



Du chromosome au gène par un criblage global des altérations génomiques dans la malignité pour isoler de nouvelles cibles thérapeutiques

Saloua Toujani

► **To cite this version:**

Saloua Toujani. Du chromosome au gène par un criblage global des altérations génomiques dans la malignité pour isoler de nouvelles cibles thérapeutiques. Génétique. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. <NNT : 2012PA11T027>. <tel-01084902>

HAL Id: tel-01084902

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01084902>

Submitted on 20 Nov 2014

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

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

**UNIVERSITE PARIS 11
FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD**

Année 2012

Numéro attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 11

Discipline : Génétique cellulaire et moléculaire

Ecole Doctorale de rattachement : Cancérologie

Présentée par **Saloua Toujani**

Soutenue publiquement le 5 Juin 2012

**DU CHROMOSOME AU GENE PAR UN CRIBLAGE GLOBAL DES
ALTERATIONS GENOMIQUES DANS LA MALIGNITE POUR ISOLER
DE NOUVELLES CIBLES THERAPEUTIQUES**

Thèse dirigée par Monsieur le Docteur Alain Bernheim

Jury

Monsieur le Pr Gérard Tachdjian	Président
Monsieur le Pr Marc Fellous	Rapporteur
Monsieur le Pr Serge Romana	Rapporteur
Monsieur le Pr Pierre Fouret	Examineur
Monsieur le Pr Martin Schlumberger	Examineur
Monsieur le Pr Ali Turhan	Examineur
Monsieur le Dr Alain Bernheim	Directeur de thèse

Remerciements

J'exprime tout d'abord ma gratitude envers le Professeur Gérard Tachdjian, qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider le jury de cette thèse.

Je remercie profondément les Professeurs Marc Fellous et Serge Romana d'avoir accepté la lourde tâche d'être rapporteurs de ce travail.

Je suis également très reconnaissante envers les Professeurs Martin Schlumberger et Ali Turhan, pour avoir eu la gentillesse d'examiner ce travail.

Je suis infiniment reconnaissante au Professeur Pierre Fouret de sa collaboration et de son aide à l'élaboration d'une partie de ce travail. Je rends hommage à l'intuition, l'esprit critique et la qualité scientifique avec lesquels il a dirigé une partie de mes travaux. Son esprit scientifique et la rigueur de son travail resteront pour moi un exemple.

Toute ma reconnaissance va au Docteur Alain Bernheim, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe, pour son encadrement fait de qualités scientifiques et humaines, et pour avoir toujours été disponible lorsque j'avais besoin de son aide. Merci pour votre confiance et pour votre patience. Merci aussi pour votre correction attentive de ce manuscrit.

Je voudrais également remercier toute l'équipe de l'Unité de Génomique Fonctionnelle de l'IGR et en particulier le Docteur Vladimire Lazare et le Docteur Philippe Dessen.

Mes remerciements vont également à toute l'équipe de cytogénétique d'Antoine Bécère en particulier le Pr Gérard Tachdjian et le Docteur Sophie Brisset pour l'aide et l'encouragement qui m'ont apporté durant cette thèse.

Je tiens à remercier également le Dr Christine Pérot pour son aide et sa compréhension. Mes remerciements vont également au Docteur Franck Viguié. Merci Franck pour les articles que tu m'as fournis et pour les moments de discussion qu'on a pu échanger.

Je remercie également l'équipe de cytogénétique de l'IGR. Mes remerciements vont en particulier à Bernard Clause, Philippe Léopoldi, Didier Fauvet, Caroline De Bois Gachi et Bernadette Léon.

Un grand merci au Docteur Alexander Valent pour sa collaboration durant ce travail.

Je remercie également le personnel du département de Biopathologie et du service d'Hématologie de l'IGR de m'avoir accueillie pour réaliser une partie de mes travaux de thèse.

Je remercie également le Docteur Filippo Rosselli de m'avoir accueilli au sein de l'ancienne FRE2939.

Je voudrais également remercier chaleureusement le Docteur Gisèle Danglot pour son aide, sa collaboration et sa gentillesse.

Merci à Françoise Dessarps pour son aide et sa gentillesse.

Merci à Françoise Royer et Christelle Bouchot, pour leur aide logistique.

Je voudrais remercier le Docteur Olivier Bernard de m'avoir accueilli au sein de son équipe au milieu de ma 3^{ème} année.

Merci à toute l'équipe du Docteur Joëlle Wiels pour les lignées cellulaires.

Un énorme merci pour le personnel de la bibliothèque de l'IGR, notamment Marie-Charlotte Ruellan pour son aide et son encouragement.

Merci à mes camarades de paillasse et de bureau, Nathalie, Henriette, Roberto, Chouaib, Mouna, Zaïm, avec lesquels j'ai partagé des moments très agréables.

Merci à mes parents, mes frères et sœurs, ma grande famille, mes proches et amis, qui m'ont soutenu depuis toujours, notamment depuis mon entrée à la faculté de médecine...

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS

aCGH	CGH array
AD	Adénocarcinome
ADN	Acide désoxyribonucléique
AID	Activation induced cytidine deaminase
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adenosine triphosphate
BCL2	B-cell lymphoma gene-2
BCR	B cell receptor
BFB	Breakage-fusion-bridge
CAK	Carcinome adénoïde kystique
CBPNC	Cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules
CGH	Comparative génomique hybridization
CNA	Copy number alterations
CNV	Copy number variation
CSC	Cellule souche cancéreuse
CSH	Cellule souche hématopoïétique
DUP	Disomie uniparentale acquise
IG	Immunoglobuline
LAL	Leucémie aiguë lymphoblastique
LAM	Leucémie aiguë myéloïde
LB	Lymphome de Burkitt
LLC	Leucémie lymphoïde chronique
LOH	Loss of heterozygosity
MCR	Minimal common region
MiRNA	MicroARN
MLPA	Multiplex ligation-dependant probe amplification
MMR	Mismatch repair
NER	Nucleotide excision repair
NHEJ	Non homologous end joining
pb	Paire de base
SNP	Single nucléotide polymorphisme

TABLE DES MATIERES

PREMIERE PARTIE : CARCINOGENESE.....	10
I. Caractéristiques fonctionnelles de la cellule cancéreuse.....	14
1. Prolifération cellulaire autonome.....	14
1.1. Dysfonctionnement des signaux mitogènes.....	14
1.2. Echappement aux signaux inhibiteurs de croissance.....	18
2. Résistance à la mort cellulaire.....	23
3. Potentiel réplicatif illimité.....	29
4. Induction de l'angiogenèse.....	33
5. Capacités invasives et métastatiques.....	37
6. Métabolisme énergétique.....	41
7. Echappement au contrôle du système immunitaire.....	42
8. Microenvironnement tumoral.....	47
8.1. Cellules malignes et les cellules souches cancéreuses.....	47
8.2. Stroma tumoral.....	50
II. ALTERATIONS GENOMIQUES.....	53
1. Altérations ponctuelles de séquences.....	57
1.1. Réparation des mésappariements.....	57
1.2. Réparation par excision de nucléotides.....	58
2. Anomalies chromosomiques.....	59
2.1 Aneuploïdie.....	64
2.2 Anomalies chromosomiques équilibrées.....	67
2.3 Anomalies chromosomiques déséquilibrée.....	73
III. GENES DU CANCER.....	77
1. Gènes codants.....	77
1.1 Oncogènes.....	78
1.2 Gènes suppresseurs de tumeurs.....	79
2. MicroRNA.....	80
IV. ANOMALIES EPIGENETIQUES.....	83
V. THERAPIES CIBLEES.....	87
VI. MOYENS D'ETUDE DE L'ONCOGENOME.....	89
1. cytogénétique conventionnelle.....	89
2. cytogénétique moléculaire.....	91
3. hybridation génomique comparative.....	95
4. séquençage à haut débit.....	100
DEUXIEME PARTIE : CYTOGENOMIQUE DES LYMPHOMES DE BURKITT.....	105
I. HEMATOPOÏESE ET DIFFERENCIATION LYMPHOÏDE B PHYSIOLOGIQUE.....	108
1. Hématopoïèse.....	108
1.1. Cellule souche hématopoïétique.....	108
1.2. Régulation de l'hématopoïèse.....	109
2. Lymphopoïèse B.....	114
2.1. Lymphopoïèse B médullaire.....	115
2.2. Lymphopoïèse B périphérique.....	117
2.3. réarrangement somatique et mutations des gènes des immunoglobulines.....	120
2.4. Cellules précurseurs des LNH B.....	125

II. ASPECTS CLINICO-EPIDEMIOLOGIQUES DES LB.....	126
III. ALTERATIONS GENOMIQUES.....	130
1. Anomalie primaire.....	130
2. Anomalies quantitatives.....	133
RESULTATS ET DISCUSSION.....	136
<i>ARTICLE 1 analyse à haute résolution des altérations génomiques associées aux lymphomes de</i>	
<i>Bruît.....</i>	150
TROISIEME PARTIE : CYTOGENOMIQUES DES CARCINOMES ADENOÏDES	
KYSTIQUES.....	151
I. ASPECTS CLINIQUES.....	153
II. ASPECTS ANATOMO-PATHOLOGIQUES.....	154
1. Macroscopie.....	154
2. Histopathologie.....	154
3. Immun histochimie.....	157
III. ALTERATIONS GENOMIQUES.....	158
1. Anomalies génomiques quantitatives.....	158
2. Anomalies génomiques équilibrées.....	161
IV. ANOMALIES DE LA SIGNATURE D'EXPRESSION.....	164
V. ALTERATIONS EPIGENETIQUES.....	156
RESULTATS ET DISCUSSION.....	166
<i>ARTICLE 2 analyse de haute résolution des altérations génomiques associées aux carcinomes</i>	
<i>Adénoïdes kystiques.....</i>	171
QUATRIEME PARTIE: CYTOGENOMIQUE DES ADENOCARCINOMES PULMONAIRE	
DES NON FUMEURS.....	172
I. CARACTERISTIQUES CLINIQUES ET HISTOPATHOLOGIQUES.....	174
1. Aspects cliniques.....	174
2. Aspects histopathologiques.....	175
II. FACTEURS GENETIQUES DE PREDISPOSITION.....	176
1. Antécédents familiaux de cancer du poumon.....	176
2. Marqueurs génétiques de prédisposition.....	177
III. CARACTERISTIQUES GENOMIQUES SOMATIQUES.....	178
1. Altérations génomiques quantitatives.....	178
2. Altérations génomiques équilibrées.....	179
2.1. Inv(2)(p21p23).....	179
2.2. Inv(10)(p11.2q11.2).....	181
2.3. Translocations t(6;V)(q22/ ROS1;V).....	183
3. Mutations ponctuelles.....	184
3.1 Anomalies de l' <i>EGFR</i>	184
3.2 Mutations <i>KRAS</i>	186
3.3 Autres mutations.....	186
4. Conclusion.....	186
RESULTATS ET DISCUSSION.....	188
<i>ARTICLE 3 Altérations génomiques dans les adénocarcinomes pulmonaires des non</i>	
<i>fumeurs.....</i>	193
DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION.....	194
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	202
ANNEXES.....	254

TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX

FIGURES

Figure 1 : Réseau de signalisation des récepteurs EGFR et leurs ligands.....	17
Figure 2 : Régulation de la voie pRB.....	19
Figure 3 : Interconnexions des voies pRB et MYC.....	21
Figure 4 : Interconnexion des voies pRB et p53.....	23
Figure 5 : Voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose.....	26
Figure 6 : Structure des télomères.....	30
Figure 7 : Rôle du complexe « shelterin » dans la protection des télomères.....	31
Figure 8 : Voie VEGF.....	33
Figure 9 : Voie HIF1.....	35
Figure 10 : Structure de l'E-cadhérine.....	38
Figure 11 : Étapes de la cascade invasion-métastase.....	39
Figure 12 : Principe « d'immunoediting » dans le cancer.....	45
Figure 13 : Modèles d'hétérogénéité tumorale.....	48
Figure 14: Interaction des cellules stromales et tumorales.....	52
Figure 15 : Lignage des cellules somatiques depuis la naissance de la première cellule après conception jusqu'à l'apparition de la première cellule dans une tumeur.....	53
Figure 16 : Chromothripsis.....	55
Figure 17 : Checkpoint mitotique.....	64
Figure 18 : Mécanismes d'inactivation d'un gène suppresseur de tumeurs.....	65
Figure 19 : Les deux premières translocations associées aux hémopathies malignes	67
Figure 20 : Gène de fusion BCR-ABL.....	68
Figure 21 : Gène MYC dérégulé par la translocation t(8;14).....	69
Figure 22 : anomalie de la réparation des cassures DSB.....	70
Figure 23 : Aspects cytogénétiques de l'amplification génique.....	74
Figure 24 : Érosion des télomères et genèse du cycle BFB.....	75
Figure 25 : Synthèse des miRNA.....	80
Figure 26 : Cluster des locus INK4A-ARF-INK4B et ANRIL.....	82
Figure 27 : Caryotype complexe en 24 couleurs d'un cancer ovarien.....	93
Figure 28 : Principes de l'aCGH et des SNP array.....	97
Figure 29 : Exemple de séquence d'une tumeur.....	103
Figure 30 : Les différents modèles de l'hématopoïèse.....	109
Figure 31 : Modèles des niches hématopoïétiques.....	110
Figure 32 : Principaux facteurs de transcription impliqués dans le contrôle de l'hématopoïèse...	112

Figure 33 : Régulation de l'hématopoïèse par les miRNA.....	114
Figure 34 : Lymphopoïèse B médullaire.....	116
Figure 35 : Lymphopoïèse B périphérique.....	118
Figure 36 : Organisation des gènes des immunoglobulines.....	121
Figure 37 : Étapes de la recombinaison V(D)J.....	123
Figure 38 : Commutation de classe isotypique des gènes des immunoglobulines (une commutation IgA est schématisée).....	124
Figure 39 : Distribution des LNH chez l'adulte et l'enfant.....	128
Figure 40 : Aspects morphologiques des LB.....	129
Figure 41 : Immunophénotypage des LB.....	130
Figure 42 : Cartographie des points de cassure sur les locus IGH et MYC.....	132
Figure 43 : Procédures d'amplification de l'ARNc.....	142
Figure 44 : Différents types histologiques de carcinomes adénoïde kystique.....	156
Figure 45 : Immunomarquage des cellules des CAK.....	158
Figure 46 : Translocation t(6;9)(q23;p23p24).....	164
Figure 47 : Carcinome bronchoalvéolaire.....	176
Figure 48 : Gène de fusion EML4-ALK.....	181
Figure 49 : Gène de fusion KIF5B-RET.....	182
Figure 50 : Amplification du gène EGFR.....	185

TABLEAUX

Tableau 1 : Exemples d'anomalies chromosomiques dans les hémopathies malignes.....	60
Tableau 2 : Exemple d'anomalies épigénétiques associées aux cancers.....	87
Tableau 3 : Exemples de thérapie ciblée dans les cancers.....	88
Tableau 4 : Comparaison des différentes méthodes d'étude de l'oncogénome.....	104
Tableau 5 : Classification OMS des hémopathies lymphoïdes B matures.....	127
Tableau 6 : Taux des transcrits de la région 1q21.....	144
Tableau 7 : Taux de transcrit de MYC.....	145
Tableau 8 : Taux des transcrits du mir-17-92.....	146
Tableau 9 : Taux du transcrit de FHIT.....	147
Tableau 10 : Taux des transcrits des gènes CDKN2A et CDK2B.....	147
Tableau 11 : Taux des transcrits des gènes TP53 et MDM2.....	148
Tableau 12 : Classification OMS des glandes salivaires.....	154
Tableau 13 : Immunohistochimie des CAK.....	157
Tableau 14 : Altérations de nombre de copies dans les CAK rapportées dans la littérature.....	160

Partie 1 : La carcinogenèse

Les premiers concepts soulignant le rôle central des altérations génomiques dans la survenue du cancer ont émergé vers la fin du 19^{ème} et le début des 20 siècles grâce aux travaux de David Von Hansemann [1890] et Theodor Boveri [1914]. En examinant au microscope des mitoses de cellules cancéreuses, ils constataient la présence de remaniements chromosomiques. Ainsi, ils posaient l'hypothèse que le cancer fût un ensemble de cellules anormales ayant des anomalies acquises du matériel chromosomique, probablement vecteur de l'hérédité. Suite à la découverte de l'ADN comme étant la molécule du support de l'hérédité [Avery et al., 1944], puis la caractérisation de sa structure par Watson et Crick en 1953, cette thèse était appuyée par la démonstration que les agents génotoxiques, provoquant des mutations, favorisaient le développement du cancer. Ultérieurement, en 1956 Tjio et Levan montraient que l'homme avait 46 chromosomes, alors que la valeur retenue jusque là était de 48 chromosomes. En 1960 Nowell et Hungerford découvraient un chromosome remanié appartenant au groupe G dans les cellules de moelle osseuse de sujets atteints de leucémie myéloïde chronique (LMC). Cette anomalie chromosomique, appelée depuis chromosome Philadelphie (Ph), est restreinte aux seules cellules leucémiques puisqu'elle n'est pas détectée dans lymphocytes T cultivés en présence de phytohémagglutinine (PHA) de ces patients et est donc acquise. Ces découvertes initiaient le concept que des altérations chromosomiques peuvent être spécifiques d'un type de prolifération maligne. Ces anomalies chromosomiques se révélaient acquises, c'est à dire limitées aux cellules malignes et clonales c'est à dire provenant en règle d'une seule cellule.

A partir de 1970, l'introduction de la technique des bandes chromosomiques permettait de démontrer que le Ph était le dérivé d'une translocation $t(9;22)(q34;q11)$ [Rowley, 1973a]. L'évolution clonale chromosomique, d'abord décrite par Lejeune et Berger [Lejeune and Berger, 1963] était observée lors de la transformation aiguë de LMC [Mitelman et al., 1976]. D'autres altérations chromosomiques « non aléatoires » étaient décrites, comme récurrentes au sein d'un groupe de tumeurs, voire même spécifiques d'un type de cancer [Berger, 2007 ; Rowley, 2008].

En 1972, Manolov et Manolova rapportaient sur les caryotypes de tumeurs de lymphome de Burkitt (LB), un chromosome 14q+, qui était identifié ultérieurement comme une translocation $t(8;14)(q24;q32)$ par Zech en 1976 [Zech et al., 1976]. En 1979, les

translocations variantes de la t(8;14) : t(2;8)(p12;q24) et t(8;22)(q24;q11) étaient décrites [Van Den Berghe ; 1979 ; Berger et al., 1979].

Ces translocations variantes montraient que 8q24 étant commun aux trois translocations [Bernheim et al., 1980, 1981, 1983] ce qui conduisait à l'hypothèse d'un facteur transformant identique. La localisation des gènes immunoglobulines (IG) sur les chromosomes 2p12, 14q32 et 22q11, suggérait un effet de position du facteur transformant en 8q24, à l'époque inconnue [Lenoir et al., 1981, 1982]. Cette hypothèse était ultérieurement vérifiée par le clonage de *MYC* localisé en 8q24, similaire à l'oncogène de la myélocytose aviaire virale 29 (v-myc) [Taub et al., 1982]. Ce gène présent à l'état normal chez l'homme était baptisé proto-oncogène cellulaire. L'effet de position postulé alors, se révèle toujours exact et semble être du aux enhanceurs des gènes des IG.

L'hypothèse de gènes impliqués dans des translocations récurrentes était vérifiée et élargie aux gènes de fusions donnant naissance à des transcrits chimériques. Le chromosome Philadelphie en est devenu le paradigme avec sa translocation entraînant la fusion de BCR/22q11 avec ABL/9q34 dont la tyrosine kinase devient constitutivement activée. La découverte d'un inhibiteur spécifique de cette kinase qui entraînait l'apoptose des cellules Ph⁺ et donc la rémission complète des malades, apportait la démonstration complète du rôle majeur dans l'oncogenèse que jouaient les remaniements chromosomiques de structure.

Parallèlement il était démontré que la transfection des cellules NIH3T3 phénotypiquement normales par de l'ADN total en provenance d'une tumeur humaine, pouvait transformer ces dernières en cellules cancéreuses [Krontiris and Cooper, 1981; Shih et al., 1981]. L'isolement de la séquence d'ADN à l'origine de cette activité transformante a permis l'identification de la première mutation somatique de l'oncogène HRAS [Reddy et al., 1982; Tabin et al., 1982].

Virtuellement toutes les cellules de l'organisme en prolifération peuvent être le siège d'une transformation maligne [Hanahan and Weinberg, 2000]. Le cancer le plus fréquent est le carcinome, d'origine épithéliale. Le carcinome squameux dérive de l'épithélium de revêtement, alors que l'adénocarcinome naît de l'épithélium glandulaire. Dans les autres proliférations malignes non épithéliales, les sarcomes proviennent du mésenchyme, les hémopathies malignes naissent à partir des progéniteurs sanguins ou du système immunitaire et les tumeurs neuro-ectodermiques proviennent du système nerveux. Un certain nombre de cancers n'obéissent pas à cette classification car la cellule tumorale étant dédifférenciée, son origine reste difficile à déterminer [Hanahan and Weinberg, 2000].

Bien qu'elles soient phénotypiquement hétérogènes, ces tumeurs répondent généralement au même processus de carcinogenèse. Chaque tumeur est la résultante d'un processus de développement multi-étapes intéressant une population cellulaire au sein d'un micro environnement fournie par le tissu d'origine [Stratton et al., 2009]. Dans ce modèle de développement, la survenue d'un cancer repose sur 2 critères, l'acquisition continue de mutations plus au moins aléatoire dans le génome de chaque cellule et la sélection qui s'opère sur la diversité phénotypique conséquent. La sélection pourrait éliminer des cellules ayant acquis des mutations délétères, on parle alors de sélection négative, ou renforcer la multiplication des cellules ayant acquis des mutations leur permettant de proliférer et survivre par rapport aux cellules voisines, on parle alors de sélection positive [Stratton et al., 2009]. Chez l'homme, probablement un millier de cellules arrivent à survivre à ce processus et la majorité d'entre elles ont un potentiel de croissance limité. Néanmoins et très occasionnellement, une cellule acquiert une série de mutations suffisamment avantageuses lui permettant : de proliférer d'une manière autonome, d'envahir les tissus adjacents et de donner des métastases.

Mon travail a consisté à étudier les altérations génomiques associées à la malignité. Dans le premier chapitre de l'introduction, je décrirai les caractéristiques fonctionnelles de la cellule cancéreuse. Dans le second chapitre de l'introduction je rapporterai l'état des connaissances actuelles sur les altérations génomiques associées aux cancers et leurs mécanismes de genèse. Enfin dans le troisième chapitre, je détaillerai les différentes méthodes d'études de ces anomalies.

I. Caractéristiques fonctionnelles de la cellule cancéreuse

En 2000, Hanahan and Weinberg proposaient 6 « sceaux » marquant la progression multiétape de la carcinogenèse et l'expression de la malignité. Ces 6 sceaux étaient : la signalisation propre à une prolifération soutenue, l'effondrement de l'activité des suppresseurs de croissance, la résistance à la mort cellulaire, la capacité à une immortalité répllicative, l'induction de l'angiogenèse et l'activation de l'invasion et la dissémination métastatique. Le progrès scientifique dans la compréhension du processus de carcinogenèse les 10 dernières années, conduisait les auteurs [Hanahan and Weinberg, 2011] à introduire 3 autres sceaux : l'inflammation, la reprogrammation du métabolisme énergétique et la perte de la réponse immune.

1. Prolifération cellulaire autonome

Une prolifération illimitée dans le temps est le trait fondamental de la cellule cancéreuse. La prolifération et la croissance d'un tissu normal dépendent d'un équilibre entre 2 types de signaux. L'entrée en cycle des cellules est sous le contrôle de signaux mitogènes. En revanche, l'arrêt de la division cellulaire résulte de la mise en place d'une cascade de protéines qui supprime la multiplication cellulaire. Le cancer correspond à une rupture de cet équilibre.

1.1. Dysfonctionnement des signaux mitogènes

Les cellules normales requièrent des signaux mitogènes pour quitter le stade de quiescence et entrer en cycle cellulaire. Ces signaux sont transmis à la cellule via des récepteurs membranaires qui se lient à des différentes classes de ligands tels que les facteurs de croissance solubles, les composants ancrés dans la matrice extra-cellulaire et les signaux provenant des cellules adjacentes. Aucune prolifération cellulaire normale ne peut se concevoir en l'absence de ces signaux mitogènes [Hanahan and Weinberg, 2000] (**Figure 1**). A la différence, les cellules tumorales présentent une faible dépendance par rapport à ces signaux mitogènes. Une des raisons avancées pour expliquer cette indépendance, est que plusieurs cellules tumorales acquièrent l'aptitude de synthétiser elles même des facteurs de croissance qui une fois largués vont se lier à des récepteurs congénères, initiant ainsi une boucle de régulation autocrine [Fedi et al., 1997]. La production de PDGF ("*platelet-derived growth factor*") et TGF α ("*tumor growth factor α* ") par le glioblastome et le sarcome respectivement [Fedi et al., 1997] illustre ce type de mécanisme. Les cellules cancéreuses

peuvent également puiser ces facteurs de croissance dans le micro-environnement tumoral. Elles envoient des signaux pour stimuler les cellules stromales, qui à leurs tours vont répondre en synthétisant des facteurs de croissance d'où un mécanisme de régulation paracrine [Bhowmick et al., 2004; Cheng et al., 2008].

Les récepteurs membranaires qui transmettent le signal mitogène à l'intérieur de la cellule peuvent être dérégulés durant le processus d'oncogenèse [Hanahan and Weinberg, 2000]. La partie intra-cytoplasmique de ces récepteurs contient souvent un domaine qui a une activité tyrosine kinase (**Figure 1**). Plusieurs récepteurs comme le récepteur à l'EGF ("*epidermal growth factor*" ; **Figure 1**), sont exprimés à des taux faibles à l'état de base [Hanahan and Weinberg, 2000]. En revanche, dans plusieurs types de cancers, un certain nombre de ces récepteurs sont sur-exprimés, c'est l'exemple de l'EGFR ou de son apparenté ERBB2/HER2/neu. Cette sur-expression semble rendre la cellule tumorale hypersensible à des taux faibles de signaux mitogènes qui à des taux similaires n'induisent pas de prolifération dans les conditions physiologiques [Fedi et al., 1997]. Cette surexpression de récepteurs est souvent secondaire à une amplification ou une dérégulation de la transcription des gènes codants pour ces récepteurs. Des mutations dans les gènes codants pour ces récepteurs peuvent aboutir à une activation constitutive de ces protéines [DiFiore et al., 1987]. Par exemple les mutations du gène de l'EGFR à l'origine de formes tronquées de la protéine résultent en une activation constitutive de ce récepteur [Fedi et al., 1997] (**Figure 1**).

Le complexe récepteur tyrosine kinase-ligand une fois dans le cytoplasme va induire une cascade de signalisation impliquant des médiateurs intracellulaires (**Figure 1**). L'acquisition d'une prolifération cellulaire autonome par les cellules cancéreuses peut être secondaire à une dérégulation de ces médiateurs [Hanahan and Weinberg 2011]. La voie la plus couramment impliquée dans les cancers est la voie: RAS-RAF-MAPK. Une altération de la protéine RAS est retrouvée dans plus de 30% des cancers (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>). Des mutations ponctuelles de RAS vont compromettre l'activité de l'oncoprotéine Ras GTPase qui normalement agit dans une boucle de rétrocontrôle et induit un signal d'activation transitoire. L'action de la protéine PI3K ("*phosphatidylinositol-3-OH-kinase*"), qui agit en aval de RAS induit une multiplication et une croissance cellulaire, est contrôlée par PTEN ("*phosphatase and tensin homolog*"). Une perte de l'expression du gène *PTEN*, qui entraîne une amplification du signal la protéine PI3K, est observée dans des tumeurs humaines [Jiang and Liu, 2009; Yuan and Cantley 2008].

Ce dysfonctionnement des signaux mitogènes va stimuler la prolifération cellulaire et induit donc une croissance tumorale. Néanmoins, des études récentes ont rapporté qu'une surexpression de certaines onco-protéines comme RAS va induire une sénescence et/ou une apoptose cellulaire [Collado and Serrano, 2010; Lowe et al., 2004]. Ces réponses cellulaires, en apparence paradoxales, semblent refléter un mécanisme intrinsèque de défense cellulaire: les cellules ayant une surexpression des signaux mitogènes seront éliminées. Dans une cellule cancéreuse donnée, la surexpression relative d'un oncogène traduit un compromis entre une surexpression maximale de cet oncogène et l'échappement aux mécanismes de défense cellulaire. Dans d'autres types de cancers, les cellules peuvent s'adapter à des taux élevés d'oncoprotéine en inhibant les voies qui déclenchent la sénescence et /ou l' apoptose.

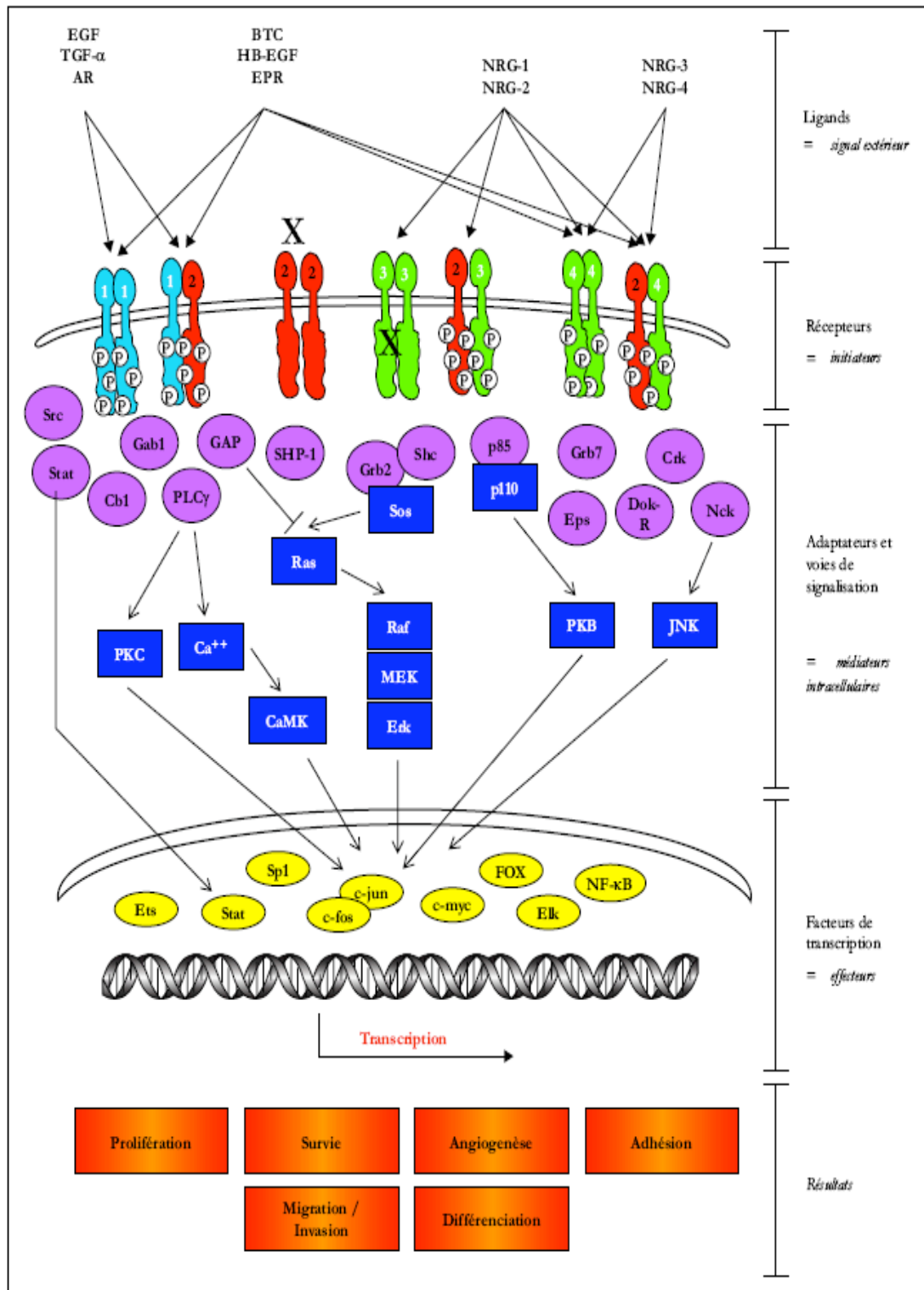


Figure 1 : Réseau de signalisation des récepteurs EGFR et leurs ligands. Ces derniers se lient à leurs récepteurs (numérotés de 1 à 4), entraînant la formation de différents dimères. ErbB2 ne possède pas de ligand (visualisé par une croix) et ErbB3 est dépourvu d'activité kinase (indiqué par une croix). Après activation et phosphorylation des récepteurs, plusieurs molécules adaptatrices (exemple : Grb2, p85) ou dotées d'activité enzymatique (exemple : Src) sont recrutées. Elles vont ensuite activer d'autres diverses voies de signalisation (entre autres la voie MAP kinase représentée ici par la cascade Ras-Raf-MEK-Erk, ou la voie PI3K avec la p110 et PKB), ce qui aboutit à l'activation de différents facteurs de transcription (exemple : MYC, NF-KB). D'après [Holbro and Hynes, 2004].

1.2. Echappement aux signaux inhibiteurs de croissance

Dans un tissu normal, plusieurs signaux inhibiteurs de croissance opèrent pour maintenir les cellules en état de quiescence et les tissus en état d'homéostasie. Ces signaux inhibiteurs de croissance peuvent être des facteurs solubles, des éléments immobiles ancrés dans la matrice extracellulaire ou bien des signaux en provenance des cellules adjacentes. Par des approches expérimentales réalisées notamment chez la souris, plusieurs gènes ont été identifiés comme suppresseurs de tumeurs. Les 2 gènes prototypes codent pour les protéines RB ("*retinoblastoma*") et p53. Elles agissent comme des molécules clés dans 2 circuits cellulaires complémentaires qui régulent la prolifération et les programmes de sénescence (activation de *TP53* et *RB*) et d'apoptose (activation de *TP53*) [Sharpless and DePinho, 2007].

a. Voie pRB

Sous sa forme hypophosphorylée, la protéine RB inhibe la prolifération des cellules en les bloquant en phase G1. En revanche, elle perd cette propriété quand elle devient hyperphosphorylée [Weinberg, 1995; Classon and Harlow, 2002] (**Figure 2**). Cette double fonction s'exerce grâce à un groupe de facteurs de transcription: E2Fs. L'action des *cyclin-dependant kinase 4* (CDK4) et *cyclin-dependant kinase 6* (CDK6) assure l'hypophosphorylation de RB. Dans ces conditions, ce dernier se lie aux facteurs de transcription E2Fs dont le domaine de transactivation se trouve ainsi bloqué. D'une manière simultanée, RB va recruter d'autres protéines qui sont des répresseurs de la transcription c'est l'exemple des histones désacétylase ("*histone deacetylase*"; HDAC) lesquelles vont remodeler la chromatine qui prend une configuration incompatible avec une transcription active.

Sous sa forme hyperphosphorylé, RB se dissocie alors des protéines E2Fs. Ces dernières vont activer la transcription des gènes cibles dont les produits vont assurer la transition vers la phase S et donc la prolifération cellulaire. Les protéines E2Fs activent également la transcription de la cycline E qui s'associe à son partenaire CDK2 et le complexe E-CDK2 maintient RB dans son état hyperphosphorylé donc dans un état inactif favorable à la prolifération cellulaire.

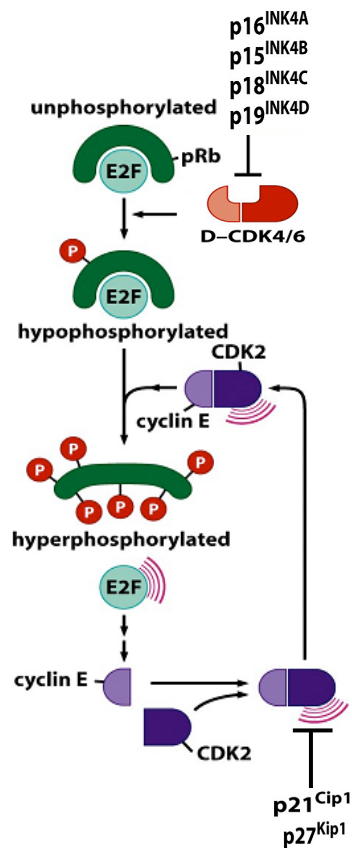


Figure 2: Régulation de la voie pRB. Les cyclines CDK4/6 transforment la protéine RB d'un état non phosphorylé à un état hypophosphorylé. Les protéines p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C} et p19^{INK4D} inhibent l'action des CDK4/6. Le complexe Cycline E-CDK2 entraîne une hyperphosphorylation de RB qui se dissocie alors des facteurs de transcription E2Fs. Les protéines p21^{Cip1} et p27^{Kip1} inhibent l'action du complexe E-CDK2. D'après [The Biology of Cancer (Garland Science 2007)].

La voie pRB est soumise à des signaux extra et intracellulaires et en réponse à ces signaux, la division cellulaire peut être soit stimulée soit inhibée [Burkhart and Sage, 2008]. Un signal mitogène transduit *via* RAS aboutit à une hypo et éventuellement une hyper phosphorylation de RB. Cette phosphorylation est initiée par l'activation de l'expression des gènes codant pour les cyclines de type D (D1, D2 et D3), notamment la cycline D1 [Hanahan and Weinberg, 2000]. Ceci a pour conséquence une synthèse et une accumulation nucléaire des protéines CDK4 et CDK6 qui assurent la phosphorylation de RB en phase G1, devenant alors un substrat pour l'action des protéines E-CDK2. [Harbour et al., 1999]. Les altérations génomiques des régulateurs de la phase G1/S a largement été rapportées dans les cancers chez l'homme [Malumbers and Barbacid, 2009]. Les cyclines de la phase G1

notamment D1 et E1 et leurs partenaires CDK4 et CDK6 sont surexprimées, leurs gènes correspondants sont mutés ou amplifiés dans une grande variété de cancers. L'activité des CDK est régulée par 2 familles de protéines inhibitrices ("*CDK inhibitors*", CDKI). La première famille comprend les protéines INK4 ("*inhibitor of cyclin-dependant kinase 4*") : INK4A ou p16/CDKN2A, INK4B ou p15/CDKN2B, INK4C ou p18/CDKN2C et INK4D ou p19/CDKN2D. Le cluster de gène INK4A-ARF-INK4B, étendue sur 42 Kb, est localisé sur la région 9p21.3. La seconde famille comprend les protéines p21^{CIP1}, p27^{KIP1} et p57^{KIP2}. La baisse de l'expression de l'ensemble des inhibiteurs des CDK dans les cancers chez l'homme a été attribuée à des anomalies génétiques et épigénétique [Burkhart and Sage, 2008 ; Harbour and Dean, 2000 ; Malumbers and Barbacid, 2009]. Des délétions ou des mutations du locus *RB/13q14*, qui affectent directement la voie pRB, ont fréquemment été rapportées dans les cancers. De plus, l'inactivation de RB aboutit à une dissociation du complexe RB-E2F, ce qui a pour conséquence une accumulation des protéines E2F qui vont activer leurs gènes cibles. Des amplifications du locus *E2F3/ 6p22* ont été rapportées dans plus de la moitié des cas du rétinoblastome [Chen et al., 2001; Grasmann et al., 2005 ; Orlic et al., 2006]. Des mutations de *RB* ont été rapportées dans plus de 90% des cancers pulmonaires à petites cellules et plusieurs d'entre eux présentent une surexpression des protéines E2F1 ou E2F3 [Wikenheiser-Brokamp, 2006].

Le facteur de transcription MYC interagit indirectement avec la voie pRB. MYC stimule l'expression du gène *CDK4*, et d'une manière simultanée va séquestrer la protéine p27^{Kip1} ce qui augmente le taux des cyclines E-CDK2, d'où une hyperphosphorylation de RB et donc une augmentation de la multiplication cellulaire. L'hétérodimère MYC-Miz-1 réprime l'expression des gènes p15^{INK4B} et p21^{cip1}. En prévenant l'expression des ces 2 derniers gènes, MYC rend la cellule résistante aux facteurs inhibiteurs de croissance dont TGFβ ("*tumor growth factor*"). Ce dernier se lie à son récepteur spécifique dont le domaine cytoplasmique a une activité sérine/thréonine kinase. La signalisation *via* la voie TGFβ entraîne la phosphorylation de la protéine Smad2 (ou Smad3) qui se lie alors à son partenaire Smad4. L'hétérodimère Smad2-Smad4 résultant passe alors dans le noyau où il s'associe à la protéine Miz-1 et l'ensemble va activer l'expression des p15^{INK4B} et p21^{cip1}. Dans une cellule normale, TGFβ empêche MYC d'accéder aux promoteurs de ces gènes. En effet, La protéine Smad3 en se liant au promoteur de MYC, va inhiber l'expression de ce dernier (**Figure 3**). Bien que la voie TGFβ soit connue par son rôle inhibiteur de la prolifération cellulaire, néanmoins dans plusieurs cancers, et à un stade avancé de la maladie, cette même voie peut favoriser la transition épithélio-mésenchymateuse

("epithelial-mesenchymal transition", EMT) et donc accroître le potentiel invasif de la tumeur [Giampieri et al., 2009]. Ce processus d'EMT sera abordé dans le paragraphe capacités invasives et métastatiques.

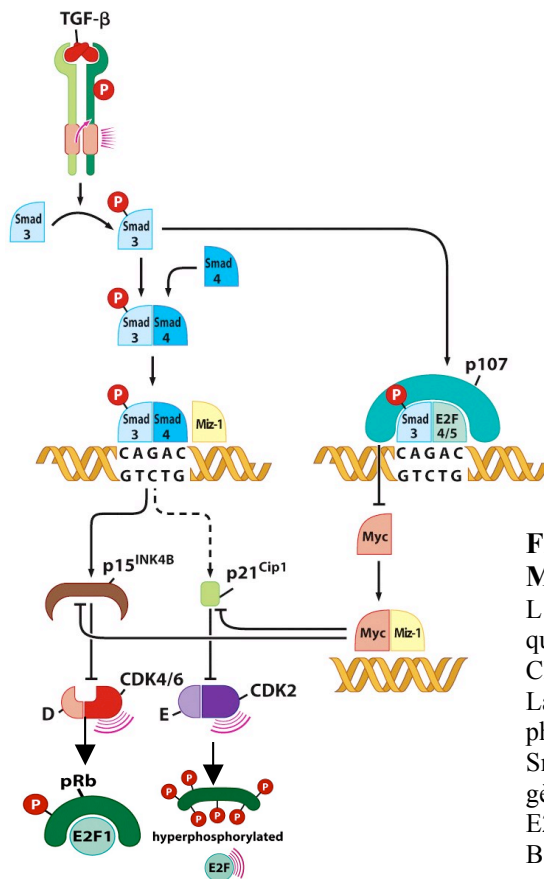


Figure 3 : Interconnexions des voies pRB et MYC. MYC interagit indirectement avec RB. L'hétérodimère MYC-Miz1 inhibe p15^{INK4B} et p21^{CIP1} ce qui augmente les taux des cyclines CDK4/CDK6 et E-CDK2. Ceci aboutit à une hyperphosphorylation de RB. La signalisation la voie TGFβ entraîne la phosphorylation de Smad3. L'hétérodimère Smad3-Smad4 s'associe à Miz-1 et active la transcription des gènes p15^{INK4B} et p21^{CIP1}. Le complexe p107-Smad3-E2F inhibe la transcription de MYC. D'après [The Biology of Cancer (Garland Science 2007)].

b. Voie p53

A l'inverse de la voie pRB qui intègre des signaux inhibiteurs de croissance provenant en majorité de l'extérieur de la cellule, celle impliquant p53 reçoit plutôt des signaux intrinsèques. En effet, en cas de dysfonctionnement des signaux mitogènes ou de stress cellulaire physiologique (exemple: anoxie ou dommage de l'ADN), la voie p53 est activée. En réponse à ces divers stimulus la protéine p53 qui est un facteur de transcription va, soit bloquer le cycle cellulaire en induisant l'expression du gène p21^{cip1}, inhibiteurs des CDK, soit déclencher l'apoptose en stimulant l'expression de protéines pro-apoptotiques. L'activation de p53 passe par la stabilisation de son taux cytoplasmique. Ce taux est contrôlé

par *MDM2* ("*murine double minute-2*") qui est un gène cible de la voie p53. La protéine MDM2 se lie au facteur de transcription p53 et l'empêche d'accéder à ses gènes cibles. En conséquence, MDM2 entraîne une ubiquitinylation de p53 d'où sa dégradation le protéasome. Le locus INK4A-ARF-INK4B/9p21.3 a la capacité de contrôler les voies p53 et pRB [Polager and Ginsberg, 2009] (**Figure 4**). Les 2 protéines p15^{INK4B} et p16^{INK4A}, codées par le même cluster de gène, inhibent CDK4 et CDK6, et renforcent ainsi la fonction de suppression de prolifération cellulaire de pRB. Le gène ARF, localisé en 9p21.3, est exprimé à partir d'un promoteur distinct, il est donc une phase de lecture alternative de p16^{INK4A} ("*alternative reading frame*", ARF). La protéine ARF se fixe et inhibe l'activité de l'oncoprotéine MDM2 et stabilise donc la protéine p53.

La dérégulation de la voie p53 est un évènement récurrent dans les cancers. Même si la protéine p53 n'est pas mutée, ses éléments de régulations, comme ARF, sont souvent altérés dans les cancers [Polager and Ginsberg, 2009]. Dans presque la moitié de ces tumeurs, la protéine p53 elle-même est altérée secondairement à des mutations du gène *TP53*. Dans ces tumeurs, ces mutants p53 jouent le rôle de dominant négatif [Hanahan and Weinberg, 2011]. Dans la moitié restante des cancers, le fonctionnement de la protéine p53 est compromis en raison de, soit l'absence du gène p16^{INK4A}/ARF (délétion ou méthylation), soit d'une sur-expression de la protéine MDM2 (amplification génique). L'altération de l'un des composants de la voie p53 peut indirectement aboutir à un dysfonctionnement de cette protéine.

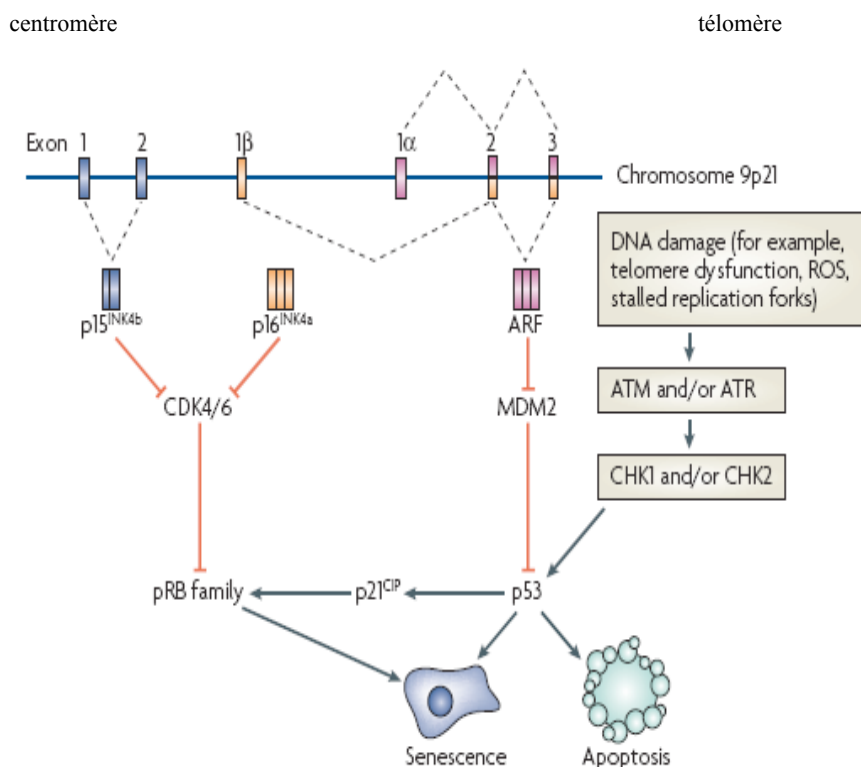


Figure 4 : Interconnexion des voies pRB et p53 : Le cluster INK4B-ARF-INK4A, localisé en 9p21, régule les voies pRB et p53 qui contrôlent la sénescence (pRB et p53) et l'apoptose (p53). En réponse à des signaux de dommage de l'ADN, p53 peut être activé via les voies *ataxia-telangiectasia mutated* (ATM) / *ataxia-telangiectasia mutated and Rad3-related* (ATR). Les protéines p15^{INK4B} et p16^{INK4A} inhibent CDK4/6 ce qui maintient RB dans un état non phosphorylé. La protéine ARF inhibe MDM2, permet donc la stabilisation de p53. CHK1/2: checkpoint kinases-1/2; ROS: reactive oxygen species. Adapté de [Sharpless and DePinho, 2007].

2. Résistance à la mort cellulaire

La croissance d'une tumeur dépend non seulement de son index mitotique mais aussi de son taux d'atrésie. La mort cellulaire programmée par apoptose [Kerr et al., 1972] est une cause majeure de cette atrésie [Adams and Cory, 2007; Evan and Littlewood, 1998; Lowe et al., 2004]. Le programme de l'apoptose est virtuellement présent sous une forme latente dans toutes les cellules de l'organisme et implique souvent la mitochondrie [Lettre and hengartner, 2006]. Sous l'impulsion de divers signaux (exemple dommage de l'ADN, perte d'ancrage des cellules épithéliales), l'apoptose est enclenché selon un processus séquentiel multi-étape (**Figure 5**). Plusieurs signaux inducteurs d'apoptose convergent vers la mitochondrie qui en retour libère le cytochrome c, catalyseur potentiel d'apoptose. Les

effecteurs ultimes de l'apoptose sont les caspases qui sont des protéases présentes sous une forme inactive, procaspases, dans le cytoplasme. En présence du cytochrome c les procaspases se convertissent en caspases. Ces dernières vont cliver des substrats clés de la cellule. Le clivage des laminines de la membrane nucléaire est responsable de la condensation de la chromatine et l'aspect pycnotique des noyaux, caractéristique des cellules en apoptose. La protéolyse des ICDA ("inhibitor of caspase-activated Dnase") libère la Dnase qui entraîne alors une fragmentation de l'ADN. Le clivage des protéines du cytosquelette aboutit à la formation des corps apoptotiques. Les composants cellulaires résultants sont dégradés par les cellules adjacentes et des cellules phagocytaires professionnelles

Cette mort cellulaire se fait selon 2 Voies: extrinsèque et intrinsèque (**Figure 5**). Cette dernière voie est initiée par TP53 (dommages de l'ADN, un déséquilibre entre les signaux mitogène et inhibiteur de croissance, sous expression des signaux de survie, ou anoxie cellulaire) [Green and Kroemer, 2009]. En revanche, d'autres facteurs (exemple l'hypercalcémie) n'impliquant pas TP53 sont capables d'activer cette voie intrinsèque. En réponse à des signaux proapoptotiques TP53 induit l'expression de Bax, membre de la famille Bcl-2. En présence de la protéine Bax, les canaux mitochondriaux deviennent perméables (**Figure 5**) et libèrent alors le cytochrome c. Ce dernier va s'associer à la protéine Apaf-1 et forme un complexe protéique, l'apoptosome. Ce dernier va activer la caspase 9, caspase initiatrice, qui à son tour va activer d'une manière séquentielle les caspases 3, 6 et 7, caspases exécutrices puisqu'elles sont directement incriminées dans le clivage des composants clés de la cellule. L'activation des caspases est inhibée par les protéines IAPs ("*inhibitors of apoptosis*"). La protéine SmaC/DIABLO, libérée au même moment que le cytochrome c, inhibe les IAP et favorise ainsi l'activation des caspases. Les facteurs de transcription E2Fs, en particulier E2F1, active la transcription des gènes des caspases. En revanche, la kinase Akt/PKB induit la phosphorylation de la caspase 9 et inhibe ainsi son activation.

La voie extrinsèque est initiée par des signaux extracellulaires qui activent alors des récepteurs membranaires pro-apoptotiques appelés récepteurs de morts (**Figure 5**). Ces récepteurs ont en commun un domaine cytoplasmique qu'on appelle domaine de mort. Les ligands de ces récepteurs sont des membres de la famille TNF ("tumor necrosis factor") qui comprend TNF α , TRAIL et le ligand Fas (FasL). Une fois activées par la fixation de leurs ligands, le domaine de mort de ces récepteurs va s'associer et activer la protéine FADD ("*Fas-associated death domain protein*"). Le complexe DISC ("*death inducing signaling*

complex") ainsi formé, va activer les caspases 8 et moins fréquemment 10, caspases initiatrices. A leur tour ces dernières vont activer les caspases exécutrices 3, 6 et 7, ainsi la voie extrinsèque rejoint la voie intrinsèque de l'apoptose (**Figure 5**). Cette dernière voie est couramment employée par l'organisme comme barrière contre le développement du cancer.

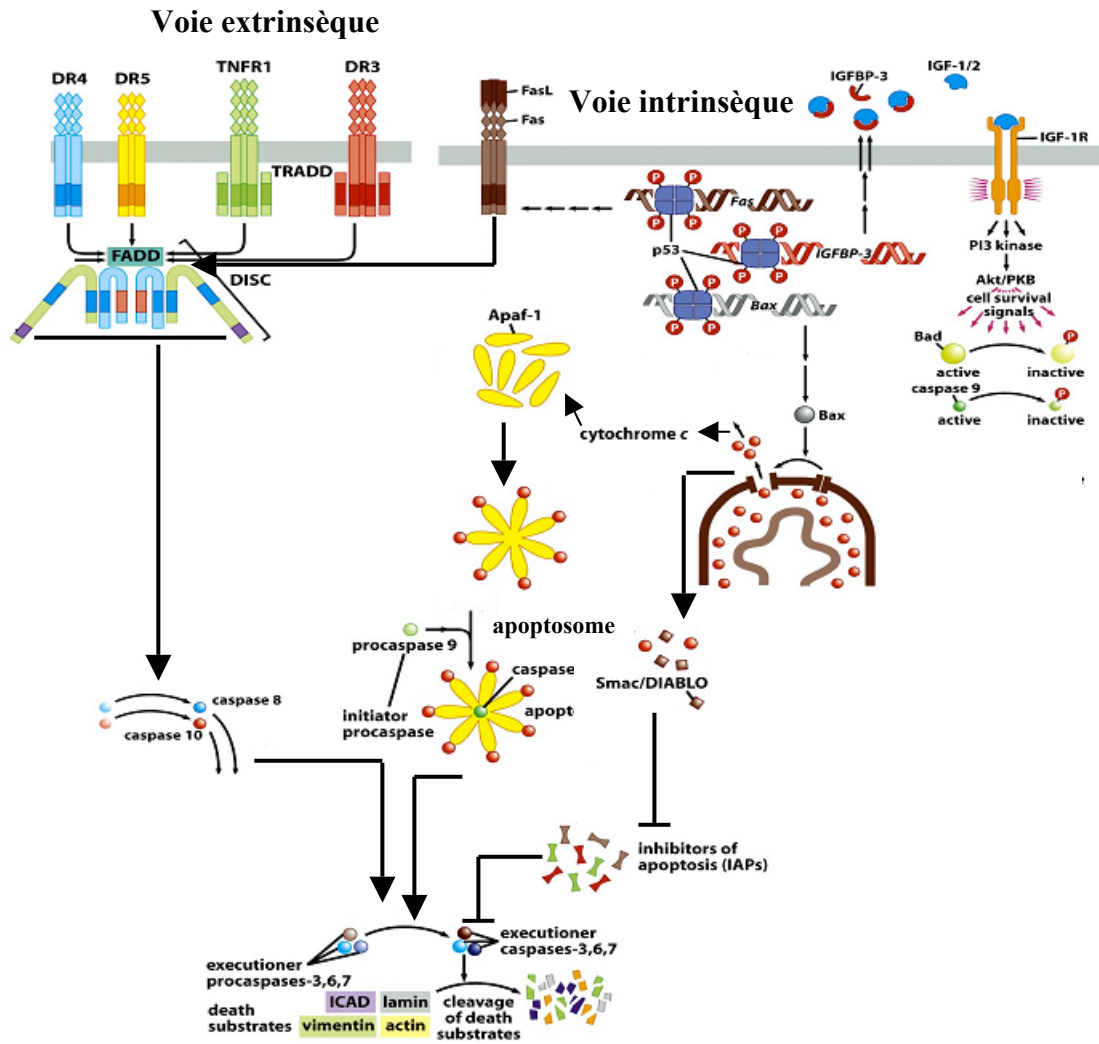


Figure 5 : Voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose. La voie intrinsèque est initiée par TP53 qui induit l'expression de Bax. En présence de Bax, la mitochondrie libère le cytochrome C. Ce dernier s'associe à la molécule Apaf-1 pour former l'apoptosome qui active la caspase 9 qui à son tour active les caspases 3, 6 et 7. Le complexe Smac/DIABLO inhibe les protéines IAP et favorise donc l'apoptose. La kinase Akt/PKB induit la phosphorylation de la caspase 9 et inhibe ainsi l'apoptose. La voie extrinsèque passe par l'activation des récepteurs de mort (Fas, DR3, DR4, DR5 et TNFR1). Le signal aboutit à l'activation des caspases 8 et 10 qui activent les caspases exécutrices 3, 6 et 7. IAP : inhibitors of apoptosis; ICAD: inhibitors of caspase-activated Dnase; DISC : death inducing signaling complex; FADD : Fas associated death domain. Adapté de [The Biology of Cancer (Garland Science 2007)].

Quelque soit la voie, le signal inducteur d'apoptose est contrôlé par un équilibre entre des protéines de la famille Bcl-2 pro apoptotiques (Bax, Bak, Bid et Bim) et anti-

apoptotiques (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Mcl-1 et A1) [Adams and Cory, 2007]. Les protéines Bcl-2 et Bcl-XL agissent en grande partie en se liant et supprimant les 2 protéines Bax et Bak. Ces 2 dernières sont ancrées sur la membrane externe mitochondriale. En l'absence de Bcl-2, Bax et Bak vont induire une rupture de la membrane externe de la mitochondrie et libèrent ainsi le cytochrome c dans le cytosol. L'interaction protéine-protéine entre les membres de la famille Bcl-2 se fait grâce un domaine commun, motif BH3. Ce même domaine permet l'interaction de cette famille Bcl-2 avec d'autres protéines dites motif BH3-unique (exemple Noxa et Puma). Plusieurs circonstances peuvent déclencher les signaux inducteurs d'apoptose. Par exemple, une hyperactivation de la transduction du signal de l'oncoprotéine MYC, secondaire à une t(8;14) par exemple, déclenche l'apoptose via Bim et d'autres protéines à motif BH3-unique, quoique contrecarré par des facteurs antiapoptotiques [Junttila and Evan, 2009 ; Lowe et al., 2004].

La cellule tumorale peut adopter plusieurs stratégies pour limiter ou éviter l'apoptose. Les anomalies de la voie p53 est le mécanisme le plus fréquemment observé comme le témoigne la fréquence élevée de la mutation de TP53 dans les cancers. Parfois l'inactivation de TP53 est insuffisante, et l'altération d'un constituant de la machinerie apoptotique est indispensable. C'est le cas de la méthylation du promoteur du gène APAF1 observée dans un certain nombre de cas de mélanomes. Dans la moitié des cancers coliques par instabilité des microsatellites, une mutation inactivatrice du gène Bax a pu être rapportée. Une sur expression de BCL2 secondaire à la translocation t(14;18) est observée dans 70% des lymphomes folliculaires. Une hyper-activation de la voie PI3K→Akt/PKB (exemple : mutation activatrice de RAS, délétion de PTEN) induit une inactivation des protéines pro-apoptotiques Bad, caspase 9 et I κ B et une activation de MDM2. L'activation de la voie NF- κ B, observée dans plusieurs types de cancers, permet la résistance à l'apoptose. Dans plusieurs cas de neuroblastome, l'avantage prolifératif qu'offre l'amplification N-MYC est soutenu par une inactivation du gène caspase 8. La voie extrinsèque peut également être touchée dans un certain nombre de tumeurs. En effet, une inactivation du gène du récepteur de TNF est observée dans certains cancers.

L'apoptose n'est pas la seule forme de mort cellulaire programmée, l'autophagie en est une autre forme [He and Klionsky, 2009 ; Levine and Kroemer, 2008]. L'autophagie est un processus cellulaire physiologique qui concourt à la dégradation des organites cellulaires (exemple ribosome et mitochondrie) permettant ainsi aux catabolites résultants d'être recyclés et réutilisés par la cellule. Au cours de ce processus, des vésicules intracellulaires, autophagosomes, vont envelopper les organelles et fusionnent avec des lysosomes qui sont le siège de la dégradation des organites. L'autophagie est un processus soumis à une régulation fine [He and Klionsky, 2009].

Des études récentes ont révélé l'existence des interconnexions entre les circuits qui contrôlent l'apoptose et l'autophagie. Par exemple la voie de signalisation impliquant les kinases PI3K, AKT et mTOR, induites en cas de signal de survie, inhibe l'apoptose et l'autophagie [Levine and Kroemer, 2008; Sinha and Levine, 2008]. Un autre point d'intersection entre les 2 types de mort cellulaire est matérialisé par la protéine Beclin-1. Cette dernière, appartenant à la famille des protéines à motif BH3-unique, est capable d'interagir avec les protéines Bcl-2/Bcl-X_L. Les signaux inducteurs des protéines BH3, vont déplacer Bcl-2/Bcl-X_L d'une part, de la protéine Beclin-1 qui alors déclenche l'autophagie et d'autre part des protéines Bax et Bad qui amorcent ainsi l'apoptose. Par ailleurs, les souris Beclin-1^{-/-} présente un risque accru de développer un cancer [Levine and Kroemer, 2008; White and DiPaola, 2009]. Il en découle que l'autophagie agit à l'encontre du développement du cancer et ceci soit indépendamment soit en concertation avec l'apoptose. En revanche, et paradoxalement, l'autophagie peut être à l'origine d'une résistance des cellules cancéreuses à la radio et chimiothérapie [Apel et al., 2009 ; White and DiPaola, 2009]. De plus, l'autophagie peut permettre aux cellules cancéreuses de passer à un état de dormance réversible. Ce mécanisme permet à la cellule tumorale de persister et éventuellement de reprendre une prolifération à des stades avancés de la maladie et après un traitement anticancéreux [Apel et al., 2009 ; White and DiPaola, 2009].

A l'inverse de l'apoptose et de l'autophagie, la nécrose cellulaire, une autre forme de mort cellulaire [Degterev et al., 2005; Laster et al., 1988]. Les études récentes ont mis en évidence de multiples molécules et processus comme effecteurs, initiateurs ou modulateurs de la nécrose cellulaire [Vandenabeele et al., 2010]. La nécrose cellulaire libère des protéines pro inflammatoires qui attirent les cellules de l'immunité. Ces dernières qui peuvent avoir à la fois un effet protecteur contre le développement du cancer mais également peuvent promouvoir la prolifération tumorale [Grivennikov et al., 2010 ; White et al., 2010]. Le rôle de l'immunité dans la carcinogenèse sera abordé ultérieurement.

3. Potentiel répliatif illimité

L'acquisition d'une prolifération autonome et d'une résistance à la mort cellulaire programmée est nécessaire mais pas suffisante pour le développement d'une tumeur. En effet, la majorité des cellules de l'organisme ont un nombre limité de divisions cellulaires potentielles. Cette restriction est en rapport avec 2 mécanismes qui s'opposent à une répliation illimitée: la sénescence, définie comme un état d'arrêt permanent de la croissance cellulaire mais viable [Hayflick and Moorhead, 1961], et la «crise» qui comprend la mort cellulaire. En conséquence, pour des cellules en culture, la répétition du nombre de divisions cellulaires aboutit au début à une sénescence puis, pour les cellules qui ont réussi à contourner cet obstacle, à un état de «crise» où la majorité des cellules vont mourir. Occasionnellement, des cellules émergent de la population en «crise» et présentent un potentiel répliatif illimité. Ces cellules, sont alors dites immortelles, ont franchi une des barrières contrôlant la transformation tumorale. De multiples études soulignent le rôle central des télomères dans l'acquisition d'une prolifération illimitée [Blasco, 2005; Shay and Wright, 2000].

Les télomères, formés par une répétition en tandem d'hexanucléotide 5'-TTAGGG-3', sont ajoutés à l'extrémité des chromosomes par la télomérase. Les télomères sont composés d'une région double brin comportant la répétition du motif télomérique GGGTTA, prolongé par un ADN simple brin riche en guanine (brin G) [McEachern et al., 2000]. Ils sont associés à 6 facteurs protéiques (TRF1, TRF2, RAP1, TIN2, TPP1 et POT1) formant un complexe protecteur (télosome ou shelterin) qui contrôle la structure, la répliation et le recrutement de nombreuses protéines associées comme les facteurs de réparation des dommages de l'ADN [De Lange, 2009] (**Figure 6**). Le brin G, de par sa richesse en guanines, peut adopter *in vitro* une structure en quadruplex de guanines (G4) peu propice à la fixation de la télomérase [De Cian et al., 2008]. Le brin G télomérique peut aussi envahir le duplex télomérique (D-loop) en formant une boucle que l'on appelle la t-loop qui protège le chromosome des fusions télomériques en séquestrant le brin G [Griffith et al., 1999] (**Figure 6**). Au cours de la phase S, la t-loop doit être « résolue » pour permettre l'extension du brin G par la télomérase et la répliation des télomères.

atteignent une longueur critique ou lorsque la coiffe est altérée, l'extrémité des chromosomes devient exposée. Des foyers de dommages de l'ADN se colocalisent alors au niveau des extrémités télomériques [D'adda di Fagagna et al., 2003]. Le signal de dommage est détecté par les kinases ATM/ATR qui activent la voie *TP53*. A son tour *TP53* active *P21* qui interfère avec les CDK, ce qui conduit à l'arrêt du cycle cellulaire et à l'induction de la sénescence. La sénescence répllicative a pour but de protéger l'organisme de l'apparition de cancers en empêchant les cellules de réaliser un trop grand nombre de divisions cellulaires. En effet, le raccourcissement des télomères provoque une augmentation de la recombinaison non homologe conduisant à des fusions chromosomiques, ce qui peut favoriser l'activation des voies oncogéniques si les cellules passent la sénescence.

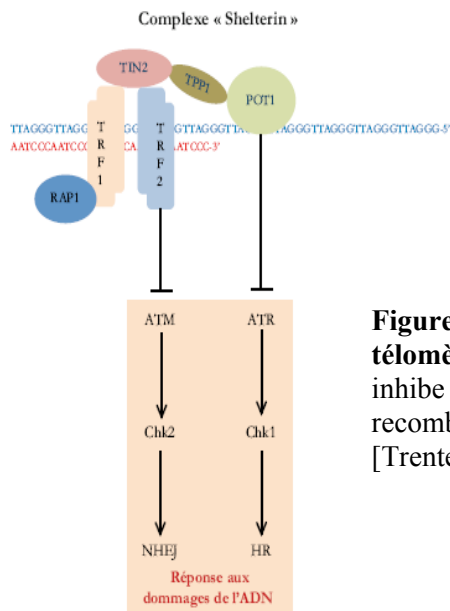


Figure 7 : Rôle du complexe « shelterin » dans la protection des télomères. La protéine TRF2 inhibe la voie ATM alors que POT1 inhibe la voie ATR. Chk1/2 : checkpoint kinases 1/2; HR : homologous recombination ; NHEJ : non homologous end joining. D'après [Trentesaux and Riou, 2010].

Alors que leur taille est maintenue dans les cellules germinales, les télomères se raccourcissent avec l'âge dans la plupart des cellules somatiques, en raison d'une activité télomérase insuffisante. La télomérase est un complexe ribonucléoprotéique qui comprend une sous-unité protéique TERT ("*telomerase reverse transcriptase*") qui a pour rôle principal de catalyser la polymérisation des nucléotides incorporés à l'extrémité 3' des chromosomes et est associée à une sous-unité d'ARN (TR) contenant le motif CCCCAA qui sert de matrice pour synthétiser les répétitions télomériques. Ces sous-unités s'associent pour former un tétramère, composé de 2 sous-unités d'ARN matrice, TR, et 2 sous-unités

catalytiques, TERT, qui est en lui-même suffisant à l'activité enzymatique *in vitro* et *in vivo* [Weinrich et al., 1997].

Dans les cellules non immortalisées, le taux de télomérase est presque nul. En revanche 85 à 90% des cancers expriment la télomérase [Shay and Bacchetti, 1997]. La télomérase est capable d'empêcher l'érosion progressive des télomères en rallongeant les extrémités des chromosomes. La présence d'une activité télomérase est associée à une résistance à l'apoptose et la sénescence. A l'inverse, son absence se traduit par un raccourcissement des télomères qui conduit à un signal de sénescence répliquative et une «crise» qui associe une augmentation des fusions entre télomères, une aneuploïdie et la mort cellulaire. Dans de rares tumeurs (10 à 15%), il a été décrit un 2^{ème} mécanisme de maintien des télomères, télomérase-indépendant, ALT ("*alternative lengthening of telomeres*"), qui implique une recombinaison homologue [Cesare and Reddel, 2010]. Ce mécanisme semble être préférentiellement observé dans les ostéosarcomes, sarcomes et glioblastomes [Bollmann, 2007 ; Reddel, 2003].

L'activation retardée de la télomérase dans des tumeurs peut à la fois compromettre et propulser le processus multi étape d'une tumeur. Dans les phases pré-néoplasiques les cellules tumorales expriment à un taux faible la télomérase, ceci entraîne un raccourcissement excessif des télomères et donc une apoptose. En effet, une érosion extensive des télomères avec fusion des extrémités chromosomiques a été rapportée dans des lésions précancéreuses [Hansel et al., 2006; Kawai et al., 2007]. En conséquence, le développement d'une tumeur peut être compromis dès les premiers stades par apoptose secondaire à une fusion des télomères. En revanche, dans des tumeurs déficientes pour *TP53*, les cellules peuvent survivre à cette fusion des télomères et arrivent au stade de cassure-pont-fusion ("*breakage-fusion-bridge*", BFB). Les amplifications et les délétions génomiques conséquentes vont accroître l'instabilité génomique d'où une progression du processus malin. Ainsi, une coopération entre les mutants *TP53* et la télomérase peut favoriser le développement du cancer [Artandi and DePinho, 2010]. Le rôle canonique de la télomérase, assurée par la TERT, dans la synthèse et la protection des télomères, a été mis en évidence par des études chez la souris et dans des cultures cellulaires. Les autres fonctions ont été mises en évidence par la suppression de l'activité de cette enzyme [Cong and Shay, 2008]. Parmi ces rôles, la TERT peut s'associer, à la sous-unité β caténine/LEF et activer ainsi la voie Wnt et à la chromatine en dehors des séquences télomériques [Massutomi et al., 2005; Park et al., 2009].

4. Induction de l'angiogenèse

Comme les tissus normaux, les tumeurs ont un métabolisme cellulaire qui nécessite non seulement un apport en oxygène (O₂) et en nutriments mais également une évacuation des métabolites toxiques. Les néovaisseaux associés aux tumeurs, générés par angiogenèse, assurent ces besoins métaboliques. Durant l'embryogenèse, le développement de l'arbre vasculaire se fait par, soit vasculogenèse, qui correspond à la naissance de cellules endothéliales puis leur assemblage en tubes, soit par angiogenèse, qui est définie par la naissance de nouveaux capillaires à partir de vaisseaux pré-existants. Chez l'adulte, l'angiogenèse est activée dans certaines circonstances (exemple la cicatrisation) et surtout d'une manière transitoire. En revanche, durant la progression tumorale l'angiogenèse est activée presque tout le temps et le demeure ainsi continuellement, on parle alors de *switch* angiogénique [Hanahan and Folkman, 1996]. Des études expérimentales faites *in vitro* et *in vivo* ont montré que le *switch* angiogénique est contrôlé par des facteurs pro et anti-angiogéniques [Baeriswyl and Christofori, 2009; Bergers and Benjamin, 2003]. Un certain nombre de ces régulateurs angiogéniques correspond à des protéines de signalisation qui se fixent sur des récepteurs membranaires exprimés par les cellules endothéliales. Les facteurs prototypes inducteurs et inhibiteurs de l'angiogenèse sont le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, VEGF-A ("*vasculoendothelial growth factor-A*" ; **Figure 8**), et la thrombospondine 1, TSP1, respectivement.

Le VEGF-A est un membre de la famille des VEGF qui comprend 5 protéines homologues parmi lesquelles le VEGF-C et le VEGF-D qui présentent une certaine spécificité pour l'endothélium lymphatique, alors que le VEGF-A et le VEGF-B agissent préférentiellement sur l'endothélium sanguin. Le ligand VEGF-A se fixe essentiellement sur 2 types de récepteur de surface appelés FLK1 (ou KDR ou VEGFR2) et FLT1 (VEGFR1). Le VEGF-A a une affinité 10 fois plus importante pour le VEGFR1 que pour le VEGFR2. En revanche, l'activité tyrosine kinase du VEGFR2

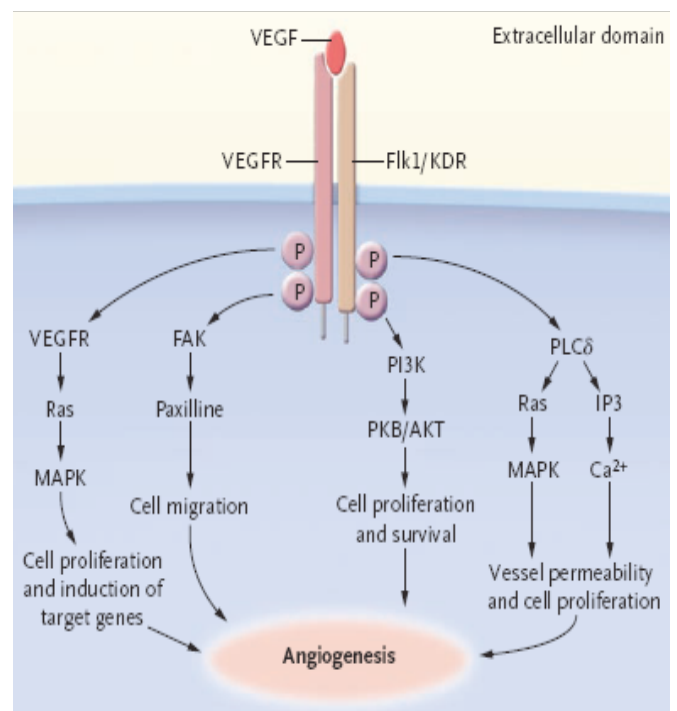


Figure 8 : Voie VEGF. D'après [Croce, 2008].

est fortement stimulée par le VEGF-A, contrairement à celle du VEGFR1. Le VEGFR2 active, après sa stimulation, la voie des MAP kinases, principalement via la PLC γ et la PKC. Le VEGFR1 est capable de s'associer à la sous-unité p85 de la PI3K. L'activation de VEGFR1 par VEGF-A *in vitro* conduit à une stimulation de la migration des monocytes. Par ailleurs, le VEGFR1 est exprimé à la surface de cellules hématopoïétiques et leur recrutement dans des foyers néoangiogéniques semble important pour le développement de la néovascularisation [Rafii et al., 2002].

La signalisation de la voie VEGF *via* ses récepteurs à activité tyrosine kinase est complexe et régulée à plusieurs niveaux [Ferrara, 2010] (**Figure 9**). L'hypoxie induit l'expression du VEGF-A. En effet, une baisse du taux d'oxygène entraîne une stabilisation du taux du messager du facteur de transcription HIF1 α qui en conséquence va induire l'expression du VEGF d'où une angiogénèse soutenue. A l'inverse, quand le taux d'O₂ augmente la prolyl-4-hydroxylase (PHD) lie ces molécules d'O₂ et les fixe sur des résidus spécifiques de proline du HIF1 α . Une autre protéine, dénommée protéine de Von Hippel-Lindau (VHL), lie ensuite le HIF1 α oxydé, et le complexe ainsi formé est ensuite ubiquitinylé et dégradé par le protéasome. Ainsi, les mutations du gène *VHL* induisent l'expression du VEGF et donc activent l'angiogénèse [Semenza, 2003]. L'activation oncogénique induit l'expression du VEGF, comme cela a été démontré pour *MYC* et *RAS* [Kalas et al., 2005, Watnick et al., 2003]. Par ailleurs, le ligand VEGF peut être séquestré dans la matrice extracellulaire sous une forme latente dont l'activation et le largage se fait en présence de métalloprotéases notamment MMP9 [Kessenbrock et al., 2010].

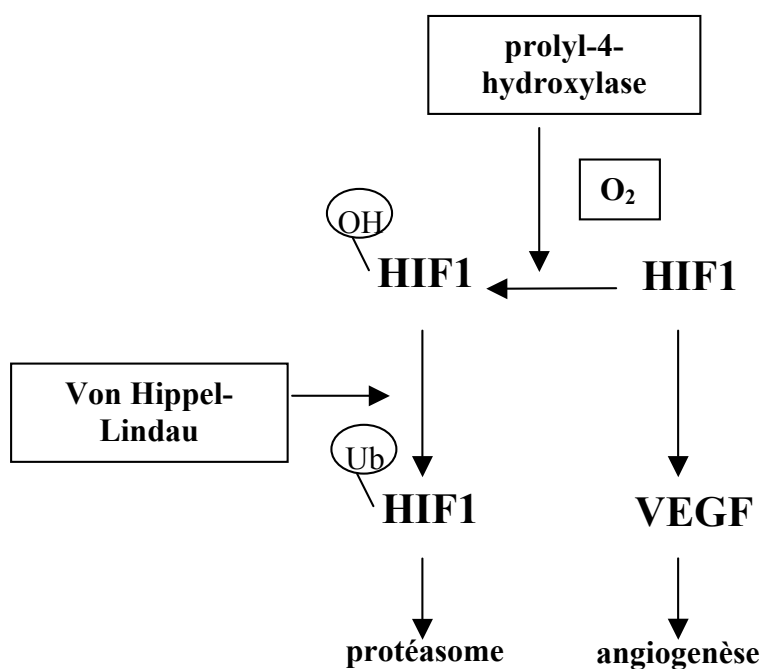


Figure 9 : Voie HIF1

En dehors de VEGF, d'autres régulateurs proangiogéniques ont été rapportés, c'est l'exemple des facteurs de croissance fibroblastiques (FGF) [Baeriswyl and Christofori, 2009], de l'angiopoïétine [Yancopoulos et al., 2000] et du TGFβ [Tuxhorn et al., 2002]. Ces régulateurs pro-angiogéniques sont contrebalancés par des facteurs anti-angiogéniques. Des études ont montré le rôle inhibiteur de l'angiogenèse de la thrombospondine 1, TSP1 [Naumov et al., 2006; Roberts et al., 2007].

La TSP1, appartient à une famille de glycoprotéines, est exprimée par certains tissus au cours de l'embryogenèse et par la plupart des cellules en culture en réponse à des facteurs de croissance spécifiques. Le rôle anti-angiogénique de TSP-1 se manifeste à 2 niveaux, d'une part cette protéine a un effet direct sur la migration et l'apoptose des cellules endothéliales, et d'autre part elle a une action sur la bio disponibilité du VEGF. La TSP-1 inhibe l'activation de MMP9 et empêche ainsi le re largage à partir de la matrice extracellulaire du VEGF [Wang-Rodriguez et al., 2003]. De plus, la TSP-1 peut se lier directement au VEGF et modifie ainsi sa clearance [Greenaway et al., 2007]. L'interaction de la TSP-1 avec le CD36 joue un rôle important dans l'inhibition de la migration des cellules endothéliales *in vitro* et *in vivo* [Dawson et al., 1997; Jimenez et al., 2000]. Par ailleurs, l'activation de la voie CD36-Fyn-caspase-3-p38MAPK par TSP-1 induit une sur-expression du Fas ligand par les cellules endothéliales qui deviennent alors réceptives à ces taux élevés et subissent ainsi

l'apoptose [Jimenez et al., 2000; Volpert et al., 2002]. Plusieurs facteurs déterminent l'expression de TSP-1 au cours de la progression tumorale. L'activation de l'oncoprotéine RAS inhibe l'expression de TSP-1 en augmentant la phosphorylation de *MYC* via la voie PI3K/Rho [Watnick et al., 2003]. Par ailleurs, les gènes suppresseurs de tumeurs induisent l'expression de TSP-1 [Ren et al., 2006]. Une perte de fonction de *TP53* est corrélée avec une baisse de l'expression de TSP-1 et une augmentation de l'angiogenèse dans les fibroblastes de patients atteints de syndrome de Li-Fraumeni [Volpert et al., 1997]. En revanche, une sur-expression de *TP53* entraîne une augmentation de l'expression de TSP-1 et une baisse de l'expression du VEGF et donc un ralentissement de la croissance tumorale. D'autres molécules inhibitrices de l'angiogenèse ont été rapportées, c'est l'exemple de l'angiostatine et de l'endostatine [Nyberg et al., 2005; Ribatti, 2009].

Le contrôle moléculaire de l'angiogenèse fait intervenir un équilibre entre facteurs pro et anti-angiogéniques. Par ailleurs, un répertoire de cellules hématopoïétiques a récemment été impliqué dans l'angiogenèse tumorale [Murdoch et al., 2008; Qian and Pollard, 2010]. Ce groupe implique des cellules de l'immunité innée, en particulier les macrophages, les polynucléaires neutrophiles, les mastocytes et les progéniteurs myéloïdes. Ces cellules, qui infiltrent les lésions pré néoplasiques et les tumeurs en progression, sont capables non seulement d'induire un *switch* angiogénique mais également de protéger les vaisseaux contre les drogues agissant sur la signalisation des cellules endothéliales [Ferrara, 2010].

Au terme de ce processus d'angiogenèse tumorale, les vaisseaux produits sont de mauvaise qualité par rapport à ceux produits lors d'un processus physiologique. Ceci est en rapport avec une prolifération anarchique des cellules endothéliales [Nagy et al., 2010] et d'une mauvaise couverture péricytaire des capillaires tumoraux [Raza et al., 2010]. Une fois le processus d'angiogenèse est induit, le profil de néovascularisation des tumeurs est très hétérogène. Certaines tumeurs, tel que l'adénocarcinome des canaux pancréatiques, sont hypovascularisées avec un stroma désertique et avasculaire [Olive et al., 2009]. D'autres cancers, comprenant les carcinomes du rein et tumeurs neuroendocrine du pancréas, sont hautement angiogéniques et donc présentent une vascularisation dense [Turner et al., 2003; Zee et al., 2010]. Historiquement, l'angiogenèse tumorale est associée à une tumeur rapidement évolutive et macroscopiquement décelable, néanmoins ce processus est induit d'une manière précoce dans les dysplasies et les carcinomes in situ [Hanahan and Folkman, 1996; Raica et al., 2009]. Ceci souligne le rôle fondamental de l'angiogenèse dans le processus de carcinogenèse.

5. capacités invasives et métastatiques

Le terme de métastase a été rapporté par Jean Claude Recamier en 1829. Il est défini par le transfert de la maladie d'un organe ou une partie d'organe à un autre non contigu. Les métastases peuvent être le signe d'appel du cancer, elles sont alors dites précoces. Elles peuvent apparaître au même moment ou après un temps de latence court, métastases synchrones de la tumeur primitive. Enfin elles peuvent apparaître plusieurs années après le début de la maladie, elles sont dites métastases métachrones. La dissémination métastatique se fait essentiellement par 2 voies: sanguine et lymphatique, en suivant les voies anatomiques de drainage des organes. Les métastases s'implantent quasi exclusivement dans les réseaux capillaires lymphatiques que sont les ganglions, et les réseaux sanguins que constituent le tissu pulmonaire ou le foie ou dans 2 sites particuliers, le cerveau et l'os où la surveillance immunitaire ne s'exerce pas.

Les mécanismes sous-jacents aux processus d'invasion et de métastases restent largement inconnus [Talmadge and Fidler, 2010]. Pour les carcinomes, le processus d'invasion s'accompagne d'une altération des jonctions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire. La cohésion des cellules épithéliales est assurée par des molécules d'adhérence qui sont également impliquées dans la transduction du signal [Cavallaro and Christofori, 2004]. Les cadhérines sont les principaux composants des systèmes de jonctions intercellulaires. L'E-cadhérine est le prototype de la famille des cadhérines classiques [Bex and Van Roy, 2009]. L'E-cadhérine, une glycoprotéine transmembranaire, servant d'intermédiaire dans l'adhérence par interaction homophile de leur domaine extracellulaire. Leur domaine intracytoplasmique interagit avec les protéines caténines (β -caténine, p120-caténine ; **Figure 10**) formant ainsi un complexe cytoplasmique d'adhérence cellulaire qui à son tour se lie avec les protéines du cytosquelette. Ces systèmes de jonction ont un rôle déterminant dans l'induction de la polarité et l'organisation de l'épithélium. L'altération quantitative ou qualitative de ces molécules entraîne la perte de fonction de l'E-cadhérine [Cavallaro and Christofori, 2004]. Dans la majorité des carcinomes, la perte de l'expression de l'E-Cadhérine est associée à un phénotype invasif de la tumeur. L'expression forcée de l'E-Cadhérine induit le passage du phénotype mésenchymateux des cellules tumorales en culture à un phénotype épithéliale [Birchmeier and Behrens, 1994; Vleminckx et al., 1991]. En revanche, une perte d'expression de l'E-Cadhérine dans un modèle de carcinome pancréatique est associée à une progression de la tumeur du stade d'adénome au stade de carcinome [Perl et al., 1998]. Chez l'homme, la perte fréquente de l'expression de l'E-

Cadhérine ainsi que les mutations inactivatrices de ce gène dans les carcinomes renforcent le rôle suppresseur de métastases de l'E-Cadhérine [Berx and Van Roy, 2009; Cavallaro and Christofori, 2004]. L'altération de l'expression d'autres molécules impliquées dans l'adhérence cellule et cellule-matrice extracellulaire ont été rapportés dans des carcinomes hautement agressifs [Cavallaro and Christofori, 2004].

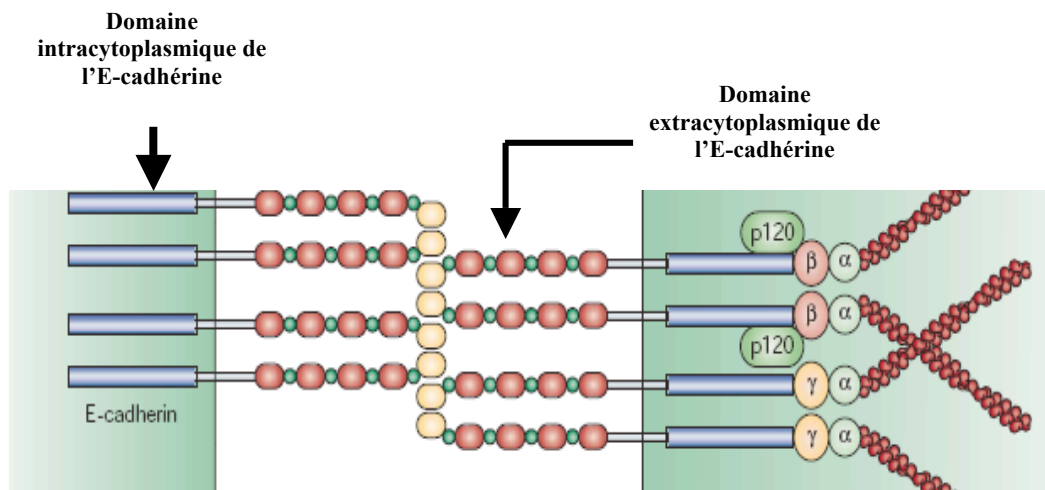


Figure 10 : Structure de l'E-cadhérine. Adapté de [Cavalaro and Christofori, 2004].

Par ailleurs, dans le mélanome et les cancers de la prostate et du sein, la perte d'expression de l'E-Cadhérine est associée à une expression acquise de la N-cadhérine [Li and Herlyn, 2000; Tomita et al., 2000]. Cette dernière, normalement exprimée au cours de l'embryogenèse et de l'inflammation, induit la migration des neurones et des cellules mésenchymateuses. L'expression de la N-cadhérine entraîne une baisse de l'expression de l'E-cadhérine et induit ainsi une invasion et une migration des cellules. Dans des cellules de carcinome mammaires qui expriment normalement l'E-cadhérine, la N-cadhérine est capable d'induire la migration et l'invasion de ces cellules, ce qui suggère que la N-cadhérine agit soit indépendamment de l'E-cadhérine, soit elle a un effet dominant par rapport à cette dernière [Nieman et al., 1999]. De plus la transfection des cellules de cancers du sein par la N-Cadhérine se traduit par une augmentation du potentiel métastatique de ces cellules [Hazan et al., 2000]. En dehors des molécules d'adhérence les autres protagonistes du processus invasion-métastase sont largement inconnus [Cavallaro and Christofori, 2004].

Les métastases générées par les carcinomes résultent de l'achèvement d'une succession d'évènements complexes de biologie cellulaire, collectivement dénommés cascade invasion-métastase [Fidler, 2003; Talmadge and Fidler, 2010; Valastyan and Weinberg, 2011] (**Figure 11**). Au décours de ce processus, la cellule carcinomateuse quitte sa tumeur primaire pour: (1) envahir localement la matrice extracellulaire et les couches de cellules stromales, (2) passer dans la lumière des vaisseaux, intravasation, (3) survivre à un flux sanguin vigoureux le long de l'arbre vasculaire, (4) s'arrêter à des distances de sites d'organes, (5) quitter la lumière vasculaire et s'implanter dans un parenchyme tissulaire hétérotopique, extravasation (6) initialement survivre dans ce nouveau microenvironnement pour générer des micrométastases, et (7) ré-initier un programme de prolifération dans ce site métastatique pour donner des macrométastases, cliniquement décelable, "colonisation métastatique". Les études expérimentales ont démontré que l'ensemble de ces étapes est orchestré par des circuits moléculaires intrinsèques à la cellule carcinomateuse. Les interactions, extrinsèques, entre les cellules carcinomateuses et stromales non tumorales constituent des points de contrôle cruciaux dans la cascade invasion-métastase.

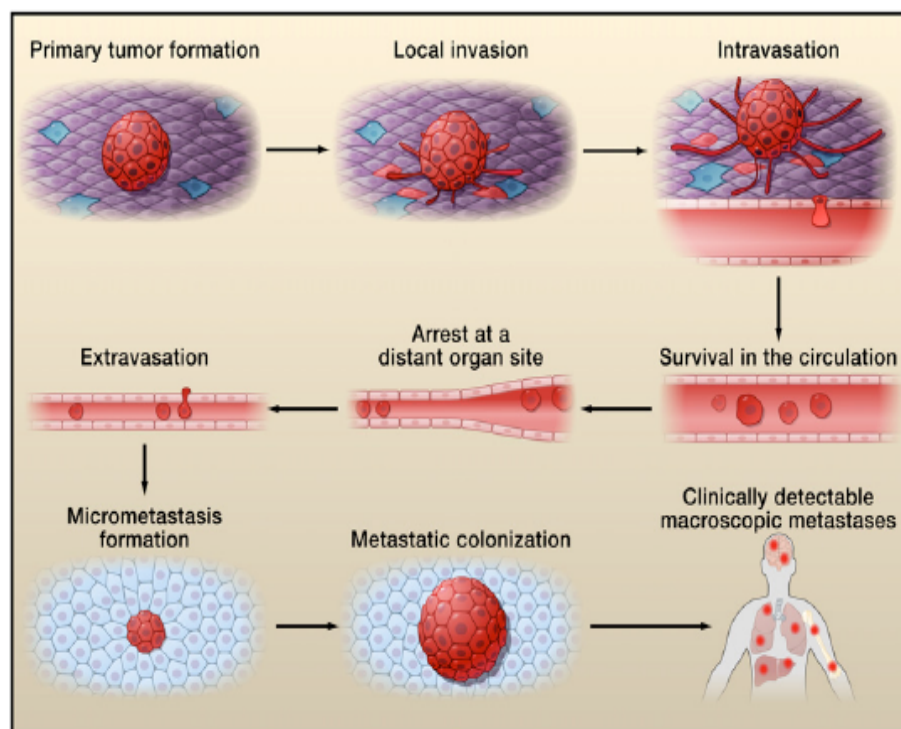


Figure 11 : Étapes de la cascade invasion-métastase.
D'après [Valastyan and Weinberg, 2011].

Plusieurs thèses ont été avancées pour décrypter cette cascade d'évènements complexes. L'une des hypothèses avancées est que les cellules carcinomateuses réactivent un programme de transition épithéliomésenchymateuse ("*epithelial-mesenchymal transition*", EMT) [Thiery, 2002]. L'EMT défini comme un changement rapide et réversible du phénotype cellulaire. Il s'agit d'un programme conservé au cours de l'évolution qui contrôle la morphogenèse embryonnaire, en particulier la formation des 3 feuillets primordiaux durant la gastrulation. Ce programme pourrait contribuer à l'émergence de cellules invasives, et, de façon plus importante, à ce que des cellules carcinomateuses pénètrent dans les vaisseaux lymphatiques et sanguins, conduisant à la dissémination métastatique. Cette hypothèse suppose également que, sur les sites hétérotopiques, des micrométastases peuvent réacquérir un phénotype épithélial partiel par MET ("*mesenchymal epithelial transition*"), pour former des tumeurs secondaires. Une des premières observations étayant cette hypothèse a été faite dans le carcinome du colon, pour lequel des cellules carcinomateuses isolées exprimant la β caténine nucléaire ont été détectées sur le front de la tumeur en expansion dans le stroma. Le postulat est que ces cellules carcinomateuses isolées proviennent de l'adénocarcinome par EMT. Les cellules carcinomateuses isolées peuvent également reformer des plaques, conduisant ainsi à une structure de type quasi exclusivement épithélial, progressant à travers la paroi colique. On retrouve un mécanisme similaire dans les métastases hépatiques [Brabletz et al., 2005]. L'hypothèse a été faite que les cellules solitaires invasives présentent des propriétés de cellules souches cancéreuses migrantes.

Une série de facteurs de transcription pléiotropes comme Snail, Slug, Twist et Zeb1/2, initialement identifiés grâce la génétique du développement, contrôle l'EMT [Thiery et al., 2009] et la migration cellulaire au cours de l'embryogenèse. Ces régulateurs de transcription sont exprimés dans un certain nombre de cancers et ont été incriminés dans l'induction de l'invasion dans des modèles expérimentaux de carcinome [Micalizzi et al., 2010; Taube et al., 2010; Yang and Weinberg, 2008]. Dans les carcinomes, l'activation de ce réseau régulateur de gènes serait responsable de la perte de l'architecture épithéliale comme les jonctions intercellulaires, la polarité apico-basale, et l'acquisition de propriétés mésenchymateuses telles que la migration et l'invasion de la matrice extracellulaire [Thiery and Sleeman 2006]. En effet, un certain nombre de ces facteurs de transcription réprime directement l'expression de l'E-cadhérine, gène clé dans la suppression de métastases des

carcinomes [Peinado et al., 2004]. Les marqueurs d'EMT sont exprimés dans plusieurs types de carcinome et dans les mélanomes [Thiery et al., 2009]. En dehors des carcinomes, une signature d'expression génique d'EMT a été décrite dans des tumeurs non épithéliales. Environ 30% des glioblastomes expriment des marqueurs d'EMT [Verhaak et al., 2010]. Par ailleurs, la régulation de ce réseau de facteurs de transcription, leurs modes d'actions, ainsi que leurs gènes cibles restent encore inconnus. Une autre signature d'expression génique d'EMT a identifié Lyn comme un marqueur pronostique dans le sous-type basal du cancer du sein, suggérant un traitement possible par le dasatinib ou d'autres inhibiteurs de la voie Src [Choi et al., 2010]. Des études expérimentales ont démontré un rôle important des cellules du microenvironnement tumoral dans la régulation de ce programme d'EMT [Egeblad et al., 2010; Joyce and Pollard, 2009].

La théorie de la transition EMT ne récapitule pas en entier tout le processus d'invasion métastases de tant plus que d'autres programmes d'invasion ont été rapportés [Friedl and Wolf, 2010]. Les cellules souches cancéreuses, que nous verrons plus loin, peuvent aussi être impliquées.

6. métabolisme énergétique

La prolifération illimitée, qui est par essence la caractéristique fondamentale de la maladie cancéreuse, implique non seulement une dérégulation des mécanismes du contrôle de la multiplication cellulaire mais également un ajustement du métabolisme énergétique pour aviver cette croissance et prolifération cellulaire. Une altération du métabolisme énergétique des cellules malignes a été observée par Otto Warburg [Warburg, 1956a, 1956b], on parle de l'effet Warburg. Ceci correspond à une augmentation de la captation et de la conversion de glucose en lactate par les cellules cancéreuses dans des conditions adéquates d'oxygénation [DeBerardinis et al., 2008 ; Vander Heiden et al., 2009]. En effet, même en présence d'oxygène, le métabolisme énergétique de la cellule cancéreuse se base largement sur la glycolyse, on parle «glycolyse aérobie». La baisse conséquente de la production d'ATP de ce *switch* métabolique est compensée par une augmentation des transporteurs du glucose, notamment GLUT1 ("*glucose transporter 1*"), lesquels accentuent substantiellement l'import du glucose vers le cytoplasme [DeBerardinis et al., 2008, Hsu and Sabatini, 2008]. Dans plusieurs tumeurs, une augmentation de la capture et de l'utilisation du glucose a été démontrée grâce à la tomographie par émission de positron (PET) avec un analogue radioactif du glucose utilisé comme rapporteur (18F-fluorodeoxyglucose, FDG).

Ce ravitaillement en glucose de la cellule cancéreuse est associé à l'activation des oncogènes (exemple *MYC* et *RAS*) et à la présence de mutations de suppresseurs de tumeurs (comme *TP53*) [Dang et al., 2009 ; DeBerardinis et al., 2008; Jones and Thompson, 2009]. La dépendance de la cellule tumorale pour la glycolyse s'accroît en période d'hypoxie qui s'observe au cours de la carcinogenèse. Cette hypoxie induit une augmentation des transporteurs du glucose et l'expression de plusieurs enzymes impliquées dans la glycolyse [DeBerardinis et al., 2008; Jones and Thompson, 2009]. Ainsi l'activation de *RAS* et l'hypoxie peuvent indépendamment augmenter les taux des facteurs de transcription HIF-1 α et HIF-2 α qui en retour stimulent la glycolyse [Semenza, 2010a, 2010b; Kroemer and Pouyssegur, 2008]. Le fondement de ce *switch* métabolique dans les cancers reste énigmatique. En revanche, il semble que cette reprogrammation métabolique aboutisse à une diversification des métabolites intermédiaires de la glycolyse. Ces derniers sont en conséquence orientés dans des voies de biosynthèse des nucléosides et des acides aminés; ce qui facilite la synthèse des macromolécules et des organelles indispensables pour l'assemblage de nouvelles cellules [Locasale et al., 2011 ; Vander Heiden et al., 2009].

Une altération des enzymes du métabolisme énergétique a été rapportée dans les cancers. Par exemple, des mutations activatrices des gènes codant pour les enzymes isocitrate déshydrogénase1/2 (IDH1/2) ont été rapportées dans les leucémies, [Andersson et al., 2011; Yen et al., 2010]. Par ailleurs, ces mutations peuvent indirectement agir sur l'angiogenèse et la stabilité du génome [Reitman and Yan, 2010].

7. Echappement au contrôle du système immunitaire

Le rôle d'un système immunitaire défaillant dans la survenue d'un cancer semblerait être validé par la fréquence élevée de certaines formes de cancers chez les patients immunodéprimés [Vajdic and Van Leeuwen, 2009]. Néanmoins, la grande majorité de ces cancers sont induits par des virus. Ceci suggère qu'une bonne partie du contrôle de ces tumeurs passe par la réduction de la charge virale, c'est à dire l'élimination des cellules infectées chez ces patients. Ces observations soulignent le rôle possible du système immunitaire dans la limitation de la formation de plus des 80% des cancers non induits par des virus. Des études basées sur des souris transgéniques et sur l'épidémiologie clinique suggèrent que le système immunitaire opère comme une barrière significative contre la formation et la progression, au moins de certaines formes de cancers non induits par des virus. Des études expérimentales ont mis en évidence le rôle des cellules de l'immunité

adaptative et innée dans la surveillance immunitaire et l'éradication des cancers [Kim et al., 2007; Schreiber et al., 2011 ; Teng et al., 2008 ; **Figure 12**]. Particulièrement, un déficit de développement ou un dysfonctionnement des lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺(LTC), *helper* CD4⁺ (T_H1) ou des cellules naturelles *killer* (NK), est associé à une augmentation de l'incidence des tumeurs. Plusieurs expériences ont montré qu'une fois activés, les macrophages peuvent devenir tumoricides *in vitro* [Fidler et al., 1981].

Les expérimentations de greffe de tumeurs chez la souris ont montré que des tumeurs survenant initialement chez des souris immunodéficientes sont souvent inefficaces dans l'initiation de greffe de tumeurs chez des hôtes syngéniques immunocompétents, à l'inverse, des tumeurs survenant chez des souris immunocompétentes sont capables d'initier des greffes de cellules malignes dans des les 2 types d'hôtes [Kim et al., 2007; Teng et al., 2008]. L'une des raisons avancées pour expliquer ces résultats: est que les clones malins hautement immunogènes sont éliminés dans les hôtes immunocompétents, c'est le processus d'*immunoediting* (**Figure 12**), donnant ainsi l'avantage aux clones variants faiblement immunogènes de proliférer et générer des cancers dans les 2 types de souris. En revanche, chez la souris immunodéficiente, les clones hautement immunogènes ne sont sélectivement pas détruites, au contraire elles vont autant proliférer que les cellules faiblement immunogènes. Quand ces tumeurs non «éditées» sont greffées, le clone immunogène est rejeté, pour la première fois, par le système immunitaire compétent du receveur [Schreiber et al., 2011 ; Smyth et al., 2006].

Le processus d'*immunoediting* du cancer est un mécanisme extrinsèque qui vise à détruire la tumeur [Vesely et al., 2011]. Il est engagé après la transformation maligne de la cellule et en cas d'échec de mise en place des processus intrinsèques de suppression tumorale. Dans sa forme la plus complexe, l'*immunoediting* du cancer correspond à 3 phases séquentielles : l'élimination, l'équilibre et l'échappement (**Figure 12**). Dans l'étape d'élimination, les acteurs de l'immunité adaptative et innée vont détruire la tumeur en cours de développement avant qu'elle ne devienne cliniquement décelable. Plusieurs cellules et molécules ont été impliquées dans cette phase d'élimination, néanmoins d'autres travaux sont requis pour déterminer quelle est la séquence exacte de leur mode d'action [Schreiber et al., 2011]. La destruction de tous les clones malins est l'ultime objectif de la phase d'élimination. Si quelques clones tumoraux variants arrivent à survivre à cette phase, ils peuvent alors entrer en phase d'équilibre où leur expansion est contrôlée par des mécanismes immunologiques. A la différence des protagonistes de l'immunité innée, ceux de l'immunité adaptative, lymphocytes T, IL-12 et INF- γ , sont indispensables pour

maintenir ce type de clone dans un état de dormance fonctionnel. C'est pendant cette phase d'équilibre que s'établit l'*immunoediting* d'une tumeur [Vesely et al., 2011]. En raison d'une pression de sélection immunitaire s'exerçant sur des clones génétiquement instables, d'autres clones variants peuvent émerger et qui : (1) ne sont plus reconnus par les cellules immunitaires (perte d'expression d'antigènes variants, incapacité de synthèse ou de présentation d'antigènes), (2) deviennent insensibles à l'action des effecteurs immunitaires, ou (3) peuvent induire un état de tolérance immunitaire dans le microenvironnement. Ces cellules peuvent alors entrer en phase d'échappement, pendant laquelle leur expansion n'est plus bloquée par le système immunitaire.

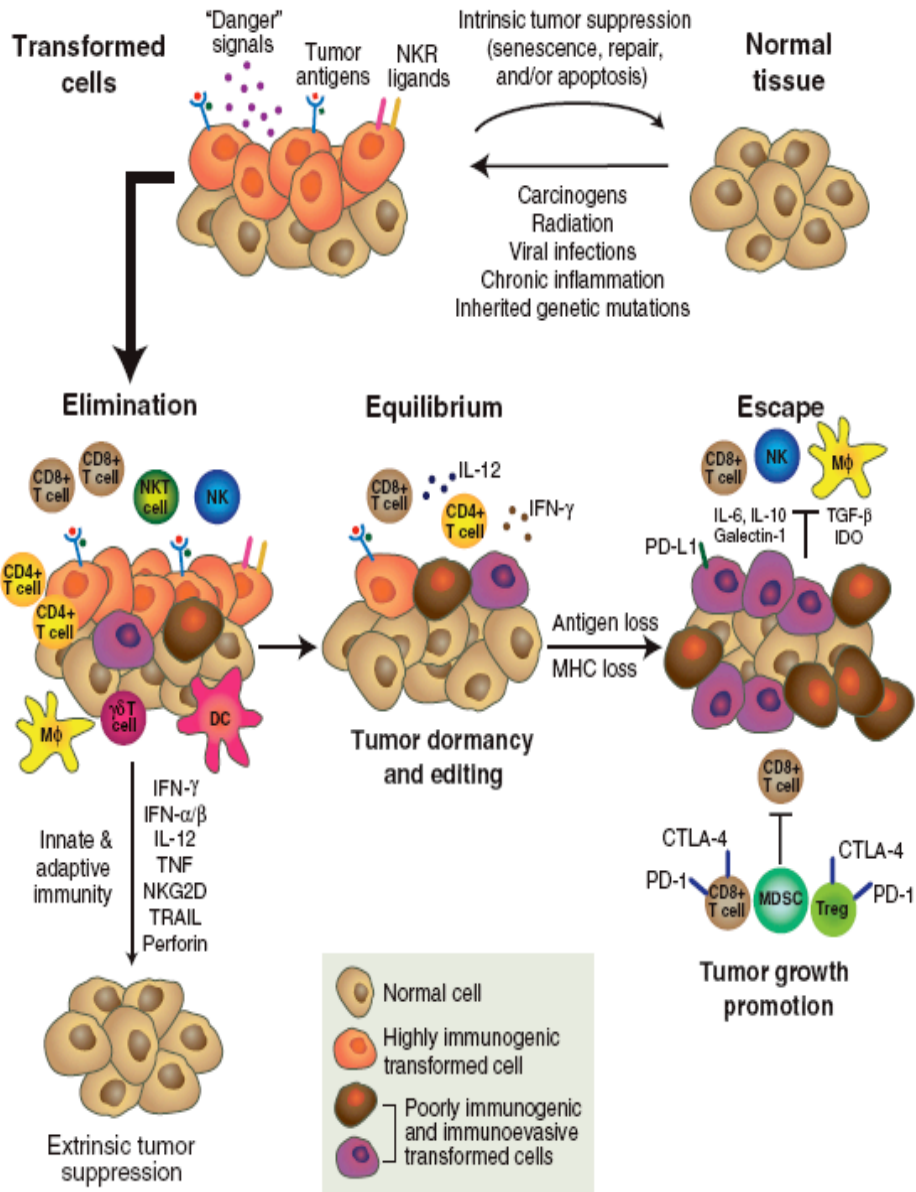


Figure 12 : Principe « d'immunoediting » dans le cancer. Ce processus correspond à 3 phases séquentielles : l'élimination, l'équilibre et l'échappement. Au cours de la phase d'élimination, les acteurs de l'immunité adaptative et innée sont mis en place pour détruire la tumeur. Si quelques clones échappent à cette phase d'élimination, ils entreront en phase d'équilibre. Pendant cette phase, qui met en jeu l'immunité adaptative, que s'établi « l'immunoediting » des clones maintenus dans un état de dormance. Les clones qui arrivent à détourner ce processus entrent en phase d'échappement. DC : cellule dendritique ; MDSC : myeloid-derived suppressor cells; Treg : Regulatory T cells. D'après [Vesely et al., 2011].

Les études clinicoépidémiologiques soutiennent l'existence d'une réponse immunitaire anti-tumorale dans certaines formes de cancers [Bindea et al., 2010; Ferrone and Dranoff, 2010; Nelson, 2008]. Dans les cancers du colon et de l'ovaire, le pronostic des patients est d'autant meilleur que la tumeur est massivement infiltrée par des cellules LTC et NK [Nelson, 2008; Pages et al., 2010]. Les patients transplantés d'organes développent des cancers à partir des cellules du donneur. Probablement, chez le donneur ostensiblement indemne, les cellules malignes sont maintenues dans un état de quiescence par un système immunitaire compétent [Strauss and Thomas, 2010]. Une autre étude clinique a montré que plus le pourcentage de macrophage dans la tumeur est élevé plus le risque de métastases est faible [Gauci and Alexander, 1975]. Par ailleurs, chez les patients immunodéprimés, l'épidémiologie n'a pas montré une recrudescence dans la majorité des cancers non induits par des virus. Ceci va l'encontre de l'idée qui stipule que le système immunitaire pourrait être une barrière anticancer. Néanmoins, chez les malades atteints par le VIH et greffés d'organes, l'immunodéficience prédomine sur les lymphocytes B et T, donc la possibilité d'une immunité résiduelle anticancer basée sur les cellules NK et les autres acteurs de l'immunité innée pourraient être envisagés chez ces patients.

L'ensemble de ces études simplifie les interactions entre la tumeur et le système immunitaire de l'hôte puisque les cellules malignes les plus immunogènes peuvent échapper au contrôle du système immunitaire (**Figure 12**). Par exemple, les cellules malignes peuvent paralyser l'infiltrat de LTC et des cellules NK en sécrétant le TGF β ou d'autres facteurs immunosuppresseurs [Shields et al., 2010; Yang et al., 2010]. De plus, le VEGF peut altérer le système immunitaire *via* l'inhibition de la différenciation des cellules dendritiques [Ellis et al., 2000]. D'autres mécanismes encore plus subtils peuvent opérer en recrutant des cellules inflammatoires qui ont une action immunosuppressive comme les cellules T régulatrices ("*Regulatory T cells*", Treg) et les cellules myéloïdes suppressives ("*myeloid-derived suppressor cells*", MDSC) [Mougiakakos et al., 2010; Ostrand-Rosenberg and Sinha, 2009] (**Figure 12**). La croissance tumorale est associée à l'expansion des MDSC qui inhibent la prolifération et la fonction des lymphocytes T. Les macrophages activés, présents dans le microenvironnement tumoral, sécrètent des enzymes protéolytiques qui facilitent l'invasion et la dissémination métastatique [Hagemann et al., 2004] (**Figure 12**).

8. Microenvironnement tumoral

Le concept couramment admis présente le cancer comme un agglomérat relativement homogène de cellules malignes. En corollaire, l'étude du cancer passe par la compréhension des caractéristiques autonomes de cette formation. En revanche, les études menées durant la dernière décennie convergent vers l'idée que le cancer a une organisation complexe. Ainsi, la compréhension de la biologie du cancer passe par l'étude des cellules spécialisées constituant cette formation et du microenvironnement tumoral élaboré tout au long du processus multiétape de la carcinogenèse. Ces constats ont été faits à partir de l'étude des carcinomes, dans lesquels les cellules épithéliales malignes constituent un compartiment, appelé parenchyme, clairement individualisé par rapport aux cellules mésenchymateuses qui forment le stroma.

8.1 . cellules malignes et les cellules souches cancéreuses

Les tumeurs issues de différents patients, que ce soient des leucémies ou des tumeurs solides, présentent une hétérogénéité significative sur le plan : morphologique, expression de marqueurs de surface, anomalies génétiques, cinétique de prolifération cellulaire et la réponse au traitement. L'hétérogénéité de toutes ces caractéristiques est aussi observée à l'échelle d'une même tumeur en dépit de sa clonalité. Bien que les cellules d'une même tumeur partagent les mêmes anomalies génétiques et épigénétiques, les analyses détaillées cellule par cellule ont rapporté des variations des aberrations génétiques et épigénétiques entre les différentes cellules. Deux modèles mutuellement exclusifs ont été avancés pour expliquer cette hétérogénéité tumorale : le modèle stochastique et le modèle hiérarchique [Wang and Dick, 2005 ; Campbell and Polyak, 2007].

Le modèle stochastique (**Figure 13**) prédit qu'une tumeur est biologiquement homogène et le comportement des cellules cancéreuses est modulable par des facteurs intrinsèques (tels que les taux des facteurs de transcriptions, voies de signalisation) ou extrinsèques (comme, facteurs de l'hôte, microenvironnement, réponse immune). Ces influences sont donc imprévisibles ou aléatoires et aboutissent à une hétérogénéité : dans l'expression des marqueurs de surface ou d'autres marqueurs de maturation, dans l'entrée en cycle cellulaire ou dans la capacité de l'initiation tumorale. Un principe clé de ce modèle est que toutes les cellules de la tumeur sont égales face à ces influences stochastiques et aussi ces cellules malignes peuvent passer d'un état à un autre car ces facteurs n'induisent pas un changement permanent [Wang and Dick, 2005].

A l'opposé, le modèle hiérarchique postule qu'une tumeur est l'image "déformée" d'un tissu normal en développement où les cellules souches maintiennent l'hierarchie d'un tissu normal (exemples : colon, cellules hématopoïétiques, peau). Dans ce modèle les "cellules souches leucémiques" sont biologiquement distinctes, maintiennent, renouvellent le clone malin par auto-renouvellement et subissent la maturation pour générer des progéniteurs qui sont dépourvus de caractéristiques de cellules souches (**Figure 13**).

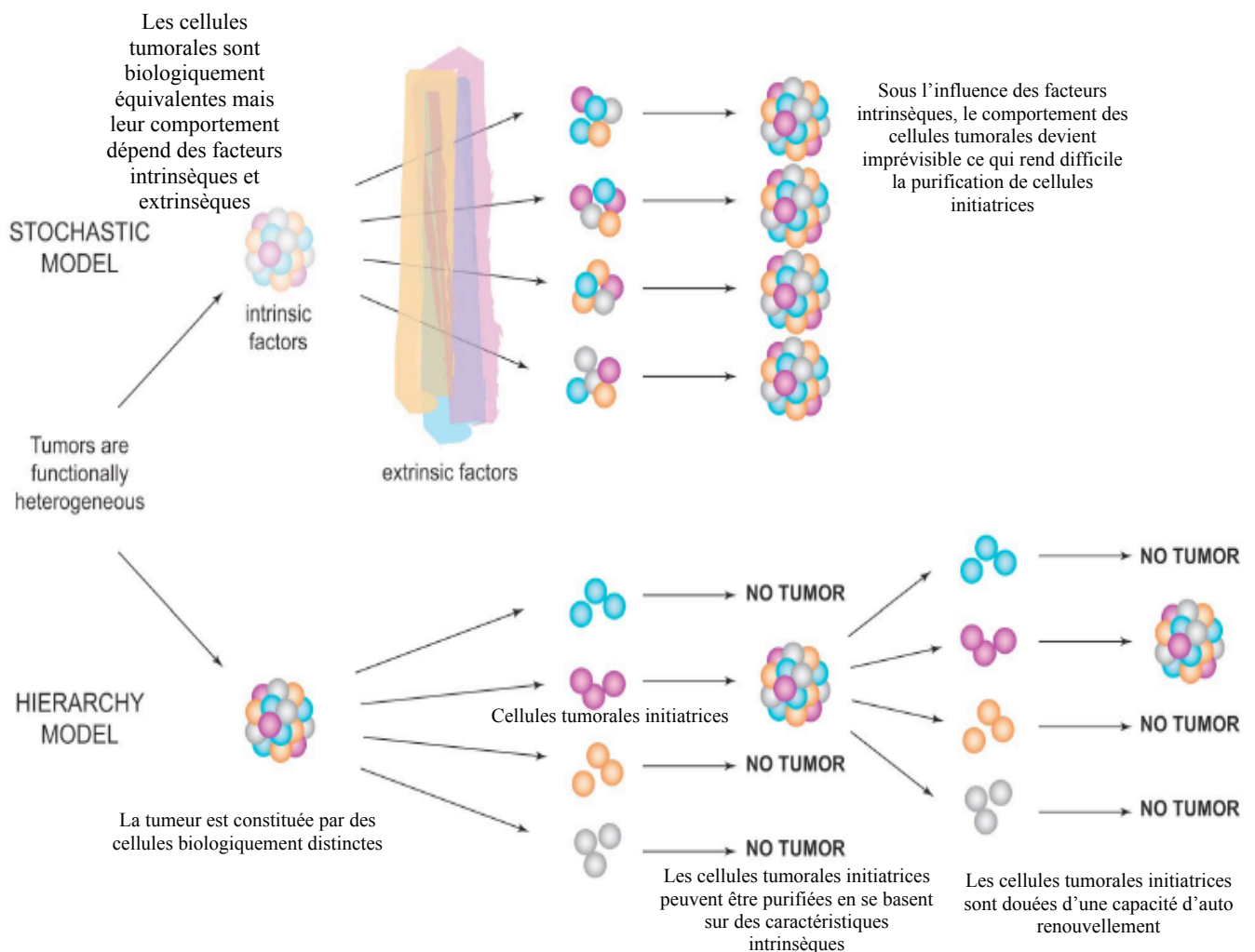


Figure 13 : Modèles d'hétérogénéité tumorale. Modèle stochastique, les cellules tumorales sont biologiquement équivalentes mais sont soumises à des facteurs extrinsèques et intrinsèques qui sont à l'origine de changements imprévisibles des cellules malignes. Ainsi il est difficile de purifier les cellules initiatrices du processus tumoral. A l'opposé, le modèle hiérarchique suppose l'existence de classes de cellules biologiquement distinctes ayant des aptitudes fonctionnelles et des comportements différents. Uniquement un sous-groupe de cellules, cellules souches cancéreuses, est capable d'initier la prolifération tumorale. D'après [Dick, 2008].

L'existence de cellule souche cancéreuse ("*cancer stem cell*", CSC) a initialement été proposée il y a plus de 47 ans [Bruce and Van der Gaag, 1963]. Ultérieurement, ce concept a été cristallisé par la découverte tout d'abord dans la leucémie aiguë myéloïde (LAM), puis dans différents types de cancers, d'une fraction de cellules largement quiescente, ayant une durée vie prolongée et douée d'une capacité d'auto-renouvellement [Clarke et al., 2006]. Ces CSC, sont le support de la maladie cancéreuse et se différencient en progéniteurs quand elles sont transplantées en série chez la souris immunodéficiente NOD-SCID [Bonnet and Dick, 1997; Cho and Clarke, 2008; Lobo et al., 2007]. A cette définition fonctionnelle, est souvent associée une identification par des marqueurs de surface co-exprimés par les CSC et leurs homologues normales [Al-Hajj et al., 2003]. Par exemple, dans les LAM une petite sous population (<0.001%) de cellules, de phénotype CD34+/CD38- (un phénotype que partagent aussi les CS hématopoïétiques normales), est seule capable de générer toutes les cellules malignes [Bonnet and Dick, 1997 ; Eisterer et al., 2005]. Dans les glioblastomes, les CSC se distinguent par l'expression de l'antigène CD133 [Olivier and Wechsler, 2004]. L'hypothèse de CSC ne présume en rien de l'origine de la cellule maligne (cellule dans laquelle s'est apparu les évènements initiaux tumorigènes) qui peut être soit une cellule souche soit un progéniteur [Reya et al., 2001].

La proportion de CSC dans une tumeur, leurs rapports avec leurs homologues normales, et l'hierarchie structurelle de la tumeur ne sont encore pas clairement établis. Par exemple, dans les LAM, le profil moléculaire des CSC est plus proche de celui des progéniteurs normaux [Goardon et al., 2011]. Dans les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) de l'enfant, les cellules malignes ne semblent pas être organisées selon un modèle hiérarchique et les CSC ne sont pas aussi rares que dans les LAM (1/100 dans les LAL versus $1/10^4$ - $1/10^6$ dans les LAM) [Goardon et al., 2011; Le Viseur et al., 2008]. Ceci contraste avec des mélanomes humains agressifs métastatiques qui ont 25% de CSC [Boiko et al., 2010; Quintana et al., 2008]. Dans les leucémies, une sous-population de cellules propage mais peut ne pas reconstituer l'intégralité de la tumeur *in vivo*. Elles sont ainsi appelées cellules leucémiques initiatrices [Vyas and Jacobsen, 2011]. Il existe probablement des raisons d'ordre expérimentale et conceptuelle à l'origine de la divergence de ces données. La différence de pourcentage de CSC entre les LAM et LAL pourrait être expliquée par une meilleure efficacité de la xéno greffe de cellules lymphoïdes comparées aux cellules myéloïdes chez la souris immunodéficiente. La différence d'hierarchie structurelle entre les tumeurs pourrait en rapport avec une différence d'organisation de leurs tissus normaux. Un tissu normal, organisé selon une hiérarchie souple peut favoriser la

formation de tumeurs riches en cellules initiatrices. Si la cellule normale peut ré-intégrer le compartiment des cellules souche à partir du compartiment des progéniteurs précoces, ceci peut être à l'origine d'une interconversion bidirectionnelle entre la fraction des CSC et le reste du compartiment cellulaire de la tumeur. Cette plasticité phénotypique, à l'origine d'une variation dynamique de la proportion des CSC, complique l'évaluation réelle du taux de CSC dans une tumeur. Dans le même ordre d'idée, l'hierarchie structurale d'une tumeur donnée évolue au fur et à mesure de la progression de la maladie cancéreuse. Il en découle des différences dans : l'hierarchie cellulaire et la proportion des CSC entre les différents types de cancers, les différents patients, et chez le même malade en réponse au traitement ou au cours de la progression de la maladie.

Les méthodes actuelles d'identification et d'isolement des CSC, dont la formation de "sphères" (mammo-, prostatato-, colonosphères) correspondant à la prolifération tridimensionnelle de clones, le développement de colonies et la détection de marqueurs spécifiques ont leurs limites. En particulier, peu se soucient de l'influence du microenvironnement qui est rarement reconstitué dans ces systèmes. Actuellement, on connaît l'influence de la signalisation par les cellules stromales entourant la tumeur non seulement sur l'expression des marqueurs de surface, mais aussi sur la survie et la croissance des CSC.

8.2 Stroma tumoral

L'hétérogénéité du stroma tumoral est supérieure à celle de la tumeur elle-même [Valastyan and Weinberg, 2011]. Ce stroma est formé par des cellules endothéliales, des péricytes, des cellules de l'immunité et des fibroblastes associés aux cancers.

Les composants prééminents du stroma tumoral sont les cellules constituant les vaisseaux associés aux tumeurs. Durant la progression tumorale le *switch* angiogénique, activant des cellules endothéliales quiescentes, va leur permettre d'induire un nouveau programme biologique dans l'optique de développer une néovasularisation. Comme cela a précédemment été noté, ce mécanisme d'angiogenèse est soutenu par un réseau interconnecté de voies de signalisation impliquant des ligands (exemple VEGF ; **Figure 8**) de récepteurs exprimés par les cellules endothéliales. Ces voies de signalisation sont fonctionnellement impliquées dans le développement de néovaisseaux tumoraux et illustre la régulation complexe du phénotype des cellules endothéliales [Ahmed and Bicknell, 2009; Dejana et al., 2009]. De plus des études ont montré que le profil d'expression ainsi que les marqueurs de surfaces des cellules endothéliales normales et associées aux tumeurs sont

différents [Nagy et al., 2010]. Par ailleurs, le rôle des cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques dans la croissance tumorale reste mal compris. En effet, les vaisseaux lymphatiques traversant la tumeur sont typiquement en collapsus et non fonctionnels. A l'inverse, une prolifération intense est présente dans les vaisseaux lymphatiques qui sont en périphérie de la tumeur et ceux qui jouxtent le tissu normal qui est infiltré par des cellules malignes. Ces derniers vaisseaux servent comme des canaux pour la dissémination métastatique des ganglions tributaires de ces vaisseaux lymphatiques.

Les péricytes, cellules mésenchymateuses spécialisées, sont associés aux vaisseaux sanguins. Ces cellules maintiennent l'endothélium dans un état de quiescence. Il semble qu'il existe une corrélation entre la densité en péricytes des vaisseaux tumoraux et le potentiel métastatique de la tumeur. En effet, une faible couverture de la paroi des néovaisseaux en péricytes faciliterait l'intravasation des cellules malignes dans la circulation sanguine et la dissémination hématogène consécutive [Gerhardt and Semb, 2008; Raza et al., 2010].

Les cellules inflammatoires font partie du stroma tumoral. Il s'agit des cellules de l'immunité innée et adaptative. Comme cela a précédemment été discuté, ces cellules constituent une barrière anticancer mais peuvent à des degrés variables promouvoir la croissance tumorale dans presque la majorité des cancers.

Les fibroblastes, présents à des proportions variables dans les carcinomes, constituent dans plusieurs cas la population cellulaire prépondérante du stroma tumoral. Le terme de fibroblastes associés aux cancers regroupe au minimum 2 types de cellules. Premièrement, il y a les cellules qui ont une importante similitude avec les fibroblastes qui constituent le composant fondamental de la structure de presque la majorité des tissus épithéliaux normaux. Les myofibroblastes représentent le 2^{ème} type de cellules. Ces cellules ont un rôle dans la cicatrisation néanmoins, leur action prolongée dans les états d'inflammation chronique peut entraîner une fibrose. Des études ont montré que ces 2 types de cellules augmentent la prolifération des cellules malignes, l'angiogenèse, l'invasion et les métastases [Bhowmick et al., 2004; Kalluri and Zeisberg, 2006].

Les différentes variétés de cellules stromales qui constituent le microenvironnement tumoral peuvent être recrutées à partir du tissu normal adjacent. De plus, des études ont montré que la moelle osseuse peut être une source clé de ces cellules stromales [Bergfeld and DeClerck, 2010; Lamagna and Bergers, 2006]. L'origine médullaire des progéniteurs des péricytes et d'autres variétés de fibroblastes associés aux cancers a été démontrée dans des modèles de cancers chez la souris. En revanche la prévalence et l'importance

fonctionnelle des progéniteurs des cellules endothéliales restent non résolues [Bergfeld and DeClerck, 2010]. Ainsi, les cellules du microenvironnement tumoral peuvent provenir: de la prolifération de cellules stromales préexistantes, de la différenciation in situ de cellules souches/progéniteurs originaires du tissu normal adjacent, ou *via* le recrutement de cellules souches/progéniteurs médullaires [Joyce and Pollard, 2009].

Les cellules du parenchyme tumoral interagissent avec les cellules du microenvironnement (**Figure 14**). Ceci a été démontré dans le cancer du sein. Par exemple, les adipocytes présents dans le microenvironnement local, en produisant l'interleukine 6 (IL6) vont stimuler l'invasion des cellules tumorales [Dirat et al., 2011]. L'invasion et la migration des cellules carcinomateuses sont initiées grâce à des facteurs de croissance tels que la chémokine CXCL12, produite par les

péricytes, fibroblastes et les cellules tumorales, qui se lie à son récepteur (CXCR4) exprimés par les macrophages et les cellules carcinomateuses. Des interactions réciproques entre les macrophages produisant l'EGF et les cellules carcinomateuses sécrétant le colony stimulating factor-1 (CSF-1) ont été rapportées. L'EGF induit la migration des

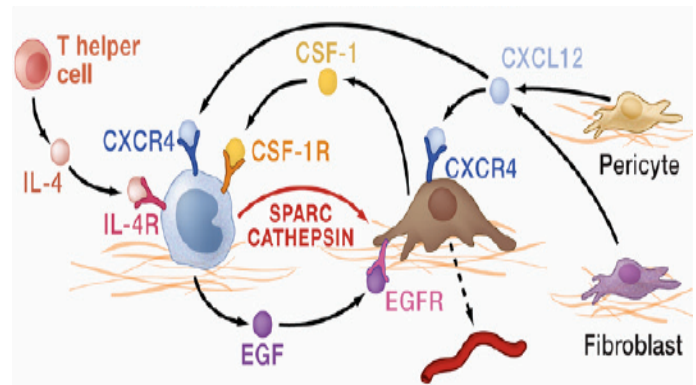


Figure 14: Interaction des cellules stromales et tumorales. Adapté de [Qian and Pollard, 2010].

cellules malignes alors que le CSF-1 permet le recrutement de macrophages, d'où une boucle de régulation paracrine [Condeelis and Segall, 2003]. De plus, les lymphocytes T CD4+ stromales stimulent la migration des cellules carcinomateuses en recrutant des macrophages [DeNardo et al., 2009]. La sécrétion d'interleukine 4 (IL-4) par les cellules carcinomateuses ou les lymphocytes CD4+ stimule la production de la protéase cathépsine par les macrophages [Gocheva et al., 2010].

Le rôle crucial du microenvironnement dans le développement de l'invasion-métastase des tumeurs solides est bien étudié et commence à émerger pour les hémopathies malignes [Buonamici et al., 2009 ; Burger et al., 2009].

II. Altérations génomiques

L'acquisition des caractéristiques fonctionnelles précédemment énumérées par la cellule cancéreuse dépend dans une large proportion des altérations génomiques de cette cellule.

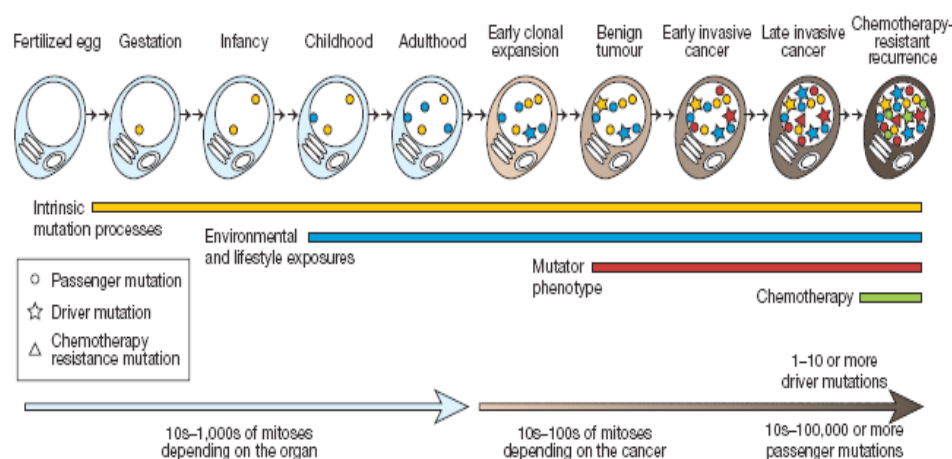


Figure 15 : Lignage des cellules somatiques depuis la naissance de la première cellule après conception jusqu'à l'apparition de la première cellule dans une tumeur. Cette cascade d'événement dénote la chronologie de l'acquisition des mutations somatiques et les processus à l'origine de ces anomalies. D'après [Stratton et al., 2009].

Ces mutations somatiques ont été accumulées durant la progression multiétape du processus tumoral. Certaines d'entre elles sont acquises au moment où les cellules ancestrales du cancer sont biologiquement et phénotypiquement normales (**Figure 15**). Dans les cellules normales, l'ADN est constamment endommagé par des agents génotoxiques et clastogènes exogène et endogène. La majorité de ces dommages sont réparés puisque le taux de mutagenèse spontanée chez l'homme est de l'ordre de 10^{-10} à 10^{-11} par base et par division cellulaire [Kunkel and Bebenek, 2000]. En revanche, une faible fraction peut se convertir en mutations fixes. La compréhension du taux de mutation somatique dans les cellules normales reste relativement rudimentaire. Néanmoins, il est probable que ce taux de mutation dépend de la nature de cette mutation et du type cellulaire concerné. Le taux de mutation augmente en présence d'important mutagènes exogènes, tels que le tabac, les rayons ultraviolets, et les radicaux libres provoqués par des mécanismes inflammatoires. Cette exposition s'accompagne d'une part, d'une augmentation de

l'incidence des cancers du poumon et de la peau respectivement et d'autre part, de la présence de mutations somatiques caractéristiques de ces agents mutagènes dans les génomes de ces tumeurs [Olivier et al., 2004]. Les taux des différentes classes de mutations somatiques sont également élevés dans plusieurs maladies rares héréditaires associées à des instabilités chromosomiques ou génétiques comme l'anémie de Fanconi et le xéroderma pigmentosum, lesquelles sont associées à un risque élevé de cancer [Hanks and Rahman, 2005; Kennedy and D'Andrea, 2006].

Le reste de mutations somatiques dans le génome de la cellule cancéreuse est acquis durant le segment de lignage cellulaire dans lequel les cellules ancestrales du cancer ont déjà un phénotype tumoral (**Figure 15**). Si le taux de mutation somatique est toujours élevé dans cet intervalle de lignage cellulaire reste encore un sujet de controverse [Bodmer et al., 2008; Loeb et al., 2001, 2008]. Pour certaines formes de cancer, ceci est clairement le cas. Par exemple, les cancers du colon et l'endomètre, liés un défaut de réparation des mésappariements secondaire à des mutations des gènes *MLH1* et *MSH2*, présentent des taux élevés de mutations somatiques [Greenman et al., 2007; Lengauer et al., 1998]. Ce «phénotype mutateur» peut se voir dans d'autres types de cancers avec instabilité chromosomique élevée, bien que ces types soient généralement moins caractérisés [Lengauer et al., 1998]. Le rôle d'un taux élevé de mutations somatiques dans la genèse d'un cancer s'explique par une augmentation de la diversité des séquences d'ADN sur lesquelles s'opère la sélection. En revanche, il a été suggéré que le taux de mutations des cellules normales semble être suffisant pour le développement de certaines formes de cancers, sans avoir besoin d'un «phénotype mutateur» [Bodmer et al., 2008; Loeb et al., 2008; Tomlinson et al., 1996].

Au cours du temps, l'acquisition des mutations peut ne pas être progressive [Nowell, 1976] et les prédécesseurs de la cellule cancéreuse peuvent subitement acquérir un grand nombre de mutations. Récemment la combinaison du « séquençage parallèle en masse du génome » et de l'analyse des polymorphismes, SNP, comparée entre tumeurs primaires et une variété de lignée, a mis en évidence un nouveau mécanisme d'instabilité génétique appelé *chromothripsis* (du grec : *chromos* pour chromosome et *thripsis* pour briser et éclats) [Stephens et al., 2011] (**Figure 16**). Il se caractérise comme un événement cataclysmique survenant soit sur un chromosome unique, soit sur un bras de chromosome, voire sur un tout petit nombre de chromosomes qui subissent d'abord une fragmentation importante et soudaine suivie d'un réassemblage de ces fragments chromosomiques. Ce type d'aberration chromosomique a récemment été rapporté dans le myélome multiple et semble être associé à

un mauvais pronostic [Magrangeas et al., 2011]. Le *chromothripsis*, cet équilibre ponctué, apparaît comme un nouveau mécanisme d'évolution des cancers. Par ailleurs, l'hypothèse originale de l'évolution clonale a suggéré que l'acquisition des mutations dans une population tumorale se fait d'une manière séquentielle [Nowell, 1976]. Des études récentes basées sur le séquençage de marqueurs clonaux et l'analyse du nombre de copies suggèrent que dans une tumeur, les sous clones peuvent être organisés selon un schéma non linéaire avec des ramifications de familles de clones [Campbell et al., 2010; Mullighan et al., 2008].

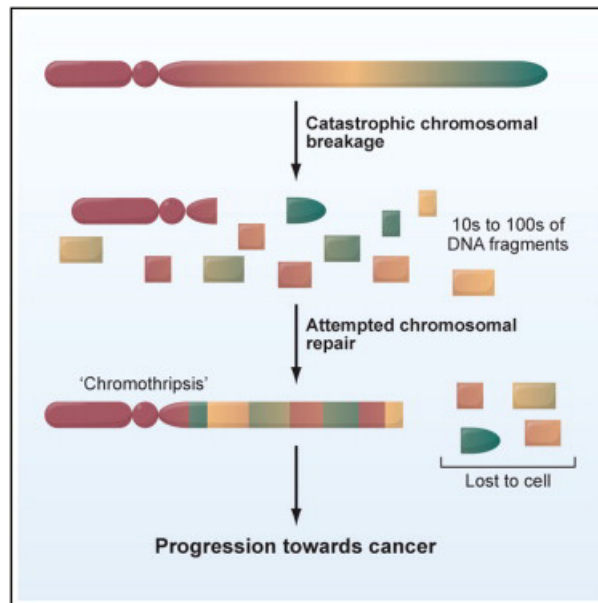


Figure 16 : Chromothripsis. D'après [Stephens et al., 2011].

Au moment du diagnostic, un cancer est formé par des milliards de cellules. Le génome de ces cellules comprend les mutations somatiques ayant servi à l'initiation [Bozic et al., 2010; Haber and Settleman, 2007] du processus malin et plusieurs autres anomalies additionnelles acquises durant la progression de la maladie cancéreuse. Quelque soit la nature de leur structure, ces anomalies additionnelles sont classées en mutations *drivers* et *passengers* [Stratton, 2011]. Les mutations *drivers* confèrent un avantage prolifératif à la cellule porteuse de ces mutations et qui sont donc sélectionnées positivement au cours de l'évolution du processus malin. Ces mutations sont présentes, par définition, dans un groupe de gènes appelés gènes du cancer [Futreal et al., 2004; <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/Census/>] et vont donc subvertir le contrôle normal de la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire et les autres interactions homéostasiques avec le microenvironnement tissulaire. A l'inverse les mutations *passengers* n'offrent aucun

avantage prolifératif, biologiquement neutres, à la cellule tumorale donc elles ne sont pas sélectionnées [Greenman et al., 2007]. Elles sont présentes dans les progéniteurs d'un clone définitif en expansion ayant déjà acquis une ou des mutations *drivers* [Bozic et al., 2010]. Il est nécessaire de souligner que les mutations *drivers* contribuent au processus de carcinogénèse et ne sont pas la cause du cancer [Bozic et al., 2010; Vogelstein and Kinzler, 2004]. Il est hautement probable que la majorité des cancers portent plus d'une mutation *driver* et leur nombre varie selon le type de cancer [Stratton et al., 2009]. Par exemple, il semble que les carcinomes communs de l'adulte, tels que les cancers du sein, colo-rectaux et la prostate, requièrent au minimum 5-7 évènements, possiblement l'équivalent en mutations *drivers* [Komarova et al., 2003, Miller, 1980], alors que ce nombre est beaucoup plus faible en cas d'hémopathies malignes [Nowell, 2002; Miller, 1980; Rowley, 1998]. En revanche, des analyses récentes des mutations somatiques dans des cancers indiquent que le nombre des mutations *drivers* peut être très élevé [Beerenwinkel et al., 2007].

Une importante sous classe de mutations *drivers*, sont celles qui confèrent une résistance aux traitements (**Figure 15**). Ces mutations sont typiquement présentes dans les formes récurrentes de cancers ayant initialement répondu aux traitements mais qui sont devenus secondairement résistantes. En l'absence de traitement, les mutations de résistance confèrent souvent un avantage prolifératif limité à la cellule maligne. Certaines semblent préexister à l'instauration du traitement, elles sont présentes en tant que mutations *passengers* dans des sous clones minoritaires de la population cellulaire tumorale jusqu'à ce que l'environnement change et devient sélectif par l'instauration du traitement [Mullighan et al., 2008; Roche-Lestienne et al., 2002]. La mutation *passenger* se converti alors en mutation *driver* et le sous clone résistant va ainsi acquérir un avantage prolifératif plus important, responsable donc d'une récurrence tumorale.

Ces mutations *drivers* peuvent survenir, dans la lignée germinale, responsable donc d'une prédisposition au cancer héréditaire, ou dans une cellule somatique, à l'origine de cancers sporadiques. Une mutation est définie par tous changements dans la séquence du génome [Vogelstein and Kinzler, 2004]. Ces modifications comprennent celles qui affectent une seule paire de base mais également celles à l'origine, d'une grande ou petite délétion, d'insertion, d'amplification ou de translocation. Dans la lignée germinale, la majorité des mutations sont subtiles, en revanche, tous les types de mutations peuvent être retrouvés dans une tumeur. Toutes ces mutations sont rares ou absentes dans les cellules normales [Lengauer et al., 1998].

Ces mutations sont 2 types [Loeb, 2001; Rajagopalan et al., 2003]. Dans une faible proportion de tumeurs, ces anomalies sont observées au niveau du nucléotide [Lengauer et al., 1998]. Dans la majorité des autres cancers, ces anomalies sont détectées au niveau chromosomique [Lengauer et al., 1997, 1998; Nowak et al., 2002].

1. Altérations ponctuelles de séquences

Le premier type d'anomalie qui a été mis en évidence dans les tumeurs comprend un changement subtil de séquence qui altère une ou quelques paires de base (pb). Ce type d'anomalie n'est pas courant dans les tumeurs humaines, mais, quand il est présent, il est à l'origine d'un phénotype tumoral sévère [Lengauer et al., 1998].

L'ADN néosynthétisé peut comporter des erreurs malgré les fonctions d'édition de la polymérase chargée de la réplication. Il est peut également subir des lésions d'origine exogène (exemple, les rayons ultraviolets, UV). Plusieurs mécanismes interviennent dans la réparation de lésions subtiles de l'ADN dont 2 voies majeures ont été associées au développement des cancers : réparation des mésappariements et réparation par excision de nucléotides.

1.1. Réparation des mésappariements (MMR : "*mismatch repair*")

La voie MMR est responsable de la réparation des mésappariements (ou hétéroduplexes) des bases d'ADN qui sont généralement commis par les polymérase δ et ϵ et dont la fréquence est évaluée à 10^{-10} [Kunz et al., 2009 ; Stojic et al., 2004].

Cette voie fait appel aux protéines : MLH1 (*MutL homolog 1*), MSH2, MSH3, MSH6 (MSH : "*MutS homolog 2*") et PMS2 ("*Postmeiotic segregation increased*"). Ces enzymes agissent sous forme d'hétérodimère et reconnaissent l'ADN sous une forme d'hétéroduplexe [Soussi, 1999]. Chaque type de mésappariement est préférentiellement reconnu par un hétérodimère donné. L'hétérodimère MLH1/ PMS2 se lie ensuite au premier hétérodimère et la réparation se déroule par des étapes successives d'excision des bases mésappariées par le complexe de nucléase EXOI-PCNA, puis resynthèse du brin lésé par une polymérase δ et enfin ligature par une ligase IV.

Le processus MMR répare non seulement les lésions induites sur l'ADN mais il joue aussi un rôle critique dans le maintien de la stabilité génomique (notamment la taille de séquences répétées de di- ou trinuécléotides, appelées microsatellites). Une anomalie de la

voie MMR est associée au cancer héréditaire du colon non polyposique (HNPCC). Cette maladie génétique est causée par une mutation dans 90% des cas au niveau des gènes *MSH2* ou *MLH1* [Bronner et al., 1994 ; Leach et al., 1993].

1.2. Réparation par excision de nucléotides (NER : *nucleotide excision repair*)

Ce mécanisme est mis en jeu pour la réparation des lésions d'ADN induites par les rayons UV et par certains agents alkylants. La voie NER fait intervenir plusieurs protéines notamment la protéine XP ("*xérodérma pigmentosum*"). La reconnaissance de la lésion peut se faire de 2 façons : dans le cas du *global genome NER* (GG-NER), les lésions sont reconnues, indépendamment de leur localisation dans le génome, par un complexe protéique XPC-RAD23B. Dans le second mécanisme, *transcription-coupled-NER* (TC-NER), seules les lésions survenant dans les régions transcrites du génome sont prises en charge et fait intervenir les protéines *Cockayne syndrome A* et *B* (CSA et CSB). Dans les 2 cas, des hélicases XPD (ou ERCC2) et XPBP (ou ERCC3) associées au complexe de transcription, TFIIH, maintiennent la chromatine en position ouverte pour permettre l'accessibilité aux enzymes de réparation. La protéine XPA reconnaît et vérifie la présence de la lésion, la protéine RPA se lie à l'ADN endommagé et l'endonucléase XPG (ou ERCC5) incise le brin en 3' de la lésion. L'endonucléase XPF (ERCC4), en association avec le facteur *excision repair cross complementation group 1* (ou ERCC1) qui incise l'ADN endommagé en 5' de la lésion, et libère un fragment simple brin. L'ADN polymérase δ ou ϵ reconstitue alors la partie excisée en apportant les nucléotides complémentaires à ceux du brin intact servant de matrice, et une ligase restaure la continuité de l'ADN.

La voie NER est sous le contrôle du gène *TP53* et les tumeurs déficientes pour *TP53* ne peuvent pas la mettre en jeu et il en résulte une instabilité génomique accrue. Le niveau d'expression et/ou d'activité des protéines de la voie NER est un facteur important de sensibilité aux agents anticancéreux provoquant des lésions de l'ADN tributaire de cette voie NER. La surexpression de ERCC1 est un facteur important de résistance au cisplatine des cancers du poumon non à petites cellules.

Chez les eucaryotes il existe des mécanismes de tolérance des lésions de l'ADN. Ils consistent chez les mammifères en une série d'ADN polymérase translésionnelles, chacune spécialisée dans le franchissement d'un type de lésion [Friedberg et al., 2005], par exemple l'ADN polymérase η pour les dimères thymine et l'ADN polymérase θ pour les sites abasiques. Ces polymérases sont fortement mutagènes et la synthèse translésionnelle est

utilisée par les tumeurs pour accroître leur niveau d'instabilité génomique. Leur expression est souvent altérée dans les cancers.

2. Anomalies chromosomiques

L'association des anomalies chromosomiques au cancer (**Tableaux 1 et 2**) est connue depuis le 20^{ème} siècle. Ces anomalies se divisent en 2 grands groupes. Les anomalies de nombre qui englobent la ploïdie, nombre de chromosome multiple de n ($n=23$ chromosomes) et l'aneuploïdie qui est définie par un nombre de chromosomes inférieur ou supérieur à $2n$. Les anomalies chromosomiques de structure peuvent être, soit équilibrées (insertion, inversion et translocations réciproque équilibrée), soit déséquilibrées (amplifications, délétions et duplications). Le progrès des moyens d'étude de l'oncogénome a permis de comprendre que les anomalies chromosomiques de structure ou segmentaire (petite délétion ou petite duplication) contribuent au développement du cancer en : activant des oncogènes et inactivant des gènes suppresseurs de tumeurs [Mitelman et al., 2007].

Disease	Chromosomal Abnormalities	Genes	Targeted therapy
Acute malignant lymphoid proliferation			
ALL L1/L2 Pre-B	t(1;19)(q23;p13)	PBX1-TCF3	
ALL L1/L2 B or biphenotypic	t(9;22)(q34;q11)	ABL-BCR	
ALL L1/L2 biphenotypic	t(4;11)(q21;q23)	AF4-MLL	
ALL L1/L2 (child)	t(12;21)(p13;q22)	TEL-AML1	
ALL L1/L2	hyperdiploidy 50-60 chromosomes,		
ALL L1/L2	t(5;14)(q31;q32)	IL3*IGH	
ALL LT	dup(6)(q22-q23)	MYB	
ALL L1/L2	del(9p),t(9p)	?CDKN2(p16)	
ALL L1/L3	del(9)(p13)	PAX5	
ALL L1/L2	t(9;12)(q34;p13)	ABL-TEL	
ALL L1/L2	t(11;V)(q23;V)	MLL-V	
ALL L1/L2	del(12p)	ETV6	
ALL L1/L3	episome(9q34.1)§	NUP214-ABL1	Imatinib
B (ALL3, Burkitt's leukemia/ lymphoma)	t(8;14)(q24;q32)	IGH*MYC	
B (ALL3, Burkitt's leukemia/ lymphoma)	t(2;8)(p12;q24)	IGK*MYC ³	
B (ALL3, Burkitt's leukemia/ lymphoma)	t(8;22)(q24;q11)	IGK*MYC ³	
Follicular lymphoma to large cell diffuse lymphoma	t(14;18)(q32;q21) and variants	IGH*BCL2/IGK/IGL	
Mantle-cell lymphoma	t(11;14)(q13;q32)	CCND1*IGH	
Marginal zone lymphoma	t(1;14)(p21;q32)	BCL10*IGH	
Marginal zone lymphoma	3		
Marginal zone lymphoma	t(11;18)(q21;q21)	BIRC3-MALT1	
large cell diffuse lymphoma	t(3;14)(q27;q32), variants	BCL6*IGH, BCL6*V	
large cell diffuse lymphoma	t(11;14)(q13;q32)	CCND1*IGH	
Anaplastic large-cell lymphoma	t(2;5)(p23;q35), variants	ALK-NPM1	
Chronic malignant lymphoid proliferation			
Lymphocytic B cell lymphoma, Chronic lymphocytic leukemia	t(11;14)(q13;q32)	CCND1*IGH	
Lymphocytic B cell lymphoma, Chronic lymphocytic leukemia	t(14;19)(q32;q13)	IGH*BCL3	
Lymphocytic B cell lymphoma, Chronic lymphocytic leukemia	t(2;14)(p13;q32)	BCL11A*IGH	
Lymphocytic B cell lymphoma, Chronic lymphocytic leukemia	del(11)(q23.1)	ATM	
Lymphocytic B cell lymphoma, Chronic lymphocytic leukemia	del(13)(q14)	DLEU, miR-16-1 & 15a	
Prolymphocytic T leukemia	inv(14)(q11q32)	TCRA/TCR D* TCL1A	
Prolymphocytic T leukemia	t(14;14)(q11;q32)	TCRA/TCR D* TCL1A	
Prolymphocytic T leukemia	t(7;14)(q35;q32.1)	TCRB* TCL1A	
Multiple myeloma	t(11;14)(q13;q32)	CCND1*IGH	

Tableau 1: Exemples d'anomalies chromosomiques dans les hémopathies malignes. D'après [Bernheim, 2010].

Multiple myeloma	t(4;14)(p16;q32)	WHSC1-IGHG1	
Multiple myeloma	del(13)(q14)	DLEU, miR-16-1 & 15a	
Acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome			
AML M2	t(8;21)(q22;q22)	RUNX1-RUNX1T1	
AML M3 and microgranular variant	t(15;17)(q22;q11-12)	PML-RARA	Retinoid Acid
AML M3 (atypical)	t(11;17)(q23;q12)	PLZF-RARA	Retinoid Acid
AML M4Eo	inv(16)(p13q22) ou t(16;16)(p13;q22)	CBFB-MYH11 CBFB-MYH11	
AML M5a and other AML	t(9;11)(p22;q23)	MLL-MLLT3	
AML M5a and other AML	t(11q23;V)	MLL multiple partners including MLL	
Acute megakaryoblastic leukemia	t(1;22)(p13;q13)	RBM15-MKL1	
AML, MDS	t(3;3)(q21;q26) or variants	RPN1-EV11	
AML, MDS	t(3;5)(q25;q34)	MLF1-NPM1	
AML, MDS	t(5;12)(q33;p13)	PDGFRB-ETV6	
AML, MDS	-5 /del(5q)	RPS14	
AML, MDS	t(6;9)(p23;q34)	DEK-NUP214	
AML, MDS	t(7;11)(p15;p15)	HOXA9-NUP98	
AML, MDS	-7 ou del(7q)	Numerous genes	
AML, MDS	+8		
AML, MDS	t(8;16)(p11;p13)	MOZ-CBP	
AML, MDS	t(9;12)(q34;p13)	ETV6-ABL	
AML, MDS	t(12;13)(p13;q12.3)	ETV6-CDX2	
AML, MDS	t(12;22)(p13;q13)	ETV6-NM1	
AML, MDS	t(12;V)(p13;V), del(12p)	ETV6L-V	
AML, MDS	t(16;21)(p11;q22)	FUS-ERG	
AML, MDS	del(20q)		
Therapy-induced leukemia			
Alkylating agent- and irradiation-induced leukemia	-5 ou del(5q)		
Alkylating agent- and irradiation-induced leukemia	-7 ou del(7q)		
Anti topoisomeraseII induced leukemia	t(11q23;V)	MLL-V	
Chronic myeloid proliferation			
Chronic myeloid leukemia (CML)	t(9;22)(q34;q11)	BCR-ABL1	Imatinib, 2nd generation TKI
Lymphoblastic acutisation of CML	t(9;22), +8,+Ph, +19, i(17q)	BCR-ABL1	Imatinib, 2nd generation TKI
Polycythemia vera	, +9p, del(20q)		
MDS/MPD	t(8;9)(p21;p24)	PCM1-JAK2	
Chronic myelomonocytic leukemia	t(5;12)(q33;p13)	PDGFRB-TEL	Imatinib
5q- syndrome	del(5q)	RPS14	

Tableau 1. Suite.

Disease	Chromosomal Rearrangements	Gene	Targeted therapy²
Breast cancer	amp(1)(q32.1)	IKBKE	
Breast and various cancers	amp(6)(q25.1)	ESR1	Tamoxifen
Breast cancer	amp(17)(q21.1)	ERBB2 (HER2)	Trastuzumab, Lapatinib
Breast cancer	amp(20)(q12)	NCOA3	
Breast and various cancers	t(12;15)(p13;q25)	ETV6-NTRK3	
Colon cancer	del(4)(q12)	REST	
Colon cancer	del(5)(q21-q22)	APC	
Hepatocellular carcinoma	amp(11)(q13-q22)	BIRC2	
Hepatocellular carcinoma	amp(11)(q13-q22)	YAP1	
Lung cancer	amp(1)(p34.2)	MYCL1	
Lung cancer (non–small-cell)	inv(2)(p22-p21p23)	EML4-ALK	
Lung, head and neck cancers	amp(3)(q26.3)	DCUN1D1	
Lung cancer (non–small-cell)	amp(7)(p12)	EGFR	Cetuximab, Panitumumab, Gefitinib, Erlotinib
Lung cancer (non–small-cell)	amp(14)(q13)	NKX2-1	
Ovarian cancer	amp(1)(q22)	RAB25	
Ovarian cancer	amp(3)(q26.3)	PIK3CA	
Ovarian, breast cancers	amp(11)(q13.5)	EMSY	
Ovarian, breast cancers	amp(17)(q23.1)	RPS6KB1	
Prostate cancer	amp(X)(q12)	AR	
Prostate cancer	del(21)(q22.3q22.3)	TMPRSS2*ERG	
Renal carcinoma papillary	+7q31	MET	
Renal carcinoma papillary	t(X;1)(p11;p34)	PSF-TFE3	
Renal carcinoma papillary	t(X;1)(p11.2;q21.2)	PRCC-TFE3	
Thyroid cancer follicular	t(2;3)(q12-q14;p25)	PAX8-PPARG	
Thyroid cancer papillary	inv(10)(q11.2q11.2)	RET-NCOA4	
Thyroid cancer papillary	inv(10)(q11.2q21)	RET-CCDC6	
Ewing's sarcoma	t(11;22)(q24.1-q24.3;q12.2)	FLI1-EWSR1	
Ewing's sarcoma	t(21;22)(q22.3;q12.2)	ERG-EWSR1	
Rhabdomyosarcoma alveolar	t(1;13)(p36;q14)	PAX7-FKHR	
Rhabdomyosarcoma alveolar	t(1;13)(p36;q14)	PAX7-FKHR	
Rhabdomyosarcoma alveolar	t(2;13)(q37;q14)	PAX3-FKHR	
Chondrosarcoma (extrasqueletical)	t(9;17)(q22;q11)	RBP56-CHN	
Chondrosarcomas (myxoid)	t(9;22)(q22;q12)	EWS-CHN	
Desmoplastic tumors	t(11;22)(p13;q12)	WT1-EWS	
Clear cell sarcomas	t(12;22)(q13;q12)	ATF1-EWS	
Liposarcomas	t(12;16)(q13;p11)	CHOP-FUS	
Liposarcomas (myxoid)	t(12;16)(q13;p11)	CHOP-FUS	
Dermatofibrosarcomas protuberans	t(17;22)(q22;q13)	COL1A1-PDGFB	
Alveolar soft part sarcomas	der(17)t(X;17)(p11;q25)	ASPCR1-TFE3	
Synovialosarcomas	t(X;18)(p11.2;q11.2)	SYT-SSX1/SSX2-SYT	
Malignant melanoma	+7		

Tableau 1. Suite.

Malignant melanoma	amp(3)(p14.2-p14.1)	MITF	
Anaplastic oligodendroglioma	del(19q)		
anaplastic oligodendroglioma	del(1p)		
Medulloblastoma	amp(2)(p24.1)	MYCN	
Medulloblastoma	del(6)(q23.1)	WNT	
Medulloblastoma	amp(8)(q24.2)	MYC	
Medulloblastoma	del(9)(p21)	CDKN2A/CDKN2B	
Medulloblastoma	i(17q)	p53	
Neuroblastoma	amp(2)(p24.1)	MYCN	
Neuroblastoma	amp(2)(p23.1)	ALK	
Neuroblastoma	del(1p)		
Renal-cell cancer	del(3p26-p25)	VHL	
Retinoblastoma	del(13)(q14.2)	RB1	
Retinoblastoma	amp(1)(q32)	MDM4	
Retinoblastoma	del(13)(q14)	RB	
Testicular germ-cell tumor	+12p		
Wilms' tumor	del(11p)	WT1	
Wilms' tumor	del(X)(q11.1)	FAM123B	
Various cancers	+1q		
Various cancers	del(3p)		
Various cancers	amp(5)(p13)	SKP2	
Various cancers	amp(5)(p13)	SKP2	
Various cancers	amp(6)(p22)	E2F3	
Various cancers	del(6q)		
Various cancers	amp(7)(p12)	EGFR	Cetuximab, Panitumumab, Gefitinib, Erlotinib
Various cancers	amp(7)(q31)	MET	
Various cancers	amp(8)(p11.2)	FGFR1	
Various cancers	amp(8)(q24.2)	MYC	
Various cancers	del(9)(p21)	CDKN2A/CDKN2B	
Various cancers	del(10)(q23.3)	PTEN	
Various cancers	amp(11)(q13)	CCND1	
Various cancers	del(11)(q22-q23)	ATM	
Various cancers	del(11q)		
Various cancers	amp(12)(p12.1)	KRAS	
Various cancers	amp(12)(q14.3)	MDM2	
Various cancers	amp(12)(q14)	CDK4	
Various cancers	amp(12)(q15)	DYRK2	
Various cancers	amp(13)(q32)	GPC5	
Various cancers	+17q		
Various cancers	amp(17)(q21.1)	ERBB2 (HER2)	Trastuzumab, Lapatinib
Various cancers	del(17)(p13.1)	TP53	
Various cancers	del(17)(q11.2)	NF1	
Various cancers	amp(19)(q12)	CCNE1	
Various cancers	amp(20)(q13)	AURKA	

Tableau 1. Suite.

2.1. Aneuploïdie

A la différence des cellules normales, l'aneuploïdie est virtuellement observée dans tous les cancers [Mitelman et al., 2007]. Par exemple, les trisomie et tétrasomie sont les anomalies les plus fréquemment observées dans les cancers (<http://cgap.nci.nih.gov/chromosomes/Mitelman>; Huret 2010). Certaines aneuploïdies sont associées à un mauvais pronostic [Carter et al., 2006]. Les origines de l'aneuploïdie et leurs part dans le développement et la progression du cancer ne sont encore pas clairs.

a. Mécanismes de l'aneuploïdie

• Anomalie des checkpoints mitotiques

Des études dans des modèles expérimentaux ont identifié des gènes et des voies de signalisation qui peuvent prévenir l'aneuploïdie. Ces gènes contrôlent : le checkpoint mitotique. C'est un mécanisme permettant aux cellules eucaryotes d'arrêter la division cellulaire au stade de métaphase jusqu'à ce que les kinétochores s'attachent aux microtubules de fuseau mitotique. Au stade de prométaphase, les chromatides sœurs sont jointes par un complexe protéique : la cohésine [Haering et al., 2008]. L'activité de CDK1 ("cyclin dependent kinase 1"),

principale kinase mitotique, maintient la cellule dans un état de division. Au fur et à mesure que la cellule progresse de la prométaphase à la métaphase un complexe protéique, MAD1("mitotic arrest deficient 1"), MAD2, MPS1, BUB1, BUB3 et BUBR1, va se fixer sur des kinétochores libres (**Figure 17**). Ce processus va prévenir, *via* MAD2 et BUBR1 [Rieder et al., 1995 ; Wassmann and Benezra, 1998], la dégradation de la cycline B1 et de la sécurine par l'E3 ubiquitine ligase APC/C ("anaphase promoting complex/cyclosome") [Sudakin et al., 1995]. A ce stade, l'arrêt de la division cellulaire et la séparation des chromatides sœurs sont inhibées. Aussitôt que le dernier doublet des kinétochores s'attache aux microtubules, la protéine APC/C se dissocie de son cofacteur CDC20 ("cell division cycle 20"), et va entraîner alors l'ubiquitinylation de la cycline B1 et de la sécurine, les 2

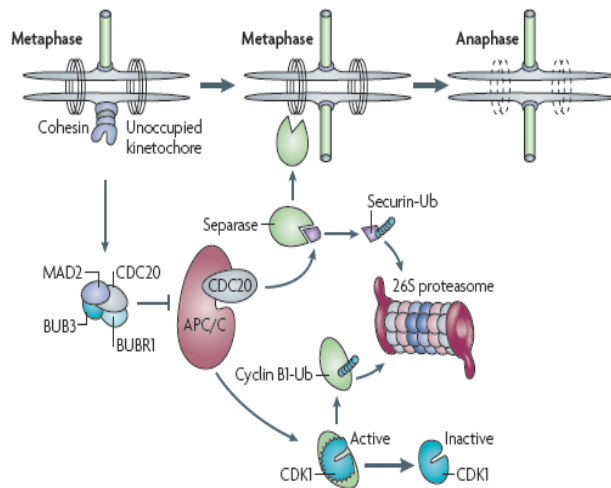


Figure 17 : Checkpoint mitotique. D'après [Schvartzman et al., 2010].

partenaires de la CDK1 et de la séparase respectivement. La dégradation de la cycline B1 par le protéasome induit un déclin rapide de l'activité de la CDK1, permettant à la cellule de quitter la phase M (mitose) du cycle cellulaire. La sécurine est une protéine chaperonne inhibitrice de la séparase. L'activité de la sécurine est essentielle pour la dissolution de la cohésine au niveau des kinétochores. La dégradation de la sécurine par le protéasome et sa dissociation du complexe CDK1-cycline B1 va activer la séparase et cliver la protéine SCC1 (RAD21). Ceci a pour conséquence la séparation des chromatides sœurs. Les 2 événements, inhibition de la CDK1 et l'activation de la séparase, sont nécessaires pour : une transition correcte métaphase-anaphase et une ségrégation adéquate des chromosomes. D'autres modèles des points de contrôle mitotique ont été rapportés [De Antoni et al., 2005 ; Herzog et al., 2009].

• Autres mécanismes

L'aneuploïdie peut également être la conséquence d'une anomalie : de la dynamique des microtubules ou des centrosomes, de la cohésion des chromatides, de la recombinaison homologue, de la réparation des cassures d'ADN double brin et du maintien de la taille des télomères [Compton, 2011 ; Thompson et al., 2010]. La surexpression de l'aurora kinase A (AURKA), requise pour la maturation des centrosomes et l'assemblage du fuseau mitotique [Vader et al., 2008], induit une instabilité chromosomique [Katayama et al., 2003]. Les anomalies des gènes de la réparation des cassures doubles brins de l'ADN peuvent être à l'origine d'aneuploïdie, c'est l'exemple de *BRCA1* et *BRCA2* [Milner et al., 1997; Yarden et al., 2002].

b. Conséquences de l'aneuploïdie

L'aneuploïdie apporte à la cellule cancéreuse d'énormes avantages. Elle permet de catalyser une probable inactivation d'un gène suppresseur de tumeurs. L'inactivation biallélique d'un gène suppresseur de tumeurs s'avère nécessaire pour que la cellule puisse acquérir un avantage prolifératif [Knudson, 2001]. L'inactivation du second allèle, *via* une recombinaison mitotique, la perte d'un

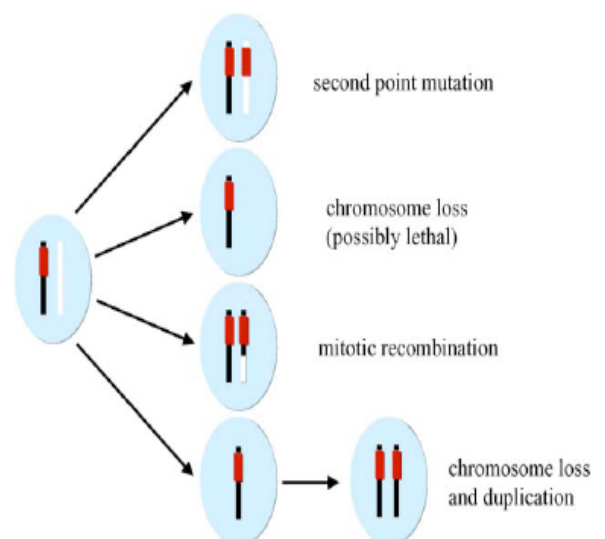


Figure 18: Mécanismes d'inactivation d'un gène suppresseur de tumeurs. D'après [Michor et al., 2005].

chromosome ou un autre changement de structure, définit la perte d'hétérozygotie: LOH ("*Loss Of Heterozygosity*"; **Figure 18**). En moyenne les génomes des cancers : du colon, du sein, du pancréas et de la prostate, peuvent perdre 25% de leurs allèles [Radford et al., 1995; Vogelstein et al., 1989]. Dans les cancers colorectaux et pancréatiques, la LOH observée est souvent secondaire à une perte de chromosomes [Brat et al., 1997; Thiagalingam et al., 2001], alors que dans le rétinoblastome, elle est plutôt la conséquence d'une recombinaison mitotique [Cavenee et al., 1985].

La trisomie peut apporter un avantage à la cellule maligne. Par exemple, dans les carcinomes papillaires du rein, une duplication récurrente du chromosome 7 a été rapportée [Fischer et al., 1998; Zhuang et al., 1998]. Le chromosome 7 dupliqué est porteur de la forme muté (mutation activatrice) de l'oncogène *MET*.

L'aneuploïdie peut entraîner un changement extensif de l'expression des gènes, ce qui peut donner à la cellule un autre avantage prolifératif. Quand un chromosome est perdu (gagné), le taux attendu des transcrits de tous les gènes localisés sur ce chromosome peut être la moitié (double) du taux normal. Cependant plusieurs processus, au minimum 2, s'opposent à cette hypothèse. Premièrement, une compensation du dosage génique survient en réponse à des boucles de contrôle qui régulent la majorité des voies de signalisation. Deuxièmement, la perte d'un chromosome est souvent associée à une duplication de la copie restante de ce chromosome, à l'origine d'une disomie uniparentale acquise [Fitzgibbon et al., 2005] (**Figure 18**), ce qui rétablit la normalité du nombre des chromosomes dans la cellule même si la LOH est présente [Brat et al., 1997; Thiagalingam et al., 2001]. De telles duplications chromosomiques paraissent nécessaires pour prévenir la mort cellulaire liée à l'haploinsuffisance.

Enfin, il a été démontré que l'aneuploïdie déclenche un *stress* protéotoxique aussi bien dans la cellule normale que la cellule maligne. Néanmoins, cette dernière arrive à survivre à ce *stress* au prix d'une «addiction non oncogénique» [Tang et al., 2011]. Ces mécanismes de survie peuvent être la cible de traitement des cancers aneuploïdies [Manchado and Malumbres, 2011].

L'aneuploïdie peut être un événement initiateur du processus de carcinogenèse. Dans les cancers colorectaux, l'instabilité chromosomique survient tôt au cours de la carcinogenèse comme le témoigne la présence de caryotypes aneuploïdes dans les adénomes [Shih et al., 2001]. Alternativement, l'aneuploïdie peut également être la conséquence de l'accumulation successive des mutations génomiques, considérée donc comme un événement de progression [Solomon et al., 2011].

2.2. Anomalies chromosomiques équilibrées

Ces anomalies équilibrées, correspondent aux insertions, inversions et translocations qui sont les anomalies équilibrées les plus fréquentes [Küppers, 2005 ; Mitelman et al., 2007; Nussenzweig and Nussenzweig, 2010]. La suite du paragraphe sera consacrée aux translocations. Après avoir été décrites dans les hémopathies malignes et les sarcomes de l'enfant (<http://cgap.nci.nih.gov/chromosomes/Mitelman>; Huret, 2010), les translocations sont observées de plus en plus dans les tumeurs solides [Takeuchi et al., 2012 ; Zhang et al., 2010]. L'introduction en 1967-1970 des techniques de bande en cytogénétique conventionnelle a permis de rattacher ces anomalies chromosomiques récurrentes à des sous types de leucémie, lymphome et sarcome. En effet, en 1973 les deux premières translocations $t(8;21)(q22;q22)$ et $t(9;22)(q34;q11)$ ont été rapportées dans les LAM et LMC respectivement [Rowley, 1973a, 1973b] (**Figure 19**). Dans les hémopathies malignes, ces translocations font le diagnostic, dictent le traitement et permettent le suivi de la maladie résiduelle. En dehors, des translocations cryptiques, telles que $t(12;21)(p13;q22)$ [Romana et al., 1995], qui sont rares, le diagnostic de ces anomalies se base de nos jours sur le caryotype.

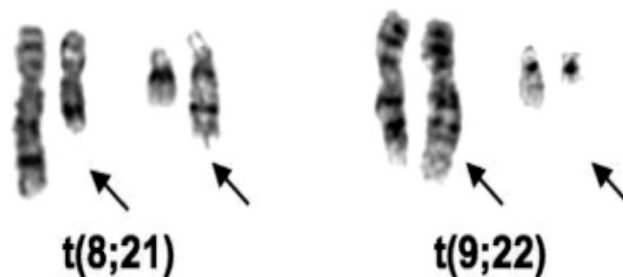


Figure 19 : Caryotypes partiels montrant les deux premières translocations associées aux hémopathies malignes. D'après [Rowley, 2008].

Les analyses moléculaires ont déterminé les points de cassures dans plusieurs translocations et ont démontré que ces derniers surviennent toujours dans le même segment d'ADN [Zhang and Rowley, 2006]. Les conséquences fonctionnelles de ces translocations sont de 3 types. Premièrement, il peut s'agir de la formation d'un gène de fusion chimérique ayant une activité nouvelle ou altérée. Les 2 principaux groupes de gènes qui participent à ces fusions, sont ceux qui codent soit pour des tyrosines kinases soit pour des facteurs de transcriptions. Deuxièmement, il peut s'agir de la dérégulation de l'expression d'un gène de

structure normale [Fröhling and Döhner, 2008]. Troisièmement, les translocations peuvent aboutir à la délétion d'un gène suppresseur de tumeur [Rabbitts, 2009]. En dehors des gènes codants pour des protéines, les translocations chromosomiques peuvent impliquer des gènes codants pour des microRAN (" short non coding RNA") [Bousquet et al., 2008 ; Calin et al., 2004a].

a. Formation de gène de fusion

Le prototype de translocation aboutissant à la formation d'un gène chimérique est la translocation $t(9;22)(q34.1;q11.2)$ (**Figure 20**). Le chromosome Philadelphie, résultant de cette anomalie, est formé par les séquences des gènes *BCR* /22q11.23 et *ABL*/9q34.1 qui a une activité tyrosine kinase. La protéine chimérique résultante BCR-ABL contient le domaine catalytique d'ABL fusionnée au domaine BCR. Ce dernier assure une oligomérisation constitutive de la protéine de fusion en l'absence de signaux d'activation physiologiques [Goldman and Melo, 2003]. La protéine de fusion ainsi formée induit une prolifération cellulaire cytokine-indépendante, une résistance à l'apoptose et une instabilité génétique. La découverte du chromosome Philadelphie a eu 2 principales retombées. D'une part, cette découverte a permis de démontrer que les anomalies chromosomiques contribuent au cancer. D'autre part, la mise en évidence de l'activité tyrosine kinase anormale dans la LMC a permis l'utilisation d'inhibiteur sélectif et réversible anti-tyrosine kinase de BCR-ABL dans le traitement de cette pathologie [Deininger et al., 2005 ; Druker et al., 2006]. Ceci souligne le rôle de la cytogénétique conventionnelle dans la caractérisation de nouvelles translocations et dans le choix de l'option thérapeutique pour le traitement des hémopathies malignes. Des gènes de fusion ayant une activité tyrosine Kinase ont été rapportés dans le cancer du poumon [Kohno et al., 2012 ; Lipson et al., 2012 ; Soda et al., 2007 ; Takeuchi et al., 2012]. Par exemple le gène chimérique *EML4-ALK*, survient dans 2 à 7% des cancers bronchopulmonaires non à petites cellules, résulte d'une inversion cryptique $inv(2)(p21p23)$. Ce gène induit une activité constitutive de la protéine kinase ALK. Cette activité protéique aberrante peut être inhibée par le crizotinib.

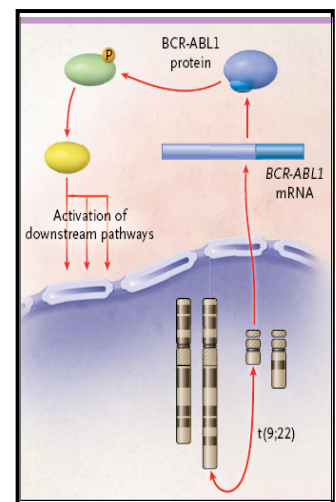


Figure 20 : Gène de fusion BCR-ABL. Adapté de [Fröhling and Döhner, 2008].

b. Dérégulation de l'expression d'un gène par effet de position

Le prototype de cette anomalie est la $t(8;14)(q24.2;q32.3)$, récurrente dans les lymphomes de Burkitt (**Figure 21**). Cette anomalie entraîne la juxtaposition de *MYC/8q24.2* à côté des séquences activatrices du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines *IGH/14q32.3*, d'où une expression constitutive de *MYC* [Küppers, 2005]. Les translocations qui entraînent une surexpression d'un gène de structure normale surviennent dans les autres tumeurs qui prennent naissance des lymphocytes B et T [O'Neil and look, 2007] et des tissus non lymphoïdes [Perner et al., 2006 ; Tomlins et al., 2005]. En effet, l'étude de profil d'expression dans les cancers de la prostate a montré une surexpression des gènes *ERG* ("*Ets-related gene*") et *ETV1* ("*Ets variant gene 1*") [Tomlins et al., 2005]. Dans des lignées de cancer de la prostate, les auteurs ont trouvé que les séquences codantes des gènes *ERG* (tous les exons codants) ou *ETV1* (8 des 10 exons codants) sont fusionnées au promoteur du gène *TMPRSS2* ("*transmembrane protease serine 2*"), régulateur de sécrétion d'androgène. Les 2 types de transcrits de fusion sont surexprimés, d'une manière mutuellement exclusive, dans plus de 79% des cas examinés de cancers de la prostate [Tomlins et al., 2005]. Expérimentalement, il a été démontré que les androgènes induisent une surexpression du transcrit de fusion *TMPRSS2-ERG*, ce qui suggère que le promoteur du gène *TMPRSS2* puisse être à l'origine d'une expression anormale d'*ERG* [Tomlins et al., 2005].

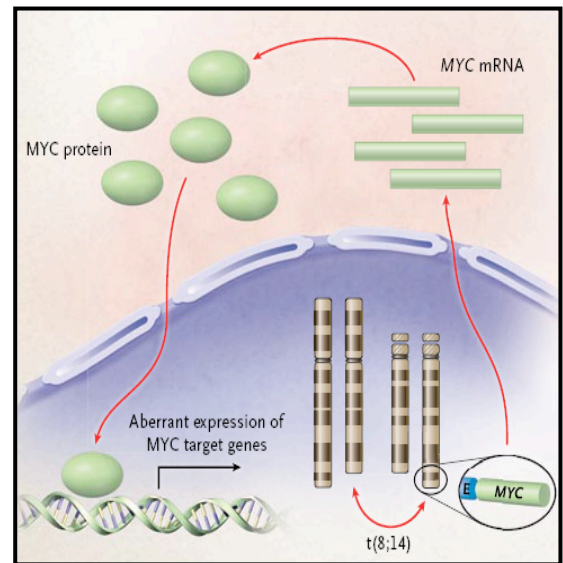


Figure 21 : Gène MYC dérégulé par la translocation $t(8;14)$. Adapté de [Fröhling and Döhner, 2008]

c. Mécanismes des translocations

La translocation chromosomique requiert : (1) une cassure d'ADN double brins ("DNA double strand breaks", DSB) sur 2 chromosomes différents, (2) une contiguïté des extrémités chromosomiques cassées (au moins durant une phase transitoire), et (3) un recollement des extrémités chromosomiques hétérologues, à la différence des fusions in cis (**Figure 22**). Des facteurs exogènes et endogènes peuvent entraîner des DSB. Les radiations ionisantes et le traitement par radio- et chimiothérapie peuvent induire des DSB. En revanche, un nombre restreint d'agent génotoxique a été incriminé dans la genèse des translocations

chromosomiques, particulièrement les inhibiteurs de la topoisomérase II [Mauritzson et al., 2002 ; Zhang and Rowley, 2006] et les radiations [Fugazzola et al., 1995 ; Povirk, 2006]. Les processus métaboliques cellulaires peuvent également entraîner des DSB. Des DSB physiologiques surviennent lors des processus de maturation des gènes des immunoglobulines (*IG*) dans les lymphocytes B [Zhang et al., 2010]. Un système de réparation hautement conservé assure la réparation des DSB pour préserver l'information génétique [Lieber, 2010]. En revanche, la réparation peut échouer aboutissant des DSB non résolues et des translocations.

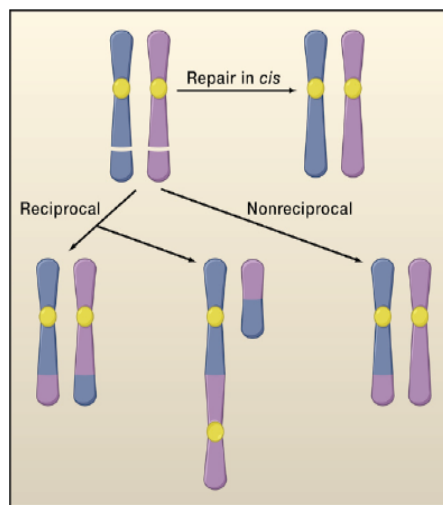


Figure 22 : anomalie de la réparation des cassures DSB. D'après [Nussenzweig and Nussenzweig, 2010].

Les gènes des Ig subissent la recombinaison V(D)J sur les locus des chaînes lourdes (*IGH*) et légères (*IGL*), et la commutation de classes ("class switch recombination", CSR) au niveau des *IGH*. Ce dernier est initié par une DSB générée par l'enzyme AID ("*activation induced cytidine deaminase*") [Chaudhuri et al., 2007]. L'AID génère des DSB au niveau de la région S ("*switch*") des *IGH*. Les extrémités résultantes de cette cassure seront jointes, ceci aboutit à l'achèvement de la CSR et l'expression de différente classe d'anticorps. Les points de cassure des translocations récurrentes associées aux lymphomes B chez l'homme et la souris souvent impliquent la région S du locus *IGH* et un oncogène, tel *MYC* [Küppers and Dalla-Favera, 2001 ; Gostissa et al, 2011]. De ce point de vue, l'AID qui induit des DSB au niveau de la région *IGH* S participe directement aux translocations impliquant *MYC* et d'autres gènes [Franco et al., 2006 ; Ramiro et al., 2006 ; Wang et al., 2009]. A travers son rôle dans l'hypermutation somatique ("*somatic hypermutation*" , SHM), au niveau des segments variables des *IGH* et *IGL*, l'AID peut participer à la genèse des DSB dans les

locus des *IG* qui servent de substrats intermédiaires pour les translocations [Liu and Schatz, 2009] ; De plus dans les lymphocytes B activés, l'AID induit des mutations, quoique à des fréquences faibles, dans des locus en dehors de ceux des *Ig* [Liu et al., 2008] ; donc cette enzyme peut contribuer à des translocations n'impliquant pas les locus des *IG* [Robbiani et al., 2008]. En effet, il a démontré que l'AID peut initier des translocations dans des tissus non-lymphoïdes [Lin et al., 2009]. En revanche les rôles potentiels de l'AID dans la genèse des DSB pangénomique ne sont encore pas clairement établis. En effet, comme cela a été mentionné auparavant, d'autres facteurs exogènes et endogènes peuvent donner ces DSB sur tout le génome [Zhang et al., 2010].

Les DSB aboutissent à la formation de foci sur une distance supérieure à 100 Kb de part et d'autre de la lésion d'ADN, ceci va : promouvoir la jonction des extrémités DSB et empêcher la formation de translocations [Nussenzweig and Nussenzweig, 2010 ; Zhang et al., 2010]. Dans les cellules somatiques la voie classique de recombinaison non homologue avec fusion des extrémités, C-NHEJ, répare plusieurs DSB [Zhang et al., 2010]. La voie C-NHEJ prévient la formation des translocations en induisant préférentiellement la jonction intrachromosomique des DSB [Ferguson et al., 2000]. Une autre voie alternative de recombinaison avec fusion des extrémités, A-EJ, utilisant les extrémités DSB avec une courte séquence de microhomologies, assure la CSR en absence de la voie C-NHEJ [Yan et al., 2007], et joint les extrémités DSB des CSC aux autres DSB pour générer des translocations [Zhang et al., 2010]. En effet, la voie C-NHEJ supprime les lymphomes, déficients pour le TP53 présentant des translocations *IGH/MYC* catalysées par la voie A-EJ [Zhu et al., 2002]. Des données suggèrent que la voie A-EJ favorise la formation des translocations [Simsek and Jasin, 2010].

En plus de leur organisation sous forme de nucléosomes, les chromosomes ségréguent dans des territoires nucléaires, spatialement bien définis [Cremer and Cremer, 2001]. La fusion des DSB pour générer des translocations requiert une proximité physique et la disposition spatiale des chromosomes peut retentir sur les profils des translocations [Zahng et al., 2010]. Les études des translocations récurrentes dans les lymphomes B chez la souris, suggèrent que les aspects de certaines régions chromosomiques, à la différence des autres territoires du génome, peuvent promouvoir et influencer la fréquence des translocations [Wang et al., 2009]. En parti, les territoires chromosomiques sont corrélés à une activité transcriptionnelle [Lieberman-Aiden et al., 2010]. L'ARN polymérase II, la topoisomérase II et d'autres facteurs impliqués dans la transcription sont localisés dans des foyers de transcription. Les gènes actifs forment des boucles à partir des domaines chromosomiques

sur de longues distances, souvent plusieurs microns, et les brins d'ADN sont transcrits dans ces foyers. Pour les foyers de transcriptions associés aux gènes *IGH*, dans 25% du temps, *MYC* se trouve colocalisé dans ces mêmes foyers de transcription. Par comparaison, une association aléatoire d'un autre gène semble survenir dans 1% [Osborne et al., 2007]. Cette colocalisation des locus *IGH/MYC* est observée dans les lymphocytes B primaires mais pas dans les autres cellules [Osborne et al., 2007 ; Wang et al., 2009]. Cette colocalisation est retrouvée dans les lymphocytes B au repos avant que l'AID n'induisse des DSB dans les gènes *IGH* et *MYC*, indiquant que ces 2 locus sont spatialement proches avant la genèse des DSB [Wang et al., 2009]. Néanmoins, il a été proposé que la genèse des translocations ne requière pas ces foyers transcription. En effet, il paraît que le locus non transcrit de *MYC* se trouve dans un compartiment nucléaire accessible aux translocations $t(MYC;IGH)$ [Robbiani et al., 2008]. La disposition non aléatoire des gènes et des chromosomes dans le noyau a aboutit à 2 modèles généraux dans l'initiation des translocations. Le modèle "*contact-first*" préconise que les translocations sont restreintes aux régions chromosomiques physiquement proches, alors que le modèle "*breakage-first*" indique que 2 cassures, DSB, distantes peuvent être juxtaposées [Meaburn et al., 2007].

Des ARN chimériques résultants de la transcription des gènes de fusion des translocations récurrentes ont été détectés, quoique à des taux faibles, dans des cellules apparemment non tumorales de sujets porteurs sains [Aplan, 2006 ; Janz et al., 2003 ; Limpens et al., 1991 ; Rowley, 2008 ; Rowley and Blumenthal, 2008]. Par exemple, le transcrit *IGH/MYC* est présent chez 2% des porteurs sains [Küppers and Dalla-Favera, 2001]. Ces gènes de fusion semblent correspondre aux translocations communes observées dans les hémopathies malignes, mais jamais celles des tumeurs solides [Rowley and Blumenthal, 2008]. Ces résultats renforcent une observation précédente qui dit que dans plusieurs circonstances, les translocations à elles seules sont insuffisantes pour donner un phénotype tumoral avéré, mais d'autres évènements sont requis [Nucifora et al., 1993, Chen et al., 2010].

Les translocations chromosomiques sont souvent des évènements précoces ou initiateurs dans le processus de carcinogenèse. En effet, dans les leucémies de l'enfant elles surviennent in utéro [Greaves and Wielms, 2003]. Les translocations peuvent également survenir au cours de la progression de la maladie cancéreuse [Rowley and Blumenthal, 2008]. Par exemple la translocation $t(8;14)(q24 ;q32)$, anomalie primaire dans les lymphomes de Burkitt, peuvent survenir secondairement au décours de la transformation

d'un lymphome folliculaire associée à une translocation t(14;18)(q32;q21) donnant naissance à un lymphome "double hit".

2.3. Anomalies chromosomiques déséquilibrée

Ces anomalies correspondent à des amplifications, gains et pertes de matériels chromosomiques (**Tableau 1**). Ces anomalies englobent les aberrations intéressant des chromosomes entiers à des duplications ou des délétions intragéniques. A la différence des anomalies équilibrées, dont les conséquences fonctionnelles peuvent être identifiées en analysant les points de cassure, la valeur fonctionnelle de la majorité des anomalies déséquilibrées est inconnue. L'identification de certains déséquilibres génomiques intéressant un seul gène peut être fructueuse. Par exemple, les duplications dup(6)(q22q23) dans les LAL T a permis d'identifier MYB comme le gène candidat de ce gain. En revanche, La majorité des déséquilibres génomiques intéressent de larges segments chromosomiques (centaines de gènes) et plusieurs tumeurs présentent de nombreuses anomalies chromosomiques déséquilibrées. Bien que cette complexité génétique ait longtemps freiné la détermination du rôle fonctionnel des gains et pertes de chromosomes individuels, les études récentes suggèrent l'importance des approches expérimentales intégratives (analyse pangénomique couplée à des analyses de transcriptome et de techniques de génomique fonctionnelle) dans l'identification des gènes candidats remaniés en conséquence à ces déséquilibres [Kim and Hahn, 2007].

a. Amplification et gain

Les gains sont couramment la conséquence d'une aneuploïdie ou d'une translocation déséquilibrée. Ils sont à l'origine d'une trisomie partielle ou totale d'une partie du génome de taille variable. Actuellement, l'identification des gènes candidats dans des gains de grande de taille requiert une analyse par aCGH associée à des études d'ARN ou de protéine. Cette stratégie a permis la découverte de MITF/3p14.2p14.1 et NEDD9/6p25p24 dans le mélanome malin [Garraway et al., 2005 ; Kim et al., 2006].

L'amplification génique est une augmentation du nombre de copies d'une région bien circonscrite d'un bras chromosomique [Albertson, 2006]. Ces anomalies sont étudiées par la cytogénétique, la CGH array et le transcriptome. Cliniquement, l'amplification génique a une valeur diagnostique et pronostique et peut être à la base d'une résistance acquise au traitement [Croce, 2008 ; Rand et al., 2011].

En dehors du neuroblastome, où le ratio de gain et d'amplification de NMYC est bien définie, dans le restant des tumeurs, ce ratio reste souvent arbitraire. Dans des tumeurs primaires et des lignées cellulaires, l'ADN amplifié peut prendre deux aspects : doubles minutes et HSR ("homogeneously staining region") (**Figure 23**). Les doubles minutes sont des molécules d'ADN acentriques, extrachromosomiques et autorépliquatives. Leur taille varie de quelques centaines de Kb à des Mb. L'HSR sont des séquences d'ADN répétées en tandem ou inversé, localisées dans une seule ou plusieurs régions du génome (**Figure 23**). Dans un certain nombre de cas, l'unité amplifiée peut impliquer des séquences provenant de 2 ou plusieurs régions du génome, soulignant un mécanisme complexe à l'origine de cette amplification [Difilippantonio et al., 2002 ; Muleris et al., 1995].

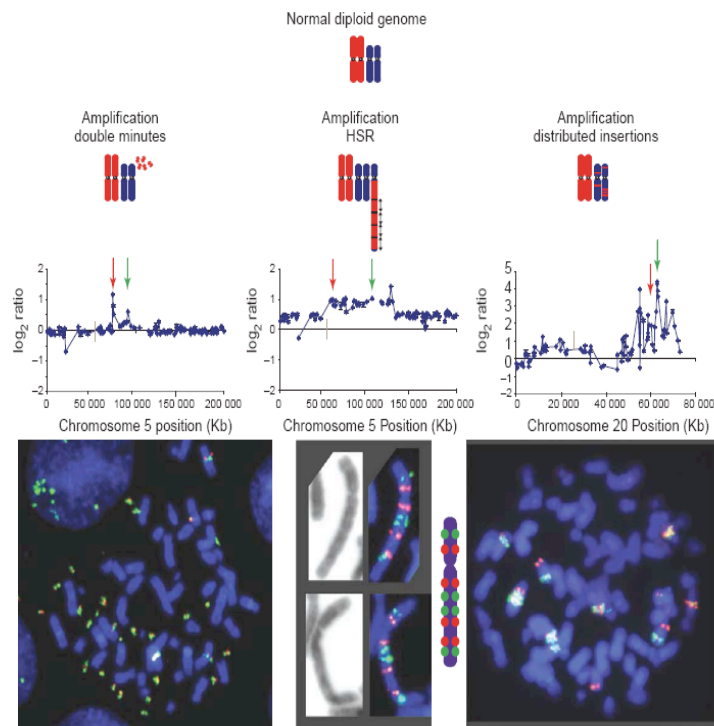


Figure 23 : Aspects cytogénétiques de l'amplification génique. Cette dernière peut prendre l'aspect de double minute et d'HSR qui peut être localisé sur une région unique du génome ou réparti sur plusieurs chromosomes. Les différentes formes d'amplifications géniques sont dénotées par aCGH et FISH. D'après [Albertson, 2006].

L'amplification génique est probablement initiée par une cassure d'ADN double brin survenant dans une cellule ayant un dysfonctionnement de points de contrôle du cycle cellulaire [Chernova et al., 1998 ; Pipiras et al., 1998]. Certains processus et séquences génomiques peuvent promouvoir ces cassures d'ADN et être à l'origine de cette amplification, notamment les erreurs de la réplication de l'ADN, le dysfonctionnement des télomères et la présence des sites fragiles [Albertson, 2006].

Les cassures d'ADN double brin sont fréquentes dans les cellules en réplication et peuvent être générées par un collapsus de la fourche de réplication incapable de progresser en présence d'une lésion d'ADN par exemple, d'où une possibilité d'initiation de l'amplification génique [Albertson, 2006]. Par exemple, la formation des amplifications des gènes *NMYC* [Savelyeva and Schwab, 2001], *EGFR* [Vogt et al., 2004] et *HER2* [Kuwahara et al., 2004] semble être initiée par un collapsus de « l'œil » de la réplication.

Les télomères préviennent la perte de séquences d'ADN consécutive d'une réplication incomplète de l'ADN au niveau des extrémités chromosomiques. Leur réplication est assurée par la télomérase qui est inactive dans la majorité des cellules somatiques et donc les extrémités des chromosomes perdent 40-50 bp à chaque division cellulaire. En revanche, les cellules tumorales ont acquis la capacité de maintenir la longueur des télomères grâce soit à la réactivation de la télomérase soit au processus ALT ("*alternate lengthening of telomers*"). En revanche, avant de s'adapter au dysfonctionnement des télomères, les cellules tumorales peuvent continuer de se diviser avec des télomères raccourcis qui deviennent donc susceptibles de fusionner avec des divisions cellulaires anormales [Londono-Vallejo et al., 2004 ; Sabatier et al., 2005]. L'amplification génique consécutive à un dysfonctionnement des télomères semble survenir par un mécanisme de cassure-fusion-pont ("*breakage-fusion-bridge*", BFB) [Maser and DePinho, 2002] (Figure 24). Dans ce processus le dysfonctionnement des télomères va promouvoir la fusion des extrémités chromosomiques aboutissant à la formation d'un chromosome dicentrique. Pendant l'anaphase, la cassure du chromosome dicentrique, et selon le point de cassure, va générer un chromosome ayant une duplication inversée à sa partie terminale. Etant donné que ce dernier chromosome présente

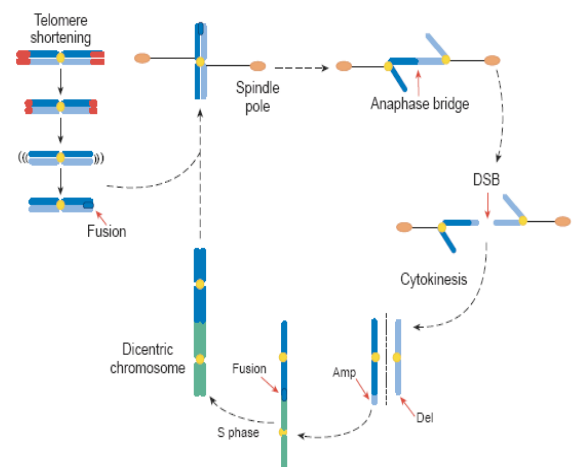


Figure 24 : Erosion des télomères et genèse du cycle BFB. D'après [Maser and DePinho, 2002].

des cassures au niveau de ses extrémités, le même processus peut se répéter lors des prochaines divisions cellulaires jusqu'à ce que les extrémités chromosomiques se stabilisent par l'addition de séquences télomériques, possiblement par une translocation à un autre chromosome. Ce modèle aboutit à une amplification chromosomique souvent au niveau d'un site de gène soumis à une sélection. Les séquences d'ADN distales par rapport au gène soumis à une sélection peuvent être perdues ou transloquées à un autre chromosome. Les preuves du modèle BFB ont été démontrées par l'analyse cytogénétique de HSR dans les lignées cellulaires tumorales et par des modèles d'étude d'amplification induit par des drogues [Murnane and Sabatier, 2004].

L'implication de certains sites fragiles communs et des séquences *Alu* dans la genèse des amplifications chromosomiques n'est pas claire et nécessite l'application des méthodes de séquençage à haut débit pour caractériser l'organisation de l'ADN amplifié et les séquences qui bornent le segment amplifié [Albertson, 2006].

Les événements d'amplification souvent incluent de multiples gènes codants ou non pour des protéines, ainsi prendre en considération uniquement le modèle d'altération génétique est toujours insuffisant pour identifier le gène fondateur ou sélectionné par le phénomène d'amplification [Santarius et al., 2010]. L'identification de ce gène d'intérêt nécessite : (1) une cartographie physique de l'amplification dans plusieurs cancers, (2) une confirmation que l'amplification génique est accompagnée par une surexpression dans les tumeurs ayant l'amplification, (3) une corrélation de l'amplification et/ou la surexpression avec les données cliniques, (4) une investigation des fonctions biologiques et dans certains cas évaluation de l'efficacité du traitement ciblée sur la protéine surexprimée [Santarius et al., 2010].

Des données quantitatives ont rapporté que par rapport aux cellules normales, l'amplification génique peut survenir à un taux élevé dans les cellules tumorales [Tlsty et al., 1989]. L'amplification peut survenir tôt au cours du processus de carcinogenèse comme le témoigne la présence d'amplification dans les mélanocytes adjacents aux cellules de mélanome malin [Bastian et al., 2000]. De plus, dans les cancers du sein l'amplification génique peut être associée à un nombre relativement faible d'anomalies chromosomiques [Fridlyand et al., 2006]. Ceci suggère que l'amplification génique peut être un événement d'initiation. En revanche, l'amplification peut aussi correspondre à une anomalie de progression au cours de la carcinogenèse.

b. Pertes chromosomiques

Le spectre des pertes génomiques va des anomalies visibles en cytogénétique, telles que les pertes chromosomiques partielles ou totales, jusqu'aux pertes intragéniques indétectables par le caryotype. Probablement, la majorité des pertes génomiques participent au processus de carcinogenèse en rapport avec la perte des gènes correspondants [Fröhling and Döhner, 2008]. Il n'existe pas de molécules pharmacologiques capables de compenser la perte consécutive des protéines, néanmoins le décryptage des répercussions fonctionnelles des pertes génomiques sur la signalisation permet de contrôler la maladie cancéreuse. Par exemple, l'inactivation de PTEN/10q23, anomalie fréquente dans le gliome, les cancers de la prostate et l'endomètre, accentue la signalisation *via* la voie PI3k-Akt-mTOR [Sansal and Sellers, 2004]. Les modèles expérimentaux et les premiers essais cliniques ont rapporté que les tumeurs déficientes pour *PTEN* sont sensibles aux inhibiteurs de mTOR, comme Sirolumis (rapamycine) [Cloughesy et al., 2008 ; Yilmaz et al., 2006].

Les pertes chromosomiques étendues sont fréquentes dans les cancers ce qui rend difficile l'identification du gène candidat. L'approche classique c'est de chercher la récurrence de la région perdue dans des cancers, ensuite déterminer la région minimale commune. Les gènes candidats ainsi identifiés sont testés pour les délétion, mutation, et anomalie épigénétique qui inactivent l'allèle restant [Hinds and Weinberg, 1994 ; Knudson, 2001]. Les gènes APC, ATM RB, NF1, PTEN et TP53 ont été identifiés grâce à cette approche. Pour les pertes des régions 1p (neuroblastome), 3p, (cancer du poumon) et 7q (hémopathies malignes myéloïdes), les gènes candidats restent à déterminer [Curtiss et al., 2005 ; Döhner et al., 1998 ; Okawa et al., 2008].

L'identification des gènes candidats dans les pertes chromosomiques est difficile en cas de gènes qui agissent par haploinsuffisance [Fodde and Smits, 2002] Une approche est requise pour analyser les conséquences des délétions monoalléliques. Par exemple, l'inhibition d'expression de plusieurs gènes candidats par ARN interférence a permis d'identifier *RPS14* comme gène causal dans le syndrome 5q [Ebert et al., 2008].

III. Gènes du cancer

1. Gènes codants

La convergence de plusieurs études ont permis d'établir un premier recensement des gènes du cancer [Futreal et al., 2004]. Cette première liste comprenait 291 gènes qui

lorsqu'ils sont mutés peuvent contribuer à la genèse de cancers sporadiques ou familiaux. Récemment cette liste a été actualisée et il y a au minimum 350 gènes de cancers, soit presque 1,6% des 22000 gènes codants pour des protéines dans le génome humain [Stratton et al., 2009]. Ces gènes présentent des mutations clonales et somatiques récurrentes dans les cancers avec une évidence forte de leur implication dans la genèse des cancers [Futreal et al., 2004].

Au tout début, la cartographie physique de la majorité de ces gènes a été réalisée par des techniques peu résolutive, en particulier la cytogénétique pour les translocations chromosomiques récurrentes dans les hémopathies malignes [Stratton et al., 2009]. Quelques gènes ont été découverts grâce à la propriété transformante de l'ADN tumoral et les autres par la mutagenèse dirigée. Les mutations de presque 10% de ces gènes ont été retrouvées dans les lignées germinales, où elles confèrent un risque élevé de développement d'un cancer, et ces gènes ont initialement souvent été identifiés par la génétique de liaison ("*linkage*") dans des familles atteintes [Stratton et al., 2009].

Ces gènes sont classés en 2 groupes : oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs. Les oncogènes et les gènes suppresseurs diffèrent par leurs profils mutationnels. A la différence des maladies monogéniques, comme la mucoviscidose, où une mutation d'un gène peut être à l'origine de la maladie, aucune mutation singulière ne peut donner un phénotype tumoral avéré [Croce, 2008 ; Vogelstein and Kinzler, 2004]. Les cellules des mammifères possèdent plusieurs mécanismes de contrôle pour protéger le génome contre un effet éventuellement délétère d'un mutant du gène de cancers [Vogelstein and Kinzler, 2004].

1.1.Oncogènes

Les oncogènes codent pour des protéines qui contrôlent la prolifération cellulaire et/ou l'apoptose. Les mutations des oncogènes résultent en une activation constitutive ou circonstancielle de ce gène. La mutation activatrice somatique d'un seul allèle d'un oncogène est généralement suffisante pour donner un avantage sélectif à la cellule [Vogelstein and Kinzler, 2004]. Approximativement 90% des mutations somatiques des gènes du cancer ont une action dominante [Stratton et al., 2009]. La majorité des oncogènes sont activés en conséquence à un réarrangement génomique. Des exemples de ces anomalies ont été abordés dans le chapitre anomalies chromosomiques équilibrées. Mais il peut s'agir de mutations faux-sens (restreintes à des résidus clés d'acide aminé), d'insertions, de délétions ou d'amplification génique. Les produits des oncogènes peuvent être : (1) des

facteurs de transcription, (2) des protéines remodelant la chromatine, (3) des facteurs de croissance, (4) des récepteurs de facteurs de croissance, (5) des molécules de signalisation, et (6) des régulateurs d'apoptose [Croce, 2008].

1.2. Gènes suppresseurs de tumeurs

Les mutations de gènes suppresseurs entraînent une baisse de l'activité du produit du gène [Vogelstein and Kinzler, 2004]. Des mutations des 2 allèles, paternel et maternel, du gène suppresseur de tumeurs sont généralement requises pour donner un avantage de prolifération à la cellule. Cette situation survient couramment à la suite de la délétion d'un allèle *via* un événement chromosomique, comme la perte d'un chromosome ou d'un bras chromosomique, couplée à une mutation intragénique du second allèle [Knudson, 2002]. L'inactivation d'un gène suppresseur de tumeurs peut être aussi la conséquence de la perte d'hétérozygotie (LOH). A peu près 10% des gènes de cancer agissent d'une manière récessive [Stratton et al., 2009]. Ces gènes sont caractérisés par un spectre mutationnel large allant de la substitution d'une simple base à la délétion de tout un gène [Stratton et al., 2009].

Les oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs opèrent d'une manière similaire à l'état physiologique : ils catalysent le processus tumoral en augmentant le nombre de cellules malignes *via* une stimulation de la multiplication cellulaire et/ou une inhibition de la mort cellulaire [Vogelstein and Kinzler, 2004]. La première mutation somatique dans un oncogène ou un gène suppresseur de tumeurs, à l'origine d'une expansion clonale, va initier le processus néoplasique [Nowell, 2002]. Les mutations somatiques conséquentes, aboutissent à des cycles d'expansion clonale, à l'origine donc d'une progression tumorale [Maley et al., 2004].

Une mutation spécifique d'un gène exprimé d'une manière ubiquitaire devrait avoir des effets similaires dans des différents types de cellules des mammifères. Néanmoins, ceci n'est généralement pas observé. La même mutation peut avoir des effets différents dans des types cellulaires distincts. Des différences peuvent même être observées dans le même type cellulaire, tout dépend de la chronologie de l'acquisition de cette anomalie au cours du processus de carcinogenèse [Vogelstein and Kinzler, 2004]. Par exemple, dans les cellules normales des voies pancréatiques, les mutations *KRAS* semblent initier le processus tumoral [Aguirre et al., 2003 ; Hruban et al., 2000]. Dans les cellules épithéliales du colon ou de l'ovaire, la même mutation de *KRAS* donne une hyperplasie qui ne progresse pas vers un

phénotype tumoral avéré [Jen et al., 1994 ; Sieben et al., 2004]. Concernant la chronologie de l'acquisition des mutations au cours de la carcinogénèse : dans les cellules épithéliales normales du colon, la survenue de mutations *KRAS* après l'acquisition de mutations *APC* résulte en une expansion clonale et une progression vers un cancer [Kinzler and Vogelstein, 1998]. Par ailleurs, dans plusieurs cancers humains et modèles expérimentaux, *KRAS* semble agir comme un oncogène [Barbacid, 1987 ; Bos, 1989]. Néanmoins, *KRAS* peut agir comme un suppresseur de tumeurs dans certaines circonstances, inhibant l'oncogénèse chez la souris [Diaz et al., 2002 ; Zhang et al., 2001].

2. MicroRNAS

Les microRNAs (miRNAs) représentent une classe d'ARN non codant (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>). Il s'agit de petits ARNs endogènes, simple brin et d'environ 22 nucléotides de longueur [Bartel, 2004]. Les gènes des miRNAs conservés au cours de l'évolution, sont localisés soit dans les séquences exoniques ou introniques de gènes codant pour des protéines (70%), soit dans des séquences intergéniques (30%) [Rodriguez et al., 2004]. La majorité des gènes des miRNAs sont orientés dans le même sens que les gènes hôtes suggérant qu'ils sont transcrits d'une manière simultanée que ces derniers. Les miRNAs sont préférentiellement transcrits par l'ARN polymérase II sous forme de longs précurseurs appelés pri-miRNA. Certains miRNAs sont synthétisés à partir d'un même pri-miRNA et sont sous la dépendance d'un même promoteur, on parle alors de miRNA polycistronique. Dans le noyau, le pri-miRNA (**Figure 25**) se replie en une structure secondaire de type «épingle à cheveux», est converti par une enzyme Droscha (RNase III) et son cofacteur DGCR8 ("DiGeorge syndrome critical region 8") en une molécule de 70 nucléotides appelée pré-miRNA. Ce dernier est ensuite exporté du noyau vers le cytoplasme par un transporteur de la famille Ran, l'exportine-5 (XPO5). Une dernière étape de maturation est nécessaire afin de produire le miRNA. Le Dicer ou éminceuse, une seconde RNase III, est responsable du clivage de la boucle terminale du pré-miRNA. Un duplex double brin

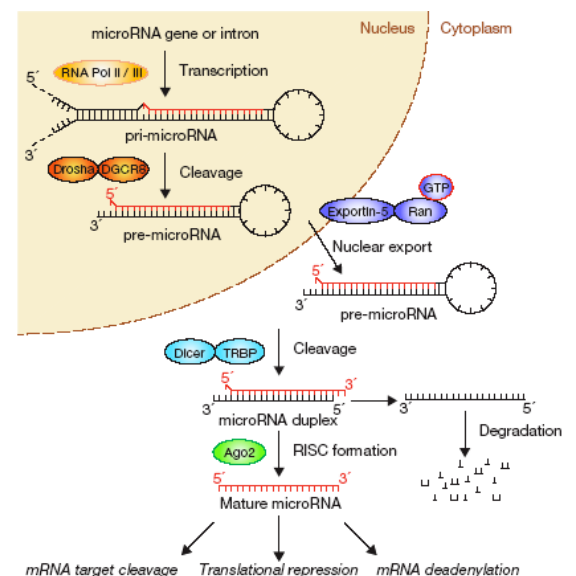


Figure 25 : Synthèse des miRNA.
D'après [Winter et al., 2009].

constitué du miRNA et de son brin passager est alors produit. Le miRNA guide, entité fonctionnelle, interagit avec les protéines Argonaute 2 (AGO2) et TRBP ("*Transactivation-Resoinsive RNA-Binding Protein*") pour former le complexe RISC ("*RNA-Induced Silencing Complex*"), tandis que le brin passager est dégradé.

Tout au long de leur biogenèse, les miRNA sont soumis à une régulation intense au cours de leur transcription et en post-transcription [Winter et al., 2009]. L'altération de ces processus est associée à un phénotype tumoral [Roman-Gomez et al., 2009; Van Kouwenhove et al., 2011 ; Winter et al., 2009]. Par exemple, par rapport aux tissus normaux, une accumulation des précurseurs pri-miRNA a été rapportée dans des tumeurs *de novo* [Thomson et al., 2006]. Des altérations de nombre de copies des gènes *Dicer1*, *AGO2* et *XPO5* surviennent souvent dans les cancers du sein, de l'ovaire et dans le mélanome malin [Lee et al., 2008 ; Melo et al., 2010].

Un miRNA lie une ou plusieurs séquences précises essentiellement dans la région 3'-UTR ("*untranslated region*") d'un ARNm cible. Un nombre réduit de séquences cibles localisées dans le cadre de lecture ouvert ("*open reading frame*" ; ORF), ou dans la région 5' UTR a également été rapporté [Forman and Coller, 2010]. Une fois le miRNA est fixé à sa cible d'ARNm, va recruter ainsi le complexe RISC vers cet ARNm. Il est admis que si la complémentarité entre le miRNA et sa cible est parfaite, la protéine Ago2 clive l'ARNm, qui est alors dégradé. En revanche, si la complémentarité est imparfaite, une répression de la traduction de l'ARNm cible est généralement observée. Une propriété supplémentaire est venue s'ajouter récemment à leur champ d'action. En effet, certains miRNA sont également capables d'activer spécifiquement la traduction de leurs ARNm cibles [Vasudevan et al., 2007; Ørom et al., 2008].

Dans presque la totalité des cancers, les anomalies de régulation accomplie par les miRNA sont impliquées dans des processus clés de la cancérogenèse comme l'apoptose [Lima et al., 2011], la prolifération [Negrini et al., 2009], l'angiogenèse [Urbich et al., 2008], la migration [Gregory et al., 2008], et l'invasion-métastase [Nicoloso et al., 2009]. De plus la cartographie de plusieurs gènes de miRNA a montré que ces gènes sont localisés dans des régions chromosomiques sujettes à des remaniements dans les cellules tumorales [Calin et al, 2004a]. Le profil d'expression des gènes de miRNA a montré une signature permettant la classification des tumeurs d'origine histologique différente [Lu et al., 2005], le diagnostic, et l'évaluation du pronostic et la réponse au traitement [Calin and Croce, 2006 ; Yanaihara et al., 2006].

Plusieurs miRNA associés aux cancers ont fonctionnellement été validés comme des facteurs oncogéniques, oncomir, [Ma and Weinberg, 2008]. Par exemple, chez l'homme le polycistron miR-17-92 est amplifié dans les lymphomes [Ota et al., 2004 ; Tagawa and Seto, 2005] et accélère la survenue de lymphome B chez la souris porteuse du transgène *MYC* [He et al., 2005]. La surexpression des oncomir peut être la conséquence d'une amplification, d'une dérégulation d'un facteur de transcription ou d'une déméthylation des îlots CpG de la région du promoteur de ce gène de miRNA [Croce, 2008].

En revanche, certains miRNA agissent comme des suppresseurs de tumeurs en inhibant l'expression des oncogènes [Chen, 2005 ; Ma and Weinberg, 2008]. C'est les cas des miR-15a et miR-16 [Calin et al., 2002 ; Cimmino et al., 2005]. Ces derniers sont localisés dans la région 13q14 qui est déletée dans 55% des cas leucémie lymphoïde chronique (LLC) [Klein et al., 2010]. Les miR-15a et miR-16 induisent un signal apoptotique en inhibant l'expression du gène *BCL2*. La perte des miR-15a et miR-16 explique ainsi la surexpression de *BCL2* dans la LLC et le cancer de la prostate [Bonci et al., 2008 ; Cimmino et al., 2005]. Un autre exemple de miR suppresseur de tumeurs, est la famille let-7 qui supprime l'expression des oncogènes *HMGA2* et *RAS* [Johnson et al., 2005 ; Mayr et al., 2007].

L'action des mirRNA en tant que suppresseurs ou oncogènes dépend de la présence de ses gènes cibles et du contexte cellulaire [Croce, 2008]. Un gène miRNA peut être un suppresseur de tumeurs si dans un tissu donné ses gènes cibles sont des oncogènes, et peut être un oncogène si dans un autre tissu différent ses gènes cibles sont des suppresseurs de tumeurs.

D'autres types d'ARN non codants (*non coding "RNA"*, ncRNA) ont été impliqués dans la carcinogénèse [Taft et al., 2010]. C'est l'exemple des lncRNA ("*long non coding RNA*"). Il s'agit d'un grand ARN, de taille généralement supérieure à 2 Kb, est soumis au processus d'épissage et contient un signal canonique de polyadénylation [Mercer et al., 2009 ; Wilusz et al., 2009]. Au sein du cluster INK4A-ARF-INK4B/9p21.3, fréquemment délété dans les cancers, un lncRNA nommé ANRIL ("*antisens noncoding RNA in the INK4 locus*") a été identifié [Pasmant et al., 2007] (**Figure 26**). Le gène *ANRIL*, constitué de 19 exons répartis sur 126 Kb, est transcrit en un

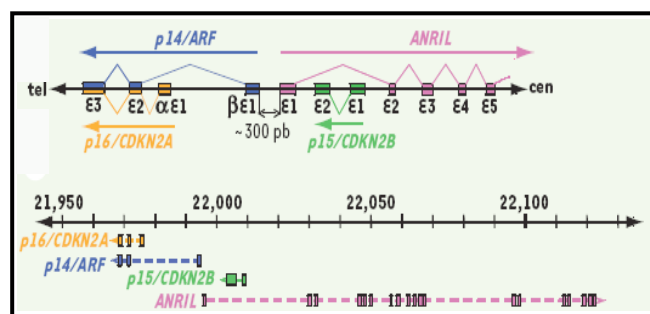


Figure 26 : Cluster des locus INK4A-ARF-INK4B et ANRIL. D'après [Pasmant et al, 2007].

ARNm dans le sens opposé à celui des trois autres gènes du cluster (**Figure 26**). Ce gène ANRIL est délété, autant que le reste des gènes du cluster, dans un syndrome héréditaire associant des prédispositions aux mélanome et astrocytome (OMIM 155755). L'exon 1 d'ANRIL est situé entre le promoteur d'ARF et INK4B, et il est transcrit dans le sens opposé du gène INK4B. Il semble que le gène ANRIL réprime l'expression du gènes p15INK4B mais non p16INK4A et ARF [Kotake et al., 2011].

En conclusion, les altérations du génome nucléaire (avec ses séquences codantes ou non) participent à la carcinogenèse. De plus en plus, le génome de la mitochondrie (avec ses séquences codantes ou non) est impliqué aussi dans ce processus [Stratton et al., 2009]. Chaque cellule possède des centaines de copies de l'ADN mitochondrial ce qui constitue un défi pour les techniques de séquençage de première génération. L'application des techniques de séquençage à haut débit a permis de révéler des mutations homoplasmique et hétéroplasmique de l'ADN mitochondrial des cellules tumorales [He et al., 2010]. Des mutations de cet ADN mitochondrial a également été rapporté dans des carcinomes.

IV. Anomalies épigénétiques

Les travaux émergents suggèrent que l'instabilité génomique et les anomalies épigénétiques contribuent à l'initiation et la progression du cancer chez l'homme [Wang et al., 2007]. Le concept de l'épigénétique, a été introduit par Waddington en 1939, et ultérieurement défini comme un changement transmissible de l'expression d'un gène qui n'est pas lié à une modification sous jacente de la séquence d'ADN [Holliday, 1987]. Le marqueur épigénétique le plus connu est la méthylation de l'ADN. Les résultats initiaux démontrant une hypométhylation globale de l'ADN tumoral chez l'homme [Feinberd and Vogelstein, 1983] ont été suivis par l'identification de l'hyperméthylation des gènes suppresseurs de tumeurs [Gonzalez-Zulueta, 1995 ; Greger et al., 1989], et récemment par la découverte de l'inactivation des gènes des miRNA par un processus de méthylation de l'ADN [Agirre et al., 2012 ; Lujambio et al., 2007]. De plus, il est connu que la méthylation de l'ADN survient dans un réseau chromatinien complexe et elle est influencée par les modifications structurelles des histones dont l'architecture est fréquemment altérée dans les cellules malignes [Bernstein et al., 2007 ; Chi et al., 2010].

Le génome nucléaire s'organise en une structure nucléoprotéique, appelée chromatine, qui, outre sa composante génétique, est riche d'une information épigénétique. Au niveau moléculaire, son unité élémentaire, le nucléosome, comprend une particule cœur et une région internucléosomique. La particule cœur est composée de 146 pb d'ADN enroulées autour d'un octamère protéique comprenant 2 copies de chacune des histones H2A, H2B, H3, H4 [Jenuwein and Allis, 2001], la région internucléosomique étant pour sa part caractérisée par la présence de l'histone H1 (histone « lien »). C'est donc la chromatine et non l'ADN seul, qui est impliquée dans tous les événements moléculaires faisant intervenir le matériel génétique, à savoir la réplication, la transcription, la réparation et la recombinaison. L'information épigénétique au sein de la chromatine est essentiellement véhiculée par des modifications de l'ADN et des histones.

La modification majeure de l'ADN est la méthylation de la cytosine. Chez les mammifères presque toute la méthylation de l'ADN survient dans les résidus cytosine des dinucléotides CpG [Herman and Baylin, 2003 ; Weber et al., 2007]. Les régions du génome qui ont une haute densité en CpG sont désignées comme des îlots de CpG et qui couvrent l'extrémité 5' des régions régulatrices de plusieurs gènes. Ces îlots CpG ne sont pas méthylés dans les cellules normales. La méthylation de l'ADN de ces régions corrèle avec une répression de la transcription [Goll and Bestor, 2005]. Ce processus fait appel à l'ADN méthyltransférase ("*DNA methyltransferases*", DNMTs). La méthylation de l'ADN intervient dans la régulation de l'expression des gènes. Par l'exemple, l'empreinte génomique requiert une hyperméthylation de l'ADN de l'un des 2 allèles parentaux d'un gène pour assurer une expression monoallélique [Feinberg et al., 2002]. L'hyperméthylation des séquences génomiques répétées prévient probablement l'instabilité chromosomique et le remaniement de gènes.

Les histones sont les pièces maîtresses de la compaction de l'ADN en chromatine et jouent un rôle majeur dans la régulation de l'expression des gènes. Elles sont les cibles de 2 types de modifications covalentes et non covalentes. Les histones sont de petites protéines basiques contenant un domaine globulaire très conservé. De part et d'autre de ce domaine, s'étendent les extrémités amino- et carboxyterminales. Les extrémités aminotermiales, et dans une moindre mesure carboxyterminales, sont les cibles privilégiées de nombreuses modifications covalentes.

Ces modifications covalentes sont post-traductionnelles et constituent le « code histone » qui dicterait l'état chromatinien et la manière de régler un gène ou un locus [Chi et

al., 2010 ; Jenuwein and Allis, 2001]. Une fois établi, ce code marquerait de façon épigénétique un locus soit d'une manière transitoire ponctuelle, soit de façon stable sur de grandes régions. Les modifications post-traductionnelles les plus étudiées sont : l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation et l'ubiquitinylation. Mais d'autres modifications ont également été décrites telles que l'ADP-ribosylation, la sumoylation, la glycosylation la biotinylation. La liste des modifications covalentes continue de s'accroître, grâce notamment à l'application de nouvelles approches techniques telle que la spectrométrie de masse. Ces modifications retiennent sur la transcription des gènes et la réparation de l'ADN Toutes les histones sont susceptibles d'être acétylées sur des lysines spécifiques dans leur domaine aminoterminal. L'acétylation des histones est assurée par les histones acétyltransférases ("*histone acetyltransferase*" ; HAT) et les histones désacétylases HDACs suppriment l'acétylation des histones. Ces 2 enzymes activent et répriment la transcription respectivement [Bernstein et al, 2007].

La méthylation des histones, peut survenir sur les résidus lysines ou arginines, est maintenant reconnue comme un processus réversible. Son homéostasie est assurée par 2 groupes d'enzymes antagonistes qui établissent, « *writers* », et suppriment, « *erasers* » la marque de méthylation des histones au niveau de résidus spécifiques [Ruthenburg et al., 2007 ; Strahl and Allis, 2000]. Par exemple la méthylation de l'histone H3 au niveau de la lysine 4 : H3K4 est établie par les protéines à domaine SET1 et MLL ("*mixed lineage leukemia*") de la famille des histones méthyltransférases ("*histone methyltransferase*" ; HMTs) [Ruthenburg et al., 2007]. La suppression du groupement méthyl est assuré par les protéines LSD1 ("*lysine-specific histone demethylase 1*") et JARID1 ("*jumonji AT-rich interactive domain 1*") de la famille des histones déméthylases ("*histone demethylase*" ; HDMs) [Klose and Zhang, 2007]. Pour l'histone H3, la méthylation peut se voir à de multiples sites lysine. Le profil de méthylations des histones est variable dans le génome des mammifères [Barski et al., 2007]. La triméthylation de H3K4 (H3K4me3) est fortement associée à une activation de la transcription, avec un niveau élevé observé au niveau des sites de transcription des gènes activement transcrits. En revanche, la triméthylation de H3K27 (H3K27me3) est associée à une répression de la transcription, particulièrement la répression de certains programmes de différenciation lors de la spécialisation de lignage [Klose and Zhang, 2007].

L'établissement d'un profil de méthylation des histones n'est pas seulement crucial pour le développement et la différenciation des cellules, mais est aussi intimement associé à

l'initiation et développement des tumeurs chez l'homme. Plusieurs gènes codant pour des enzymes impliquées dans les modifications post-traductionnelles ont été impliqués dans la carcinogénèse. Par exemple, le gène *MLL* a initialement été identifié dans des translocations chromosomiques récurrentes dans les leucémies aiguës [Krivtsov and Armstrong, 2007], et a ultérieurement été démontré qu'il code pour une HMT spécifique H3K4 [Milne et al., 2002 ; Nakamura et al., 2002]. *MLL* agit au sein d'un complexe macromoléculaire nucléaire lequel induit une H3K4me3 pour une transcription efficiente [Milne et al., 2002 ; Ruthenburg et al., 2007]. Les réarrangements du gène *MLL* sont parmi les anomalies chromosomiques les plus fréquentes dans les leucémies, responsables de 80% et 5-10% des leucémies aiguës du nourrisson et de l'adulte respectivement [Hess, 2004 ; Krivtsov and Armstrong, 2007].

Les mécanismes de modifications non covalentes des histones comme le remodelage de la chromatine et l'incorporation de variants d'histones spécialisées offrent à la cellule des outils supplémentaires pour introduire des variations dans la matrice chromatinienne. Le remodelage de chromatine dépendant de l'hydrolyse de l'ATP semble modifier l'accessibilité de la chromatine en agissant sur les interactions et l'incorporation des histones [Smith and Peterson, 2005]. Le complexe SWI/SNF ("*switching/sucrose nonfermenting*"), adénosine triphosphate (ATPase), utilise l'énergie provenant de l'hydrolyse d'ATP pour remodeler le nucléosome de la fibre chromatinienne et modifie ainsi la transcription [Wilson and Roberts, 2011]. Des mutations inactivatrices des sous unités du complexe SWI/SNF ont été rapportées dans plusieurs cancers chez l'homme.

Les mécanismes de régulation covalents et non covalents de la chromatine, agissent d'une manière synergique pour contrôler la structure de la chromatine et ainsi réguler l'expression des gènes [Wilson and Roberts, 2011]. Les anomalies des processus de méthylation de l'ADN et de modifications des histones sont associées aux cancers (**Tableau 2**).

Type of Cancer	Epigenetic Disruption
Colon cancer	CpG-island hypermethylation (<i>hMLH1</i> , <i>p16^{INK4a}</i> , <i>p14^{ARF}</i> , <i>RARB2</i> , <i>SFRP1</i> , and <i>WRN</i>), hypermethylation of miRNAs (<i>miR-124a</i>), global genomic hypomethylation, loss of imprinting of <i>IGF2</i> , mutations of histone modifiers (<i>EP300</i> and <i>HDAC2</i>), diminished monoacetylated and trimethylated forms of histone H4
Breast cancer	CpG-island hypermethylation (<i>BRCA1</i> , E-cadherin, <i>TMS1</i> , and estrogen receptor), global genomic hypomethylation
Lung cancer	CpG-island hypermethylation (<i>p16^{INK4a}</i> , <i>DAPK</i> , and <i>RASSF1A</i>), global genomic hypomethylation, genomic deletions of <i>CBP</i> and the chromatin-remodeling factor <i>BRG1</i>
Glioma	CpG-island hypermethylation (DNA-repair enzyme <i>MGMT</i> , <i>EMP3</i> , and <i>THBS1</i>)
Leukemia	CpG-island hypermethylation (<i>p15^{INK4b}</i> , <i>EXT1</i> , and <i>ID4</i>), translocations of histone modifiers (<i>CBP</i> , <i>MOZ</i> , <i>MORF</i> , <i>MLL1</i> , <i>MLL3</i> , and <i>NSD1</i>)
Lymphoma	CpG-island hypermethylation (<i>p16^{INK4a}</i> , <i>p73</i> , and DNA-repair enzyme <i>MGMT</i>), diminished monoacetylated and trimethylated forms of histone H4
Bladder cancer	CpG-island hypermethylation (<i>p16^{INK4a}</i> and <i>TPEF/HPP1</i>), hypermethylation of miRNAs (<i>miR-127</i>), global genomic hypomethylation
Kidney cancer	CpG-island hypermethylation (<i>VHL</i>), loss of imprinting of <i>IGF2</i> , global genomic hypomethylation
Prostate cancer	CpG-island hypermethylation (<i>GSTP1</i>), gene amplification of polycomb histone methyltransferase <i>EZH2</i> , aberrant modification pattern of histones H3 and H4
Esophageal cancer	CpG-island hypermethylation (<i>p16^{INK4b}</i> and <i>p14^{ARF}</i>), gene amplification of histone demethylase <i>JMJD2C/GASC1</i>
Stomach cancer	CpG-island hypermethylation (<i>hMLH1</i> and <i>p14^{ARF}</i>)
Liver cancer	CpG-island hypermethylation (<i>SOCS1</i> and <i>GSTP1</i>), global genomic hypomethylation
Ovarian cancer	CpG-island hypermethylation (<i>BRCA1</i>)

Tableau 2 : Exemple d'anomalies épigénétiques associées aux cancers. D'après [Esteller, 2008].

V. Thérapies ciblées

Le développement de molécules qui inhibent d'une manière ciblée la protéine codée par un gène muté est devenu l'ultime objectif qui succède à la détection d'une anomalie génomique dans une tumeur. Le prototype de cette thérapie ciblée est l'imatinib (Glivec), qui inhibe le domaine kinase d'ABL, utilisé dans le traitement de la LMC. Dans la majorité des cas, la LMC est associée à la translocation t(9;22)(q34;q11) qui a pour conséquence la formation d'un gène de fusion *BCR-ABL*. Ce dernier est à l'origine d'une activation constitutive de la protéine ABL. Les essais cliniques ont démontré la supériorité de l'imatinib par rapport à la chimiothérapie conventionnelle dans le traitement de la LMC [O'Brien et al., 2003]. Le succès de l'imatinib dans le traitement de la LMC a été élargi à d'autres types de cancers associées à des mutations activatrices des oncogènes : C-KIT, PDGFR α , FIP1L1-PDGFR α .

Les inhibiteurs de l'activité kinase l'EGFR ont initialement été développés car l'*EGFR* a un rôle régulateur de la prolifération cellulaire ça d'une part et d'autre part il est surexprimé dans plusieurs types de cancers. Ultérieurement, la découverte d'une mutation

somatique activatrice de l'*EGFR* dans les CBNPC a défini un sous-groupe de patients particulièrement sensibles aux traitements par les inhibiteurs de l'*EGFR* comme l'erlotinib (Tarceva) et le gefitinib (Iressa). En cas de mutation de l'*EGFR*, le taux de réponse à ces traitement a été évalué à 71% comparé à 1% en cas d'absence de mutations [Shepherd et al., 2005 ; Thatcher et al., 2005].

Il existe plusieurs exemples de molécules inhibant d'une manière ciblée les protéines dérégulées en conséquence à des altérations génomiques (**Tableau 3**) et cette liste de traitement va évoluer d'une parallèle avec l'arrivée du séquençage à haut débit. En revanche, la découverte de gènes mutés dans plusieurs cancers n'a pas permis la découverte d'une thérapie ciblée. Par exemple *RAS* dont la mutation, qui est décelée dans 30% des cancers, est synonyme d'une résistance au traitement par les inhibiteurs de l'*EGFR* dans les CBNPC.

Gene	Genetic Alteration	Tumor Type	Therapeutic Agent
Receptor tyrosine kinase			
<i>EGFR</i>	Mutation, amplification	Lung cancer, glioblastoma	Gefitinib, erlotinib
<i>ERBB2</i>	Amplification	Breast cancer	Lapatinib
<i>FGFR1</i>	Translocation	Chronic myeloid leukemia	PKC412, BIBF-1120
<i>FGFR2</i>	Amplification, mutation	Gastric, breast, endometrial cancer	PKC412, BIBF-1120
<i>FGFR3</i>	Translocation, mutation	Multiple myeloma	PKC412, BIBF-1120
<i>PDGFRA</i>	Mutation	Glioblastoma, gastrointestinal stromal tumor	Sunitinib, sorafenib, imatinib
<i>PDGFRB</i>	Translocation	Chronic myelomonocytic leukemia	Sunitinib, sorafenib, imatinib
<i>ALK</i>	Mutation or amplification	Lung cancer, neuroblastoma, anaplastic large-cell lymphoma	Crizotinib
<i>c-MET</i>	Amplification	Gefitinib-resistant non-small-cell lung cancer, gastric cancer	Crizotinib, XL184, SU11274
<i>IGF1R</i>	Activation by insulin-like growth factor II ligand	Colorectal, pancreatic cancer	CP-751,871, AMG479
<i>c-KIT</i>	Mutation	Gastrointestinal stromal tumor	Sunitinib, imatinib
<i>FLT3</i>	Internal tandem duplication	Acute myeloid leukemia	Lestaurinib, XL999
<i>RET</i>	Mutation, translocation	Thyroid medullary carcinoma	XL184
Non-receptor tyrosine kinase			
<i>ABL</i>	Translocation (BCR-ABL)	Chronic myeloid leukemia	Imatinib
<i>JAK2</i>	Mutation (V617F), translocation	Chronic myeloid leukemia, myeloproliferative disorders	Lestaurinib, INCB018424
<i>SRC</i>	Overexpression	Non-small-cell lung cancer; ovarian, breast cancer; sarcoma	KX2-391, dasatinib, AZD0530
Serine-threonine-lipid kinase			
<i>BRAF</i>	Mutation (V600E)	Melanoma; colon, thyroid cancer	SB-590885, PLX-4032, RAF265, XL281
Aurora A and B kinases	Overexpression	Breast, colon cancer; leukemia	MK-5108 (VX-689)
Polo-like kinases	Overexpression	Breast, lung, colon cancer; lymphoma	BI2536, GSK461364
<i>MTOR</i>	Increased activation	Renal-cell carcinoma	Temsirolimus (CCI-779), BEZ235
<i>PI3K</i>	PIK3CA mutations	Colorectal, breast, gastric cancer; glioblastoma	BEZ235
DNA damage or repair			
<i>BRCA1</i> and <i>BRCA2</i>	Mutation (synthetic lethal effect)	Breast, ovarian cancer	Olaparib, MK-4827 (PARP inhibitors)

Tableau 3 : Exemples de thérapie ciblée dans les cancers.
D'après [McDermott et al, 2011].

VI. Moyens d'étude de l'oncogénome

1. Cytogénétique conventionnelle

Le modèle génétique à la base de notre conception de la carcinogenèse puise ses racines [Maser and DePinho, 2002] dans les analyses cytogénétiques initiales de cellules cancéreuses [Boveri, 1914 ; Von Hansemann en 1890]. Traditionnellement, le terme de cytogénétique fait référence à l'étude de l'hérédité cellulaire, spécialement la description des chromosomes et l'identification des aberrations chromosomiques.

La cytogénétique humaine a débuté en 1956 après la découverte du nombre exact des chromosomes humains, 46, [Tjio and Levan, 1956]. Le développement des techniques de culture cellulaire a permis l'amélioration des préparations métaphasiques [Tjio and Whang, 1962]. Le classement des chromosomes était devenu possible d'abord sur la base de leur taille, de leur indice centromérique et de leur appariement débouchant sur le caryotype normal et pathologique. La découverte et le développement des techniques de bandes par la quinacrine (bandes Q) [Caspersson et al., 1970], le traitement enzymatique (bandes G) [Seabright, 1971] ou la dénaturation à la chaleur (bandes R) [Dutrillaux, 1971] rendait possible l'identification de chaque chromosome et sa subdivision en bandes.

Une nomenclature internationale était née à Denver en 1960 créait les fondations de la cytogénétique humaine. Un système international évolutif dédié pour la nomenclature de la cytogénétique humaine ("*international system chromosome nomenclature*"; ISCN) permettait la description : (1) des paires des autosomes et des gonosomes (Denver Conférence) et (2) de leur profil de bandes caractéristique de chaque paire de chromosomes homologues à la Conférence de Paris (1971). Ce système, toujours en vigueur, a facilité la standardisation et la description des anomalies chromosomiques depuis 1960.

L'amélioration de la résolution de l'analyse chromosomique par les bandes avait révélé en 1973, treize ans après sa découverte en 1960 [Nowell et Hungerford 1960], que le chromosome Philadelphie ne correspondait pas à une délétion 22q, mais résultait d'une $t(9;22)(q34;q11)$ [Rowley, 1973a].

La cytogénétique somatique est l'étude des chromosomes dans les tissus tumoraux. Plusieurs types de tissus peuvent être étudiés. A l'état physiologique, les cellules hématopoïétiques se divisent spontanément, ce qui favorise l'obtention des métaphases. A l'opposé, dans les tumeurs solides, l'index mitotique des cellules malignes est faible d'où la

difficulté d'obtenir des métaphases. Le caryotype dans les hémopathies malignes est relativement simple ce qui facilite le diagnostic des anomalies chromosomiques. En effet, la cytogénétique oncohématologique est devenu un argument clé dans le diagnostic, le pronostic le traitement et le suivi de la maladie résiduelle des hémopathies malignes. Les 2 dernières classifications de l'OMS des hémopathies malignes s'appuie largement sur les résultats de la cytogénétique conventionnelle. Par contre, pour les tumeurs solides, en dehors des sarcomes, et spécialement dans les tumeurs épithéliales la cytogénétique conventionnelle s'est heurtée à 3 difficultés : (1) un index mitotique faible avec des métaphases de qualité moyenne, (2) un taux d'échec assez élevé et (3) un caryotype très complexe ce qui rend le diagnostic des anomalies chromosomiques très incertain (**Figure 27**). Dans les carcinomes, la cytogénétique somatique est restée en retrait par rapport aux examens anatomopathologiques qui ont, de nos jours, toute la valeur diagnostique et pronostique.

Quelque soit le type de cancer le caryotype est un examen pangénomique permettant l'analyse des anomalies chromosomiques équilibrées et des aneuploïdies. En revanche, le seuil de résolution de la cytogénétique conventionnelle, 5-10 Mb, est faible et exige une bonne qualité des métaphases. Ainsi, les anomalies cryptiques et les mutations ponctuelles restent indétectables par le caryotype. Les isodisomies acquises souvent à l'origine de LOH le sont aussi. La cytogénétique conventionnelle se fait à partir de cultures cellulaires, néanmoins certaines anomalies chromosomiques, notamment les chromosomes doubles minutes [Graux et al., 2004] peuvent être perdues au cours des cultures cellulaires.

La sélection de métaphases de bonne qualité peut introduire un biais dans le choix de métaphases et le clone malin peut alors passer inaperçu. C'est l'exemple des translocations $t(1;19)(q23;p13)$ et $t(15;17)(q22;q21-22)$, associées aux LAL B et LAM3 respectivement, qui généralement font parti des métaphases de mauvaise qualité. Par ailleurs, la cytogénétique conventionnelle permet une étude de tout le génome cellule par cellule ce qui donc offre la possibilité de tracer l'évolution clonale qui a une valeur diagnostique et cognitive. En dehors des anomalies chromosomiques répertoriées dans les bases données (<http://cgap.nci.nih.gov/chromosomes/Mitelman>; Huret, 2010), et grâce à son caractère pangénomique, la cytogénétique conventionnelle garde de nos jours l'aptitude de rapporter de nouvelles anomalies chromosomiques qui peuvent avoir une valeur diagnostique et thérapeutique (découverte de nouveaux gènes de fusion).

Le rôle de pierre angulaire de la cytogénétique conventionnelle dans le diagnostic des anomalies chromosomiques acquises et clonales a été consolidé par des techniques complémentaires dérivées qui se basent généralement sur l'hybridation *in situ* fluorescente (FISH).

2. Cytogénétique moléculaire

La première application des techniques moléculaires sur des préparations cytologiques de chromosomes émergeait de l'observation que des séquences nucléotidiques complémentaires peuvent s'hybrider pour former des complexes plus stables que des séquences non complémentaires. La première analyse d'hybridation *in situ* était rapportée en 1969 par Joe Gall et Mary Lou Pardue, qui avaient utilisé un hybride ADN-ARN pour localiser des gènes codant pour l'ARN ribosomal [Gall and Pardue, 1969]. Ainsi, le principe de l'hybridation *in situ* se base sur l'hybridation d'une sonde marquée, contenant une séquence d'ADN génomique d'intérêt, sur sa séquence complémentaire située dans une région cible du génome. Le résultat de cette hybridation est évalué par une analyse microscopique. Depuis sa première découverte en 1969, les méthodes d'hybridation *in situ* ont évolué d'une manière extensive et ceci concerne à la fois la cible et la sonde.

Les toutes premières hybridations *in situ* étaient basées sur des méthodes de détection radioactive. Rapidement le marquage au tritium s'est imposé associé au marquage simultané en bandes GTG [Harper et al., 1982] et RHG [Bernheim et al., 1984]. De nombreux gènes ont été ainsi localisés, mais cette technique restait délicate : autoradiographie, long temps d'exposition, analyse statistique de nombreuses mitoses, radioactivité... Une approche plus robuste, basée sur un couplage chimique d'un fluorochrome à une sonde d'ARN, était utilisée pour une détection et rapide des hybrides [Rudkin and Stollar, 1977] qui était baptisée hybridation *in situ* fluorescente [Bauman et al., 1980]. Le couplage d'un fluorochrome à une sonde d'ADN ou d'ARN fait référence souvent à un marquage direct. A l'opposé, un marquage indirect, renvoie à une détection enzymatique ou immunologique d'un peptide qui a été préalablement incorporé dans la sonde. La synthèse de nucléotides modifiés contenant de la biotine, incorporés à la sonde par des polymérase, révélée par l'avidine couplée à un fluorochrome devenait la norme de la FISH [Langer et al., 1981]. Cependant les sondes d'ADN restaient petites puisqu'elles contiennent des séquences répétées, comme les séquences *Alu* et *LINES* qui sont présentes dans le génome humain. L'hybridation directe de ces sondes généraient alors un énorme

bruit de fond empêchant ainsi la distinction du signal d'hybridation spécifique, limitant alors la FISH aux seules séquences centromériques. Cette difficulté a été surmontée par une préincubation de la sonde complexe dénaturée en présence d'un excès d'ADN humain total non marqué ou des seules séquences répétées, l'ADN Cot-1. Cette préincubation va saturer préférentiellement les séquences répétées et empêcher alors leur hybridation sur l'ADN cible [Landegent et al., 1987]. Cette procédure a rendu les clones génomiques complexes et de grande taille aptes à l'utilisation en FISH et permis le premier marquage spécifique de différents chromosomes sur des métaphases et aussi des noyaux interphasiques [Cremer et al., 1988 ; Lichter et al., 1988 ; Pinkel et al., 1988], le rendant accessibles à l'approche cytogénétique.

La résolution de ce marquage a atteint son apogée dans les années 90 à travers l'utilisation de différentes cibles comprenant le chromosome métaphasique (résolution : 5 Mb) , le noyau interphasique (50 Kb-2 Mb) et la fibre chromatinienne (5-500 Kb). Les sondes allaient du phage de 10kb au chromosome entier (peinture chromosomique) puis au génome entier. Cela allait autoriser la localisation de nombreux gènes, l'étude d'hybrides somatiques interspécifiques, l'évolution chromosomique des espèces et la CGH métaphasique. Pour le séquençage du génome humain ("*international human genome sequencing*", 2004), des clones génomiques ont été cartographiés et séquencés. Des BAC ("*bacterial artificial chromosomes*"), des Fosmid, des PAC ("*P1-derived artificial chromosomes*") et des YAC ("*yeast artificial chromosomes*") sont désormais utilisés comme sondes en FISH pour cartographier les réarrangements chromosomiques à une haute résolution [Henderson et al., 2004 ; Fujiwara et al., 2001 ; Huang et al., 1998]. Ces clones sont disponibles sur les sites : *Ensembl Cytoview*, *NCBI Map-Viewer* ou *UCSC genome browser*. Des sondes commerciales sont également disponibles

Les sondes de peinture chromosomique, qui marquent la totalité ou une partie d'un chromosome, sont devenues disponibles grâce au développement de l'approche PCR ("*polymerase chain reaction*") universelle en particulier la DOP-PCR [Telenius et al., 1992]. Cette technique permet la synthèse de sondes de peinture de chromosome entier à partir d'un nombre limité de chromosome triés et de petites régions obtenues par microdissection chromosomique [Cram et al., 2004; Guan et al., 1992].

Les sondes de peinture sont souvent utilisées pour vérifier un réarrangement chromosomique évident ou suspecté sur les techniques de bandes. En revanche, le décryptage d'un remaniement complexe contenant un matériel chromosomique non

identifiable est inefficace si une ou deux sondes de peinture sont utilisées par hybridation. Des techniques étaient développées pour permettre l'hybridation simultanée de plusieurs sondes de peinture marquées différemment.

L'introduction de fluorochromes divers qui couvrent le spectre depuis les rayons ultraviolets jusqu'aux infra-rouges et le développement d'un système d'imagerie numérisé

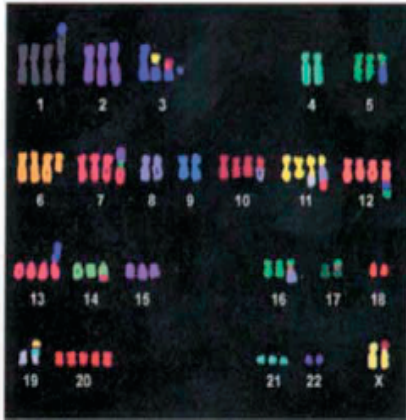


Figure 27 : Caryotype complexe en 24 couleurs d'un cancer ovarien. D'après [Speicher and Ward, 1996].

hautement sensible ont rendu possible ces développements. Ils ont permis la visualisation simultanée des 24 chromosomes humains (**Figure 27**), chacun ayant une couleur différente, en une seule hybridation. Ceci est basé sur la combinaison spécifique pour chaque chromosome de 5 fluorochromes différents [Nederlof et al., 1989, 1992]. Les techniques spécifiques utilisant ces approches comprennent : M-FISH ("*multiplex FISH*") [Speicher et al., 1996] (**Figure 27**), SKY

("spectral karyotyping") [Schröck et al., 1996] et COBRA ("*combined binary ratio labelling*") [Tanke et al., 1999]. Ces techniques permettent de caractériser les : (1) aberrations de structure interchromosomiques, (2) réarrangements chromosomiques complexes fréquents dans les tumeurs solides et (3) marqueurs chromosomiques. En revanche, la sensibilité de détection de petits réarrangements interchromosomiques (de taille inférieure à 5 Mb) est très faible en utilisant ces approches.

La peinture inverse est une technique puissante pour l'analyse d'un chromosome remanié [Carter et al., 1992]. Le chromosome anormal est obtenu soit par tri soit par microdissection. Le chromosome anormal alors collecté est amplifié par DOP-PCR, puis marqué, mais hybridé sur des métaphases normales. Le profil d'hybridation de la sonde peinture inverse permet d'élucider la composition du chromosome anormal, et révèle la localisation des points de cassure. La résolution de cette technique peut être augmentée d'une manière drastique en hybridant la sonde de peinture du chromosome anormale sur des array de sondes [Fiegler et al., 2003b ; Gribble et al., 2004].

La puissance de la FISH, quelque la sonde utilisée : peinture ou locus spécifique, est sa capacité d'analyser tout ou une partie du génome à l'échelle de cellule(s) isolée(s). A ce

niveau de résolution, l'analyse de l'ADN offre la possibilité de comprendre la biologie de la cellule cancéreuse, l'évolution clonale, le mosaïcisme chromosomique et d'autres évènements rares (exemple la maladie résiduelle). Il est établi qu'au cours de la carcinogenèse, les cellules tumorales deviennent de plus en plus hétérogènes avec une désorganisation de leurs propriétés structurales. Il est souvent nécessaire d'analyser les cellules d'une manière individuelle et dans leur environnement habituel, exemple une coupe tissulaire. Le progrès des outils permettant l'analyse de chaque cellule devrait faciliter l'identification de tissus ayant des génomes différents. Des évènements rares, tels que les lésions préneoplasiques ou la maladie résiduelle, devraient bénéficier des avancées de la FISH. De plus, cette technique permet aussi une corrélation détaillée génotype-phénotype qui ne peut pas être étudiée par d'autres techniques moléculaires hautement résolutive [Goymer, 2008].

L'avantage de la FISH interphasique par rapport la FISH métaphasique comprend l'analyse d'un grand nombre de noyaux (jusqu'à 1000 cellules) ce qui augmente la probabilité de détection des aberrations chromosomiques présents à un faible taux. Donc la FISH interphasique permet de renseigner sur le taux, « *rate* », de l'instabilité chromosomique alors que la FISH métaphasique, qui est réalisé à partir d'un nombre plus limité de cellules, établit l'état, « *state* », des réarrangements chromosomiques. En clinique les sondes, centromères, peintures, locus spécifiques et télomères sont utilisées en FISH métaphasique et en FISH interphasique, à l'exception des peintures.

En dehors de ces applications, la FISH est un outil utilisée pour : l'étude en 3-D de l'architecture du noyau interphasique, la cartographie des gènes, l'étude de la réplication et la recombinaison de l'ADN, la transcription des gènes et pour l'étude de l'organisation de la chromatine. La FISH combinée à l'immunophénotypage est un outil performant utilisé en cancérologie. Par exemple, cette technique a permis de tracer l'histoire naturelle des leucémies en pédiatrie en montrant que certaines translocations spécifiques associées aux leucémies sont présentes dans un groupe de progéniteurs normaux du sang du cordon [Greaves and Wiemels, 2003]. A la différence du caryotype qui se fait à partir d'un échantillon frais, la FISH peut être appliquée à une variété large d'échantillons : appositions, frottis cellulaires, cellules cultivées et coupes en paraffines, qui ont une spécificité. La FISH ne permet pas un examen pangénomique, à l'exception des grosses aberrations chromosomiques détectées par les techniques 24 couleurs (**Figure 27**), et donc

elle a une valeur limitée dans la découverte de nouveaux réarrangements chromosomiques touchant tout le génome.

Les progrès des techniques d'hybridation puis la disponibilité de la séquence du génome humain ont permis de mettre au point et de développer l'hybridation génomique comparative (CGH). Cet outil permet une analyse pangénomique et constitue donc un trait d'union entre la cytogénétique et les approches moléculaires.

3. Hybridation génomique comparative

Bien que les tumeurs solides soient les cancers les plus fréquents, elles sont moins étudiées en cytogénétique conventionnelle en raison de la difficulté d'obtenir des métaphases de bonne qualité et de la complexité des caryotypes observés [Mitelman et al., 2004]. La CGH était conçue pour contrecarrer cet obstacle [Du Manoir et al., 1993; Kallioniemi et al., 1992].

En CGH, l'ADN est extrait de la tumeur (test) et d'un échantillon normal (référence). Les 2 types d'ADN sont marqués par 2 fluorochromes différents, le mélange de sondes équimolaire alors obtenu est hybridé sur une cible normale de chromosomes métaphasiques. L'interprétation des résultats de CGH nécessite l'utilisation d'outils informatiques spécifiques. Il s'agit de logiciels d'analyse d'images en microscopie, développés pour quantifier les signaux de fluorescence le long des chromosomes et faire la moyenne des résultats obtenus pour plusieurs métaphases. L'analyse de la CGH est basée sur la quantification du ratio de fluorescence de l'ADN test par rapport à l'ADN de référence (nombre de copies dans la tumeur/nombre de copies dans la référence). On établit donc des profils de variation le long de chaque paire de chromosomes homologues. Un intervalle de confiance a été défini ; un ratio est considéré comme normal s'il varie entre 0.75 et 1.25 ; un ratio <0.75 est considéré comme une perte tandis qu'une valeur >1.25 comme gain. Cette technique avait permis l'étude d'un certain nombre de tumeurs [Lichter et al., 2000 ; Mertens et al., 1997] (**Figure 28**), cependant elle manque cruellement de résolution, 5-10 Mb pour les délétions et 2 Mb pour les amplifications [Mantripragada et al., 2004]. La CGH array a été développé pour améliorer la résolution de la CGH sur chromosome métaphasique [Pinkel et al., 1998 ; Solinas-Toldo et al., 1997].

Conceptuellement, la CGH array (aCGH) est un aménagement technique de la CGH sur chromosomes. L'amélioration réside dans le changement des cibles d'hybridation. En effet, alors que la CGH utilise des chromosomes en métaphase, l'aCGH est pratiqué sur des array de sondes d'ADN immobilisés sur une lame de microscopie [Pinkel et al., 1998 ; Pollack et al., 1999] (**Figure 28**). Ces sondes sont directement cartographiées sur la séquence du génome humain. La résolution de l'aCGH dépend de la densité et de la taille des sondes d'ADN dans les arrays. Différents substrats de sondes étaient utilisés en aCGH : des inserts de clones génomiques de grande taille (40-200 Kb) comme les : BAC, cosmides, PAC, et fosmids. La production d'une quantité suffisante d'ADN de BAC avec une pureté adéquate est fastidieux, différentes techniques étaient utilisées pour amplifier de faible quantité d'ADN. Ces outils correspondent à la ligation PCR [Snijders et al., 2001], DOP-PCR [Fiegler et al., 2003a] et l'amplification par déplacement de brin [Smirnov et al., 2004]. Des array formés par des acides nucléiques moins complexes tels que de clones d'ADN complémentaire, ADNc, (0.5-2 Kb), de produits de PCR sélectionnés (0.1-1.5 Kb) et des oligonucléotides (25-85 pb) étaient également utilisés [Carter, 2007]. Les sondes oligonucléotides étaient produites par un *spotting* d'oligonucléotides sur la lame [Barrett et al., 2004 ; Carvalho et al., 2004]. Désormais elles sont synthétisées in situ sur une lame de microscopie ou un substrat en silicone qui peut contenir jusqu'à 2.000.000 éléments [Lucito et al., 2003 ; Zhao et al., 2004]. Les SNP ont été utilisés comme des array (**Figure 28**), et des supports contenant plus de 1.600.000 SNP sont utilisables [Kennedy et al., 2003 ; Matsuzaki et al., 2004]. Le terme d'ACPA (Anomalies Chromosomiques Par Array) est désormais utilisé pour désigner toutes les matrices utilisées pour l'étude des remaniements du génome.

Outre l'aCGH avec deux fluorochromes, des matrices d'ACPA mono couleurs permettent de voir les anomalies de nombre de copies mais aussi les d'étudier le statut d'hétérozygotie le long des chromosomes.

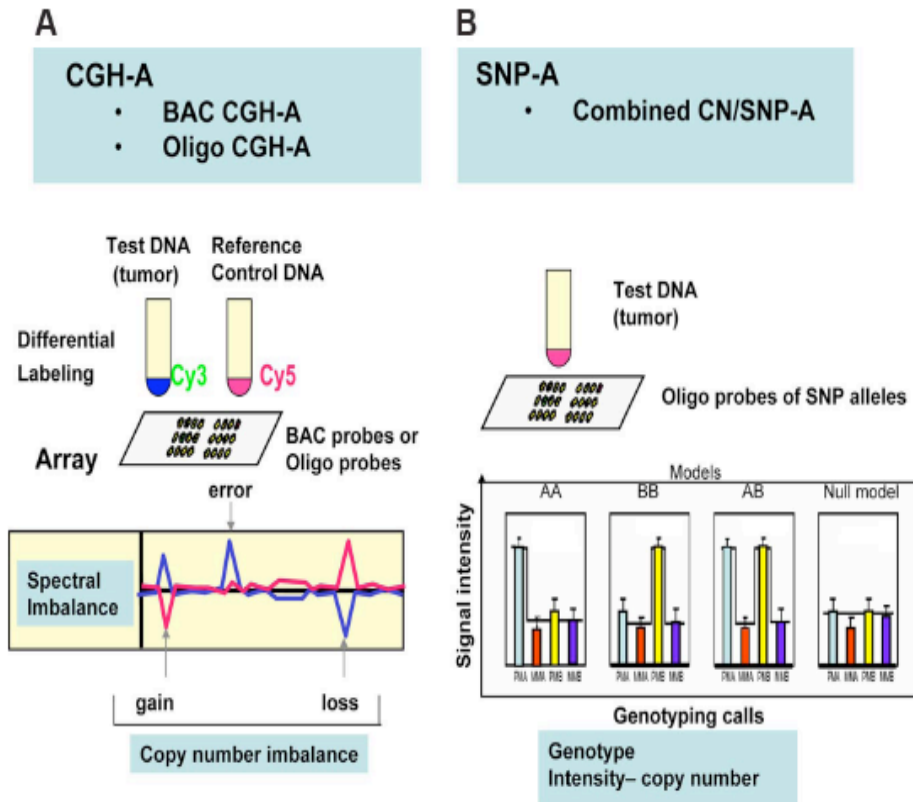


Figure 28 : Principes de l'aCGH et des SNP array.A: l'hybridation d'un mélange équimolaire ADN test-ADN de référence sur une lame contenant des array (BAC ou oligonucléotides) permet de déterminer le spectre des CNA dans la tumeur. **B** l'hybridation de la seule ADN test sur une matrice contenant des SNP permet de déterminer le génotype des allèles et les CNA dans la tumeur. Adapté de [Pinkel and Albertson, 2005].

Le choix d'une de ces plates-formes d'ACPA dépend de plusieurs paramètres. La détection d'une anomalie génomique dépend de la distribution et de la taille des éléments des array (**Figure 28**). Par exemple, la haute performance d'un microarray comportant 32000 clones chevauchants est rendu possible grâce à la distribution uniforme des éléments de l'array à travers tout le génome malgré la présence de quelques lacunes dans la couverture de ce génome [Garnis et al., 2005 ; Ishkanian et al., 2004]. Par contre cette plate-forme, constituée d'inserts de clones de grande taille, a une sensibilité réduite dans la détection des anomalies génomiques de taille inférieure à 50 Kb par rapport aux oligonucléotides qui sont théoriquement plus performants dans la détection des aberrations de petite taille [Barrett et al., 2004 ; Selzer et al., 2005 ; Zhao et al., 2005]. La plate-forme Nimblegen 2.000.000 oligonucléotides est la plus sensible des microarray dans la détection des anomalies de petite taille. La probabilité de détection de ces anomalies de petite taille décroît d'une manière drastique avec une baisse de la densité des array d'une plateforme. En raison de l'existence de plusieurs sources à l'origine d'un bruit de fond expérimental, une

performance optimale n'est jamais atteinte par aucune des plates-formes. Bien que des amplifications soient détectables par toutes les plates-formes quelque soit le bruit de fond, la mise en évidence d'un gain simple copie va dépendre à la fois du bruit de fond de la plate-forme et du ratio de fluorescence à chaque élément de l'array. Pour la détection d'une CNA simple copie d'une manière fiable, la moyenne des ratios de gain simple copie d'une région donnée doit être différent au minimum d'une déviation standard par rapport à la moyenne des ratios d'une portion normale du génome. Dans le cas où la distinction d'un gain simple copie par rapport au bruit de fond est difficile à obtenir, ceci peut être surmonté en faisant la moyenne de plusieurs éléments de l'array [Ylstra et al., 2006]. La moyenne des signaux de plusieurs locus, suivie d'une analyse statistique est requise pour identifier d'une manière fiable des CNA de petite taille. La détermination des points de cassure d'une CNA avec précision est proportionnelle à la densité des éléments de l'array. Dans ce cas, le maximum de performance théorique est observé avec le microarray Nimblegen2 M, suivie par Agilent 1 M et Affymetrix 1.6 M.

La quantification des ratios en aCGH peut être influencée par l'existence dans le génome humain de séquences, communes à tous les individus, de type LCR ("*low copy reiterated*"). Ces régions contiennent des familles de gènes et des blocs de duplications segmentaires [Eichler, 2001]. Si un locus contenant une séquence LCR présente un changement de nombre de copies, la modification du ratio correspondant peut sous estimer l'étendue de l'anomalie, car les autres locus ayant des LCR gardent un ratio normal [Zhang et al., 2005]. A l'opposé, tous les locus contenant une LCR peuvent avoir un ratio modifié lorsqu'un locus est remanié [Locke et al., 2004]. Ces polymorphismes du nombre de copie (CNV) dont les LCR font partie, ont été une surprise importante lorsqu'ils ont été décrits dans leur généralité [Redon et al., 2006]. Ils sont dispersés dans le génome, ils représentent de 5 à 12% de ce dernier. Ils peuvent dépasser 2 Mégabases et contenir des gènes et des miRNA. Ils sont très généralement hérités des parents.

Les ACPA trouvent un intérêt majeur dans la génétique constitutionnelle et prénatale. En effet, elle est utilisée lors des anomalies du développement, du retard mental, des fausses couches spontanées, pour préciser les mécanismes de genèse des aberrations chromosomiques [Locke et al., 2004] et dans la corrélation génotype-phénotype [Van Buggenhout et al., 2004]. Elles sont désormais utilisées en première intention dans de nombreux pays et de nombreux laboratoires en France dans ces indications.

L'aCGH offre une approche solide dans l'étude des cancers, car elle permet une analyse pangénomique et quantitative de l'oncogénome. Dans un même type de tumeur, l'aCGH identifie un large spectre de CNA, mettant en évidence plusieurs types d'instabilité génomique. Par exemple, l'étude par aCGH de 2 types de lignées cellulaires de cancer du colon, ayant ou une instabilité des microsatellites, a révélé que la nature exacte de cette instabilité reflète le changement de nombre de copies [Snijders et al., 2003]. L'aCGH est indiqué dans le cancer du colon par instabilité chromosomique où elle permet de la faire le diagnostic des gènes remaniés.

L'aCGH permet également de tracer l'historique des tumeurs. En effet, certaines tumeurs manifestent une certaine stabilité *in vivo*, avec une tumeur primitive et une récurrence ayant presque le même profil aCGH [Albertson, 2003 ; Waldman et al., 2000]. A l'opposé d'autres tumeurs présentent une instabilité génomique avec une hétérogénéité clonale qui ne peut pas être étudiée par aCGH et se prête bien à des approches analysant d'une manière individuelle les cellules [Chin et al., 2004].

Les données de l'aCGH peuvent avoir une valeur pronostique. Les CNA ont été associées au pronostic des cancers : gastrique, prostate, sein et aux lymphomes [Callagy et al., 2005 ; Martinez-Climent et al., 2003 ; Paris et al., 2004 ; Rubio-Moscardo et al., 2005 ; Weiss et al., 2004]. Les CNA segmentaires dans un neuroblastome orientent vers une thérapeutique intensive.

L'aCGH permet d'identifier des gènes dans des régions génomiques altérées d'une manière récurrente [Snijders et al., 2003, 2005]. D'autres techniques sont également requises pour retenir définitivement l'implication de ces gènes dans le processus de carcinogénèse.

Dans les tumeurs, les SNP array renseignent sur la LOH qui peut être la conséquence, soit d'un changement de nombre de copies (fréquemment il s'agit de délétion, mais aussi il s'agit d'amplification), soit sans changement de nombre de copies, ou disomie uniparentale acquise (DUP). Cette dernière résulte d'une perte d'un gène suppresseur de tumeurs suivie d'une duplication de l'allèle restant qui peut être muté ou être le siège d'une modification épigénétique [Dutt and Beroukhim, 2007 ; LaFramboise, 2009]. Ce mécanisme de DUP a été rapporté dans les leucémies aiguës [Raghavan et al., 2005].

L'aCGH comme la FISH ne nécessite pas de culture cellulaire et elle peut se faire sur un spectre large d'échantillon biologique.

L'aCGH ne permet pas de déterminer la localisation physique d'une aberration chromosomique et ne détecte pas les anomalies de structure équilibrées. Le développement d'une approche expérimentale permettant de renseigner sur les CNA, les anomalies de structure équilibrées et les mutations ponctuelles sont devenues possibles avec le séquençage à haut débit.

4. Séquençage à haut débit

Les méthodes de séquençage se basent généralement sur l'arrêt du processus de reproduction du brin matrice d'ADN dans un sens ou dans l'autre sens, en utilisant des di-désoxynucléotides (méthode de Sanger), des terminateurs réversibles ou des nucléotides naturels [Metzker, 2005]. La méthode automatisée de Sanger est considérée comme la technique de séquençage première génération ("*first generation sequencing*") et les nouvelles méthodes, utilisées depuis 2005, sont baptisées méthodes de 2^{ème} génération ou de nouvelle génération ("*next generation sequencing*", NGS). Ces nouvelles méthodes ont des stratégies différentes pour accomplir une combinaison de 3 processus : (1) préparation de la matrice, (2) séquençage et acquisition par un système d'imagerie et (3) alignement et assemblage du génome. Ces techniques de NGS produisent au moins une gigabase (1.10^9 bases) de séquence brute par expérience.

Les principaux systèmes commercialisés sont, Roche/454, Illumina/Solexa, et Life/APG. Ces systèmes partent directement de l'ADN à lire, sans clonage dans des bactéries ou des phages. La fragmentation mécanique, par sonication ou nébulisation, de l'ADN génère des fragments. La majorité des systèmes d'imagerie sont incapables de détecter un seul événement fluorescent, donc une amplification par PCR des fragments est requise. Une librairie de fragments est créée et une ligation d'adaptateurs contenant des amorces, *primers*, universelles est réalisée aux 2 extrémités de chaque cible permettant une amplification d'un génome complexe par PCR avec des amorces communes. Après ligation, l'ADN est séparé en simple brin et fixé sur une surface solide ou un support. L'immobilisation de fragments spatialement séparés permet la réalisation simultanée de milliers à des milliards de réactions de séquençage. L'étape suivante est importante : elle permet une amplification de chaque segment (environ un million de fois) tout en le gardant

séparé de tous les autres. Pour Roche/454 et Life/APG, ceci est réalisé grâce à l'attachement de chaque fragment à une bille microscopique (un seul par bille) puis à son amplification sur la bille, isolée dans une gouttelette d'une émulsion [Dressman et al., 2003]. Pour Illumina/Solexa, c'est la fixation des segments matrices sur une lame de verre suivie d'un système d'amplification locale qui en multiplie le nombre au voisinage immédiat du point d'attachement [Fedurco et al., 2006]. Cette étape a donc pour résultat un support sur lequel sont répartis des centaines de milliers de points, dont chacun contient un million d'exemplaires, *colonies* ("*polymerase colonies*"), d'un fragment d'ADN bien particulier.

Après cette étape d'amplification, ces millions de fragments peuvent être : immobilisés sur un gel de polyacrylamide sur une lame microscopique [Shendure et al., 2005], fixés chimiquement sur une lame de verre traitée, procédure utilisée par Life/APG, [Kim et al., 2007], ou déposés d'une manière individuelle dans des puits d'une plaque PTP ("*PicoTiterPlate*"), technique utilisée par Roche/454 [Leamon et al., 2003]. Ces échantillons sont alors prêts pour des réactions enzymatiques du séquençage proprement dit, s'apparentant au pyroséquençage pour 454, séquence par synthèse pour Illumina et à un séquençage par ligation pour *SOLID* ("*support oligonucleotide ligation detection*"). Dans tous les cas, la technique est adaptée de manière à lire une base in situ sur chacun des fragments, à acquérir l'image correspondante puis à passer à la base suivante.

De nouveaux séquenceurs lisant directement l'ADN sans passer par l'amplification en *colonies* sont disponibles c'est l'exemple d'Helicos BioSciences [Pushkarev et al., 2009]. Ce système détermine directement la séquence par synthèse sur des molécules isolées. D'autres plate-formes utilisent de nanopores à travers lesquels on fait passer la molécule d'ADN et les bases sont repérées au cours de leur passage grâce à leurs propriétés électriques [Branton et al., 2008]. comme le système Ion Torrent dont la deuxième version est annoncée pouvoir séquencer un génome humain pour 1000\$.

Au terme de ce séquençage, des lectures ("*reads*") de taille différente sont obtenues. La longueur de ces lectures est de : 330 bases pour Roche/454, 75 ou 100 bases pour Illumina/Solexa et 50 bases pour Life/APG. Une fois obtenues ces lectures sont : soit alignées sur le génome de référence soit assemblées [Chaisson et al., 2009 ; Pop and Salzberg, 2008 ; Trapnell and Salzberg, 2009].

Le choix d'une de ces plates-formes dépend de plusieurs paramètres, de la longueur de lecture, actuellement c'est Roche/454 et Ion Torrent qui offrent cette possibilité avec des sessions plus courtes (moins de 10 heures). L'exactitude est comparable mais l'assemblage des séquences obtenues est plus aisé. Les plates-formes proposent des protocoles dits extrémités appariées ("*paired ends*" et "*mate pairs*") autorisant la lecture de séquences dont on sait qu'elles sont éloignées d'une distance donnée dans l'ADN d'origine. Cette stratégie permet de caractériser les anomalies de structure du génome avec une résolution de l'ordre de la paire de bases [Welch et al., 2011] et permet de voir les remaniements détectés par la cytogénétique [Bernheim, 2011 ; Sanlaville, 2012]. Le choix dépend également de la « profondeur » du séquençage, c'est à dire le nombre de fois où un même nucléotide est séquencé, est grande. Ces plates-formes ont un large champ d'application. Elles sont adaptées à l'analyse de variants [Mills et al., 2011] d'une région ou d'un génome déjà connu : les petites lectures effectuées sont assemblées par comparaison avec la séquence de référence, et, moyennant une redondance suffisante, les différences éventuelles avec cette référence peuvent être déterminées rapidement avec une bonne fiabilité. Ainsi des haplotypes peuvent être mis en évidence. Le transcriptome d'une cellule, d'un tissu ou d'un organisme peut être aussi séquencé : *RNA-seq* [Wang et al., 2009]. Les marques épigénétiques et la structure de la chromatine peuvent être étudiés grâce à des méthodes basées sur le séquençage à haut débit, *Chip-seq* ("*chromatin Immunoprecipitation*"). De nombreuses variantes sont possibles : analyses de méthylations, *methyl-seq* et sensibilité à la DNase I, *DNase-seq* [Wold and Myers, 2008]. Grâce ces méthodes NGS le séquençage d'exons connus, exomes, est devenu possible [Ng et al., 2009, 2010].

Le séquençage de la totalité d'un génome tumoral peut également être réalisée [Ley et al., 2008]. Malgré l'extrême complexité révélée par l'analyse détaillée de nombreuses tumeurs [Bass et al., 2011; Pleasance et al., 2010] (**Figure 29**), le séquençage semble y trouver sa place aujourd'hui. Il ne s'agit plus de faire l'inventaire de toutes les altérations présentes dans l'ADN d'une cellule tumorale, mais de s'intéresser uniquement aux gènes dont l'implication au processus de carcinogenèse est connue. Une liste de 100 à 200 gènes est alors établie, l'ADN tumoral correspond est isolée et séquencé à une redondance élevée (100 fois par exemple] pour repérer les mutations acquises somatiques en les comparant au génome normal du malade.

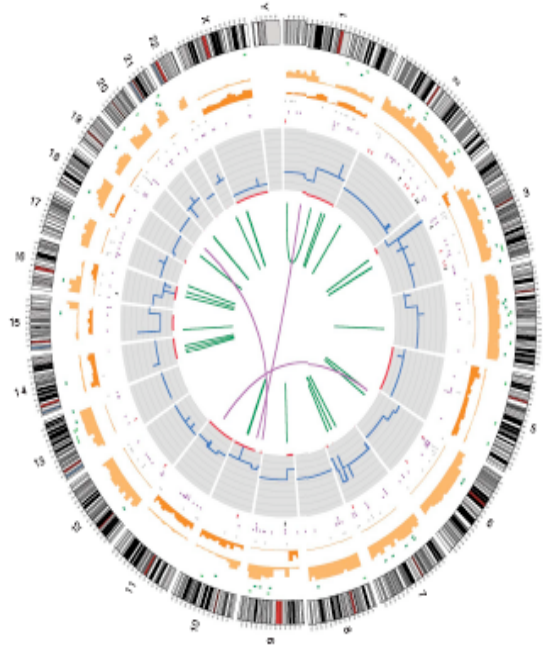


Figure 29 : Exemple de séquence d'une tumeur. D'après [Pleseance et al, 2010].

En conclusion, chacune des techniques décrites précédemment a ses avantages et inconvénients (**Tableau 4**). Leur application en clinique ou en recherche repose sur plusieurs paramètres. Le séquençage à haut débit, puisqu'il permet de renseigner sur les CNA, risque de remplacer l'aCGH à terme : Mais il reste quant même un problème à résoudre c'est les anomalies de structure équilibrées, où pour le moment le séquençage à haut débit ne permet de les détecter sans une orientation préalable. Cependant cette question sera résolue essentiellement par la bioinformatique, centrale dans le processus de séquence NGS et annotation détaillée du génome humain. La FISH et l'aCGH ont permis de faire le lien entre la cytogénétique conventionnelle et les techniques de biologie moléculaires. Ces dernières techniques ont également leur rôle dans le diagnostic des anomalies génomiques. Leurs champs d'application restent limités à certains marqueurs moléculaires bien connus et bien caractérisés. Ces techniques de biologie moléculaire sont très sensibles par rapport à la cytogénétique conventionnelle et moléculaire, elles sont capables de détecter une cellule maligne sur 10^5 à 10^6 . Elles sont donc indiquées pour : évaluer la réponse à une thérapie ciblée, le suivi de la maladie résiduelle et la détection précoce des rechutes de la maladie cancéreuse. Techniquement, ces approches moléculaires sont restreintes à quelques locus du génome humain à la différence des techniques de cytogénomique (caryotype, M-FISH et ACPA) qui offrent un examen pangénomique.

Caractéristiques	Techniques					
	Caryotype	FISH	M-FISH	SNP array	aCGH	NGS
Résolution	+	++	++	++++	++++	+++++
Sensibilité	+	+++	+	+	+	+
LOH	-	-	-	+	-	+
Détection de mutations	-	-	-	-	-	+
Nécessité de mise en culture	+	-	+	-	-	-
Détection des anomalies équilibres	+	+	+	-	-	+
Distinction de plusieurs clones	+	+	-	-	-	-

Tableau 4 : Comparaison des différentes méthodes d'étude de l'oncogénome. NGS : next generation sequence.

Notre travail de recherche a porté sur l'étude des altérations génomiques de la malignité dans les lymphomes de Burkitt et deux types de tumeurs solides, les carcinomes adénoïdes kystiques des glandes salivaires et les adénocarcinomes pulmonaire du non fumeur.

Partie 2 : Cytogénomique des lymphomes de Burkitt

Introduction

Environ 5% des cancers chez l'homme et plus de 70% des hémopathies malignes impliquent le système lymphoïde, avec une atteinte prédominante de la lignée lymphoïde B. Ce dernier groupe comprend : les proliférations immatures (leucémie lymphoblastique), les lymphoproliférations matures (lymphomes non Hodgkin, LNH) et le myélome multiple. Presque 95% des LNH sont d'origine B [Fisher et al., 2004].

Les lymphomes de Burkitt (LB) sont un sous groupe des LNH [Jaffe et al., 2008]. Décrit pour la première fois par Denis Burkitt en 1958, le LB se présente sous 3 formes épidémiologiques distinctes : la forme endémique représente la majeure partie des tumeurs pédiatriques dans l'Afrique tropicale et la nouvelle Guinée. La forme sporadique représente 1 à 2% des lymphomes de l'adulte en Europe et aux Etats-Unis. Enfin il existe une forme associée à l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Le LB est un modèle de tumeurs associées à un virus. En effet, dans sa forme endémique le LB est associée à l'infection par le virus d'Epstein-Barr (EBV), puisque 98% des ces tumeurs sont porteuses du génome viral. En revanche, 5 à 10% des tumeurs sporadiques sont positives pour l'EBV. La forme associée au VIH présente un taux intermédiaire, 30-40%, d'infection par l'EBV [Bornkamm, 2009].

Le trait commun tous les variants de LB est la dérégulation de l'expression de MYC. En 1982, il a été démontré que dans les cellules de LB le locus MYC est juxtaposée au gène des chaînes lourdes de immunoglobulines (IGH), sur le 14q32 ou moins fréquemment au gène des chaînes légères de type κ en 2p12 (IG κ) ou de type λ en 22q11 (IG λ).

Le rôle potentiellement oncogène de la dérégulation de MYC a été démontré dans les cellules hématopoïétiques au milieu des années 80. Les souris transgéniques exprimant MYC sous le contrôle d'un enhancer d'IG développent des lymphomes B après une période de latence de 4-6 mois [Adams et al, 1985]. Cet événement est nécessaire pour expliquer la survenue d'un LB mais il n'est pas suffisant. En effet, la pathogénie du LB est loin d'être élucidé, puisque la présence d'anomalies chromosomiques additionnelles dans les caryotypes des LB constitue un facteur de mauvais pronostic dans l'évolution de cette maladie. Ces remaniements surviennent dans 70% des cas de LB pédiatrique et sont détectés par la cytogénétique conventionnelle [Heerema et al., 2005]. Cette dernière joue un rôle fondamental dans le diagnostic et le suivi du LB, néanmoins elle offre une résolution spatiale relativement faible. Comme ces aberrations sont dans la majorité des cas déséquilibrées, elles se prêtent bien à une analyse par la CGH array. Nous avons entrepris

l'étude de 12 tumeurs primaires et 15 lignées cellulaires de lymphome de Burkitt (LB) par CGH array pan-génomique de 44K et 244K respectivement.

I. Hématopoïèse et différenciation lymphoïde B physiologique

1. Hématopoïèse

L'hématopoïèse est le processus de formation de toutes les cellules sanguines à partir de la cellule souche hématopoïétique (CSH). Chez l'homme, elle se déroule dans le foie pendant la vie fœtale, puis dans la moelle osseuse après la naissance.

Elle se fait selon un modèle hiérarchique où progressivement la CSH perd ses capacités d'autorenouvellement et de pluripotence, s'engage alors graduellement dans la différenciation en donnant des progéniteurs hématopoïétiques multipotents (MPP). Ces MPP ayant un potentiel de différenciation restreint, donnent naissance à deux progéniteurs oligopotents, un progéniteur lymphoïde commun (CLP) et un progéniteur myéloïde commun (CMP) [Chao et al., 2008]. A leur tour, les CMP et CLP donnent naissance aux cellules effectrices du sang.

Il existe plusieurs schémas d'hématopoïèse (**Figure 30**). Ces modèles basés sur des études expérimentales *in vivo* et *in vitro*, laissent suggérer qu'un même progéniteur hématopoïétique peut incarner plusieurs potentialités de différenciation. [Ceredig et al., 2009; Dulatov et al., 2010].

1.1. Cellule souche hématopoïétique

Le concept de la CSH, a été proposé par Till et McCulloch [1961]. Les cellules hématopoïétiques injectées à des souris irradiées génèrent des colonies spléniques. La CSH murine se définit : KIT+Lin- (absence de marqueur de surface des lignées engagées) SCA1+ ("*Stem-Cell Antigen*"), appelée ainsi fraction KLS [Kondo, 2010]. Chez l'homme, la CSH est : Lin-CD34+CD38- [Dulatov et al., 2010]. Selon qu'elles ont une capacité d'auto renouvellement de longue durée ou au contraire limitée dans le temps le compartiment KLS, dans des conditions d'homéostasie, se subdivise : en long-term (LT)-HSCs et short-term (ST)-HSCs respectivement [Kondo, 2010].

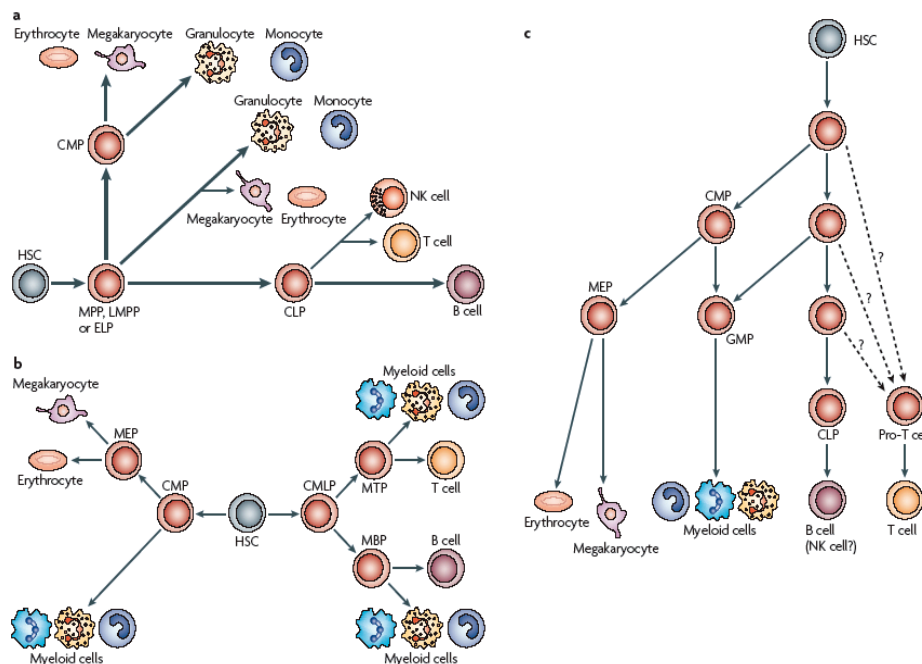


Figure 30 : Les différents modèles de l'hématopoïèse

HSC : cellule souche hématopoïétique; MMP: progéniteur multipotent; LMPP: progéniteur multipotent prolymphoïde; CLP: progéniteur lymphoïde commun; CMP : progéniteur myéloïde commun; ELP: progéniteur lymphoïde précoce; GMP: progéniteur granulo-macrophagique; MBP: progéniteur myéloïde-lymphoïde B; MEP: progéniteur myéloïde-érythroïde; MTP: progéniteur myéloïde-lymphoïde T; NK cell : cellule natural killer. D'après [Ceredig et al., 2009].

1.2. Régulation de l'hématopoïèse

a. Micro environnement médullaire

Le micro environnement médullaire, historiquement appelé niche hématopoïétique, est une structure tridimensionnelle qui héberge et régule, au moins en partie, l'auto renouvellement et la différenciation de la CSH [Wilson et al., 2007]. Bien que cela ne soit pas clairement établi, les études suggèrent que les CSH résident dans 2 types de compartiments médullaires [Wilson et al., 2007; Kondo, 2010] (**Figure 31**).

Le premier: c'est l'endoste, ou niche endostale, qui correspond à la face interne des espaces inter trabéculaires de l'os compact. Il comprend des ostéoblastes spécialisés, des ostéoclastes et des fibroblastes. Il contient également des cellules réticulaires qui constitutivement sécrètent des cytokines telle la chémokine CXCL12 (cellules CAR), laquelle protéine a un rôle dans la mobilisation et le *homing* des CSH. Dans cette niche, les CSH sont en contact étroit avec les ostéoblastes qui ont un rôle crucial dans l'auto renouvellement des CSH. En effet, une activation du récepteur de la Parathormone exprimé à la surface des ostéoblastes induit une augmentation du nombre des CSH *via* la voie Notch [Calvi et al., 2003; Adams, et al., 2007].

Le second, c'est le sinusoïde central qui est un capillaire fenêtré, niche vasculaire, où les CSH jouxtent les cellules CAR qui sont adjacentes aux sinusoïdes médullaires [Wilson et al., 2007].

Il est probable que la niche endostale soit le compartiment des CSH quiescentes Lin-Sca1+Kit+CD34-, tandis que la niche vasculaire abrite les CSH activées CD34+ [Wilson et al., 2007].

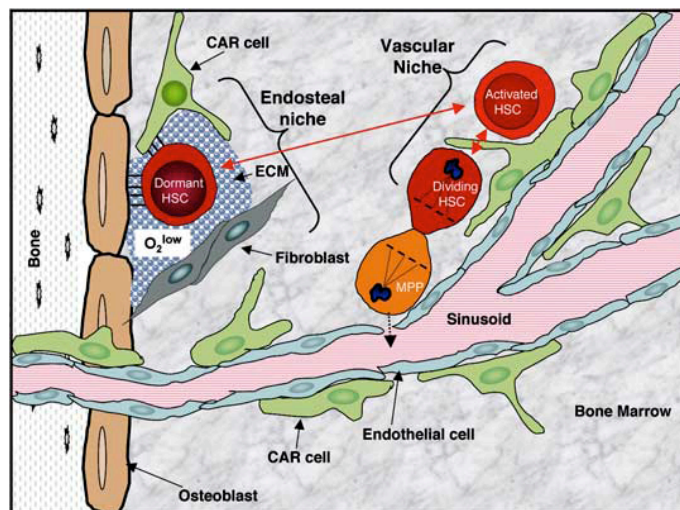


Figure 31 : Modèles des niches hématopoïétiques. Les CSH quiescentes (« dormantes ») sont au contact étroit avec les ostéoblastes qui forment en partie la niche l'endostale. Les CSH activées (en division) jouxtent les cellules CAR (CXC12-abundant reticular) qui sont adjacentes aux sinusoïdes médullaires. Ces CSH activées donnent les MPP et les autres progéniteurs. ECM: matrice extracellulaire. D'après [Wilson et al., 2007].

b. Facteurs de croissance et cytokines

Ces molécules: sont les déterminants extrinsèques de l'hématopoïèse. Les facteurs de croissance comprennent les facteurs stimulant la formation de colonies ou «Colony Stimulatin Factor» (CSF) et les cytokines qui regroupent les interleukines (IL), les interférons (IFN), les chémokines et les hormones (thrombopoïétine, érythropoïétine). Ces molécules agissent par l'intermédiaire de récepteurs membranaires qui peuvent avoir ou non une activité tyrosine kinase intrinsèque. Les récepteurs à activité tyrosine kinase sont classés en 20 classes définis par la structure de leur domaines extra-cellulaire impliqués dans la reconnaissance du ligand. Plusieurs de ces récepteurs, dont ceux de classe III (FLT3, KIT, PDGFR A et B) sont associés à des hémopathies malignes. La famille des récepteurs des cytokines sont des protéines membranaires. Leur domaine cytoplasmique dépourvu d'une activité catalytique, s'associe à des kinases comme les protéines kinases Janus (JAKs)

[Vainchenker et al., 2008]. Quel que soit le type de récepteur, l'association du domaine extracellulaire du récepteur à son ligand induit une phosphorylation des protéines JAKs. L'étape ultime de cette induction est l'activation des gènes intervenant dans la survie, la prolifération et la différenciation des cellules hématopoïétiques.

c. Facteurs de transcription

Ces facteurs de transcription sont les déterminants intrinsèques du phénotype cellulaire du système hématopoïétique [Orkin, 2000]. Ils interviennent, tôt au cours de l'embryogenèse, dans la formation de la CSH, et dans l'hématopoïèse au cours de la vie fœtale et à l'âge adulte. Leur mode d'action s'opère dans des complexes protéiques et interagissant avec la chromatine [Orkin and Zon, 2008]. Au cours de la différenciation des lignées hématopoïétiques, ces facteurs de transcription (**Figure 32**) agissent à des concentrations finement régulées et à des phases bien précises du cycle cellulaire.

Parmi les facteurs de transcription qui interviennent dans la formation ou la fonction des CSH, il y a MLL ("*Mixed Lineage-Leukemia*"), RUNX1, TEL/ETV6, SCL/tal1 et LMO2 [Orkin and Zon 2008]. Ces facteurs ne sont pas restreints aux CSH, mais interviennent ultérieurement dans l'hématopoïèse. Le profil d'expression de certains facteurs de transcription semble être restreint à certaines lignées hématopoïétiques. Ainsi, une sur-expression du facteur GATA-1 est observée dans le progéniteur mégacaryocyte-érythrocyte [Kim and Bresnick, 2007], en revanche, la protéine C/EBP α , facteur myéloïde, est détectée dans le progéniteur granulocyte-myéloïde [Dahl et al., 2003]. Cette corrélation entre le phénotype du progéniteur et le profil d'expression des facteurs de transcription s'estompe dans les stades les plus précoces de l'hématopoïèse. Ainsi, les MPP, voire même la CSH expriment, quoique à des taux faibles, des marqueurs de lignées différentes. Ce phénomène est appelé l'amorçage de lignage [Orkin, 2003]. Ce processus apparaît comme un outil efficace permettant à la chromatine de se maintenir dans une configuration permissive à l'engagement dans une voie de différenciation donnée. La répression transitoire des autres voies alternatives de différenciation, suivie d'une extinction permanente, permet de préserver la plasticité inhérente du progéniteur multipotent [Orkin and Zon, 2008]. Ce processus d'amorçage de lignage suggère que le destin de ces progéniteurs immatures n'est pas d'emblée scellé et que l'engagement d'une lignée dans une voie de différenciation donnée apparaît comme un processus dynamique au cours duquel les autres voies alternatives de différenciation sont éteintes plutôt qu'un processus dans lequel un nouveau programme est imposé à une cellule «inerte».

Les mécanismes d'action des principaux facteurs de transcription sont contexte dépendant [Orkin, 2000]. Les facteurs clés, pour la différenciation d'une lignée donnée, sont dotés d'une activité complémentaire qui va dans le sens de promouvoir la différenciation de leur propre lignée, et simultanément vont agir à l'encontre des autres facteurs favorisant la différenciation des autres voies [Orkin and Zon, 2008]. Par exemple, GATA-1 et PU.1, semblent être des facteurs clés dans la différenciation des progéniteurs mégacaryocyte-erythrocyte et myéloïde respectivement. Ces 2 protéines ont des actions antagonistes. En effet, *in vivo* l'inhibition d'expression de GATA-1 oriente la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques vers la lignée myéloïde et le phénomène inverse s'observe lorsqu'on inhibe l'expression de PU.1 [Rhodes et al., 2005].

Ces facteurs de transcription interagissent physiquement en formant des complexes protéiques. Cet ensemble de facteurs forme un réseau synchronisé qui agit selon un axe temporel et dans un contexte bien déterminé. La leucémie apparaît comme la conséquence d'un dysfonctionnement des points vulnérables de ce réseau protéique plutôt que d'une activité non spécifique de ces protéines [Orkin and Zon, 2008].

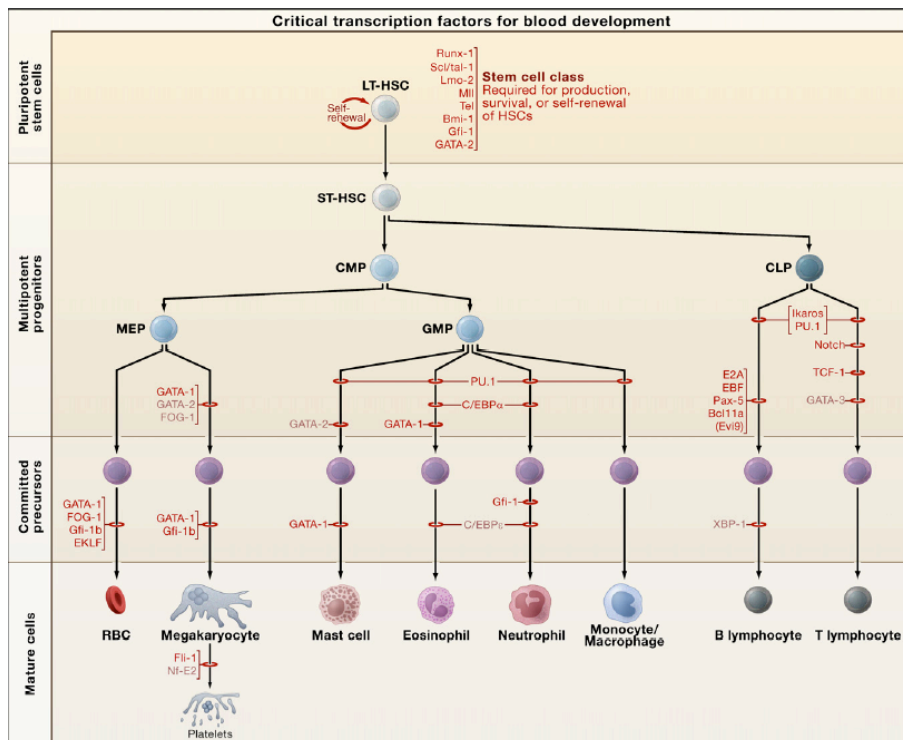


Figure 32 : Principaux facteurs de transcription impliqués dans le contrôle de l'hématopoïèse. LT-HSC long term hematopoietic stem cell; ST-HSC short term stem cell; CMP common myeloid progenitor; CLP common lymphoid progenitor; MEP megakaryocyte erythroid progenitor; GMP granulocyte macrophage progenitor; RBC red blood cell. D'après [Orkin and Zon, 2008].

d. microRNAs et hématopoïèse

Plusieurs travaux expérimentaux ont mis en évidence le rôle des miRNA au cours de l'hématopoïèse [Chen et al., 2004 ; Havelange and Garzon, 2010; Vasilatou et al., 2009]. Les délétions du gène codant pour le *Dicer* chez la souris sont à l'origine d'un décès précoce au stade embryonnaire associé à un déficit en cellules souches multipotentes [Bernstein et al., 2003]. La délétion du gène *Dicer* au cours des stades précoces du développement des lymphocytes B entraîne un blocage de maturation au stade pro-B de ces cellules et une altération du répertoire des anticorps [Koralov et al., 2008].

Des études expérimentales réalisées chez la souris et l'homme ont montré que certains miRNA présentent une expression différentielle selon le type de tissu hématopoïétique. Par exemple, chez la souris, une sur-expression de mir-181 est retrouvée dans les lymphocytes B matures et le thymus, par contre, les progéniteurs indifférenciés présentent un taux faible de ce miR [Chen and Lodish, 2005]. Pour un même miRNA, le niveau d'expression est variable selon le stade de différenciation d'un progéniteur. Ainsi, une sur-expression de miR-17-92 est retrouvée dans les précurseurs des lymphocytes B et T, en revanche, passé le stade de maturation, ce miR est faiblement transcrit [Havelange and Garzon, 2010]. Au cours de l'hématopoïèse, la délétion du miR-17-92 induit un arrêt de développement des lymphocytes B au stade pro-B. Ce blocage de maturation est secondaire à une sur-expression du facteur de transcription pro-apoptotique Bim [Ventura et al., 2008]. Le miR-150 est essentiellement exprimé dans les tissus lymphoïdes. Les souris déficientes pour miR-150 présente une expansion du répertoire des lymphocytes B1 [Xiao et al., 2007]. Cet effet est du au moins en parti à une surexpression de MYB qui est une cible de miR-150. Il en découle que les miRNA ont un rôle crucial qui s'exerce tout au long de l'hématopoïèse (**Figure 33**). Cette fonction passe, au moins en partie, par la régulation de l'expression des gènes cibles. L'altération de ce mécanisme de contrôle se traduit par la survenue d'hémopathies malignes [Garzon et al., 2009 ; Yendamuri and Calin 2009].

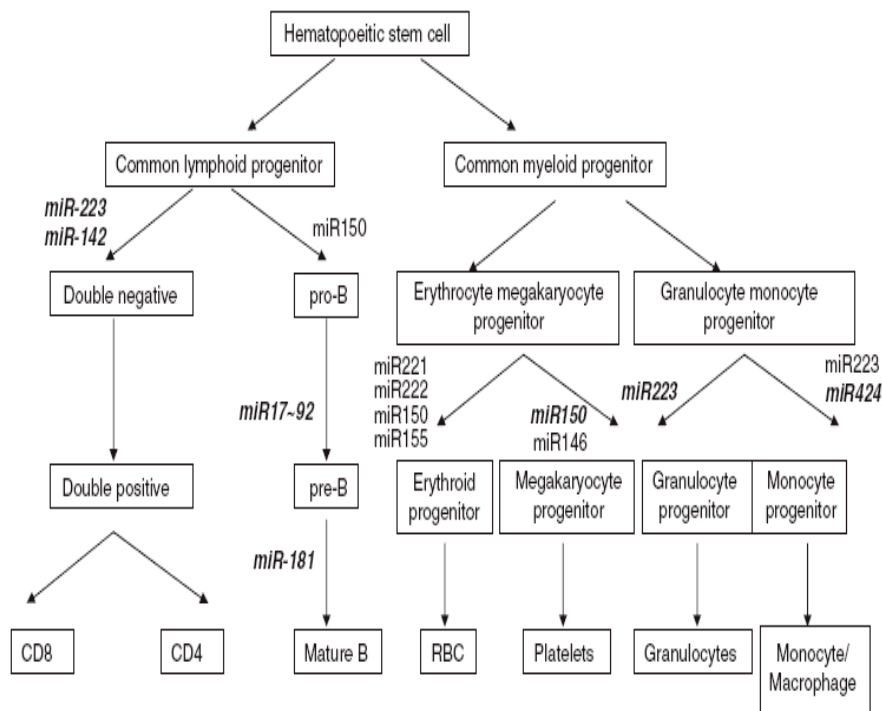


Figure 33 : Régulation de l'hématopoïèse par les miRNA.
 Les miR en gras et italique stimulent la différenciation, et tous autres miR inhibent la maturation. D'après [Yendamuri and ca] 2009].

2. Lymphopoïèse B

Il s'agit d'un processus continu qui a pour finalité la production de lymphocytes B, élément clé de l'immunité adaptative. Sous l'impulsion de stimulus extrinsèques [Nutt and Kee, 2007], les progéniteurs hématopoïétiques vont subir une cascade de différenciation coordonnée par un réseau harmonieux de facteurs de transcription et de régulateurs épigénétiques [Mathias and Rolink, 2005; Zandi et al., 2010]. L'objectif ultime de cette différenciation est la production de lymphocytes B présentant une *IG* fonctionnelle capable, non seulement de distinguer le soi du non soi, mais aussi de reconnaître un antigène spécifique.

Cette lymphopoïèse B se déroule dans 2 compartiments : la moelle osseuse et les organes lymphoïdes secondaires (exemple : amygdale, ganglions et rate). La lymphopoïèse médullaire est antigène-indépendante, alors que la lymphopoïèse B périphérique est antigène-dépendante. Dans la moelle osseuse, les gènes des *IG* subissent la recombinaison somatique V(D)J, et l'hypermutation somatique et la commutation de classe en périphérie.

2.1. Lymphopoïèse B médullaire

Chez l'adulte la CSH va se différencier progressivement pour donner les progéniteurs multipotents ("*multipotent progenitor*", MPP). Ces derniers sont caractérisés par la perte de la capacité d'auto renouvellement et l'acquisition de l'expression de la tyrosine kinase FLT3 [Adolfsson et al., 2005]. A son tour, le MMP génère les progéniteurs lymphoïdes multipotents ("*early lymphoid progenitor cells*", ELP) L'amorçage du développement vers la lignée lymphoïde va se faire d'une manière graduelle et incrimine un réseau de facteurs de transcription [Zandi et al., 2010]. L'action synergique des protéines Pu.1 ("*Purine box factor 1*") et Ikaros, induisent l'expression des composants de la voie de signalisation impliquant l'IL-7 et Flt3 qui sont nécessaires pour la genèse des cellules pro-B [Dekoter et al., 2002; Yoshida et al., 2006]. Les progéniteurs ELP n'expriment pas le récepteur α à l'IL7, mais ils progressent pour donner naissance aux progéniteurs lymphoïdes communs ("*common lymphoid progenitor*", CLP), lesquels sur-expriment l'IL-7R α [Hardy et al., 2007]. Cette signalisation agit en concert avec des facteurs de transcription [Zandi et al., 2010]. La genèse des premiers progéniteurs B repose sur les protéines E2A et EBF1 qui agissent d'une manière coordonnée pour activer, d'une part la transcription des gènes spécifiques de la lignée B, et d'autre part le réarrangement des chaînes lourdes des *IG* [Lin and Grosschedl, 1995]. A son tour, la protéine EBF1 active Pax5 qui a un rôle essentiel dans la différenciation terminale et le maintien de l'identité normale de la lignée B [Cobaleda et al., 2007]. La survie et la prolifération des précurseurs pro-B sont contrôlées par les 2 facteurs de transcription LEF1 et SOX4 [Reya et al., 2000; Schilham et al., 1996]. Enfin IRF4 et IRF8 semblent promouvoir le réarrangement des gènes des chaînes légères [Lu et al., 2003].

Au stade des ELP, il y a une initiation d'expression des gènes *RAG1* et *RAG2* [Igarashi et al., 2002]. A partir du compartiment des CLP, une population de cellules: pré-pro-B, nommée fraction A, va exprimer des marqueurs de surface de type B: CD45R (B220) et CD43 [Li et al., 1996]. Ces derniers vont se différencier pour donner les cellules pro-B ou fraction B qui expriment le CD19, traduisant l'engagement vers la lignée B, et débutent le réarrangement des segments D_H-J_H [Hardy et al., 1991; Li et al., 1996] (**Figure 34**). Au stade des grandes cellules pré-BII, une recombinaison productive V_H-D_{JH} se traduit par l'expression d'une I μ membranaire qui avec les chaînes légères VpreB et λ 5 et les molécules I α et I β constituent le récepteur pré-B de surface ("*B cell receptor*", pré-BCR).

A ce stade les cellules cessent d'exprimer les gènes *RAG1* et *RAG2*. Une signalisation *via* le pré-BCR va promouvoir un arrêt de la recombinaison au locus homologue et une exclusion allélique, stimuler l'expansion cellulaire et induire la différenciation des cellules vers le stade petite cellule pré-B II. A ce stade les cellules réexpriment de nouveau les gènes *RAG1* et *RAG2* et débutent le réarrangement des gènes des chaînes légères (IGL) [Meffre et al., 2000]. Le réarrangement des gènes IGL débute au niveau du locus IG κ . Si le réarrangement des gènes IG κ n'est pas fonctionnel, les gènes IG λ se réarrangent. De la transcription des gènes IG λ fonctionnellement réarrangés en présence des transcrits pour les gènes IGH résultera l'expression, à la surface de la membrane cellulaire, de molécules IGH/ λ .

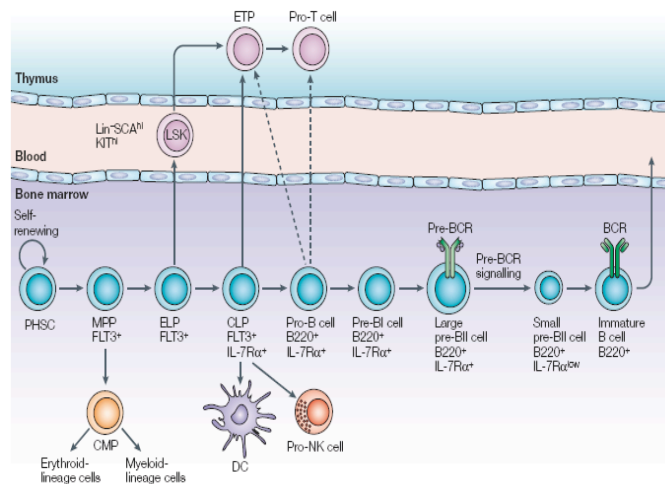


Figure 34 : Lymphopoïèse B médullaire. Les étapes de la lymphopoïèse sont représentées sur ce schéma. Les flèches en pointillé indiquent des voies non encore établies. Légende: PHSC : pluripotent hematopoietic stem cell; MMP: multipotent progenitor; ELP early lymphoid progenitor; CLP: common lymphoid progenitor; DC: dendritic cell; ETP early T cell progenitor. D'après [Mathias and Rolink, 2005].

Les B immatures exprimant un BCR fonctionnel à leur surface vont subir l'épreuve de l'autoréactivité. Les B autoréactifs peuvent être soit récupérés grâce un second réarrangement V(D)J des gènes IG, c'est *l'editing* de récepteur [Küppers et al., 1999 ; Nussenzweig, 1998], soit éliminés ou inactivés par apoptose ou anergie respectivement. Les B immatures présentant une IgM et IgD à leur surface et sélectionnés positivement vont quitter la moelle osseuse et passer dans le sang périphérique.

2.2. Lymphopoïèse B périphérique

Les B naïfs circulants IgM+,IgD+ sont de petits lymphocytes souvent CD5+ vont passer dans les organes lymphoïdes secondaires où ils se différencient tout le long d'un processus multiétapes. Ils peuvent éventuellement devenir des lymphocytes B matures, lesquels sont répertoriés en 2 catégories : les B folliculaires et les B de la zone marginale (ZM) [Matthias and Rolink, 2005]. Ces 2 types de cellules ont des sites anatomiques différents et des propriétés distinctes (**Figure 35**).

a. B folliculaires

Les B folliculaires, une fois devenus matures et atteignent la capacité de circuler dans la rate (et la moelle osseuse elle même), migrent d'une manière répétée à travers le sang et les zones B-dépendante des ganglions, des plaques de Peyer et la pulpe blanche de la rate. Ces sites anatomiques représentent le siège de prédilection de la réponse immunitaire T-dépendante. Au cours de cette réponse , le centre germinatif (CG) est formé par la prolifération de lymphocytes B dans les follicules de ces structures lymphoïdes périphériques. Les B naïfs gagnent tout d'abord des aires riches en lymphocytes T (zones T) des tissus lymphoïdes guidés par la surexpression de récepteurs de chémokines spécifiques présentés par les cellules dendritiques en réponse à la rencontre de l'antigène. Dans ces zones T, les lymphocytes s'activent en réponse à leur interaction avec les lymphocytes T CD4+ et les cellules présentatrices d'antigènes [Maclennan, 1994]. L'initiation de la formation du CG nécessite l'interaction des CD40 et CD154 exprimés par les lymphocytes B et T CD4+ respectivement. Les B ainsi activés peuvent suivre différentes voies. Certains migrent dans des zones extrafolliculaires où ils vont proliférer et se différencier en plasmocytes sécréteurs d'anticorps à durée vie limitée. D'autres donnent des B précurseurs du CG qui gagnent les follicules primaires. Ces structures formées par des B IgM+IgD+ sont logées entre les mailles d'un réseau formé par les prolongements des cellules folliculaires dendritiques (CFD). A ce niveau, les B commencent à proliférer rapidement et refoulent les B IgM+IgD+ en périphérie pour former la zone du manteau (**Figure 35**) autour du CG, produisant ainsi le follicule secondaire.

Au décours de quelques jours d'une prolifération vigoureuse l'architecture du CG devient apparente: une zone sombre constituée exclusivement de lymphocytes B en prolifération étroitement agglomérés, appelés centroblastes, et une zone claire formée de petites cellules B non proliférant, centrocytes, logées entre les mailles du réseau formé par les CFD, lymphocytes T et macrophages. Les centroblastes vont diversifier les gènes IGV des chaînes légère et lourde par l'hypermutation somatique ("*Somatic Hypermutation*", SHM) et les cellules exprimant un nouveau récepteur ayant une haute affinité pour un antigène spécifique seront sélectionnées et passeront dans la zone claire. Certains centrocytes se différencient éventuellement pour donner des B mémoires ou des plasmocytes. Le CG atteint sa taille maximale au bout de 2 semaines, puis il régresse lentement pour disparaître au bout de quelques semaines.

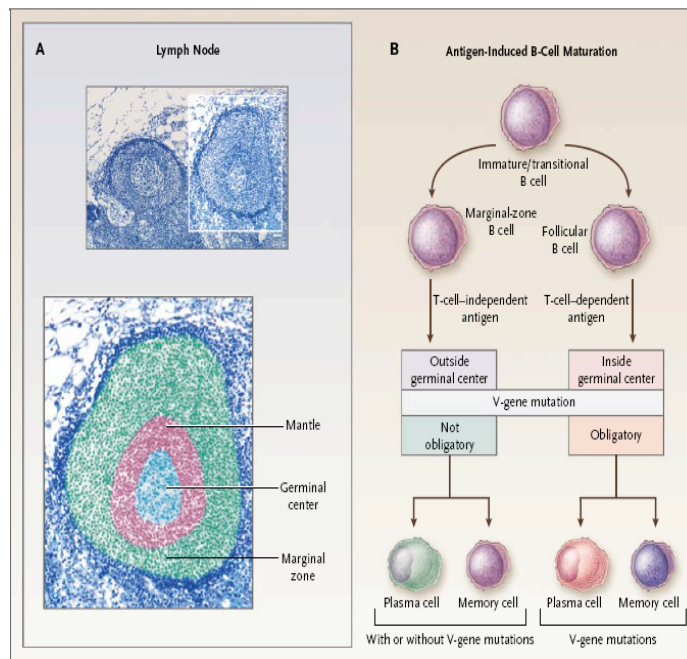


Figure 35 : Lymphopoïèse B périphérique. Cette phase de développement des cellules B se fait dans les organes lymphoïdes secondaires. **A** la formation d'un follicule lymphoïde secondaire est synonyme du centre germinatif qui est entouré par la zone du manteau qui se trouve au contact de la zone marginale. **B** Dans le centre germinatif les gènes IGV subissent l'hypermutation somatique, alors que dans la zone marginale ce processus n'est pas obligatoire. D'après [Ghiorazzi et al., 2005].

Cellules B et zone sombre du CG

Les centroblastes ont un taux de multiplication extrêmement rapide ; leur cycle cellulaire varie de 6 à 12 heures [Maclennan, 1994 ; Allen et al., 2007]. Ce taux de multiplication élevé est requis pour la genèse, dans un intervalle de temps très court, d'un répertoire large d'IG modifiés à partir duquel seront sélectionnés quelques lymphocytes B ayant un BCR hautement spécifique d'un antigène donnée. En effet, le profil d'expression a permis de démontrer que la différenciation d'un lymphocyte B activé en un centroblaste s'accompagne d'une surexpression des gènes inducteurs de prolifération cellulaire et d'une répression des gènes qui inhibent la multiplication cellulaire comme *P21* [Klein et al., 2003 ; Shaffer et al., 2001]. En revanche, la physiologie d'un centroblaste diffère remarquablement des autres cellules en division de l'organisme. Notamment, la détection et la réparation des dommages de l'ADN sont spécifiquement supprimées dans les centroblastes [Phan and Dalla-Favera, 2004]. De plus, les centroblastes expriment la télomérase [Hu et al., 1997], ainsi l'expansion clonale vigoureuse des précurseurs B du CG ne doit pas aboutir à une perte du potentiel réplicatif qui peut être la conséquence directe d'un raccourcissement des télomères.

Le programme transcriptionnel spécifique des centroblastes est encore mal connu. La délétion/ mutation germinale de facteurs de transcription peuvent compromettre le développement du CG. Le gène *BCL6* semble jouer un rôle clé dans le développement des centroblastes (pour revue [Basso and Dalla-Favera, 2010]).

Cellules B et zone claire du CG

La zone claire du CG est le siège de 3 processus de la lymphopoïèse B : sélection des B produisant des anticorps de grande affinité, processus de commutation de classe ("*Class-Switch Recombination*", CSR) et l'initiation de la différenciation des centrocytes en plasmocytes ou B mémoires. Comparés aux centroblastes, les centrocytes sont très hétérogènes, ceci est peut être lié au fait que ces cellules vont subir plusieurs voies de développement. Les centrocytes peuvent retourner en arrière et donner des centroblastes, ou se différencier en B post-CG, c'est à dire B mémoires ou en plasmocytes. Les études moléculaires de la réponse immune T-dépendante ont révélé l'impact des mécanismes de sélection dans le CG dans la genèse des anticorps de grande affinité [Blink et al., 2005 ; Shih et al., 2002]. Un centroblaste exprimant un nouveau BCR doit subir l'épreuve de

reconnaissance et de fixation de l'antigène. Il semble que cette épreuve se déroule dans la zone claire du CG et soit assurée par des cellules spécifiques hébergées par ce site. La fixation de l'antigène par le BCR couplée à la co-stimulation d'autres récepteurs B par les T du CG fournit des signaux de survie à la cellule B. A l'inverse, l'absence de reconnaissance de l'antigène par le BCR induit un signal d'apoptose de la cellule B. En effet, la présence de macrophages qui ont phagocytés un grand nombre de précurseur B du CG qui étaient récemment en cycle (aspect de corps "tingible") suggère que la plupart meurent durant cette étape de sélection. Il a été suggéré que la différenciation des B du CG en plasmocytes est menée par l'acquisition d'un BCR ayant une grande affinité [Phan et al., 2006]. Pour les B mémoires, leur processus de différenciation semble être stochastique [Blink et al., 2005].

b. B de la zone marginale

La majeure partie de ces cellules B siègent dans la zone marginale (ZM) de la rate. Chez l'homme la ZM splénique est une niche unique où des cellules B résident et déclenchent une réponse immunitaire T-indépendante. Dans ce compartiment, le programme de maturation des lymphocytes et le réarrangement des gènes des IG sont différents de ceux du CG (pour revue [Weill et al., 2009]).

2.3. réarrangement somatique et mutations des gènes des immunoglobulines

Une protéine d'IG est formée par 2 chaînes lourdes : IGH, codées par un locus localisé en 14q32, et 2 chaînes légères IGL qui peuvent être soit de type IG κ (2p12), soit de type de IG λ (22q11) (**Figure 36**). Le locus *IGH* est composé de plusieurs régions: V (variable), J (jonction), D (diversité) et C (constante). Le locus *IGL* est formé de plusieurs segments : V, J et C (**Figure 36**). Les lymphocytes B utilisent plusieurs formes d'instabilité génomique physiologique dans l'optique de former un large répertoire diversifié d'IG. La recombinaison somatique V(D)J permet l'assemblage des segments des gènes V (**Figure 36**) des locus d'IG au cours du développement lymphoïde et de la réponse immune. Les locus d'IG également subissent la commutation de classe isotypique et l'hypermutation somatique en réponse à une stimulation antigénique.

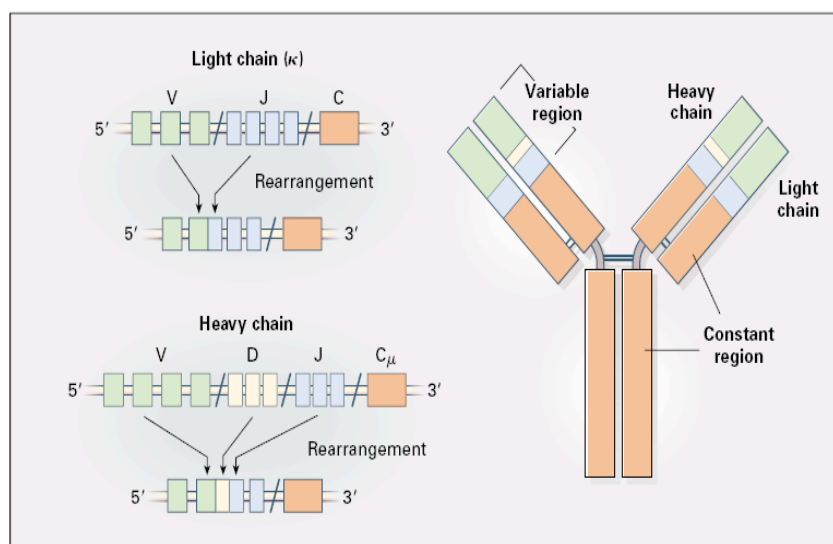


Figure 36 : Organisation des gènes des immunoglobulines. Une IG est formée par 2 chaînes lourdes (IGH) et 2 chaînes légères (IGL). Le locus *IGH* est formé par plusieurs segments géniques V (variable), D (diversité) J (jonction) et C (constante). Le locus *IGL* est organisé de la même façon que le gène *IGH* à l'exception des segments D qui sont absents des locus *IGL*. D'après [Küppers et al., 1999].

a. Recombinaison somatique V(D)J

Ce processus se déroule au cours de la lymphopoïèse B médullaire. Sur le plan moléculaire la recombinaison V(D)J implique une cassure d'ADN double brin initiée par les enzymes RAG1 et RAG2 et résolue par ligature des extrémités non homologues ("*non-homologous end-joining*", NHEJ) [Gellert, 2002].

Dans la moelle osseuse, au cours de leur développement les précurseurs B vont former à partir d'un groupe d'exons intacts la partie V des IG en recombinant des segments individuels de gènes. Pour le locus IGH, la partie variable résulte de l'assemblage des exons des segments de gènes V, D et J, alors que la partie variable des locus IGκ et IGλ est composée des exons V et J [Gellert, 2002 ; Rajewsky, 1996] (**Figure 36**). Ces réarrangements géniques se déroulent d'une manière séquentielle selon un processus appelé la recombinaison V(D)J (**Figure 37**). Tout d'abord, un segment D_H est assemblé avec un segment J_H. Ensuite un segment V_H est ajouté à la combinaison D_HJ_H. Cette recombinaison V(D)J peut aboutir soit un cadre de lecture ouvert avec synthèse de la chaîne V, et la cellule peut alors amorcer le réarrangement de la partie V du locus IGL, soit donner un réarrangement non fonctionnel. Dans ce dernier cas, un 2^{ème} réarrangement V(D)J est tenté sur l'allèle homologue d'IGH.

La recombinaison V(D)J est initiée par 2 endonucléases spécifiquement exprimés dans les lymphocytes RAG1 et RAG2 [Matthews and Oettinger, 2009 ; Zhang et al., 2011]. Ce complexe enzymatique va couper au niveau d'une séquence signal spécifique de recombinaison (RSS) qui flanque les séquences codantes des segments de gènes V, D et J [Lieber and Raghavan, 2006] (**Figure 37**). Chaque RSS est composée de 2 séquences conservées heptamères nonamères séparées par un intercaler de 12 ou 23 bp. RAG1 et RAG2 coupent d'une manière précise entre la séquence RSS et une séquence codante de 2 segments géniques réarrangés, générant 2 bouts en "épingle à cheveux" au niveau de la séquence codante (extrémité codante) et une extrémité franche au niveau RSS (séquence signale) (**Figure 37**). Les extrémités franches des 2 séquences RSS seront jointes, libérant ainsi la séquence interposée entre 2 segments géniques réarrangés sous forme d'ADN circulaire. La structure en "épingle à cheveux" des extrémités codantes sera reouverte, par une nucléase artemis, et les 2 bouts seront joints. A cours de cette réaction, des nucléotides peuvent être supprimés des extrémités codantes par une digestion exonucléotidique et des nucléotides ("*N sequences*") peuvent être rajoutés, d'une manière aléatoire, à ces extrémités par une déoxynucléotidyl terminale transférase ("*terminal nucleotidyltransferase*", TdT), augmentant ainsi la diversité des segments géniques V. Cette phase de réaction est catalysée par, en plus des protéines RAG, des enzymes impliquées dans la réparation des cassures d'ADN double brin par NHEJ, comprenant DNA-PK (formée par une sous unité catalytique associée aux protéines Ku70 et Ku80), l'ADN ligase IV, XRCC4 et XLF [Lieber and Raghavan, 2006].

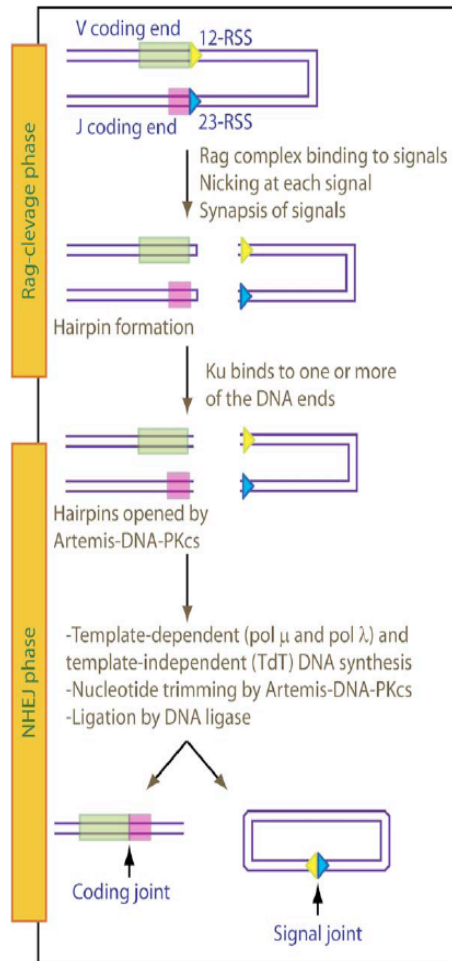


Figure 37 : Étapes de la recombinaison V(D)J. Les enzymes RAG1/2 coupent au niveau des séquences RSS. Les cassures doubles brin d'ADN ainsi générées sont résolues par le système de réparation ligature des extrémités non homologues NHEJ. D'après [Lieber and Raghavan, 2006].

Le processus de recombinaison V(D)J est strictement régulé à différents niveaux. La recombinaison V(D)J est spécifique des lignées lymphoïdes. Ce réarrangement survient à des stades précis du développement lymphoïde : pro-B, pro-T, pré-B et pré-T. Ce processus peut survenir à des stades tardifs du développement des lymphocytes B et T, lors du phénomène d'*editing* du récepteur [Wang et al, 2009]. La recombinaison V(D)J est coordonnée dans le temps : le réarrangement D-J précède celui du V-DJ et est restreint à la phase G0-G1 du cycle cellulaire [Li et al, 1996]. Enfin la recombinaison obéit au principe de l'exclusion allélique, dans lequel un réarrangement productif sur un allèle prévient le réarrangement sur l'allèle homologue. Elle est soumise également au principe de l'exclusion isotypique des locus des chaînes légères, dans lequel un réarrangement productif d'IG κ prévient un réarrangement sur le locus IG λ et vice versa. Récemment, il a été proposé que la recombinaison V(D)J se déroule dans un compartiment nucléaire bien déterminé, appelé

foyer de recombinaison V(D)J, et que plusieurs facteurs interviennent dans la régulation de ce processus (pour revue [Matthews and Oettinger, 2009]).

b. Commutation de classe isotypique

Une fraction des B du CG va subir la commutation de classe ("*class switch recombination*", CSR). Il s'agit d'un mécanisme de recombinaison somatique irréversible permettant aux cellules B de changer l'expression de leur IG de la classe IgM et IgD à une autre classe ayant des fonctions effectrices distinctes (**Figure 38**). Au cours de la commutation de classe, les gènes des parties constantes $C\mu$ et $C\delta$ sont remplacés par les gènes des $C\gamma$, $C\alpha$ ou $C\epsilon$. La CSR requiert l'expression de l'AID ("*Activation-Induced cytidine Deaminase*", AID) [Muramatsu et al., 2000] et des domaines distincts de la protéine AID semblent être fonctionnellement nécessaires pour la CSR ou la SHM [Barreto et al., 2003]. Au cours de la commutation de classe, des cassures d'ADN sont introduites dans séquences *switch* ($s\mu$) et des régions *switch* associées à la C_H . Le fragment d'ADN entre les 2 séquences *switch* est éliminé et les 2 bouts des fragments d'ADN seront joints. Il a été établi que la réparation des cassures d'ADN fait appel au mécanisme NHEJ [Rooney et al., 2004], néanmoins le mécanisme par lequel les régions *switch* recombinent reste inconnu. Alors que le réarrangement V(D)J intéresse un seul allèle du locus IGH, la commutation de classe survient sur les 2 allèles d'IGH [Irsch et al., 1994].

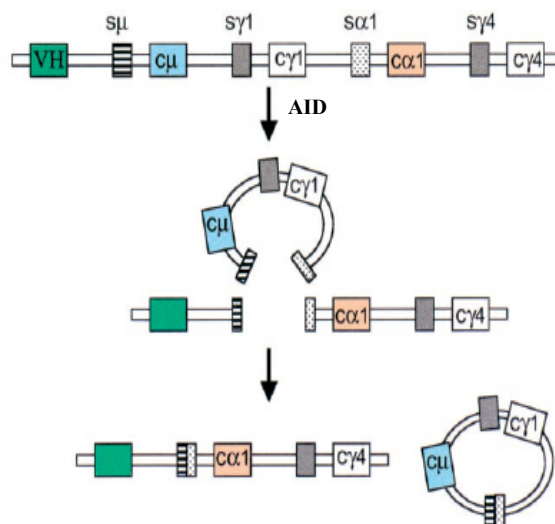


Figure 38 : Commutation de classe isotypique des gènes des immunoglobulines (une commutation IgA est schématisée). L'AID introduit des cassures double brins dans des séquences switch S. Les cassures d'ADN sont par la suite réparées selon le mode de NHEJ. Le segment d'ADN coupé est éliminé sous forme d'épisode circulaire. D'après [Küppers and Dalla-Favera, 2001].

c. Hypermutation somatique

Les centroblastes dans la zone sombre du CG subissent le processus de SHM au niveau des gènes V des IG en réponse à une stimulation antigénique [Berek et al., 1991]. Le CG est le site principal mais non exclusif dans lequel se déroule le SHM [William et al., 2002]. Le processus de SHM introduit un changement d'un seul nucléotide au niveau des gènes V réarrangés des IGH et IGL à un taux de 10^{-3} par pb et par génération [Wagner and Neuberger, 1996]. Le SHM est associé aux cassures de l'ADN [Bross et al, 2000] et requiert l'activité de l' AID [Muramatsu et al., 2000]. Cette enzyme déclenche directement ce processus par une désamination des cytosines en uraciles au locus des IG [Ramiro et al., 2003]. L'action de l'AID ne suffit pas à expliquer à elle seule la mutagenèse des gènes des IG [Reynaud et al., 2003]. Trois autres facteurs principaux ont été décrits comme participant au processus de SHM : l'uracile glycosylase (UNG), les protéines MSH2/MSH6 et les ADN polymérases translésionnelles [Liu and Schatz, 2009].

2.4. Cellules précurseurs des LNH B

A l'exception de rares cas des lymphomes lymphoblastique et du manteau, tous les cellules des autres LNH B présentent des mutations somatiques des gènes V des IG, démontrant ainsi que ces cellules tumorales dérivent de lymphocytes B du CG [Küppers et al., 1999]. De plus, le génome de ces groupes de LNH B montrent 2 principales anomalies génétiques, des translocations chromosomiques et une altération du processus de SHM, soulignant un dysfonctionnement des processus de réarrangement des gènes IG [Küppers and Dalla-Favera, 2001]. Les translocations chromosomiques associées aux LNH B dérivant du CG fréquemment impliquent le locus des IG, avec un point de cassure dans soit la séquence *switch*, S, soit dans la région cible de SHM [Küppers and Dalla-Favera, 2001 ; Küppers, 2005]. Le rôle critique de l'AID dans l'initiation des processus SHM et CSR, laisse suggérer que cette enzyme peut contribuer à la genèse des translocations associées aux LNH du CG. Les souris surexprimant l'AID présentent une instabilité chromosomique et des translocations chromosomiques associées aux lymphomes [Robbiani et al., 2009]. Il a été démontré que l'AID est requise pour la formation des translocations t(MYC;IGH) dans les lymphocytes B induites pour subir le CSR ainsi que dans le plasmocytome murin induit par l'IL6 [Ramiro et al., 2004]. En revanche, le gène codant pour l'AID n'est pas muté dans ces

LNH B suggérant que le dysfonctionnement des processus de SHM et CSR au cours de la lymphomagenèse ne peut être directement associé à l'AID, mais possiblement lié à une altération des mécanismes ciblant son activité sur le génome [Pasqualucci et al., 2001]. Il en découle que la majorité des LNH dérivent du CG, y compris les LB, et que les translocations y associées surviennent lors des processus de SHM et CSR. Une exception faite pour les translocations t(14;18)(q32;q21) associée au lymphome folliculaire et t(8;14)(q24;q32) associée à un sous groupe de LB endémique, lesquelles translocations sont probablement la conséquence d'une erreur du processus de la recombinaison V(D)J survenant dans des lymphocytes B immatures pré-CG [Küppers et al., 1999].

II. Aspects clinico-épidémiologiques des LB

Le LB, considéré comme une entité pathologique de haut grade de malignité, a été rapporté pour la première fois comme un sarcome de la joue [Coakley, 2006]. La dénomination du LB a évolué grâce aux progrès des techniques immuno-histo-chimiques, cytogénétiques et moléculaires. Selon les classifications cette entité a été désignée comme «lymphome indifférencié» par Rappaport en 1966, « lymphome Burkitt » dans la classification de Kiel en 1968, « lymphome à petites cellules non clivées de type Burkitt » dans la formulation internationale à usage clinique en 1981 et lymphome Burkitt dans la classification REAL en 1994. Dans sa dernière classification, l'organisation mondiale de la santé (OMS) a supprimé le sous-groupe de LB « atypique » inclus dans la classification de 2001 [Jaffe et al., 2008 ; **Tableau 5**].

Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma
 B-cell prolymphocytic leukemia
 Splenic marginal zone lymphoma
 Hairy cell leukemia
Splenic lymphoma/leukemia, unclassifiable
 *Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma**
 *Hairy cell leukemia-variant**
 Lymphoplasmacytic lymphoma
 Waldenström macroglobulinemia
 Heavy chain diseases
 Alpha heavy chain disease
 Gamma heavy chain disease
 Mu heavy chain disease
 Plasma cell myeloma
 Solitary plasmacytoma of bone
 Extraosseous plasmacytoma
 Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma)
 Nodal marginal zone B-cell lymphoma (MZL)
 Pediatric type nodal MZL
 Follicular lymphoma
 Pediatric type follicular lymphoma
 Primary cutaneous follicle center lymphoma
 Mantle cell lymphoma
 Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), not otherwise specified
 T cell/histiocyte rich large B-cell lymphoma
 DLBCL associated with chronic inflammation
 Epstein-Barr virus (EBV) DLBCL of the elderly*
 Lymphomatoid granulomatosis
 Primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma
 Intravascular large B-cell lymphoma
Primary cutaneous DLBCL, leg type
 ALK⁺ large B-cell lymphoma
 Plasmablastic lymphoma
 Primary effusion lymphoma
Large B-cell lymphoma arising in HHV8-associated multicentric Castleman disease
 Burkitt lymphoma
B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma
 B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and classical Hodgkin lymphoma

Tableau 5 : Classification OMS des hémopathies lymphoïdes B matures. D'après [Jaffe, 2009].

Pour la première fois le LB a été décrit chez des enfants de l'Afrique équatoriale, où la tumeur sévit une manière endémique [Burkitt, 1958]. Par la suite, les 2 autres formes sporadiques et associées aux états d'immunodéficience ont été rapportées. En dehors des zones endémiques, le LB représente 40-50% des LNH pédiatriques (**Figure 39**). Sur le plan morphologique les formes survenant en dehors de l'Afrique et endémique sont similaires. En revanche dans la forme endémique, la tumeur tend à envahir les os de la face (joue et maxillaires) et survient chez de jeunes enfants. Dans les formes non endémiques, la tumeur tend à envahir le tractus digestif, particulièrement la jonction iléo-cæcale, et également les reins et ovaires ; en revanche l'envahissement de la face est inhabituelle [Magrath, 1997]. L'envahissement de la moelle osseuse au moment du diagnostic reste rare, mais peut être prééminent à des stades tardifs de la maladie [Cairo et al., 2003]. Un faible pourcentage, 1-2% de patients, peut présenter une maladie disséminée avec un envahissement du sang périphérique et de la moelle osseuse. Antérieurement dénommée LAL3 selon FAB [Bennett et al., 1976], n'est plus considérée comme une leucémie mais plutôt un LB dans sa phase

leucémique [Harris et al., 1994]. L'envahissement neuro-méningé se voit dans les formes disséminées [Cairo et al., 2003]. Le LB est associée à l'infection VIH mais aussi aux autres états d'immunodéficience [Hecht and Aster, 2000 ; Knowles et al., 1988 ; Van Krieken, 2004].

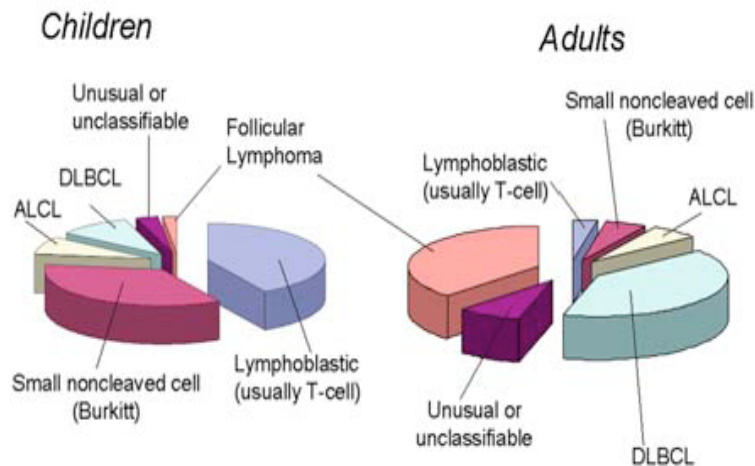


Figure 39 : Distribution des LNH chez l'adulte et l'enfant. D'après [Sandlund et al., 1996].

Morphologiquement, la tumeur est formée par des cellules de taille moyenne (12 μ) avec des noyaux ronds à ovales contenant de multiples nucléoles basophiles plus au moins proéminents (**Figure 40A**). Le cytoplasme des cellules est basophile, peu abondant et présentant souvent des vacuoles lipidiques visualisées plus aisément sur les empreintes cytologiques (**Figure 40B**). Les tumeurs ont un haut index mitotique et les coupes histologiques montrent souvent un aspect de « ciel étoilé » conséquent de la présence de nombreux macrophages réactionnels à corps "tingibles" (**Figure 40C**).

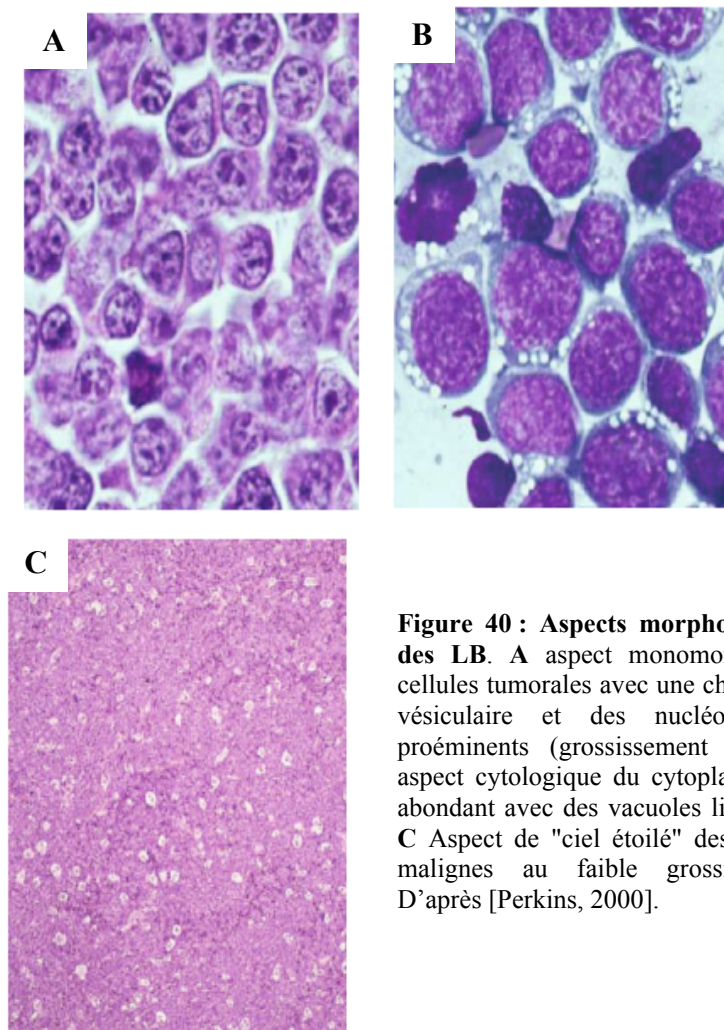


Figure 40 : Aspects morphologiques des LB. **A** aspect monomorphe des cellules tumorales avec une chromatine vésiculaire et des nucléoles peu proéminents (grossissement 100). **B** aspect cytologique du cytoplasme peu abondant avec des vacuoles lipidiques. **C** Aspect de "ciel étoilé" des cellules malignes au faible grossissement. D'après [Perkins, 2000].

L'immunophénotypage (**Figure 41**) de la tumeur montre des cellules B matures exprimant les antigènes de surface CD19, CD20, CD22, CD79a. L'origine centrofolliculaire de ces cellules tumorales est confirmée par l'expression de CD10 et BCL6. Les cellules tumorales expriment une IgM de surface avec une restriction pour une chaîne légère [Magrath, 1997 ; Perkins, 2000] et sont BCL2- et TdT-. Le LB est parmi les tumeurs humaines les plus proliférantes, avec un temps de dédoublement de l'ordre de 12-24 heures . En immunohistochimie, près de 100% des cellules tumorales expriment le Ki67 [Frost et al., 2004 ; Wilson et al., 1987].

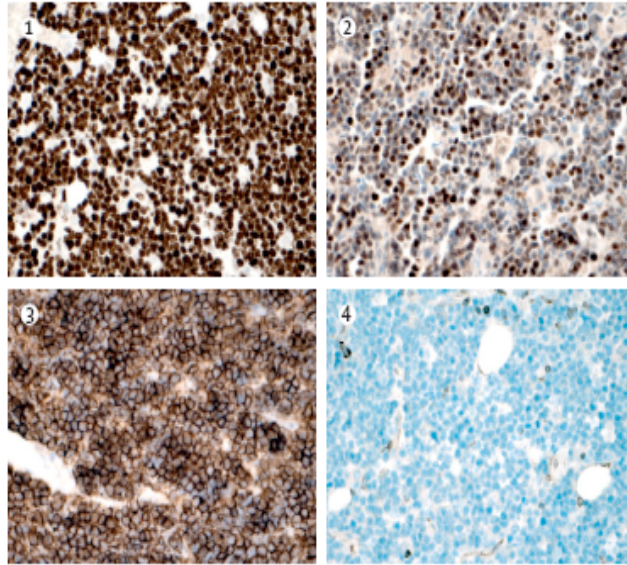


Figure 41 : Immunophénotypage des LB. 1 La presque totalité des cellules malignes expriment le Ki67. 2 Marquage positif pour le BCL6. 3 Marquage positif membranaire pour le CD20. 4 Les cellules n'expriment pas le BCL2. D'après [Molyneux et al., 2012].

III. Altérations génomiques

1. Anomalie primaire

Le dénominateur commun des 3 formes épidémiologiques de LB est le réarrangement chromosomique de la région 8q24/MYC. Dans 80% des cas il s'agit $t(8;14)(q24;q32)$ et dans les autres cas ça correspond à une des 2 translocations variantes $t(2;8)(p12;q24)$ et $t(8;22)(q24;q11)$. Ces 3 types de réarrangement, entraînent la juxtaposition de *MYC* à l'un des locus des immunoglobulines : 14q32/IGH, 2p12/IG κ et 22q12/IG λ .

Les points de cassure sur les régions chromosomiques 8q24 et 14q32 sont différents, selon qu'il s'agit de LB sporadique ou endémique (**Figure 42**).

Dans la forme endémique, le point de cassure sur *MYC* se situe à distance (Jusqu'à 100 kb) de la région 5' de l'exon 1 [Gutierrez et al., 1992 ; Joos et al., 1992 ; Pelicci et al., 1986], et le point de cassure dans le locus *IGH/14q32* se situe dans le segment JH.

Dans la forme sporadique et associée à l'infection par le VIH, le point de cassure se situe entre les exons 1 et 2 de *MYC/8q24* et dans le segment S μ au niveau du locus *IGH*. Le point de cassure sur *MYC* conduit à la perte de l'exon 1 qui contient des séquences non

transcrites et régulant négativement la transcription du gène. Les séquences codantes de *MYC* sont en revanche conservées (Exons 2 et 3), mais sont sous la dépendance d'un promoteur alternatif situé au niveau de l'intron 1, les promoteurs habituels de *MYC* (P1 et P2) n'étant pas classiquement conservés dans les formes sporadiques, à la différence des formes endémiques [Hecht and Aster, 2000].

Dans les deux formes, peuvent exister des mutations dans l'exon 2, responsables de stabilisation de la protéine *MYC*. La mutation de la thréonine 58, classique dans le LB, diminue la dégradation de cette protéine [Bahram et al., 2000].

Dans les deux translocations variantes, les points de cassure sont situés en 5' du segment C des locus *IGκ/2p12* et *IGλ/22q11*. Sur *MYC*, le point de cassure se situe une distance variable en 3' de celui-ci. Dans la t(8;14), *MYC* migre dans le locus *IGH* par contre dans les t(2;8) et t(8;22), ces les 2 gènes *IGκ* et *IGλ* qui migrent dans le locus de *MYC*.

Dans le LB, les 3 translocations chromosomiques sont responsables d'une dérégulation de l'expression de *MYC*, en juxtaposant la région codante de *MYC* à des régions *enhancers* des gènes *IG*. Ceci a pour conséquence un dysfonctionnement de plusieurs processus cellulaires : apoptose, adhésion cellulaire, prolifération, et l'angiogenèse [Klapproth and Wirth, 2010]. Il a été démontré dans des modèles murins, que *MYC* est nécessaire mais suffisant pour déclencher le processus de lymphomagenèse et que des événements additionnels sont requis [Adams et al., 1985 ; Kovalchuk et al., 2000].

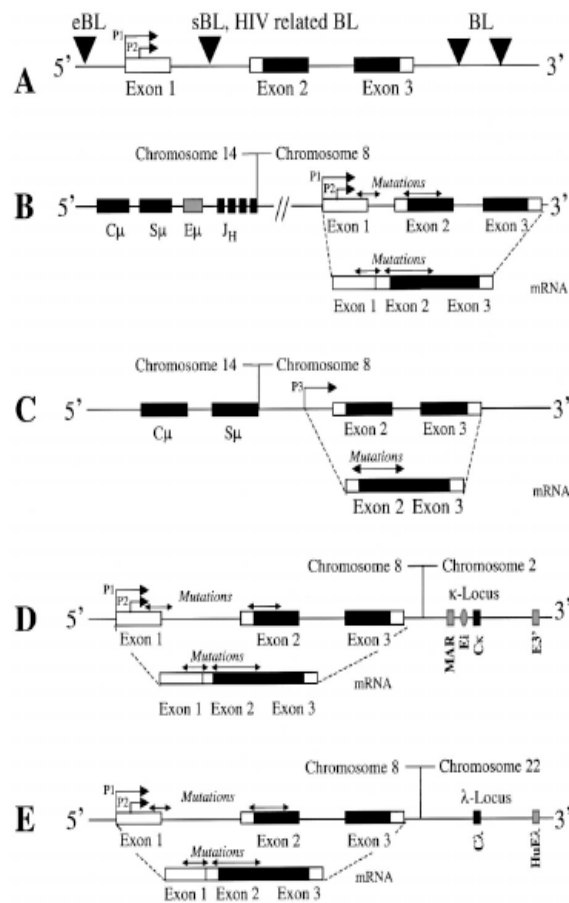


Figure 42 : Cartographie des points de cassure sur les locus IGH et MYC. A configuration germinale de MYC. **B** points de cassure de la t(8;14) dans la forme endémique de LB. Sur MYC, le point de cassure siège sur une distance de 100 Kb du côté 5' de MYC; sur IGH le point de cassure siège dans le segment JH. Des mutations sont observées dans les exons 1 et 2. **C** dans la forme sporadique, le point de cassure est situé dans le segment S μ d'IGH et dans l'intron de MYC. **D et E** dans les translocations variantes, le point de cassure est situé du côté de 3' de MYC et dans le segment C des locus IG κ (2p12) et IG λ (22q11). Légende :BL :Burkitt lymphoma; eBL : endemic Burkitt lymphoma; sBL : sporadic Burkitt lymphoma. D'après [Hecht and Aster, 2000].

2. Anomalies quantitatives

Approximativement, 60 à 70% des LB sporadiques de l'adulte ont des anomalies chromosomiques additionnelles à la t(8;14) ou l'une de ses variantes [Berger and Bernheim, 1985 ; Heerema et al., 2005; Poirel et al., 2009 ; Slater et al., 1982]. Ces anomalies ont été étudiées par la cytogénétique conventionnelle et moléculaire, des techniques moléculaires de recherche de LOH, par la CGH et les SNP array [Berger and Bernheim, 1985 ; Davidsson et al., 2007 ; Garcia et al., 2003 ; Karpova et al., 2006 ; Lones et al., 2004 ; Onciu et al., 2006 ; Parsa et al., 1994; Nelson et al., 2010 ; Poirel et al., 2009 ; Salaverria et al., 2008 ; Schiffman et al., 2011 ; Scholtysik et al., 2010 ; Sobol et al., 2002 ; Zimonjic et al., 2001 ; Zunino et al., 2000].

Si on exclue le type de translocation t(MYC;V), l'étude de 70 LB sporadiques par caryotype a rapporté une atteinte plus fréquente, 15%, des chromosomes 1, 6, 13, 17 et 22 [Onciu et al., 2006]. Une association entre ces différentes anomalies a été observée au moins dans 10% des cas, suggérant que ces anomalies additionnelles ne sont pas exclusives.

Des études par cytogénétique conventionnelle ont rapporté un gain récurrent de la région 1q [Berger and Bernheim, 1985; Douglass et al., 1980 ; Lones et al., 2004 ; Onciu et al., 2006; Poirel et al., 2009]. L'incidence de cette anomalie varie selon la nature du matériel étudié et l'effectif des cohortes. L'étude de 19 tumeurs LB non endémiques, a rapporté un gain du 1q dans 7 échantillons (36%) [Lones et al., 2006]. Dans une série de 200 LB, le gain 1q a été détecté dans 29% des cas [Poirel et al., 2009]. L'analyse de 59 lignées cellulaires a rapporté des anomalies additionnelles dans 47 cas (79%) [Berger and Bernheim, 1985]. Parmi ces anomalies, le gain 1q a été détecté dans 17/47 lignées cellulaires (36%) suivi par les anomalies du chromosome 7, détectées dans 10/47 (21%). Ces gains du 1q peuvent intéresser une région ou tout le bras long du chromosome 1. Ils peuvent prendre l'aspect de : duplication, triplication amplification et translocations équilibrées ou sauteuses ("*jumping translocation*") [Berger and Bernheim, 1982 ; Garcia et al., 2003 ; Lones et al., 2004; Onciu et al., 2006]. Le pronostic de cette anomalie est encore un sujet de controverse [Garcia et al., 2003 ; Lones et al., 2004 ; Onciu et al., 2006 ; Poirel et al., 2009]. Différentes approches expérimentales ont délimité plusieurs MCR, parfois chevauchantes sur le 1q [Davidsson et al., 2007 ; Douglass et al., 1980 ; Garcia et al., 2003 ; Salaverria et al., 2008 ; Schiffman et al., 2011]. L'étude par caryotype de 13 LB non endémiques, a rapporté deux régions d'intérêts : 1q12q31 et 1q21q31 [Douglass et al., 1980]. L'étude par CGH

métaphasique de 51 LB a rapporté 2 MCR : 1q12q25 et 1q31q32 [Salaverria et al., 2008]. L'analyse par aCGH (32.000 clones chevauchants) de 10 LB ayant un gain 1q a rapporté 2 MCR : 1q22q32.3 et 1q12 q25.2 [Davidsson et al., 2007].

Les anomalies du chromosome 13 ont également été rapportées dans LB [Lones et al., 2004 ; Nelson et al., 2010 ; Onciu et al., 2006 ; Poirel et al., 2009 ; Salaverria et al., 2008 ; Schiffman et al., 2011 ; Scholtysik et al., 2010 ; Zunino et al., 2000]. Ces anomalies peuvent correspondre à des : amplification, gain ou perte d'une région du 13q. Des monosomies totales et des anomalies de structure complexe du chromosome 13 ont également été rapportées [Lones et al., 2004 ; Nelson et al., 2009 ; Onciu et al., 2006 ; Poirel et al., 2009]. Ces anomalies ne sont pas exclusives, le même patient peut avoir 2 altérations distinctes du chromosome 13 [Onciu et al., 2006].

La fréquence des anomalies du 13 varie selon le type d'anomalie et le nombre de cas étudiés. Par exemple dans une série de 28 LB étudiés par des SNP array 330K le gain 13q, observé dans 3/18 (11%), représente le 2^{ème} type de gain après le 1q [Schiffman et al., 2011]. L'étude de 90 LB par FISH avec des sondes du 13q a rapporté des délétions 13q dans 38/90 cas (42%) [Nelson et al., 2010]. Dans cette étude, la del(13)(q14.3), détectée dans 13/38 (14%), est associée une baisse du taux de survie à 5 ans (77% versus 95%). La perte de cette région 13q14 a également été retrouvée par CGH métaphasique [Salaverria et al., 2008]. L'étude de 200 caryotypes de LB a rapportée la del(13q) dans 14% des cas et cette anomalie semble être associée à un mauvais pronostic [Poirel et al., 2009]. Les gains du 13q ont été rapportés [Salaverria et al., 2008 ; Schiffman et al., 2011]. La région commune amplifiée dans les LB est 13q31.3.

En dehors des régions 1q et 13q, une récurrence du gain de 7q a également été rapporté dans les LB [Berger and Bernheim, 1985 ; Garcia et al., 2003 ; Lones et al., 2004 ; Nelson et al., 2010 ; Poirel et al., 2009 ; Salaverria et al., 2008 ; Scholtysik et al., 2010]. Ces anomalies correspondent à des trisomies partielles ou totales du chromosome 7/7q. L'analyse de 200 caryotypes de LB a rapporté un gain 7q dans 14 % des cas [Poirel et al., 2009]. Dans cette étude, cette trisomie 7q semble être associée à un mauvais pronostic. L'étude de 51 LB par CGH métaphasique a rapporté un gain 7/7q dans 10 cas (19.6%) [Salaverria et al., 2008]. La région 7q21q22 apparaît comme une RMC [Poirel et al., 2009]. L'étude de 39 LB par SNP array 250 SNP a mis en évidence une RMC sur le 7p12.2 intéressant le gène *IKZF1* [Scholtysik et al., 2010].

D'autres gains intéressant les régions 3q26/*BCL6*, 6q15, 8q24 (*gène MYC*), 12q, 15q, 18q21 et 22 ont également été rapportés dans LB [Onciu et al., 2006 ; Salaverria et al., 2008 ; Scholtysik et al., 2010 ; Zunino et al., 2000].

Des pertes récurrentes ont été rapportées dans les LB [Gaidano et al., 1992 ; Parsa et al., 1994 ; Salaverria et al., 2008 ; Schiffman et al., 2011 ; Scholtysik et al., 2010 ; Sobol et al., 2002].

Les délétions 6q sont des anomalies additionnelles récurrentes dans les LB [Onciu et al., 2006 ; Gaidano et al., 1992 ; Parsa et al., 1994 ; Scholtysik et al., 2010]. Des délétions partielles (interstielles ou terminales) ou totales du bras long 6q ont été détectées dans les LB. Une étude de 71 tumeurs et lignées cellulaires LB par des marqueurs polymorphes localisés sur le 6q a identifié 2 MCR : 6q21q23 et 6q25q27 [Gaidano et al., 1992]. L'étude de 39 LB par SNP array 250k a rapporté une seule MCR localisée en 6q14.3 [Scholtysik et al., 2010].

Le locus *TP53* est fréquemment altéré dans les LB [Gaidano et al., 1991 ; Sobol et al., 2002]. L'analyse simultanée de 31 lignées cellulaires de LB et de lignées lymphoblastoïdes par 184 marqueurs microsatellites a rapporté des LOH au locus *TP53* dans 9/31 lignées (29%) [Sobol et al., 2002]. L'étude de 51 LB a rapporté une perte de la région 17p12pter dans 6/51 cas (11.7%).

L'étude de 39 LB par SNP array 250k a rapporté une perte de la région 3p14/*FHIT* dans 3/39 [Scholtysik et al., 2010]. Cette dernière étude a également rapporté des délétions des régions : 1p36.1/*E2F* et 9p21/*CDKN2B*.

Résultats et discussion

Partie 2 : Analyse à haute résolution des altérations génomiques associées aux lymphomes de Burkitt

Article 1 : High Resolution Genome-Wide Analysis of Chromosomal alterations in Burkitt's Lymphoma

PLOS ONE, September 2009, 4(9) :e7089 1-14

I. Contexte

Les altérations chromosomiques additionnelles à la translocation $t(MYC;IG)$ sont fréquentes dans les LB. Ces anomalies ont un rôle majeur dans la progression et le pronostic de la maladie. En revanche, elles sont relativement peu étudiées. Dans un premier travail nous avons entrepris une étude par aCGH de haute résolution de 27 échantillons LB dans le but de mettre en évidence des gènes candidats remaniés secondairement à ces anomalies.

Entre 1995 et 2005, 12 tumeurs ont été collectées et congelées au moment diagnostique de la maladie. Le diagnostic de LB, fait selon les critères de l'OMS, a été revu par un hématologue expérimenté. Un seuil de 60% de cellules tumorales dans l'échantillon tumoral a été évalué et retenu comme critère d'inclusion dans cette étude.

Les 15 lignées cellulaires : BL2, BL31, BL41, BL70, BL84, BL104, BLLAL, Ly47, Ly91, Namalwa, Ramos, Oku, Salina, Séraphina et BLMer (établie à partir de la tumeur 29124), ont été fournies par le groupe du Dr Joëlle Wiels.

Les tumeurs et les lignées ont été analysées par aCGH pangénomique 44.000 et 244.000 oligonucléotides respectivement. Les résultats d'aCGH ont été validés par la cytogénétique conventionnelle et moléculaire.

II. Présentation des résultats

Plus de la moitié ($n=145$) des CNA < 2 Mb correspondent à des polymorphismes ou CNV. Les locus polymorphes Mendéliens (81/145) étaient exclusivement détectés par les lames 244K. Ces polymorphismes étaient observés au niveau des locus des récepteurs olfactifs, *HLA*, *UGT2B17* et *UGT2B28*. Des CNV récurrents étaient observés dans le locus *GSTT1* ("*glutathion S-transferase*"). Un polymorphisme du gène *BIRC6*, à type de duplication, était détecté dans une tumeur (29124) primaire et sa lignée (BLMer) correspondante. Des CNV somatiques (38/145), restreints aux locus IGLK (2p11), IGH (14q32) et IGHL (22q11) étaient détectés uniquement par les lames 244K. Parmi les 26/145 CNA de petite taille (**Tableaux 1 et 2 de l'article 1**), 16 étaient localisés dans des séquences intergéniques ou des séquences codantes de fonction indéterminée. Dix CNV étaient présents dans des gènes incriminés dans des processus de différenciation des lymphocytes B et de carcinogénèse.

Cent trente six CNA $>$ 2 Mb étaient détectées dans notre série (**Tableau 1 et 2 de l'article 1**). Des monosomies et trisomies totales étaient observées dans 17/136. Des aneuploïdies segmentaires étaient notées dans 119/136. Aucune CNA n'était observée dans la moitié des tumeurs, 6/12, et 2/14 lignées cellulaires. Ailleurs les anomalies génomiques quantitatives étaient récurrentes. Les gains étaient observés dans les régions suivantes : 1q (12/27), 13q (7/27), 7q (6/27), 8q (4/27), 2p (3/27), 11q (2/27) et 15q (2/27). Les pertes, moins fréquentes, étaient détectées dans les régions : 3p (5/27), 4p (4/27), 4q (4/27), 9p (4/27), 6p (3/27), 17p (3/27), 6q (2/27), 11pterp13 (2/27) et 14q12q21.3 (2/27).

Vingt MCRs (taille variant entre 0.07-71.36 Mb) étaient mises en évidence (**Tableau 3 de l'article 1**). La région la plus fréquemment gagnée est le 1q suivi par le 13q.

Sur le 1q, La première région est 1q21.1q25.2 qui contient un amplicon de 6.3 Mb (1q21.1q21.3) avec trois gènes candidats BCL9, BCA2 et PIAS3. Deux autres régions 1q32.21 et q44 contiennent les oncogènes MDM4 et AKT3.

Sur le 13q, La MCR est 13q31.3q32.1, siège d'un amplicon contenant plusieurs gènes, tels qu'ABCC4, mais aussi le polycistron miR17-92.

Sur le 2p, la MCR de 0.04 Mb (2p16.1) contient l'oncogène *REL*, sous unité de la famille NF-KB. Sur le 3p, la MCR de 0.1Mb, localisée en 3p14.2, inactive un allèle de FHIT. Sur le 9p une MCR (9p21.3) implique le gène *CDKN2A/CDKN2B*.

La translocation t(8;14), mise en évidence par le caryotype, était détectée dans 18 échantillons. La t(8;22) était retrouvée dans une tumeur et 5 lignées cellulaires et la t(2;8) était observée dans 2 tumeurs et 1 lignée cellulaire. Quatre autres translocations additionnelles : t(1;3)(q24;q25), t(5;22)(q 12;q12.2), t(12;22)(q 12;q11.2) et der(13;13)(q10;q10) étaient observées dans notre travail. Ces translocations étaient indétectables par aCGH. Dans une lignée (BL84), la duplication du der(8)t(8;22)(q24;q11.2) a permis de localiser le point de cassure à 300 Kb par rapport de *MYC*. Ce point de cassure interrompt un cluster de microRNA (mir1204, mir1205, mir1206 et mir1207). Ce cluster est également interrompu dans une 2^{ème} lignée (Ly47) avec une t(8;22) avec là un remaniement complexe (**Figure 4 de l'article 1**).

III. Discussion

Nous avons entrepris l'étude de 12 tumeurs et 14 lignées cellulaires de LB par aCGH pangénomique de haute résolution dans le but est de déterminer les gènes candidats impliqués dans les remaniements additionnels à la translocation t(*MYC;IG*).

Deux types de CNV étaient détectés dans notre série. Le premier sous groupe correspond à des CNV de type Mendéliens. Les CNV sont des segments d'ADN présents en nombre de copies variables chez un sujet phénotypiquement normal, par rapport à un ADN de référence [Redon et al., 2006 ; Durbin et al., 2010]. Ils se révèlent ubiquitaire, représentent 12% du génome humain et peuvent impliquer des gènes ou des pseudogènes. La très grande majorité (99%) de ces polymorphismes semble être héritée des parents selon un mode Mendélien. Des CNV étaient observés dans le gène *GSTT1*. Un rôle de prédisposition de ce variant a été rapporté dans la littérature. Dans la LMC, il semble que le gain de nombre de copies de *GSTT1* soit associé à une absence de réponse au traitement par imatinib [Koh et al., 2010]. Dans notre travail une duplication de *BIRC6* était observée dans une tumeur et sa lignée correspondante. Des amplifications de *BIRC6* ont été rapportées dans les LAL [Berquam-Vrieze et al., 2011]. Affirmer un rôle de prédisposition de *GSTT1* et *BIRC6* dans le développement de LB nécessite des études d'association ("*genome wide association*" ; GWA) avec de grandes cohortes. Le 2^{ème} type de CNV observé dans notre travail correspond aux CNV restreints aux locus des IG. Dans les LB, le réarrangement monoclonal des locus IG a rendu possible leur détection par les microarray 244K.

Dans 6 tumeurs et 2 lignées cellulaires aucune CNA n'était observée en dehors des translocations t(*MYC;IG*) qui sont indétectables par aCGH. Dans une étude de 51 tumeurs LB par CGH métaphasique, aucune anomalie n'était détectée dans 9/51 [Salaverria et al., 2008]. Dans l'analyse de 39 tumeurs par SNP array 250K, la moyenne des CNA était de 6 [Scholtysik et al., 2010] alors qu'elle était le double dans la majorité des tumeurs solides [Beroukhim et al., 2010]. Il en découle que les altérations génomiques additionnelles sont à la base de la progression et l'évolution d'un sous-groupe de LB. Les disomies uniparentales acquises (DUP) peuvent être un mécanisme alternatif de progression. Dans 3 études différentes des DUP, quoique rares, étaient mises en évidence au niveau de locus de gènes suppresseurs de tumeurs : *TP53/17p* et *NOXA/18q* [Nielaender et al., 2006 ; Schiffman et al., 2011 ; Scholtysik et al., 2010].

Des CNA récurrentes, observées dans 6 tumeurs et 13 lignées, avaient permis de définir 20 MCR. La région la plus fréquemment gagnée était le 1q. Ce résultat était rapporté

par plusieurs études [Berger and Bernheim, 1985 ; Davidsson et al., 2007 ; Salaverria et al., 2008 ; Schiffman et al., 2011; Scholtysik et al., 2010]. La trisomie 1q était rapportée aussi dans les autres hémopathies malignes et les tumeurs solides (<http://cgap.nci.nih.gov/chromosomes/Mitelman>; Huret, 2010). Trois MCR étaient mises en évidence sur le 1q. La région consensus, faisant 34.13 Mb, 1q21.1q25 était rapportée dans des études antérieures [Salaverria et al., 2008 ; Schiffman et al., 2011; Sobol et al., 2002]. Dans notre travail, la partie proximale de cette MCR contient une amplification qui intéressait les gènes BAC2, PIAS3, BCL9 et LHX4. La région 1q32.1, 0.39 Mb de taille, et MDM4 est potentiellement le gène candidat de cette région. L'analyse de 39 LB par SNP array 250K avait rapporté le 1q31.3 <195.25-195.67 Mb> comme la région la plus fréquemment gagnée dans les LB [Scholtysik et al., 2010]. Cette dernière contient le gène *PTPRC* qui contrôle la signalisation des récepteurs des IG et des cytokines. Dans cette étude, en revanche ce gène n'est pas exprimé dans les tumeurs où un gain 1q était observé. Dans notre étude la 3^{ème} région sur le 1q intéressait 1q44, contenant plusieurs gènes dont *AKT3*.

Sur le 13q, la MCR 13q31.3q32.1 intéressait plusieurs gènes candidats notamment ABBC4, GPCR et SOX21 et le polycistron mir-17-92. La même région était rapportée récemment par 2 études distinctes utilisant des SNP array, 250K et 300K, plate-formes aussi résolutive que notre microarray [Schiffman et al., 2011 ; Scholtysik et al., 2010].

La région la plus fréquemment délétée était le 3p14.2, 0.1 Kb, et emportait le gène suppresseur de tumeurs *FHIT*. Ce résultat était aussi rapporté par une étude récente [Scholtysik et al., 2010]. Les MCR des régions 9p21.3 et 17p13 intéressait les gènes suppresseurs de tumeurs CDKN2A/CDKN2B et TP53 [Salaverria et al., 2008 ; Schiffman et al., 2011 ; Scholtysik et al., 2010].

En conclusion l'étude par aCGH des anomalies additionnelles dans le LB a permis de dégager une hétérogénéité génétique. Dans un sous-groupe de LB les altérations génomiques associées à la t(MYC;IG) sont fréquentes et récurrentes. En revanche, dans un autre sous-groupe, ces anomalies génomiques additionnelles sont très rares et les événements de progression restent à déterminer.

Résultats complémentaires : étude du transcriptome et du mirnome

Certaines MCR que nous avons défini par aCGH sont encore relativement grandes, et contiennent de nombreux gènes potentiellement intéressants pour la progression tumorale. Afin de les identifier, il apparaît nécessaire de corréliser les résultats d'aCGH avec des études d'expression. Les méthodes plus exhaustives sont celles de l'étude du transcriptome et du mirnome.

1. Matériels et méthodes

1.1 Extraction d'ARN

Les cellules fraîchement cultivées sont lavées et centrifugées. Puis les cellules sont lysées et les ARN totaux sont extraits au TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). L'ARN est quantifié avec le spectrophomètre Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies). Une quantité de ces ARN totaux, à peu près 1 µg, est conservée pour la réalisation du mirnome. L'autre partie, 5µg, est purifiée à l'aide du Kit Rneasy mini (Qiagen). Les ARN purifiés supérieurs à 200 bases sont élués avec de l'eau RNase-free et quantifiée par le spectrophomètre. Leur qualité est vérifiée par une analyse sur minigel (Lab-on-a-chip, Agilent).

1.2 Transcriptome

Marquage

Une rétrotranscription de l'ARNm est réalisée en présence d'oligo dT, d'enzyme reverse transcriptase du rétrovirus Moloney (M-MuL V), et d'un oligonucléotide correspondant au promoteur de la RNA polymérase T7. Celui-ci se fixe sur l'extrémité 3' de l'ADNc en formant une boucle. Une seconde incubation, réalisée en présence de RNA polymérase T7, de ribonucléotides, et de dUTP couplé à une cyanine fluorescence (Cy5 ou Cy3) conduit après 2h de réaction à 40°C, à une amplification linéaire de ARNc marqué. Après purification sur colonne de Qiagen et contrôle de qualité, les échantillons sont mélangés aux ARN de référence et mis à hybrider sur les microarray (**Figure 43**).

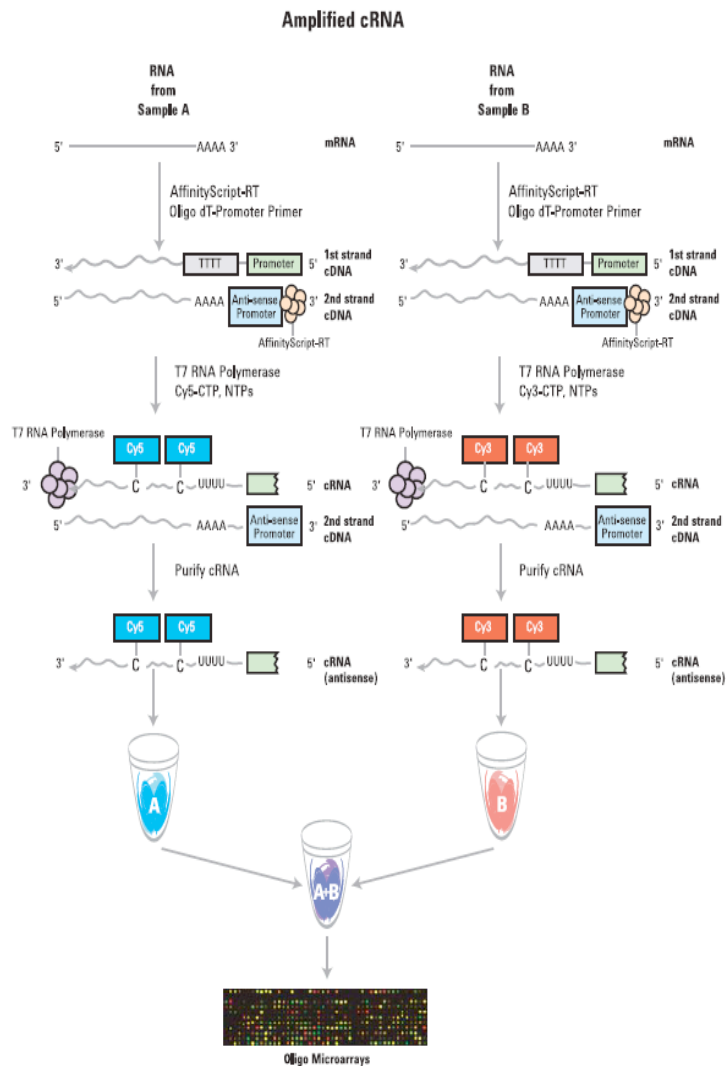


Figure 43 : Procédure d'amplification de l'ARNc sont représentées dans ce schéma. Les cibles alors générées sont marquées par les Cy5 ou Cy3.

Hybridation et lecture des microarray

L'analyse du transcriptome est réalisée sur des lames commerciales Agilent sur lesquelles ont été synthétisés in situ des oligonucléotides 60mers. Ces oligonucléotides correspondent à un panel de 44 000 gènes dont la séquence, spécifique à chacun, a été soigneusement choisie pour éviter toute interférence avec des séquences répétées ou des gènes de la même famille. Les expériences toutes dupliquées : l'ARN extrait des prélèvements tumoraux est marqué pour la moitié par la cyanine Cy5 et pour la moitié par la cyanine Cy3, et les résultats d'hybridation moyennés pour éliminer les biais de marquage.

Cette technique de double marquage est appelée *dye swap*. Les hybridations ont été effectuées en double couleur contre un ARN de référence correspondant à de la moelle normale. Après hybridation et lavages, les lames sont introduites dans un scanner (Agilent) qui enregistre les niveaux de fluorescence de chacune des cyanines sur toute la surface de la lame.

Analyse des résultats

Ces données sont traitées dans un premier temps sur un logiciel d'analyse d'images ("*feature extraction*" software P.5-Agilent technologies) qui contrôle le marquage par rapport au bruit de fond et corrige les données par une normalisation proportionnelle à la quantité d'ARN. Ensuite ces résultats sont transférés dans le logiciel Resolver (Rosetta) qui utilise des tests statistiques pour obtenir les seuils de significativité des variations d'expression observées pour les gènes.

1.2 mirnome

Chaque échantillon a été préparé selon les recommandations du protocole microarray miRNA (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). L'ARN total est marqué et hybridé sur des lames microarray 8x16 K (v3). Ces microarray contiennent 851 séquences de miRNA d'origine humaine et 88 miRNA issus de virus humains, chacune de ces séquences est répliquée 16 fois selon les instructions du fournisseur. Une seule lame, contient 8 microarray distincts (l'équivalent de 8 échantillons). Chaque microarray contient 15.000 oligonucléotides contenant des sondes synthétisées à partir de la base donnée miRBASE, release 13.0 [Griffiths-Jones et al., 2008]. Chaque sonde, qui est formée par 40-60 mers, est directement synthétisée in situ selon une configuration permettant de reproduire la structure du miRNA (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). L'analyse des résultats d'hybridation se fait par un logiciel d'analyse d'images (Feature Extraction software 9.5-Agilent Technologies) et les données ainsi générées sont transférées dans un logiciel qui utilise des tests statistiques pour obtenir les seuils de significativité des variations d'expression observées pour les miRNA [Smyth et al., 2005].

2. Résultats du transcriptome

2.1. Gain 1q

Le 1q21.q25.2 était la région la plus fréquemment gagnée dans notre série. Dans la lignée BL41, cette région présentait une amplification de la partie proximale. Parmi les gènes candidats de cette région PIAS3, BCL9 et NOTCH2NL. Dans cette lignée seule, le gène *BCL9* est surexprimé par rapport aux gènes candidats (**Tableau 6**). Dans les 7 autres échantillons où le gain 1q était constaté, les taux des transcrits des PIAS3, BCL9 et NOTCH2NL restent faible.

Lignées	Nombre de copies 1q21	BCL9/ARNm ratio	PIAS3 /ARNm	NOTCH2NL /ARNm
BL2	+++	1	1	1
BL31	+++	1	1	0.35
BL41	++++	11.23	2.49	3.29
BL70	+++	1	1	1
BL84	+++	1	1	1
Namalwa	+++	1	1	1
Salina	+++	1	1	0.31
Séraphina	+++	1	1	1
BL104	+/+	1	2.22	0.38
BLLAL	+/+	1	1	1
BLMer	+/+	1	1	0.38
Ly47	+/+	1	1	0.38
Ly91	+/+	1	1	0.21
Oku	+/+	1	1	0.2
Ramos	+/+	1	1	1

Tableau 6 : Taux des transcrits de la région 1q21.

Légende :+/+ disomie 1q21 ; +++ : trisomie 1q ; ++++ : amplification 1q21

2.1. Gain 2p16

La MCR, 2p16.1, intéressait le gène REL. Dans, la lignée BL41, ce gène présentait une amplification (6 copies). Le ratio d'ARNm de REL était normal.

2.2. Gain 8q24

Dans toutes les lignées, qui ont toutes la translocation $t(MYC;IG)$, le taux de transcrit moyen de MYC (**Tableau 7**) était de 2.32 (extrêmes : 1 à 4). Dans la lignée Séraphina, le gain, simple copie (ratio=1.5), de MYC était associé à un taux de transcrit normal.

Lignées	Nombre de copie 8q24/MYC	MYC/ARNm
BL2	+/+	3.23
BL31	+/+	2.34
BL41	+/+	1
BL70	+/+	1
BL84	+++	2.67
BL104	+/+	2.55
BLLAL	+/+	2.2
BLMer	+/+	2.41
Ly47	+++	2.73
Ly91	+/+	1
Namalwa	+/+	2.19
Oku	+/+	4
Ramos	+/+	3
Salina	+/+	3.49
Séraphina	+++	1

Tableau 7 : Taux de transcrit de MYC.
Légende :+/+ : disomie 8q24 ; +++ : trisomie 8q24.

2.3. Gain 13q

La MCR, 13q31.3q32, 7.23 Mb, intéressait les gènes ABCC4, GPC5, GPC6 SOX21 et mir-17-92. Les taux de transcrit des gènes ABCC4, GPC5, GPC6 étaient normaux, alors que celui de SOX21 était de 2.42. Le taux moyen d'ARNm de mir-17-92 était 4.7 (extrêmes : 1.94-7.59 ; **Tableau 8**). Dans les lignées BL2, BL31, BLMer et Ramos le gain du chromosome 13 était associé à un ratio d'ARNm de mir-17-92 élevé, et ce taux culminait dans une seule lignée, Namalwa dont la région 13q31.3q32 était le siège d'une amplification.

Lignées	Nombre de copie du 13q31	mir-17-92/ARNm
BL2	+++	4.86
BL31	+++	6.50
BL41	+/+	4.32
BL70	+/+	2.35
BL84	+/+	5.74
BL104	+/+	4.09
BLLAL	+/+	3.84
BLMer	+++	6.29
Ly47	+/+	1.94
Ly91	+/+	2.90
Namalwa	+++	7.59
Oku	+/+	4.93
Ramos	+++	6.39
Salina	+/+	3.26
Séraphina	+/+	5.51

Tableau 8 : Taux des transcrits du mir-17-92.
Légende +/- disomie 13q31 ; +++ trisomie 13q31.

2.4. Gain 11q

La région 11q23.1, une MCR de 0.1 Mb, était le siège d'un gain simple copie. Le taux du transcrit du gène candidat *POU2AF1* était de 15.44.

2.5. Perte 3p

La MCR sur le 3p14.1 impliquait le gène *FHIT*. Ce dernier était perdu d'une manière hémizygote dans 4 lignées (**Tableau 9**). Dans 3 lignées, BLMER, LY47 et RAMOS, la perte touchait un seul exon. L'ARNm de *FHIT* était très bas seulement dans une seule lignée (BL84) qui avait perdu la totalité du gène. Par contre dans les lignées RAMOS et BLMER le taux du transcrit était deux fois moins élevé que celui de LY47.

Lignées	nombre de copies 3p14/ <i>FHIT</i>	Exon	<i>FHIT</i> /ARNm
ramos	+/-	5	2.43
Ly47*	+/-	4	5.85
BLMer	+/-	5	2.56
BL84	+/-	tous	0.16

Tableau 9 : Taux du transcrit de *FHIT*. Légende : +/- perte hémizygote 3p14 ; * L'exon 4 perdu par cette dernière est inclus dans des CNV.

2.6. Perte 9p21

La MCR sur le 9p21.3 intéressait le gène CDKN2A/CDKN2B. Le taux moyen d'ARNm de CDKN2A était de 0.93 (extrêmes : 0.13-2.3). Dans la lignée BL2 la perte de CDKN2A était biallélique et le taux du transcrit était de 0.13. Dans 2 lignées (LY47 et Séraphina), aucune anomalie n'était observée au locus CDKN2A et le taux moyen d'ARN était bas : 0.3. Dans tous les échantillons, le taux moyen d'ARNm de CDKN2B était très bas : 0.05 (extrêmes : 0.01-0.15) (**Tableau 10**).

Lignées	Nombre de copies 9p21/P16	CDKN2A	CDKN2B
BL2	-/-	0.13	0.02
BL31	+/+	1	0.03
BL41	+/-	1	0.04
BL70	+/+	1	0.06
BL84	+/+	1	0.15
BL104	+/+	1	0.13
BLLAL	+/+	2.3	0.05
BLMer	+/+	1	0.03
Ly47	+/+	0.43	0.09
Ly91	+/+	1	0.07
Namalwa	+/+	1	0.01
Oku	+/+	1	0.03
Ramos	+/+	1	0.04
Salina	+/+	1	0.04
Séraphina	+/+	0.18	0.01

Tableau 10 : Taux des transcrits des gènes CDKN2A et CDKN2B. Légende : +/+ disomie 9p21 ; +/- perte hémizygote 9p21 ; -/- perte homozygote 9p21.

2.7. Perte 17p13

La MCR sur le 17p, faisait 15.93 Mb, impliquait plusieurs gènes dont TP53. Dans la lignée BL 41, la perte de 17p était hémizygote et le taux du transcrit de TP53 était de 2.06. Pour la lignée Ramos, la perte de 17p était homozygote et l'ARNm de TP53 était de 2.17 (**Tableau 11**).

Lignées	Nombre de copies 17p13/ <i>TP53</i>	<i>P53</i> /ARNm	Nombre de copies 12q14/ <i>MDM2</i>	<i>MDM2</i> /ARNm	<i>MDM2</i>
BL2	+/+	3.94	+/+	4.69	++++
BL31	+/+	5.96	+/+	4.35	NF
BL41	+/-	2.06	+/+	1	NF
BL70	+/+	6.15	+/+	1	NF
BL84	+/+	1	+/+	1	NF
BL104	+/+	7.84	+/+	2.01	NF
BLLAL	+/+	5.85	+/+	3.29	NF
BLMer	+/+	4.08	+/+	3.16	NF
Ly47	+/+	2.46	+/+	5.7	+++
Ly91	+/+	2.8	+/+	3.67	+++
Namalwa	+/+	5.24	+/+	3.26	NF
Oku	+/+	6.44	+/+	4.59	NF
Ramos	-/-	2.17	+/+	2.95	bas
Salina	+/+	5.32	+/+	3.4	NF
Séraphina	+/+	4.5	+/+	1	+++

Tableau 11 : Taux des transcrits des gènes *TP53* et *MDM2*. Légende : +/+ disomie 17p13 et 12q14; +/- : perte homozygote de 17p13 ; ++++ surexpression de la protéine *MDM2* ; NF : non fait. Les résultats de *MDM2* ont fait le sujet d'une publication antérieure [Capoulade et al., 1998].

3. Discussion complémentaire l'article 2

Nous avons corrélé les résultats d'aCGH aux résultats des transcriptome et miRnome. Sur le 1q la région consensus, 1q21q25 était très grande. Dans une lignée BL41, une amplification de la région proximale, 1q21, était notée. A l'exception de *BCL9*, les autres Les gènes candidats, *PIAS3* et *NOTCH2NL* de cette région avaient un transcrit faible. L'absence de surexpression des autres gènes de la région pourrait s'expliquer de 3 façons : i) les sondes existantes sur la lame de microarray ne correspondent pas au transcrit cherché ; ii) les autres gènes de la région sont mutés ; iii) l'hétérochromatine localisée en 1q12 pourrait retentir sur le profil d'expression des gènes des régions contiguës [Fournier et al., 2010]. *BCL9* présentait un taux de messager élevé, 11.23. Il est vraisemblablement que le gène *BCL9* soit le gène driver de la région 1q21. En effet, *BCL9* est impliqué dans des translocations récurrentes dans les LAL B [Willis et al., 1998]. Une dysrégulation de *BCL9* a également été rapporté dans le mélanome malin et dans le cancer du colon [Mani et al., 2009]. *BCL9*, composant de la voie Wnt/ β , augmente l'activité transcriptionnelle médiée par

la β caténine et augmente la prolifération cellulaire, la migration, l'invasion-métastase. Il semble que cette action de *BCL9* passe par l'activation de *MYC* et *CCND1* [Mani et al., 2009].

Sur le 2p16.2, en dépit de l'amplification de l'oncogène *REL*, le taux de messenger de ce gène s'est avéré normal. Ce résultat pourrait être expliqué par une mutation gène *REL*, ou par l'absence de la sonde adéquate sur la lame de microarray. Le gain sur la région 8q24 impliquait *MYC*. Le taux de messenger de dernier n'était pas corrélé au gain de la région de *MYC*. L'ensemble des 15 lignées ne présentait pas un taux élevé de *MYC*. Il a été démontré que les cellules du centre germinatif, dont dérivent les LB, n'expriment pas *MYC* à l'état de base. Ceci suggère que les translocations t(*MYC* ;*IG*) aboutissent à une expression ectopique de *MYC* plutôt qu'une dérégulation de son expression comme cela a été antérieurement rapporté [Boxer and Dang, 2001]. Le gain sur la région 11q23.1 impliquait le gène *POU2AF1* qui était surexprimé. Il code pour un coactivateur spécifique des lymphocytes B et il est amplifié dans le myélome multiple.

Sur le 13q, Les gènes *ABCC4*, *GPC5* *GPC6* et *SOX21* n'étaient pas surexprimés. Par contre le polycistron mir-17-92 était surexprimé. Ce résultat a été rapporté récemment [Schiffman et al., 2011 ; Scholysik et al., 2010] Ce mir joue un rôle crucial dans la lymphopoïèse B, il permet le passage du stade pro-B au stade pré-B [Yendamuri and calin, 2009]. Il a été rapporté que mir-17-92 accélère le processus de lymphomagenèse induite par *MYC* [Mu et al., 2009]. En effet, mir-17-92 est une cible directe de *MYC* et les 2 gènes agissent d'une manière synergique. Par ailleurs, les souris porteuses du transgène mir-17-92 développent une maladie lymphoproliférative et décèdent prématurément [Xiao et al., 2008]. Les lymphocytes de ces souris présentent un taux de prolifération élevé et une baisse de l'apoptose. Il a démontré que mir-17-92 suppriment l'expression du gène suppresseur de *PTEN* et *Bim* qui a un rôle proapoptotique. L'action coordonnée de *MYC* et mir-17-92 n'est pas décryptée dans sa totalité et d'autres gènes interviennent dans ce circuit notamment *E2F1* qui est altéré dans les LB [Scholysik et al., 2010].

Une perte hémizygote de *FHIT* était observée dans 4 lignées et seulement une seule lignée, BL84, présente un taux de transcrit bas de *FHIT* concordant avec la perte du gène. Il est indispensable d'étudier ces transcrits par une autre technique indépendante.

La perte sur le 9p21, qui impliquait le gène *CDKN2A/CDKN2B*, était observée dans 2 lignées. Dans un seul cas, BL2, la perte biallélique du locus *CDKN2A/CDKN2B* était corrélée à une baisse du transcrit correspondant. En revanche, le transcrit du *CDKN2B* était

très bas dans toutes les lignées. Ce résultat a été rapporté dans une série de tumeurs LB analysées par des SNP array où la perte sur le 9p21 n'intéressait que le locus CDKN2B [Scholysik et al., 2010]. La discordance entre le taux bas de p15INK4B/CDKN2B et les CNA, reflète une régulation génique complexe du locus INK4A/INK4B mais probablement déterminante dans la progression tumorale.

Sur le 17p, la perte était relativement grande mais comportait toujours TP53. Elle était observée dans 2 lignées. Néanmoins le transcrit de ce gène n'était pas très bas, même en cas de perte biallélique de TP53 (lignée Ramos, **Tableau 11**). Ce transcrit de TP53 était inchangé même en cas de surexpression de MDM2 qui réduit normalement la survie de la protéine de p53. Les mutations de TP53 ont été rapportées dans 33%-40% of biopsies de LB [Imamura et al., 1994 ; Kornblau et al., 1991] et 60%-83% des lignées cellulaires [Farrell et al., 1991 ; Wiman et al., 1991]. Ces mutations sont associées à une inactivation conséquente de la protéine p53 [Vousden et al., 1993]. Dans notre cas il serait intéressant d'étudier le transcrit de TP53 par une autre technique indépendante pour pouvoir conclure.

La corrélation des résultats d'aCGH à ceux du transcriptome souligne de nouveau l'hétérogénéité génétique dans les LB. Le transcriptome et le mirnome suggèrent que les gènes remaniés en conséquence à des anomalies génomiques agissent d'une manière synchrone avec MYC.

High Resolution Genome-Wide Analysis of Chromosomal Alterations in Burkitt's Lymphoma

Saloua Toujani^{1,2}, Philippe Dessen^{1,2,3}, Nathalie Ithzar^{1,2}, Gisèle Danglot^{1,2}, Catherine Richon³, Yegor Vassetzky^{2,4}, Thomas Robert³, Vladimir Lazar³, Jacques Bosq⁵, Lydie Da Costa^{5B}, Christine Pérot⁶, Vincent Ribrag⁵, Catherine Patte⁵, Joëlle Wiels^{2,4}, Alain Bernheim^{1,2*}

1 CNRS, FRE2939, Génomique Cellulaire des Cancers, Institut Gustave Roussy (IGR), Villejuif, France, **2** Université Paris-Sud, Orsay, France, **3** IGR, Functional Genomics Unit, Villejuif, France, **4** CNRS, UMR 8126, IGR, Villejuif, France, **5** IGR, IFR 54, Villejuif, France, **6** Cytogenetic Laboratory, Hôpital Saint Antoine, Paris, France

Abstract

Additional chromosomal abnormalities are currently detected in Burkitt's lymphoma. They play major roles in the progression of BL and in prognosis. The genes involved remain elusive. A whole-genome oligonucleotide array CGH analysis correlated with karyotype and FISH was performed in a set of 27 Burkitt's lymphoma-derived cell lines and primary tumors. More than half of the 145 CNAs <2 Mb were mapped to Mendelian CNVs, including *GSTT1*, glutathione *s*-transferase and *BIRC6*, an anti-apoptotic protein, possibly predisposing to some cancers. Somatic cell line-specific CNVs localized to the *IG* locus were consistently observed with the 244 K aCGH platform. Among 136 CNAs >2 Mb, gains were found in 1q (12/27), 13q (7/27), 7q (6/27), 8q(4/27), 2p (3/27), 11q (2/27) and 15q (2/27). Losses were found in 3p (5/27), 4p (4/27), 4q (4/27), 9p (4/27), 13q (4/27), 6p (3/27), 17p (3/27), 6q (2/27), 11pterp13 (2/27) and 14q12q21.3 (2/27). Twenty one minimal critical regions (MCR), (range 0.04–71.36 Mb), were delineated in tumors and cell lines. Three MCRs were localized to 1q. The proximal one was mapped to 1q21.1q25.2 with a 6.3 Mb amplicon (1q21.1q21.3) harboring *BCA2* and *PIAS3*. In the other 2 MCRs, 1q32.1 and 1q44, *MDM4* and *AKT3* appeared as possible drivers of these gains respectively. The 13q31.3q32.1 <89.58–96.81> MCR contained an amplicon and *ABCC4* might be the driver of this amplicon. The 40 Kb 2p16.1 <60.96–61> MCR was the smallest gained MCR and specifically encompassed the *REL* oncogene which is already implicated in B cell lymphomas. The most frequently deleted MCR was 3p14.1 <60.43–60.53> that removed the fifth exon of *FHIT*. Further investigations which combined gene expression and functional studies are essential to understand the lymphomagenesis mechanism and for the development of more effective, targeted therapeutic strategies.

Citation: Toujani S, Dessen P, Ithzar N, Danglot G, Richon C, et al. (2009) High Resolution Genome-Wide Analysis of Chromosomal Alterations in Burkitt's Lymphoma. PLoS ONE 4(9): e7089. doi:10.1371/journal.pone.0007089

Editor: Syed A. Aziz, Health Canada, Canada

Received: May 7, 2009; **Accepted:** August 20, 2009; **Published:** September 17, 2009

Copyright: © 2009 Toujani et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The work was financed by the Canceropole Ile de France, the CNRS and the IGR. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: bernheim@igr.fr

‡ Current address: Laboratoire d'Hématologie, Hôpital Robert Debré, Paris, France

Introduction

First described by D. Burkitt in 1958, Burkitt's lymphoma (BL) is a monoclonal proliferation of malignant B lymphocytes. It is a mature aggressive lymphoma that accounts for 30 to 50% of lymphomas in children and for 1 to 2% in adults [1]. Its original description, a jaw tumor, led to the discovery of Epstein-Barr virus (EBV). Because of its high frequency in children living in the African equatorial regions (the Burkitt Belt), heavily infected by EBV and malaria [2] this viral linked tumor was qualified of endemic. It was identical, by morphology (cytology and pathology), immunophenotype and chromosome abnormalities to mature aggressive lymphomas, mainly EBV negative, that were observed in all the world. This type of BL, coined as sporadic, accounts for 30 to 50% of lymphomas in children and for 1 to 2% in adults [1]. The treatment of endemic and sporadic BL rely on high dose of chemotherapy with good results in children.

The hallmark of this disease is the t(8;14) translocation or one of the variant t(8;22) or t(2;8) translocations, associating the *MYC* gene (located at 8q24) to one of three immunoglobulin loci [3,4].

These balanced chromosomal translocations result in constitutively deregulated *MYC* expression by position effect, whatever the break point location and the transcription orientation [5], Hypothesized as a transforming factor located on 8q24, *MYC* was the first oncogene isolated in a human malignancy, responsible for maintaining the balance of cellular proliferation, differentiation, adhesion and apoptosis.

By virtue of the translocation, *MYC* is in the position of the variable part of Ig genes [5] that is subjected to hypermutation by the AID activation [6].

Additional chromosomal abnormalities, detected in 70% of pediatric BL, seem to be important factors influencing clinical outcome [7,8]. Gain of 7q and del(13q) seems strong genetic indicators of a poor prognosis [9]. Although many of these chromosomal anomalies undoubtedly play major roles in the pathogenesis of BL, the genes involved have remained elusive.

High resolution CGH array (aCGH) [10,11] is a powerful method to identify pathogenic DNA copy-number changes (gain, amplification and deletion) on a genome-wide scale, and to map these changes to genomic sequence. It does not detect balanced

structural rearrangements such as translocations. It is based on isolation of genomic DNA isolated from test and reference cell populations, differential labeling with fluorescent dyes and cohybridization with a high-resolution DNA microarrays. Oligonucleotide CGH arrays enable genome-wide detection of DNA copy-number changes down to 15~20 Kb.

Recurrent chromosomal rearrangements in various tumors define Minimal Critical Regions (MCR) that are often small enough to pinpoint the few candidate genes in oncogenesis that lie in this chromosomal region. Many of these MCR contain known oncogenes and tumor suppressor genes and also help identify new genes that are critical in lymphomagenesis.

In this study, whole-genome 44K and 244K oligonucleotide arrays were used for fine mapping of recurrent copy number alterations (CNA) present in a set of 27 human Burkitt's lymphomas. These results allow a global view of genomic instability at a high level resolution (50 Kb on average) and the identification of new gene loci that are recurrently altered.

Materials and Methods

Primary Tumors and Cell Lines

The patients were studied according to various protocols approved by the French Ethics Committees. Between 1995 and 2005, 13 BL tumors were collected and frozen at disease onset. Tumor specimens were reviewed by an expert hematopathologist according to current WHO criteria for morphologic, immunophenotypic, and cytogenetic features.

Fifteen Burkitt's lymphoma-derived B cell lines were studied: BL2, BL31, BL41, BL70, BL84, BL104, BLLAL, Ly47, Ly91, Namalwa, Ramos, Oku, Salina, Seraphina and BLMer (derived from the relapse of tumor case 29124, thus counting one BL for both samples). They were cultured at 37°C in complete medium (GIBCO-BRL, Scotland) containing 2 mM L-glutamine, 1 mM pyruvate, 20 mM glucose, 20 µg/ml gentamicin and supplemented with 5% heat-inactivated fetal calf serum.

Ethics Statement

No ethics statements are required for this work.

Cytogenetic analysis

Cytogenetic analysis was performed on metaphase spreads obtained from tumor biopsy or bone marrow specimens and cell lines. In each case, 15 RHG-banded metaphases were analyzed when possible. Clonal chromosomal abnormalities were described according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature [12].

Fluorescence in situ hybridization (FISH) studies

A set of commercial probes was used to diagnosis in some cases and to resolve discrepancies between aCGH results and karyotype data (Supplementary Table S1). To confirm DNA copy number changes obtained from aCGH, a FISH analysis was carried out using individual probes on cytogenetic preparations. Five BAC clones (Table S1) were selected from Pieter De Jong libraries (<http://www.chori.org/bacpac/>) according to their position on the UCSC human genome (<http://www.genome.ucsc.edu/>). Purified BAC DNA was labeled by random priming in the presence of Alexa 488-dUTP (green) and Alexa 594-dUTP (red) (Abbott). The quality of the probes was verified by hybridization to metaphase spreads of a negative control. The preparations were observed with an epifluorescence microscope and images captured with a Vysis imaging station. Between 20 and 40 metaphase spreads and 100 nuclei were analyzed for each sample.

Oligonucleotide aCGH

Tumor genomic DNA was isolated according to Qiagen protocols with modifications [13]. Samples containing a t(8;V) were detected by cytogenetic analysis and/or FISH (dissociation of the MYC signal) in more than 60% of cells. High-molecular-weight genomic DNA was extracted from the cell lines with a DNeasy extraction kit (Qiagen).

Patient tumor samples and cell lines were analyzed using 44K and 244K microarrays (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) respectively. Only cell lines were processed as dye-swap pairs. In all experiments, sex-matched DNA from a pooled human female or male individual (Promega, Madison, WI) was used as the reference. Oligonucleotide aCGH processing was performed as detailed in the manufacturer's protocol (version 4.0; <http://www.agilent.com>). Data were extracted from scanned images using feature extraction software (version A.8.5.3, Agilent). Raw data text files from the latter were then imported for analysis into CGH Analytics 3.4.40. Aberrations were detected with the ADM2 algorithm and filtering options of a minimum of 5 probes and $\text{abs}(\log_2\text{Ratio}) > 0.3$. Aberration segments were individually reviewed using build 35, hg17 of UCSC [14]. Anomalies that were localized to regions with high-copy repetitive or GC-rich DNA sequences including telomeric regions were excluded. We defined gains and losses for the oligonucleotide dataset as a linear ratio ≥ 1.2 or ≤ 0.8 respectively. High and low-level amplification events were defined as a linear ratio ≥ 4 or $2 < \text{ratio} < 4$ respectively. The data are described in accordance with MIAME guidelines and have been deposited in ArrayExpress under E-TABM-703 accession number.

Results

Cytogenetic results

The karyotype of the primary tumor was complex in 4 cases (Table 1).

Among the 15 cell lines, 13 exhibited a complex karyotype (Table 2); 11 harbored the same chromosomal abnormalities that were previously described [15,16], while BLLAL, BLMER, OKU and Salina have not been reported elsewhere. The hallmark t(8;14) translocation was detected in 18 tumors or cell lines. The variant t(8;22) translocations were found in 1 tumor and 5 cell lines and the t(2;8) were found in 2 tumors and 1 cell line.

aCGH CNA correlate with conventional and molecular cytogenetic results. A strong correlation between aCGH results and karyotype analysis was observed for CNA ≥ 5 Mb. Some larger CNA were detected in cell lines exclusively by aCGH. For example, in the Ly47 cell line, a gain of a 25.75 Mb region on 16q21qter <62.92–88.67> could not be detected by karyotype analysis (Fig. 1 A+B). This gain was confirmed by FISH (Fig. 1C). In the Ly91 cell line, a nonsegmented gain of 1q was observed on aCGH (Fig. 1E) that allowed FISH to identify a der(13)t(1;13)(q32.1;p12) present in only 20% of the cells (Fig. 1 D+F). Often aCGH refined the breakpoints detected by conventional cytogenetics. In addition to primary BL translocations, four other balanced translocations were only shown by karyotype analysis without any visible scar at 20 Kb resolution (Table 2).

Analysis of small-scale copy number alteration: CNVs

Small sized CNA ($n = 145$) defined as ≤ 2 Mb long, ranging from 0.03 to 2 Mb in size, were detected in 140 occurrences originating from 244 K arrays, and 5 from 44 K. More than half of these small CNA were found to be Mendelian CNVs. This was tested by examining the sequence present at each CNA, with the University of California at Santa Cruz Genome Browser (<http://genome.cse.ucsc.edu>) and Toronto (<http://projects.tcag.ca/variation>) tools.

Table 1. Small and large scale chromosomal imbalances in Burkitt tumors.

Tumors	Age (years)/Sex	CNA	Coordinates (Mb)	Cytogenomic karyotype
28787	4/F	-2p23.1p16.3	<31.32–49.17>	46,XX,der(3)t(3;?)(q2;?),t(8;14)(q24.2;q32.3)[15]
		-3q26.3q27.1#	<183.94–185.30>	
		+7q21.1qter	<87.24–158.6>	
		-12q21.3#	<79.246–80.19>	
29123	8/M	+1q21.1q25.3	<143.72–182.28>	47,XY,dup(1)(q21q25),t(8;14)(q24.2;q32.3), del(17)(p11),+ mar[15]
		-13q21.1q21.2	<52.77–57.69>	
		+13q21.3q33.1	<69.49–103.22>	
		-13q33.1q34	<103.63–109.46>	
		-17pterq11.1	<0.04–22.33>	
29124	32/M	no statistically significant CNA		46,XY,t(8;14)(q24.2;q32.3)[150]
29125	68/F	-1p31.1p12	<71.21–119.36>	47–49,XX,del(1)(p13p31),t(2;8)(p11.2;q24.2), der(3)t(3;?)(q27;?),-9,+ add(11)(p15),+ mars[15]
		+1q21.1q32.1	<148.08–205.17>	
		-3q28qter	<190.07–194.87>	
		-4p16.1p14	<10.88–37.52>	
		-4q32.1qter	<161.36–191.12>	
		-9pterp13.3	<0.32–33.06>	
		-9q12q34.1	<66.22–129.48>	
		-11pterp13	<3.3–32.41>	
		+11q22.1qter	<101.45–133.95>	
		-13q14.1q14.3	<40.4–51.07>	
		29127	9/M	
29139	82/M	-1p36.3p35.3	<3.64–29.63>	47,XY,der(3)del(3)(p?)t(3;?)(?;?),t(8;14) (q24.2;q32.3.3),+mar[15]
		-3pterp11.1	<0.22–90.26>	
		+3q11.2qter	<95.29–199.28>	
		-6q13q22.1	<75.21–114.87>	
		-9p21.3[x0.25] #	<21.73–22.31>	
		+10pterp14	<0.13–9.39>	
		-11q13.5qter	<75.18–133.72>	
		-13q12.1q14.1	<20.35–42.57>	
		-13q21.2q31.3	<59.28–93.42>	
		-13q32.3qter	<99.06–112.61>	
		-14q12q21.3	<26.52–43.84>	
		+18q11.1qter	<16.9–76.08>	
29140	12/M	no statistically significant CNA		46,XY,t(8;22)(q24.2;q11.2)[15]
29141	41/M	+1q21.1q25.3	<144.28–181.75>	46,XY,t(8;14)(q24.2;q32.3),der(13)t(1;13)(?;?)[15]
		-13q31.1q31.2	<84.36–86.95>	
		-13q33.1qter	<103.63–114.07>	
29142	61/F	no statistically significant CNA		46,XX,t(8;14)(q24.2;q32.3)[15]/idem,del(4)(q24q31)[4]
29143	62/M	no statistically significant CNA		46,XY,t(8;14)(q24.2;q32.3)[15]
29145	57/M	+1q21.1q25.3	<143.72–178.73>	46,XY,dup(1)(q21q25),der(14)t(8;14)(q24.2;q32.3)[15]
		+8q24.2qter	<128.81–146.25>	
		-11q24.1qter	<120.99–133.76>	
29146	55/M	no statistically significant CNA		46,XY,t(8;14)(q24.2;q32.3)[15]
29147	15/M	+2p16.1#	<60.96–61>	46,XY,t(2;8)(p11.2;q24.2),add(13)(q?) [15]
		+8p23.1#	<10.1–11>	
		+13q31.3q32.3	<89.58–99.61>	
		-13q32.3qter	<99.87–114.07>	

Results from chromosomal banding are in plain characters and # indicate small size CNAs.
doi:10.1371/journal.pone.0007089.t001

Table 2. Small and large scale chromosomal imbalances in Burkitt cell lines.

Cell Lines	CNA	Coordinates (Mb)	Cytogenomic karyotype
BL2	+1q21.1q31.3	<142.11–193.88>	46,XY,der(1)dup(1)(q21.1q31.3)dic(1;7)(q31.3;q10),
	–6q24.1qter	<142.01–170.82>	dic(1;6)(q10;q24.1),t(8;22)(q24.2;q11.2),
	+7q11.2qter	<61.47–158.57>	del(10)(p12.1),der(13;13)(q10;q10)[15]
	–9p21.3[x0,05] [#]	<21.89–22.54>	
	–10pterp12.1	<0.11–38.66>	
	+13		
BL31	–15q14 [#]	<34.61–35.52>	
	+1q21.1q31.1	<142.56–184.06>	46,XY,dup(1)(q21.1q31.1),t(8;14)(q24.2;q32.3),
	–10p14p11.2	<11.25–36.95>	del(10)(p14p11.2),der(13)del(13)(q13.1q31.2)
	–13q13.1q31.2	<32.35–87.94>	dup(13)(q31.2qter)[15]
BL41[§]	+13q31.2qter	<88.01–112.92>	
	+1q12q21.1	<141.46–142.87>[x2.6]	84–89,XXYY,dup(1)(p36.1p35.1),dup(1)(q12q25.3),
	+1q21.1	<142.87–143.28>[x3.8]	del(2)(p16.3q36.3),del(3)(q13.1q21.3)x2,–4,
	+1q21.1q25.3	<143.28–180.03>[x2.6]	der(4)(4pter->q32.2::?->?::->4q35.1->4qter),
	+1q32.1 [#]	<200.97–201.36>	del(6)(6p12.3q12),+7x2,–8,
	+2p16.1p15	<60.82–62.21>[x3]	t(8;14)(q24.2;q31.3)x2,del(9)(p24.1q22.1),
	+2p15p14	<62.22–65.11>[x1.8]	del(11)(p15.1q22.3),del(16)(p11.2q23.2),
	–2p12qter	<79.22–230.59>[x0,75]	del(17)(p11.2)x2,dup(17)(q21.3qter),
	–3q13.1q21.3	<106.02–131.82>	del(18)(p11.31q22.3),+20,
	–3q26.3	<176.02–178.83>	der(22)t(11;22)(q22.3;q13.3),mar(s)[15]
	–4p16.2q13.3	<4.92–71.26>[x0,75]	
	–4q22.1q35.1	<90.69–187.4>	
	–5q33.1 [#]	<150.42–151.29>	
	–5q33.2 [#]	<154.144–155.125>	
	–6pterq12	<0,1–67.66>[x0,75]	
	+7		
	–8		
	–9p24.1p21.1	<7,5–32,13>[x0,75]	
	–9p13.2q33.1	<37,92–119,58>[x0,75]	
	–11		
	+12p13.3 [#]	<5,88–7,27>	
	–15q14 [#]	<33,47–33,5>	
–16			
–17pterp11.2	<0,02–19,68>		
+17p11.2 [#]	<19,69–21,44>		
+17q21.3qter	<41,06–78,65>		
–18			
+20			
–22q13.3qter	<44,82–49,5>		
BL70	+1q21.2q25.2	<146,81–176,59>	47,XY,dup(1)(q21.2q25.2),del(2)(q13q24.1),
	–2q13q24.1	<110,18–156,88>	+7,t(8;14)(q24.2;q32.3),t(12;22)(q12;q13)[15]
	+7		
BL84	+1		50,XY,+Y,+1,der(3)del(3)(p22.1p12.3)del(3)
	–3p22.1p12.3	<41,97–76,58>	(q26.2q28),+5,t(8;22)(q24.2;q11.2),+der(8)t(8;22)
	–3q26.2 [#]	<172,08–172,15>	(q24.2;q11.2)[15]
	–3q26.3q28	<184,06–191,84>	
	+5		
	+8pterq24.2	<0,06–129,15>	
+22q11.2q13.3	<21,58–49,05>		
+Y			

Table 2. Cont.

Cell Lines	CNA	Coordinates (Mb)	Cytogenomic karyotype
BL104	-4q13.2q21.1	<67,38–77,21>	47,XX,t(1;3)(q24;p25),t(8;12)(p23;q24),
	-4q28.3q31.2*	<136,56–151,65>	t(8;22)(q24.2;q11.2),+inv(12)(?p13q24.2)[8]/
	-4q34.1 [#]	<174,14–174,94>	47,XX,t(1;3),der(4)del(4)(q13.2q21.1)t(4;?)(q21.1;?),
	-4q34.3q35.1	<182,3–186,69>	der(4)del(4)(q28.3q35.1)t(4;?)(q35.1;?);,
	-5p13.2 [#]	<36–37,44>	t(8;22),der(9)del(9)(q21.3q31.1)t(4;9;12;?)(?;?q31;?);
	-9q21.3q31.1	<79,24–100,39>	,der(12)t(5;12)(q13.2;?)+der(12)(4;5;12)(?;?;?) [7]
	+12		
BL LAL	no statistically significant CNA		46,XY,t(8;14)(q24.2;q32.3),t(12;22)(q12;q11.2)[15]
BLMer	-3p14.2 [#]	<60,28–60,64>	47,XY,t(5;22)(q12;q13),t(8;14)(q24.2;q32.3),
	-5q11.2q12.13 [#]	<58,88–59,12>	+13,der(18)t(13;18)(q12.2;q21.2),
	+13q12.2qter [x2]	<27,74–114,12>	der(19)del(19)(q13.2qter)dup(19)(q13.1q13.2)[15]
	-18q21.2qter	<51,67–76,11>	
	+19q13.1q13.2	<40,69–46,22>	
	-19q13.2qter	<46,54–63,78>	
Ly47	+1q43q44	<236,62–245,43>	47,XY,+Y,dup(1)(q43q44),der(6)t(3;6)(6pter->6q24.1:
	-3p14.2 [#]	<60,36–60,54>	:3q26.3->3qter),der(8)(8pter->8q24.2::22q11.2->22q12.3
	+3q26.3qter	<176,05–199,38>	:8q21.2.->8q24.2::22q11.2->22qter),
	-6q24.1qter	<142,16–170,83>	der(11)(11pter->11q27.3:16q21->16qter),
	+8q21.2q24.2	<86,91–129,16>	del(14)(q31.3qter), der(18)(11q27.3::18p11->18qter),
	-14q31.3qter	<88,09–106,34>	der(22)t(8;22)(q24.2;q11.2)[15]
	+16q21qter	<62,92–88,67>	
	+22q11.2q12.3	<21,58–31,49>	
+Y			
LY91	no statistically significant CNA		46,XX,t(2;8)(p11.2;q24.2)[12]/46,XX,idem,
			der(13)t(1;13)(q32.1p12)[3]
Namalwa	+1pterp36.1	<1,74–18,8>	45X,?-Y,dup(1)(pterp36.1),dup(1)(q11q31.1),
	+1q12q31.1	<141,5–186,86>	der(3)t(3;4)(3qter->3p11.1:4p11->4qter),
	+1q44 [#]	<240,24–241,35>	der(3)(3pter->3q29::5q12.1->5q23),-4,
	-3p25.1p11.1	<15,3–90,39>	der(5)(5pter->5q12.1::5q23->5qter),
	+3q26.1qter	<163,87–199,32>	der(6)t(3;6)(3q26.3;6p22.2),+7, dup(9)(q34.1qter),
	-4pterp11	<0,62–48,92>	der(10)del(10)(q22.1q23.1)t(3;10)(q28;p24),
	-5q11.2q12.1	<53,99–61,52>	der(14)del(14)(q12q24)t(8;14)(q24.2;q32.3),
	-6pterp22.2	<0,33–24,68>	der(17)t(3;13;17)(3pter::17p12::hsr13q22->q32:
	+7		:17p11.2->17qter),dup(18q21.1q21.3)[17]
	+9q34.1qter	<127,34–138,34>	
	-10q22.1q23.1	<71,66–83,88>	
	+13q22.3q31.2	<76,54–92,10>[x4]	
	+13q31.3q32.1	<92,11–95,82>[x5,7]	
	-14q12q24.3	<31,73–75,3>	
+17p12p11.2	<15,47–21,1>		
+18q21.1q21.3	<44,13–55,48>		
OKU	+2pterq21.3	<0,02–136,96>	46,XY,+del(2)(q21.3),-6,t(8;22)(q24.2;q11.2)[5]/
	-8pterp12	<0,16–29,88>	47,XY,+del(2)(q21.3),
	+10q22.1qter	<71,61–135,31>	der(8)(22qter->22q11.2::8q24.2->8p12::10q22.1->10qter),
	+15q26.2qter	<92,15–100,21>	der(8)t(8;15)(8qter->8p27.3::15q26.2->15qter)[11]
Ramos**	-3p14.2 [#]	<60,43–60,53>	45,X,?-Y,del(3)(q12.3q21.3),inv(4)(p14q21),
	-3q12.3q21.3	<102,69–129,51>	del(6)(q22.3q23.2),t(8;14)(q24.2;q32.3),
	+3q23qter	<143,27–199,32>	der(16)t(7;16)(q11.2;p13), der(17)(17qter->17p11.2:
	-5q31.2 [#]	<138,16–138,27>	:hsr(13)(q14q31),

Table 2. Cont.

Cell Lines	CNA	Coordinates (Mb)	Cytogenomic karyotype
	-6q22.3q23.2	<121,26–134,4>	<i>der(18)(18pter->18q21.3::18q12.1->18q21.3:</i>
	+7q11.2qter	<72,27–158,61>	<i>:3q23->3qter)+r [11]/44,idem,-r[4]</i>
	+11q23.1 [#]	<110,62–110,81>	
	-13q12.1q14.1	<25,14–39,85>	
	+13q14.1	<40,25–45,19>	
	+13q21.3q31.1	<70,41–85,36>	
	-13q31.1q31.2	<85,4–87,85>	
	+13q31.2q33.1	<87,87–101,55>	
	-13q33.1qter	<101,56–109,37>	
	-17pterp11.2	<0,02–20,58>	
	+18q12.1q21.3	<27,21–53,62>	
	-18q21.3qter	<52,65–76,11>	
	-Xq21.3	<88,85–92,1>	
Salina	+1q21.2q31.3	<146,66–192,35>	46,XX,dup(1)(q21.2q31.1),t(8;14)(q24.2;q32.3)[9]/
	-4p15.3p15.2	<18,2–23,74>	46,sl, <i>der(4)t(4;10)(q34.3;q23.3)[4]/</i>
	-4q34.3q35.2	<179,18–191,31>	46,Sdl1, <i>der(4)t(4;?)</i> (4p15.2;?) ^[2]
	+10q23.3q24.3	<96,97–105,61>	
Séraphina	+1q21.1qter	<142,57–245,43>	48,XX, <i>der(2)t(1;2)</i>
	+2pterp24.3	<0,02–14,02>	<i>(1qter->1q21.1::2p25->p24.3::2p25->2qter)+4,</i>
	+4		<i>der(6)t(6;?)</i> (?:6p22.1->6qter),t(8;14)(q24.2;q32.3),
	-5q33.3 [#]	<158,08–158,18>	+15, <i>dup(16)(q23.2qter),del(18)(p11.2)[15]</i>
	-6p24.2p22.1	<11,2–28,88>	
	+8q24.2 [#]	<128,71–128,95>	
	+15		
	-18p11.3p11.2	<0–15,11>	
	+16q23.2qter	<79,59–88,69>	
	-20q11.2 [#]	<32,51–32,65>	

*BL104 has a complex rearrangement on 4q.

**Ramos has a very complex rearrangement on 13q.

[#]indicate small size CNAs.

[§]In BL41, the 1q12q25.2 gain was segmented due to the presence of two amplicons.

Results from chromosomal banding are in plain characters, those from FISH (see supplementary data table 1) are in bold and those from aCGH are in italic.

doi:10.1371/journal.pone.0007089.t002

Eighty one of the 145 small CNA were mapped to Mendelian CNV (mCNV) in the Database of Genomic Variants. Among these mCNV, there were very frequent CNVs overlapping the large group of olfactory receptor genes, the UGT2B17 and UGT2B28 genes. The genes encoding the HLA group were also detected within these common CNVs. In our set, the GSTT1 gene exhibited the most frequent CNVs. This locus was gained (5 copies) in 7 cases and homozygously lost in three cases.

Immunoglobulin Somatic Copy Number Variation

Thirty-eight of the small CNA were mapped to the immunoglobulin loci at chromosomal subbands 2p11.2 (IGK), 14q32.3 (IGH) and 22q11.2 (IGL) (Table S2, Figure 2, Figure S1, Figure S2, Figure S3, Figure S4, Figure S5, Figure S6, Figure S7, Figure S8, Figure S9, Figure S10, Figure S11). These acquired monoclonal alterations were ascertained only by the 244 K aCGH platform. The IGH locus was rearranged in all cell lines (14/15 on the two chromosomes), with a specific pattern for each cell line and it expressed surface IgM. In addition, IGK gene rearrangements were also detected in all cell lines (8/15 biallelic).

IGK was homozygously rearranged in the only t(2;8). IGL locus somatic rearrangements were observed in 10 cell lines (7 biallelic). The other 5 cell lines, whose IGL locus was in germline configuration, only exhibited surface IgK expression (Table S2). In the t(8;22) the IGL gene was rearranged on the two alleles in 4 cases. The only hemizygote was observed in the OKU cell line (Figure S8) which expressed IGK. These results, consistent with the germinal center nature of BL cells, and the processes of maturation of immunoglobulin, show a very good concordance between immunophenotype and aCGH results.

Other Small Somatic Copy Number Alterations

Among the 26 remaining small-scale CNA (Tables 1 and 2), 16 imbalances were localized to either intergenic regions or predicted gene sequences of unknown function. The significance of these CNA remains to be determined. Ten imbalances were mapped to regions containing characterized genes, many of which play roles in tumorigenesis and B-cell differentiation and proliferation. These genes allowed either the narrowing of the minimal critical regions or remained as a single CNA (see below).

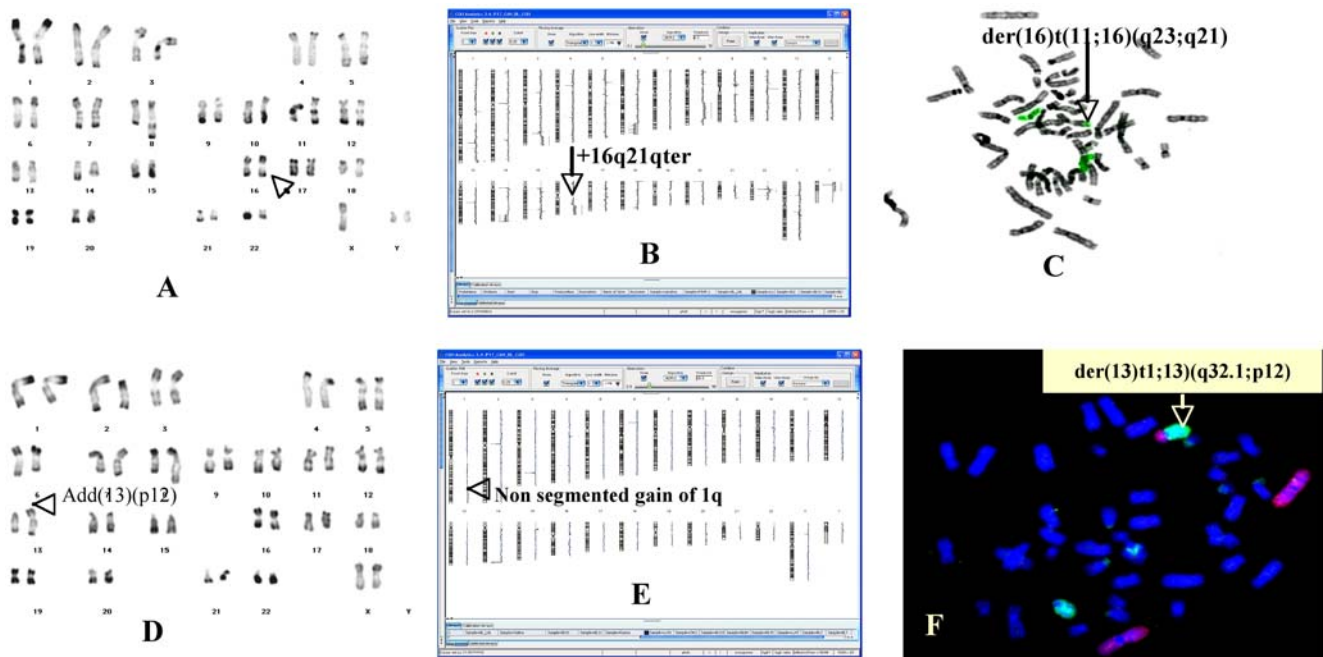


Figure 1. Correlation karyotype-high resolution aCGH. **A** RHG-banded karyotype of Ly47 showing 2 normal chromosome 16 (arrow). **B** Karyogramme of Ly47 cell line showing a gain of chromosome 16 (arrow). **C** FISH with whole painting of chromosome 16 confirmed aCGH result. The additional piece of chromosome 16 was translocated at the long arm of chromosome 11. **D** RHG-banded karyotype of Ly91 showing an add(13)(p12) which is presented in 20% of cells (arrow). **E** Karyogramme of Ly91 cell line showing a non segmented gain on 1q (arrow). **F** FISH with whole painting of chromosome 1 (red) and 13 (green) allowed to identify the origin of the material translocated at 13p. Hence, the add(13) became a der(13)t(1;13)(q32.1;p12).
doi:10.1371/journal.pone.0007089.g001

Analysis of large-scale copy number alteration

The total number of CNA >2 Mb was 136 in cell lines and tumors (Table 1). There were 17 whole chromosome gains or losses and 119 structural CNA (sCNA). The distribution of these sCNA was bimodal, with primary tumors or cell lines tending to have either a large number or no large CNA. From the frequency analysis, we observed the general trends of 1q (12/27), 13q (7/27), 7q (6/27), 8q (4/27), 2p (3/27), 11q (2/27) and 15q (2/27) gains whereas losses were more frequent at the following chromosomal regions: 3p (5/27), 4p (4/27), 4q (4/27), 9p (4/27), 13q (4/27), 6p (3/27), 17p (3/27), 6q (2/27), 11pterp13 (2/27) and 14q12q21.3 (2/27).

Minimal critical region altered in BL

Some of these CNA were recurrent across different samples and allowed us to define 21 MCRs of gain/amplification or loss/deletion (Table 3). A nearly equal number of lost and gained MCR were defined and their median size was 4.96 Mb (range 0.04–71.36 Mb).

The most frequent gained region was 1q followed by 13q. Three different MCRs were mapped to 1q. The proximal one was mapped to 1q21.1q25.2. The BL 41 cell line exhibited a 6.3 Mb amplicon localized at 1q21.1q21.3 <142.87–149.17 Mb> (Fig. 3A+B+C). The region exhibiting the highest copy number (as many as 7 copies), contained 14 genes and among them, *BCA2* and *PLAS3* seemed to be possible oncogenes. Two other MCRs were isolated on 1q (Table 3). Three different MCRs were mapped to 13q (Table 3). The most frequent one mapped to 13q31.3q32.1, contained the Namalwa cell line amplicon (Fig. 3F). A 240 Kb MCR at 8q24.2 encompassed *MYC*. A loss of 13q33.1q34 was only found in tumors. In our set, the most frequent deleted region was 3p14.2 followed by 9p21.3 and a deletion of 17p (Table 3).

Discussion

In this work, we report a fine mapping of chromosomal imbalances in a set of 27 BL primary tumors and cell lines. Whole-genome 44 K and 244 K oligonucleotide arrays were used to analyze recurrent copy number alterations present in tumors and cell lines respectively.

Comparison of the 15 dye-swap pairs from cell lines revealed identical aberrations. In most cases, the boundaries of the chromosomal aberrations were absolutely identical. The dye-swap helped to reduce the background level. Whole-genome oligonucleotide microarrays aCGH analysis allowed us to delineate the chromosomal imbalances at 15~20 Kb resolution in the 15 cell lines (244 K) and at 70 Kb average resolution in the 13 primary tumors (44 K).

Each sample was also investigated using conventional cytogenetics. Close agreement between karyotype data and whole-genome aCGH CNAs was observed. When discrepancies occurred, they were mostly explained, *i*) by a lack of detection due to karyotype resolution; *ii*) by aCGH locally blurred heterogeneous cell clones, or normal cell contamination in the sample; *iii*) by the presence of balanced chromosomal rearrangements. In addition to BL hallmark anomalies, 4 other apparently balanced translocations were detected exclusively by conventional cytogenetics, as expected (Table 2). The karyotypes of the 11 previously published cell lines were essentially identical to those reported elsewhere [15,16].

Four cell lines (BLLAL, OKU, SALINA, BLMer) have been karyotyped for the first time in the present paper. The BLMer cell line was established from a recurrent tumor (case 29124). Karyotype analysis of BLMer showed the same anomalies as observed in the parental tumor (*data not shown*). Although cell lines cannot fully recapitulate all the biological aspects of tumors [11], the chromosomal alterations observed in cell lines are representative of their parent histology [17].

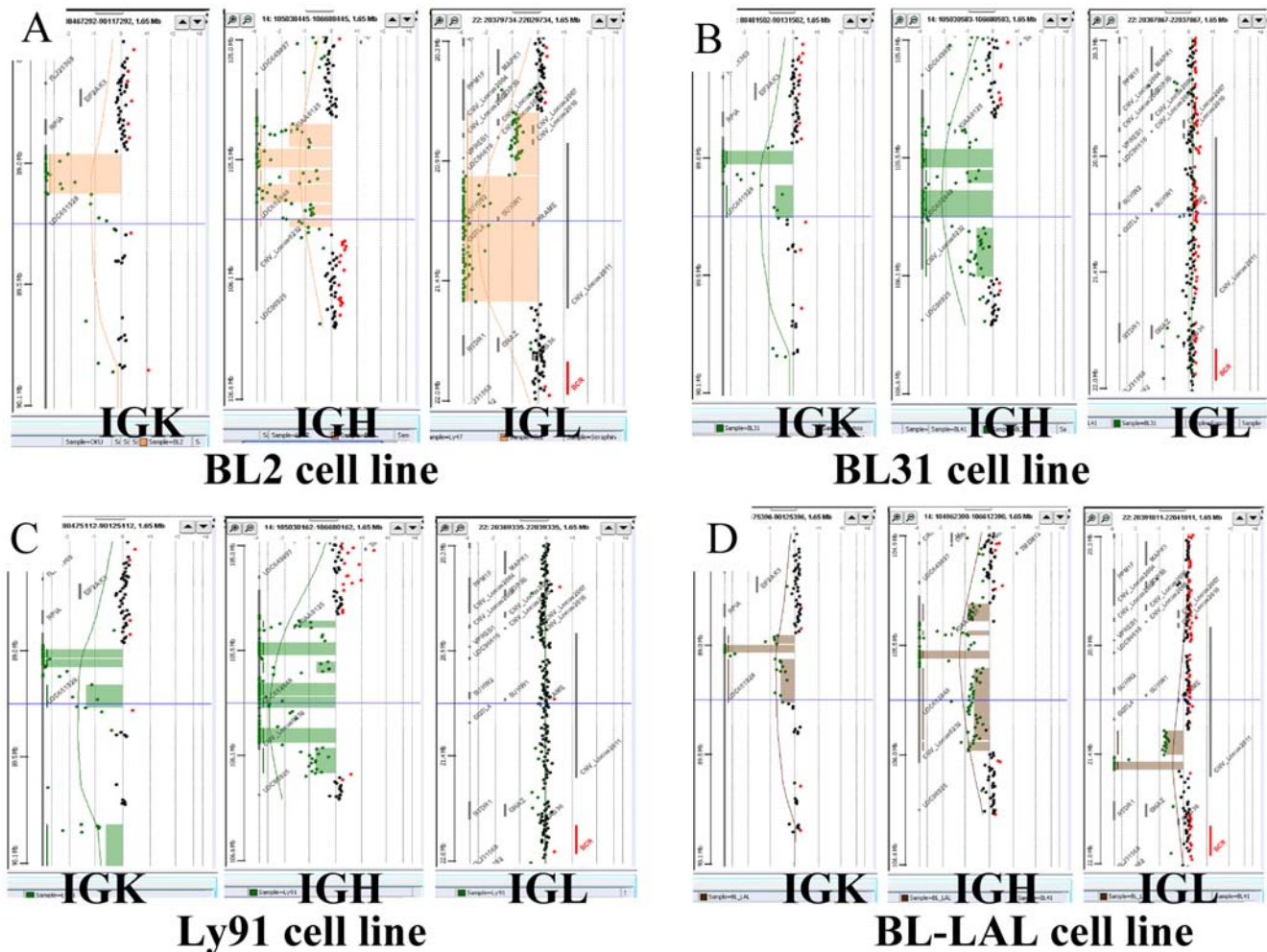


Figure 2. Immunoglobulin Somatic Copy Number Variation. The immunoglobulin loci at chromosomal subbands 2p11.2 (IGK), 14q32.3 (IGH) and 22q11.2 (IGL) showed acquired monoclonal alterations by the 244 K aCGH platform. The segmented rearrangements were identified by a stained rectangle and the individual oligonucleotides are identified by a bold dot. The Y axis is the chromosomal position, the X axis is the ratio (loss is to the left). A to D, S1: The IGH locus was rearranged in all cell lines (14/15) on the two chromosomes, with a specific pattern for each cell line. BL2 and BL31 have a t(8;14). A to D, S1: IGK gene rearrangements were detected in all cell lines and 8 have a clear biallelic rearrangement including LY91 the only t(2;8). A to D, S1: IGL loci somatic rearrangements were observed in only 10 cell lines (7 biallelics) including four cases of t(8;22) as in BLAL. Other cell lines are presented as supporting figures.
doi:10.1371/journal.pone.0007089.g002

In the primary tumor subgroup with $CNA \geq 1$ ($n = 6$), the mean number of CNA per sample was 6 versus 9 for cell lines ($n = 14$), showing the same order of magnitude.

Partial duplication of the PVT1 mi RNA locus: a role in BL?

In the BL 84 and Ly 47 cell lines, the der(8)t(8;22) was totally and partially duplicated respectively. This allowed the high-resolution mapping of the translocation. The MYC 3' breakpoints were mapped to the PVT1 locus that harbors *mir1204*, *mir1205*, *mir1206* and *mir1207* [18]. Among these genes, only *mir1204* and *mir1205* were duplicated in the two cell lines (Fig. 4). The localization of these micro-RNAs in the 8q24 region raises questions. Are these micro-RNA implicated in lymphomagenesis. Are BL variant translocations a distinct group?

CNAs and CNVs in BL

A total of 145 CNA ≤ 2 Mb were detected. Among them, there were 81 CNA mapped to Mendelian CNV. *GSTT1* was the most polymorphic gene in our set. *GSTT1* is a member of a multigenic

family of detoxifying enzymes [19]. Four classes of isoenzymes have been linked to human malignancy: *GSTM1*, *GSTP1*, *GSTA1* and *GSTT1*. Several studies have shown that individuals who harbor *GSTM1*^{-/-} or *GSTT1*^{-/-} as well as *GSTP1* variants are at an increased risk for a series of tumors [19,20]. Further studies are required to clarify its role in Burkitt's lymphoma.

CNV are not totally neutral variants. Many recent studies have directly and indirectly implicated some Mendelian CNV in genomic disorders [21,22]. A 560 Kb low-level amplification of the 2p23 region was found in the BL Mer cell line and its parental tumor, and confirmed by FISH (Figure 3 I, J). This region harbors only *BIRC6* gene which encodes an inhibitor of apoptosis and a chimeric E2/E3 ubiquitin ligase [23]. However, the 3 copies on chromosome 2 and the single copy on the other chromosome have the same boundaries as a reported CNV. Interestingly, germline amplification of *BIRC6* was found in patients with a family history of pancreatic cancer [24].

Somatic CNVs mapped to the immunoglobulin locus [25,26] were the second type found in our study. BLs have clonally

Table 3. Minimal critical regions issued from tumor and cell lines.

Cytogenetic band	position (Mb)	Size (Mb)	Gain/Loss	Cell lines	Tumors	Cancer-related genes in the region	miRNA
1q21.1q25.2	142,87–177	34,13	G	8	3	>300 genes, <i>BCL9 PIAS3 BCA2 LHX4</i>	
1q32.1	200,97–201,36	0,39	G	3	0	<i>MDM4 PIK3C2B LRRN5</i> <i>PLEKHA6 PPP1R15B</i>	
1q44	240,24–241,35	1,11	G	4	0	<i>ADSS HNRPU AKT3 ZNF238</i> <i>C1orf121 FAM36A C1orf100</i> <i>C1orf101 LOC440742</i>	
2p16.1	60,96–61	0,04	AMP	2	1	<i>REL</i>	
3p14.2	60,43–60,53	0,1	L	4	1	<i>FHIT</i>	
4p15.3p15.2	18,2–23,74	5,54	L	3	1	<i>SLIT2 PPARGC1A GBA3 KCNIP4</i> <i>MGC29898 GPR125</i>	
4q34.1	174,14–174,94	0,8	L	2	1	<i>HMGB2 SAP30 HAND2 MORF4</i> <i>SCRG1 GALNT7 GALNT17</i>	
4q34.3q35.1	182,3–186,69	4,39	L	3	1	<i>SLC25A4 CASP3 DCTD ACSL1</i> <i>ING2 IRF2 CARF LRP2BP STOX2</i> <i>FLJ12716 MLF1IP WWC2 SNX25</i> <i>ENPP6 FLJ30277 RWDD4A</i> <i>FLJ33167 ANKRD37 HELT</i>	
6p24p22.4	11,2–26,4	15,2	L	3	0	>60 genes <i>BMP6 FOXC1 IRF4</i> <i>MAK SSR1 TFAP2A RIPK1</i> <i>PRPF4B EEF1E1 NRN1 EXOC2</i> <i>WRNIP1 RIOK1 HUS1B CAGE1</i>	
6q24.1qter	142,16–170,83	28,67	L	2	0	135 genes, <i>PDCC2</i>	
7q21.1qter	87,24–158,6	71,36	G	5	1	444 genes	
8q24.2	128,71–128,95	0,24	G	3	1	<i>MYC</i>	<i>mir-1204</i>
9p21.3	21,89–22,31	0,42	L	2	2	<i>CDKN2A/CDKN2B</i>	
11pterp13	pter-32,41	32,41	L	1	1	235 genes, <i>FANCF, PLEKHA7</i>	
11q23.1	110,62–110,81	0,19	G	1	1	<i>POU2AF1 C11orf53 FLJ45803</i>	
13q31.3q32.1	89,58–96,81	7,23	AMP	5	2	<i>GPC5 DCT DNAJC3 CLDN10</i> <i>GPC6 ABCC4 SOX21 DZIP1 TGDS</i> <i>UGCG2 GPR180 HS6ST3</i>	<i>mir-622 mir-17</i> <i>mir-18a mir-19a</i> <i>mir-20a mir-19b-1</i> <i>mir-92-1</i>
13q32.2	97,79–97,85	0,06	G	4	2	<i>FARP1</i>	
13q33.1q34	103,64–112,61	9,3	L	0	3	<i>ING1 COL4A2 COL4A1 RAB20 LIG4</i> <i>TNFSF13B EFN2 ERCC5 FGF14</i> <i>PCCA SLC10A2 IRS2 ARHGEF7</i> <i>TNFSF13B ANKRD10</i>	
14q12q21.3	26,52–43,84	17,32	L	1	1	44 genes, <i>FANCM</i>	<i>mir-624</i>
15q26.2qter	92,15–100,21	8,06	G	2	0	25 genes <i>MCTP2, IGF1R, PCSK6</i>	
17pterp11.2	0–19,68	15,36	L	2	1	>200 genes <i>TP53</i>	<i>mir-22 mir-132</i> <i>mir-212 mir-195</i> <i>mir-497 mir-324</i>

doi:10.1371/journal.pone.0007089.t003

rearranged *IGH*, *IGK* and *IGL* chain genes, hence these rearrangements can be detected by the 244 K aCGH platform that showed a high sensitivity between the oligonucleotide arrays [27]. The rearranged pattern is highly specific of each individual malignant cell line confirming that they are monoclonal proliferations. Several oligonucleotides have an intermediate value between one and two copy losses (Figure 2, Figure S1, Figure S2, Figure S3, Figure S4, Figure S5, Figure S6, Figure S7, Figure S8,

Figure S9, Figure S10, Figure S11). This could be related to further rearrangements of IG genes in subclones. According to the genetic model of lymphomagenesis, the frozen differentiation stage might reflect the cell type in which the primary translocation t(8;14) took place leading to maturation arrest. An alternative hypothesis is that mature aggressive B-NHL originate from cells with stem-cell features or that stemness was acquired during lymphomagenesis by epigenetic remodeling [28].

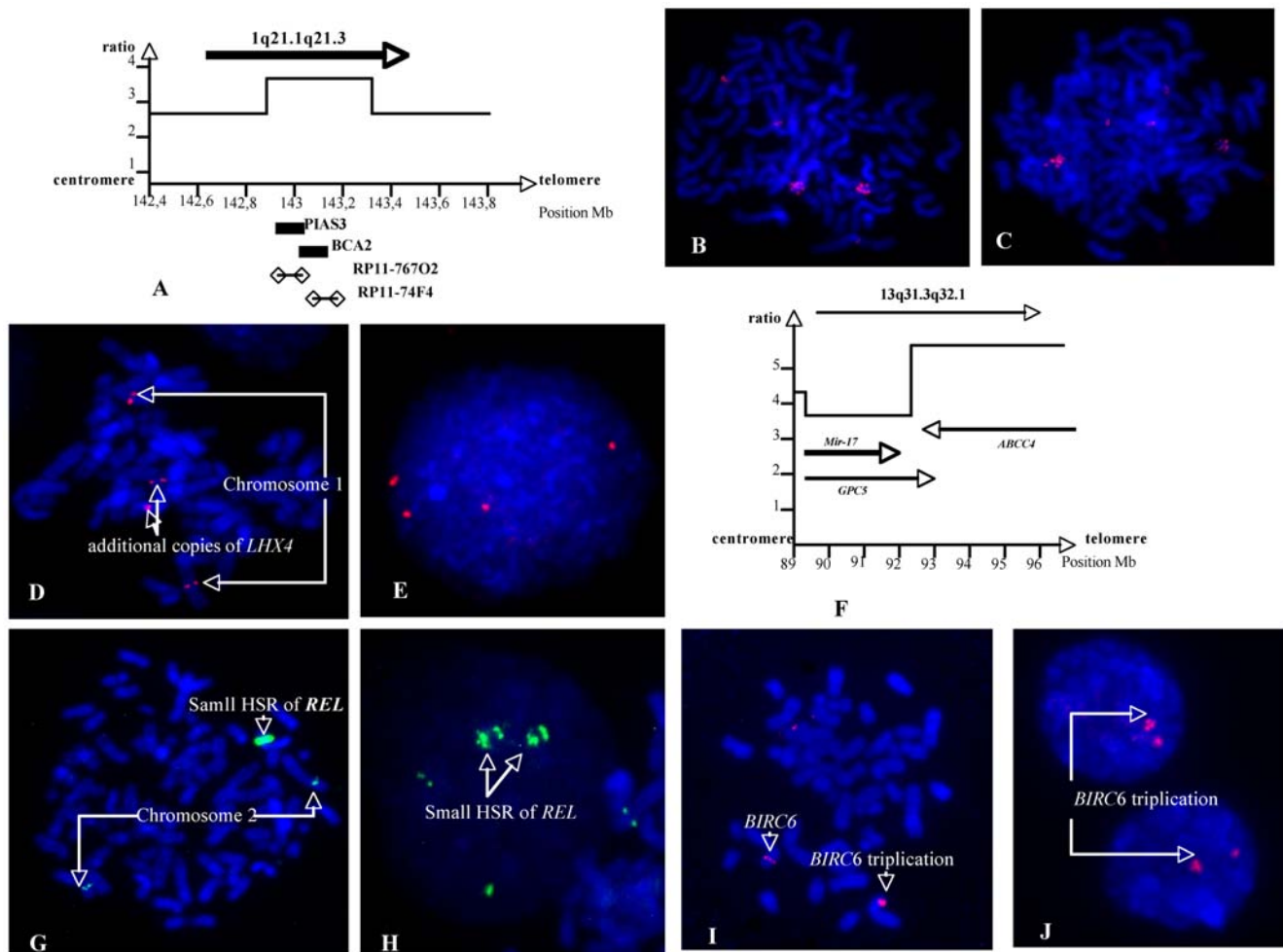


Figure 3. Various gained or amplified small regions description. **A.** Copy number profile of 1q21.1 amplicon in BL41: the 7 copies maximal amplitude region was the <142,87–143,28 Mb> interval that included *BCA2* and *PIAS3* genes. **B and C.** The amplifications of *BCA2* and *PIAS3* were confirmed by FISH with BAC clones RP11-767O2 and RP11-74F4 respectively which showed a small HSR. **D and E.** In Namalwa a low level amplification (4 to 5 copies) of 1q25.2 <176,6–177> was confirmed by FISH with BAC clone RP11-175C8 which contains the *LHX4* gene only. **3F.** In Namalwa the 13q31.3q32.1 <89,58–95,82> region was amplified. The proximal part that harboured the polycistron mir-17 and a part of *GPC5* gene was present in 8 copies. The distal region, with maximal amplitude (12 copies), contained 12 genes including *GPC5*, *GPC6* and *ABCC4* (see text). **G and H.** In BL 41 the *REL* gene was found amplified and FISH with BAC clone RP11-373L24 showed a small HSR. **I and J** Molecular cytogenetic on BLMer cell line showing a duplication of *BIRC6*. RP11-121M15 BAC clone was chosen on the region of *BIRC6*. The latter gene was duplicated as denoted by an arrow.

doi:10.1371/journal.pone.0007089.g003

CNAs distribution

In our study, the distribution of the CNA >2 Mb was bimodal, with 6/12 primary tumors and 13/15 cell lines exhibiting additional abnormalities to the IG/MYC translocation, in accordance with the low number of chromosomal changes previously reported [29,30]. A smaller group with partial uniparental disomy resulting in loss of heterozygosity without chromosomal imbalances besides classic chromosomal instability, has been reported in BL [29].

Gains were more frequent at the following regions 1q (12/27), 13q (7/27), 7q (6/27), 8q (4/27), 2p (3/27), 11q (2/27) and 15q (2/27). Ten MCRs were observed.

In BL, the most frequent additional anomaly is the duplication of 1q [8,31].

MCRs on chromosome 1

Three MCRs were observed on 1q. The major one was localized at 1q21.1q25.2 <142.87–177.00>. In a recent study

using tiling-resolution aCGH, this MCR was larger and mapped to 1q12q25.2 [31]. In the BL 41 cell line, the 1q21.1q21.3 <142.87–149.17> region harbored a 6 Mb amplicon (Fig. 3A, B, C). In a recent study, a 1.35 Mb minimal deleted region <143.65–145.00>, was associated with developmental defects [32]. This region overlapped the BL41 amplicon, but the copy number peaks (<142.87–143.28>) seemed to be different. The genomic structure of 1q21 is extremely complex, with at least 4 large segmental-duplication blocks ranging in size from 270 Kb to 2.2 Mb. Consequently, these duplons favored the non-allelic homologous recombination which might explain both the congenital anomalies (Mefford et al., 2008) and malignancy, particularly lymphoma. Although 1q rearrangements have no impact on the prognosis of BL [9], amplification does nevertheless contribute to tumor development [33]. *BCA2* and *PIAS3* that mapped at the maximal amplitude of the BL 41 amplicon are thus candidate driver genes in this amplicon. *BCA2* has E3 ubiquitin ligase activity and was found to be overexpressed in invasive breast

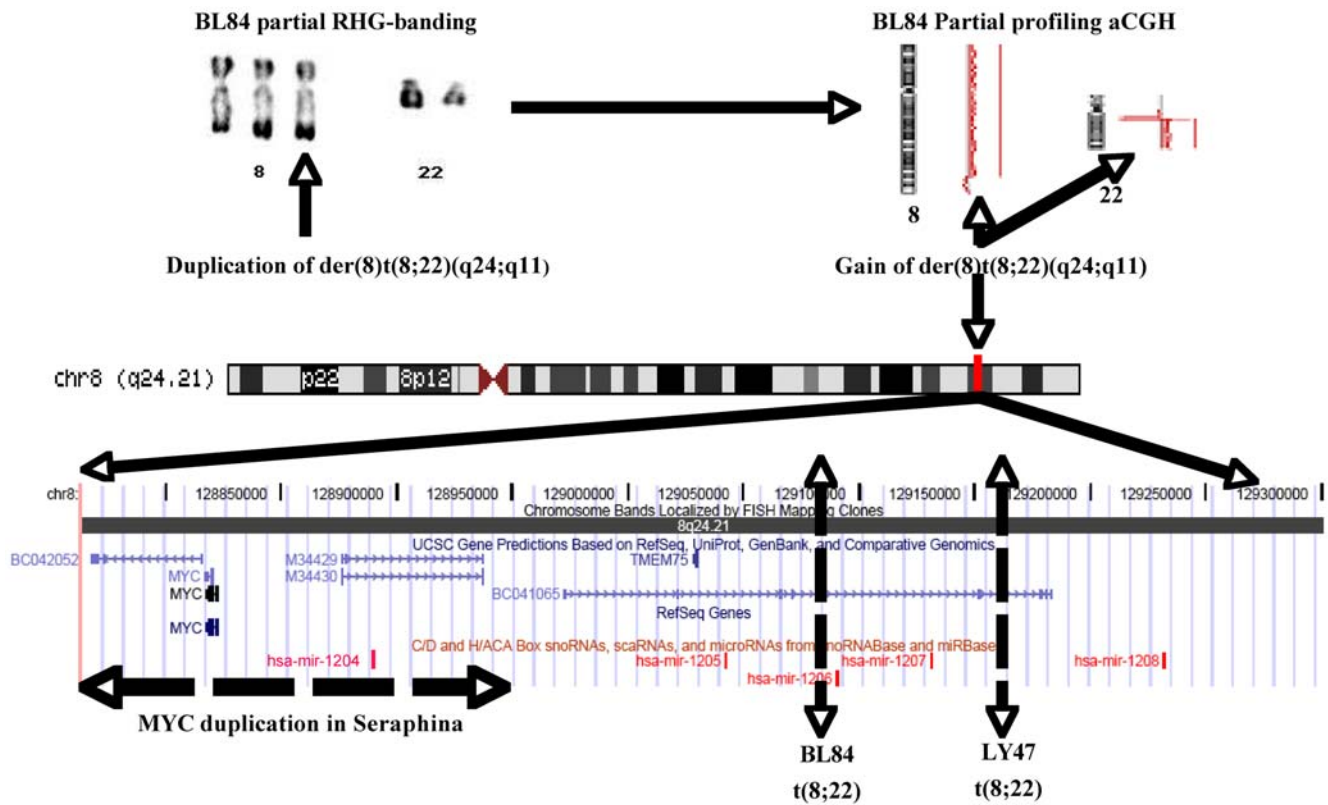


Figure 4. Virtual cloning of 8q24 region. *MYC* region breakpoints. In Seraphina, BL 84 and Ly 47 cell lines, *MYC* locus was gained. *MYC* region breakpoints vary with primary anomalies. In BL 84 and Ly 47 cell lines with t(8;22), *MYC* breakpoints were mapped to *PVT1* (Huppi et al., 2008); mir-1205 and mir1204 (not present on UCSC map, located on chr8:128877390-128877456) defined the MCR of this gain. In Seraphina, a 240 Kb duplication was observed around *MYC* and located by FISH in the immediate vicinity this gene on the der(14)t(8;14) (data not shown). This duplication contained hsa mir 1204.

doi:10.1371/journal.pone.0007089.g004

cancer [34]. *PIAS3* codes for the Protein Inhibitor of Activated *STAT3*. *PIAS3* signaling has been shown to prevent apoptosis and enhance cellular proliferation through the regulation of genes such as *MYC* [35]. Overactivation of *STAT3* has been identified in many cancers [36].

The second 1q MCR was 1q32.1 <200.97–201.36>. It encompasses *MDM4*. This gene has not been implicated in BL, but *MDM4* inhibits *P53*, and in vivo development of B-cell lymphomas in E μ -myc *MDM4*^{+/-} mice is delayed compared to that occurring in E μ -myc *MDM4*^{+/+} mice [37].

The third 1q MCR was 1q44 <240.24–241.35>. It harbors *AKT3* which is one of the 3 isoforms of *AKT*. The latter is a Ser/Thr kinase in the PTEN/PI3K/AKT pathway and activation of *AKT* is often observed in human cancers [38]. In primary hepatocellular carcinoma, *AKT3* was up-regulated as a result of a gained 1q44 region [39]. In the Namalwa cell line, a 0.4 Mb low-level amplification (5 copies) at 1q25.2 <176.6–177> containing 5 genes was detected. Among them, *LHX4*, a LIM homeobox 4 was found to be amplified by FISH (Fig. 3D+E). *LHX4* is the partner of *IGH* in t(1;14)(q25;q32) detected in pre-B acute lymphoblastic leukemia [40].

MCRs on other chromosomes

The second most gained arm was 13q. The major MCR was 13q31.3q32.1 <89.58–96.81> containing a 6.24 Mb amplicon <89.58–95.82> (Fig. 3F) as frequently seen in lymphomas but also across a broad range of tumor types [41]. The proximal segment of this amplicon contained microRNA-17 polycistron [42,43] which was stably upregulated in the presence of

constitutive *MYC* expression [44]. The highest copy number segment harbored 12 genes, including *GPC5*, *GPC6* and *ABCC4*. Glypican genes (*GPC5* and *GPC6*), belong to a family of heparan sulfate proteoglycans that are constantly expressed and up-regulated in rhabdomyosarcoma with an amplified 13q31q32 region [45]. However, in case 29147 and in Namalwa cell line, the DNA copy number of *GPC5* argues against this gene as the driver of the amplification. *ABCC4* (MRP4), which encodes the multi-drug resistance protein, could also play this role. It was present in 12 copies in the Namalwa cell line. It was found to be amplified in several drug-resistant cell lines derived from various malignancies [46]. *ABCC4* transcripts were found upregulated in a set of BL with gain of 13q31q32 region [30].

On chromosome 8, *MYC* was the only gene contained in a 240 Kb gained MCR at 8q24.2, originating either from t(8;14) and t(8;22) rearrangements.

A 2p16 MCR contained a 40 Kb amplicon in BL 41. It harbored *REL* (Fig. 3G, H), a member of the NF- κ B family of transcription factors, which was found to be amplified in primary mediastinal B-cell lymphoma [47].

The 11q23.1 MCR mapped to <110.62–110.81> contained *POU2AF1*, a B-cell specific transcriptional coactivator which is amplified in multiple myeloma [48].

A 1.8 Mb amplicon was found at 17p11.2, in the BL 41 cell line, with a 381 Kb peak of 10 copies <20.72–21.10> containing four genes of mostly unknown function. The proximal and distal boundaries of this amplicon with 7 copies, contained two kinases genes, *AKAP10* and *MAP2K3*. The genomic structure of 17p11 is

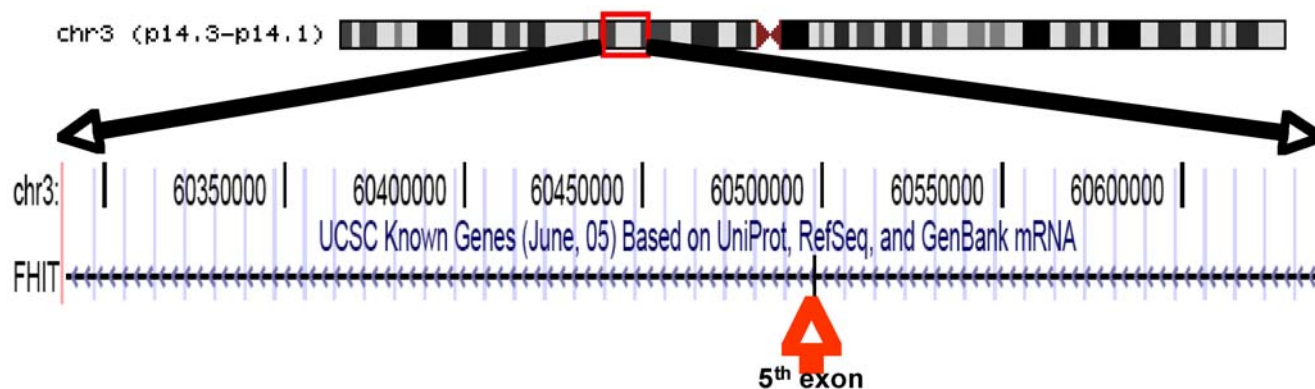


Figure 5. A small intragenic loss. Based on the UCSC data base (June, 2004), the 402 Kb MCR on 3p remove the fifth exon of *FHIT* gene. doi:10.1371/journal.pone.0007089.g005

complex, with several segmental-duplication blocks including one totaling 183 Kb.

Gene loss regions in BL

The most frequent deleted arm was 3p in four cell lines and one tumor, a rare finding in BL. A 100 Kb MCR localized at 3p14.2 <60.43–60.53> contained the 5th exon of *FHIT* (Fragile Histidine Triad) (Fig. 5), a finding in agreement with earlier studies [49].

On 9p, the 420 Kb MCR harbored *CDKN2A/CDKN2B*, a gene rarely reported to be impaired in BL [50].

On 13q33.1q34 a 10 Mb MCR, detected only in three tumors, harbored more than thirty genes. Among these *ING1*, *COLAA2*, *COLAA1*, *RAB20*, *LIG4*, *TNFSF13B*, all in a small region, could constitute the target of this loss. In case 29125 a single 10 Mb deletion at 13q14.1q14.3 removed the critical mir-16-1 and mir-15a involved in CLL [42]. This rearrangement is not observed in the 15 cell lines.

On 17p, a large 19.86 Mb MCR had removed *P53* as well as several other genes. Mutations in the *P53* gene have been found in at least 33% of BL biopsy specimens [51] and in as much as 83% of BL cell lines [52,53].

Some single deletions were observed. In case 28787, a deletion at 2p23.1p16.3 particularly removed *MSH2* and *MSH6* genes that do not seem to be frequently altered in lymphoma [54]. *EBF1* (5q33.3 <158.08–158.18>), the early B cell factor was lost in Seraphina. In a recent work on ALL, mono-allelic deletions of *EBF1* were emphasized [55].

High resolution aCGH is a powerful method that allowed a fine mapping of additional unbalanced chromosomal abnormalities in BL, but karyotype still remain an essential tool to rapidly identify balanced chromosomal translocations. A subgroup of BL without CNAs, warrants further investigation (SNP array, whole genome sequence) in order to find the necessary additional oncogenic events to the *MYC* rearrangement [4]. The identification of the target genes of the large MCR will need correlations with other genomics data sets (gene expression, nucleotide sequence, epigenetic...) in order to make the low throughput functional gene studies.

With regard to additional chromosomal abnormalities studied by cytogenomics, BL appears to exhibit non-random genetic heterogeneity as revealed by this study. The MCRs remain to be fully functionally characterized in order to design targeted and personalized therapies in poor prognosis disease [9].

Data Availability. The microarray data analyzed in this paper have been submitted to the Array Express data repository at the European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>) under the following accession numbers: E-TABM-703.

Supporting Information

Table S1 Commercial and BAC probes used to validate aCGH results

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0007089.s001 (0.07 MB DOC)

Table S2 Clonal Immunoglobulin phenotype linked to chromosomal abnormalities and acquired CNV

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0007089.s002 (0.08 MB DOC)

Figure S1 BL41 cell line.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0007089.s003 (0.11 MB JPG)

Figure S2 BL70 cell line

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0007089.s004 (0.12 MB JPG)

Figure S3 BL84 cell line

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0007089.s005 (0.12 MB JPG)

Figure S4 BL104 cell line

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0007089.s006 (0.12 MB JPG)

Figure S5 BLMer cell line

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0007089.s007 (0.12 MB JPG)

Figure S6 Ly47 cell line

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0007089.s008 (0.11 MB JPG)

Figure S7 Namalwa cell line

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0007089.s009 (0.11 MB JPG)

Figure S8 OKU cell line

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0007089.s010 (0.12 MB JPG)

Figure S9 Ramos cell line

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0007089.s011 (0.12 MB JPG)

Figure S10 Salina cell line

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0007089.s012 (0.12 MB JPG)

Figure S11 Seraphina cell line

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0007089.s013 (0.12 MB JPG)

Acknowledgments

We are grateful to the help of Dr Alexander Valent, those of Bastien Job for some analysis, and to the gift of cell lines by Dr Alan B. Rickinson. The authors thank Lorna Saint Ange for editing and Cécile Tétaud, Bernard Clause, Philippe Léopoldi, Didier Fauvet, Sébastien Forget, Yann Lécluse for their help.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: VL AB. Performed the experiments: ST CR TR LDC JW. Analyzed the data: ST PD NI VV

CP VR CP AB. Contributed reagents/materials/analysis tools: GD JB VR CP JW AB. Wrote the paper: ST PD JW AB.

References

- Harris NL, Horning SJ (2006) Burkitt's lymphoma—the message from microarrays. *N Engl J Med* 354: 2495–2498.
- Thorley-Lawson D, Allday M (2008) The curious case of the tumour virus: 50 years of Burkitt's lymphoma. *Nat Rev Microbiol* 6: 913–924.
- Lenoir G, Preud'homme J, Bernheim A, Berger R (1982) Correlation between immunoglobulin light chain expression and variant translocation in Burkitt's lymphoma. *Nature* 298: 474–476.
- Hummel M, Bentink S, Berger H, Klapper W, Wessendorf S, et al. (2006) A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *N Engl J Med* 354: 2419–2430.
- Battey J, Moulding C, Taub R, Murphy W, Stewart T, et al. (1983) The human c-myc oncogene: structural consequences of translocation into the IgH locus in Burkitt lymphoma. *Cell* 34: 779–787.
- Aoufouchi S, Faili A, Zober C, D'Orlando O, Weller S, et al. (2008) Proteasomal degradation restricts the nuclear lifespan of AID. *J Exp Med* 205: 1357–1368.
- Lones MA, Sanger WG, Le Beau MM, Heerema NA, Spoto R, et al. (2004) Chromosome abnormalities may correlate with prognosis in Burkitt/Burkitt-like lymphomas of children and adolescents: a report from Children's Cancer Group Study CCG-E08. *J Pediatr Hematol Oncol* 26: 169–178.
- Heerema NA, Bernheim A, Lim MS, Look AT, Pasqualucci L, et al. (2005) State of the Art and Future Needs in Cytogenetic/Molecular Genetics/Arrays in childhood lymphoma: summary report of workshop at the First International Symposium on childhood and adolescent non-Hodgkin lymphoma, April 9, 2003, New York City, NY. *Pediatr Blood Cancer* 45: 616–622.
- Poirel HA, Cairo MS, Heerema NA, Swansbury J, Auferin A, et al. (2009) Specific cytogenetic abnormalities are associated with a significantly inferior outcome in children and adolescents with mature B-cell non-Hodgkin's lymphoma: results of the FAB/LMB 96 international study. *Leukemia* 23: 323–331.
- Kallioniemi A (2008) CGH microarrays and cancer. *Curr Opin Biotechnol* 19: 36–40.
- Chin L, Gray JW (2008) Translating insights from the cancer genome into clinical practice. *Nature* 452: 553–563.
- Shaffer L, Tommerup N (2005) An International System For Human Cytogenetic Nomenclature. Basel: Karger.
- Bernheim A, Toujani S, Saulnier P, Robert T, Casiraghi O, et al. (2008) High-resolution array comparative genomic hybridization analysis of human bronchial and salivary adenoid cystic carcinoma. *Lab Invest* 88: 464–473.
- Karolchik D, Hinrichs A, Furey T, Koskin K, Sugnet C, et al. (2004) The UCSC Table Browser data retrieval tool. *Nucleic Acids Res* 32: 493–496.
- Berger R, Bernheim A (1985) Cytogenetics of Burkitt's lymphoma-leukaemia: a review. *IARC Sci Publ* pp 65–80.
- Karpova MB, Schoumans J, Blennow E, Ernberg I, Henter JI, et al. (2006) Combined spectral karyotyping, comparative genomic hybridization, and in vitro apoptotyping of a panel of Burkitt's lymphoma-derived B cell lines reveals an unexpected complexity of chromosomal aberrations and a recurrence of specific abnormalities in chemoresistant cell lines. *Int J Oncol* 28: 605–617.
- Greshock J, Nathanson K, Martin AM, Zhang L, Coukos G, et al. (2007) Cancer cell lines as genetic models of their parent histology: analyses based on array comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 67: 3594–3600.
- Huppi K, Volfovsky N, Runfola T, Jones TL, Mackiewicz M, et al. (2008) The identification of microRNAs in a genomically unstable region of human chromosome 8q24. *Mol Cancer Res* 6: 212–221.
- Clapper ML (2000) Genetic polymorphism and cancer risk. *Curr Oncol Rep* 2: 251–256.
- Morari EC, Leite JL, Granja F, da Assumpcao LV, Ward LS (2002) The null genotype of glutathione s-transferase M1 and T1 locus increases the risk for thyroid cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11: 1485–1488.
- Sebat J (2007) Major changes in our DNA lead to major changes in our thinking. *Nat Genet* 39: S3–5.
- Stranger BE, Forrest MS, Dunning M, Ingle CE, Beazley C, et al. (2007) Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes. *Science* 315: 848–853.
- Ren J, Shi M, Liu R, Yang QH, Johnson T, et al. (2005) The Birc6 (Bruce) gene regulates p53 and the mitochondrial pathway of apoptosis and is essential for mouse embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 565–570.
- Lucito R, Suresh S, Walter K, Pandey A, Lakshmi B, et al. (2007) Copy-number variants in patients with a strong family history of pancreatic cancer. *Cancer Biol Ther* 6: 1592–1599.
- Bernheim A, Dessen P, Lazar V, Auger N, Fauvet D, et al. (2007) Cryptic del(13q14.2) and physiological deletions of immunoglobulin genes detected by high-resolution array comparative genomic hybridization in a patient with indolent chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 176: 89–91.
- Wang K, Li M, Hadley D, Liu R, Glessner J, et al. (2007) PennCNV: an integrated hidden Markov model designed for high-resolution copy number variation detection in whole-genome SNP genotyping data. *Genome Res* 17: 1665–1674.
- Coe BP, Ylstra B, Carvalho B, Meijer GA, Macaulay C, et al. (2007) Resolving the resolution of array CGH. *Genomics* 89: 647–653.
- Martin-Subero JI, Kreuz M, Bibikova M, Bentink S, Ammerpohl O, et al. (2008) New insights into the biology and origin of mature aggressive B-cell lymphomas by combined epigenomic, genomic and transcriptional profiling. *Blood*.
- Nielaender I, Martin-Subero JI, Wagner F, Martinez-Climent JA, Siebert R (2006) Partial uniparental disomy: a recurrent genetic mechanism alternative to chromosomal deletion in malignant lymphoma. *Leukemia* 20: 904–905.
- Salaverria I, Zettl A, Bea S, Hartmann EM, Dave SS, et al. (2008) Chromosomal alterations detected by comparative genomic hybridization in subgroups of gene expression-defined Burkitt's lymphoma. *Haematologica* 93: 1327–1334.
- Davidsson J, Andersson A, Paulsson K, Heidenblad M, Isaksson M, et al. (2007) Tiling resolution array comparative genomic hybridization, expression and methylation analyses of dup(1q) in Burkitt lymphomas and pediatric high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemias reveal clustered near-centromeric breakpoints and overexpression of genes in 1q22-32.3. *Hum Mol Genet* 16: 2215–2225.
- Mefford HC, Sharp AJ, Baker C, Itsara A, Jiang Z, et al. (2008) Recurrent rearrangements of chromosome 1q21.1 and variable pediatric phenotypes. *N Engl J Med* 359: 1685–1699.
- Albertson DG (2006) Gene amplification in cancer. *Trends Genet* 22: 447–455.
- Burger AM, Gao Y, Amemiya Y, Kahn HJ, Kitching R, et al. (2005) A novel RING-type ubiquitin ligase breast cancer-associated gene 2 correlates with outcome in invasive breast cancer. *Cancer Res* 65: 10401–10412.
- Bowman T, Broome MA, Sinibaldi D, Wharton W, Pledger WJ, et al. (2001) Stat3-mediated Myc expression is required for Src transformation and PDGF-induced mitogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 7319–7324.
- Inghirami G, Chiarle R, Simmons WJ, Piva R, Schlessinger K, et al. (2005) New and old functions of STAT3: a pivotal target for individualized treatment of cancer. *Cell Cycle* 4: 1131–1133.
- Terzian T, Wang Y, Van Pelt CS, Box NF, Travis EL, et al. (2007) Haploinsufficiency of Mdm2 and Mdm4 in tumorigenesis and development. *Mol Cell Biol* 27: 5479–5485.
- Koseoglu S, Lu Z, Kumar C, Kirschmeier P, Zou J (2007) AKT1, AKT2 and AKT3-dependent cell survival is cell line-specific and knockdown of all three isoforms selectively induces apoptosis in 20 human tumor cell lines. *Cancer Biol Ther* 6: 755–762.
- Kim TM, Yim SH, Shin SH, Xu HD, Jung YC, et al. (2008) Clinical implication of recurrent copy number alterations in hepatocellular carcinoma and putative oncogenes in recurrent gains on 1q. *Int J Cancer* 123: 2808–2815.
- Kawamata N, Sakajiri S, Sugimoto KJ, Isobe Y, Kobayashi H, et al. (2002) A novel chromosomal translocation t(1;14)(q25;q32) in pre-B acute lymphoblastic leukemia involves the LIM homeodomain protein gene, Lhx4. *Oncogene* 21: 4983–4991.
- Neat MJ, Foot N, Jenner M, Goff L, Ashcroft K, et al. (2001) Localisation of a novel region of recurrent amplification in follicular lymphoma to an approximately 6.8 Mb region of 13q32-33. *Genes Chromosomes Cancer* 32: 236–243.
- Croce CM, Calin GA (2005) miRNAs, cancer, and stem cell division. *Cell* 122: 6–7.
- He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, et al. (2005) A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 435: 828–833.
- Tagawa H, Karube K, Tsuzuki S, Ohshima K, Seto M (2007) Synergistic action of the microRNA-17 polycistron and Myc in aggressive cancer development. *Cancer Sci* 98: 1482–1490.
- Williamson D, Selve J, Gordon T, Lu YJ, Pritchard-Jones K, et al. (2007) Role for amplification and expression of glypican-5 in rhabdomyosarcoma. *Cancer Res* 67: 57–65.
- Yasui K, Mihara S, Zhao C, Okamoto H, Saito-Ohara F, et al. (2004) Alteration in copy numbers of genes as a mechanism for acquired drug resistance. *Cancer Res* 64: 1403–1410.
- Weniger MA, Gesk S, Ehrlich S, Martin-Subero JI, Dyer MJ, et al. (2007) Gains of REL in primary mediastinal B-cell lymphoma coincide with nuclear accumulation of REL protein. *Genes Chromosomes Cancer* 46: 406–415.
- Zhao C, Inoue J, Imoto I, Otsuki T, Iida S, et al. (2008) POU2AF1, an amplification target at 11q23, promotes growth of multiple myeloma cells by directly regulating expression of a B-cell maturation factor, TNFRSF17. *Oncogene* 27: 63–75.
- Ohta M, Inoue H, Coticelli MG, Kastury K, Baffa R, et al. (1996) The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. *Cell* 84: 587–597.

50. Tresnasari K, Takakuwa T, Ham MF, Rahadiani N, Nakajima H, et al. (2007) Telomere dysfunction and inactivation of the p16(INK4a)/Rb pathway in pyothorax-associated lymphoma. *Cancer Sci* 98: 978–984.
51. Gaidano G, Ballerini P, Gong JZ, Inghirami G, Neri A, et al. (1991) p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 5413–5417.
52. Wiman KG, Magnusson KP, Ramqvist T, Klein G (1991) Mutant p53 detected in a majority of Burkitt lymphoma cell lines by monoclonal antibody PAb240. *Oncogene* 6: 1633–1639.
53. Sobol H, Benziane A, Kerangueven F, Yin L, Noguchi T, et al. (2002) Genome-wide search for loss of heterozygosity in Burkitt lymphoma cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* 33: 217–224.
54. Brimmell M, Mendiola R, Mangion J, Packham G (1998) BAX frameshift mutations in cell lines derived from human haemopoietic malignancies are associated with resistance to apoptosis and microsatellite instability. *Oncogene* 16: 1803–1812.
55. Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, Miller CB, Coustan-Smith E, et al. (2007) Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 446: 758–764.

Partie 3 : Cytogénomique des carcinomes adénoïdes kystiques

Introduction

Le carcinome adénoïde kystique (CAK) est une tumeur constituée par de types 2 de cellules malignes : épithéliales ou luminales, et myoépithéliales ou basales [El-Naggar and Huvos, 2005]. Ces cellules s'organisent selon trois configurations morphologiques majeures: tubulaire, cribriforme et solide. Tous les systèmes de stratification des CAK se basent sur la présence et la quantification de la composante solide qui est corrélée à un mauvais pronostic [Perzin et al., 1978; Szanto et al., 1984].

Le CAK est une entité rare d'adénocarcinome [Bell et al., 2010] et représente à peu près 1% de l'ensemble des cancers de la région orale et maxillo-faciale [Kokemueller et al., 2004]. Cette tumeur, décrite pour la fois en 1856 par Billroth comme un cylindrome, est communément classée dans le groupe de tumeurs des glandes salivaires, bien qu'elle puisse survenir dans n'importe quel site anatomique abritant une glande exocrine séromuqueuse [Gondivkar et al., 2011].

Au niveau pronostic, le CAK est un carcinome difficile à classer. Le plus souvent indolent au début de la maladie, il se comporte comme un bas grade, puis au cours de l'évolution, il se caractérise par des récives locales et des métastases tardives. En dépit d'une résection chirurgicale associée ou non à une radiothérapie postopératoire, 40 à 60% des patients ayant une tumeur des glandes salivaires développent des métastases à distance et 80 à 90% des patients meurent dans les 15 ans qui suivent le diagnostic [Bell et al., 2010].

L'invasion par voie lymphatique est rare et elle survient souvent par voie hématogène dans les stades évolués de la maladie [Huang et al., 1997]. Ce type de carcinome a tendance à envahir les nerfs, une caractéristique qui, bien qu'elle ne soit pas pathognomonique, suggère la mise en place de voies moléculaires spécifiques à l'origine de ce neurotropisme [El-Rifai et al., 2001]. C'est une tumeur qui produit abondamment des composants de la membrane basale et de la matrice extracellulaire ce qui pourrait être lié à de nouveaux mécanismes génétiques de différenciation.

Au total, le CAK correspond à une tumeur constitutionnellement biphasique ayant une croissance lente, avec des récives locales et des métastases à distance inéluctables. Les mécanismes moléculaires à l'origine de l'initiation et la progression de ce type de carcinome sont mal compris. Nous avons étudié par CGH array de haute de résolution 17 tumeurs de CAK à la recherche de remaniements récurrents impliquant des gènes spécifiques pouvant avoir un rôle dans la carcinogenèse de cette tumeur.

I.Aspects cliniques des CAK

Le CAK est une tumeur qui se développe au dépend des glandes exocrines essentiellement ectodermiques ou ecto-endodermiques. Il représente approximativement 10% de l'ensemble des carcinomes des glandes salivaires principales, notamment les parotides et la submandibulaire, et accessoires [El-Naggar and Huvos, 2005]. Il forme 30% des carcinomes des glandes salivaires accessoires avec une fréquence plus élevée dans le palais, suivie par la langue, la muqueuse buccale, les lèvres et le plancher buccal [El-Naggar and Huvos, 2005]. Les localisations inhabituelles comprennent le conduit auditif externe [Pulec et al., 1963], le nasopharynx [Wang et al., 1996], les glandes lacrymale [Friedrich and Bleckmann, 2003], mammaire [Arpino et al., 2002] et sudoripare [Seab and Graham, 1987], l'arbre trachéo-bronchique [Moran et al., 1995], l'œsophage [Kitada et al., 1997], le col utérin [Ferry and Scully, 1988], la vulve [Paraskevaidis et al., 2001] et les glandes de Cowper [Carpenter and Bernardo, 1971].

Bien que le tableau clinique soit dépendant de la localisation anatomique, le symptôme commun le plus fréquent est l'apparition d'une masse d'évolution lente suivie par des algies en rapport avec l'infiltration périnerveuse [El-Naggar and Huvos, 2005]. La tumeur survient à tous les âges avec un pic chez l'adulte et le sujet âgé. Il n'existe pas de prédilection apparente pour un sexe en dehors d'une incidence élevée des tumeurs de la glande sbumandibulaire chez les femmes [El-Naggar and Huvos, 2005].

La classification des carcinomes des glandes salivaires principales se base sur la taille de la tumeur, l'extension locale de la tumeur, l'infiltration ganglionnaire et les métastases à distance, classification TNM (**Tableau 12**). Selon ces dernières règles, les tumeurs des glandes salivaires accessoires sont classées selon les critères des autres carcinomes du site anatomique d'origine.

TX	La tumeur primitive ne peut être évaluée
T0	La tumeur primitive n'est pas décelable
T1	Tumeur ≤ 2cm dans sa plus grande dimension sans extension extraglandulaire
T2	2cm < T ≤ 4cm dans sa plus grande dimension sans extension extraglandulaire
T3	T > 4cm dans ses plus grandes dimensions (T3a) ou avec envahissement extraglandulaire sans atteinte du nerf facial (T3b)
T4	(T4a) tumeur envahissant la peau, la mandibule, le canal auditif, et/ou le nerf facial (T4b) tumeur envahissant la base du crâne, de l'apophyse ptérygoïde et/ou de la carotide
N0	Pas de métastase ganglionnaire
N1	Un seul ganglion métastatique homolatéral de diamètre < 3cm
N2	Un seul ganglion métastatique homolatéral entre 3 et 6cm, ou plusieurs ganglions. Métastatiques homolatéraux dont aucun n'a un diamètre ≥ 6cm, ou métastases ganglionnaires bilatérales ou controlatérales dont aucune n'a un diamètre ≥ 6cm
N2a	Une métastase ganglionnaire unique homolatérale entre 3 et 6 cm
N2b	Plusieurs métastases ganglionnaires homolatérales dont le diamètre est < 6cm
N2c	Métastases ganglionnaires bilatérales ou controlatérales dont le diamètre est < 6cm
N3	Métastase ganglionnaire dont le diamètre est ≥ 6cm
M0	Pas de métastase connue
M1	Existence de métastase viscérale à distance

Tableau 12 : Classification OMS des glandes salivaires. D'après [Uro-Coste, 2009].

II. Aspects anatomo-pathologiques des CAK

1. Macroscopie

Macroscopiquement, cette tumeur se présente comme une masse solide unilobulaire et de consistance ferme. Elle est souvent partiellement circonscrite avec des secteurs d'infiltration.

2. Histopathologie

Ce type de carcinome est principalement formé par 2 types de cellules: épithéliale sécrétoire et myoépithéliale. L'ensemble de ces cellules s'organise selon 3 architectures: tubulaire, cribriforme et solide [Azumi and Battifora, 1987] (**Figure 44**). Le stroma tumoral est généralement hyalin et peut présenter des caractéristiques mucineuses ou myxoïdes. Dans certaines tumeurs, le stroma hyalin peut être très abondant avec une composante épithéliale atténuée. L'invasion périnerveuse, moins rarement intranerveuse, est une caractéristique commune des CAK bien qu'elle ne soit spécifique de ce type cancers. Dans la tumeur, l'infiltration nerveuse peut être très étendue et dépasser les limites cliniques de la masse tumorale.

Dans la forme tubulaire (**Figure 44A**), les canaux et les tubules sont tapissés de l'intérieur par une couche de cellule épithéliale avec une lumière centrale et de l'extérieur par une ou plusieurs couches de cellules myoépithéliales.

Le modèle cribriforme (ou glandulaire; **Figure 44B**), qui est la forme histologique la plus fréquente, est caractérisé par des îlots de cellules épithéliales et myoépithéliales renfermant des espaces cylindriques microkystiques. Les cellules tumorales sont de petite taille, de forme cuboïde contenant un noyau basophile et un cytoplasme de faible abondance. Ces cellules ont une apparence presque monomorphe.

La forme solide (ou basaloïde; **Figure 44C**) est composée par des îlots massifs de cellules basaloïdes avec un centre souvent nécrotique. Les cellules sont de petite taille, à cytoplasme basophile avec une chromatine dense en motte.

Les figures mitotiques sont généralement rares dans les variants cribriforme et tubulaire, en revanche, elles sont facilement individualisables dans la forme solide conventionnelle qui est associée à un mauvais pronostic [Carrasco et al., 2006]. Ces 3 formes peuvent être plus ou moins associées [Batsakis and Luna, 1990; Perzin et al., 1978].

La stratification des CAK a apporté une valeur pronostique dans plusieurs études [Szanto et al., 1984]. Selon la proportion de la composante solide dans la tumeur, 3 grades indicateurs de pronostic sont mis en évidence [DaCruz et al., 2006 ; Szanto et al., 1984 ; Uro-Coste, 2009]. Le grade 1 correspond à des carcinomes bien différenciés et constitués par des modèles tubulaire et cribriforme sans aucune composante solide. Dans le grade 2, la tumeur peut avoir une structure purement cribriforme ou mixte mais la composante solide reste inférieure à 30% dans certaines études [Szanto et al., 1984] et à 50% dans d'autres [Spiro and Huvos, 1992]. Le grade 3, qui est de mauvais pronostic, correspond aux carcinomes avec une composante solide prédominante [Spiro and Huvos, 1992 ; Szanto et al., 1984 ; Uro-Coste, 2009].

Dans de très rares cas, les CAK peuvent subir une dédifférenciation, appelée aussi transformation de haut grade [Handra-Luca et al., 2009; Seethala et al., 2009, 2011]. Ce variant histologique peut présenter 2 composantes : une architecture conventionnelle de CAK et un carcinome dédifférencié qui peut être soit un carcinome indifférencié, soit un adénocarcinome peu différencié. Dans les CAK, la dédifférenciation est un événement extrêmement rare dont l'évolution clinique et les caractéristiques moléculaires sont mal compris, même si les données récentes semblent être en faveur d'un caractère clinique agressif de cette transformation des CAK [Seethala et al., 2011].

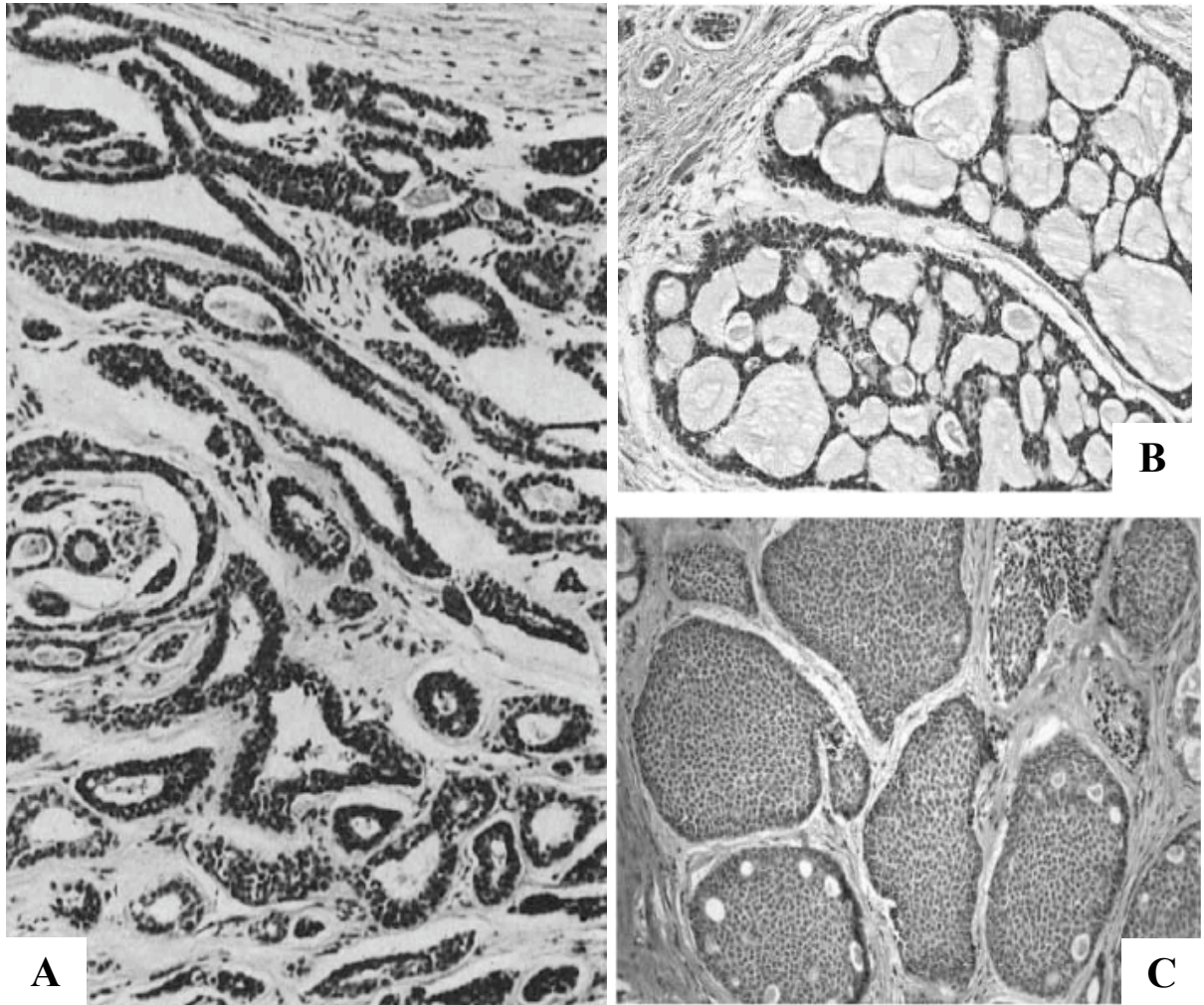


Figure 44 : Différents types histologiques de carcinomes adénoïde kystique. A tubulaire, B cribriforme, C solide. Adapté de [Rao et al, 2008].

3. Immunohistochimie

L'utilisation des anticorps dirigés contre des filaments intermédiaires et d'autres marqueurs moléculaires a permis de mieux caractériser les 2 principaux types de cellules des CAK [Azumi and Battifora, 1987 ; Bell et al., 2010 ; Bilal et al., 2003; Carlos-Bregni et al., 2009 ; Neves Cde et al., 2010] (**Tableau 13**).

Les cellules épithéliales expriment les marqueurs suivants : ACE ("*carcinoma embryonic antigen*"), EMA ("*epithelial membrane antigen*"), CK7 ("*cytokeratin*"), S100 et sur-expriment C-Kit (CD117) [Bell et al., 2010] (**Figure 45A**). Les cellules myoépithéliales sont CD10-, CK14⁺, CK17⁺, vimentine⁺, SMA⁺ ("*smooth, muscle actin*"), TP63⁺, S100⁺ et EGFR⁺, GFAP⁺ ("*glial fibrillary acidic protein*") [Bell et al., 2010 ; Bilal et al., 2003] (**Figure 45B**).

Les CAK expriment faiblement le Ki-67 [Carlos-Bregni et al., 2009]. En revanche, la dédifférenciation des CAK s'accompagne d'une augmentation de l'expression du Ki-67 avec perte de l'expression des marqueurs myoépithéliaux [Gondivkar et al., 2011].

Anticorps	Cellule luminale	Cellule myoépithéliale
ACE	+	-
EMA	+	-
C-Kit	++	-
CK7	+	-
PS100	+	+
EGFR	-	+
GFAP	-	+
TP63	-	+
CK14	-	+
CK17	-	+
SMA	-	+
Vimentine	-	+

Tableau 13 : Immunohistochimie des CAK.

+ : positif ; - : négatif ; ++ expriment fortement ; +/- expriment faiblement

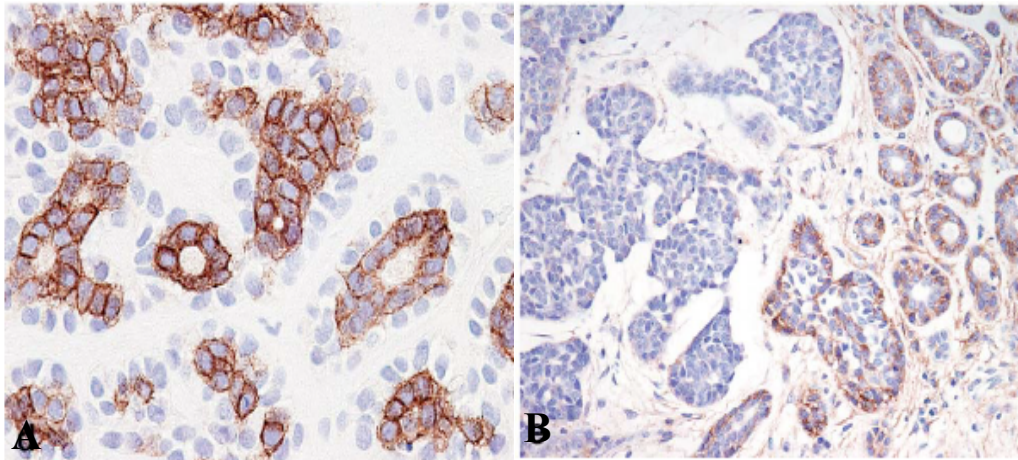


Figure 45 : Immunomarquage des cellules des CAK. A marquage C-Kit+ des cellules épithéliales. **B** marquage positif EGFR des cellules myoépithéliales dans les formes tubulaire et cribriforme et négatif dans la forme solide. D'après [Bell et al., 2010].

III. Altérations génomiques des CAK

Les altérations génomiques ont été étudiées par la cytogénétique conventionnelle [Mark et al., 1996; Stenman et al., 1986], la cytogénétique moléculaire [Jin et al., 2001; Roijer et al., 1997], la CGH métaphasique et microarray [Rao et al., 2008; El-Rifai et al., 2001 ; Kasamatsu et al., 2005], SNP array [Yu et al., 2007] et des techniques moléculaires de recherche de LOH [Johns et al., 1996; Rutherford et al., 2006 ; Queimado et al., 1998].

1. Anomalies génomiques quantitatives

La récurrence de la délétion 6q, del(6q), dans les CAK a été rapportée par la cytogénétique conventionnelle. Des études par caryotype de 38 échantillons de CAK ont démontré que les réarrangements de 6q sont présents dans 18/38 cas [Bell et al., 2007 ; El-Naggar et al., 1999 ; Higashi et al., 1991 ; Hrynychak et al., 1993 ; Jin et al., 2001; Lopez-Ginés et al., 1994 ; Mark et al., 1996 ; Martins et al., 1996 ; Nordkvist et al., 1994 ; Sandros et al., 1990 ; Stenman et al., 1986]. Parmi ces réarrangements : les del(6q) ont été observées

dans 8/18 cas. Dans 10/18, ces réarrangements correspondent à des translocations impliquant le 6q ; ces remaniements seront abordés dans le paragraphe concernant les anomalies équilibrées. Des études ultérieures par CGH ont rapporté une fréquence variable de la del(6q) dans les CAK. L'analyse de 24 tumeurs étudiées par CGH métaphasique, a mis en évidence la del (6q) dans 25% des cas [El-Rifai et al., 2001]. Dans une étude de 53 CAK par aCGH (2500 clones), la del(6q) a été détectée dans 32% des cas [Rao et al., 2008]. La zone minimale commune délétée a été cartographiée par CGH dans la région 6q23q27 [El-Rifai et al., 2001 ; Rao et al., 2008]. Des études moléculaires ont été réalisées pour restreindre d'avantage la zone minimale commune à la recherche de gènes suppresseurs de tumeurs. L'étude de 58 échantillons (CAK appariés avec des glandes salivaires normales) avec 38 marqueurs (microsatellites) répartis sur le 6q, a démontré que la LOH survient dans 57% des cas, confirmant ainsi les résultats de la cytogénétique conventionnelle [Rutherford et al., 2006]. La région minimale commune est localisée en 6q24.1q25.1 et flanquée par les marqueurs D6S471 et D6S168. Cette région contient 2 gènes suppresseurs de tumeurs potentiellement candidats : *PLAGL1* ("pleomorphic adenoma of the salivary gland gene like 1") et *LATS1* ("large tumor suppressor 1").

Des études par CGH de CAK ont rapporté des anomalies génomiques déséquilibrées en dehors de la del(6q) [El-Rifai et al., 2001; Freier et al., 2005 ; Kasamatsu et al., 2005 ; Persson et al., 2012 ; Rao et al., 2008 ; Vékony et al., 2007 ; Wetterskog et al., 2012; Yu et al., 2007] (**Tableau 14**). Le nombre des anomalies génomiques rapporté par CGH métaphasique est relativement important dans les CAK. En revanche, cette technique est peu sensible et la majorité des anomalies rapportées se localisent au niveau des télomères des chromosomes qui génèrent un profil génomique peu fiable [Vékony et al., 2007] (**Tableau 14**). Des études par aCGH de haute résolution et par SNP array, qui sont des techniques plus résolutes, ont souligné la rareté des altérations génomiques déséquilibrées dans ce type de carcinome [Persson et al., 2012 ; Yu et al., 2007] (**Tableau 14**).

Des altérations des locus *RBI/13q14* et *TP53/7p13* ont été rapportées dans les CAK. L'analyse de LOH a démontré des anomalies au locus *TP53* dans plus de la moitié des cas des CAK [Yamamoto et al., 1996, 1998].

Gains	Pertes	Méthodes d'étude	Nombre de cas	Références
1q23.2, 1q32.1, 1q44, 6p12.3, 8q22.1q23.1, 8q24.3, 9p24.3p23, 13q34, 17q23.2, 22q11.2, 22q13.1	1p36.3p35.3, 1p21.3p21.1, 2p11.1, 3p21.3p21.1, 3p14.2p12.3, 3p12.3p12.1, 5q12.3q13.2, 5q13.3q14.3, 5q22.1, 6q24.1q27, 9p24.2p23, 9p22.3p22.2, 9q33.3q34.3, 11p15.5p15.4, 11p15.4, 11p15.1, 11q23.3, 12q13.1q13.2, 12q13.3, 12q13.3q14.1, 14q23.2q24.3, 15q15.2q15.3, 21q11.1, 21q22.3	ACGH (244.000 oligonucléotides)	40 tumeurs	Persson et al., 2012
1p36.1p35.3, 11p15.5, 12p13.3, 16p13.3, 19p13	6q25.3q26, 9p11.1q21.1	BAC array (32000 clones)	16 tumeurs	Wetterskog et al., 2012
1p31p22, 1q31q44	1p36 p32, 1p35p32,	CGH métaphasique et BAC array (2500 clones)	53 tumeurs	Rao et al, 2008
1q11q25, 4q12, 6p25q22, 8, 8p23p11, 18	2q33q37, 4p16q35, 4q11q27, 4q31q35, 5p15q35, 5q11q35, 6q23q27, 9p13q22, 12q12q13.3, 13q 17p, 19	BAC array (4000 clones)	18 tumeurs	Vékony et al., 2007
1p36.3p35.3, 1p35.2p33, 2q37.3, 4p16.3, 5q32q33.1, 8q24.3, 9q33.3q34.3, 11p15.5, 11q13.3, 11q23.3, 12q13.2q14.1, 16p13.3, 16q24.3 17p13.3, 17q11.2q25.3, 19p13.1q13.3, 19p12q13.3, 21q22.3 et 22q13.3	1p21.3p12, 5q21.1, 5q21.3q23.2, 9p22.3p13.3, 12q12q14.1, 13q14.3q21.3, 14q11.2q31.3, 17p13.1q11.1, 20q11.2q12	SNP array (100k)	22 tumeurs et 2 lignées cellulaires	Yu et al., 2007
7p11.2, 2p21	9p	CGH métaphasique	6 tumeurs	Kasamatsu et al., 2005
1q32, 3p21, 3q29, 4q35, 5p15.3, 5q35, 6p25, 6q21q24, 6q27, 7q11.2, 7q21, 7q31, 10q11.2, 11p14, 11p12q12, 11q14, 11q23, 12p13, 12q13, 12q14, 12q24.3, 13q24, 15q21, 16p13.3p13.2, 16q24, 18p11.3, 18q23, 19q13.4, 21q22, Xq28	8p22	CGH métaphasique	27 tumeurs	Freier et al., 2005
1q31q32, 2pterp23, 4q12q13, 6p, 6pterp24, 6p21, 7pterp15, 7q1q34, 8, 8p, 8q, 9pterp23, 9q34, 11q, 11q12q13, 12q24, 13q32qter, 14q32, 16, 16p, 16q23, 17p12, 17q, 17q11q21, 17q24qter, 18, 18p, 18p11.2, 20q, 20q13, 22 et 22q13	1p, 3p, 3p14p12, 3q12q13, 3q13, 4p15, 4q26qter, 5q13q14, 5q13, 6, 6q22, 6q23qter, 6q23q24, 6q24, 8p23, 9pterp21, 11p, 12q12, 12q12q13, 13q21, 13q21q22, 14q24qter, 17q11q21, 18q21q22 et Xq21q22	CGH métaphasique	24 tumeurs	El-Rifai et al., 2001
1pter p22, 1p34p11, 1q11q32, 3q13.3q23, 7, 7q, 8, 9p, 11q12q13, 15, 16, 17, 19, 22	1pterp33, 1pter35, 1q41qter, 5, 5q12q21, 6q22.2q23, 6q11qter, 6q11q23, 6q23qter, 7p21.2p13, 8q11q13, 9p 9pterp21, 9q, 9q31qter, 11p, 11q21q23, 12q12q13, 12q12q14, 12q12q15, 12q12q21.2, 12q15q21, 12q21.3qter, 13, 13q13q31, 13q14q31, 13q14q22 13q21qter, 14, 16q, -X			

Tableau 14 : Altérations de nombre de copies dans les CAK rapportées dans la littérature.

Deux études ont rapporté des amplifications génomiques dans les CAK [Rao et al., 2008 ; Vékony et al., 2007]. L'analyse de 18 tumeurs par CGH array a mis en évidence des amplifications dans 7 régions chromosomiques : 9q34.1, 9q34.3, 11q13.2q13.3, 12q14.3q21.1, 16p13.3, 16q24.3 et 19q13.3 [Vékony et al., 2007]. Parmi les gènes candidats inclus dans ces amplicons : *CCND1*, *MDM2* et *NOTCH1*. L'étude de 58 CAK a rapporté une seule amplification de la région 4q12 qui intéresse *c-Kit* [Rao et al., 2008].

2. Anomalies génomiques équilibrées

Le profil cytogénétique des CAK a montré un contenu génomique relativement diploïde [El-Naggar et al., 1999] et un nombre limité d'anomalies chromosomiques de structure équilibrées [Bell et al., 2007].

L'étude cytogénétique de 38 cas de CAK [Bell et al., 2007 ; El-Naggar et al., 1999 ; Hrynychak et al., 1994 ; Jin et al., 1994 ; Martins et al., 1996, 2001 ; Nordkvist et al., 1994 ; Sandros et al., 1990] (**Figure 46A**) a mis en évidence des translocations impliquant 6q dans 10/38 cas. Une translocation récurrente t(6;9)(q23;p23-24) a été détectée dans 6/10. Des variants de cette translocation t(6;9) ont été rapportés dans 4/10 cas : t(X;6)(p22;q23), t(6;14)(q22;q11), t(6;14)(q25;q13) et t(6;15)(q25;q15). La translocation t(6;9) a été identifiée comme la seule anomalie dans certains cas de ces tumeurs suggérant un rôle primaire et/ou précoce dans le développement de ce groupe de CAK [El-Naggar et al., 1999 ; Martins et al., 2001 ; Sandros et al., 1988].

Récemment le clonage des points de cassure de cette translocation a mis en évidence un gène de fusion impliquant *MYB* ("*v-myb myeloblastosis viral oncogene linked to avian leukemia*"; chr6:135 544 146-135 582 003) et *NFIB* ("*nuclear factor IB*", chr9 :14 071 847-14 303 945) [Persson et al., 2009]. *MYB* est un facteur de transcription qui participe à la régulation de la prolifération, l'apoptose et la différenciation cellulaire [Oh and Reddy 1999 ; Ramsay and Gonda, 2008]. Il est surexprimé dans les cellules immatures en cours de prolifération et son taux de transcrite décroît au fur et à mesure que les cellules se différencient. La protéine *MYB* possède 3 domaines clés fonctionnels : le domaine N-terminal se lie à l'ADN ; le domaine central active la transcription et le domaine C-terminal régule négativement la transcription [Oh and Reddy 1999 ; Ramsay and Gonda, 2008]. Ce dernier domaine (codé par les exons 10 et 13) contient un motif leucine *zipper-like*, lequel domaine quand il est interrompu amorce l'activité transformante de *MYB*. Le gène *MYB* est un

oncogène potentiel qui est remanié dans les cancers humains [Stenman et al., 2010]. Dans les LALT, le locus *MYB/6q23* peut être soit dupliqué, soit remanié par une translocation t(6;7)(q23;q34). Dans ce dernier cas, la séquence intégrale de *MYB* est mise sous la commande des séquences régulatrices du gène *TCRβ* qui entraînent alors d'une surexpression de *MYB*. Il est également surexprimé dans les cancers du pancréas, colon, sein [Ramsay and Gonda, 2008]. Chez la souris, *Myb* est exprimé dans la glande submandibulaire au stade embryonnaire, ceci est en faveur d'un rôle possible de *MYB* dans le développement des glandes salivaires [Visel et al., 2004]. De plus, *MYB* a été impliqué dans le maintien des cellules progénitrices et requis pour une bonne différenciation du système hématopoïétique, des neurones, des cellules de la peau et des cryptes de l'épithélium colique.

NFIB code pour facteur de transcription nucléaire ayant un domaine qui se lie à l'ADN, un domaine N-terminal de dimérisation et un domaine C-terminal de transactivation, riche en proline [Qian et al., 1995].

Dans les CAK et par rapport à une glande salivaire normale, le gène de fusion *MYB-NFIB* résulte en une surexpression *MYB* [Persson et al., 2009]. Des taux élevés de la protéine *MYB* sont également retrouvés par immunohistochimie dans les CAK. Cette activation constitutive de *MYB* induit une surexpression de ses gènes cibles [Persson et al., 2009]. L'analyse de l'expression d'un panel de 14 gènes cibles de *MYB* dans 7 CAK a révélé une surexpression des gènes : (1) du cycle cellulaire (*CCNB1*, *CDC2*, *MAD1L1*), (2) de l'apoptose (*API5*, *BCL2*, *BIRC3*, *HSPA8*, *SET*), et (3) de la croissance cellulaire/angiogenèse (*MYC*, *c-Kit*, *VEGFA*, *FGF2*, *CD53*).

Le mécanisme moléculaire par lequel *MYB* est activé par cette t(6;9) est la conséquence vraisemblablement de la perte de l'extrémité 3'UTR [Persson et al., 2009] (**Figure 46B**) de *MYB* (exon 15). Cette région contient normalement des séquences cibles hautement conservées des miR-15a, miR-16 (chr13q14 : 49.519.608-49.522.567 Mb) et miR-150 [Persson et al., 2009 ; Press et al., 1994]. Ces miR régulent l'expression de *MYB*. En effet, dans le modèle murin, la perte de ces miR interrompt la répression de *MYB* [Chung et al., 2008]. Les miR-15a, miR-16 jouent un rôle important dans les hémopathies lymphoïdes B. En effet, ces miRNA sont perdus dans la leucémie lymphoïde chronique, généralement secondaire à une délétion de la région 13q14 [Calin et al., 2004b]. La protéine Pax5 réprime l'expression de ces miRNA et d'une manière simultanée stimule l'expression de *MYB* [Chung et al., 2008]. Une surexpression des miR-15a, miR-16 réduit le taux endogène de *MYB* et compromet la fonction de *PAX5*. La perte des miR-15a, miR-16 induit une surexpression de *BCL2*, protéine antiapoptotique, qui est négativement contrôlée par ces miRNA. Dans les

CAK d'autres mécanismes plus complexes peuvent induire une surexpression de MYB [Persson et al., 2012].

Le transcrit de fusion *MYB-NFIB*, absent des glandes salivaires normales [Mitani et al., 2010 ; West et al., 2011], est détecté dans 28% des CAK primaires et 35% des métastases [Mitani et al., 2010]. La présence de *MYB-NFIB* dans 1/3 des CAK confirme le rôle de ce gène de fusion dans le développement d'un groupe de ces tumeurs [Bhaijee et al., 2011]. Ce gène de fusion est exprimé d'une manière ubiquitaire quelque soit le site anatomique de la glande salivaire. En effet, *MYB-NFIB* a été identifié dans les CAK des glandes mammaire et salivaire de la tête et du cou [Persson et al., 2009]. Différents exons des gènes *MYB* et *NFIB*, impliqués dans cette fusion, sont à l'origine de plusieurs variants chimériques [Mitani et al., 2010]. *MYB* est surexprimé dans la majorité des CAK, bien que son expression soit significativement plus élevée dans les carcinomes avec t(6;9) [Mitani et al., 2010]. Dans une étude récente portant sur 156 tumeurs CAK, la surexpression de la protéine MYB, confinée aux cellules myoépithéliales des sous-types tubulaire et cribriforme, a été retrouvée dans 55% des cas [Mitani et al., 2011]. La sur-expression de *MYB* secondaire à la t(6;9) peut être attribuée à la perte de la région régulatrice 3'UTR de *MYB* [Mitani et al., 2010]. Cette sur-expression va induire la transcription des gènes cibles de *MYB* qui peuvent constituer de potentiels marqueurs de diagnostic et de traitement ciblé des CAK [Bell et al., 2011 ; Persson et al., 2009].

L'expression de la protéine MYB est vraisemblablement cantonnée à un type cellulaire de la tumeur [Bell et al., 2011]. Seules les cellules myoépithéliales expriment fortement la protéine MYB, bien que le gène de fusion soit présent dans les 2 types de cellules [West et al., 2011]. Il a été démontré que les patients présentant des tumeurs CAK : MYB+/c-KIT+ ont une meilleure survie que ceux ayant des tumeurs MYB-/c-KIT+ [Bell et al., 2011].

Il semble exister une association entre le transcrit de fusion *MYB-NFIB* et le phénotype CAK. En effet, ce transcrit est absent des autres types histologiques de tumeurs des glandes salivaires, y compris ceux ayant une double composante cellulaire et une structure morphologique commune avec les CAK [Mitani et al., 2010 ; West et al., 2011]. La présence de ce transcrit de fusion est significativement associée à l'âge (patients âgés de plus de 50 ans), néanmoins il ne serait pas corrélé à d'autres paramètres clinico-biologiques ni à la survie [Mitani et al., 2010].

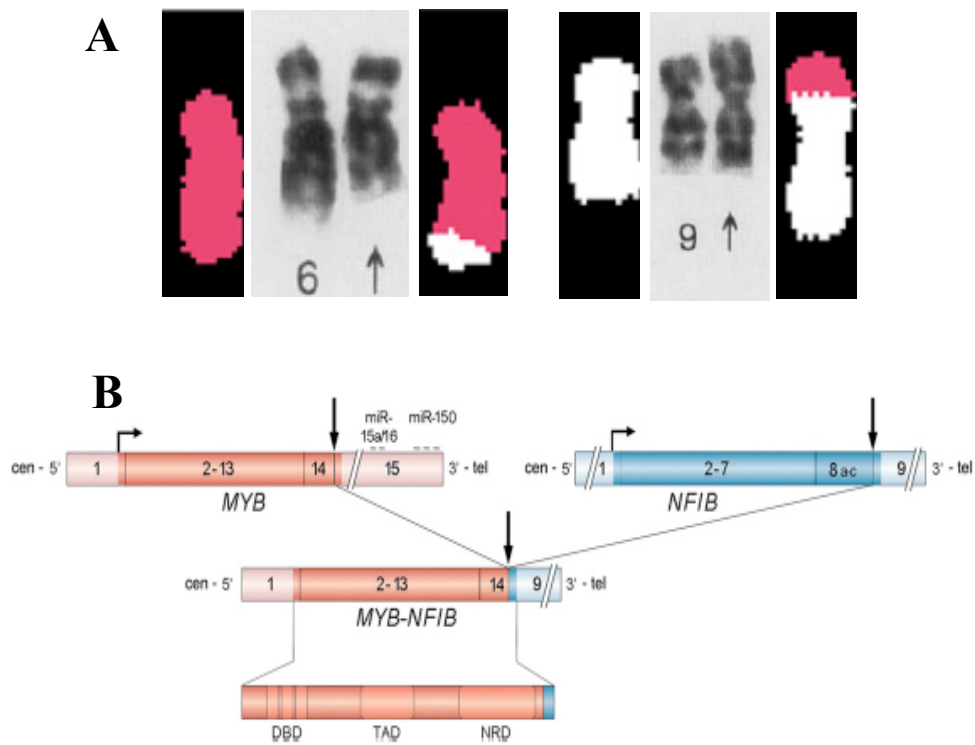


Figure 46 : Translocation t(6;9)(q23;p23p24). **A** caryotype et multiFISH partiel de la t(6;9). **B** Présentation schématique des gènes *MYB*, *NFIB*. Les flèches montrent les points de cassure. Pour *MYB* le point de cassure intéresse 3'UTR et emporte donc les mir-15a/16 et mir-150. DBD, DNA binding domain; NRD negative regulatory domain; TAD, transactivation domain. D'après [Persson et al., 2009].

IV. Anomalies de la signature d'expression

Une signature d'expression de gènes, impliqués dans le développement, la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose, la différenciation myoépithéliale et dans la matrice extracellulaire, a également été rapportée dans les CAK [Frierson et al., 2002]. La comparaison du profil d'expression de 15 CAK par rapport à l'épithélium des glandes salivaires majeures normale a montré une surexpression du gène *SOX4*. Ce dernier code pour un facteur de transcription ayant un domaine HMG lui permettant de se fixer sur l'ADN. Il est exprimé dans plusieurs types de tissus notamment les lymphocytes B. La surexpression de *SOX4* n'est pas spécifique

des CAK. En effet, il est également surexprimé dans le carcinome mammaire [Porter et al., 2001]. Une surexpression des facteurs de transcription AP-2 (notamment AP-2 α et AP-2 γ) a également été rapportée dans les CAK [Frierson et al., 2002]. Les protéines AP-2 ont un rôle dans la régulation de plusieurs gènes notamment *c-Kit* [Huang et al., 1998 ; Leask et al., 1991]. Une surexpression de deux gènes de la voie Wnt/ β -caténine a également été rapportée dans les CAK [Frierson et al., 2002]. *Frizzled-7*, exprimé normalement dans plusieurs types de tissus adultes et fœtaux, code pour un récepteur de la protéine Wnt et peut réprimer *APC* et donc promouvoir la signalisation de la β -caténine [Sagara et al., 1998]. La caséine Kinase 1 ϵ , réagit avec plusieurs composants de la voie Wnt et sa sur-expression va stabiliser la protéine β -caténine d'où une activation de la transcription des gènes cible de cette protéine. Par ailleurs, une sécrétion abondante des protéines de la matrice extracellulaire (exemple la chondroïtine sulfate) et de la membrane basale a été retrouvée dans les CAK [Frierson et al., 2002].

V. Altérations épigénétiques des CAK

L'analyse des îlots CpG de 16 tumeurs de CAK par microarray et pyroséquençage a montré une altération du profil de méthylation de plusieurs gènes par rapport à un tissu glandulaire normal [Bell et al., 2011]. Une hypométhylation des îlots CpG à proximité des gènes : *FBXO17*, *PHKG1*, *LOXL1*, *DOCK1*, et *PARVG* a été mise en évidence. Une hyperméthylation a été identifiée à proximité de plusieurs gènes codants pour des facteurs de transcription notamment *EN1*, *FOXE1*, *GBX2*, *FOXLI*, *TBX4*. Les gènes hyperméthylés ont un rôle dans le développement et l'apoptose, suggérant que la répression de ces gènes est associée à l'initiation et la progression de ce type de carcinome [Bell et al., 2011].

En conclusion, le CAK est une entité pathologique rare. Cette tumeur présente une hétérogénéité génétique. Le spectre des réarrangements est caractérisé par : des anomalies déséquilibrées et une translocation réciproque récurrente, t(6;9)(q23;p22p24) à l'origine d'un gène de fusion MYB-NFIB.

Résultats et discussion

Partie 3 : Analyse de haute résolution des carcinomes adénoïdes kystiques

Article 2: High-resolution array comparative genomic hybridization analysis of human bronchial and salivary adenoid cystic carcinoma

Laboratory Investigation, May 2008, 88(5):464-474

I. Contexte

Le diagnostic des CAK, comme toutes les autres tumeurs solides, se base essentiellement sur l'histopathologie. Plusieurs études [El-Naggar et al., 1999 ; Jin et al., 2001 ; Rao et al., 2008 ; Persson et al., 2012] étaient menées pour décrypter l'oncogénome de cette tumeur afin de dégager des marqueurs moléculaires permettant de proposer un diagnostic plus précis, émettre un pronostic et éventuellement proposer un traitement adapté et un suivi non invasif et sensible de la maladie cancéreuse. Ces études étaient parfois basées sur des méthodes génomiques ayant une résolution limitée et explorant une région unique du génome. Ainsi nous avons entrepris l'analyse de 17 tumeurs de CAK par aCGH pangénomique de 44K oligonucléotides.

Dix sept tumeurs congelées bronchique et salivaire étaient collectées de 5 hôpitaux Franciliens. La tumeur primaire provenait de glandes, salivaires principales ou accessoires dans 7 et 8 cas respectivement, et bronchiques dans 2 autres cas. L'échantillon étudié représentait, la tumeur primaire dans 11 cas, une récurrence locale dans 3 cas, ou une métastase dans 3 autres cas. Une cohorte supplémentaire de 21 CAK salivaires primaires, pour laquelle uniquement les coupes en paraffine étaient disponibles, était analysée en immunohistochimie pour comparer l'expression de certaines protéines.

Le seuil de 70% de cellules tumorales était évalué sur des coupes colorées par l'hématoxyline-éosine. Après extraction, l'ADN tumoral et de référence étaient différenciellement marqués et hybridés en quantité équimolaire sur des lames de CGH array contenant 44000 oligonucléotides. Les altérations de nombre de copies (CNAs) étaient validées par FISH et/ou MLPA. L'expression protéique était étudiée par immunohistochimie.

Dans une seule réaction, la MLPA ("*multiplex ligation-dependant probe amplification*") permet la détection simultanée d'une délétion ou une duplication simple copie de 40 séquences cibles du génome [Schouten et al., 2002]. Au cours de cette technique, ce n'est pas l'ADN matrice qui est amplifié mais plutôt les sondes ajoutées au mélange qui sont amplifiées et quantifiées. L'amplification de la sonde dépend de la présence de sa séquence complémentaire dans la matrice.

Pour valider les CNA des locus *CCND1*, *CDKN2B*, et *TP53*, nous avons procédé à une MPLA. Chaque locus testé est représenté par une sonde. Cette dernière est constituée par deux oligonucléotides qui s'hybrident sur 2 sites adjacents de la séquence cible. Les oligonucléotides qui s'hybrident seront alors unis par une ligase, permettant leur amplification. Toutes les sondes unies possèdent à leur extrémité une séquence identique, ce

qui permet une amplification par PCR à l'aide d'une seule paire d'amorces. Chaque sonde génère un produit d'amplification ayant une taille 130-480 pb. Ces produits seront séparés par électrophorèse. La quantité relative de chaque sonde amplifiée reflète le nombre de copies de la séquence cible.

II. Présentation des résultats

Dans notre série, les altérations génomiques (CNA) étaient rares (**Figure 1 de l'article 2**). Le nombre moyen de CNA était de 3.8. Globalement, il y avait plus de perte que de gain (41 versus 24).

La région la plus fréquemment perdue était 6q (**Tableau 2 de l'article 2**). Ailleurs, les pertes étaient observées dans les régions chromosomiques: 1p35, 8q12q13, 9p21, 12q12q13 et 17p13p11. Les régions minimales communes délétées emportaient les gènes suppresseurs de tumeurs : *CDKN2A/CDKN2B*, *TP53* et *LIMA1*. La région minimale commune délétée sur 8q12q13 impliquait le miR-124A2 qui régule les gènes *CDK6* et *MMP2*.

Un gain récurrent était noté dans les régions chromosomiques : 7p15.2, 17q21q25, et 22q11q13.2. Des gains isolés étaient observés au niveau des locus *CCND1*, *KIT/PDGFRA/KDR*, *MDM2* et *JAK2*.

III. Discussion

Nous avons étudié les réarrangements génomiques de 17 carcinomes des glandes salivaires et bronchiques par CGH array de haute de résolution afin de préciser la récurrence de certaines anomalies et déterminer l'implication de gènes spécifiques dans la carcinogenèse de ce type de carcinome.

Les altérations génomiques étaient rares puisque la moyenne de CNA était de 3.8. Le nombre moyen de CNA par tumeur était de 2.7 dans une série de 20 tumeurs étudiées par CGH métaphasique [El-Rifai et al., 2001] et de 3 dans une cohorte de 24 tumeurs et lignées cellulaires analysées par SNP array 100K [Yu et al., 2007]. La paucité des remaniements chromosomiques était également rapporté par la cytogénétique conventionnelle [Mark et al., 1996 ; Martins et al., 1996 ; Sandros et al., 1990] et confirmé par l'analyse de la ploïdie par cytométrie de flux [Franzen et al., 1991; Greiner et al., 1989]. La rareté des désordres génomiques dans les CAK ne peut être attribuée à un défaut de résolution de notre méthode. Car la même méthode avait permis de déceler des altérations génomiques assez nombreuses

dans les lymphomes de Burkitt [Toujani et al., 2009]. Etant donné que les CAK sont des tumeurs typiquement pauvres en cellules stromales [Yu et al., 2007] et que les échantillons étaient choisis sur la base de la haute richesse en cellules tumorales (> 70%), ces résultats ne peuvent pas être expliqués par le faible pourcentage de cellules néoplasiques dans les cas étudiés. Le CAK est donc marqué par la rareté des anomalies génomiques, à la différence de la majorité des carcinomes, qui sont caractérisés par des aneuploïdies et des réarrangements chromosomiques complexes probablement secondaires à la crise des télomères [Maser and DePinho, 2002]. Cette crise résulte d'un raccourcissement des télomères du à des cycles itératifs de réplication cellulaire survenant précocement au cours de la progression tumorale. Alternativement, l'instabilité des microsatellites, comme dans un groupe de cancer du colon [Lengauer et al., 1997], pourrait expliquer la rareté des réarrangements génomiques. Néanmoins cette hypothèse était écartée par l'étude de l'allotypie des microsatellites dans les CAK [Cerilli et al., 1999 ; El-Rifai et al., 2001]. Les mutations ponctuelles sont également très rares dans les CAK. Le séquençage selon Sanger de 410 gènes candidats a mis en évidence des mutations ponctuelles non récurrentes dans 10 gènes (<http://www.sanger.ac.uk/cosmic>). Ainsi, un phénotype mutateur est totalement exclu dans les CAK [Bodmer et al., 2008; Loeb et al., 2008; Tomlinson et al., 1996] et l'implication d'un nombre restreint de gènes spécifiques associés à la sélection positive pourrait expliquer la carcinogenèse des CAK [El-Rifai et al., 2001].

Dans la majorité des études publiées antérieurement, la del(6q) est l'anomalie la plus fréquente dans les CAK [Bell et al., 2007 ; Nordkvist et al., 1994 ; Queimado et al., 1998]. En effet, la délétion 6q est l'anomalie la plus fréquente dans les CAK [Jin et al., 2001]. La proportion de la del(6q) varie selon le nombre de cas étudié et l'approche expérimentale. Dans une étude portant sur une série de 24 tumeurs étudiées par CGH métaphasique, la del (6q) a été observée dans 25% des cas. En revanche, dans une analyse par CGH array de 53 CAK, la del(6q), détectée dans 32% des cas succède à la del(1p) qui est observée dans 44% des cas [Rao et al., 2008]. Dans cette étude, les pertes des régions chromosomiques 1p32p36 ($P=0.002$), 2q33q 37 ($P=0.02$), et 6q22q27 ($P=0.004$) seraient associées au type solide des CAK [Rao et al., 2008].

Cette anomalie n'est pas spécifique des CAK, elle était rapportée dans les autres tumeurs solides, dans les leucémies aiguës et dans les lymphomes (<http://cgap.nci.nih.gov/chromosomes/Mitelman>; Huret, 2010). Dans les CAK, 2 types de réarrangement de la région 6q étaient rapportés [Jin et al., 2001]. Il peut s'agir d'une simple

délétion, cette perte d'hétérozygotie suggère l'implication d'un gène suppresseur de tumeurs [Queimado et al., 1998]. Néanmoins, aucun gène suppresseur de tumeurs n'était mis en évidence [Rutherford et al., 2006]. Dans une série de CAK publiée juste après notre travail, la del(6q) était également fréquente [Rao et al., 2008].

Nous n'avons pas pu réaliser les caryotypes des 17 tumeurs car il s'agissait d'une collection de tumeurs congelées, sans mise en culture. L'anomalie chromosomique la plus fréquente était aussi la perte de 6q (6/17 cas).

On constate une perte, MCR, de la région 6q22.3. Dans un cas le point de cassure distal, passe dans le gène TCBA1, impliqué dans des translocations de lymphomes T. La deuxième MCR perdue (chr 6q24.1q25.1:139.735.253-157.546.310) couvre 18 Mb environ et contient 64 gènes. Parmi ceux ci PLAG1L1 est une protéine en doigt de zinc se fixant à l'ADN, soumis à empreinte parentale et est considéré comme un gène suppresseur de tumeur.

On a vu que la région 6q23 était aussi impliquée dans des translocations dont la plus fréquente est la t(6;9)(q22-23;p23-24) [Bhaijee et al., 2011], cette dernière entraînant la surexpression du gène de fusion *MYB-NFIB*, [Persson et al., 2009]. Cette translocation, étant une anomalie équilibrée, n'est donc pas détectable par CGH array [Pinkel and Albertson, 2005] mais la t(6;9) peut-être aussi déséquilibrée [Jin et al., 2001]. Après un réexamen des données primaires une seule tumeur (**cas 15, Tableau 1 de l'article 2**) présente un point de cassure (6q23.3qter <135.6-170.8 Mb>) de perte à l'intérieur de MYB dans la région distale de la translocation sans délétion du 9p. S'il y a translocation, la partie perdue est le site de fixation des miR.

La del(1p), est détectée dans 44% des cas dans la série de Rao [Rao et al., 2008]. Dans notre série la del(1p) a été détectée dans 29% (n=5) des cas avec deux MCR. Ces dernières sont incluses dans la del(1)(p36p32) présentée par Rao et al qui l'associent à une survie globale significativement réduite.

Une del(9)(p21), emportant d'une manière hémizygote le locus *CDKN2A/CDK2B*, était présente dans 2 cas de notre série. Cette anomalie est le remaniement le plus fréquent dans la série de Yu analysant 22 tumeurs et 2 lignées cellulaires [Yu et al., 2007] où elle est observée dans 4 tumeurs et 1 lignée cellulaire et que le séquençage de l'allèle restant n'a pas montré de mutations [Yu et al., 2007]. Une extinction transcriptionnelle pourrait être due à la méthylation du second allèle d'autant plus que la méthylation de *P16* a été rapportée dans 15% [Maruya et al., 2003] et 22% [Nishimine et al., 2003] des CAK. Dans notre travail, nous n'avons pas évalué le profil de méthylation de l'allèle homologue et le taux du transcrit du gène.

La perte du locus *TP53* était observée dans 2/17 tumeurs dans notre étude, alors que dans d'autres études, cette anomalie était rapportée dans plus de 50% des cas [Yamamoto et al., 1998]. Cette différence pourrait être en rapport avec les méthodes utilisées pour rechercher cette anomalie et le type histologique des CAK.

Dans notre série, le gain le plus fréquent impliquait la région 7p15.2. Dans une analyse portant sur 27 tumeurs, la trisomie 22 est l'anomalie la plus fréquente [Freier et al., 2005]. Dans une autre série de 53 tumeurs, la trisomie 8 est l'anomalie la plus fréquemment gagnée [Rao et al., 2008]. Cette trisomie 8 n'est pas spécifique des CAK, elle est observée dans tumeurs solides et dans les hémopathies malignes (<http://cgap.nci.nih.gov/chromosomes/Mitelman>; Huret, 2010). Dans, cette étude la trisomie 8 est associée à la forme solide [Rao et al., 2008].

Les amplifications géniques sont rares dans les CAK. Dans une tumeur primaire (**cas 15, Tableau 1 de l'article 2**), une amplification de *MDM2* sous forme de double minute était observée dans notre série. A notre connaissance, c'est le premier travail rapportant l'amplification de *MDM2* dans ce type de carcinome.

En conclusion, l'étude des CAK par CGH array de haute résolution a permis de démontrer que le CAK est caractérisé par la rareté des altérations génomiques, donc un phénotype mutateur n'est pas obligatoire à la survenue de ce type de carcinome. En effet, la t(6;9) a été rapportée comme la seule anomalie dans un sous groupe de CAK. Une perte des gènes *CDKN2A/CDKN2B* et *TP53* a été également retrouvée dans notre travail. Le gène *TP53* était directement délété dans 2 cas et probablement indirectement altéré en conséquence à une amplification de *MDM2* dans un seul cas.

High-resolution array comparative genomic hybridization analysis of human bronchial and salivary adenoid cystic carcinoma

Alain Bernheim^{1,2}, Saloua Toujani^{2,3}, Patrick Saulnier⁴, Thomas Robert⁵, Odile Casiraghi¹, Pierre Validire⁶, Stéphane Temam⁷, Philippe Menard^{8,9}, Philippe Dessen^{2,5} and Pierre Fouret^{3,9}

Adenoid cystic carcinoma (ACC) is a rare but distinctive tumor. Oligonucleotide array comparative genomic hybridization has been applied for cataloging genomic copy number alterations (CNAs) in 17 frozen salivary or bronchial tumors. Only four whole chromosome CNAs were found, and most cases had 2–4 segmental CNAs. No high level amplification was observed. There were recurrent gains at 7p15.2, 17q21–25, and 22q11–13, and recurrent losses at 1p35, 6q22–25, 8q12–13, 9p21, 12q12–13, and 17p11–13. The minimal region of gain at 7p15.2 contained the *HOXA* cluster. The minimal common regions of deletions contained the *CDKN2A/CDKN2B*, *TP53*, and *LIMA1* tumor suppressor genes. The recurrent deletion at 8q12.3–13.1 contained no straightforward tumor suppressor gene, but the *MIRN124A2* microRNA gene, whose product regulates *MMP2* and *CDK6*. Among unique CNAs, gains harbored *CCND1*, *KIT/PDGFR/KDR*, *MDM2*, and *JAK2*. The CNAs involving *CCND1*, *MDM2*, *KIT*, *CDKN2A/2B*, and *TP53* were validated by FISH and/or multiplex ligation-dependent probe amplification. Although most tumors overexpressed cyclin D1 compared with surrounding glands, the only case to overexpress *MDM2* had the corresponding CNA. In conclusion, our report suggests that ACC is characterized by a relatively low level of structural complexity. Array CGH and immunohistochemical data implicate *MDM2* as the oncogene targeted at 12q15. The gain at 4q12 warrants further exploration as it contains a cluster of receptor kinase genes (*KIT/PDGFR/KDR*), whose products can be responsive to specific therapies.

Laboratory Investigation (2008) 88, 464–473; doi:10.1038/labinvest.2008.18; published online 10 March 2008

KEYWORDS: adenoid cystic carcinoma; array comparative genomic hybridization; c-kit; mdm2 head and neck; microRNA

Adenoid cystic carcinoma (ACC) is a rare subtype of adenocarcinoma occurring in major and minor salivary glands of the upper aero-digestive tract.¹ Other sites of origin include the tracheobronchial tree, lachrymal gland, breast, skin, and vulva. ACC is an infiltrative tumor with a marked tendency to invade nerves and adjacent bone. It consists of two kinds of cells: ductal cells and myoepithelial cells.

Owing to its slow growth, ACC has a relatively indolent but relentless course. When distant metastases occur, only low response rates have been reported with multi-drug regimens.² Studies have reported contradictory results regarding the usefulness of compounds targeting KIT.^{3,4} As a

general rule, responsiveness to KIT inhibitors correlates with gene mutations, which are not found in ACC.⁵ Significant efforts should be directed to improve the knowledge of molecular genetic events in this malignancy to provide new therapeutic targets.

There is wide agreement that recurrent genomic aberrations contain genes that are important for tumor occurrence or progression.⁶ To date, few studies of ACC using chromosomal comparative genomic hybridization (CGH) have revealed recurrent segmental losses at 6q23–qter, 12q12, and 13q21–q22 and recurrent segmental gains at 16p, 17q, and 22q13.^{7,8} Yet, the resolution of these techniques was limited,

¹Département de Biologie et de Pathologie Médicales, Institut de Cancérologie Gustave-Roussy, Villejuif, France; ²FRE 2939 CNRS, Institut de Cancérologie Gustave-Roussy, Villejuif, France; ³Unité de recherche translationnelle Thorax Tête et Cou, Institut de Cancérologie Gustave-Roussy, Villejuif, France; ⁴Recherche translationnelle, Institut de Cancérologie Gustave-Roussy, Villejuif, France; ⁵Unité de génomique fonctionnelle, Institut de Cancérologie Gustave-Roussy, Villejuif, France; ⁶Département de Pathologie, Institut Mutualiste Montsouris, Paris, France; ⁷Département de Chirurgie Cervico-faciale, Institut de Cancérologie Gustave-Roussy, Villejuif, France; ⁸Service de Stomatologie et de Chirurgie Maxillo-faciale, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, France and ⁹Université Pierre et Marie Curie, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

Correspondence: Professor P Fouret, MD, PhD, Unité de recherche translationnelle Thorax Tête et Cou, Institut Gustave-Roussy, 39 rue Camille Desmoulins, Villejuif, Cedex 94805, France. E-mail: pierre.fouret@igr.fr

Received 18 December 2007; accepted 24 December 2007

and loss-of-heterozygosity (LOH) studies have subsequently been performed to map deletions at 6q and 12q.^{9,10} Consistent with previous cytogenomic analyses, a recent study using concurrent LOH and copy number analysis by SNP genotyping arrays has concluded that ACCs are characterized by limited number of chromosomal aberrations with the most frequent area of deletion present on 9p.¹¹

Array CGH has been developed to increase the spatial resolution for the detection of chromosomal copy number alterations (CNAs). Vékony *et al*¹², published the results of a study using BAC-based CGH array in a series of 18 paraffin-embedded primary ACCs, showing very frequent copy number gains at loci of growth factors and their receptors. Here, we report the results of a study using high-resolution oligonucleotide CGH array in frozen samples with the goal to increase the knowledge of CNAs in ACC and establish a catalog of candidate cancer genes residing in the altered regions.

MATERIALS AND METHODS

Cases

The 17 frozen samples used for array CGH were obtained from Institut de Cancérologie Gustave-Roussy, Institut Mutualiste Montsouris, Beaujon, Pitié-Salpêtrière, and Avicenne hospitals, (France), but were treated, purified, quantified, and labeled at Institut Gustave Roussy. The study complied with French laws regarding patient information and consent. There were 13 females and four males. The median age was 51 years (interquartile range 38–55). The primary sites were major salivary glands in seven cases, including the parotid gland (three cases), the submandibular gland (three cases), and the sublingual gland (one case), or minor salivary glands along the aerodigestive tract in eight cases. Two cases involved the bronchial glands. The tumor samples were taken from the primary tumor in 11 cases, a local recurrence in three cases, or a metastatic site in three cases.

An additional cohort of patients with primary salivary ACC, for which only paraffin-embedded samples were available, had been treated at Pitié-Salpêtrière hospital from 1968–2002. The 21 samples were chosen to directly compare the immunohistochemical expression of selected proteins in the tumor cells and in surrounding salivary cells.

Array CGH

Samples at least 3 × 3 × 3 mm in size were cut in a cryostat at –20°C after removing most of OCT. Beginning, middle and end sections of each sample were stained with hematoxylin and eosin to assess the proportions of tumor cells. The average percentage of tumor cells was above 70% in each case. Thirty 40 μm sections were placed in a tube and kept frozen. The following procedures are detailed in the supplementary material. The samples were homogenized, and genomic DNA was extracted according to Quiagen protocols with modifications. Restriction of DNA, quality control of restricted DNA by microanalysis, pooling, and clean up, were

performed following Agilent instructions. The samples were hybridized in single vs a standard DNA (male or female, Promega) with oligo 44k CGH Agilent micro arrays (G4410B). The scanning and image analysis were performed with Agilent technology using default settings. Raw data txt files from the Agilent Feature Extraction software 8.5.1.1 were then imported for analysis into CGHAnalytics 3.3.1. Aberrations were obtained with ADM1 algorithm and filtering options of a minimum of five probes and abs (log2 ratio) > 0.3. Aberration segments were manually reviewed. Those that were localized to regions with high-copy repetitive or GC-rich DNA sequences including telomeric regions were excluded.

Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification

The multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) method for relative quantification of nucleic acids was performed according to manufacturer's instructions (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands). The P006 MLPA probe mix included two probes for *CCND1*, two probes for *TP53*, and one probe for *CDKN2B*, all labeled with 6-FAM fluorescent dye. The PCR products were analyzed in duplicate and in two dilutions (1/1 and 1/20) using an ABI-3730 DNA Analyser (Applied Biosystems). Preliminary tests showed an excellent reproducibility with less than 5% in the variation of peak area. After normalization, a difference of 30% in peak area of the sample relative to the reference DNA sample was required to call a deletion or a gain.

Fluorescent *In Situ* Hybridization

Tumor touch preps were prepared by imprinting slightly thawed tissues onto glass slides and air-drying them. The slides were fixed in methanol/acetic acid. For *KIT* and *CDKN2A/2B*, FISH were performed with commercial probes (Kreatec, NL). For *CCND1* and *MDM2*, BAC clones were selected from Pieter De Jong libraries (<http://www.chori.org/bacpac/>) according to their position on UCSC human genome (<http://www.genome.ucsc.edu/>). Purified BAC DNA was labeled by random priming in the presence of Alexa 488-dUTP (green) and Alexa 594-dUTP (red) (Abott). The quality of the probes was verified by hybridization to metaphases spreads of normal peripheral lymphocytes.

Immunohistochemistry

Standard immunohistochemistry protocols were used to detect cyclin D1 (pre-diluted mab P2D11F11, Ventana, Tucson, AZ, USA), MDM2 (mab IF2, Zymed, San Francisco, CA, USA), and VEGF (rabbit polyclonal antibody A-20, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). For cyclin D1, after epitope retrieval in 10 mM, pH 7.3 citrate buffer for 20 min, all steps were performed in a Ventana automated stainer. For MDM2, after epitope retrieval for 30 min, the primary antibody was incubated overnight at 4°C at 1:25, then revealed using the Histostain kit (Zymed) For VEGFA, after epitope retrieval for 30 min, the primary antibody was

incubated at room temperature at 1:200 for 1 h, then revealed using the ABC Elite kit (Vector, Burlingame, CA, USA). DAB was used as a substrate.

Statistical Analysis

The Fischer's exact test was used to compare primary tumors vs recurrences or metastases according to whether they had a unique or multiple large segmental losses as well as to compare expression of cyclin D1 in tumor and salivary gland cells.

RESULTS

Cytogenomic Analysis

The results of our analysis for each case are provided in Table 1. The profile of gains and losses for the study population is displayed in Figure 1. The number of CNAs varied from 17 (case 3) to one (cases 9 and 16) with most cases being 2–4 (Figure 1, Table 1). Only four whole chromosome CNAs, linked to mitotic non-disjunction, were found. This compares to the 66 segmental CNAs, linked to structural chromosomal rearrangements, which were observed. Losses were much more frequent than gains in the large segmental CNAs (>10 Mb), while they were in the same proportions in smaller segmental CNAs (<10 Mb) ($P < 0.01$). Among the three tumors with more than a unique large segmental CNA loss, one was a local recurrence (case 1), and two were a metastasis (cases 5 and 3) compared to 11 primary tumors and three recurrences or metastases among cases having no or a unique large segmental CNA loss ($P = 0.03$). Case 3 had the highest number of segmental CNAs and complex structural rearrangements on 4q, 11q and 15.

Recurrent CNAs

Segmental CNAs individually spanning at least 10 probes were compared across samples to identify overlapping groups of positive- or negative-value CNAs (CNA clusters). This step identified 12 CNA clusters that were defined by at least two positive- or negative-value overlapping CNAs. The number of overlapping CNAs per cluster ranged from two to four.

The 12 clusters were localized on chromosomes 1p, 6q, 7p, 8q, 9p, 12q, 17p, 17q, and 22q. Two distinct clusters that were separated by at least 1 Mb were present on 1p, 6q, and 12q, whereas the chromosomes 7p, 8q, 9p, 17p, and 22q harbored only 1 cluster each. On 17q, there were actually six distinct regions of overlapping positive-value CNAs, which were considered together as a single complex cluster extending from 17q21.32 to 17q25.3.

The boundaries of segmental CNAs in each cluster were used in an effort to identify the minimal regions of overlap or minimal common regions (MCRs). Eleven clusters included only 1 MCR. In the highly complex cluster on 17q, 2 MCRs could be identified, while there was no clear pattern of recurrence in other 17q regions. The data for the 13 MCRs are shown in Table 2. There were 4 MCR of gains and 9 MCR of losses, which were localized to chromosomes 7p, 17q, 22q,

and to chromosomes 1p, 6q, 8q, 9p, 12q, 17p, respectively. The median MCR size was 1365 kb (range 90–5447 kb). The maximum ratio ranged from 1.31 to 2.04 for gains, while the minimum ratio ranged from 0.52 to 0.61 for losses.

Putative Oncogenes or Tumor Suppressor Genes Present within MCRs

Genes were localized to MCRs using the UCSC Genome Browser (HG 17, build 35). Among MCR genes, coding genes that have been associated with cancer were identified using the list of genes possibly implicated in cancer in the Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology.¹³

As shown in Table 2, the *LIMA1*, *CDKN2A/CDKN2B*, and *TP53* cancer-associated genes were present within MCRs of losses. Interestingly, although the MCR at 9p21 also involved the *MTAP* and *TUSC1* putative tumor suppressor genes, an additional eight probes loss (41 kb) targeted exactly the *CDKN2A/CDKN2B* locus. The MCR at 7p15.2 contained the *HOXA* cluster.

Several regions included gene encoding microRNAs. The loss extending 2193 kb at 8q12.3–13.1, which was noted in three cases, involved the *MIRN124A2* microRNA gene.

Putative Oncogenes or Tumor Suppressor Genes Present within Unique CNAs

Several unique CNAs were sufficiently narrow (16–79 probes) to point to possibly relevant genes. These events include gain of *JAK2*, high level gain of *CCND1*, *MDM2*, and *KIT* (Table 1).

Validation of Aberrations with MPLA

The deletions involving *TP53* at 17p13.2. and *CDKN2B* at 9p21 were confirmed by a reduction of more than 30% of peak areas in cases 8 and 10 and in cases 1 and 10, respectively. An increase more than 30% in relative peak area for both the *CCND1* and the adjacent *FGF3* probes at 11q13 confirmed the gain in case 3.

Validation of Aberrations with FISH

FISH validated the gains in regions involving *KIT/PDGFR*/*KDR*, *MMD2*, and *CCND1* as well as the loss in the region involving *CDKN2A/CDKN2B*.

Immunohistochemistry

Cyclin D1 was diffusely expressed within tumor nuclei in case 3—a metastatic deposit to the liver—that had a *CCND1* gain (Figure 2). Tissue from the primary site in the palate was not available for comparison. In an independent series of 21 ACCs with paraffin-embedded samples with paired surrounding salivary glands, cyclin D1 was expressed in every sample in 30–100% tumor cells, while none of the salivary glands expressed the protein ($P < 0.001$).

Case 7 that harbored a gain involving *MDM2* exhibited strong *MDM2* nuclear expression, which was not seen in the adjacent glands in the cavum (Figures 2 and 3). Nuclear

Table 1 Chromosomal number abnormalities

Case	Gender	Age (years)	Primary site	Sample+	Loss	Gain
1	F	79	Cheek	LR	–8q11.2q13.1 < 51.52–67.58 > (MIRN124A2), –8q24.1qter < 119.95–141.59 > , –9p22.3p21.2 < 14.38–26.31 > (CDKN2A), –9p21.2p13.2 < 28.50–37.02 >	
2	F	38	Parotid gland	PT	–6q22.3 < 121.8–125.02 > (PKIB,HSF2,SERINC1), –12q21.3q22 < 87.32–89.81 >	+7p15.2 < 26.91–27.05 > (HOXA)
3	F	33	Palate	Liver M	–4q12 < 58.6–71.5 > , –4q13.3q22 < 76.3–81.2 > , –6q24.1q26 < 139.1–161.7 > , –9q22.31qter < 92.4–136.3 > , –11pterp15.4 < 0.1–7.4 > , –11q12.1q13.1 < 56.9–65.4 > , –11q13.5qter < 72.9–134 > , –15q13.1q14 < 24.5–33 > , –15q15.2q21.2 < 40.5–49.5 >	+1p36.3 < 1.05–6.69 > , +4q12 < 53.32– 57.81 > x[1.9](KIT), +4q13.3 < 71.65–76.2 > , +4q22.2q22.3 < 91.6–93.9 > +7p15.2 < 26.91– 27.05 > (HOXA), +11q13.2q13.4 < 66.9– 72.8 > x[2.9](CCND1,FGF19,FGF4,FGF3,CTTN), +15q11.2q12 < 22.4–24.4 > , +15q14 < 36.2– 40.16 > , +18q12 < 33–35 >
4	M	64	Parotid gland	LR	–1p36.1p35.1 < 26.4–32.7 > (FGR,SERINC2,LCK), –1p33p31.1 < 48.4–76.81 > , –8q12.3q13.1 < 65.3–67.5 > (MIRN124A2), –8q23.3q24.11 < 117–118 >	
5	M	54	Submandibular gland	Lung M	–6q13q22.3 < 71–128.2 > , –9p21.3p21.2 < 20.8–27.3 > (CDKN2A), –12q12q15 < 37.05–68.27 > , –14q23.3q24.3 < 64.26–75.41 > (FOS)	
6	F	51	Main bronchus	PT	–3pterp12.3 < 0.3–76.84 > , –15q21.3q22.2 < 55.81–58.87 >	
7	F	46	Main bronchus	PT	–4p15.3 < 13.15–15.33 > (RAB28 ^a)	+12q15 < 67.47–68.27 > x[2.4](MDM2), +16x[1.3], +22x[1.4]
8	F	52	Sublingual gland	PT	–8q12.3q13.1 < 63.2–67.58 > (MIRN124A2), –17pterp11.2 < 0.4–18.8 >	+17q21.31qter < 41.4–76.6 >
9	F	36	Soft palate	PT		+22
10	F	49	Ethmoido-nasal region	LR	–9p21 < 21.95–21.99 > (CDKN2A) ^b , –13q12.3q31.1 < 17.6–91.98 > , –21	
11	M	55	Submandibular gland	PT	–6q24.1q25.2 < 139.7–157.5 >	+7p15.2 < HOXA cluster > ^b , +7p13 < 43.99–44.19 >
12	F	71	Submandibular gland	PT	–17p13.1p11.1 < 6.2–22.1 >	+17pterp13.2 < 0.4–6.18 > , +17q11.1qter < 22.7–78.5 >
13	F	54	Tongue	Lung M	–4q26q34.3 < 116.12–181.33 > , –6q25.2q25.3 < 154.91–155.8 >	+9q34.13qter < 134.5–137.8 >

Table 1 Continued

Case	Gender	Age (years)	Primary site	Sample+	Loss	Gain
14	F	21	Cavum	PT	-1p36.2p36.1 < 12.64–16.07 > -1p35.2p35.1 < 31.2–32.68 > -12q12q13.1 < 43.11–52.40 >	+1p36.3 < 0.8–3.67 >, +7p15.2 < 26.97–27.06 > (HOXA) +8q24.3qter < 142.27–145.98 > +9pterp23 < 0.2–14.07 > (JAK2)
15	F	68	Maxillary sinus	PT	- 6q23.3qter < 135.6–170.8 > - 12q12q13.3 < 43.7–55.7 >	
16	F	35	Tongue base	PT		
17	M	50	Parotid gland	PT	-9p22.3p22.1 < 14.13–19.28 > x[0.81] ^c	

+PT = Primary tumor, LR = Local recurrence, M = Metastasis.

Agilent 44 k were used for CGH array with a high molecular weight DNA (Promega) as control. A threshold of 10 oligonucleotides was used to obtain highly confident results. In recurrent regions some small abnormalities ≥ 5 were retained. The chromosomes are described following the ISCN 2005 with slight additions: sequences are included into < > and expressed in Mb, with a resolution of 10 kb; linear ratio are written between brackets after an x, they are omitted for the trisomy or monosomy ranges, with the exception of complex regional rearrangements; some genes of interest in the designed region are written in parenthesis and separated by a comma. Chromosome losses or gains bigger than 10 Mb are labeled in bold, complex chromosomal structural rearrangements are labeled in italics.

^aAt the border, perhaps involved in a structural rearrangement.

^bBelow 10 oligonucleotides but recurrent aberration.

^cRatio above 0.8 but clearly visible on the graphic as a consistent chromosomal rearrangement.

MDM2 expression was not seen in any other tumor, including the 21 independent paraffin-embedded samples. None of the surrounding bronchial or salivary glands expressed MDM2 within nuclei; light or moderate cytoplasmic MDM2 staining could occasionally be observed. Moderate or strong expression of VEGFA was noted within the cytoplasm of 20–100% of tumor cells in every tumor sample. In salivary glands strong expression was seen in serous acinar cells and some duct cells. Mucous cells were consistently negative.

DISCUSSION

A genome-wide analysis of 17 frozen samples of ACC has been performed using long oligonucleotide CGH 44k array. Previous chromosomal CGH studies have revealed recurrent segmental losses at 6q23-qter, 12q12, and 13q21–q22 and recurrent segmental gains at 16p, 17q, and 22q13.^{7,8} The comparison with our results show that the majority of the most frequent losses or gains that were previously reported by chromosomal CGH are listed in this study in a limited cohort, but often delineated with a better precision. Notably, we report MCRs of deletions on 6q and on 12q, which overlap with previously identified regions of common allelic losses that were mapped by LOH studies, an observation that further supports the validity of our methodology.^{9,10} Using oligonucleotide CGH array, at least five probes are required for a reliable call for loss or gain.^{14,15} In this study, we made a definite call only using at least 10 probes. Moreover, aberrations were subjected to manual review. An important aspect of our analysis is that we chose to discard recurrent calls in regions characterized by GC-rich and high-copy repetitive sequences. As in chromosomal CGH, less specific hybridization to arrays can occur in GC-rich regions, probably in relationship with not perfectly effective blocking by Cot-1 DNA even when the quality of genomic DNA preparations is carefully controlled.^{16,17} To validate our results, we used FISH and MLPA for six selected aberrations. We were able to validate five of the six aberrations assayed, including those containing *CCND1*, *MDM2*, *KIT*, *CDKN2A/2B*, and *TP53*. However, we could not validate one recurrent low amplitude gain, which is not shown in this paper. Therefore, although our approach was conservative, caution should be advised for the regions that we did not validate with secondary techniques.

Every case reported here had CNAs with an average number of three. Large chromosomal band size segmental CNAs were significantly more frequently losses than gains, to the contrary of small segmental CNAs. No high level amplification was observed. Whole CNAs were observed on small chromosomes, that is, chr16, chr21 and chr22 in two cases. Those results are in accordance with most previous reports, which claim that ACC does not have very extensive chromosomal aberrations, and they suggest that global genomic instability is not a mechanism.^{7,8,11} A potential technical problem could have been the dilution of tumor cell DNA into non tumor cell DNA. However, the percentage of

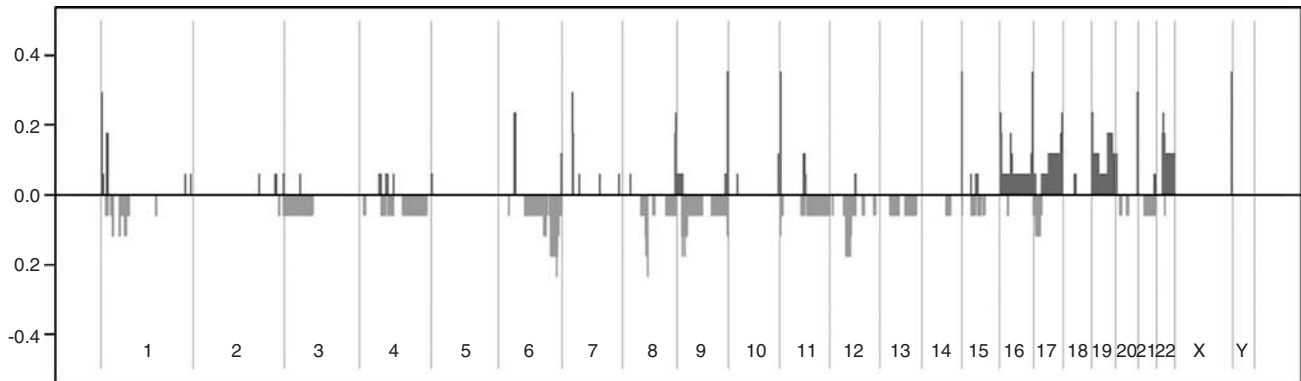


Figure 1 Profile of gains and losses after exclusion of repetitive DNA sequences in 17 frozen adenoid cystic carcinomas using high-resolution oligonucleotide CGH array. Shown are log₂ ratios for each chromosome.

tumor cells was above 70% in each of our samples. Consistent with the accumulation of genetic events as tumors progress toward more advanced stages, the only tumor that had a relatively high number of genomic aberrations was a metastatic lesion, and recurrent or metastatic lesions had significantly more large segmental losses than primary tumors.

The low level of structural complexity and the resolution of the oligonucleotide CGH array may facilitate the identification of regions that may be of functional importance. An interesting gain at 12q15 involves *MDM2*. A previous study has previously reported an amplicon of 6.8 Mb at 12q14.3–q21.1,¹² containing many genes. Here, the gain that was validated by FISH as a double minute type amplification extended only along 800 kb. Furthermore, we showed that the case with the 12q15 gain was the only one to express *MDM2* within tumor nuclei and that none of the salivary or bronchial glands expressed the protein within nuclei. Together, our data strongly support that *MDM2* is the targeted oncogene. *CDKN2A* and *CDKN2B* are the prime suspects in the loss at 9p21 in two cases. An additional 8-probes loss involved exactly *CDKN2A* and *CDKN2B*, further suggesting that the locus is the target of the deletion. Several studies have reported deletion or methylation of *CDKN2A* in ACC.^{18,19} In addition to genetic changes, epigenetic modifications have an important impact on gene expression and the phenotypes of cancer cells. *CDKN2A/CDKNB* also encodes p14ARF, a member of the *MDM2/TP53* pathway. Interestingly, *TP53* was present in a recurrent loss, and the losses of *CDKN2A/CDKNB*, the losses of *TP53*, and the gain of *MDM2* were mutually exclusive aberrations, suggesting that the pathway is involved in ACC.

Another interesting aberration is the gain at 4q12. Freier *et al*,⁸ using classic CGH has previously reported a gain at 4q12–q13 in one case, but our study is the first to have narrowed the gain to a region that contains the cluster of the transmembrane receptor kinase genes *KIT*, *PDGFRA*, and *KDR*. Inhibitors of *KIT* are used in the treatment of advanced ACC,^{2–4} although no *KIT* mutation has been found so far.⁵

KIT is consistently expressed by luminal cells in ACCs.⁵ Before the removal of the liver deposit that was analyzed by array CGH, the patient had not been treated with *KIT* inhibitors, a chronology that indicates that the 4q12 gain was not secondary to such treatment. The *KIT* oncoprotein interacts with *PDGFRA*, whose gene is localized in the vicinity. The region also harbors *KDR*, which encodes the receptor for VEGF. Serosus cells in normal salivary glands constitutively express high levels of VEGF,²⁰ a fact that we confirmed by means of immunohistochemistry. Moreover, we showed that most tumors expressed high VEGF levels. The target gene in the 4q12 region remains to be determined.

CCND1 was gained in one case, in which cyclin D1 was diffusely expressed. As reported by Frierson *et al*, *CCND1* is one of the highest ranked overexpressed genes in ACC compared with normal salivary gland.²¹ We confirmed that ACC expressed cyclin D1 by means of immunohistochemistry in an independent series, while the surrounding glands did not ($P < 0.001$). Unlike *MDM2*, cyclin D1 expression within tumor nuclei is not restricted to cases with a gain in the corresponding locus, a fact indicating that several mechanisms are responsible for cyclin D1 overexpression.

The MCR at 12q12–q13.13 overlaps with one of the major consensus region of allele loss reported by Rutherford *et al*,⁹ though the boundaries of the changes were not coincident. Several cancer genes reside in the loss, including the *LIMA1* putative tumor suppressor gene.²² The *ANP32D* and *LETMD1* genes, also present within the consensus region of loss, are oncogenic. *DUSP6*, another candidate tumor suppressor gene within the LOH consensus deletion loci, is located outside the array CGH defined MCRs on 12q that is reported here.

Ten genes coding for microRNAs were located to regions of recurrent gain or loss, a finding consistent with the fact that this class of small, regulatory RNA genes frequently resides in cancer-associated genomic regions.²³ Evidence is accumulating that microRNAs contribute to tumorigenesis, which indicates that aberrations should be examined for the

Table 2 Minimal common regions of overlapping positive or negative value copy number alterations

Location ^a	Width ^a	Band1	Band2	Cases ^b	Ratio ^c	Cancer-associated coding genes ^d	microRNAs
chr1:31 200–32 688	1487	1p35.2	1p35.1	4, 14	0.58	BAI2 FABP3 HDAC1 LCK RBBP4 PTP4A2 EIF3S2 PUM1 KHDRBS1 IQCC MARCKSL1 TXLNA SERINC2	
chr1:50 618–52 179	1561	1p32.3	1p32.3	4, 14	0.55	CDKN2C EPS15 NRD1 RAB3B FAF1 RNF11	
chr6:121 809–125 021	3212	6q22.31	6q22.31	2, 5	0.59	FABP7 GJA1 HSF2 PKIB SMPDL3A SERINC1 TCBA1	
chr6:154 919–155 868	949	6q25.2	6q25.3	3, 11, 13, 15	0.53	CNKSR3, TIAM2	
chr7:26 967–27 057	90	7p15.2	7p15.2	2, 3, 14, *	1.38	HOXA7 HOXA9 HOXA10 HOXA11 HOXA13	MIRN196b
chr8:65 349–67 543	2 193	8q12.3	8q13.1	1, 4, 8	0.55	CRH CYP7B1 TRIM55 DNAJC5B ADHFE1	MIRN124A2
chr9:20 864–26 312	5447	9p21.3	9p21.2	1, 5, *	0.55	CDKN2A CDKN2B IFNA1 IFNA13 IFNA17 IFNB1 MTAP TUSC1	MIRN31
chr12:43 743–50 676	6 932	12q12	12q13.13	5, 14, 16	0.61	ACVR1B ACVRL1 ADCY6 ARF3 ATF1 CCNT1 COL2A1 LALBA PFKM PRKAG1 SMARCD1 TEGT VDR WNT1 WNT10B TUBA1A MLL2 DDX23 TUBA1B RAPGEF3 FAIM2 ANP32D LETMD1 RND1 RACGAP1 SENP1 PLEKHA9 LIMA1 HDAC7A RHEBL1 AMIGO2	
chr12:51 798–52 404	606	12q13.13	12q13.13	5, 14, 16	0.61	AMHR2 ITGB7 PCBP2 PFDN5 RARG SP1 TARBP2 MAP3K12 ESPL1 CSAD PRR13	
chr17:6277–18 845	1 154	17p13.2	17p11.2	8, 12	0.61	ALOX12 CD68 CLDN7 EIF4A1 EIF5A FGF11 POLR2A SLC2A4 TNK1 TNFSF13 TNFSF12 CLEC10A GABARAP AIPL1 YBX2 PTPNM3 TXNL5 KCTD11 BCL6B ALOX15B ATP1B2 CHD3 EFNB3 GUCY2D MYH10 PER1 RCVRN RPL26 SHBG TP53 AURKB NTN1 FXR2 ARHGFE15 JMJD3 HES7 WDR16 MYH10 RCVRN RPL26 AURKB NTN1 ARHGFE15 WDR16 SCO1 MAP2K4 GAS7 ELAC2 ADORA2B COX10 MEIS3P1 PMP22 UBB COPS3 PIGL NCOR1 TNFRSF13B TRPV2 RASD1 FLCN LLGL1 SHMT1 SREBF1 TOP3A PEMT GRAP ALKBH5	MIRN195, MIRN497, MIRN324, MIRN33b
chr17:44 158–45 402	1244	17q21.32	17q21.33	8, 12	1.34	GIP GNGT2 NGFR PHB HOXB13 IGF2BP1 MYST2 ABI3	MIRN196a-1
chr17:76 626–76 861	235	17q25.3	17q25.3	8, 12, 13	1.58	AATK	MIRN657, MIRN338
chr22:15 902–18 179	2277	22q11.1	22q13.2	7, 9	1.47	SEPT5 BCL2L13 BID CDC45L CLTCL1 GNB1L MRPL40 PRODH TBX1 UFD1L	

^aLocation and width in kb.

^b*Additional case(s) less than 10 probes.

^cMaximum (gain) or minimum (loss) ratio.

^dAtlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology.

The bold values indicate genes of special interest.

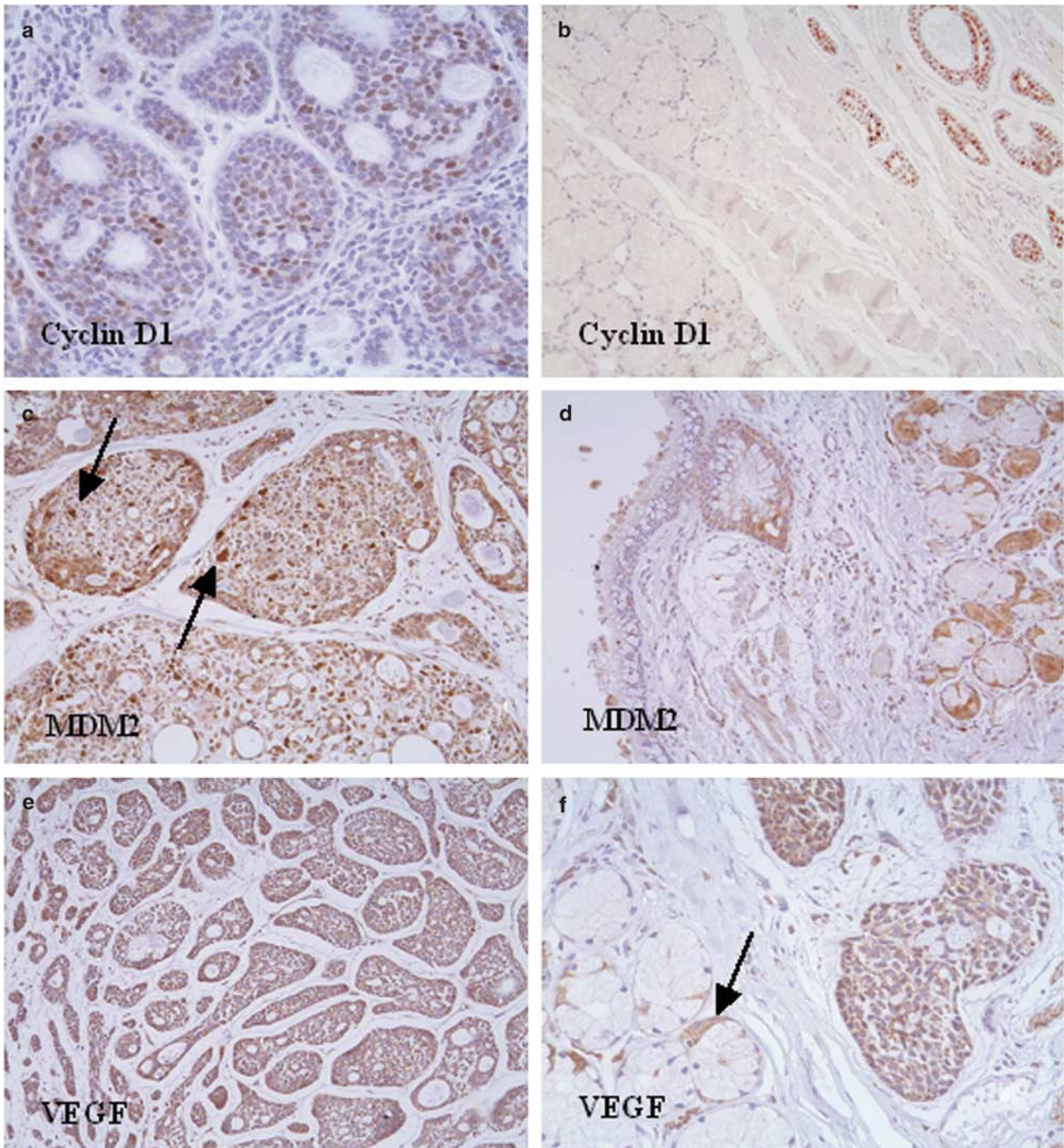


Figure 2 Immunoperoxidase staining for cyclin D1, MDM2, and VEGFA. (a and b) Cyclin D1: diffuse reactivity within tumor nuclei in case 3 (a); diffuse reactivity in tumor nuclei on the right side and lack of reactivity in the adjacent salivary gland on the left side in one paraffin-embedded case (case 18) (b). (c and d) MDM2: strong reactivity in scattered nuclei (arrows) in case 7 (c); moderate cytoplasmic staining, but lack of nuclear reactivity in the adjacent epithelial structures in the cavum in the same case (d). (e and f) VEGFA: diffuse cytoplasmic reactivity in case 7 (e); another field of the same case showing on the left side minor salivary glands with negative mucous cells and positive serous cells (arrow) (f).

presence of potentially cancer-associated microRNA genes. The deletion at 8q12.3, where no straightforward tumor suppressor gene has been located, harbors the *MIRN124A2* gene, which regulates *MMP2*, which is involved in invasion

and metastasis, and the oncogene *CDK6*.²⁴ Two regions of gains at clusters of *HOX* genes, several of which are oncogenic, contain *MRIN196* genes that participate in the post-transcriptional regulation of *HOX* messages.²⁵

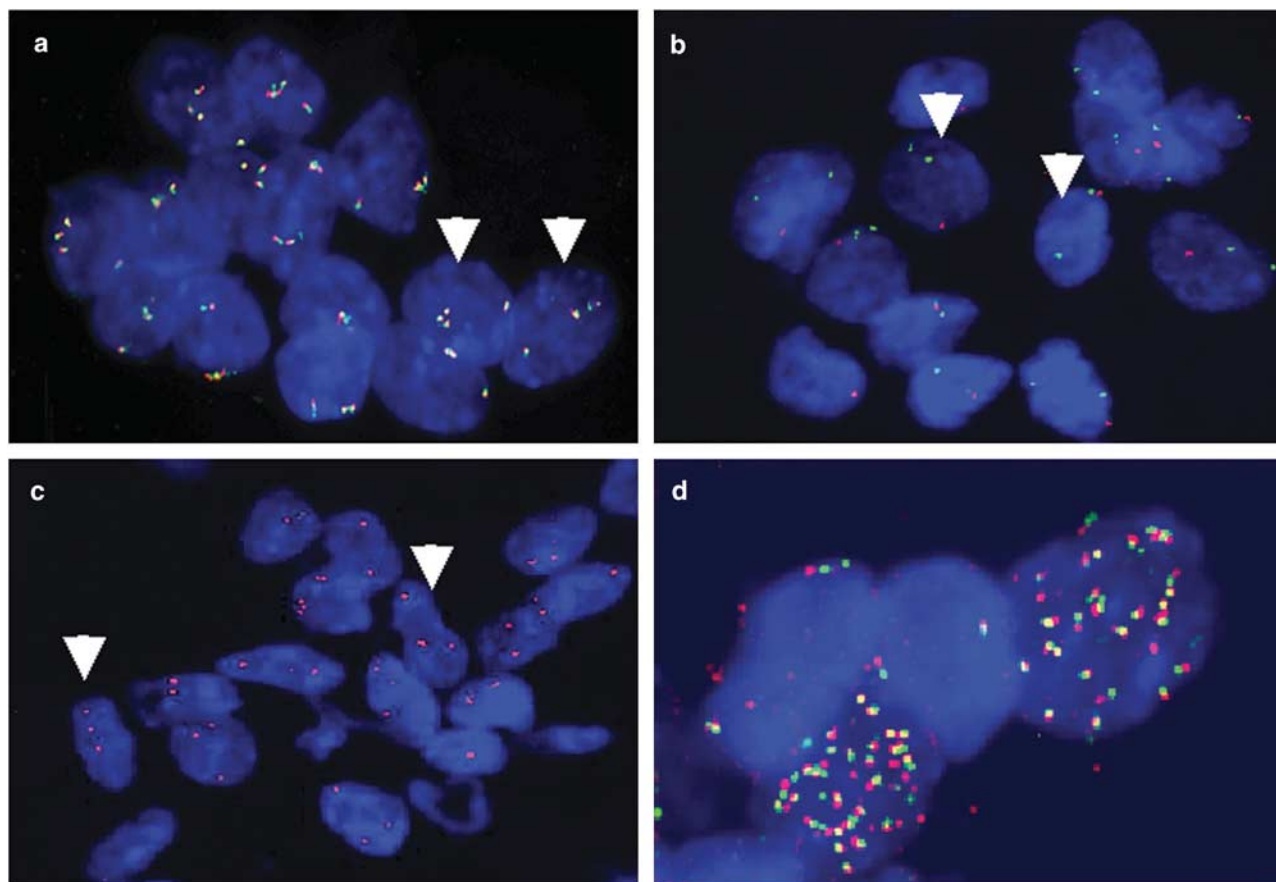


Figure 3 Validation of aCGH results using FISH on touch imprint of frozen tumors. (a) Case 3. Four copies of *KIT* gene were noted on the nuclei (white arrows). (b) Case 1. A single *CDKN2A/2B* locus (red signal) was observed while the control FISH probe (9q21) in green was normal. The nuclei with deletion are indicated with arrows. (c) Case 3. The BAC clone RP11-195M19 (red) in the region of *CCND1* gene was present in three copies on tumor nuclei. (d) Case 7. The BAC RP11-159C11 (red) and RP11-1143G9 (green) were chosen at the locus and near *MDM2* gene respectively. Some nuclei showed a typical amplification pattern seen with double minute amplification.

While we were in the final phase of writing this paper, Vékony *et al*¹², published the results of a study using BAC-based CGH 4.2 k array in a series of 18 paraffin-embedded primary ACCs, showing very frequent (~60–80%) copy number gains at loci of growth factors and their receptors.¹² Here, we analyzed 17 samples, but the number of aberrations, particularly gains, in our report is clearly lower than that found by Vékony. Choosing to use conservative criteria with a deliberate bias against high-copy repetitive or GC-rich sequences, it is likely that we underestimated the number of aberrations. Reviewing our primary data we noticed, albeit at a far lower frequency, abnormalities consistent with 15 of the 21 gains that were reported by Vékony *et al*¹². Strikingly, 12 of these 15 gains are localized to telomeres (1p36.33, 4p16.3, 8q24.3, 9q34.3, 11p15.5, 13q34, 16p13.3, 16q24.3, 17p13.3, 19p13.3, 20q13.33, and 22q13.33), and were discarded in our study as telomere-associated sequences are markedly GC-rich. While telomeric regions may contain important cancer genes, our opinion is that further evidence is required to establish the occurrence of widespread gains at telomeric sites in ACC.

In conclusion, although the present study is only a first-pass screening approach, the results presented here suggest that it provides an efficient entry point to catalog genomic CNAs in ACC. We were able to find most regions of recurrent gains and loss previously reported. Together with expression data, our results strongly implicate *MDM2*. The gain at 4q12 warrants further exploration as it contains a cluster of receptor kinase genes, whose products can be responsive to specific therapies. Further efforts to identify the target genes will probably involve systematic screens to produce orthogonal data sets (mutational, epigenetic, expression and loss of function phenotypes).

ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to the following investigators who participated in the collection of tissue samples: J-C Bertrand (GH Pitié-Salpêtrière), F Janot (Institut Gustave-Roussy), A Martin (CH Avicennes), and D Casal-Hatem (CH Bichat). We thank V Lazar for help with the PCR assays and A Valent for the generous gift of metaphase spreads of normal peripheral lymphocytes (both investigators at Institut Gustave-Roussy). This work was supported by Institut Gustave-Roussy (taxe professionnelle) and PNEs Poumon (INCa).

DISCLOSURE

All authors deny any ethical or financial conflict of interest.

Data availability: The microarray data related to this paper have been submitted to the Array Express data repository at the European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>) under the accession number E-TABM-267. They are available for reviewing purpose at the following URL: www.ebi.ac.uk/aerep/login

Username: Reviewer_E-TABM-267

Password: 1179220984917

1. El-Naggar A, Huvos A. Adenoid cystic carcinoma. In: Barnes L, Eveson J, Reichart P, Sidransky D (eds). *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours* (World Health Organization Classification of Tumours), 1st edn. IARC Press: Lyon, France, 2005, pp 221–222.
2. Dodd R, Slevin N. Salivary gland adenoid cystic carcinoma: a review of chemotherapy and molecular therapies. *Oral Oncol* 2006;42:759–769.
3. Faivre S, Raymond E, Casiraghi O, *et al*. Imatinib mesylate can induce objective response in progressing, highly expressing KIT adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *J Clin Oncol* 2005;23:6271–6273.
4. Pfeffer M, Talmi Y, Catane R, *et al*. A phase II study of Imatinib for advanced adenoid cystic carcinoma of head and neck salivary glands. *Oral Oncol* 2006;43:33–36.
5. Holst V, Marshall C, Moskaluk C, *et al*. KIT protein expression and analysis of c-kit gene mutation in adenoid cystic carcinoma. *Mod Pathol* 1999;12:956–960.
6. Albertson D, Collins C, McCormick F, *et al*. Chromosome aberrations in solid tumors. *Nat Genet* 2003;34:369–376.
7. El-Rifai W, Rutherford S, Knuutila S, *et al*. Novel DNA copy number losses in chromosome 12q12–q13 in adenoid cystic carcinoma. *Neoplasia* 2001;3:173–178.
8. Freier K, Flechtenmacher C, Walch A, *et al*. Copy number gains on 22q13 in adenoid cystic carcinoma of the salivary gland revealed by comparative genomic hybridization and tissue microarray analysis. *Cancer Genet Cytogenet* 2005;159:89–95.
9. Rutherford S, Yu Y, Rumpel C, *et al*. Chromosome 6 deletion and candidate tumor suppressor genes in adenoid cystic carcinoma. *Cancer Lett* 2006;236:309–317.
10. Rutherford S, Hampton G, Frierson H, *et al*. Mapping of candidate tumor suppressor genes on chromosome 12 in adenoid cystic carcinoma. *Lab Invest* 2005;85:1076–1085.
11. Yu Y, Baras A, Shirasuna K, *et al*. Concurrent loss of heterozygosity and copy number analysis in adenoid cystic carcinoma by SNP genotyping arrays. *Lab Invest* 2007;87:430–439.
12. Vékony H, Ylstra B, Wilting S, *et al*. DNA copy number gains at loci of growth factors and their receptors in salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007;13:3133–3139.
13. Huret JL, Dessen P, Bernheim A. Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology. *Nucleic Acids Res* 2003;31:272–274.
14. Ylstra B, van den Ijssel P, Carvalho B, *et al*. BAC to the future! or oligonucleotides: a perspective for micro array comparative genomic hybridization (array CGH). *Nucleic Acids Res* 2006;34:445–450.
15. Wicker N, Carles A, Mills I, *et al*. A new look towards BAC-based array CGH through a comprehensive comparison with oligo-based array CGH. *BMC Genomics* 2007;8:84.
16. Pinkel D, Albertson D. Array comparative genomic hybridization and its applications in cancer. *Nat Genet* 2005;37:S11–S17.
17. Tan DS, Lambros MB, Natrajan R, *et al*. Getting it right: designing microarray (and not 'microarray') comparative genomic hybridization studies for cancer research. *Lab Invest* 2007;87:737–754.
18. Maruya S, Kurotaki H, Shimoyama N, *et al*. Expression of p16 protein and hypermethylation status of its promoter gene in adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2003;65:26–32.
19. Li J, El-Naggar A, Mao L. Promoter methylation of p16INK4a, RASSF1A, and DAPK is frequent in salivary adenoid cystic carcinoma. *Cancer* 2005;104:771–776.
20. Pammer J, Weninger W, Mildner M, *et al*. Vascular endothelial growth factor is constitutively expressed in normal human salivary glands and is secreted in the saliva of healthy individuals. *J Pathol* 1998;186:186–191.
21. Frierson H, El-Naggar A, Welsh J, *et al*. Large scale molecular analysis identifies genes with altered expression in salivary adenoid cystic carcinoma. *Am J Pathol* 2002;161:1315–1323.
22. Maul R, Chang D. EPLIN, epithelial protein lost in neoplasm. *Oncogene* 1999;18:7838–7841.
23. Calin G, Sevignani C, Dumitru C, *et al*. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:2999–3004.
24. Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, *et al*. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res* 2007;67:1424–1429.
25. Yekta S, Shih I, Bartel D. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* 2004;304:594–596.

Partie 4 : Cytogénomique des adénocarcinomes pulmonaires des non fumeurs

Introduction

Le tabagisme actif est la principale cause de mortalité par cancer du poumon. En revanche, 15% des hommes et 53% des femmes développent un cancer bronchique non à petite cellule (CBNPC) sans avoir jamais fumé, soit 25% des patients dans le monde [Ferlay et al., 2010]. En France en l'an 2000, les CBNPC du NF sont responsables du décès de 17% des femmes et 4% des hommes. En Europe et au Nord des Etats-Unis, à peu près 10-15% surviennent chez des non fumeurs [Toh and Lim, 2007], alors que 30-40% des CBNPC touchent des sujets non fumeurs CBNPC dans les pays Asiatiques [Toh and Lim, 2007]. Les sujets non fumeur (NF) sont définis comme ceux qui ont fumé moins de 100 cigarettes dans leur vie [Ferlay et al., 2010].

Les CBNPC du NF sont plus fréquents chez les femmes et l'adénocarcinome est le type histologique prédominant [Wakelee et al., 2007]. Par rapport aux F, les patients NF répondent mieux aux traitements par les inhibiteurs du récepteur à l'*EGF* [Shepherd et al., 2005 ; Thatcher et al., 2005].

Les mutations *EGFR* sont plus fréquentes dans les CBNPC des NF que ceux du F et sont exclusives avec les mutations *KRAS* [Pao et al., 2004 ; Pham et al., 2006 ; Tam et al., 2006 ; Tsao et al., 2005]. Des mutations du gène *HER2/neu* ont été rapportées les CBNPC du NF [Shigematsu et al., 2005]. Les mutations *KARS* et *TP53* varient avec le statut F/NF [Denissenko et al., 1996 ; Riely et al., 2008 ; Toyooka et al., 2006]. Les études génomiques des CBNPC du NF ont été réalisées sur des cohortes de petite taille et les approches expérimentales étaient peu résolutive et intéressant un nombre restreint de locus génomique [Sanchez-Cespedes et al., 2001 ; Wong *et al.*, 2002, 2003]. Nous avons entrepris l'étude de 60 tumeurs d'adénocarcinome de NF par aCGH de haute résolution dans l'optique de préciser le profil des remaniements génomiques récurrents et de mettre en évidence éventuellement l'implication de nouveaux gènes dans ce type de cancer.

I. Caractéristiques cliniques et histopathologiques

1. Aspects Cliniques :

L'âge au diagnostic semble varier avec la zone géographique [Wakelee et al., 2007]. Par rapport aux CBNPC du F, ceux du NF surviennent chez l'adulte jeune en Asie, en revanche, en Europe et aux Etats-Unis, ils surviennent soit au même âge soit à un âge un peu plus avancé.

Les CBNPC du NF semblent être plus fréquents chez les femmes que chez les hommes [Wakelee et al., 2007]. Cependant une analyse de 13 études prospectives, dans laquelle était étudiée des sujets NF, l'incidence du cancer pulmonaire chez les NF entre les hommes et les femmes semble être identique après normalisation selon l'âge des sujets de plus de 40 ans [Thun et al., 2008].

La prévalence des mutations activatrices du gène *EGFR* chez les patients NF atteints de CBNPC est presque 10 fois supérieure à celle observée chez les F [Shigematsu et al., 2005]. Cette caractéristique moléculaire explique une meilleure réponse aux inhibiteurs de l'*EGFR*, comme gefitinib et erlotinib, des patients NF par rapport aux F [Shepherd et al., 2005 ; Thatcher et al., 2005].

Plusieurs études ont rapporté une meilleure survie du NF par rapport au F et ceci quelque soit, le stade de la maladie, le traitement, les facteurs de co-morbidités et les autres facteurs pronostiques connus [Zell et al., 2005]. Par exemple, dans une analyse multivariée de patients avec un adénocarcinome stades I-IV, le statut NF constitue un facteur prédictif indépendant pour une meilleure survie. Il est cependant difficile dans ces différentes études de connaître la mortalité spécifique due à la maladie elle-même ou à un facteur de co-morbidité, de tels facteurs étant souvent nombreux chez les sujets tabagiques [Hadoux et al., 2011].

Des études épidémiologiques ont identifié plusieurs facteurs environnementaux, en association avec les CBNPC du NF. L'association du risque du cancer du poumon et la fumée environnementale du tabac (FET) a été rapportée. Des études ont démontré que l'exposition à la FET augmente de 20-25% le risque de survenue du cancer du poumon [Sun et al., 2007]. En se basant sur ces résultats, l'institut Américaine de santé et l'agence internationale de la recherche sur le cancer ont désigné la FET comme carcinogène pour l'homme. Néanmoins, l'incidence globale indique que la FET est relativement un faible carcinogène et la majorité des cancers du poumon du NF ne peuvent pas être expliqués par l'exposition à la FET uniquement [Sun et al., 2007]. D'autres facteurs susceptibles de favoriser la survenue du cancer

du poumon chez le NF ont été rapportés c'est l'exemple des radiations ionisantes et certains métaux lourds [Hadoux et al., 2011, Sun et al., 2007].

2. Aspects histopathologiques

Les adénocarcinomes (AD) sont les formes histologiques les plus fréquentes des CBNPC des NF [Travis et al., 2004]. Le carcinome bronchoalvéolaire (BA) et les adénocarcinomes mixtes avec composante BA se distinguent des autres CBNPC par une fréquence accrue de survenue chez les NF.

Le carcinome BA est une lésion localisée de petite taille (≤ 3 cm) formant une couche unicellulaire tapissant des structures alvéolaires préexistantes sans infiltration stromale, vasculaire ou pleurale, définissant ainsi une progression de type « lépidique » (**Figure 47**). Il s'agit d'un carcinome à différenciation glandulaire exclusivement bronchoalvéolaire, donc c'est un carcinome in situ et non un adénocarcinome comme cela a été proposé dans la dernière classification de l'OMS en 2004 [Travis et al., 2004].

Les adénocarcinomes mixtes ce sont des carcinomes à différenciation glandulaire comprenant toujours au moins une composante invasive et éventuellement une composante non invasive (BA). Les adénocarcinomes mixtes avec composante BA sont plus fréquents chez les NF que chez les F.

Il est à noter que la présence d'une composante BA est associée à un meilleur pronostic dans certaines études [Koike et al., 2009 ; Noguchi et al., 1995]. Ceci justifie en partie la proposition actuelle de réviser la classification des CBNPC en introduisant le sous-type « lépidique » correspondant à l'adénocarcinome mixte comportant une composante BA dans l'ancienne classification. Le sous-type « lépidique » est plus fréquent chez les NF que chez les F.

L'immunohistochimie est un élément clé du diagnostic histologique de l'AD pulmonaire. Le TTF-1, est un excellent marqueur permettant de confirmer dans 75 à 80% des cas l'origine primitive d'un adénocarcinome pulmonaire qui est TTF-1⁺ [Lau et al., 2002]. C'est utile pour éliminer l'origine métastatique des AD d'autres sites anatomiques comme le sein et le colon qui sont TTF-1 négatifs. D'autres anticorps comme p63, les CK5/6 et CK7 (cytokératines ; CK), peuvent être utilisés pour faire le diagnostic pathologique des AD [Travis et al., 2011].

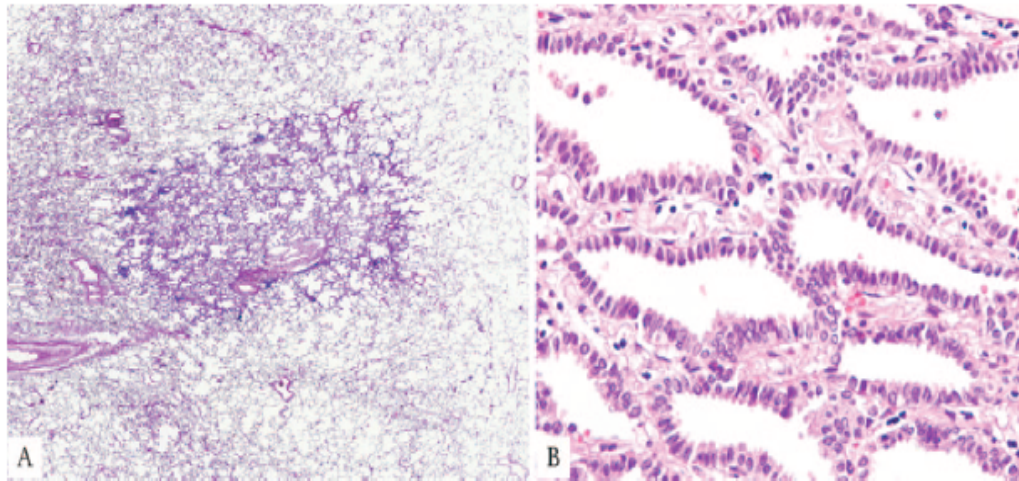


Figure 47 : Carcinome bronchoalvéolaire. **A**, Tumeur non mucineuse circonscrite avec une progression purement « lépidique ». Absence de foyers d'invasion. **B**, La tumeur montre des pneumocytes atypiques en prolifération le long d'une paroi alvéolaire légèrement épaissie. D'après (Travis et al, 2011).

II. Facteurs génétiques de prédisposition

Le cancer du poumon est une maladie liée à l'exposition à des facteurs environnementaux. Il est probable que des facteurs de prédisposition d'ordre génétiques soient aussi impliqués [Li et al., 2010].

1. Antécédents familiaux de cancer du poumon :

Des analyses de cancer du poumon des NF ont démontré que l'existence des antécédents familiaux augmentent 1.5 fois le risque de survenue de cancer du poumon [Matakidou et al., 2005]. Le *genetic epidemiology of lung cancer consortium* a rapporté l'étude de 52 familles avec 3 membres ou plus atteints de cancers du poumon ou du larynx et a identifié un locus, situé en 6q23q25, prédisposant au cancer du poumon [Bailey-Wilson et al., 2004]. La cartographie fine de cette région a identifié *RGS17* (protéine G impliquée dans la prolifération cellulaire) comme gène de susceptibilité associé à un risque relatif de 4.71 pour la survenue d'un cancer du poumon chez les NF. [Amos et al., 2010 ; You et al., 2009]. En revanche, le rôle fonctionnel de *RGS17* dans la survenue du cancer du poumon reste à déterminer et des études de confirmation dans des familles avec plusieurs membres atteints sont requises.

2. Marqueurs génétiques de prédisposition

Des études d'association ("*genome wide association*") appliquées sur de grandes cohortes dans des descendants de populations génétiquement hétérogènes ont mis en évidence 3 locus polymorphes, localisés en 5p15.3, 13q31.3 et 15q25.1 associés au cancer du poumon.

Une étude de l'agence internationale de recherche sur le cancer (IARC) englobant 3259 cas de cancer du poumon et 4159 témoins a rapporté un locus de susceptibilité localisé en 5p15.3, région incluant les gènes *CLPTMIL* ("*cleft lip and palate transmembrane protein 1-like*") et *TERT* ("*telomerase reverse transcriptase*") [McKay et al., 2008]. Cette même région a été identifiée dans une autre étude intéressant 10000 cas de cancer du poumon (5000 patients appariés à des témoins) [Wang et al., 2008]. Deux variants, rs402710 et rs2736100, sont associés à un risque élevé de survenue de cancer du poumon [McKay et al., 2008 ; Wang et al., 2008]. Cette association a été confirmée par une autre étude intéressant une cohorte plus large [Truong et al., 2010]. Cette analyse a également rapporté une association plus forte de ces 2 variants avec les adénocarcinomes pulmonaires qu'avec les autres types histologiques comme le carcinome épidermoïde et le carcinome à petites cellules.

Les connaissances actuelles des fonctions des gènes *CLPTMIL* et *TERT* impliquent ce dernier comme plausiblement le gène candidat du cancer du poumon. *TERT* est un composé, réverse transcriptase, de la télomérase et qui est crucial pour l'activité enzymatique de la télomérase et le maintien des télomères. La télomérase est responsable du maintien de la longueur des télomères dans plus 90% des cancers chez l'homme (y compris le cancer du poumon) qui présentent une activité positive de cette télomérase, suggérant que le maintien de la longueur des télomères est une étape clé dans la majorité des cancers.

Le gène *CLPTMIL* doit son nom à son homologue *CLPTMI*, localisé sur le 19p, et ségrégue avec un phénotype de fente labio-palatine dans une famille [Yoshiura et al., 1998]. *CLPTMIL* a été cloné comme un facteur de résistance au cisplatine dans des lignées de cancer ovarien, sous le nom de CRR9 ("*cisplatin-resistance related protein 9*") [Yamamoto et al., 2001]. La région 5p15.3 est associée à un risque relatif de 1.62 et 2.35 pour les hétérozygotes et homozygotes respectivement dans une population de femmes Asiatiques NF [Hsiung et al., 2010]. D'autres études ont rapporté que le locus 5p15.3 est associé à d'autres types de cancers comme les tumeurs : du cerveau, de la peau, de la prostate, de l'utérus et de la vessie [Rafnar et al., 2009].

Une étude pangénomique par des SNP array dans une cohorte de 754 patients NF atteints de cancer de poumon (377 patients appariés à des témoins), a identifié 2 SNP, rs2352028 et rs2352029 localisés dans l'intron 5 du gène *GPC5*/13q31.3, qui confèrent un risque de 60% de développer un cancer du poumon chez les NF [Li et al., 2010]. L'étude d'expression a démontré que ces 2 variants contrôlent l'expression du gène *GPC5*. En effet, ces 2 allèles sont associés à une baisse de l'expression de *GPC5*. De plus, dans les AD, le transcrit de *GPC5* est réduit de 50% par rapport à un tissu pulmonaire normal [Li et al., 2010]. Le gène *GPC5* est un membre de la famille des glycanes. Les données actuelles suggèrent que ces glycanes régulent les voies *Wnt*, *hedghog*, *FGF* et *BMP* [Filmus et al., 2001]. Selon le contexte, les glycanes peuvent soit stimuler soit inhiber ces voies de signalisation qui sont cruciales pour la prolifération et la division cellulaire [De Cat and David, 2001 ; Filmus, 2001]. Les altérations du locus *GPC5* est un événement commun à plusieurs cancers. L'amplification de la région 13q31.3 est observée dans plusieurs types de cancers notamment dans les lymphomes [Toujani et al., 2009].

Les 2 variants identifiés et qui régulent l'expression de *GPC5* peuvent contribuer au développement du cancer du poumon des NF. Néanmoins, d'autres études sont nécessaires pour explorer les mécanismes de régulation de ces variants et le rôle fonctionnel de *GPC5* dans l'oncogenèse pulmonaire.

Trois études de liaison à grande échelle ont rapporté un locus de prédisposition au cancer du poumon localisé dans la région 15q25.1 [Amos et al., 2008 ; Hung et al., 2008 ; Thorgeirsson et al., 2008]. Cette région contient 3 gènes codant pour des récepteurs cholinergiques de type nicotinique (*CHRNA3*, *CHRNA5* et *CHRNA4*) ubiquitaires. Deux des 3 études ont identifié des variants alléliques qui sont directement associés au risque de cancer du poumon [Amos et al., 2008 ; Hung et al., 2008], alors que la 3^{ème} étude a rapporté une association de la même région à la dépendance à la nicotine et donc augmente indirectement le risque de survenue du cancer du poumon *via* la consommation du tabac [Thorgeirsson et al., 2008].

III. Caractéristiques génomiques somatiques

1. Altérations génomiques quantitatives

Des études ont rapporté une différence des altérations chromosomiques dans les cancers pulmonaires entre F et NF. Une cohorte de 45 AD (18 NF appariés avec 27 F) a été analysée par 54 marqueurs microsatellitaires couvrant 28 bras chromosomiques différents [Sanchez-Cespedes

et al., 2001]. Des LOH dans les régions chromosomiques 3p, 6q, 9p (*P16*), 16p, 17p (*TP53*) et 19p sont significativement plus fréquentes dans les adénocarcinomes des F que les NF. De plus, la médiane de perte allélique est plus élevée chez les F (0.28) que les NF (0.11) [Sanchez-Cespedes et al., 2001]. Dans la cohorte des NF, les altérations chromosomiques sont rares et impliquent souvent les régions chromosomiques 9p (22%), 12p (22%) et 19q (22%) comparées au reste du génome [Sanchez-Cespedes et al., 2001]. Dans une étude similaire, 42 NF et 29 F atteints d'AD ont été analysés à la recherche d'anomalies chromosomiques par 84 marqueurs microsatellites [Wong et al., 2002]. La médiane de LOH était de 40% pour les NF contre 44.5% chez les F, lesquelles valeurs sont supérieures à l'étude précédente. La même étude n'a pas trouvé une fréquence globale d'altérations génomiques plus élevée chez les F que les NF, à la différence un chevauchement significatif entre les 2 groupes a été noté [Wong et al., 2002]. Les altérations des régions 16q, 17q et 19q sont plus fréquentes chez les NF que les F. En revanche, et en accord avec les résultats de la série de Sanchez-Cespedes *et al* [2001], les régions 9p21 (45%) et 19q13.3 (48%) semblent être plus fréquemment remaniées chez les NF que les F. L'étude de 12 AD (6 NF appariés avec 6 F) par 52 microsatellites répartis sur 10 locus chromosomiques différents a rapporté une moyenne de LOH chez les NF supérieure à celle des F (46% versus 28% ; $p < 0.05$) [Powell et al., 2003]. Une atteinte significativement plus fréquente des régions 3p, 8p, 9p, 10p et 10q chez les NF par rapport aux fumeurs a été rapportée par cette étude.

L'étude par CGH de 32 AD de NF a identifié un gain du 16p, dans 59% des cas, comme le gain le plus fréquent [Wong et al., 2003]. Les mêmes auteurs et d'une manière séparée ont analysé 10 tumeurs issues de patients F et ont détecté un gain 16p dans un seul cas.

L'analyse de 69 AD de F (n=39) et NF (n=30) par SNP array a rapporté un gain plus fréquent chez les NF des régions 5q, 7p et 16p [Thu et al., 2012].

Il est difficile de conclure quant à la nature et la spécificité des remaniements chromosomiques observés dans les CBPNC des NF étant donnée le nombre limite des cas étudiés et la disparité des approches expérimentales.

2. Altérations génomiques équilibrées

2.1 *inv(2)(p21p23)*

L'équipe de Soda [2007], a rapporté un essai de transformation médiée par des rétrovirus, dans lequel une banque d'expression d'ADNc a été réalisée à partir d'AD pulmonaires réséqués chirurgicalement. Après transformation de cellules NIH3T3, les ADNc ont été amplifiés puis séquencés. Un des transcrits séquencés contient le gène de fusion (**Figure 48**) formé par *EML4*

("Echinoderm microtubule-associated protein-like 4") et *ALK* ("Anaplastic lymphoma kinase") qui résulte d'une inversion cryptique de la région chromosomique inv(2)(p21p23). L'allèle sauvage d'*EML4* est un membre de la famille des protéines EMAP et l'extrémité N-terminale a précédemment été démontrée que comme essentielle pour la formation des microtubules des cellules Héla [Pollmann et al., 2006]. Le gène *ALK* code pour une tyrosine kinase. Deux nouveaux partenaires d'*ALK*, *KIF5B* et *TFG*, ont été rapportés dans les cancers pulmonaires [Rikova et al., 2007 ; Takeuchi et al., 2009 ; Wong et al., 2011]. L'étude par FISH de CBPNC a démontré des amplifications d'*EML4* et/ou d'*ALK*, indiquant que d'autres mécanismes de réarrangements génomiques de ces 2 gènes peuvent survenir [Perner et al., 2008].

Les transcrits de fusion impliquant *ALK* semblent être restreints aux CBPNC. En effet, l'étude par RT-PCR des gènes de fusion : *NPM-ALK* , *TPM3-ALK* , *CLTC-ALK* , *ATIC-ALK* et *TFG-ALK*, qui sont récurrents dans les hémopathies malignes, dans une cohorte de 77 CBPNC primaires a exclu la présence de ces transcrits de fusion dans le cancer du poumon [Shinmura et al., 2008].

Les réarrangements du gène *ALK* ont été identifiés dans 2-7% des CBPNC [Kwak et al., 2010 ; Soda et al., 2007]. Histologiquement, cette anomalie est corrélée à une tumeur moins différenciée avec une structure acineuse prédominante [Inamura et al., 2009] ou en bague à chaton. Il semble que le gène de fusion *EML4-ALK* ne soit pas présent dans toutes les cellules tumorales [Perner et al., 2008]. La majorité de ces tumeurs sont TTF1+.

Une étude de 82 patients atteints de CBPNC, dont l'implication du gène *ALK* a été démontrée par FISH, a rapporté une réponse de 57% au traitement par le crizotinib (PF-02341066) et une survie sans événement à 6 mois de 72% [Kwak et al., 2010]. Le crizotinib agit d'une manière compétitive avec l'ATP, inhibe le récepteur *ALK* et également *MET*. Des mutations acquises de novo de résistance ont été rapportées au cours du traitement par cette molécule [Choi et al., 2010].

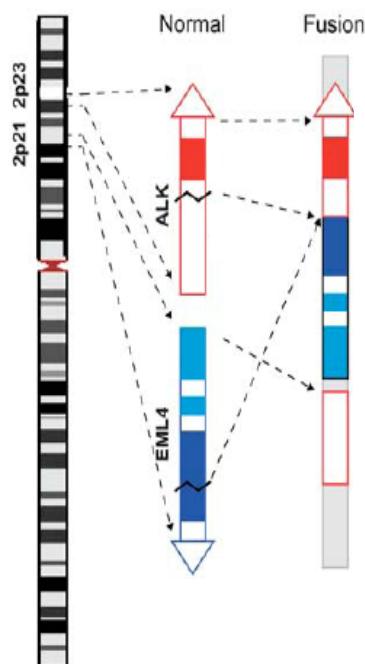


Figure 48 : Gène de fusion *EML4-ALK*. Ce dernier résulte d'une inversion paracentrique et cryptique: $inv(2)(p21p23)$. Adapté de (Cheng, 2012).

2.2 $inv(10)(p11.2q11.2)$

Récemment, l'équipe de Kohno [2012] en réalisant, dans une première étape, un séquençage de 2^{ème} génération du transcriptome de 30 AD pulmonaires a démontré la présence d'un gène de fusion formé par *KIF5B* ("*kinesin family 5B*") et *RET*. Ultérieurement, l'étude de 319 échantillons d'AD par RT-PCR et séquençage selon Sanger a mis en évidence le gène de fusion *KIF5B-RET* dans 2% des cas (soit 6/319). Le gène *RET* code pour une tyrosine kinase, remanié par des translocations dans le carcinome papillaire de la thyroïde [Fusco et al., 1987 ; Takahashi et al., 1985] et dans des hémopathies malignes. *KIF5B* est un gène partenaire d'*ALK* et le gène de fusion résultant a été rapporté dans le cancer du poumon [Takeuchi et al., 2009 ; Wong et al., 2011].

L'étude par PCR génomique de 6 tumeurs exprimant le gène de fusion, a permis de conclure que *KIF5B-RET* est le produit d'une inversion péricentromérique du chromosome 10 : $inv(10)(p11.2q11.2)$ et cette anomalie a ensuite été confirmée par FISH [Kohno et al., 2012] (**Figure 49**). Cette inversion $inv(10)(p11.2q11.2)$ est absente dans les cellules épithéliales normales et les cellules inflammatoires qui jouxtent les cellules tumorales, confirmant ainsi le caractère acquis de cette anomalie [Takeuchi et al., 2012]. Dans les tumeurs présentant le gène de

fusion *KIF5B-RET*, le taux de transcrite de *RET* est 30 fois supérieur à celui observé dans un tissu pulmonaire normal.

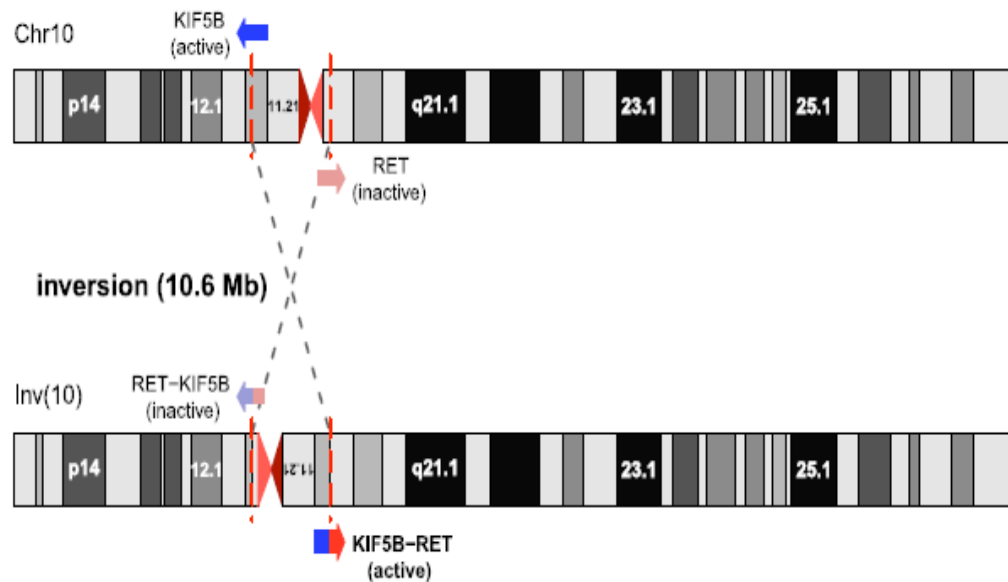


Figure 49 : Gène de fusion KIF5B-RET. Ce gène résulte d'une inversion de 10.6 Mb: inv(10)(p11.2q11.2). D'après (Ju et al, 2012).

L'immunohistochimie à l'aide d'un anticorps dirigé contre la protéine RET a permis de démontrer un marquage cytoplasmique positif des cellules tumorales ayant le gène de fusion *KIF5B-RET* [Kohno et al., 2012]. Ces AD pulmonaires présentant le gène de fusion *KIF5B-RET* sont TTF-1⁺ [Takeuchi et al., 2012]. Tous les échantillons (7/399) présentant *KIF5B-RET* sont : *ALK*^{+/+}, *EGFR*^{+/+}, *EML4-ALK* négatif, *HER2/neu*^{+/+} et *KRAS*^{+/+} [Takeuchi et al., 2012]. La nature mutuellement exclusive de *KIF5B-RET* avec les autres anomalies suggère un rôle primaire ou *driver* de *KIF5B-RET* dans la carcinogenèse pulmonaire [Herbst et al., 2008 ; Gerber and Minna, 2010 ; Janku et al., 2010]. L'association du gène fusion *KIF5B-RET* et le statut F/NF n'est encore pas clair [Kohno et al., 2012 ; Lipson et al., 2012].

Des transcrits variants ont été rapportés, mais la protéine chimérique résultante contient le domaine *coiled-coil* de *KIF5B*, indispensable à l'homodimérisation, [Hirokawa et al., 2009] et tout le domaine kinase de *RET* lequel est détecté dans les autres gènes de fusion récurrents dans les tumeurs de la thyroïde [Jhiang, 2000]. L'expression de *KIF5B-RET* dans une lignée de cancer de poumon, H1299, dépourvue de l'allèle sauvage de *RET* et tout autre gène de fusion impliquant ce dernier induit la phosphorylation du domaine kinase de *RET*. Cette phosphorylation, secondaire à la fusion avec *KIF5B*, est supprimée par vandetanib qui est une antityrosine kinase dirigée contre

RET [Commander et al., 2011]. L'expression de *KIF5B-RET* dans des fibroblastes NIH3T3 induit une transformation cellulaire [Kohno et al., 2012].

Le gène, *CCDC6* ("*coiled-coil domain containing 6*"), autre partenaire de *RET* a été rapporté dans les adénocarcinomes pulmonaires [Takeuchi et al., 2012]. Le gène de fusion *CCDC6-RET* a précédemment été rapporté dans le cancer de la thyroïde [Greico et al., 1990].

2.3 Translocations t(6;V)(q22/*ROS1*;V)

Le gène *ROS1* ("*c-ros oncogene 1*"), qui code pour un récepteur à activité tyrosine, a été impliqué dans les CBPNC [Rikov et al., 2007]. Deux gènes de fusions impliquant *ROS1* ont été rapportés dans les cancers du poumon. Ces gènes impliquent : *solute carrier family 34 sodium phosphate: SLC34A2-ROS1* qui résulte d'une translocation t(4;6)(q15.2;q22) et CD74, molécule du complexe HLA : *CD74-ROS1* qui est le produit d'une translocation t(5;6)(q32;q22). Ces gènes de fusions ont été identifiés dans une tumeur (1/150 cas) et une lignée cellulaire (1/44 cas) de CBPNC [Rikov et al., 2007].

Une étude récente intégrative moléculaire et histopathologique de 1476 CBPNC a rapporté, en plus de 2 gènes sus-cités 4 autres gènes partenaires de *ROS1* [Takeuchi et al., 2012]. Ces gènes correspondent à : t(1;6)(q21.2;q22)/*TMP3-ROS1*, inv(6)(q22q25.3)/*EZR-ROS1*, t(6;12)(q22;q14.1)/*LRIG3-ROS1* et t(6;20)(q22;q12)/*SDC4-ROS1*. Ces gènes de fusion représentent 0.9% (13/1476) des CBPNC et 1.2% (13/1116) des adénocarcinomes pulmonaires [Takeuchi et al., 2012]. Ces tumeurs présentant un gène de fusion impliquant *ROS1* sont *EGFR^{+/+}* et *KARS^{+/+}*.

Tous ces gènes de fusion contiennent le domaine kinase de *ROS1*. Parmi les partenaires de *ROS1*, seulement *TMP3* et *EZR* contiennent un domaine *coiled-coil* qui peut participer à l'homodimérisation, la structure des autres partenaires est pour le moment inconnu [Takeuchi et al., 2012].

Dans le cancer du poumon les gènes de fusion ne sont plus rares. Actuellement on dénombre 3 gènes, *ALK*, *RET* et *ROS1*, impliqués dans des gènes de fusion avec des partenaires multiples. Ces 3 gènes codent pour des récepteurs à activité tyrosine, pour *ALK* et *RET* des molécules capables d'inhiber ces protéines mutantes sont en cours d'essai.

3. Mutations ponctuelles

3.1 Anomalies de l'*EGFR*

L'*EGFR* est une famille de récepteurs à activité tyrosine kinase. Elle comprend 4 membres: EGFR (HER1/ErbB1), HER2/neu (ErbB2), HER3 (ErbB3) et HER4 (ErbB4). Dans les cellules tumorales, l'activité tyrosine kinase de l'*EGFR* peut être dérégulée par plusieurs mécanismes oncogéniques notamment les mutations, l'amplification génique (**Figure 50**) et la surexpression de la protéine EGFR [Ciardello and Tortora, 2008]. Dans les CBPNC, les mutations et les amplifications de l'*EGFR* sont sensibles aux antiTK de l'*EGFR* [Gazdar, 2009].

La mutation *EGFR* est la première anomalie moléculaire retrouvée de façon prédominante chez les NF par rapport aux F [Lynch et al., 2004; Pao et al., 2004]. Les mutations somatiques activatrices spécifiques et qui confèrent une sensibilité aux antiTK de l'*EGFR* siègent dans le domaine tyrosine kinase de l'*EGFR*. Les mutations de type délétion de l'exon 19 et de substitution (L858R) de l'exon 21 sont les plus fréquentes dans les CBPNC et sont appelées les mutations «classiques» [Gazdar, 2009]. Ces mutations constituent un facteur prédictif de réponse aux antiTK de l'*EGFR* [Shepherd et al., 2005 ; Thatcher et al., 2005].

Les variations de nombre de copies de l'*EGFR* ont été analysées au cours de la progression des AD [Tang et al., 2008 ; Yatabe et al., 2008]. Les mutations de l'*EGFR* précèdent les anomalies de nombre de ce gène. L'hétérogénéité du nombre de copies est plus importante dans la tumeur primaire que dans la métastase correspondante [Tang et al., 2008]. L'amplification de l'*EGFR* a été corrélée à des formes histologiques de haut grade et/ou au processus d'invasion et est rare dans les lésions préneoplasiques [Yatabe et al., 2008 ; Yoshida et al., 2005]. Ainsi, des tumeurs avec un profil d'amplification de l'*EGFR* apparaissent plus agressives. Dans une analyse multivariée, l'amplification de l'*EGFR* (**Figure 50**) est à la fois un facteur, pronostic significatif pour une baisse de la survie et prédictif de l'effet de l'erlotinib sur la survie [Zhu et al., 2008]. L'amplification de *MET* peut être l'un des mécanismes de résistance à l'erlotinib [Engelman et al., 2007]. Il a été rapporté que les coupes en paraffines sont adaptées pour la recherche par FISH de l'amplification de l'*EGFR* et *MET* ce qui permet de donner une information pronostique et expliquer une éventuelle résistance aux antiTK de l'*EGFR*. L'expression de la protéine EGFR détectée par immunohistochimie n'a pas de valeur pronostique, à l'opposé les mutations ou l'amplification de l'*EGFR* semble être d'excellents marqueurs prédictifs pour une réponse aux antiTK [Rowinsky, 2004].

Plusieurs études ont rapporté que la fréquence des mutations de l'*EGFR* dépend, de l'ethnie (32% dans l'Est Asie / 7% chez les Caucasiens), du sexe (38% chez les femmes/ 10% chez les

hommes), du statut tabagique (47% chez les NF / 7% chez les F) et du type histologique (30% dans les adénocarcinomes / 2% dans les autres types) [Mitsudomi et al., 2006]. La fréquence des mutations de l'*EGFR* apparaît être inversement proportionnelle à l'exposition au tabac et à l'exposition au tabagisme passif [Kosaka et al., 2004].

Les mutations spécifiques acquises de l'*EGFR* comme T790M, l'amplification de *MET* et la surexpression d'*HER3/ErbB3* sont responsables de 50% des cas de résistances aux antiTK de l'*EGFR* [Nguyen et al., 2009 ; Tang et al., 2008].

L'implication des mutations *HER2/neu* dans les cancers du poumon des NF a été mise en évidence en 2004 [Stephens et al., 2004]. Ces mutations, rapportées dans 66 cas parmi 3248 (2%), ont des caractéristiques cliniques similaires à celles de l'*EGFR* [Tomizawa et al., 2011]. En effet, elles sont plus fréquentes, en Asie de l'Est (2,1%/ 1,5 chez les caucasiens), chez les femmes (3,6% / 1% chez les hommes), les NF (3,9% / 1% chez les F) et dans les AD (2,7% / 0,3% dans les autres types).

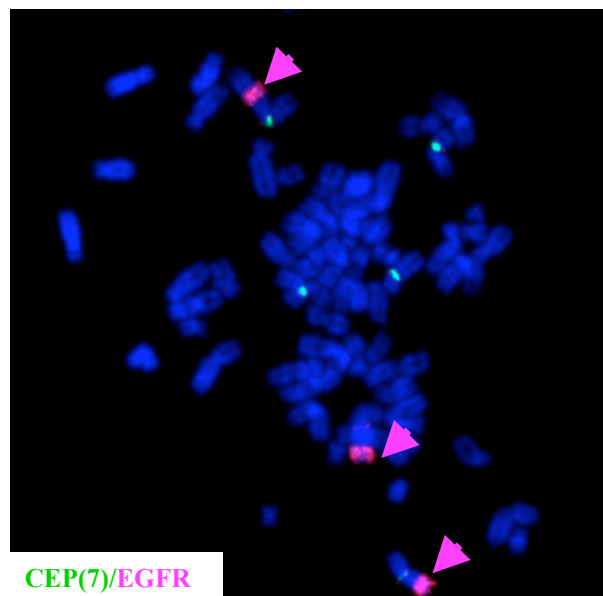


Figure 50 : Amplification du gène *EGFR*. HSR (flèches rouges) du gène *EGFR* dans une lignée d'adénocarcinome pulmonaire non fumeur. La flèche verte indique le centromère du chromosome 7.

3.2. Mutations *KRAS*

La protéine RAS agit en aval de la voie *EGFR* et stimule la prolifération cellulaire. Les mutations activatrices *KRAS* sont plus fréquentes dans les CBPNC du F que dans celui du NF [Ahrendt et al., 2001]. Ces anomalies sont prédictives d'une mauvaise survie et d'une résistance aux antiTK de l'*EGFR* [Pao et al., 2005] et ont été associées aux adénocarcinomes à composante solide prédominante. Les mutations *EGFR* et *KRAS* sont mutuellement exclusives.

3.3. Autres mutations

Les mutations de *TP53* ont été rapportées dans les cancers du poumon du F et moins fréquemment du NF [Le Calvez et al., 2005]. De plus, la signature mutationnelle (c'est le ratio de transitions, transversions, et délétions) et le Spectre mutationnel (la distribution des mutations tout au long du gène) varient en fonction du statut F/NF [Denissenko et al., 1997]. des mutations du gène *LKBI*, des mutations et ou amplification du gène *NKX- 2* ont également été rapportées dans les AD du NF [Ding et al., 2008 ; Weir et al., 2007 ; Ji et al., 2007 ; Winslow et al., 2011].

4. Conclusion

Les mutations des gènes *EGFR* et *HER2* sont présentes dans les exons qui codent pour les domaines kinases [Lynch et al., 2004 ; Pao et al., 2004 ; Stephens et al., 2004]. Ces mutations sont supposées aboutir à une autophosphorylation et une augmentation de la phosphorylation des autres membres de la famille HER, donc une activation constitutive de ces récepteurs membranaires. Ainsi les voies de signalisation en aval de ces protéines membranaires seront activées d'où une prolifération cellulaire soutenue et une résistance à l'apoptose. L'anomalie *KRAS* correspond toujours à une mutation ponctuelle des codons 12 ou 13 [Rodenhuis et al., 1987]. Ces mutations altèrent l'activité intrinsèque de la GTPase qui résulte en une accumulation de *KRAS* sous sa forme GTP [Trahey and McCormick, 1987]. Concernant les gènes de fusion *EML4-ALK* et *KIF5B-RET*, les domaines *Coiled-coil* d'*EML4* et *KIF5B* sont supposés agir comme un motif d'oligomérisation, lesquels domaines entraîne une dimérisation et une autophosphorylation du domaine kinase des protéines ALK et RET [Kohno et al., 2012 ; Mano, 2008]. En dehors du gène de fusion *KIF5B-RET* les 4 autres anomalies génétiques semblent être suffisantes pour déclencher le processus de carcinogenèse pulmonaire. En effet, les souris

transgéniques exprimant ces aberrations développent un AD pulmonaire similaire à celui de l'homme et la réduction de l'expression de ces transgènes induit une régression tumorale [Chen et al., 2010 ; Politi et al., 2006]. En corollaire, l'expression continue d'un oncogène aberrant est nécessaire pour maintenir la viabilité des cellules tumorales. Ainsi, au moins dans un sous groupe d'AD pulmonaire, les cellules tumorales sont dépendentes, « addictives », de ces oncogènes [Gazdar et al., 2004 ; Weinstein and Joe, 2008]. Interrompre cette voie de signalisation oncogénique, « addiction », par une molécule ciblée va altérer la survie des cellules tumorales, donc réduire la charge tumorale et ralentir la progression tumorale [Vogelstein et al., 2004].

Le rôle des mutations *KRAS* dans la carcinogénèse pulmonaire, n'est pas simple. Tous les cancers, mutés pour ce gène, ne sont pas dépendants du mutant *KRAS* [Singh et al., 2009]. La suppression de l'expression de *KRAS* mutés par des shRNA dans des lignées de cancers pulmonaires a montré que la moitié d'entre elles maintiennent une viabilité cellulaire dans ces conditions expérimentales, alors que la densité cellulaire est réduite dans l'autre moitié des cellules. Une des hypothèses avancées pour expliquer ces résultats est le rôle potentiel de l'instabilité chromosomique causé par le tabac. Il a été démontré que la surexpression de *MAD2* induit une instabilité chromosomique précoce qui augmente la probabilité de récurrence tumorale dans des souris transgéniques pour *KRAS* et cette récurrence est indépendante de la voie de signalisation du mutant *KRAS* [Sotillo et al., 2010].

Enfin il est important de noter que les mutations *EGFR*, *KRAS*, *HER2*, les gènes de fusion *EML4-ALK* et *KIF5B-RET* sont mutuellement exclusifs [Kohno et al., 2012 ; Sun et al., 2010]. Il en découle que l'AD du NF est hétérogène sur le plan génétique. La prise en charge thérapeutique et pronostique du patient passe par l'identification de ces anomalies génétiques. [West et al., 2012].

Résultats et discussion

Partie 4 : Altérations génomiques dans les adénocarcinomes pulmonaires des non fumeurs

Article 3: Genomic Aberrations in Lung Adenocarcinoma in Never Smokers

Plos one, December 2010, (5)12 e15145 1-11

I. Contexte

Nous avons entrepris l'étude de 60 adénocarcinomes pulmonaires de NF par CGH array 244K à la recherche de nouveaux gènes impliqués dans cette tumeur.

Le projet, intitulé *Lung genes*, implique 13 centres Français. Les 60 patients sont des NF, définis comme ceux qui ont fumé moins de 100 cigarettes dans leur vie [Ferlay et al., 2010], ont été traités chirurgicalement. Le diagnostic histopathologique a été revu et les cas douteux ont été exclus de cette étude. Le seuil de 50% de cellules tumorales était évalué sur des coupes colorées par l'hématoxyline-éosine. Après extraction, les ADN tumoraux et de référence ont été différenciellement marqués et hybridés en quantité équimolaire sur des lames de CGH array contenant 244000 oligonucléotides. D'une manière parallèle une étude par SNP array, a été réalisée sur 40 des 60 échantillons. Les gènes *EGFR* (exons 18, 19, 20, 21) et *KRAS* (exons 2 et 3) ont été séquencés. La validation des CNA de certains des gènes candidats a été réalisée par RQ-PCR et FISH et pour la plupart par la comparaison entre les résultats des aCGH et des SNP array.

II. Présentation des résultats

La médiane d'âge était de 69 ans (59-77 ans) avec une prédominance féminine (88%). Plus de la moitié des tumeurs était stade I. Histologiquement la tumeur était : bien différenciée dans 34 cas, moyennement différenciée dans 7 cas et peu différenciée dans 19 cas. L'expression de la protéine TTF1/NKX-2 était détectée dans 57/60 tumeurs.

Le pourcentage moyen des altérations de nombre de copies (CNA) par tumeur était de 17% avec des extrêmes de 0-60%. Les pourcentages des gains et perte étaient similaires ($p = 0.01$) en dehors du groupe de tumeurs où le pourcentage des CNA était inférieur à 5%. Une classification non supervisée de ces CNA a permis de dégager 2 groupes majeurs A et B. A leurs tours le groupe A est ramifié en 2 sous groupes A1 et A2, et le groupe B est classé en B1, B2 et B3 (**Figure 1A de l'article 3**). Les différents sous groupes diffèrent par le pourcentage et le profil des anomalies génomiques. Le nombre et la complexité des remaniements génomiques vont en crescendo du sous groupes A1 au sous groupe B3. Le sous groupe A1 présentait le nombre le plus faible de CNA (moyenne était de 2% avec des extrêmes 0-4%). Le sous groupe B3 contenait

le pourcentage le plus élevé de CNA et le profil le complexe des aberrations génomiques. Le nombre de CNA dans le sous groupe A2 était inférieur à celui de B1. Ce dernier était caractérisé par un gain 8q. Le sous groupe B2 présentait plus de perte que de gain (21% versus 10%). Pour B3, le gain des bras chromosomiques 7p et 7q était prédominant. Aucune différence clinico-biologique n'était mise en évidence entre les 5 sous groupes.

Les gains récurrents étaient observés dans les régions 1q, 5p, 7p, 8q et 16p dans plus de 20% des cas et entre 10-20%, ce gain était détecté en 5q, 6p, 7q, 14q, 16q, 17q, 20q et 21q et Xq. Dans plus de 20% des cas, les pertes intéressaient les régions 8p, 9p, 9q, 13q et 18q, et entre 10-20%, ces pertes étaient notées en 6q, 12p, 15q, 17p, 18p, 20p, Xp et Xq.

Les mutations de l'*EGFR* étaient détectées dans 40/60 tumeurs. Parmi les 20 tumeurs, ayant *EGFR*^{+/+}, 4 présentaient des mutations pour KARS. Après ajustement au pourcentage de CNA, les mutations *EGFR* étaient associées aux sous groupes et au gain 7p. Le B3 présentait le pourcentage le plus élevé (93%) du gain 7p et le taux (93%) de mutations *EGFR* le plus fréquent. Chaque amplicon contenant *EGFR*, présentait une mutation du même gène. Les mutations *KRAS* n'étaient pas associées d'une manière significative au gain 12p.

Dix tumeurs *EGFR*^{+/+}, *KRAS*^{+/+} appartenaient soit au sous groupe A1 (9/10 tumeurs), soit sous groupe A2 (1/10). Les amplifications de *MET* et *HER2/ERBB2* étaient associées au gain 7p et à la mutation *EGFR* respectivement.

Les gains récurrents avaient permis d'identifier 22 MCR ("*minimal commun region*" ; **Tableau 1 de l'article 3**) localisées sur les régions : 1q, 2p, 5p, 5q, 7p, 7q, 8q, 12p, 12q, 14q, 18p et 20q. Les gènes candidats de ces MCR étaient : *BCL9*, *ARNT*, *MDM4*, *NSD1*, *EGFR*, *MYC* et *MDM2*.

Les pertes récurrentes avaient permis d'identifier 9 MCR localisées dans les régions : 1p, 3q, 6q, 8q, 9p, 16q et 20p (**Tableau 2 de l'article 3**). Plusieurs gènes étaient mis en évidence dont p15^{INK4B}/CDK2B qui était perdu dans 53% des échantillons.

Des amplifications, 27 amplicons, étaient détectées dans les régions : 1p, 3q, 6q, 8q, 9p, 16q et 20p (**Tableau 3 de l'article 3**). Ces amplicons contenaient plusieurs gènes dont : *MET*, *KRAS*, *CDK4*, *FUS* et *HER2/ERBB2*.

L'étude par SNP array avait mis en évidence des LOH récurrentes au niveau de *RBI* et *WRN* ("*Werner syndrome, RecQ helicase-like*"), dont les locus étaient aussi remaniés par aCGH.

III. Discussion

Nous rapportons, à ce jour, le nombre le plus important d'AD de NF étudiés par aCGH de haute résolution. Les 60 échantillons tumoraux ont été sélectionnés d'une manière très rigoureuse. Pour chaque cas, le diagnostic clinique et histopathologique a été revu et les cas douteux ont été exclus de cette étude. Le statut NF a été vérifié par un formulaire « ad hoc ». Le pourcentage de cellules malignes a été évalué selon une procédure très rigoureuse (pour revue [Bernheim et al., 2008]). Les ADN sont extraits à partir de 60 tumeurs congelées et la qualité de ces ADN a été évaluée selon les procédures d'Agilent et des moyens de contrôle interne. Les altérations de nombre de copies ont été revues et les CNV ("*copy number variation*") ont été écartées. L'étude simultanée par SNP array de 40/60 échantillons a permis de valider les CNA dans ce groupe de tumeurs.

L'étude par aCGH a permis d'identifier 2 grands groupes d'altérations génomiques. Le groupe A présentait le taux le plus bas de CNA. Trois possibilités d'explication à ce résultat. Il se peut que l'échantillon ne soit pas enrichi en cellules malignes, or les échantillons étaient évalués d'une manière précise et un seuil de 50% de cellules tumorales était fixé et quantifié pour que le prélèvement soit inclus dans l'étude. La deuxième explication, c'est que notre approche expérimentale n'était pas aussi résolutive. Certes la plate-forme 244K oligonucléotides a une résolution relative par rapport à la nouvelle génération de microarray comme les 1Méga. Néanmoins, au sein même de cette étude ce type microarray avait permis de mettre en évidence de nombreuses CNA avec un profil génomique complexe (sous groupe B3). La troisième explication, est que l'anomalie *driver* dans ce groupe, de part sa nature, elle est indétectable par aCGH. Il peut s'agir d'anomalie génomique équilibrée, c'est l'exemple du gène de fusion *EML4-ALK* qui résulte d'une inversion cryptique : $inv(2)(p21p23)$ [Soda et al., 2007]. L'étude ultérieure de ces 10 échantillons par FISH avec une sonde de séparation d'*ALK* avait montré des anomalies de ce gène [Hofman et al., 2011]. Dans le cluster A1, qui comprend 7 cas, une séparation de la sonde était observée dans un cas, une délétion de l'extrémité 5' d'*ALK* était notée dans un autre cas, un gain simple copie (trisomie) d'*ALK* était détecté dans 3 cas, enfin le locus d'*ALK* était normal dans 2 cas. Dans le cluster A2, qui contient 3 cas, une séparation de la sonde d'*ALK* était détectée dans un cas, un gain simple copie et une polysomie d'*ALK* étaient observés dans les 2 cas restants. Ainsi dans le groupe A, dont le profil était $EGFR^{+/+}$ et $KRAS^{+/+}$, *ALK* était remanié dans 3 cas. Dans les 7 cas restants, il serait intéressant de chercher les anomalies de *RET/10q11.2* et de *ROSI/6q22* [Kohno et al., 2012 ; Takeuchi et al., 2012].

Le deuxième groupe était caractérisé par de nombreuses CNA et Le nombre de CNA culminait dans le sous groupe B3 avec un profil complexe. L'analyse non supervisée de ce groupe B a permis d'individualiser des clusters qui diffèrent par le taux et le profil de remaniements génomiques. Un cluster fortement associé à un gain de 8q24/*MYC*, un 2^{ème} cluster caractérisé par la perte des gènes *RBI* et *WRN*. Enfin un 3^{ème} cluster caractérisé par un gain 7p et 7q et associé à une fréquence élevée de mutants de l'*EGFR*. Il en découle que l'AD du NF est hétérogène sur le plan génétique.

Dans le groupe B3, l'instabilité chromosomique était associée aux anomalies de l'*EGFR* (mutation, gain et amplification). L'aCGH ne permet pas de tracer la chronologie de la survenue de ces deux types d'évènements [Pinkel and Albertson, 2005]. En revanche, les mutations de l'*EGFR* n'étaient pas associées au gain 7p dans 19 des 40 tumeurs *EGFR*^{-/+}. Ceci permet de dire que les mutations de l'*EGFR* ont peut être un rôle primaire dans la carcinogenèse des AD de NF. Dans 19/40 tumeurs, les allèles mutés de l'*EGFR* se superposaient avec le gain simple copie du 7p et l'amplification de la région 7p12/ *EGFR*. Ce résultat laisserait dire que de l'allèle muté de l'*EGFR* offre un avantage prolifératif, subit donc une sélection par la tumeur qui devient dépendante, « addictive », de ce mutant. A l'opposé les mutations de *KARS* étaient rares, observées dans 4/60 tumeurs qui sont *EGFR*^{+/+}. Ces résultats confirment que les mutations de *KRAS* sont rares dans les AD de NF et elles sont exclusives par rapport aux anomalies *EGFR*.

Dans ce travail un nouveau gène *FUS/TLS* ("*translocated in liposarcoma*") était impliquée pour la première fois dans la carcinogenèse pulmonaire. Le gène *FUS* / 16p11 était le siège d'une amplification dont le mécanisme de formation laisse prédire qu'il résultait de plusieurs cycles de cassure-pont-fusion. Cette amplification était associée à une surexpression de ce gène dans la tumeur qui était le siège d'amplification par comparaison aux autres tumeurs n'ayant pas cette amplification. *FUS*, remanié par translocation t(12;16)(q13;p11), a été cloné dans un cas de liposarcome [Rabbitts et al., 1993]. Dans le liposarcome, *FUS* réarrangé par translocation a plusieurs partenaires. Ce profil d'anomalie génomique est en faveur de l'hypothèse qui dit que l'oncogenèse dans les AD du NF est dépendante, « addictive », d'un oncogène, qui dans ce cas *FUS* [Gazdar et al., 2004; Suda et al., 2011]. Reste à déterminer maintenant le rôle de ce gène dans la carcinogène pulmonaire. Il paraît assez prématuré de dire que *FUS* aurait un rôle similaire à celui de l'*EGFR* dans la carcinogenèse des AD de NF. Il serait intéressant de chercher le statut mutationnel de *FUS* dans les 59 tumeurs ne présentant pas cette amplification. Dire que *FUS* joue le rôle d'un oncogène paraît très précoce car certains gènes, tel que TTF-1/NKX2-1, peuvent avoir une fonction dualiste dans la carcinogenèse pulmonaire [Winslow et al., 2011]. Des

investigations plus poussées s'avèrent indispensables pour décrypter le rôle de *FUS* dans et la carcinogenèse pulmonaire de NF.

L'AD pulmonaire est une pathologie complexe. Outre l'hétérogénéité phénotype (plusieurs types histologiques), nous avons également mis en évidence un spectre d'anomalie génétique aussi hétérogène. Un nouveau gène, *FUS*, a été ajouté à la liste, non exhaustive, de gènes impliqués dans la carcinogenèse des AD pulmonaires. Les approches pangénomiques ont s'avèrent indispensables de nos jours pour découvrir de nouveaux gènes.

Genomic Aberrations in Lung Adenocarcinoma in Never Smokers

Bastien Job^{1,9}, Alain Bernheim^{2,9}, Michèle Beau-Faller³, Sophie Camilleri-Broët^{4,5}, Philippe Girard⁶, Paul Hofman⁷, Julien Mazières⁸, Saloua Toujani², Ludovic Lacroix⁹, Julien Laffaire¹⁰, Philippe Dessen^{2,5}, Pierre Fouret^{2,11*}, for the LG Investigators

1 Plate-forme de Biologie Intégrée, Institut de recherche intégrée en Cancérologie à Villejuif, Villejuif, France, **2** INSERM Génétique des tumeurs U985, INSERM, Villejuif, France, **3** Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire (Hôpital de Hautepierre), CHU Strasbourg, Strasbourg, France, **4** INSERM JE2492, INSERM, Kremlin-Bicêtre, France, **5** Université Paris-Sud, Kremlin-Bicêtre, France, **6** Département Thoracique, Institut Mutualiste Montsouris, Paris, France, **7** Laboratoire de Pathologie Clinique et Expérimentale (Hôpital Pasteur), CHU Nice, Nice, France, **8** Unité de Cancérologie Cervico Thoracique (Hôpital Larrey), CHU Toulouse, Toulouse, France, **9** Laboratoire de Recherche Translationnelle, Institut de Cancérologie Gustave-Roussy, Villejuif, France, **10** Ligue Nationale contre le Cancer, Paris, France, **11** Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

Abstract

Background: Lung cancer in never smokers would rank as the seventh most common cause of cancer death worldwide.

Methods and Findings: We performed high-resolution array comparative genomic hybridization analysis of lung adenocarcinoma in sixty never smokers and identified fourteen new minimal common regions (MCR) of gain or loss, of which five contained a single gene (*MOCS2*, *NSUN3*, *KHDRBS2*, *SNTG1* and *ST18*). One larger MCR of gain contained *NSD1*. One focal amplification and nine gains contained *FUS*. *NSD1* and *FUS* are oncogenes hitherto not known to be associated with lung cancer. FISH showed that the amplicon containing *FUS* was joined to the next telomeric amplicon at 16p11.2. *FUS* was over-expressed in 10 tumors with gain of 16p11.2 compared to 30 tumors without that gain. Other cancer genes present in aberrations included *ARNT*, *BCL9*, *CDK4*, *CDKN2B*, *EGFR*, *ERBB2*, *MDM2*, *MDM4*, *MET*, *MYC* and *KRAS*. Unsupervised hierarchical clustering with adjustment for false-discovery rate revealed clusters differing by the level and pattern of aberrations and displaying particular tumor characteristics. One cluster was strongly associated with gain of *MYC*. Another cluster was characterized by extensive losses containing tumor suppressor genes of which *RB1* and *WRN*. Tumors in that cluster frequently harbored a central scar-like fibrosis. A third cluster was associated with gains on 7p and 7q, containing *ETV1* and *BRAF*, and displayed the highest rate of EGFR mutations. SNP array analysis validated copy-number aberrations and revealed that *RB1* and *WRN* were altered by recurrent copy-neutral loss of heterozygosity.

Conclusions: The present study has uncovered new aberrations containing cancer genes. The oncogene *FUS* is a candidate gene in the 16p region that is frequently gained in never smokers. Multiple genetic pathways defined by gains of *MYC*, deletions of *RB1* and *WRN* or gains on 7p and 7q are involved in lung adenocarcinoma in never smokers.

Citation: Job B, Bernheim A, Beau-Faller M, Camilleri-Broët S, Girard P, et al. (2010) Genomic Aberrations in Lung Adenocarcinoma in Never Smokers. *PLoS ONE* 5(12): e15145. doi:10.1371/journal.pone.0015145

Editor: Eric J. Bernhard, National Cancer Institute, United States of America

Received: July 28, 2010; **Accepted:** October 26, 2010; **Published:** December 6, 2010

Copyright: © 2010 Job et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work is part of the Programme National d'Excellence Spécialisé Poumon funded by the Institut National du Cancer and of the Programme Cartes d'Identité des Tumeurs funded by the Ligue Nationale contre le cancer (grants to Pierre Fouret). The Institut National du Cancer has no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The Ligue Nationale contre le Cancer conducted the hybridization experiments to SNP arrays as part of its program Carte d'Identité des tumeurs. JL is employed by the Ligue Nationale contre le Cancer and analyzed the SNP array data.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: pierre.fouret@pnl.aphp.fr

These authors contributed equally to this work.

Introduction

Tobacco smoking is the main avoidable cause of lung cancer. However, lung cancer also occurs in never smokers and would rank as the seventh most common cause of cancer death worldwide [1], [2]. In France, lung cancer in never smokers accounted in the year 2000 for 17% and 4% of lung cancer deaths among women and men, respectively [3].

Lung cancer in never smokers occurs more frequently among women, and it favors the adenocarcinoma histological type [4]. One of the most striking distinctions is the observed differential

response to drugs that target the epidermal growth factor receptor (EGFR). Compared with smokers, never smokers treated with these agents have higher response rates to treatment [5], [6].

EGFR mutations in lung cancer are more frequent in never smokers and are exclusive with *KRAS* mutations [7], [8], [9], [10], [11]. Mutations in *HER2* also target never smokers [12]. The transversion/transition ratio and the distribution of *TP53* and *KRAS* mutations differ according to smoking status [13], [14], [15], [16]. The complex mutational signatures of lung cancer cells in smokers reflect the cocktail of carcinogens in tobacco smoke and their proclivities for particular bases [17].

While it is well established that specific DNA sequence abnormalities are linked to smoking status, other oncogenomic events are less well known among never smokers. In most genomic studies, the proportion of never smokers is unknown or small compared to that of smokers. Few separate studies of aberrations in never smokers have been performed, mainly in patients from East Asia [18], [19]. Allelic imbalances were infrequent in never smokers with lung adenocarcinoma [20], although in Chinese never smokers their pattern appeared distinct [18]. In Chinese never smokers the most frequent aberration was gain of 16p [19]. In the largest study of the lung adenocarcinoma genome, never smoker status was associated, although not significantly, with amplification of 7p-q and 16p and deletion of 10q and 15q [21]. Preliminary studies also indicate a relationship between smoking history and *EML4-ALK* fusions [22].

The catalogue of copy-number aberrations may lead to the identification of imbalances encompassing genes that contribute to the development or progression of lung cancer [23]. Here, we tried to accrue knowledge of aberrations occurring in lung adenocarcinoma in never smokers with the goal to uncover new aberrations that would include cancer genes.

Materials and Methods

Detailed methods on inclusion of patients, processing of samples, *EGFR* and *KRAS* sequencing, oligonucleotide aCGH analysis, genomic PCR, fluorescent *in situ* hybridization studies, gene expression analysis and SNP array analysis are available in supplementary information (Material and Methods S1).

Patients and samples

The project, referred as the Lung Genes (LG) study, involved 13 centers in France. The 60 patients were never smokers - defined following current consensus guidelines [24], [25] as persons with a lifetime exposure of less than 100 cigarettes. All patients had been treated by surgery. The pathological diagnosis was reviewed and cases for which a doubt about the primary site in the lung remained were excluded.

The research has been approved by the Institut National du Cancer review board as part of the Programme National d'Excellence Spécialisé Poumon. Written consent has been obtained from study patients for the use of their lung samples.

Genomic DNA and RNA were extracted from frozen tumor sections and the HCC827 cell line, obtained from ATCC. The cell line was authenticated by comparison of its Agilent aCGH profile with the previously published whole genome tiling path aCGH profile [26].

Sequencing of *EGFR* and *KRAS*

EGFR exons 18, 19, 20, 21 and *KRAS* exons 2 and 3 were directly sequenced in both sense and antisense directions from at least two independent amplifications.

Oligonucleotide aCGH analysis

Genomic DNA was analyzed using 244K Whole Human Genome (G4411B) microarrays (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The data are described in accordance with MIAME guidelines and have been deposited in ArrayExpress (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>) under E-TABM-926 accession number.

The threshold for gain and loss was $\text{abs}(\log_2(\text{ratio})) > 0.25$ for a minimum of 5 consecutive probes. Focal amplifications were considered for aberrations showing a $\log_2(\text{ratio}) > 1.58$ and extending less than 5 Mb. Minimal common regions (MCR)

were identified with STAC v1.2 [27] and by using both the frequency-confidence and footprint methods at lower and higher stringencies (confidence > 0.95 and > 0.995 , respectively). MCR were manually reviewed to validate breakpoints and to discard copy-number variants. For hierarchical clustering, Euclidean distances and Ward's construction method were used. The bootstrap tests were performed using the R environment package Pvcust [28]. Cluster-associated aberrations were identified using ANOVA with P values adjusted for their false-discovery rate using the Benjamini-Hochberg method [29]. The P values (F-test) for the association of clusters with clinicopathological variables were adjusted for multiple testing using Bonferroni correction.

Genomic PCR

Quantification of *FUS* genomic DNA was performed in Taqman[®] assays (Applera, Villebon-sur-Yvette, France) using primers and probes that were designed using Primer3 software.

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) studies

FISH was performed on tumor touch-imprinted slides.

Gene expression analysis

The gene expression analysis encompassed HG-U1133 plus 2.0 Affymetrix array data in a subset of 40 samples belonging to an ongoing study (not published). Expression of probe sets in the 16p11.2 region was compared with the t-test.

Quantification of *FUS* mRNA expression was performed in pre-designed Taqman[®] gene expression assays.

SNP array analysis

SNP array genotyping was carried out using the Illumina "HumanCNV370-Quad" array (Illumina, Inc., San Diego, CA) in the subset of 40 samples belonging to an ongoing study (not published). Individual cases with aCGH profiles delineating an aberration were selected for cross-validation by SNP array profiles. The aCGH profile in the region of aberration was compared to the corresponding SNP array profile for each selected case using the Integrated Genome Browser (<http://www.bioviz.org/igb/>).

For assessment of copy-neutral loss of heterozygosity (LOH), only segments with at least 10 consecutive SNPs showing a LOH and a copy number equal to 2 were considered.

Results

Clinicopathological characteristics

The clinicopathological characteristics are shown in Table S1. The median age was 69 years (interquartile range, 59 to 77). Patients were more frequently women (88%). Pathological stages were stage I in 32 cases (53%), stage II in 6 cases (10%), stage III in 21 cases (35%), and stage IV in 1 case (2%). The median tumor size was 31 mm (interquartile range, 25 to 40). The tumors were well-differentiated in 34 cases (57%), moderately differentiated in 7 cases (12%) and poorly differentiated in 19 cases (32%). They comprised a bronchioalveolar component in 28 cases (47%). Central fibrosis was present in 19 cases (32%). Tumor expressed the NKX-2 protein in 57 cases (95%).

Genome complexity

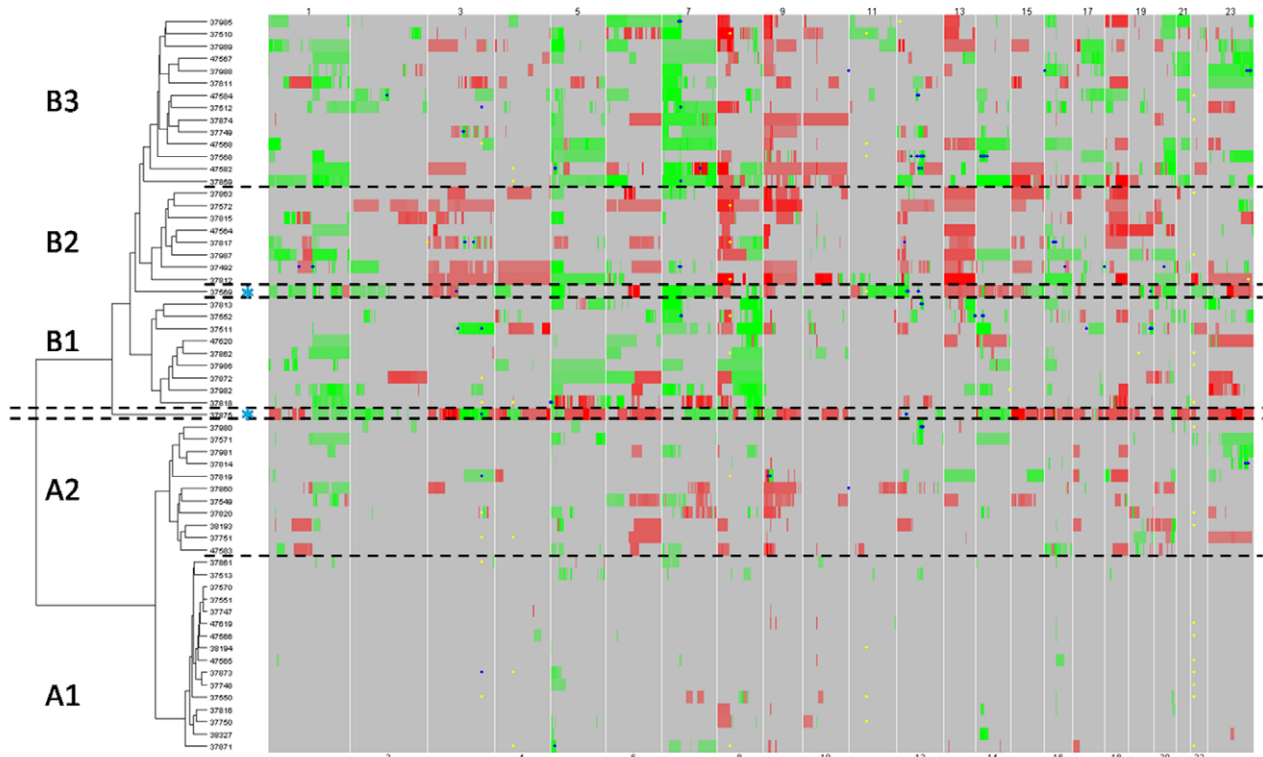
The percentages of aberrant genome (AG) were calculated for each case (mean 17%, median 16%, range 0 to 64%). The percentages of gains (mean 9%, median 7%, range 0% to 31%) and of losses (mean 8%, median 6%, range 0% to 41%) were

similar and correlated ($R^2 = 0.102$, $P = 0.01$). Those percentages were not correlated when cases with low levels of AG ($< 5\%$) belonging mainly to cluster A1 (see below) were excluded ($R^2 = 0.002$, $P = 0.84$) (Figure S1).

Partition of tumors into clusters

A non supervised hierarchical clustering analysis revealed two main classes A and B, which could be further subdivided into 2 clusters A1 ($n = 16$) and A2 ($n = 11$) for A and into 3 clusters B1

A



B

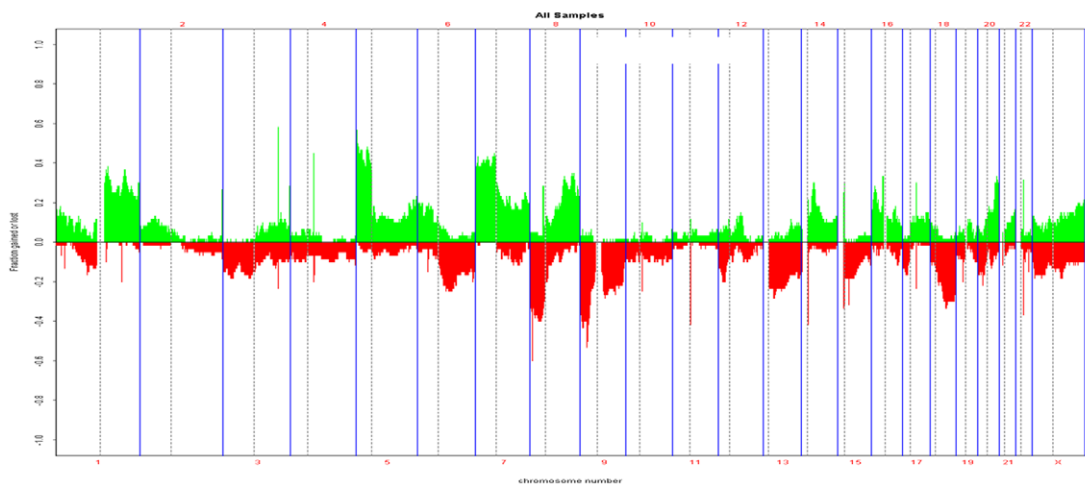


Figure 1. Aberrations using aCGH analysis in 60 never smokers with lung adenocarcinoma. Panel A. Heat map of gains (green color) and losses (red color) by chromosome generated by non supervised hierarchical clustering. Small blue or yellow dot indicate gains with $\log_2(\text{ratio}) > 1.5$ and losses with $\log_2(\text{ratio}) < -1.5$, respectively. Blue star (*): two outliers (37875 between classes A and B and 37569 between clusters B1 and B2). **Panel B.** Distribution of gains (green color) and losses (red color) along the genome. doi:10.1371/journal.pone.0015145.g001

(n = 9), B2 (n = 9) and B3 (n = 14) for B (Figure 1). An assessment of the uncertainty in hierarchical clustering is provided in Figure S2.

Clusters differed by their AG percentages ($P < 0.001$; Figure S3) and their aberration patterns. Cluster A1 was characterized by few aberrations, which comprised recurring gains on 5p, 7p, 14q and 20q, and losses on 8p (Table S2). In cluster A2 the level of AG (mean 12%, range 2 to 18%) was higher than in cluster A1 (mean 2%, range 0 to 4%). The aberration pattern in cluster A2 was different from the patterns of clusters B1, B2 and B3, indicating that cluster A2 was not a cluster belonging to class B with reduced amplitude in the aberrations. Cluster A2 had more losses (9%) than gains (7%), while cluster B1 had twice more gains (13%) than losses (6%). Notably, cluster B1 was characterized by the occurrence in every case of a gain on 8q. Cluster B2 was characterized by more losses (21%) than gains (10%) with a distinctive combination of numerous and frequent losses on 3p, 8p and 13. Cluster B3 was defined by gains on 7p and 7q, together with gains on 17q, 21, and less frequently X. One outlier between class A and class B was characterized by a uniquely high level of AG (64%), which was distributed in both gains (23%) and losses (41%); another outlier between cluster B1 and B2 displayed a gain of the whole chromosome 12.

By ANOVA, gains including oncogenes and losses including tumor suppressor genes were significantly associated after adjustment for their false discovery rate with particular clusters (Table S3). *MYC* at 8q24.21 was gained in 100% of cases in cluster B1 (adjusted $P = 6.00E-05$). *BRAF* was included in a region extending 1.27 Mb at 7q34 that was gained in 64% of cases in cluster B3 (adjusted $P = 0.001$). Other gains on 7q including *ELN*, *HIP1*, *CREB3L2* and *KIAA1549* were associated with cluster B3. The gains on 7p containing *CARD11*, *ETV1* and *IKZF1* were observed in 78% to 92% of cases of cluster B3. Several regions on 13q that included *CDX2*, *BRC42*, *RBI* and *ERCC5* were lost in 77% to 88% of cases in cluster B2. *WRN* at 8p12 was the single gene present in a deleted region in 88% of cases in cluster B2 (adjusted $P = 0.002$).

The five clusters differed by their association with a central scar-like fibrosis ($P = 0.03$ after Bonferroni correction), which was more frequent in cluster B2 (7/9 cases) compared to other clusters (12/50 cases). They did not differ with regard to other clinicopathological characteristics.

Relationships of clusters with abnormalities in *EGFR* and *KRAS*

Forty tumors (67%) harbored *EGFR* mutations (Table S4). The four *KRAS* mutations were observed in four *EGFR* wild-type cases.

The prevalence of *EGFR* mutations differed with clusters ($P = 0.004$), gains on 7p ($P = 0.04$) and AG percentages ($P < 0.001$). *EGFR* mutations remained associated with clusters after adjustment for AG percentages and gain on 7p ($P = 0.05$). Cluster B3 was characterized by the highest frequency of gains on 7p (93%), and the highest frequency of *EGFR* mutations (93%), although these abnormalities did not coincide. Most gains on 7p (80%) and every case with an amplification spanning *EGFR* were associated with *EGFR* mutation. Nineteen *EGFR* mutations were seen in cases with no gain on 7p.

While every gain on 7p included *EGFR*, only 5 of 14 gains on 12p included *KRAS* either wild-type (3 cases) or mutated (2 cases). The distribution of mutations or gains involving *EGFR* or *KRAS* is displayed in Figure S4. The 10 cases without abnormality involving *EGFR* or *KRAS* belonged to clusters A1 (9 cases) or A2 (1 case with 2% AG). Amplifications of *MET* and *ERBB2* occurred with a gain on 7p and an *EGFR* mutation, respectively.

Distribution of recurrent aberrations

Recurrent gains were observed on 1q, 5p, 7p, 8q and 16p in $>20\%$ of cases and on 5q, 6p, 7q, 14q, 16q, 17q, 20q, 21q and Xq in 10% to 20% of cases (Figure 1). Recurrent losses were observed on 8p, 9p, 9q, 13q and 18q in $>20\%$ of cases and on 3p, 6q, 12p, 15q, 17p, 18p, 20p, Xp and Xq in 10% to 20% of cases. The proportion of tumors harboring gains on 5p or 7p and losses on 8p or 9p exceeded 40%. A comparison with previously reported large aberrations is shown in Table S5.

Minimal common regions

MCRs of gain were identified on 1q, 2p, 5p, 5q, 7p, 7q, 8q, 12p, 12q, 14q, 18p and 20q (Table 1). Their mean width was 879 Kb (range 109 to 2927). The maximum $\log_2(\text{ratio})$ ranged from 0.53 to 3.13. The twenty-two MCRs contained 152 coding genes, including *BCL9*, *ARNT*, *MDM4*, *NSD1*, *EGFR*, *MYC* and *MDM2*, as well as 6 *miRNA*. The highest frequency of recurring gains (62%) was noted at 5p13.33 that contained *TERT* and *CLPTMIL*. The MCR containing *EGFR* was involved in 43% of cases. A 171 Kb MCR at 20q13.33 contained only *mir-646*. Nine MCR contained between 1 and 5 coding genes, five MCR between 7 and 9 coding genes, and four MCR more than 10 coding genes. The MCR of gains were compared to previously published regions of gain in four representative studies [21], [30], [31], [32]. As shown in Table 1, out of eight MCR that did not overlap with previously reported gains, one MCR contained a single gene (*MCO2*) and two MCR contained only three genes.

MCRs of loss were identified on 1p, 3q, 6q, 8q, 9p, 16q and 20p (Table 2). Their mean width was 560 Kb (range 20 to 1703). The minimum $\log_2(\text{ratio})$ ranged from -0.43 to -1.19 . In four cases it was < -1 . The nine MCRs contained 18 coding genes, including *CDKN2B* for which the highest frequency of losses (53%) was noted. Five MCRs contained only one coding gene, and three MCRs between 3 and 6 coding genes. As shown in Table 2, six MCR of loss did not overlap with previously reported losses. Four of these MCR contained a single gene (*NSUN3*, *KHDRBS2*, *SNTG1* and *ST18*) and one MCR contained four genes.

Top focal amplifications

Twenty-seven focal (extending less than 5 Mb) amplifications were observed on 2q, 3p, 3q, 5p, 7p, 7q, 9p, 12p, 12q, 14q, 16p, 17q, 20q and Xq (Table 3). Their mean width was 643 Kb (range 14 to 4567 Kb). The maximum $\log_2(\text{ratio})$ ranged from 1.61 to 4.37. The 27 focal amplifications contained 114 coding genes, including *MET*, *KRAS*, *CDK4*, *FUS* and *ERBB2*, as well as two isolated *miRNA* and a cluster of 14 *miRNA*. Twenty-four amplifications were observed once. The three amplifications containing *TRIO*, *DKFZp564N2472* and *CDK4* were observed twice. Nine amplifications contained between 1 and 3 coding genes, ten between 4 and 6 coding genes, and three >10 coding genes. Eleven amplifications overlapped with previously reported gains.

Copy-neutral loss of heterozygosity

Forty-five of regions of interest which had been identified by aCGH (Tables 1, 2 and 3) could be evaluated by SNP analysis in 40 tumors. Thirty-nine regions were cross-validated by the SNP array profiles. An example is shown in Figure S5.

The SNP arrays could be analyzed for detection of copy-neutral LOH in 23 cases. The 17 remaining samples were not informative for LOH. Two-hundred and five regions displayed recurring copy-neutral LOH. MCR of recurring copy-neutral LOH with a frequency $>20\%$ are shown in Table S6. Among tumor

Table 1. Minimal common regions of gain in lung adenocarcinoma in 60 never smokers.

Cytoband	Start*	End	Width (Kb)	Coding genes (n)	Log2 ratio [§]	Frequency	Coding genes [¶]	mRNA gene	Previously reported overlapping region [§]
1q21.1	144967396	146188634	1221	9	2.46	33%	BCL9 CHD1L PRKAB2 FMO5 GJA5 GJA8 ACP6 GPR89B PDZKIP1	-	Kim et al.
1q21.2	148910280	149167813	257	4	1.07	37%	ARNT CTSK CTSS HORMAD1	-	Kim et al.; Weir et al.
1q21.3	152773939	153124479	350	4	1.07	38%	ADAR CHRNB2 KCNN3 UBE2Q1	-	Kim et al. Tonon et al.
1q32.1	202347395	203140588	793	9	1.02	37%	KISS1 REN ETNK2 GOLT1A MDM4 PIK3C2B LRRN2 PLEKHA6 PPP1R15B	-	Weir et al.
2p21	43387367	46315293	2927	15	0.97	13%	PPM1B SIX3 SLC3A1 PREPL LRPPRC SIX2 DYNC2L1 SRBD1 ABCG5 ABCG8 C2orf34 PLEKH2 UNQ6975 hCG_1645220 PRKCE	-	Weir et al.
5p15.33	1280621	1654137	373	5	1.74	62%	TERT SLC6A3 CLPTM1L LPCAT1 SDHAP3	-	Weir et al.
5p15.32	4965919	5075638	109	0	1.58	50%	-	-	-
5p12-5p11	45366792	4600894	642	0	1.09	37%	-	-	-
5q11.2	52373558	52735879	362	1	0.53	18%	MOCS2	-	-
5q35.2-5q35.3	176142617	178360147	2217	41	0.59	22%	UNC5A HK3 UIMC1 ZNF346 FGFR4 NSD1 RAB24 PRELID1 MXD3 LMAN2 RGS14 SLC34A1 PFN3 T1Z GRK6 PRR7 DBN1 PDLIM7 DOK3 DD41 FLJ10404 TMED9 B4GALT7 FAMI153A PROPI FAMI153C RPL19P9 N4BP3 RMND58 NHP2 GMCL1L HNRNPAB AGXTL2 COL23A1 CLK4 ZNF354A ZNF354B ZFP2 FLJ1183 ZNF454 GRM6	-	-
5q35.3	179513778	180194523	680	7	0.59	23%	FLT4 MAPK9 GPPT2 CNOT6 SCGB3A1 OR2Y1 MGAT1	-	-
7p11.2	54766919	56108248	1341	12	3.13	42%	EGFR SEC61G LANCL2 ECOP PSPHL SEPT14 FKBP9L CCT6A GBAS P5PH MRPS17 ZNF713	-	Kim et al.; Tonon et al.; Weir et al.; Zhao et al.
7q11.2	64860558	65616940	756	7	0.6	28%	DKFZp434F142 CCT6P1 ASL GUSB RCP9 VKORC1L1 TPST1	-	Zhao et al.
8q24.21	128611272	129784296	1173	3	1.3	35%	MYC PVT1 TMEM75	mir-1205 mir-1206 mir-1207 mir-1208	Kim et al.; Tonon et al.; Weir et al.; Zhao et al.
8q24.23	139213139	139712071	498	0	1.17	28%	-	-	-
12p11.21	31151912	31558797	406	3	0.81	12%	FAM60A FLJ13224 OVOS2	-	-
12q15	67079640	68051228	971	9	2.41	15%	MDM2 RAP1B NUP107 hCG_1757335 CPM SLC35E3 MGC5370 CPSF6 LYZ	mir-1279	Tonon et al.; Weir et al.; Zhao et al.
14q13.2-14q21.1	35346936	38036164	2689	15	2.58	30%	MBIP NKX2-1 NKX2-8 PAX9 MIPOL1 FOXA1 BRMS1L STELLAR SFTA3 FLJ42220 TTC6 C14orf25 SSRT1 CLEC14A SLC25A21	-	Tonon et al.; Weir et al.; Zhao et al.
18p11.32	634728	831011	196	3	1.05	12%	TYMS ENOSF1 C18orf56	-	Kim et al.; Tonon et al.
20q13.2	51212268	51703066	490	2	0.81	30%	ZNF217 RP4-724E16.2	-	Zhao et al.
20q13.31	54675484	55408554	733	3	0.82	33%	BMP7 SPO11 RAE1	-	-
20q13.33	58147620	58319505	171	0	0.81	32%	-	mir-646	Tonon et al.

*hg 18 assembly;

§Maximum value;

¶Oncogenes according to the 2010 April Cancer Gene Census³⁸ are in bold characters; genes for which a somatic mutation has been reported in lung cancer (Cosmic database april 2010) are underlined;*Weir et al.²¹; Tonon et al.²⁸; Kim et al.²⁹; Zhao et al.³⁰

doi:10.1371/journal.pone.0015145.t001

Table 2. Minimal common region of loss in lung adenocarcinoma in 60 never smokers.

Cytoband	Start*	End	Width (Kb)	Genes (n)	Log2 ratio [§]	Frequency	Coding genes ^{&}	miRNA genes	Previously reported overlapping region [§]
1p22.1	92942530	93381319	439	3	-0.43	18%	EVI5 MTF2 FAM69A	-	Tonon et al.
3q11.2	95327585	95416019	88	1	-0.74	15%	NSUN3	-	
6q11.1	62484326	62985285	501	1	-0.8	12%	KHDRBS2	-	
8q11.22	50928921	51329519	401	1	-1.19	20%	SNTG1	-	
8q11.23	53446319	53494813	48	1	-1.16	15%	ST18	-	
9p21.3	21998396	22018473	20	1	-1.18	53%	CDKN2B	-	Tonon et al.; Weir et al.; Zhao et al.
9q21.13	74982746	75362791	380	0	-0.56	28%	-	-	
16q23.1	76281180	77681228	1400	4	-0.43	10%	WVVOX VAT1L NUDT7 CLEC3A	-	
20p12.1	13515731	15279357	1763	6	-1.05	22%	FLRT3 ESF1 TASP1 C20orf7 SEL1L2 MACROD2	-	Weir et al.

*hg 18 assembly;

§Minimum value;

&Tumor suppressor genes according to the 2010 april Cancer Gene Census³⁸ are in bold characters;§Weir et al.²¹; Tonon et al.³⁰; Kim et al.³¹; Zhao et al.³²

doi:10.1371/journal.pone.0015145.t002

suppressor genes that were present in losses identified by aCGH, *RBI* and *WRN* were also present within copy-neutral LOH MCRs.

The 16p11.2 region harboring the oncogene *FUS*

The short arm of chromosome 16 displayed high-level focal amplifications in case 37817. There were two distinct regions of amplification that were separated by >4 Mb and extended 0.92 Mb and 1.20 Mb at 16p12.1 and at 16p11.2, respectively (Table 3). Each region comprised three peaks, which extended 36 Kb to 185 Kb and were spaced by 140 to 670 Kb. The 16p11.2 amplicons shown in Figure 2 harbored *FUS*, 12 other coding genes, and one long non-coding RNA gene. Nine additional cases demonstrated gains of a smaller amplitude encompassing *FUS*.

Real-time quantitative PCR assays in case 37817 showed a strong increase (>30 times) in *FUS* copy number compared to *AQP8* and *AMPD2*, which were located in copy-neutral regions.

The 16p11.2 region was explored by FISH by using two BAC clones (RP11-388M20 and RP11-347C12). The former completely covered *FUS*, while the latter was 745 Kb telomeric to it in the region <30,109–30,290Mb> (Figure 2). Both BAC were co-hybridized on normal metaphases and nuclei, and the signals were superposed. When co-hybridized on tumor cells from case 37817, two independent gene amplification homogeneously staining region (HSR) patterns appeared (Figure 2), demonstrating that the breakpoint of an unknown chromosomal translocation separated the two amplified segments (the telomeric amplification revealed by RP11-347C12 was not apparent in the aCGH results as this region was not covered by Agilent oligoprobes). Then, the amplicon containing *FUS* was characterized using RP11-388M20 together with the Vysis break apart probe. The BAC probe was stained in the same color as the centromeric part of the Vysis probe, but in a color different from that of the telomeric part. The probes were found amplified with a HSR pattern and co-localized in tumor cells, delimiting the previous breakpoint from 30,27 to 30,50 Mb. Furthermore, the co-localization suggested that the two amplicons <30,71–30,90Mb> and <31,09–31,21> were physically linked, as the 0,2Mb region <30,90–31,09Mb> was not amplified.

As shown in Figure S6, analysis of gene expression array data showed that four probe sets (1565717_s_at, 200959_at, 215744_at and 217370_x_at) interrogating *FUS* were significantly overexpressed in the subgroup of 10 tumors harboring a 16p gain compared with 30 tumors without such gain.

Real-time PCR gene expression assay established that *FUS* mRNA relative levels were 4 times higher in tumor 37817 (mean Δ CT 2.6) compared to NCI-HCC827 cell line (mean Δ CT 4.6), which displayed no gain on 16p.

Discussion

We used a high-resolution aCGH to analyze aberrations that occurred in lung adenocarcinoma in 60 never smokers. We identified new MCR of gain or loss and new amplifications. Furthermore, unsupervised hierarchical clustering showed that tumors could be classified into clusters exhibiting different levels and pattern of aberrations, which contained cancer genes. Clusters differed by their tumor characteristics.

Fourteen MCR of gain (eight regions) or loss (six regions) did not overlap with regions that were previously reported in four representative studies [21], [30], [31], [32]. Out of our newly described MCR, five contained a single coding gene (*MCOS2*, *NSUN3*, *KHDRBS2*, *SNTG1* and *ST18*) and may be considered as high-priority regions for further studies. Somatic mutations in genes within narrow MCR, including *FLT4*, *MAPK9*, *SPO11* and *KHDRBS2*, have been reported in cancers (COSMIC v48 release). Among single genes encompassed by MCR of loss, *ST18* was present in a 48 Kb MCR. *ST18* was found lost, hypermethylated and its mRNA downregulated in breast cancer [33].

Some newly uncovered aberrations contained oncogenes such as *FUS* at 16p11.2 and *NSD1* at 5q35.2–q35.3, whose association with lung cancer has hitherto not been reported. A gain on 16p has been previously associated with lung cancer in never smokers, although the association was not significant after multiple testing [19], [21]. We note that the association with never smoker status may be confounded by ethnicity or sex [34]. We found that the oncogene *FUS* was present in a high-level narrow amplification at 16p11.2 in one tumor (37818). It should be noted that nine other tumors displayed gains encompassing *FUS*, although the gene was first identified from a single patient. Furthermore, in the gene

Table 3. Top focal (<5Mb) amplifications (log2 ratio >1.58) not contributing to minimal common regions of gain.

Slide	Cytoband	Start*	End	Width (Kb)	Coding genes (n)	Log2 ratio [§]	Coding genes [¶]	miRNA	Previously reported overlapping region [§]
47584	2q14.2	120120731	120483864	363	2	1.69	PTPN4 TMEM177	-	Tonon et al.
37511	3p11.2	87661697	88571168	909	4	1.98	HTR1F CGBBP1 ZNF654 C3orf38	-	
37749	3q13.12	109377362	109440377	63	0	1.68	-	-	
37749	3q13.13	10999496	110354933	355	4	1.63	GUCA1C MORC1 TRAT1 FLJ22763	-	
37749	3q13.2	113240470	113522551	282	4	1.64	TMPRSS7 C3orf52 GCET2 SLC9A10	-	
37817	3q13.31	115227473	115456050	229	3	2.63	DRD3 ZNF80 QTRTD1	-	
37817	3q22.3	138959945	139026309	66	1	2.88	SOX14	-	Tonon et al.
37871, 47582	5p15.2	14167833	14668598	501	3	1.71	TRIO UNQ1870 FAM105A	-	Kim et al.
37492, 37985	7p12.1	52760845	53085803	325	1	3.21	DKFZp564N2472	-	
47582	7q31.2	115355561	116206401	851	6	2.13	MET [#] CAV1 CAV2 TFEC TES tcag7.929	-	Tonon et al.; Weir et al.; Zhao et al.
37819	9p22.3	15490609	15525984	35	0	1.8	-	-	
37819	9p21.3	21418395	21862731	444	3	1.67	IFNA1 IFNE1 MTAP	mir-31	
37875	12p12.1	24937842	25295816	358	5	4.37	KRAS BCAT1 LRMP CASC1 LYRM5	-	Tonon et al.; Weir et al.
37569	12p12.1-12p11.21	26213455	30754588	4541	19	4.32	SSPN MED21 FGFRIOP2 TM7SF3 C12orf11 C12orf71 STK38L ARNTL2 PTHLH PPFIBP1 KLHDC5 MRP535 REP15 CCDC91 ERGIC2 FAR2 TMTC1 OVCH1 IPO8	-	Tonon et al.
37568	12q13.13-12q13.2	53027533	53669280	642	12	2.23	ITGA5 ZNF385A GPR84 NCKAP1L PDE1B PPP1R1A LACRT DCD GTSF1 GLYCAM1 KIAA0748 MUC11	-	
37569, 47584	12q14.1	56426027	56440483	14	3	3.18	CDK4 TSPAN31 MARCH9	-	Weir et al.; Zhao et al.
37568	14q22.1	51202459	51815854	613	4	2.78	NID2 C14orf166 GNG2 PTGDR	-	
37817	16p12.1	24688436	24743419	55	0	2.64	-	-	Tonon et al.
37817	16p12.1	24882738	25043384	161	0	2.69	-	-	Tonon et al.
37817	16p12.1	25462373	25608504	146	0	2.59	-	-	Tonon et al.
37817	16p11.2	30013241	30048741	36	3	2.56	MAPK3 GDDP3 YPEL3	-	
37817	16p11.2	30715645	30901000	185	4	2.47	CTF1 BCL7C FBXL19 ORA1B (NCRNA00095)	-	
37817	16p11.2	31097645	31215554	118	4	2.59	FUS PYCARD PYDC1 TRIM72	-	
37511	17q12	35096506	35253366	157	5	3.76	ERBB2 GRB7 IKZF3 C17orf37 PERLD1	-	Kim et al.; Weir et al.; Zhao et al.
37492	20q11.21	31371257	31524747	153	2	1.61	SNTA1 CDKSRAP1	-	
37814	Xq27.1	138207177	139111284	904	4	1.64	F9 MCF2 ATP11C RP11-35F15.2	mir-505	
37988	Xq27.3	144986917	149553420	4567	18	1.78	FMR1 FTHL8 FMIRINB ASFMRI AFF2 IDS MAGEA9 MAGEA11 HSEF1 TMEM185A CXorf40A MAGEA9B HSEF2 MAGEA8 CXorf40B FLJ16423 FLJ44451 MAMLD1	mir-513c mir-513b mir-513a-1 mir-513a-2 mir-506 mir-507 mir-508 mir-509-2 mir-509-3 mir-509-1 mir-510 mir-514-1 mir-514-2 mir-514-3	

*hg 18 assembly;

[§]Maximum value;

[¶]Oncogenes according to the 2010 April Cancer Gene Census³⁸ are in bold characters; genes for which a somatic mutation has been reported in lung cancer (Cosmic database april 2010) are underlined;

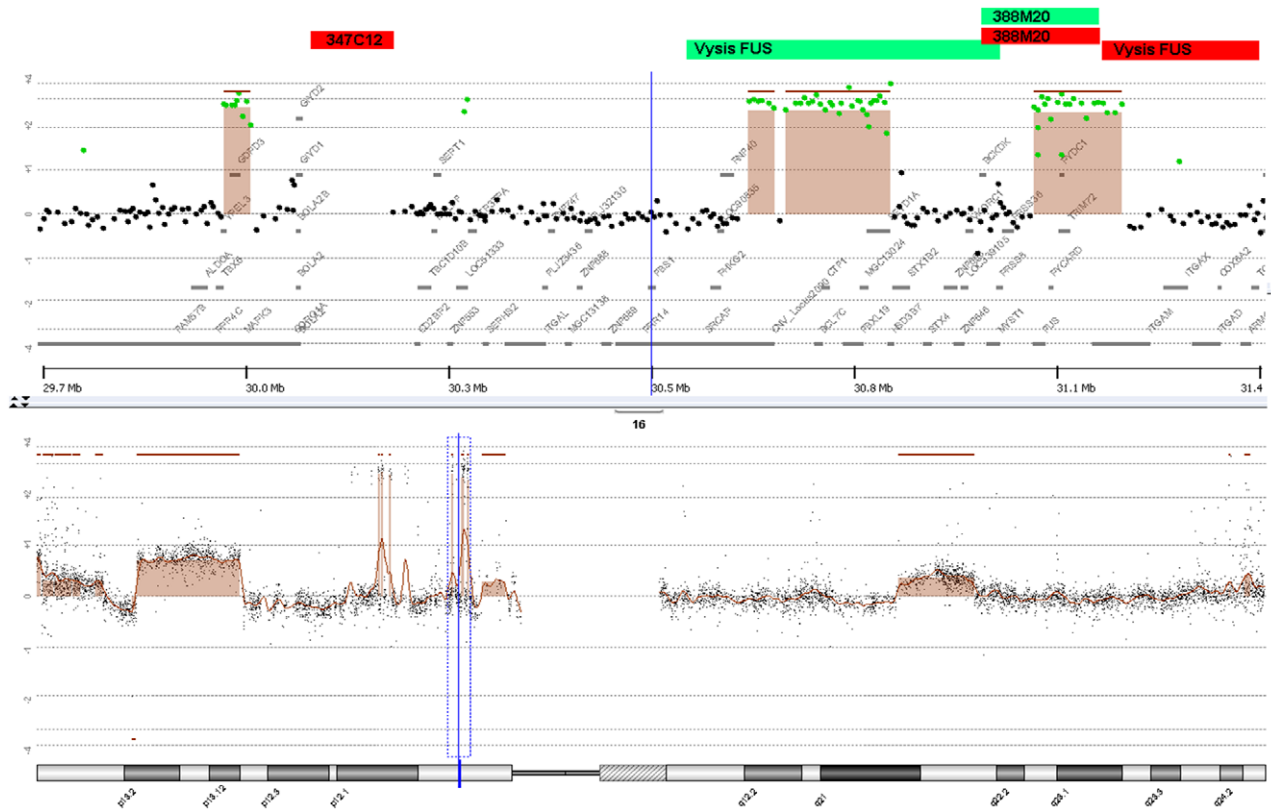
[#]MET except 20 Kb at the 3' part of the gene;

^{*}Weir et al.²¹; Tonon et al.³⁰; Kim et al.³¹; Zhao et al.³²

doi:10.1371/journal.pone.0015145.t003

A

Chromosome 16:29,841,800-31,354,673 1.53 Mb



B

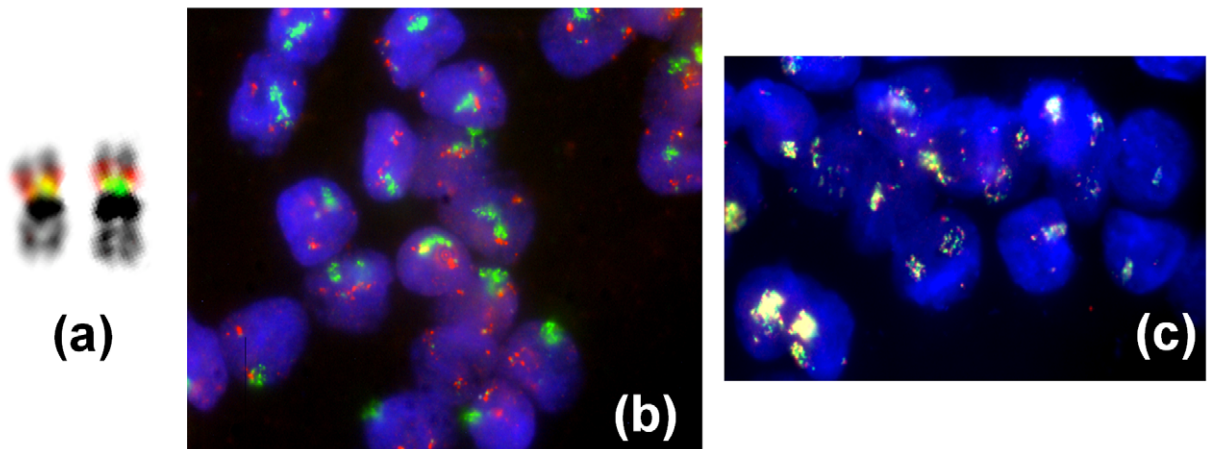


Figure 2. Amplicons on 16p11.2 in case 37817 using aCGH and FISH analyses. Panel A. aCGH analysis. Below: chromosome 16 diagram; the blue line limits the 16p11.2 region represented above. Above: aCGH profile for the enlarged 16p11.2 region showing the complex amplification. The dots are individual oligonucleotides that are in green when they are gained; a brown color, enhanced by a horizontal line, show the region of copy-number alteration segmented by the algorithm. The p telomere is to the left, the centromere to the right. The location and color of probes used for FISH are indicated as red or green squares at the upper part of the aCGH profile. **Panel B.** Examples of FISH results for the 16p11.2 region. (a) Normal chromosome 16 from a normal blood mitosis, in DAPI inverted colors showing the specific heterochromatin secondary constriction of the long arm. Although separated by less than a 1 Mb, RP11-347C12 (red) is slightly more telomeric than RP11-388M20 (green), although they are fused

for a large part. (b) The same probes on case 37817 cells showing a distinct pattern of amplification. (c) Combination of Vysis FUS probes with RP11-388M20 (red) that show a co-localization of the three probes on the amplicon even in decondensed HS.
doi:10.1371/journal.pone.0015145.g002

expression analysis the mean *FUS* expression level was compared between the 10 tumors displaying the 16p gain and 30 tumors without such gain. As *FUS* was found overexpressed in the subgroup with 16p gain, it was identified as a candidate gene from 10 tumors. Originally described as the result of translocations in myxoid liposarcoma [35], *FUS* encodes a TET protein that exerts roles in transcription and splicing and functions in several aspects of growth control and DNA repair [36]. Here, the aberration in tumor 37818 consisted of three closely spaced amplicons, suggesting amplification through breakage-fusion-bridge cycles [37]. Furthermore, FISH showed that the amplicon containing *FUS* was joined with the next telomeric amplicon in a HSR. The whole 16p11.2 region appeared highly rearranged as shown by the lack of FISH co-localization of the BAC covering *FUS* with a farther telomeric BAC. Among genes present in the 16p11.2 amplicon only *FUS* has until now been reported as altered by somatic simple mutation in cancer (Cosmic v48 release). While our data are consistent with *FUS* as a candidate gene in lung adenocarcinoma in never smokers, they do not prove that *FUS* is the functional target of the amplification. It is essential to systematically analyze using functional assays the whole 16p11.2 region.

To pinpoint cancer genes, we used a census that is conducted with relatively conservative criteria [38]. It is remarkable that we found many cancer genes that were previously reported in aberrations in lung cancer, including *BCL9*, *ARNT*, *MDM4*, *EGFR*, *MYC*, *MDM2*, *CDKN2B*, *MET*, *CDK4*, and *ERBB2*. Large aberrations are also consistent with the literature [19], [21], [23], [26], [31]. The gain containing *TERT* was reported as the most frequent event (78%) in early lung cancer [39]. *TERT* was included in this study within a MCR of gains with a high frequency (62%). At 5p15.2 *TRIO* was previously identified in a focal amplification and was found differentially expressed in early-stage lung cancer [40]. At 5p13 *GOLPH3* was recently established as a new oncogene that was gained in lung and other cancers [41]. It was frequently gained in our study without being included in a MCR or a focal amplification. At 14q13.2–14q21.1 we found a MCR of gain containing *MBIP*, *NKX2-1*, *NKX2-8* and *PAX9*, whose cooperation is involved in lung tumorigenesis [42]. Overlapping with previously reported regions, other MCR were often delineated with better precision. We identified a 390Kb MCR at 20q13.2, reported by Zhao et al. [32], that contained two genes of which *ZNF217* was found mutated in lung cancer. Another MCR at 20q13.33, reported by Tonon et al. [30], contained only *mir-646*.

We used hierarchical clustering to determine whether tumors were heterogeneous and whether there were cluster-specific aberrations, which could have been hidden in the study of the whole cohort. Tumors could be classified into five clusters that differed by their AG percentages and aberration patterns. Interestingly, the compendium of cancer genes that were present in cluster-associated recurring aberrations was to a large extent different from the list of MCR-associated cancer genes except for *MYC*. Present in a MCR in the whole cohort, *MYC* was also strongly associated with one cluster (cluster B1), where it was gained in every case. As point mutations in *MYC* do not occur in lung cancer, the gain of *MYC* could be important for lung cancer classification in never smokers. The tumor suppressor gene *WRN*, which encodes a helicase, was the single gene present in a narrow region at 8p12 that was frequently lost in cluster B2. *WRN* has

been reported to undergo epigenetic inactivation through CpG island promoter hypermethylation in about one-third of non-small cell lung cancer [43]. Other losses associated with cluster B2 were located on 13q and included *RBI*, which is frequently altered in lung cancer [16], and three other tumor suppressor genes. Another gain that was associated with cluster B3 included *BRAF*, whose mutation has been reported in 3% of non-small cell lung cancer [44]. There were other noteworthy gains on 7p and 7q, however, among which that of *ETV1* was the most strongly associated with cluster B3. The results presented here support heterogeneity in the genetic pathways in lung adenocarcinoma in never smokers. This view is strengthened by the association of cluster B2 with scar-like tumor fibrosis, a desmoplastic reaction which is common in localized peripheral lung adenocarcinoma, and of cluster B3 with the highest rate of *EGFR* mutation (93%) as well as the highest rate of the co-occurrence of *EGFR* mutations and gains or amplifications on 7p (86%).

EGFR mutations were found in 68% of cases in our study, a high rate similar to those reported in never or former light smokers in two recent studies [45], [46], while mutations in *KRAS* were infrequent. *EGFR* mutations were exclusive of *KRAS* mutations, a consistent observation suggesting that *EGFR* and *KRAS* mutations signal through a common pathway. The fact that every gain on 7p included *EGFR* supports that the gene is a likely target of those gains. In the absence of a gain on 7p, cases wild-type for both *EGFR* and *KRAS* either demonstrated amplification of *KRAS* or were characterized by low levels of aberrant genome. The targeting of *EGFR* or *KRAS* appears a nearly constant finding when tumors display genomic instability. However, it has been shown that the molecular subsets defined by *EML4-ALK*, *EGFR*, or *KRAS* mutations are distinct [47].

MCR of gains outnumbered MCR of loss, although the proportions of gained and lost genome were similar, suggesting a greater dispersion of losses. The predominance of gains is observed in most studies [21], [30], [32]. It is likely that other mechanisms inactivate tumor suppressor genes. Copy-neutral LOH may be such a mechanism. Copy-neutral LOH (also known as uniparental disomy)—wherein the retained homolog is duplicated so as to preserve two total copies per cell—is quite common in some cancers [48]. The SNP array analysis revealed recurrent copy-neutral LOH. Among tumor suppressor genes altered by copy-number losses, *RBI* and *WRN* were also present in regions of recurrent copy-neutral LOH. This observation may be meaningful as copy-neutral LOH can be biologically equivalent to the second hit in the Knudson hypothesis. The variety of different genetic events underlying LOH at the *RBI* locus in retinoblastoma seems to occur in lung cancer [49]. On the other hand, at less than 75% tumor DNA in heterogeneous samples an allelic duplication event and an allelic LOH bear resemblance to each other [50]. A comparison between smokers and never smokers with lung carcinoma is required to determine whether LOH is less frequent in never smokers as suggested by the early work of Sanchez-Cespedes et al. [20].

In conclusion, new regions of interest, some of which contained cancer genes or few potential candidate genes, were uncovered. Our results do not establish that the new regions were characteristic of never smoker status, but provide interesting insights into genomic imbalances in lung cancer. Amplicons at 16p11.2 were joined in a HSR including *FUS*, which was overexpressed when the gene was included in 16p11.2 gains. We also

showed heterogeneity in lung adenocarcinoma in never smokers with *MYC* as important in the classification. Genetic alterations targeting the *EGFR* signaling pathway appear nearly constant in tumors with genomic instability.

LG participants, all in France

Centre Chirurgical Marie-Lannelongue, Le Plessis-Robinson: P Dartevelle, E Dulmet, F Leroy-Ladurie, V de Montpreville; CHI Créteil: I Monnet; CHU Dijon: A Bernard, F Piard; CHU Hôtel-Dieu, Paris: M Alifano, S Camilleri-Broët, JF Régard; CHU Nice: P Hofman, V Hofman, J Mouroux; CHU Saint-Louis, Paris: J Trédaniel; CHU Strasbourg: M Beau-Faller, G Massard, A Neuville; CHU Tenon, Paris: M Antoine, J Cadranel; CHU Toulouse: L Brouchet, J Mazières, I Rouquette; HIA Percy, Clamart: P Saint-Blancard, F Vaylet; Institut Gustave-Roussy, Villejuif: A Berhneim, P Dessen, F Dufour, N Dorvault, P Fouret, B Job, L Lacroix, V Lazar, C Richon, V Roux, P Saulnier, E Taranchon, S Toujani, A Valent; Institut Mutualiste Montsouris, Paris: P Girard, D Gossot, P Validire; Ligue Nationale contre le Cancer: J Laffaire.

Supporting Information

Figure S1 Correlations between percentages of gain and percentages of loss in the whole genome in never smokers with lung adenocarcinoma. R2: Pearson correlation coefficient. Panel A. Correlation among the 5 clusters A1, A2, B1, B2 and B3. Panel B. Correlation among the 4 clusters A2, B1, B2 and B3 after exclusion of cases with low levels of aberrant genome (<5%) belonging to cluster A1. (TIF)

Figure S2 Cluster dendrogram with adjusted unbiased (AU) and bootstrap (BP) values (%) in 60 never smokers with lung adenocarcinomas using the R environment package Pvcust. Distance: euclidean. Cluster method: Ward. BP values (right, green color), AU values (left, red color), and cluster labels (bottom). The AU value may be lower than the BP value when the similarities involve a small proportion of the data. An example is provided by cases 37818 and 37892 belonging to cluster B1, whose region of similarity (8q) was narrow as shown in the heatmap. (TIF)

Figure S3 Percentages of aberrant genome in each cluster. Mean and standard deviation bars. P value: F test. (TIF)

Figure S4 Distribution of mutations or gains involving *EGFR* or *KRAS* in 57 never smokers with lung adenocarcinoma and available *EGFR* and *KRAS* sequencing data.

References

- Subramanian J, Govindan R (2007) Lung cancer in never smokers: a review. *J Clin Oncol* 25: 561–570.
- Sun S, Schiller JH, Gazdar AF (2007) Lung cancer in never smokers—a different disease. *Nat Rev Cancer* 7: 778–790.
- International Agency for Research on Cancer (2007) Water, air, soil and food pollutants. Dans: Attributable Causes of Cancer in France in the Year 2000. Geneva: WHO Press. pp 97–102.
- Wakelee HA, Chang ET, Gomez SL, Keegan TH, Feskanich D, et al. (2007) Lung cancer incidence in never smokers. *J Clin Oncol* 25: 472–478.
- Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, Tan EH, Hirsh V, et al. (2005) Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 353: 123–132.
- Thatcher N, Chang A, Parikh P, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, et al. (2005) Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: results from a randomised, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer). *Lancet* 366: 1527–1537.
- Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, et al. (2004) EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 13306–13311.
- Tsao M, Sakurada A, Cutz J, Zhu C, Kamel-Reid S, et al. (2005) Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med* 353: 133–144.

(TIF)

Figure S5 Example of the results of the comparison between aCGH and SNP array profiles in the 7p12.1 region displaying an amplification including *DKFZp564N2472*. Lanes from top to bottom: Illumina SNP array profile (log2ratio, slide 35), Agilent aCGH profile (log2ratio, slide 37492), location of Illumina SNP probes, location of Agilent aCGH probes, human genes (plus strand), cytoband and coordinates, human genes (minus strand). (TIF)

Figure S6 Box plots of expression levels of 4 Affymetrix probe sets interrogating *FUS*. Gain0: no gain of the 16p11.2 region; gain+: gain of the 16p11.2 region. Horizontal line: median; solid circle: mean; upper/lower whiskers: Max/Min value. P values: Student's t test. (TIF)

Material and Methods S1 Detailed methods on inclusion of patients, processing of samples, *EGFR* and *KRAS* sequencing, oligonucleotide aCGH analysis, genomic PCR, fluorescent in situ hybridization studies, gene expression analysis and SNP array analysis. (DOC)

Table S1
(DOC)

Table S2
(TIF)

Table S3
(DOC)

Table S4
(DOC)

Table S5
(DOC)

Table S6
(XLS)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: PF. Performed the experiments: BJ MB-F ST LL. Analyzed the data: BJ AB MB-F ST LL JL PD PF. Contributed reagents/materials/analysis tools: BJ MB-F SC-B PG PH JM PD. Wrote the paper: BJ AB MB-F SC-B PG PH JM ST LL JL PD PF.

9. Pham D, Kris MG, Riely GJ, Sarkaria IS, McDonough T, et al. (2006) Use of cigarette-smoking history to estimate the likelihood of mutations in epidermal growth factor receptor gene exons 19 and 21 in lung adenocarcinomas. *J Clin Oncol* 24: 1700–1704.
10. Tam IYS, Chung LP, Suen WS, Wang E, Wong MCM, et al. (2006) Distinct epidermal growth factor receptor and KRAS mutation patterns in non-small cell lung cancer patients with different tobacco exposure and clinicopathologic features. *Clin Cancer Res* 12: 1647–1653.
11. Rudin CM, Avila-Tang E, Harris CC, Herman JG, Hirsch FR, et al. (2009) Lung cancer in never smokers: molecular profiles and therapeutic implications. *Clin Cancer Res* 15: 5646–5661.
12. Shigematsu H, Takahashi T, Nomura M, Majmudar K, Suzuki M, et al. (2005) Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas. *Cancer Res* 65: 1642–1646.
13. Denissenko MF, Pao A, Tang M, Pfeifer GP (1996) Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science* 274: 430–432.
14. Toyooka S, Tokumo M, Shigematsu H, Matsuo K, Asano H, et al. (2006) Mutational and epigenetic evidence for independent pathways for lung adenocarcinomas arising in smokers and never smokers. *Cancer Res* 66: 1371–1375.
15. Riely GJ, Kris MG, Rosenbaum D, Marks J, Li A, et al. (2008) Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 14: 5731–5734.
16. Ding L, Getz G, Wheeler DA, Mardis ER, McLellan MD, et al. (2008) Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature* 455: 1069–1075.
17. Pleasance ED, Stephens PJ, O'Meara S, McBride DJ, Meynert A, et al. (2010) A small-cell lung cancer genome with complex signatures of tobacco exposure. *Nature* 463: 184–190.
18. Wong MP, Lam WK, Wang E, Chiu SW, Lam CL, et al. (2002) Primary adenocarcinomas of the lung in nonsmokers show a distinct pattern of allelic imbalance. *Cancer Res* 62: 4464–4468.
19. Wong MP, Fung L, Wang E, Chow W, Chiu S, et al. (2003) Chromosomal aberrations of primary lung adenocarcinomas in nonsmokers. *Cancer* 97: 1263–1270.
20. Sanchez-Cespedes M, Ahrendt SA, Piantadosi S, Rosell R, Monzo M, et al. (2001) Chromosomal alterations in lung adenocarcinoma from smokers and nonsmokers. *Cancer Res* 61: 1309–1313.
21. Weir BA, Woo MS, Getz G, Perner S, Ding L, et al. (2007) Characterizing the cancer genome in lung adenocarcinoma. *Nature* 450: 893–898.
22. Horn L, Pao W (2009) EML4-ALK: honing in on a new target in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 27: 4232–4235.
23. Balsara BR, Testa JR (2002) Chromosomal imbalances in human lung cancer. *Oncogene* 21: 6877–6883.
24. Toh C, Lim W (2007) Lung cancer in never-smokers. *J Clin Pathol* 60: 337–340.
25. Rudin CM, Avila-Tang E, Samet JM (2009) Lung cancer in never smokers: a call to action. *Clin Cancer Res* 15: 5622–5625.
26. Garnis C, Lockwood WW, Vucic E, Ge Y, Girard L, et al. (2006) High resolution analysis of non-small cell lung cancer cell lines by whole genome tiling path array CGH. *Int J Cancer* 118: 1556–1564.
27. Diskin SJ, Eck T, Greshock J, Mosse YP, Naylor T, et al. (2006) STAC: A method for testing the significance of DNA copy number aberrations across multiple array-CGH experiments. *Genome Res* 16: 1149–1158.
28. Suzuki R, Shimodaira H (2006) Pvcust: an R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. *Bioinformatics* 22: 1540–1542.
29. Hochberg Y, Benjamini Y (1990) More powerful procedures for multiple significance testing. *Stat Med* 9: 811–818.
30. Tonon G, Wong K, Maulik G, Brennan C, Feng B, et al. (2005) High-resolution genomic profiles of human lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 9625–9630.
31. Kim T, Yim S, Lee J, Kwon M, Ryu J, et al. (2005) Genome-wide screening of genomic alterations and their clinicopathologic implications in non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res* 11: 8235–8242.
32. Zhao X, Weir BA, LaFramboise T, Lin M, Beroukhi R, et al. (2005) Homozygous deletions and chromosome amplifications in human lung carcinomas revealed by single nucleotide polymorphism array analysis. *Cancer Res* 65: 5561–5570.
33. Jandrig B, Seitz S, Hinzmann B, Arnold W, Micheel B, et al. (2004) ST18 is a breast cancer tumor suppressor gene at human chromosome 8q11.2. *Oncogene* 23: 9295–9302.
34. Gazdar AF, Thun MJ (2007) Lung cancer, smoke exposure, and sex. *J Clin Oncol* 25: 469–471.
35. Kanoe H, Nakayama T, Hosaka T, Murakami H, Yamamoto H, et al. (1999) Characteristics of genomic breakpoints in TLS-CHOP translocations in liposarcomas suggest the involvement of Translin and topoisomerase II in the process of translocation. *Oncogene* 18: 721–729.
36. Tan AY, Manley JL (2009) The TET family of proteins: functions and roles in disease. *J Mol Cell Biol* 1: 82–92.
37. Tanaka H, Yao M (2009) Palindromic gene amplification—an evolutionarily conserved role for DNA inverted repeats in the genome. *Nat Rev Cancer* 9: 216–224.
38. Futreal PA, Coin L, Marshall M, Down T, Hubbard T, et al. (2004) A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer* 4: 177–183.
39. Kang JU, Koo SH, Kwon KC, Park JW, Kim JM (2008) Gain at chromosomal region 5p15.33, containing TERT, is the most frequent genetic event in early stages of non-small cell lung cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 182: 1–11.
40. Garnis C, Davies JJ, Buys TPH, Tsao M, MacAulay C, et al. (2005) Chromosome 5p aberrations are early events in lung cancer: implication of glial cell line-derived neurotrophic factor in disease progression. *Oncogene* 24: 4806–4812.
41. Scott KL, Kabbarah O, Liang M, Ivanova E, Anagnostou V, et al. (2009) GOLPH3 modulates mTOR signalling and rapamycin sensitivity in cancer. *Nature* 459: 1085–1090.
42. Hsu DS, Acharya CR, Balakumaran BS, Riedel RF, Kim MK, et al. (2009) Characterizing the developmental pathways TTF-1, NKX2-8, and PAX9 in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 5312–5317.
43. Agrelo R, Cheng W, Setien F, Roper S, Espada J, et al. (2006) Epigenetic inactivation of the premature aging Werner syndrome gene in human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 8822–8827.
44. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, et al. (2002) Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417: 949–954.
45. Mok TS, Wu Y, Thongprasert S, Yang C, Chu D, et al. (2009) Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 361: 947–957.
46. Rosell R, Moran T, Queralt C, Porta R, Cardenal F, et al. (2009) Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med* 361: 958–967.
47. Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, Digumarthy SR, Costa DB, et al. (2009) Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol* 27: 4247–4253.
48. LaFramboise T (2009) Single nucleotide polymorphism arrays: a decade of biological, computational and technological advances. *Nucleic Acids Res* 37: 4181–4193.
49. Cavenee WK, Dryja TP, Phillips RA, Benedict WF, Godbout R, et al. (1983) Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* 305: 779–784.
50. Pfeiffer DA, Le JM, Steemers FJ, Chang W, Jennigen T, et al. (2006) High-resolution genomic profiling of chromosomal aberrations using Infinium whole-genome genotyping. *Genome Res* 16: 1136–1148.

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

Le cancer est, par essence, une maladie génétique à l'échelle de la cellule [Bernheim et al., 2004 ; Mileman et al., 2007 ; Vogelstein and Kinzler, 2004]. Dans le cancer les anomalies génomiques sont schématiquement subdivisées en 2 grands groupes. Le premier, correspond aux altérations qui inactivent des gènes par mutation, délétion, ou par mécanisme épigénétique. Le second, englobe les anomalies qui entraînent une activation ou une dérégulation de gènes par mutation ponctuelle, amplification, ou par anomalie cytogénétique équilibrée. Les altérations chromosomiques sont détectées dans 85% des cancers. Les outils cytogénomiques permettent la caractérisation de ces anomalies. Le caryotype est le premier examen qui a été utilisé pour l'étude du génome des cellules cancéreuses, en particulier les hémopathies malignes et les tumeurs mésoenchymateuses [Stratton, 2011]. En revanche, dans les tumeurs solides, la difficulté d'obtenir les métaphases d'intérêt et la complexité des caryotypes obtenus ont restreint l'utilité de la cytogénétique conventionnelle. Trouver une approche expérimentale permettant une analyse pangénomique sans recourir à une culture cellulaire préalable est devenue une nécessité pour l'étude de l'oncogénome des tumeurs solides. Dans une seule expérience, l'aCGH, qui est l'ultime progrès évolutif de la cytogénomique, permet de quantifier les gains et les pertes tout le long du génome à partir de cellules non cultivées [Pinkel and Albertson, 2005]. Ce travail de thèse illustre l'intérêt de l'aCGH dans la caractérisation des altérations génomiques associées aux cancers.

I. Altérations génomiques associées aux lymphomes de Burkitt

Les anomalies chromosomiques additionnelles à la translocation $t(MYC;IG)$ sont détectées dans 60 à 70% des LB pédiatriques. Certaines de ces anomalies ont une valeur pronostique [Poirel et al., 2009]. Nous avons entrepris l'étude de 12 tumeurs et 15 lignées cellulaires par aCGH 44K et 244K respectivement pour établir une cartographie fine de ces anomalies additionnelles. Les résultats d'aCGH avait permis d'individualiser 2 groupes cytogénomiques de LB.

Dans le premier groupe, 19/27 cas (70%), des CNA récurrentes étaient mises en évidence. Des gains récurrents étaient observés dans les régions 1q, 13q, 7q, 8q, 2p, 11q et 15q. Les pertes, moins fréquentes, étaient détectées dans les régions : 3p, 4p, 4q, 9p, 6p, 17p, 6q, 11pterp13 et 14q12q21.3. Les microarray 244K avaient permis de mettre en évidence le réarrangement des locus des *IG*, gènes spécifiques de lignée cellulaire. Le réarrangement

somatique et monoclonale du locus des *IG* pourrait être utilisé comme un moyen non invasif dans : la surveillance de la maladie résiduelle et la détection des rechutes précoces des LB [He et al., 2011 ; Kroenlein et al., 2012]. L'étude des 15 lignées par transcriptome et miRNome avait permis de préciser les gènes candidats dans certaines MCR. Les gènes : *BCL9/1q21*, *p15^{INK4B}/9p21*, *TP53/17p13*, miR-17-92/13q31.3q32, et la famille des mir let-7 impliquent la voie de signalisation de *MYC*. La recherche de mutations de ces gènes dans une cohorte plus grande de LB serait nécessaire pour déterminer l'incidence et le pronostic de chaque anomalie. Ces résultats viennent confirmer l'hypothèse qui dit que la dérégulation de *MYC*, par juxtaposition aux locus *IG*, est nécessaire mais pas suffisante pour déclencher un phénotype tumoral avéré [Adams et al., 1985 ; Kovalchuk et al., 2000]. D'autres anomalies génomiques additionnelles, telles que l'amplification du polycistron miR-17-92 ou la perte de *p15^{INK4B}*, vont apporter une synergie à la dérégulation de *MYC* dans le processus de lymphomagenèse. Des études fonctionnelles de ces gènes remaniés seraient nécessaires pour déchiffrer leur rôle respectif dans la survenue de LB.

Dans le second groupe, 8/27 cas (30%), aucune CNA n'était observée à une résolution de 100 Kb. Dans les 8 cas (2 lignées cellulaires et 6 tumeurs), la translocation *t(MYC;IG)* était mise en évidence par le caryotype, ceci souligne l'intérêt de l'utilisation de 2 techniques cytogénomiques complémentaires pour l'étude de l'oncogénome. Dans ce groupe l'anomalie additionnelle à la *t(MYC;IG)* était indétectable par aCGH et le caryotype. L'utilisation d'autres approches expérimentales telles que le séquençage de 2^{ème} génération (NGS) est nécessaire pour mettre en évidence le spectre des anomalies génomiques secondaires dans ce groupe de LB.

II. Altérations génomiques associées aux carcinomes adénoïdes kystiques

Les carcinomes adénoïdes kystiques (CAK) sont des carcinomes rares, ils représentent à peu près 1% de l'ensemble des cancers de la région orale et maxillo-faciale [Kokemueller et al., 2004]. Leurs bases génétiques (CAK) sont peu étudiées. Dix sept tumeurs congelées de carcinomes adénoïdes kystiques étaient analysées par aCGH 44K. Des pertes récurrentes étaient observées dans les régions 1p35, 6q22q25, 8q12q13, 9p21, 12q12q13 et 17p11p13. Des gains récurrents, moins fréquents, étaient notés dans les régions 7p15.2, 17q21q25 et

22q11q13. Des gains isolés étaient détectés au niveau des locus : *KIT/PDGFRA/KDR/4q12*, *CCND1/11q13*, *MDM2/12q15* et *JAK2/9p24*. Les résultats d'aCGH combinés à ceux de la FISH, la MPLA et l'immunohistochimie avaient démontré l'implication des 2 voies majeures de gènes suppresseurs de tumeurs dans les CAK : p16^{INK4A}/p15^{INK4B} (indirectement la voie pRB) et ARF-MDM2-p53. Des gènes inducteurs de prolifération cellulaire, comme *KIT* et *CCND1* étaient aussi remaniés dans 2 tumeurs seulement. L'étude d'une cohorte plus importante, quoique difficile de l'obtenir vu la rareté des CAK, permettra de dresser un spectre relativement plus exhaustif quant à la nature et la fréquence des gènes impliqués dans les CAK.

Dans ce groupe de 17 CAK, les CNA étaient rares. Le nombre moyen de CNA était de 3.8. Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure les autres anomalies génomiques qui de part leur nature ne peuvent pas être détectées par aCGH. En effet, la translocation t(6;9)(q23;p23-24), à l'origine du gène de fusion *MYB-NFIB*, est récurrente dans les CAK [Persson et al., 2009]. Il serait nécessaire de chercher ce gène de fusion dans ces tumeurs et de corrélérer la présence de cette anomalie avec le profil aCGH.

III. Altérations génomiques associées aux adénocarcinomes pulmonaires des non fumeurs

Les adénocarcinomes pulmonaires (AD) sont les types histologiques les plus fréquents des CBPNC de non fumeurs (NF). Génétiquement, ce cancer est caractérisé une fréquence élevée de mutations activatrices de l'*EGFR* et par la présence de gènes de fusion *EML4-ALK* et *KIF5B-RET* lesquelles anomalies étaient à la base de traitements ciblés des AD de NF [Commander et al., 2011; Kohno et al., 2012 ; Shepherd et al., 2005 ; Thatcher et al., 2005]. Soixante tumeurs congelées d'AD de NF étaient étudiées par aCGH 244K à la recherche d'autres gènes impliqués dans ce type de cancer. Une étude par des SNP array était également réalisée sur 40/60 tumeurs. Cette étude avait individualisé 2 groupes de tumeurs.

Dans un premier groupe, 50/60 tumeurs, de nombreuses CNA étaient identifiées. Des gains récurrents étaient détectés dans les régions 1q, 2p, 5p, 5q, 6p, 7p, 7q, 8q, 12p, 12q, 14q, 16p, 17q, 18p, 20q, 21q et Xq. Ces régions impliquaient les gènes inducteurs de prolifération cellulaire comme *EGFR*, *ERBB2*, *MET*, *MYC*, *BCL9*, *CDK4*, *ARNT* et *KRAS*. L'oncogène *FUS*, dont le locus était le siège d'amplification, était associés pour la première fois au cancer

du poumon. Une étude fonctionnelle de ce gènes serait à mener pour apporter des indications sur son possible rôle dans la carcinogenèse pulmonaire du NF. Des pertes récurrentes étaient identifiées dans les régions : 1p, 3q, 6q, 8q, 9p, 16q et 20p. Le gène *p15^{INK4B}* était délété dans plus de la moitié des cas. Le locus du gène *RBI* était le siège de délétion et de LOH. Aucune délétion n'était observée au locus *TP53*. Par contre cette voie majeure suppresseur de tumeur était indirectement impliquée en conséquence à une amplification du locus *MDM2*.

Dans le 2^{ème} groupe, 10/60, de rares CNA étaient observées. Une étude ultérieure par FISH avait montré l'implication du gène *ALK* dans 4 cas [Hofman et al., 2011]. Pour les cas restant, il serait intéressant de chercher les anomalies des gènes *RET/inv(10)(p11.2q11.2)* et de *ROS1/6q22* qui étaient récemment impliqués dans le cancer du poumon [Kohno et al., 2012 ; Takeuchi et al., 2012]. Ces anomalies cryptiques sont équilibrées donc indétectables par aCGH. Le séquençage de 2^{ème} génération trouve son utilité dans ce groupe de tumeurs, puisqu'il permet de renseigner sur les CNA, les anomalies équilibrées (cryptiques ou non) et les mutations ponctuelles.

IV. Conclusion générale

L'étude des profils aCGH de 3 types de cancers, AD pulmonaires du NF, CAK et LB, confirme de nouveau les travaux David Von Hansemann [1890] et Theodor Boveri [1914] sur le rôle central des altérations génomiques dans la genèse des cancers. En dépit d'une disparité des origines tissulaires, les spectres des altérations génomiques de ces 3 tumeurs présentent des similitudes.

Une proportion importante des AD (50/60) pulmonaires et LB (19/27) sont aneuploïdes. Récemment, il a démontré que cet état d'aneuploïdie provoque un stress protéotoxique dans la cellule tumorale [Tang et al., 2011]. En revanche, les cellules malignes survivent à ce stress protéotoxique au prix d'une « addiction non oncogénique ». Il existerait des molécules qui sont capables d'induire la mort des cellules aneuploïdes, soit en augmentant les effets cytotoxiques résultant de ce contenu génomique anormal, soit en bloquant les voies de survie associées à cette addiction. La combinaison de ces molécules, AICAR, 17-AAG et la chloroquine, était plus efficace sur des lignées de cancer du colon de type CIN ("*chromosomal*

instability"), aneuploïde que sur les lignées MIN ("*microsatellite instability*"). Il serait intéressant de tester ces molécules sur les lignées aneuploïdes d'AD ou de LB.

Dans les AD et LB le locus de *MYC* était remanié par gain simple copie et par translocation respectivement. *MYC* se trouve au carrefour de plusieurs voies de signalisation et il est l'effecteur immédiat et précoce de plusieurs stimulations des ligands-récepteurs membranaires. Dans les cancers *MYC* peut être dérégulé par translocation, amplification ou par insertion de séquences régulatrices en amont de son locus, mais jamais par mutation ponctuelle [Dang, 2012]. *MYC* est dérégulé ou surexprimé dans plus de 70% des cancers chez l'homme. L'expression de *MYC* est corrélée à des tumeurs agressives [Gurel et al., 2008 ; Palaskas et al., 2011]. Des études *in vitro* et dans des modèles murins ont rapporté que le potentiel transformant de *MYC* requière une coopération avec d'autres oncogènes. Par exemple, chez la souris la délétion de la voie ARF-MDM2-p53 accélère le processus de carcinogenèse [Finch et al., 2006 ; Jacobs et al., 1999]. Cette coopération fait intervenir des oncogènes comme BMI1. Dans les LB et AD, le réarrangement génomique de la voie ARF-MDM2-p53 était récurrent. Il serait nécessaire de chercher quel est l'oncogène qui collabore avec *MYC*. Par ailleurs, une dérégulation des miR était à l'activation de *MYC*. Par exemple, ce dernier induit la surexpression du polycistron miR17-92 qui altère plusieurs processus biologiques (cycle cellulaire, angiogenèse). Dans LB, le locus du miR17-92 était amplifié, alors que dans les AD, aucune anomalie génomique n'a été observée. Il est intéressant d'évaluer le taux de miR dans les AD. Les modèles expérimentaux dans des tumeurs induites par *MYC* suggèrent que les tumeurs établies deviennent dépendantes de *MYC*, sont « addictives ». Cette addiction à *MYC* semble être liée à des modifications de plusieurs processus biologiques notamment métaboliques et énergétique. Ces changements provoqués par *MYC* offre une opportunité de nouvelles stratégies thérapeutique (pour revue [Dang, 2012]).

Le dénominateur commun des anomalies génomiques (104 profils aCGH) des 3 tumeurs, correspond à l'altération des 2 voies majeures supprimeurs de tumeurs : la voie p16^{INK4A}/pRB et l'axe ARF-MDM2-p53. A l'état physiologique, l'induction de ces 2 voies déclenche l'apoptose (*TP53*) et la sénescence (*RB* et *TP53*) qui sont les 2 mécanismes qui préviennent le développement d'une tumeur. Ainsi la perte de ces locus fait basculer la cellule dans l'immortalisation cellulaire. Dans les AD et LB, les réarrangements génomiques de ces 2 voies est vraisemblablement la conséquence d'une stimulation oncogénique au moins en

partie. Par exemple, la dérégulation de *MYC* peut directement affecter la fonction des télomères et augmente l'instabilité génomique [Louis et al., 2005]. Par contre, dans les CAK, les pertes génomiques dépassaient les gains et à l'exception de *CCND1* et *KIT* peu d'oncogènes, étaient remaniés. Dans les CAK, le séquençage de 2^{ème} génération, de l'ADNc, serait de grand apport pour établir un spectre plus exhaustif des anomalies génomiques et avec une précision. Dans les 3 types de tumeurs, l'altération des 2 voies p16^{INK4A}/pRB et de l'axe ARF-MDM2-p53 offre des options thérapeutiques. Dans les AD et CAK, le locus *MDM2* était amplifié. Cette anomalie, qui survient dans des tumeurs exprimant l'allèle sauvage de *TP53*, va contrecarrer les effets suppressifs de la protéine ARF [Brady et al., 2004 ; Momand et al., 1998]. Ainsi, *MDM2* est une bonne cible thérapeutique pour les tumeurs exprimant *TP53*^{+/+}, notamment dans les AD où le locus n'était pas délété. Nutlins est une classe de drogue qui inhibe l'interaction entre *MDM2* et p53 [Vassilev et al., 2004]. Cette molécule a été utilisée en clinique (pour revue [Cheung et al., 2009]). Des molécules qui miment les effets physiologiques d'ARF, entre autres inhibition de *MDM2*, peuvent être des inhibiteurs potentiels du processus de carcinogenèse et ceci quelque soit le statut de *TP53* [Saporita et al., 2007]. Cibler l'altération de la voie p16^{INK4A}/pRB passe en partie par contrecarrer les gènes dérégulés secondairement à l'altération de cette voie.. Il a démontré que la protéine p16 contrôle également la biogenèse des ribosomes qui sont donc synonymes de prolifération cellulaire. La perte de p16 va lever l'inhibition sur cette synthèse de ribosomes, et donc ce mécanisme offre une possibilité de thérapie ciblée. Depuis la découverte du chromosome Philadelphie qui s'était ultérieurement révélé comme la résultante d'une translocation chromosomique, l'importance des anomalies chromosomiques dans la définition des évènements moléculaires qui contribuent à l'initiation et au maintien des cellules malignes a été établie pour tous les types de tumeurs humaines. Le progrès relativement rapide des outils technologiques a permis de générer une masse de données considérables concernant les gènes impliqués dans la carcinogenèse. Ce travail de cette thèse, illustre l'utilité de l'aCGH dans l'étude des altérations génomiques associées à la malignité. Cette technique a généré un spectre large de gènes altérés en conséquence à des anomalies génomiques quantitatives. Le décryptage du rôle de ces gènes dans la carcinogenèse requiert des analyses génomiques intégratives et des études fonctionnelles des gènes en question. Une fois validé, ces gènes peuvent être utilisés comme des marqueurs pour le suivi de la maladie cancéreuse. En revanche, l'aCGH, qui a ses limites, ne permet pas de déceler les anomalies équilibrées dont la mise en évidence ouvre la possibilité de traitement ciblée. Dans un proche avenir, le séquençage de 2^{ème} génération va détrôner la place de l'aCGH dans l'étude de l'oncogénome

puisqu'il renseigne sur les mutations ponctuelles, les CNA et les anomalies équilibrées. En oncologie, ce progrès scientifique serait alors la base de la médecine personnalisée.

Néanmoins, des zones d'ombres persistent dans notre compréhension de la carcinogenèse. Car le cancer est une maladie complexe et versatile. La cellule maligne, qui dérive d'une cellule normale, établit un nouveau code transcriptionnel, métabolique et énergétique en partie secondaire à des anomalies génomiques et épigénomiques. A l'intérieur d'une même tumeur, les cellules ont des potentiels de malignités hétérogènes (concept de la CSC) qui sont à l'origine d'une résistance au traitement. Cette tumeur évolue également dans un écosystème, qui est lui-même constitué de mosaïque de cellule, hostile parfois à son expansion. L'avancement dans la compréhension de la carcinogenèse passe par un décryptage de ces aspects fonctionnels et génomiques de la cellule maligne et de son environnement.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adams, G.B., Martin, R.P., Alley, I.R., Chabner, K.T., Cohen, K.S., Calvi, L.M., Kronenberg, H.M., and Scadden, D.T. (2007). Therapeutic targeting of a stem cell niche. *Nat Biotechnol* 25, 238-243.
- Adams, J.M., and Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 26, 1324-1337.
- Adams, J.M., Harris, A.W., Pinkert, C.A., Corcoran, L.M., Alexander, W.S., Cory, S., Palmiter, R.D., and Brinster, R.L. (1985). The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* 318, 533-538.
- Adolfsson, J., Mansson, R., Buza-Vidas, N., Hultquist, A., Liuba, K., Jensen, C.T., Bryder, D., Yang, L., Borge, O.J., Thoren, L.A., et al. (2005). Identification of Flt3⁺ lympho-myeloid stem cells lacking erythromegakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* 121, 295-306.
- Agirre, X., Martinez-Climent, J.A., Odero, M.D., and Prosper, F. (2012). Epigenetic regulation of miRNA genes in acute leukemia. *Leukemia* 26, 395-403.
- Aguirre, A.J., Bardeesy, N., Sinha, M., Lopez, L., Tuveson, D.A., Horner, J., Redston, M.S., and DePinho, R.A. (2003). Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev* 17, 3112-3126.
- Ahmed, Z., and Bicknell, R. (2009). Angiogenic signalling pathways. *Methods Mol Biol* 467, 3-24.
- Ahrendt, S.A., Decker, P.A., Alawi, E.A., Zhu Yr, Y.R., Sanchez-Cespedes, M., Yang, S.C., Haasler, G.B., Kajdacsy-Balla, A., Demeure, M.J., and Sidransky, D. (2001). Cigarette smoking is strongly associated with mutation of the K-ras gene in patients with primary adenocarcinoma of the lung. *Cancer* 92, 1525-1530.
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3983-3988.
- Albertson, D.G. (2003). Profiling breast cancer by array CGH. *Breast Cancer Res Treat* 78, 289-298.
- Albertson, D.G. (2006). Gene amplification in cancer. *Trends Genet* 22, 447-455.
- Allen, C.D., Okada, T., Tang, H.L., and Cyster, J.G. (2007). Imaging of germinal center selection events during affinity maturation. *Science* 315, 528-531.
- Amos, C.I., Pinney, S.M., Li, Y., Kupert, E., Lee, J., de Andrade, M.A., Yang, P., Schwartz, A.G., Fain, P.R., Gazdar, A., et al. (2010). A susceptibility locus on chromosome 6q greatly increases lung cancer risk among light and never smokers. *Cancer Res* 70, 2359-2367.
- Amos, C.I., Wu, X., Broderick, P., Gorlov, I.P., Gu, J., Eisen, T., Dong, Q., Zhang, Q., Gu, X., Vijaykrishnan, J., et al. (2008). Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1. *Nat Genet* 40, 616-622.
- Andersson, A.K., Miller, D.W., Lynch, J.A., Lemoff, A.S., Cai, Z., Pounds, S.B., Radtke, I., Yan, B., Schuetz, J.D., Rubnitz, J.E., et al. (2011). IDH1 and IDH2 mutations in pediatric acute leukemia. *Leukemia* 25, 1570-1577.
- Apel, A., Zentgraf, H., Buchler, M.W., and Herr, I. (2009). Autophagy-A double-edged sword in oncology. *Int J Cancer* 125, 991-995.
- Aplan, P.D. (2006). Causes of oncogenic chromosomal translocation. *Trends Genet* 22, 46-55.

- Arpino, G., Clark, G.M., Mohsin, S., Bardou, V.J., and Elledge, R.M. (2002). Adenoid cystic carcinoma of the breast: molecular markers, treatment, and clinical outcome. *Cancer* 94, 2119-2127.
- Artandi, S.E., and DePinho, R.A. (2010). Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis* 31, 9-18.
- Avery, O.T., Macleod, C.M., and McCarty, M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types : induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J Exp Med* 79, 137-158.
- Azumi, N., and Battifora, H. (1987). The cellular composition of adenoid cystic carcinoma. An immunohistochemical study. *Cancer* 60, 1589-1598.
- Baeriswyl, V., and Christofori, G. (2009). The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 19, 329-337.
- Bahram, F., von der Lehr, N., Cetinkaya, C., and Larsson, L.G. (2000). c-Myc hot spot mutations in lymphomas result in inefficient ubiquitination and decreased proteasome-mediated turnover. *Blood* 95, 2104-2110.
- Bailey-Wilson, J.E., Amos, C.I., Pinney, S.M., Petersen, G.M., de Andrade, M., Wiest, J.S., Fain, P., Schwartz, A.G., You, M., Franklin, W., et al. (2004). A major lung cancer susceptibility locus maps to chromosome 6q23-25. *Am J Hum Genet* 75, 460-474.
- Barbacid, M. (1987). ras genes. *Annu Rev Biochem* 56, 779-827.
- Barreto, V., Reina-San-Martin, B., Ramiro, A.R., McBride, K.M., and Nussenzweig, M.C. (2003). C-terminal deletion of AID uncouples class switch recombination from somatic hypermutation and gene conversion. *Mol Cell* 12, 501-508.
- Barrett, M.T., Scheffer, A., Ben-Dor, A., Sampas, N., Lipson, D., Kincaid, R., Tsang, P., Curry, B., Baird, K., Meltzer, P.S., et al. (2004). Comparative genomic hybridization using oligonucleotide microarrays and total genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17765-17770.
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., and Zhao, K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129, 823-837.
- Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297.
- Bass, A.J., Lawrence, M.S., Brace, L.E., Ramos, A.H., Drier, Y., Cibulskis, K., Sougnez, C., Voet, D., Saksena, G., Sivachenko, A., et al. (2011). Genomic sequencing of colorectal adenocarcinomas identifies a recurrent VTI1A-TCF7L2 fusion. *Nat Genet* 43, 964-968.
- Basso, K., and Dalla-Favera, R. (2010). BCL6: master regulator of the germinal center reaction and key oncogene in B cell lymphomagenesis. *Adv Immunol* 105, 193-210.
- Bastian, B.C., Kashani-Sabet, M., Hamm, H., Godfrey, T., Moore, D.H., 2nd, Brocker, E.B., LeBoit, P.E., and Pinkel, D. (2000). Gene amplifications characterize acral melanoma and permit the detection of occult tumor cells in the surrounding skin. *Cancer Res* 60, 1968-1973.
- Batsakis, J.G., and Luna, M.A. (1990). Histopathologic grading of salivary gland neoplasms: I. Mucoepidermoid carcinomas. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 99, 835-838.
- Bauman, J.G., Wiegant, J., Borst, P., and van Duijn, P. (1980). A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochromelabelled RNA. *Exp Cell Res* 128, 485-490.
- Beerenwinkel, N., Antal, T., Dingli, D., Traulsen, A., Kinzler, K.W., Velculescu, V.E., Vogelstein, B., and Nowak, M.A. (2007). Genetic progression and the waiting time to cancer. *PLoS Comput Biol* 3, e225.

- Bell, A., Bell, D., Weber, R.S., and El-Naggar, A.K. (2011). CpG island methylation profiling in human salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Cancer* 117, 2898-2909.
- Bell, D., Roberts, D., Kies, M., Rao, P., Weber, R.S., and El-Naggar, A.K. (2010). Cell type-dependent biomarker expression in adenoid cystic carcinoma: biologic and therapeutic implications. *Cancer* 116, 5749-5756.
- Bell, D., Zhao, Y.J., Rao, P.H., Weber, R.S., and El-Naggar, A.K. (2007). Translocation t(6;14) as the sole chromosomal abnormality in adenoid cystic carcinoma of the base of tongue. *Head Neck Pathol* 1, 165-168.
- Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R., and Sultan, C. (1976). Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 33, 451-458.
- Berek, C., Berger, A., and Apel, M. (1991). Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell* 67, 1121-1129.
- Berger, R. (2007). Cytogénétique humaine. De 1956 à 2006. *Pathologie Biologie* 56, 1-12.
- Berger, R., and Bernheim, A. (1982). Cytogenetic studies on Burkitt's lymphoma-leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 7, 231-244.
- Berger, R., and Bernheim, A. (1985). Cytogenetics of Burkitt's lymphoma-leukaemia: a review. *IARC Sci Publ*, 65-80.
- Berger, R., Bernheim, A., Weh, H.J., Flandrin, G., Daniel, M.T., Brouet, J.C., and Colbert, N. (1979). A new translocation in Burkitt's tumor cells. *Hum Genet* 53, 111-112.
- Berger, R., Bernheim, A., Weh, H.J., Flandrin, G., Daniel, M.T., Brouet, J.C., and Colbert, N. (1979). A new translocation in Burkitt's tumor cells. *Hum Genet* 53, 111-112.
- Bergers, G., and Benjamin, L.E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 3, 401-410.
- Bergfeld, S.A., and DeClerck, Y.A. (2010). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells and the tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev* 29, 249-261.
- Bernheim, A. (2010). Cytogenomics of cancers: from chromosome to sequence. *Mol Oncol* 4, 309-322.
- Bernheim, A. (2011). Clonage des points de cassure par NGS. Paper presented at: *Approches génomiques en cytogénétique acquise et constitutionnelle (Paris)*.
- Bernheim, A., Berger, R., and Lenoir, G. (1980). [Translocations t(2;8) and t(8;22) in continuous cell lines of African Burkitt's lymphoma]. *C R Seances Acad Sci D* 291, 237-239.
- Bernheim, A., Berger, R., and Lenoir, G. (1981). Cytogenetic studies on African Burkitt's lymphoma cell lines: t(8;14), t(2;8) and t(8;22) translocations. *Cancer Genet Cytogenet* 3, 307-315.
- Bernheim, A., Berger, R., and Lenoir, G. (1983). Cytogenetic studies on Burkitt's lymphoma cell lines. *Cancer Genet Cytogenet* 8, 223-229.
- Bernheim, A., Berger, R., and Szabo, P. (1984). Localization of actin-related sequences by in situ hybridization to R-banded human chromosomes. *Chromosoma* 89, 163-167.
- Bernheim, A., Huret, J.L., Guillaud-Bataille, M., Brison, O., and Couturiers, J. (2004). [Cytogenetics, cytogenomics and cancer: 2004 update]. *Bull Cancer* 91, 29-43.

- Bernheim, A., Toujani, S., Saulnier, P., Robert, T., Casiraghi, O., Validire, P., Temam, S., Menard, P., Dessen, P., and Fouret, P. (2008). High-resolution array comparative genomic hybridization analysis of human bronchial and salivary adenoid cystic carcinoma. *Lab Invest* 88, 464-473.
- Bernstein, B.E., Meissner, A., and Lander, E.S. (2007). The mammalian epigenome. *Cell* 128, 669-681.
- Bernstein, E., Kim, S.Y., Carmell, M.A., Murchison, E.P., Alcorn, H., Li, M.Z., Mills, A.A., Elledge, S.J., Anderson, K.V., and Hannon, G.J. (2003). Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet* 35, 215-217.
- Beroukhi, R., Mermel, C.H., Porter, D., Wei, G., Raychaudhuri, S., Donovan, J., Barretina, J., Boehm, J.S., Dobson, J., Urashima, M., et al. (2010). The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* 463, 899-905.
- Berquam-Vrieze, K.E., Nannapaneni, K., Brett, B.T., Holmfeldt, L., Ma, J., Zagorodna, O., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Meyerholz, D.K., Knudson, C.M., et al. (2011). Cell of origin strongly influences genetic selection in a mouse model of T-ALL. *Blood* 118, 4646-4656.
- Berx, G., and van Roy, F. (2009). Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, a003129.
- Bhaijee, F., Pepper, D.J., Pitman, K.T., and Bell, D. (2011). New developments in the molecular pathogenesis of head and neck tumors: a review of tumor-specific fusion oncogenes in mucoepidermoid carcinoma, adenoid cystic carcinoma, and NUT midline carcinoma. *Ann Diagn Pathol* 15, 69-77.
- Bhowmick, N.A., Neilson, E.G., and Moses, H.L. (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432, 332-337.
- Bilal, H., Handra-Luca, A., Bertrand, J.C., and Fouret, P.J. (2003). P63 is expressed in basal and myoepithelial cells of human normal and tumor salivary gland tissues. *J Histochem Cytochem* 51, 133-139.
- Bindea, G., Mlecnik, B., Fridman, W.H., Pages, F., and Galon, J. (2010). Natural immunity to cancer in humans. *Curr Opin Immunol* 22, 215-222.
- Birchmeier, W., and Behrens, J. (1994). Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta* 1198, 11-26.
- Blasco, M.A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet* 6, 611-622.
- Blink, E.J., Light, A., Kallies, A., Nutt, S.L., Hodgkin, P.D., and Tarlinton, D.M. (2005). Early appearance of germinal center-derived memory B cells and plasma cells in blood after primary immunization. *J Exp Med* 201, 545-554.
- Bodmer, W., Bielas, J.H., and Beckman, R.A. (2008). Genetic instability is not a requirement for tumor development. *Cancer Res* 68, 3558-3560; discussion 3560-3551.
- Boiko, A.D., Razorenova, O.V., van de Rijn, M., Swetter, S.M., Johnson, D.L., Ly, D.P., Butler, P.D., Yang, G.P., Joshua, B., Kaplan, M.J., et al. (2010). Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271. *Nature* 466, 133-137.
- Bollmann, F.M. (2007). Targeting ALT: the role of alternative lengthening of telomeres in pathogenesis and prevention of cancer. *Cancer Treat Rev* 33, 704-709.
- Bonci, D., Coppola, V., Musumeci, M., Addario, A., Giuffrida, R., Memeo, L., D'Urso, L., Pagliuca, A., Biffoni, M., Labbaye, C., et al. (2008). The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. *Nat Med* 14, 1271-1277.

- Bonnet, D., and Dick, J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3, 730-737.
- Bornkamm, G.W. (2009). Epstein-Barr virus and its role in the pathogenesis of Burkitt's lymphoma: an unresolved issue. *Semin Cancer Biol* 19, 351-365.
- Bos, J.L. (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 49, 4682-4689.
- Bousquet, M., Quelen, C., Rosati, R., Mansat-De Mas, V., La Starza, R., Bastard, C., Lippert, E., Talmant, P., Lafage-Pochitaloff, M., Leroux, D., et al. (2008). Myeloid cell differentiation arrest by miR-125b-1 in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with the t(2;11)(p21;q23) translocation. *J Exp Med* 205, 2499-2506.
- Boveri, T. (1914). *Zur Frage der Entstehung Maligner Tumoren*. (Jena, Gustav Fischer.).
- Boxer, L.M., and Dang, C.V. (2001). Translocations involving c-myc and c-myc function. *Oncogene* 20, 5595-5610.
- Bozic, I., Antal, T., Ohtsuki, H., Carter, H., Kim, D., Chen, S., Karchin, R., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Nowak, M.A. (2010). Accumulation of driver and passenger mutations during tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 18545-18550.
- Brabletz, T., Jung, A., Spaderna, S., Hlubek, F., and Kirchner, T. (2005). Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer* 5, 744-749.
- Brady, S.N., Yu, Y., Maggi, L.B., Jr., and Weber, J.D. (2004). ARF impedes NPM/B23 shuttling in an Mdm2-sensitive tumor suppressor pathway. *Mol Cell Biol* 24, 9327-9338.
- Branton, D., Deamer, D.W., Marziali, A., Bayley, H., Benner, S.A., Butler, T., Di Ventra, M., Garaj, S., Hibbs, A., Huang, X., et al. (2008). The potential and challenges of nanopore sequencing. *Nat Biotechnol* 26, 1146-1153.
- Brat, D.J., Hahn, S.A., Griffin, C.A., Yeo, C.J., Kern, S.E., and Hruban, R.H. (1997). The structural basis of molecular genetic deletions. An integration of classical cytogenetic and molecular analyses in pancreatic adenocarcinoma. *Am J Pathol* 150, 383-391.
- Bronner, C.E., Baker, S.M., Morrison, P.T., Warren, G., Smith, L.G., Lescoe, M.K., Kane, M., Earabino, C., Lipford, J., Lindblom, A., et al. (1994). Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 368, 258-261.
- Bross, L., Fukita, Y., McBlane, F., Demolliere, C., Rajewsky, K., and Jacobs, H. (2000). DNA double-strand breaks in immunoglobulin genes undergoing somatic hypermutation. *Immunity* 13, 589-597.
- Bruce, W.R., and Van Der Gaag, H. (1963). A QUANTITATIVE ASSAY FOR THE NUMBER OF MURINE LYMPHOMA CELLS CAPABLE OF PROLIFERATION IN VIVO. *Nature* 199, 79-80.
- Buck, D., Malivert, L., de Chasseval, R., Barraud, A., Fondaneche, M.C., Sanal, O., Plebani, A., Stephan, J.L., Hufnagel, M., le Deist, F., et al. (2006). Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell* 124, 287-299.
- Buonamici, S., Trimarchi, T., Ruocco, M.G., Reavie, L., Cathelin, S., Mar, B.G., Klinakis, A., Lukyanov, Y., Tseng, J.C., Sen, F., et al. (2009). CCR7 signalling as an essential regulator of CNS infiltration in T-cell leukaemia. *Nature* 459, 1000-1004.
- Burger, J.A., Ghia, P., Rosenwald, A., and Caligaris-Cappio, F. (2009). The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood* 114, 3367-3375.

- Burkhardt, D.L., and Sage, J. (2008). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer* 8, 671-682.
- Burkitt, D. (1958). A sarcoma involving the jaws in African children. *Br J Surg* 46, 218-223.
- Cairo, M.S., Sposto, R., Hoover-Regan, M., Meadows, A.T., Anderson, J.R., Siegel, S.E., Kadin, M.E., Kjeldsberg, C.R., Wilson, J.F., Perkins, S.L., et al. (2003). Childhood and adolescent large-cell lymphoma (LCL): a review of the Children's Cancer Group experience. *Am J Hematol* 72, 53-63.
- Calin, G.A., and Croce, C.M. (2006). MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 6, 857-866.
- Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., et al. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15524-15529.
- Calin, G.A., Liu, C.G., Sevignani, C., Ferracin, M., Felli, N., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Cimmino, A., Zupo, S., Dono, M., et al. (2004b). MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11755-11760.
- Calin, G.A., Sevignani, C., Dumitru, C.D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M., et al. (2004a). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2999-3004.
- Callagy, G., Pharoah, P., Chin, S.F., Sangan, T., Daigo, Y., Jackson, L., and Caldas, C. (2005). Identification and validation of prognostic markers in breast cancer with the complementary use of array-CGH and tissue microarrays. *J Pathol* 205, 388-396.
- Calvi, L.M., Adams, G.B., Weibrecht, K.W., Weber, J.M., Olson, D.P., Knight, M.C., Martin, R.P., Schipani, E., Divieti, P., Bringhurst, F.R., et al. (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425, 841-846.
- Campbell, L.L., and Polyak, K. (2007). Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle* 6, 2332-2338.
- Campbell, P.J., Yachida, S., Mudie, L.J., Stephens, P.J., Pleasance, E.D., Stebbings, L.A., Morsberger, L.A., Latimer, C., McLaren, S., Lin, M.L., et al. (2010). The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer. *Nature* 467, 1109-1113.
- Capoulade, C., Bressac-de Paillerets, B., Lefrere, I., Ronsin, M., Feunteun, J., Tursz, T., and Wiels, J. (1998). Overexpression of MDM2, due to enhanced translation, results in inactivation of wild-type p53 in Burkitt's lymphoma cells. *Oncogene* 16, 1603-1610.
- Carlos-Bregni, R., Vidaurre, E.C., Carolina Netto, A., Leon, J.E., and Almeida, O.P. (2009). Primary intraosseous adenoid cystic carcinoma of the mandible: histopathological and immunohistochemical analysis. *Pathol Oncol Res* 15, 659-664.
- Carpenter, A.A., and Bernardo, J.R., Jr. (1971). Adenoid cystic carcinoma of Cowper's gland: case report. *J Urol* 106, 701-703.
- Carrasco Ortiz, D., and Aldape Barrios, B. (2006). Adenoid cystic carcinoma of the dorsum of the tongue: presentation of a case. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 11, E417-420.
- Carter, N.P. (2007). Methods and strategies for analyzing copy number variation using DNA microarrays. *Nat Genet* 39, S16-21.

- Carter, N.P., Ferguson-Smith, M.A., Perryman, M.T., Telenius, H., Pelmear, A.H., Leversha, M.A., Glancy, M.T., Wood, S.L., Cook, K., Dyson, H.M., et al. (1992). Reverse chromosome painting: a method for the rapid analysis of aberrant chromosomes in clinical cytogenetics. *J Med Genet* 29, 299-307.
- Carter, S.L., Eklund, A.C., Kohane, I.S., Harris, L.N., and Szallasi, Z. (2006). A signature of chromosomal instability inferred from gene expression profiles predicts clinical outcome in multiple human cancers. *Nat Genet* 38, 1043-1048.
- Carvalho, B., Ouwerkerk, E., Meijer, G.A., and Ylstra, B. (2004). High resolution microarray comparative genomic hybridisation analysis using spotted oligonucleotides. *J Clin Pathol* 57, 644-646.
- Caspersson, T., Zech, L., and Modest, E.J. (1970). Fluorescent labeling of chromosomal DNA: superiority of quinacrine mustard to quinacrine. *Science* 170, 762.
- Cavallaro, U., and Christofori, G. (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer* 4, 118-132.
- Cavenee, W.K., Hansen, M.F., Nordenskjold, M., Kock, E., Maumenee, I., Squire, J.A., Phillips, R.A., and Gallie, B.L. (1985). Genetic origin of mutations predisposing to retinoblastoma. *Science* 228, 501-503.
- Ceredig, R., Rolink, A.G., and Brown, G. (2009). Models of haematopoiesis: seeing the wood for the trees. *Nat Rev Immunol* 9, 293-300.
- Cerilli, L.A., Swartzbaugh, J.R., Saadut, R., Marshall, C.E., Rumpel, C.A., Moskaluk, C.A., and Frierson, H.F., Jr. (1999). Analysis of chromosome 9p21 deletion and p16 gene mutation in salivary gland carcinomas. *Hum Pathol* 30, 1242-1246.
- Cesare, A.J., and Reddel, R.R. (2010). Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nat Rev Genet* 11, 319-330.
- Chaisson, M.J., Brinza, D., and Pevzner, P.A. (2009). De novo fragment assembly with short mate-paired reads: Does the read length matter? *Genome Res* 19, 336-346.
- Chao, M.P., Seita, J., and Weissman, I.L. (2008). Establishment of a normal hematopoietic and leukemia stem cell hierarchy. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 73, 439-449.
- Chaudhuri, J., Basu, U., Zarrin, A., Yan, C., Franco, S., Perlot, T., Vuong, B., Wang, J., Phan, R.T., Datta, A., et al. (2007). Evolution of the immunoglobulin heavy chain class switch recombination mechanism. *Adv Immunol* 94, 157-214.
- Chen, C.Z. (2005). MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *N Engl J Med* 353, 1768-1771.
- Chen, C.Z., Li, L., Lodish, H.F., and Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 303, 83-86.
- Chen, C.Z., and Lodish, H.F. (2005). MicroRNAs as regulators of mammalian hematopoiesis. *Semin Immunol* 17, 155-165.
- Chen, D., Gallie, B.L., and Squire, J.A. (2001). Minimal regions of chromosomal imbalance in retinoblastoma detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 129, 57-63.
- Chen, J., Odenike, O., and Rowley, J.D. (2010). Leukaemogenesis: more than mutant genes. *Nat Rev Cancer* 10, 23-36.
- Chen, Z., Sasaki, T., Tan, X., Carretero, J., Shimamura, T., Li, D., Xu, C., Wang, Y., Adelmant, G.O., Capelletti, M., et al. (2010). Inhibition of ALK, PI3K/MEK, and HSP90 in murine lung adenocarcinoma induced by EML4-ALK fusion oncogene. *Cancer Res* 70, 9827-9836.

- Cheng, L., Alexander, R.E., Maclennan, G.T., Cummings, O.W., Montironi, R., Lopez-Beltran, A., Cramer, H.M., Davidson, D.D., and Zhang, S. (2012). Molecular pathology of lung cancer: key to personalized medicine. *Mod Pathol* 25, 347-369.
- Cheng, N., Chytil, A., Shyr, Y., Joly, A., and Moses, H.L. (2008). Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Mol Cancer Res* 6, 1521-1533.
- Chernova, O.B., Chernov, M.V., Ishizaka, Y., Agarwal, M.L., and Stark, G.R. (1998). MYC abrogates p53-mediated cell cycle arrest in N-(phosphonacetyl)-L-aspartate-treated cells, permitting CAD gene amplification. *Mol Cell Biol* 18, 536-545.
- Cheung, K.J., Horsman, D.E., and Gascoyne, R.D. (2009). The significance of TP53 in lymphoid malignancies: mutation prevalence, regulation, prognostic impact and potential as a therapeutic target. *Br J Haematol* 146, 257-269.
- Chi, P., Allis, C.D., and Wang, G.G. (2010). Covalent histone modifications--miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers. *Nat Rev Cancer* 10, 457-469.
- Chin, K., de Solorzano, C.O., Knowles, D., Jones, A., Chou, W., Rodriguez, E.G., Kuo, W.L., Ljung, B.M., Chew, K., Myambo, K., et al. (2004). In situ analyses of genome instability in breast cancer. *Nat Genet* 36, 984-988.
- Chiorazzi, N., Rai, K.R., and Ferrarini, M. (2005). Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 352, 804-815.
- Cho, R.W., and Clarke, M.F. (2008). Recent advances in cancer stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 18, 48-53.
- Choi, Y.L., Bocanegra, M., Kwon, M.J., Shin, Y.K., Nam, S.J., Yang, J.H., Kao, J., Godwin, A.K., and Pollack, J.R. (2010). LYN is a mediator of epithelial-mesenchymal transition and a target of dasatinib in breast cancer. *Cancer Res* 70, 2296-2306.
- Choi, Y.L., Soda, M., Yamashita, Y., Ueno, T., Takashima, J., Nakajima, T., Yatabe, Y., Takeuchi, K., Hamada, T., Haruta, H., et al. (2010). EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors. *N Engl J Med* 363, 1734-1739.
- Chung, E.Y., Dews, M., Cozma, D., Yu, D., Wentzel, E.A., Chang, T.C., Schelter, J.M., Cleary, M.A., Mendell, J.T., and Thomas-Tikhonenko, A. (2008). c-Myb oncoprotein is an essential target of the dleu2 tumor suppressor microRNA cluster. *Cancer Biol Ther* 7, 1758-1764.
- Ciardello, F., and Tortora, G. (2008). EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med* 358, 1160-1174.
- Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., Iorio, M.V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Aqeilan, R.I., Zupo, S., Dono, M., et al. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13944-13949.
- Clarke, M.F., Dick, J.E., Dirks, P.B., Eaves, C.J., Jamieson, C.H., Jones, D.L., Visvader, J., Weissman, I.L., and Wahl, G.M. (2006). Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 66, 9339-9344.
- Classon, M., and Harlow, E. (2002). The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 910-917.
- Cloughesy, T.F., Yoshimoto, K., Nghiemphu, P., Brown, K., Dang, J., Zhu, S., Hsueh, T., Chen, Y., Wang, W., Youngkin, D., et al. (2008). Antitumor activity of rapamycin in a Phase I trial for patients with recurrent PTEN-deficient glioblastoma. *PLoS Med* 5, e8.

- Coakley, D. (2006). Denis Burkitt and his contribution to haematology/oncology. *Br J Haematol* 135, 17-25.
- Cobaleda, C., Schebesta, A., Delogu, A., and Busslinger, M. (2007). Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nat Immunol* 8, 463-470.
- Collado, M., and Serrano, M. (2010). Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer* 10, 51-57.
- Commander, H., Whiteside, G., and Perry, C. (2011). Vandetanib: first global approval. *Drugs* 71, 1355-1365.
- Compton, D.A. (2011). Mechanisms of aneuploidy. *Curr Opin Cell Biol* 23, 109-113.
- Condeelis, J., and Segall, J.E. (2003). Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nat Rev Cancer* 3, 921-930.
- Cong, Y., and Shay, J.W. (2008). Actions of human telomerase beyond telomeres. *Cell Res* 18, 725-732.
- Cram, L.S., Gray, J.W., and Carter, N.P. (2004). Cytometry and genetics. *Cytometry A* 58, 33-36.
- Cremer, T., and Cremer, C. (2001). Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet* 2, 292-301.
- Cremer, T., Lichter, P., Borden, J., Ward, D.C., and Manuelidis, L. (1988). Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using chromosome-specific library probes. *Hum Genet* 80, 235-246.
- Croce, C.M. (2008). Oncogenes and cancer. *N Engl J Med* 358, 502-511.
- Curtiss, N.P., Bonifas, J.M., Lauchle, J.O., Balkman, J.D., Kratz, C.P., Emerling, B.M., Green, E.D., Le Beau, M.M., and Shannon, K.M. (2005). Isolation and analysis of candidate myeloid tumor suppressor genes from a commonly deleted segment of 7q22. *Genomics* 85, 600-607.
- d'Adda di Fagagna, F., Reaper, P.M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N.P., and Jackson, S.P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426, 194-198.
- da Cruz Perez, D.E., de Abreu Alves, F., Nobuko Nishimoto, I., de Almeida, O.P., and Kowalski, L.P. (2006). Prognostic factors in head and neck adenoid cystic carcinoma. *Oral Oncol* 42, 139-146.
- Dahl, R., Walsh, J.C., Lancki, D., Laslo, P., Iyer, S.R., Singh, H., and Simon, M.C. (2003). Regulation of macrophage and neutrophil cell fates by the PU.1:C/EBPalpha ratio and granulocyte colony-stimulating factor. *Nat Immunol* 4, 1029-1036.
- Dang, C.V. (2012). MYC on the Path to Cancer. *Cell* 149, 22-35.
- Dang, C.V., Le, A., and Gao, P. (2009). MYC-induced cancer cell energy metabolism and therapeutic opportunities. *Clin Cancer Res* 15, 6479-6483.
- Davidsson, J., Andersson, A., Paulsson, K., Heidenblad, M., Isaksson, M., Borg, A., Heldrup, J., Behrendtz, M., Panagopoulos, I., Fioretos, T., et al. (2007). Tiling resolution array comparative genomic hybridization, expression and methylation analyses of dup(1q) in Burkitt lymphomas and pediatric high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemias reveal clustered near-centromeric breakpoints and overexpression of genes in 1q22-32.3. *Hum Mol Genet* 16, 2215-2225.
- Dawson, D.W., Pearce, S.F., Zhong, R., Silverstein, R.L., Frazier, W.A., and Bouck, N.P. (1997). CD36 mediates the In vitro inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells. *J Cell Biol* 138, 707-717.

- De Antoni, A., Pearson, C.G., Cimini, D., Canman, J.C., Sala, V., Nezi, L., Mapelli, M., Sironi, L., Faretta, M., Salmon, E.D., et al. (2005). The Mad1/Mad2 complex as a template for Mad2 activation in the spindle assembly checkpoint. *Curr Biol* 15, 214-225.
- De Cat, B., and David, G. (2001). Developmental roles of the glypicans. *Semin Cell Dev Biol* 12, 117-125.
- De Cian, A., Lacroix, L., Douarre, C., Temime-Smaali, N., Trentesaux, C., Riou, J.F., and Mergny, J.L. (2008). Targeting telomeres and telomerase. *Biochimie* 90, 131-155.
- de Lange, T. (2009). How telomeres solve the end-protection problem. *Science* 326, 948-952.
- DeBerardinis, R.J., Lum, J.J., Hatzivassiliou, G., and Thompson, C.B. (2008). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* 7, 11-20.
- Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., Cuny, G.D., Mitchison, T.J., Moskowitz, M.A., and Yuan, J. (2005). Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol* 1, 112-119.
- Deininger, M., Buchdunger, E., and Druker, B.J. (2005). The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood* 105, 2640-2653.
- Dejana, E., Orsenigo, F., Molendini, C., Baluk, P., and McDonald, D.M. (2009). Organization and signaling of endothelial cell-to-cell junctions in various regions of the blood and lymphatic vascular trees. *Cell Tissue Res* 335, 17-25.
- DeKoter, R.P., Lee, H.J., and Singh, H. (2002). PU.1 regulates expression of the interleukin-7 receptor in lymphoid progenitors. *Immunity* 16, 297-309.
- DeNardo, D.G., Barreto, J.B., Andreu, P., Vasquez, L., Tawfik, D., Kolhatkar, N., and Coussens, L.M. (2009). CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer Cell* 16, 91-102.
- Denissenko, M.F., Pao, A., Tang, M., and Pfeifer, G.P. (1996). Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science* 274, 430-432.
- Di Fiore, P.P., Pierce, J.H., Kraus, M.H., Segatto, O., King, C.R., and Aaronson, S.A. (1987). erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science* 237, 178-182.
- Diaz, R., Ahn, D., Lopez-Barcons, L., Malumbres, M., Perez de Castro, I., Lue, J., Ferrer-Miralles, N., Mangués, R., Tsong, J., Garcia, R., et al. (2002). The N-ras proto-oncogene can suppress the malignant phenotype in the presence or absence of its oncogene. *Cancer Res* 62, 4514-4518.
- Dick, J.E. (2008). Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* 112, 4793-4807.
- Difilippantonio, M.J., Petersen, S., Chen, H.T., Johnson, R., Jasin, M., Kanaar, R., Ried, T., and Nussenzweig, A. (2002). Evidence for replicative repair of DNA double-strand breaks leading to oncogenic translocation and gene amplification. *J Exp Med* 196, 469-480.
- Ding, L., Getz, G., Wheeler, D.A., Mardis, E.R., McLellan, M.D., Cibulskis, K., Sougnez, C., Greulich, H., Muzny, D.M., Morgan, M.B., et al. (2008). Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature* 455, 1069-1075.
- Dirat, B., Bochet, L., Dabek, M., Daviaud, D., Dauvillier, S., Majed, B., Wang, Y.Y., Meulle, A., Salles, B., Le Gonidec, S., et al. (2011). Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Res* 71, 2455-2465.

- Dohner, K., Brown, J., Hehmann, U., Hetzel, C., Stewart, J., Lowther, G., Scholl, C., Frohling, S., Cuneo, A., Tsui, L.C., et al. (1998). Molecular cytogenetic characterization of a critical region in bands 7q35-q36 commonly deleted in malignant myeloid disorders. *Blood* 92, 4031-4035.
- Douglass, E.C., Magrath, I.T., Lee, E.C., and Whang-Peng, J. (1980). Cytogenetic studies in non-African Burkitt lymphoma. *Blood* 55, 148-155.
- Doulatov, S., Notta, F., Eppert, K., Nguyen, L.T., Ohashi, P.S., and Dick, J.E. (2010). Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. *Nat Immunol* 11, 585-593.
- Downward, J. (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3, 11-22.
- Dressman, D., Yan, H., Traverso, G., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (2003). Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8817-8822.
- Druker, B.J., Guilhot, F., O'Brien, S.G., Gathmann, I., Kantarjian, H., Gattermann, N., Deininger, M.W., Silver, R.T., Goldman, J.M., Stone, R.M., et al. (2006). Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 355, 2408-2417.
- du Manoir, S., Speicher, M.R., Joos, S., Schrock, E., Popp, S., Dohner, H., Kovacs, G., Robert-Nicoud, M., Lichter, P., and Cremer, T. (1993). Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Hum Genet* 90, 590-610.
- Dutrillaux, B., and Lejeune, J. (1971). [A new technic of analysis of the human karyotype]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 272, 2638-2640.
- Dutt, A., and Beroukhi, R. (2007). Single nucleotide polymorphism array analysis of cancer. *Curr Opin Oncol* 19, 43-49.
- Ebert, B.L., Pretz, J., Bosco, J., Chang, C.Y., Tamayo, P., Galili, N., Raza, A., Root, D.E., Attar, E., Ellis, S.R., et al. (2008). Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature* 451, 335-339.
- Egeblad, M., Nakasone, E.S., and Werb, Z. (2010). Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev Cell* 18, 884-901.
- Eichler, E.E. (2001). Segmental duplications: what's missing, misassigned, and misassembled--and should we care? *Genome Res* 11, 653-656.
- Eisterer, W., Jiang, X., Christ, O., Glimm, H., Lee, K.H., Pang, E., Lambie, K., Shaw, G., Holyoake, T.L., Petzer, A.L., et al. (2005). Different subsets of primary chronic myeloid leukemia stem cells engraft immunodeficient mice and produce a model of the human disease. *Leukemia* 19, 435-441.
- El-Naggar, A., and Huvos, M. (2005). Adenoid cystic carcinoma. In *Head and Neck Tumours*, L. Barnes, J.W. Eveson, P. Reichart, and D. Sidransky, eds. (Lyon, France, IARC Press).
- el-Naggar, A.K., Lovell, M., Callender, D.L., and Killary, A.M. (1999). Limited nonrandom chromosomal aberrations in a recurrent adenoid cystic carcinoma of the parotid gland. *Cancer Genet Cytogenet* 109, 66-69.
- El-Rifai, W., Rutherford, S., Knuutila, S., Frierson, H.F., Jr., and Moskaluk, C.A. (2001). Novel DNA copy number losses in chromosome 12q12--q13 in adenoid cystic carcinoma. *Neoplasia* 3, 173-178.

- Ellis, L.M., Takahashi, Y., Liu, W., and Shaheen, R.M. (2000). Vascular endothelial growth factor in human colon cancer: biology and therapeutic implications. *Oncologist* 5 Suppl 1, 11-15.
- Engelman, J.A., Zejnullahu, K., Mitsudomi, T., Song, Y., Hyland, C., Park, J.O., Lindeman, N., Gale, C.M., Zhao, X., Christensen, J., et al. (2007). MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 316, 1039-1043.
- Esteller, M. (2008). Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 358, 1148-1159.
- Evan, G., and Littlewood, T. (1998). A matter of life and cell death. *Science* 281, 1317-1322.
- Fang, S., and Salven, P. (2011). Stem cells in tumor angiogenesis. *J Mol Cell Cardiol* 50, 290-295.
- Farrell, P.J., Allan, G.J., Shanahan, F., Vousden, K.H., and Crook, T. (1991). p53 is frequently mutated in Burkitt's lymphoma cell lines. *EMBO J* 10, 2879-2887.
- Fedi, P., Tronick, S.R., and Aaronson, S.A. (1997). Growth factors. *Cancer Medicine*, 41-64.
- Fedurco, M., Romieu, A., Williams, S., Lawrence, I., and Turcatti, G. (2006). BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. *Nucleic Acids Res* 34, e22.
- Feinberg, A.P., Cui, H., and Ohlsson, R. (2002). DNA methylation and genomic imprinting: insights from cancer into epigenetic mechanisms. *Semin Cancer Biol* 12, 389-398.
- Feinberg, A.P., and Vogelstein, B. (1983). Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 301, 89-92.
- Ferguson, D.O., Sekiguchi, J.M., Chang, S., Frank, K.M., Gao, Y., DePinho, R.A., and Alt, F.W. (2000). The nonhomologous end-joining pathway of DNA repair is required for genomic stability and the suppression of translocations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6630-6633.
- Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., and Parkin, D.M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 127, 2893-2917.
- Ferrara, N. (2010). Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 21, 21-26.
- Ferrara, N. (2010). Role of myeloid cells in vascular endothelial growth factor-independent tumor angiogenesis. *Curr Opin Hematol* 17, 219-224.
- Ferrone, C., and Dranoff, G. (2010). Dual roles for immunity in gastrointestinal cancers. *J Clin Oncol* 28, 4045-4051.
- Ferry, J.A., and Scully, R.E. (1988). "Adenoid cystic" carcinoma and adenoid basal carcinoma of the uterine cervix. A study of 28 cases. *Am J Surg Pathol* 12, 134-144.
- Fidler, I.J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 3, 453-458.
- Fidler, I.J., Raz, A., Fogler, W.E., Hoyer, L.C., and Poste, G. (1981). The role of plasma membrane receptors and the kinetics of macrophage activation by lymphokines encapsulated in liposomes. *Cancer Res* 41, 495-504.
- Fiegler, H., Carr, P., Douglas, E.J., Burford, D.C., Hunt, S., Scott, C.E., Smith, J., Vetrie, D., Gorman, P., Tomlinson, I.P., et al. (2003a). DNA microarrays for comparative genomic hybridization based on DOP-PCR amplification of BAC and PAC clones. *Genes Chromosomes Cancer* 36, 361-374.

- Fiegler, H., Gribble, S.M., Burford, D.C., Carr, P., Prigmore, E., Porter, K.M., Clegg, S., Crolla, J.A., Dennis, N.R., Jacobs, P., et al. (2003b). Array painting: a method for the rapid analysis of aberrant chromosomes using DNA microarrays. *J Med Genet* 40, 664-670.
- Filmus, J. (2001). Glypicans in growth control and cancer. *Glycobiology* 11, 19R-23R.
- Finch, A., Prescott, J., Shchors, K., Hunt, A., Soucek, L., Dansen, T.B., Swigart, L.B., and Evan, G.I. (2006). Bcl-xL gain of function and p19 ARF loss of function cooperate oncogenically with Myc in vivo by distinct mechanisms. *Cancer Cell* 10, 113-120.
- Fischer, J., Palmedo, G., von Knobloch, R., Bugert, P., Prayer-Galetti, T., Pagano, F., and Kovacs, G. (1998). Duplication and overexpression of the mutant allele of the MET proto-oncogene in multiple hereditary papillary renal cell tumours. *Oncogene* 17, 733-739.
- Fisher, S.G., and Fisher, R.I. (2004). The epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma. *Oncogene* 23, 6524-6534.
- Fitzgibbon, J., Smith, L.L., Raghavan, M., Smith, M.L., Debernardi, S., Skoulakis, S., Lillington, D., Lister, T.A., and Young, B.D. (2005). Association between acquired uniparental disomy and homozygous gene mutation in acute myeloid leukemias. *Cancer Res* 65, 9152-9154.
- Fodde, R., and Smits, R. (2002). Cancer biology. A matter of dosage. *Science* 298, 761-763.
- Forman, J.J., and Coller, H.A. (2010). The code within the code: microRNAs target coding regions. *Cell Cycle* 9, 1533-1541.
- Fournier, A., McLeer-Florin, A., Lefebvre, C., Duley, S., Barki, L., Ribeyron, J., Alboukadel, K., Hamaidia, S., Granjon, A., Gressin, R., et al. (2010). 1q12 chromosome translocations form aberrant heterochromatic foci associated with changes in nuclear architecture and gene expression in B cell lymphoma. *EMBO Mol Med* 2, 159-171.
- Franco, S., Gostissa, M., Zha, S., Lombard, D.B., Murphy, M.M., Zarrin, A.A., Yan, C., Tepsuporn, S., Morales, J.C., Adams, M.M., et al. (2006). H2AX prevents DNA breaks from progressing to chromosome breaks and translocations. *Mol Cell* 21, 201-214.
- Franzen, G., Klausen, O.G., Grenko, R.T., Carstensen, J., and Nordenskjold, B. (1991). Adenoid cystic carcinoma: DNA as a prognostic indicator. *Laryngoscope* 101, 669-673.
- Freier, K., Flechtenmacher, C., Walch, A., Ohl, S., Devens, F., Burke, B., Hassfeld, S., Lichter, P., Joos, S., and Hofele, C. (2005). Copy number gains on 22q13 in adenoid cystic carcinoma of the salivary gland revealed by comparative genomic hybridization and tissue microarray analysis. *Cancer Genet Cytogenet* 159, 89-95.
- Fridlyand, J., Snijders, A.M., Ylstra, B., Li, H., Olshen, A., Segreaves, R., Dairkee, S., Tokuyasu, T., Ljung, B.M., Jain, A.N., et al. (2006). Breast tumor copy number aberration phenotypes and genomic instability. *BMC Cancer* 6, 96.
- Friedberg, E.C., Lehmann, A.R., and Fuchs, R.P. (2005). Trading places: how do DNA polymerases switch during translesion DNA synthesis? *Mol Cell* 18, 499-505.
- Friedl, P., and Wolf, K. (2010). Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol* 188, 11-19.
- Friedrich, R.E., and Bleckmann, V. (2003). Adenoid cystic carcinoma of salivary and lacrimal gland origin: localization, classification, clinical pathological correlation, treatment results and long-term follow-up control in 84 patients. *Anticancer Res* 23, 931-940.

- Frierson, H.F., Jr., El-Naggar, A.K., Welsh, J.B., Sapinoso, L.M., Su, A.I., Cheng, J., Saku, T., Moskaluk, C.A., and Hampton, G.M. (2002). Large scale molecular analysis identifies genes with altered expression in salivary adenoid cystic carcinoma. *Am J Pathol* 161, 1315-1323.
- Frohling, S., and Dohner, H. (2008). Chromosomal abnormalities in cancer. *N Engl J Med* 359, 722-734.
- Frost, M., Newell, J., Lones, M.A., Tripp, S.R., Cairo, M.S., and Perkins, S.L. (2004). Comparative immunohistochemical analysis of pediatric Burkitt lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Clin Pathol* 121, 384-392.
- Fugazzola, L., Pilotti, S., Pinchera, A., Vorontsova, T.V., Mondellini, P., Bongarzone, I., Greco, A., Astakhova, L., Butti, M.G., Demidchik, E.P., et al. (1995). Oncogenic rearrangements of the RET proto-oncogene in papillary thyroid carcinomas from children exposed to the Chernobyl nuclear accident. *Cancer Res* 55, 5617-5620.
- Fujiwara, H., Emi, M., Nagai, H., Ohgaki, K., Imoto, I., Akimoto, M., Ogawa, O., and Habuchi, T. (2001). Definition of a 1-Mb homozygous deletion at 9q32-q33 in a human bladder-cancer cell line. *J Hum Genet* 46, 372-377.
- Fusco, A., Grieco, M., Santoro, M., Berlingieri, M.T., Pilotti, S., Pierotti, M.A., Della Porta, G., and Vecchio, G. (1987). A new oncogene in human thyroid papillary carcinomas and their lymph-nodal metastases. *Nature* 328, 170-172.
- Futreal, P.A., Coin, L., Marshall, M., Down, T., Hubbard, T., Wooster, R., Rahman, N., and Stratton, M.R. (2004). A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer* 4, 177-183.
- Gaidano, G., Ballerini, P., Gong, J.Z., Inghirami, G., Neri, A., Newcomb, E.W., Magrath, I.T., Knowles, D.M., and Dalla-Favera, R. (1991). p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5413-5417.
- Gaidano, G., Hauptschein, R.S., Parsa, N.Z., Offit, K., Rao, P.H., Lenoir, G., Knowles, D.M., Chaganti, R.S., and Dalla-Favera, R. (1992). Deletions involving two distinct regions of 6q in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 80, 1781-1787.
- Gall, J.G., and Pardue, M.L. (1969). Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 63, 378-383.
- Garcia, J.L., Hernandez, J.M., Gutierrez, N.C., Flores, T., Gonzalez, D., Calasanz, M.J., Martinez-Climent, J.A., Piris, M.A., Lopez-Capitan, C., Gonzalez, M.B., et al. (2003). Abnormalities on 1q and 7q are associated with poor outcome in sporadic Burkitt's lymphoma. A cytogenetic and comparative genomic hybridization study. *Leukemia* 17, 2016-2024.
- Garnis, C., Coe, B.P., Lam, S.L., MacAulay, C., and Lam, W.L. (2005). High-resolution array CGH increases heterogeneity tolerance in the analysis of clinical samples. *Genomics* 85, 790-793.
- Garraway, L.A., Widlund, H.R., Rubin, M.A., Getz, G., Berger, A.J., Ramaswamy, S., Beroukhi, R., Milner, D.A., Granter, S.R., Du, J., et al. (2005). Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* 436, 117-122.
- Garzon, R., Calin, G.A., and Croce, C.M. (2009). MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Med* 60, 167-179.
- Gauci, C.L., and Alexander, P. (1975). The macrophage content of some human tumours. *Cancer Lett* 1, 29-32.
- Gazdar, A.F. (2009). Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene* 28 Suppl 1, S24-31.

- Gazdar, A.F., Shigematsu, H., Herz, J., and Minna, J.D. (2004). Mutations and addiction to EGFR: the Achilles 'heal' of lung cancers? *Trends Mol Med* 10, 481-486.
- Gellert, M. (2002). V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. *Annu Rev Biochem* 71, 101-132.
- Gerber, D.E., and Minna, J.D. (2010). ALK inhibition for non-small cell lung cancer: from discovery to therapy in record time. *Cancer Cell* 18, 548-551.
- Gerhardt, H., and Semb, H. (2008). Pericytes: gatekeepers in tumour cell metastasis? *J Mol Med (Berl)* 86, 135-144.
- Giampieri, S., Manning, C., Hooper, S., Jones, L., Hill, C.S., and Sahai, E. (2009). Localized and reversible TGFbeta signalling switches breast cancer cells from cohesive to single cell motility. *Nat Cell Biol* 11, 1287-1296.
- Goardon, N., Marchi, E., Atzberger, A., Quek, L., Schuh, A., Soneji, S., Woll, P., Mead, A., Alford, K.A., Rout, R., et al. (2011). Coexistence of LMPP-like and GMP-like leukemia stem cells in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 19, 138-152.
- Gocheva, V., Wang, H.W., Gadea, B.B., Shree, T., Hunter, K.E., Garfall, A.L., Berman, T., and Joyce, J.A. (2010). IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. *Genes Dev* 24, 241-255.
- Goldman, J.M., and Melo, J.V. (2003). Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med* 349, 1451-1464.
- Goll, M.G., and Bestor, T.H. (2005). Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem* 74, 481-514.
- Gondivkar, S.M., Gadbail, A.R., Chole, R., and Parikh, R.V. (2011). Adenoid cystic carcinoma: a rare clinical entity and literature review. *Oral Oncol* 47, 231-236.
- Gonzalez-Zulueta, M., Bender, C.M., Yang, A.S., Nguyen, T., Beart, R.W., Van Tornout, J.M., and Jones, P.A. (1995). Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. *Cancer Res* 55, 4531-4535.
- Gostissa, M., Alt, F.W., and Chiarle, R. (2011). Mechanisms that promote and suppress chromosomal translocations in lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 29, 319-350.
- Goymer, P. (2008). Natural selection: The evolution of cancer. *Nature* 454, 1046-1048.
- Grasemann, C., Gratias, S., Stephan, H., Schuler, A., Schramm, A., Klein-Hitpass, L., Rieder, H., Schneider, S., Kappes, F., Eggert, A., et al. (2005). Gains and overexpression identify DEK and E2F3 as targets of chromosome 6p gains in retinoblastoma. *Oncogene* 24, 6441-6449.
- Graux, C., Cools, J., Melotte, C., Quentmeier, H., Ferrando, A., Levine, R., Vermeesch, J.R., Stul, M., Dutta, B., Boeckx, N., et al. (2004). Fusion of NUP214 to ABL1 on amplified episomes in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 36, 1084-1089.
- Greaves, M.F., and Wiemels, J. (2003). Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer* 3, 639-649.
- Green, D.R., and Kroemer, G. (2009). Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* 458, 1127-1130.

- Greenaway, J., Lawler, J., Moorehead, R., Bornstein, P., Lamarre, J., and Petrik, J. (2007). Thrombospondin-1 inhibits VEGF levels in the ovary directly by binding and internalization via the low density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1). *J Cell Physiol* 210, 807-818.
- Greenman, C., Stephens, P., Smith, R., Dalgliesh, G.L., Hunter, C., Bignell, G., Davies, H., Teague, J., Butler, A., Stevens, C., et al. (2007). Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* 446, 153-158.
- Greger, V., Passarge, E., Hopping, W., Messmer, E., and Horsthemke, B. (1989). Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Hum Genet* 83, 155-158.
- Gregory, P.A., Bracken, C.P., Bert, A.G., and Goodall, G.J. (2008). MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition. *Cell Cycle* 7, 3112-3118.
- Greiner, T.C., Robinson, R.A., and Maves, M.D. (1989). Adenoid cystic carcinoma. A clinicopathologic study with flow cytometric analysis. *Am J Clin Pathol* 92, 711-720.
- Gribble, S.M., Fiegler, H., Burford, D.C., Prigmore, E., Yang, F., Carr, P., Ng, B.L., Sun, T., Kamberov, E.S., Makarov, V.L., et al. (2004). Applications of combined DNA microarray and chromosome sorting technologies. *Chromosome Res* 12, 35-43.
- Grieco, M., Santoro, M., Berlingieri, M.T., Melillo, R.M., Donghi, R., Bongarzone, I., Pierotti, M.A., Della Porta, G., Fusco, A., and Vecchio, G. (1990). PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. *Cell* 60, 557-563.
- Griffith, J.D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R.M., Bianchi, A., Moss, H., and de Lange, T. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97, 503-514.
- Griffiths-Jones, S., Saini, H.K., van Dongen, S., and Enright, A.J. (2008). miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res* 36, D154-158.
- Grivennikov, S.I., Greten, F.R., and Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140, 883-899.
- Guan, X.Y., Meltzer, P.S., Cao, J., and Trent, J.M. (1992). Rapid generation of region-specific genomic clones by chromosome microdissection: isolation of DNA from a region frequently deleted in malignant melanoma. *Genomics* 14, 680-684.
- Gurel, B., Iwata, T., Koh, C.M., Jenkins, R.B., Lan, F., Van Dang, C., Hicks, J.L., Morgan, J., Cornish, T.C., Sutcliffe, S., et al. (2008). Nuclear MYC protein overexpression is an early alteration in human prostate carcinogenesis. *Mod Pathol* 21, 1156-1167.
- Gutierrez, M.I., Bhatia, K., Barriga, F., Diez, B., Muriel, F.S., de Andreas, M.L., Epelman, S., Risueno, C., and Magrath, I.T. (1992). Molecular epidemiology of Burkitt's lymphoma from South America: differences in breakpoint location and Epstein-Barr virus association from tumors in other world regions. *Blood* 79, 3261-3266.
- Haber, D.A., and Settleman, J. (2007). Cancer: drivers and passengers. *Nature* 446, 145-146.
- Hadoux, J., Besse, B., and Planchard, D. (2011). [Lung cancer in never smoker: Epidemiology, molecular profiles and treatment]. *Presse Med* 40, 371-378.
- Haering, C.H., Farcas, A.M., Arumugam, P., Metson, J., and Nasmyth, K. (2008). The cohesin ring concatenates sister DNA molecules. *Nature* 454, 297-301.

- Hagemann, T., Robinson, S.C., Schulz, M., Trumper, L., Balkwill, F.R., and Binder, C. (2004). Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF-alpha dependent up-regulation of matrix metalloproteases. *Carcinogenesis* 25, 1543-1549.
- Hanahan, D., and Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86, 353-364.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
- Handra-Luca, A., Planchard, D., and Fouret, P. (2009). Docetaxel-cisplatin-radiotherapy in adenoid cystic carcinoma with high-grade transformation. *Oral Oncol* 45, e208-209.
- Hanks, S., and Rahman, N. (2005). Aneuploidy-cancer predisposition syndromes: a new link between the mitotic spindle checkpoint and cancer. *Cell Cycle* 4, 225-227.
- Hansel, D.E., Meeker, A.K., Hicks, J., De Marzo, A.M., Lillemo, K.D., Schulick, R., Hruban, R.H., Maitra, A., and Argani, P. (2006). Telomere length variation in biliary tract metaplasia, dysplasia, and carcinoma. *Mod Pathol* 19, 772-779.
- Harbour, J.W., and Dean, D.C. (2000). The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev* 14, 2393-2409.
- Harbour, J.W., Luo, R.X., Dei Santi, A., Postigo, A.A., and Dean, D.C. (1999). Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell* 98, 859-869.
- Hardy, R.R., Carmack, C.E., Shinton, S.A., Kemp, J.D., and Hayakawa, K. (1991). Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J Exp Med* 173, 1213-1225.
- Hardy, R.R., Kincade, P.W., and Dorshkind, K. (2007). The protean nature of cells in the B lymphocyte lineage. *Immunity* 26, 703-714.
- Harper, M.E., Barrera-Saldana, H.A., and Saunders, G.F. (1982). Chromosomal localization of the human placental lactogen-growth hormone gene cluster to 17q22-24. *Am J Hum Genet* 34, 227-234.
- Harris, N.L., Jaffe, E.S., Stein, H., Banks, P.M., Chan, J.K., Cleary, M.L., Delsol, G., De Wolf-Peeters, C., Falini, B., Gatter, K.C., et al. (1994). A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 84, 1361-1392.
- Havelange, V., and Garzon, R. (2010). MicroRNAs: emerging key regulators of hematopoiesis. *Am J Hematol* 85, 935-942.
- Hayflick, L., and Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25, 585-621.
- Hazan, R.B., Phillips, G.R., Qiao, R.F., Norton, L., and Aaronson, S.A. (2000). Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol* 148, 779-790.
- He, C., and Klionsky, D.J. (2009). Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* 43, 67-93.
- He, J., Wu, J., Jiao, Y., Wagner-Johnston, N., Ambinder, R.F., Diaz, L.A., Jr., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Papadopoulos, N. (2011). IgH gene rearrangements as plasma biomarkers in Non-Hodgkin's lymphoma patients. *Oncotarget* 2, 178-185.

- He, L., Thomson, J.M., Hemann, M.T., Hernando-Monge, E., Mu, D., Goodson, S., Powers, S., Cordon-Cardo, C., Lowe, S.W., Hannon, G.J., et al. (2005). A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 435, 828-833.
- He, Y., Wu, J., Dressman, D.C., Iacobuzio-Donahue, C., Markowitz, S.D., Velculescu, V.E., Diaz, L.A., Jr., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Papadopoulos, N. (2010). Heteroplasmic mitochondrial DNA mutations in normal and tumour cells. *Nature* 464, 610-614.
- Hecht, J.L., and Aster, J.C. (2000). Molecular biology of Burkitt's lymphoma. *J Clin Oncol* 18, 3707-3721.
- Heerema, N.A., Bernheim, A., Lim, M.S., Look, A.T., Pasqualucci, L., Raetz, E., Sanger, W.G., and Cairo, M.S. (2005). State of the Art and Future Needs in Cytogenetic/Molecular Genetics/Arrays in childhood lymphoma: summary report of workshop at the First International Symposium on childhood and adolescent non-Hodgkin lymphoma, April 9, 2003, New York City, NY. *Pediatr Blood Cancer* 45, 616-622.
- Henderson, L.J., Okamoto, I., Lestou, V.S., Ludkovski, O., Robichaud, M., Chhanabhai, M., Gascoyne, R.D., Klasa, R.J., Connors, J.M., Marra, M.A., et al. (2004). Delineation of a minimal region of deletion at 6q16.3 in follicular lymphoma and construction of a bacterial artificial chromosome contig spanning a 6-megabase region of 6q16-q21. *Genes Chromosomes Cancer* 40, 60-65.
- Herbst, R.S., Heymach, J.V., and Lippman, S.M. (2008). Lung cancer. *N Engl J Med* 359, 1367-1380.
- Herman, J.G., and Baylin, S.B. (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 349, 2042-2054.
- Herzog, F., Primorac, I., Dube, P., Lenart, P., Sander, B., Mechtler, K., Stark, H., and Peters, J.M. (2009). Structure of the anaphase-promoting complex/cyclosome interacting with a mitotic checkpoint complex. *Science* 323, 1477-1481.
- Hess, J.L. (2004). MLL: a histone methyltransferase disrupted in leukemia. *Trends Mol Med* 10, 500-507.
- Higashi, K., Jin, Y., Johansson, M., Heim, S., Mandahl, N., Biorklund, A., Wennerberg, J., Hambreus, G., Johansson, L., and Mitelman, F. (1991). Rearrangement of 9p13 as the primary chromosomal aberration in adenoid cystic carcinoma of the respiratory tract. *Genes Chromosomes Cancer* 3, 21-23.
- Hinds, P.W., and Weinberg, R.A. (1994). Tumor suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev* 4, 135-141.
- Hirokawa, N., Noda, Y., Tanaka, Y., and Niwa, S. (2009). Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 682-696.
- Hofman, P., Ilie, M., Hofman, V., Roux, S., Valent, A., Bernheim, A., Alifano, M., Leroy-Ladurie, F., Vaylet, F., Rouquette, I., et al. (2011). Immunohistochemistry to identify EGFR mutations or ALK rearrangements in patients with lung adenocarcinoma. *Ann Oncol*.
- Holbro, T., and Hynes, N.E. (2004). ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44, 195-217.
- Holliday, R. (1987). The inheritance of epigenetic defects. *Science* 238, 163-170.
- Hruban, R.H., Goggins, M., Parsons, J., and Kern, S.E. (2000). Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 6, 2969-2972.
- Hrynchak, M., Horsman, D., Salski, C., Berean, K., and Benedet, J.L. (1994). Complex karyotypic alterations in an endometrial stromal sarcoma. *Cancer Genet Cytogenet* 77, 45-49.

- Hsiung, C.A., Lan, Q., Hong, Y.C., Chen, C.J., Hosgood, H.D., Chang, I.S., Chatterjee, N., Brennan, P., Wu, C., Zheng, W., et al. (2010). The 5p15.33 locus is associated with risk of lung adenocarcinoma in never-smoking females in Asia. *PLoS Genet* 6.
- Hsu, P.P., and Sabatini, D.M. (2008). Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* 134, 703-707.
- Hu, B.T., Lee, S.C., Marin, E., Ryan, D.H., and Insel, R.A. (1997). Telomerase is up-regulated in human germinal center B cells in vivo and can be re-expressed in memory B cells activated in vitro. *J Immunol* 159, 1068-1071.
- Huang, H., Qian, C., Jenkins, R.B., and Smith, D.I. (1998). Fish mapping of YAC clones at human chromosomal band 7q31.2: identification of YACS spanning FRA7G within the common region of LOH in breast and prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 21, 152-159.
- Huang, M., Ma, D., Sun, K., Yu, G., Guo, C., and Gao, F. (1997). Factors influencing survival rate in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *Int J Oral Maxillofac Surg* 26, 435-439.
- Huang, S., Jean, D., Luca, M., Tainsky, M.A., and Bar-Eli, M. (1998). Loss of AP-2 results in downregulation of c-KIT and enhancement of melanoma tumorigenicity and metastasis. *EMBO J* 17, 4358-4369.
- Hung, R.J., McKay, J.D., Gaborieau, V., Boffetta, P., Hashibe, M., Zaridze, D., Mukeria, A., Szeszenia-Dabrowska, N., Lissowska, J., Rudnai, P., et al. (2008). A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25. *Nature* 452, 633-637.
- Huret, J.L. (2010). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* .
- Igarashi, H., Gregory, S.C., Yokota, T., Sakaguchi, N., and Kincade, P.W. (2002). Transcription from the RAG1 locus marks the earliest lymphocyte progenitors in bone marrow. *Immunity* 17, 117-130.
- Imamura, J., Miyoshi, I., and Koeffler, H.P. (1994). p53 in hematologic malignancies. *Blood* 84, 2412-2421.
- Inamura, K., Takeuchi, K., Togashi, Y., Hatano, S., Ninomiya, H., Motoi, N., Mun, M.Y., Sakao, Y., Okumura, S., Nakagawa, K., et al. (2009). EML4-ALK lung cancers are characterized by rare other mutations, a TTF-1 cell lineage, an acinar histology, and young onset. *Mod Pathol* 22, 508-515.
- Irsch, J., Irlenbusch, S., Radl, J., Burrows, P.D., Cooper, M.D., and Radbruch, A.H. (1994). Switch recombination in normal IgA1+ B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1323-1327.
- Ishkanian, A.S., Malloff, C.A., Watson, S.K., DeLeeuw, R.J., Chi, B., Coe, B.P., Snijders, A., Albertson, D.G., Pinkel, D., Marra, M.A., et al. (2004). A tiling resolution DNA microarray with complete coverage of the human genome. *Nat Genet* 36, 299-303.
- Jacobs, J.J., Scheijen, B., Voncken, J.W., Kieboom, K., Berns, A., and van Lohuizen, M. (1999). Bmi-1 collaborates with c-Myc in tumorigenesis by inhibiting c-Myc-induced apoptosis via INK4a/ARF. *Genes Dev* 13, 2678-2690.
- Jaffe, E., Harris, N., Stein, H., Campo, E., Pileri, S., and Swerdlow, S. (2008). Introduction and overview of the classification of the lymphoid neoplasms. In *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues* (ed 4th), C.E. Swerdlow SH, Harris NL, et al, ed. (Lyon France, IARC Press).
- Jaffe, E.S. (2009). The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 523-531.
- Janku, F., Stewart, D.J., and Kurzrock, R. (2010). Targeted therapy in non-small-cell lung cancer--is it becoming a reality? *Nat Rev Clin Oncol* 7, 401-414.

- Janz, S., Potter, M., and Rabkin, C.S. (2003). Lymphoma- and leukemia-associated chromosomal translocations in healthy individuals. *Genes Chromosomes Cancer* 36, 211-223.
- Jen, J., Powell, S.M., Papadopoulos, N., Smith, K.J., Hamilton, S.R., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1994). Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions. *Cancer Res* 54, 5523-5526.
- Jenuwein, T., and Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074-1080.
- Jhiang, S.M. (2000). The RET proto-oncogene in human cancers. *Oncogene* 19, 5590-5597.
- Ji, H., Ramsey, M.R., Hayes, D.N., Fan, C., McNamara, K., Kozlowski, P., Torrice, C., Wu, M.C., Shimamura, T., Perera, S.A., et al. (2007). LKB1 modulates lung cancer differentiation and metastasis. *Nature* 448, 807-810.
- Jiang, B.H., and Liu, L.Z. (2009). PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Adv Cancer Res* 102, 19-65.
- Jimenez, B., Volpert, O.V., Crawford, S.E., Febbraio, M., Silverstein, R.L., and Bouck, N. (2000). Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nat Med* 6, 41-48.
- Jin, C., Martins, C., Jin, Y., Wiegant, J., Wennerberg, J., Dictor, M., Gisselsson, D., Strombeck, B., Fonseca, I., Mitelman, F., et al. (2001). Characterization of chromosome aberrations in salivary gland tumors by FISH, including multicolor COBRA-FISH. *Genes Chromosomes Cancer* 30, 161-167.
- Jin, Y., Mertens, F., Limon, J., Mandahl, N., Wennerberg, J., Dictor, M., Heim, S., and Mitelman, F. (1994). Characteristic karyotypic features in lacrimal and salivary gland carcinomas. *Br J Cancer* 70, 42-47.
- Job, B., Bernheim, A., Beau-Faller, M., Camilleri-Broet, S., Girard, P., Hofman, P., Mazieres, J., Toujani, S., Lacroix, L., Laffaire, J., et al. (2010). Genomic aberrations in lung adenocarcinoma in never smokers. *PLoS One* 5, e15145.
- Johns, M.M., 3rd, Westra, W.H., Califano, J.A., Eisele, D., Koch, W.M., and Sidransky, D. (1996). Allelotype of salivary gland tumors. *Cancer Res* 56, 1151-1154.
- Johnson, S.M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., Labourier, E., Reinert, K.L., Brown, D., and Slack, F.J. (2005). RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 120, 635-647.
- Jones, R.G., and Thompson, C.B. (2009). Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev* 23, 537-548.
- Joos, S., Falk, M.H., Lichter, P., Haluska, F.G., Henglein, B., Lenoir, G.M., and Bornkamm, G.W. (1992). Variable breakpoints in Burkitt lymphoma cells with chromosomal t(8;14) translocation separate c-myc and the IgH locus up to several hundred kb. *Hum Mol Genet* 1, 625-632.
- Joos, S., Haluska, F.G., Falk, M.H., Henglein, B., Hameister, H., Croce, C.M., and Bornkamm, G.W. (1992). Mapping chromosomal breakpoints of Burkitt's t(8;14) translocations far upstream of c-myc. *Cancer Res* 52, 6547-6552.
- Joyce, J.A., and Pollard, J.W. (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 9, 239-252.
- Ju, Y.S., Lee, W.C., Shin, J.Y., Lee, S., Bleazard, T., Won, J.K., Kim, Y.T., Kim, J.I., Kang, J.H., and Seo, J.S. (2012). A transforming KIF5B and RET gene fusion in lung adenocarcinoma revealed from whole-genome and transcriptome sequencing. *Genome Res* 22, 436-445.
- Junttila, M.R., and Evan, G.I. (2009). p53--a Jack of all trades but master of none. *Nat Rev Cancer* 9, 821-829.

- Kalas, W., Yu, J.L., Milsom, C., Rosenfeld, J., Benezra, R., Bornstein, P., and Rak, J. (2005). Oncogenes and Angiogenesis: down-regulation of thrombospondin-1 in normal fibroblasts exposed to factors from cancer cells harboring mutant ras. *Cancer Res* 65, 8878-8886.
- Kallioniemi, A., Kallioniemi, O.P., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J.W., Waldman, F., and Pinkel, D. (1992). Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258, 818-821.
- Kalluri, R., and Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 392-401.
- Karpova, M.B., Schoumans, J., Blennow, E., Ernberg, I., Henter, J.I., Smirnov, A.F., Nordenskjold, M., and Fadeel, B. (2006). Combined spectral karyotyping, comparative genomic hybridization, and in vitro apoptotyping of a panel of Burkitt's lymphoma-derived B cell lines reveals an unexpected complexity of chromosomal aberrations and a recurrence of specific abnormalities in chemoresistant cell lines. *Int J Oncol* 28, 605-617.
- Kasamatsu, A., Endo, Y., Uzawa, K., Nakashima, D., Koike, H., Hashitani, S., Numata, T., Urade, M., and Tanzawa, H. (2005). Identification of candidate genes associated with salivary adenoid cystic carcinomas using combined comparative genomic hybridization and oligonucleotide microarray analyses. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 1869-1880.
- Katayama, H., Brinkley, W.R., and Sen, S. (2003). The Aurora kinases: role in cell transformation and tumorigenesis. *Cancer Metastasis Rev* 22, 451-464.
- Kawai, T., Hiroi, S., Nakanishi, K., and Meeker, A.K. (2007). Telomere length and telomerase expression in atypical adenomatous hyperplasia and small bronchioloalveolar carcinoma of the lung. *Am J Clin Pathol* 127, 254-262.
- Kennedy, G.C., Matsuzaki, H., Dong, S., Liu, W.M., Huang, J., Liu, G., Su, X., Cao, M., Chen, W., Zhang, J., et al. (2003). Large-scale genotyping of complex DNA. *Nat Biotechnol* 21, 1233-1237.
- Kennedy, R.D., and D'Andrea, A.D. (2006). DNA repair pathways in clinical practice: lessons from pediatric cancer susceptibility syndromes. *J Clin Oncol* 24, 3799-3808.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.
- Kessenbrock, K., Plaks, V., and Werb, Z. (2010). Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 141, 52-67.
- Kim, J.B., Porreca, G.J., Song, L., Greenway, S.C., Gorham, J.M., Church, G.M., Seidman, C.E., and Seidman, J.G. (2007). Polony multiplex analysis of gene expression (PMAGE) in mouse hypertrophic cardiomyopathy. *Science* 316, 1481-1484.
- Kim, M., Gans, J.D., Nogueira, C., Wang, A., Paik, J.H., Feng, B., Brennan, C., Hahn, W.C., Cordon-Cardo, C., Wagner, S.N., et al. (2006). Comparative oncogenomics identifies NEDD9 as a melanoma metastasis gene. *Cell* 125, 1269-1281.
- Kim, R., Emi, M., and Tanabe, K. (2007). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 121, 1-14.
- Kim, S.I., and Bresnick, E.H. (2007). Transcriptional control of erythropoiesis: emerging mechanisms and principles. *Oncogene* 26, 6777-6794.

- Kim, S.Y., and Hahn, W.C. (2007). Cancer genomics: integrating form and function. *Carcinogenesis* 28, 1387-1392.
- Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1998). Landscaping the cancer terrain. *Science* 280, 1036-1037.
- Kitada, H., Yamaguchi, K., Takashima, M., and Tanaka, M. (1997). Adenoid cystic carcinoma of the esophagus: report of a case. *Surg Today* 27, 238-242.
- Klapproth, K., and Wirth, T. (2010). Advances in the understanding of MYC-induced lymphomagenesis. *Br J Haematol* 149, 484-497.
- Klein, U., Lia, M., Crespo, M., Siegel, R., Shen, Q., Mo, T., Ambesi-Impiombato, A., Califano, A., Migliazza, A., Bhagat, G., et al. (2010). The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* 17, 28-40.
- Klein, U., Tu, Y., Stolovitzky, G.A., Keller, J.L., Haddad, J., Jr., Miljkovic, V., Cattoretti, G., Califano, A., and Dalla-Favera, R. (2003). Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2639-2644.
- Klose, R.J., and Zhang, Y. (2007). Regulation of histone methylation by demethylination and demethylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 307-318.
- Knowles, D.M., Chamulak, G.A., Subar, M., Burke, J.S., Dugan, M., Wernz, J., Slywotzky, C., Pelicci, G., Dalla-Favera, R., and Raphael, B. (1988). Lymphoid neoplasia associated with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). The New York University Medical Center experience with 105 patients (1981-1986). *Ann Intern Med* 108, 744-753.
- Knudson, A.G. (2001). Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer* 1, 157-162.
- Knudson, A.G. (2002). Cancer genetics. *Am J Med Genet* 111, 96-102.
- Koh, Y., Kim, D.Y., Park, S.H., Jung, S.H., Park, E., Kim, H.J., Sohn, S.K., Joo, Y.D., Kim, S.J., Shin, H.J., et al. (2010). GSTT1 copy number gain is a poor predictive marker for escalated-dose imatinib treatment in chronic myeloid leukemia: genetic predictive marker found using array comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 203, 215-221.
- Kohno, T., Ichikawa, H., Totoki, Y., Yasuda, K., Hiramoto, M., Nammo, T., Sakamoto, H., Tsuta, K., Furuta, K., Shimada, Y., et al. (2012). KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. *Nat Med* 18, 375-377.
- Koike, T., Togashi, K., Shirato, T., Sato, S., Hirahara, H., Sugawara, M., Oguma, F., Usuda, H., and Emura, I. (2009). Limited resection for noninvasive bronchioloalveolar carcinoma diagnosed by intraoperative pathologic examination. *Ann Thorac Surg* 88, 1106-1111.
- Kokemueller, H., Eckardt, A., Brachvogel, P., and Hausamen, J.E. (2004). Adenoid cystic carcinoma of the head and neck--a 20 years experience. *Int J Oral Maxillofac Surg* 33, 25-31.
- Komarova, N.L., Sengupta, A., and Nowak, M.A. (2003). Mutation-selection networks of cancer initiation: tumor suppressor genes and chromosomal instability. *J Theor Biol* 223, 433-450.
- Kondo, M. (2010). Lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Immunol Rev* 238, 37-46.
- Koralov, S.B., Muljo, S.A., Galler, G.R., Krek, A., Chakraborty, T., Kanellopoulou, C., Jensen, K., Cobb, B.S., Merkenschlager, M., Rajewsky, N., et al. (2008). Dicer ablation affects antibody diversity and cell survival in the B lymphocyte lineage. *Cell* 132, 860-874.

- Kornblau, S.M., Goodacre, A., and Cabanillas, F. (1991). Chromosomal abnormalities in adult non-endemic Burkitt's lymphoma and leukemia: 22 new reports and a review of 148 cases from the literature. *Hematol Oncol* 9, 63-78.
- Kosaka, T., Yatabe, Y., Endoh, H., Kuwano, H., Takahashi, T., and Mitsudomi, T. (2004). Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications. *Cancer Res* 64, 8919-8923.
- Kotake, Y., Nakagawa, T., Kitagawa, K., Suzuki, S., Liu, N., Kitagawa, M., and Xiong, Y. (2011). Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15(INK4B) tumor suppressor gene. *Oncogene* 30, 1956-1962.
- Kovalchuk, A.L., Qi, C.F., Torrey, T.A., Taddesse-Heath, L., Feigenbaum, L., Park, S.S., Gerbitz, A., Klobeck, G., Hoertnagel, K., Polack, A., et al. (2000). Burkitt lymphoma in the mouse. *J Exp Med* 192, 1183-1190.
- Krivtsov, A.V., and Armstrong, S.A. (2007). MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer* 7, 823-833.
- Kroemer, G., and Pouyssegur, J. (2008). Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell* 13, 472-482.
- Kroenlein, H., Schwartz, S., Reinhardt, R., Rieder, H., Molkentin, M., Gokbuget, N., Hoelzer, D., Thiel, E., and Burmeister, T. (2012). Molecular analysis of the t(2;8)/MYC-IGK translocation in high-grade lymphoma/leukemia by long-distance inverse PCR. *Genes Chromosomes Cancer* 51, 290-299.
- Krontiris, T.G., and Cooper, G.M. (1981). Transforming activity of human tumor DNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 1181-1184.
- Kunkel, T.A., and Bebenek, K. (2000). DNA replication fidelity. *Annu Rev Biochem* 69, 497-529.
- Kunz, C., Saito, Y., and Schar, P. (2009). DNA Repair in mammalian cells: Mismatched repair: variations on a theme. *Cell Mol Life Sci* 66, 1021-1038.
- Kuppers, R. (2005). Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 5, 251-262.
- Kuppers, R., and Dalla-Favera, R. (2001). Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene* 20, 5580-5594.
- Kuppers, R., Klein, U., Hansmann, M.L., and Rajewsky, K. (1999). Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 341, 1520-1529.
- Kuwahara, Y., Tanabe, C., Ikeuchi, T., Aoyagi, K., Nishigaki, M., Sakamoto, H., Hoshinaga, K., Yoshida, T., Sasaki, H., and Terada, M. (2004). Alternative mechanisms of gene amplification in human cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 41, 125-132.
- Kwak, E.L., Bang, Y.J., Camidge, D.R., Shaw, A.T., Solomon, B., Maki, R.G., Ou, S.H., Dezube, B.J., Janne, P.A., Costa, D.B., et al. (2010). Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 363, 1693-1703.
- LaFramboise, T. (2009). Single nucleotide polymorphism arrays: a decade of biological, computational and technological advances. *Nucleic Acids Res* 37, 4181-4193.
- Lamagna, C., and Bergers, G. (2006). The bone marrow constitutes a reservoir of pericyte progenitors. *J Leukoc Biol* 80, 677-681.

- Landegent, J.E., Jansen in de Wal, N., Dirks, R.W., Baao, F., and van der Ploeg, M. (1987). Use of whole cosmid cloned genomic sequences for chromosomal localization by non-radioactive in situ hybridization. *Hum Genet* 77, 366-370.
- Langer, P.R., Waldrop, A.A., and Ward, D.C. (1981). Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 6633-6637.
- Laster, S.M., Wood, J.G., and Gooding, L.R. (1988). Tumor necrosis factor can induce both apoptic and necrotic forms of cell lysis. *J Immunol* 141, 2629-2634.
- Lau, S.K., Luthringer, D.J., and Eisen, R.N. (2002). Thyroid transcription factor-1: a review. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 10, 97-102.
- Le Calvez, F., Mukeria, A., Hunt, J.D., Kelm, O., Hung, R.J., Taniere, P., Brennan, P., Boffetta, P., Zaridze, D.G., and Hainaut, P. (2005). TP53 and KRAS mutation load and types in lung cancers in relation to tobacco smoke: distinct patterns in never, former, and current smokers. *Cancer Res* 65, 5076-5083.
- le Viseur, C., Hotfilder, M., Bomken, S., Wilson, K., Rottgers, S., Schrauder, A., Rosemann, A., Irving, J., Stam, R.W., Shultz, L.D., et al. (2008). In childhood acute lymphoblastic leukemia, blasts at different stages of immunophenotypic maturation have stem cell properties. *Cancer Cell* 14, 47-58.
- Leach, F.S., Nicolaides, N.C., Papadopoulos, N., Liu, B., Jen, J., Parsons, R., Peltomaki, P., Sistonen, P., Aaltonen, L.A., Nystrom-Lahti, M., et al. (1993). Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 75, 1215-1225.
- Leamon, J.H., Lee, W.L., Tartaro, K.R., Lanza, J.R., Sarkis, G.J., deWinter, A.D., Berka, J., Weiner, M., Rothberg, J.M., and Lohman, K.L. (2003). A massively parallel PicoTiterPlate based platform for discrete picoliter-scale polymerase chain reactions. *Electrophoresis* 24, 3769-3777.
- Leask, A., Byrne, C., and Fuchs, E. (1991). Transcription factor AP2 and its role in epidermal-specific gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7948-7952.
- Lee, E.J., Baek, M., Gusev, Y., Brackett, D.J., Nuovo, G.J., and Schmittgen, T.D. (2008). Systematic evaluation of microRNA processing patterns in tissues, cell lines, and tumors. *RNA* 14, 35-42.
- Lejeune, J., Berger, R., Haines, M., Lafourcade, J., VIALATTE, J., Satge, P., and Turpin., R. (1993). Constitution d'un clone à 54 chromosomes au cours d'une leucoblastose congénitale chez une enfant mongolienne. *CRAS* 256, 1195-1197.
- Lengauer, C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1997). Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 386, 623-627.
- Lengauer, C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643-649.
- Lenoir, G., Preud'homme, J.L., Bernheim, A., and Berger, R. (1981). [Correlation between variant translocation and the expression of immunoglobulin light chains in Burkitt-type lymphomas and leukemias]. *C R Seances Acad Sci III* 293, 427-429.
- Lenoir, G.M., Preud'homme, J.L., Bernheim, A., and Berger, R. (1982). Correlation between immunoglobulin light chain expression and variant translocation in Burkitt's lymphoma. *Nature* 298, 474-476.
- Lettre, G., and Hengartner, M.O. (2006). Developmental apoptosis in *C. elegans*: a complex CEDnario. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 97-108.
- Levine, B., and Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132, 27-42.

- Ley, T.J., Mardis, E.R., Ding, L., Fulton, B., McLellan, M.D., Chen, K., Dooling, D., Dunford-Shore, B.H., McGrath, S., Hickenbotham, M., et al. (2008). DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature* 456, 66-72.
- Li, G., and Herlyn, M. (2000). Dynamics of intercellular communication during melanoma development. *Mol Med Today* 6, 163-169.
- Li, Y., Sheu, C.C., Ye, Y., de Andrade, M., Wang, L., Chang, S.C., Aubry, M.C., Aakre, J.A., Allen, M.S., Chen, F., et al. (2010). Genetic variants and risk of lung cancer in never smokers: a genome-wide association study. *Lancet Oncol* 11, 321-330.
- Li, Y.S., Wasserman, R., Hayakawa, K., and Hardy, R.R. (1996). Identification of the earliest B lineage stage in mouse bone marrow. *Immunity* 5, 527-535.
- Li, Z., Dordai, D.I., Lee, J., and Desiderio, S. (1996). A conserved degradation signal regulates RAG-2 accumulation during cell division and links V(D)J recombination to the cell cycle. *Immunity* 5, 575-589.
- Lichter, P., Cremer, T., Borden, J., Manuelidis, L., and Ward, D.C. (1988). Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum Genet* 80, 224-234.
- Lichter, P., Joos, S., Bentz, M., and Lampel, S. (2000). Comparative genomic hybridization: uses and limitations. *Semin Hematol* 37, 348-357.
- Lieber, M.R. (2010). The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem* 79, 181-211.
- Lieber, M.R., Yu, K., and Raghavan, S.C. (2006). Roles of nonhomologous DNA end joining, V(D)J recombination, and class switch recombination in chromosomal translocations. *DNA Repair (Amst)* 5, 1234-1245.
- Lieberman-Aiden, E., van Berkum, N.L., Williams, L., Imakaev, M., Ragozy, T., Telling, A., Amit, I., Lajoie, B.R., Sabo, P.J., Dorschner, M.O., et al. (2009). Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science* 326, 289-293.
- Lima, R.T., Busacca, S., Almeida, G.M., Gaudino, G., Fennell, D.A., and Vasconcelos, M.H. (2011). MicroRNA regulation of core apoptosis pathways in cancer. *Eur J Cancer* 47, 163-174.
- Limpens, J., de Jong, D., van Krieken, J.H., Price, C.G., Young, B.D., van Ommen, G.J., and Kluin, P.M. (1991). Bcl-2/JH rearrangements in benign lymphoid tissues with follicular hyperplasia. *Oncogene* 6, 2271-2276.
- Lin, C., Yang, L., Tanasa, B., Hutt, K., Ju, B.G., Ohgi, K., Zhang, J., Rose, D.W., Fu, X.D., Glass, C.K., et al. (2009). Nuclear receptor-induced chromosomal proximity and DNA breaks underlie specific translocations in cancer. *Cell* 139, 1069-1083.
- Lin, H., and Grosschedl, R. (1995). Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF. *Nature* 376, 263-267.
- Lipson, D., Capelletti, M., Yelensky, R., Otto, G., Parker, A., Jarosz, M., Curran, J.A., Balasubramanian, S., Bloom, T., Brennan, K.W., et al. (2012). Identification of new ALK and RET gene fusions from colorectal and lung cancer biopsies. *Nat Med* 18, 382-384.
- Liu, M., Duke, J.L., Richter, D.J., Vinuesa, C.G., Goodnow, C.C., Kleinstein, S.H., and Schatz, D.G. (2008). Two levels of protection for the B cell genome during somatic hypermutation. *Nature* 451, 841-845.

- Liu, M., and Schatz, D.G. (2009). Balancing AID and DNA repair during somatic hypermutation. *Trends Immunol* 30, 173-181.
- Lobo, N.A., Shimono, Y., Qian, D., and Clarke, M.F. (2007). The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23, 675-699.
- Locasale, J.W., Grassian, A.R., Melman, T., Lyssiotis, C.A., Mattaini, K.R., Bass, A.J., Heffron, G., Metallo, C.M., Muranen, T., Sharfi, H., et al. (2011). Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. *Nat Genet* 43, 869-874.
- Locke, D.P., Se Graves, R., Nicholls, R.D., Schwartz, S., Pinkel, D., Albertson, D.G., and Eichler, E.E. (2004). BAC microarray analysis of 15q11-q13 rearrangements and the impact of segmental duplications. *J Med Genet* 41, 175-182.
- Loeb, L.A. (2001). A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res* 61, 3230-3239.
- Loeb, L.A., Bielas, J.H., and Beckman, R.A. (2008). Cancers exhibit a mutator phenotype: clinical implications. *Cancer Res* 68, 3551-3557; discussion 3557.
- Londono-Vallejo, J.A. (2004). Telomere length heterogeneity and chromosome instability. *Cancer Lett* 212, 135-144.
- Lones, M.A., Sanger, W.G., Le Beau, M.M., Heerema, N.A., Sposto, R., Perkins, S.L., Buckley, J., Kadin, M.E., Kjeldsberg, C.R., Meadows, A., et al. (2004). Chromosome abnormalities may correlate with prognosis in Burkitt/Burkitt-like lymphomas of children and adolescents: a report from Children's Cancer Group Study CCG-E08. *J Pediatr Hematol Oncol* 26, 169-178.
- Lopez-Gines, C., Cerda-Nicolas, M., and Llombart-Bosch, A. (1994). Cytogenetic findings in a new case of adenoid cystic carcinoma arising in sphenoidal sinus. *Cancer Genet Cytogenet* 75, 150-152.
- Louis, S.F., Vermolen, B.J., Garini, Y., Young, I.T., Guffei, A., Lichtensztejn, Z., Kuttler, F., Chuang, T.C., Moshir, S., Mougey, V., et al. (2005). c-Myc induces chromosomal rearrangements through telomere and chromosome remodeling in the interphase nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9613-9618.
- Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B.L., Mak, R.H., Ferrando, A.A., et al. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435, 834-838.
- Lu, R., Medina, K.L., Lancki, D.W., and Singh, H. (2003). IRF-4,8 orchestrate the pre-B-to-B transition in lymphocyte development. *Genes Dev* 17, 1703-1708.
- Lucito, R., Healy, J., Alexander, J., Reiner, A., Esposito, D., Chi, M., Rodgers, L., Brady, A., Sebat, J., Troge, J., et al. (2003). Representational oligonucleotide microarray analysis: a high-resolution method to detect genome copy number variation. *Genome Res* 13, 2291-2305.
- Lujambio, A., Ropero, S., Ballestar, E., Fraga, M.F., Cerrato, C., Setien, F., Casado, S., Suarez-Gauthier, A., Sanchez-Cespedes, M., Git, A., et al. (2007). Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res* 67, 1424-1429.
- Lynch, T.J., Bell, D.W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R.A., Brannigan, B.W., Harris, P.L., Haserlat, S.M., Supko, J.G., Haluska, F.G., et al. (2004). Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 350, 2129-2139.
- Ma, L., and Weinberg, R.A. (2008). MicroRNAs in malignant progression. *Cell Cycle* 7, 570-572.

- MacLennan, I.C. (1994). Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 12, 117-139.
- Magrangeas, F., Avet-Loiseau, H., Munshi, N.C., and Minvielle, S. (2011). Chromothripsis identifies a rare and aggressive entity among newly diagnosed multiple myeloma patients. *Blood* 118, 675-678.
- Magrath, I.T. (1997). Non-Hodgkin's lymphomas: epidemiology and treatment. *Ann N Y Acad Sci* 824, 91-106.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 9, 153-166.
- Manchado, E., and Malumbres, M. (2011). Targeting aneuploidy for cancer therapy. *Cell* 144, 465-466.
- Mani, M., Carrasco, D.E., Zhang, Y., Takada, K., Gatt, M.E., Dutta-Simmons, J., Ikeda, H., Diaz-Griffero, F., Pena-Cruz, V., Bertagnolli, M., et al. (2009). BCL9 promotes tumor progression by conferring enhanced proliferative, metastatic, and angiogenic properties to cancer cells. *Cancer Res* 69, 7577-7586.
- Mano, H. (2008). Non-solid oncogenes in solid tumors: EML4-ALK fusion genes in lung cancer. *Cancer Sci* 99, 2349-2355.
- Manolov, G., and Manolova, Y. (1972). Marker band in one chromosome 14 from Burkitt lymphomas. *Nature* 237, 33-34.
- Mantripragada, K.K., Buckley, P.G., Diaz de Stahl, T., and Dumanski, J.P. (2004). Genomic microarrays in the spotlight. *Trends Genet* 20, 87-94.
- Mark, H.F., Hanna, I., and Gnepp, D.R. (1996). Cytogenetic analysis of salivary gland type tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 82, 187-192.
- Martinez-Climent, J.A., Alizadeh, A.A., Segraves, R., Blesa, D., Rubio-Moscardo, F., Albertson, D.G., Garcia-Conde, J., Dyer, M.J., Levy, R., Pinkel, D., et al. (2003). Transformation of follicular lymphoma to diffuse large cell lymphoma is associated with a heterogeneous set of DNA copy number and gene expression alterations. *Blood* 101, 3109-3117.
- Martins, C., Fonseca, I., Roque, L., Pinto, A.E., and Soares, J. (1996). Malignant salivary gland neoplasms: a cytogenetic study of 19 cases. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 32B, 128-132.
- Martins, C., Fonseca, I., Roque, L., Ribeiro, C., and Soares, J. (2001). Cytogenetic similarities between two types of salivary gland carcinomas: adenoid cystic carcinoma and polymorphous low-grade adenocarcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 128, 130-136.
- Maruya, S., Kurotaki, H., Shimoyama, N., Kaimori, M., Shinkawa, H., and Yagihashi, S. (2003). Expression of p16 protein and hypermethylation status of its promoter gene in adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 65, 26-32.
- Maser, R.S., and DePinho, R.A. (2002). Connecting chromosomes, crisis, and cancer. *Science* 297, 565-569.
- Masutomi, K., Possemato, R., Wong, J.M., Currier, J.L., Tothova, Z., Manola, J.B., Ganesan, S., Lansdorp, P.M., Collins, K., and Hahn, W.C. (2005). The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8222-8227.
- Matakidou, A., Eisen, T., and Houlston, R.S. (2005). Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk. *Br J Cancer* 93, 825-833.
- Matsuzaki, H., Dong, S., Loi, H., Di, X., Liu, G., Hubbell, E., Law, J., Berntsen, T., Chadha, M., Hui, H., et al. (2004). Genotyping over 100,000 SNPs on a pair of oligonucleotide arrays. *Nat Methods* 1, 109-111.
- Matthews, A.G., and Oettinger, M.A. (2009). RAG: a recombinase diversified. *Nat Immunol* 10, 817-821.

- Matthias, P., and Rolink, A.G. (2005). Transcriptional networks in developing and mature B cells. *Nat Rev Immunol* 5, 497-508.
- Mauritzson, N., Albin, M., Rylander, L., Billstrom, R., Ahlgren, T., Mikoczy, Z., Bjork, J., Stromberg, U., Nilsson, P.G., Mitelman, F., et al. (2002). Pooled analysis of clinical and cytogenetic features in treatment-related and de novo adult acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes based on a consecutive series of 761 patients analyzed 1976-1993 and on 5098 unselected cases reported in the literature 1974-2001. *Leukemia* 16, 2366-2378.
- Mayr, C., Hemann, M.T., and Bartel, D.P. (2007). Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science* 315, 1576-1579.
- McDermott, U., Downing, J.R., and Stratton, M.R. (2011). Genomics and the continuum of cancer care. *N Engl J Med* 364, 340-350.
- McEachern, M.J., Krauskopf, A., and Blackburn, E.H. (2000). Telomeres and their control. *Annu Rev Genet* 34, 331-358.
- McKay, J.D., Hung, R.J., Gaborieau, V., Boffetta, P., Chabrier, A., Byrnes, G., Zaridze, D., Mukeria, A., Szeszenia-Dabrowska, N., Lissowska, J., et al. (2008). Lung cancer susceptibility locus at 5p15.33. *Nat Genet* 40, 1404-1406.
- Meaburn, K.J., Misteli, T., and Soutoglou, E. (2007). Spatial genome organization in the formation of chromosomal translocations. *Semin Cancer Biol* 17, 80-90.
- Meffre, E., Casellas, R., and Nussenzweig, M.C. (2000). Antibody regulation of B cell development. *Nat Immunol* 1, 379-385.
- Melo, S.A., Moutinho, C., Ropero, S., Calin, G.A., Rossi, S., Spizzo, R., Fernandez, A.F., Davalos, V., Villanueva, A., Montoya, G., et al. (2010). A genetic defect in exportin-5 traps precursor microRNAs in the nucleus of cancer cells. *Cancer Cell* 18, 303-315.
- Mercer, T.R., Dinger, M.E., and Mattick, J.S. (2009). Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet* 10, 155-159.
- Mertens, F., Johansson, B., Hoglund, M., and Mitelman, F. (1997). Chromosomal imbalance maps of malignant solid tumors: a cytogenetic survey of 3185 neoplasms. *Cancer Res* 57, 2765-2780.
- Metzker, M.L. (2005). Emerging technologies in DNA sequencing. *Genome Res* 15, 1767-1776.
- Micalizzi, D.S., Farabaugh, S.M., and Ford, H.L. (2010). Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 15, 117-134.
- Michor, F., Iwasa, Y., Vogelstein, B., Lengauer, C., and Nowak, M.A. (2005). Can chromosomal instability initiate tumorigenesis? *Semin Cancer Biol* 15, 43-49.
- Miller, D.G. (1980). On the nature of susceptibility to cancer. The presidential address. *Cancer* 46, 1307-1318.
- Mills, R.E., Walter, K., Stewart, C., Handsaker, R.E., Chen, K., Alkan, C., Abyzov, A., Yoon, S.C., Ye, K., Cheetham, R.K., et al. (2011). Mapping copy number variation by population-scale genome sequencing. *Nature* 470, 59-65.
- Milne, T.A., Briggs, S.D., Brock, H.W., Martin, M.E., Gibbs, D., Allis, C.D., and Hess, J.L. (2002). MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Mol Cell* 10, 1107-1117.
- Milner, J., Ponder, B., Hughes-Davies, L., Seltsmann, M., and Kouzarides, T. (1997). Transcriptional activation functions in BRCA2. *Nature* 386, 772-773.

- Mitani, Y., Li, J., Rao, P.H., Zhao, Y.J., Bell, D., Lippman, S.M., Weber, R.S., Caulin, C., and El-Naggar, A.K. (2010). Comprehensive analysis of the MYB-NFIB gene fusion in salivary adenoid cystic carcinoma: Incidence, variability, and clinicopathologic significance. *Clin Cancer Res* 16, 4722-4731.
- Mitani, Y., Li, J., Rao, P.H., Zhao, Y.J., Bell, D., Lippman, S.M., Weber, R.S., Caulin, C., and El-Naggar, A.K. (2010). Comprehensive analysis of the MYB-NFIB gene fusion in salivary adenoid cystic carcinoma: Incidence, variability, and clinicopathologic significance. *Clin Cancer Res* 16, 4722-4731.
- Mitelman, F., Johansson, B., and Mertens, F. (2004). Fusion genes and rearranged genes as a linear function of chromosome aberrations in cancer. *Nat Genet* 36, 331-334.
- Mitelman, F., Johansson, B., and Mertens, F. (2007). The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat Rev Cancer* 7, 233-245.
- Mitelman, F., Levan, G., Nilsson, P.G., and Brandt, L. (1976). Non-random karyotypic evolution in chronic myeloid leukemia. *Int J Cancer* 18, 24-30.
- Mitsudomi, T., Kosaka, T., and Yatabe, Y. (2006). Biological and clinical implications of EGFR mutations in lung cancer. *Int J Clin Oncol* 11, 190-198.
- Molyneux, E.M., Rochford, R., Griffin, B., Newton, R., Jackson, G., Menon, G., Harrison, C.J., Israels, T., and Bailey, S. (2012). Burkitt's lymphoma. *Lancet* 379, 1234-1244.
- Momand, J., Jung, D., Wilczynski, S., and Niland, J. (1998). The MDM2 gene amplification database. *Nucleic Acids Res* 26, 3453-3459.
- Moran, C.A. (1995). Primary salivary gland-type tumors of the lung. *Semin Diagn Pathol* 12, 106-122.
- Mougiakakos, D., Choudhury, A., Lladser, A., Kiessling, R., and Johansson, C.C. (2010). Regulatory T cells in cancer. *Adv Cancer Res* 107, 57-117.
- Mu, P., Han, Y.C., Betel, D., Yao, E., Squatrito, M., Ogdowski, P., de Stanchina, E., D'Andrea, A., Sander, C., and Ventura, A. (2009). Genetic dissection of the miR-17~92 cluster of microRNAs in Myc-induced B-cell lymphomas. *Genes Dev* 23, 2806-2811.
- Muleris, M., Almeida, A., Gerbault-Seureau, M., Malfoy, B., and Dutrillaux, B. (1995). Identification of amplified DNA sequences in breast cancer and their organization within homogeneously staining regions. *Genes Chromosomes Cancer* 14, 155-163.
- Mullighan, C.G., Phillips, L.A., Su, X., Ma, J., Miller, C.B., Shurtleff, S.A., and Downing, J.R. (2008). Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Science* 322, 1377-1380.
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., and Honjo, T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102, 553-563.
- Murdoch, C., Muthana, M., Coffelt, S.B., and Lewis, C.E. (2008). The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 8, 618-631.
- Murnane, J.P., and Sabatier, L. (2004). Chromosome rearrangements resulting from telomere dysfunction and their role in cancer. *Bioessays* 26, 1164-1174.
- Muto, A., Tashiro, S., Nakajima, O., Hoshino, H., Takahashi, S., Sakoda, E., Ikebe, D., Yamamoto, M., and Igarashi, K. (2004). The transcriptional programme of antibody class switching involves the repressor Bach2. *Nature* 429, 566-571.

- Nagy, J.A., Chang, S.H., Shih, S.C., Dvorak, A.M., and Dvorak, H.F. (2010). Heterogeneity of the tumor vasculature. *Semin Thromb Hemost* 36, 321-331.
- Nakamura, T., Mori, T., Tada, S., Krajewski, W., Rozovskaia, T., Wassell, R., Dubois, G., Mazo, A., Croce, C.M., and Canaani, E. (2002). ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation. *Mol Cell* 10, 1119-1128.
- Naumov, G.N., Bender, E., Zurakowski, D., Kang, S.Y., Sampson, D., Flynn, E., Watnick, R.S., Straume, O., Akslen, L.A., Folkman, J., et al. (2006). A model of human tumor dormancy: an angiogenic switch from the nonangiogenic phenotype. *J Natl Cancer Inst* 98, 316-325.
- Nederlof, P.M., Robinson, D., Abuknesha, R., Wiegant, J., Hopman, A.H., Tanke, H.J., and Raap, A.K. (1989). Three-color fluorescence in situ hybridization for the simultaneous detection of multiple nucleic acid sequences. *Cytometry* 10, 20-27.
- Nederlof, P.M., van der Flier, S., Vrolijk, J., Tanke, H.J., and Raap, A.K. (1992). Fluorescence ratio measurements of double-labeled probes for multiple in situ hybridization by digital imaging microscopy. *Cytometry* 13, 839-845.
- Negrini, M., Nicoloso, M.S., and Calin, G.A. (2009). MicroRNAs and cancer--new paradigms in molecular oncology. *Curr Opin Cell Biol* 21, 470-479.
- Nelson, B.H. (2008). The impact of T-cell immunity on ovarian cancer outcomes. *Immunol Rev* 222, 101-116.
- Nelson, M., Perkins, S.L., Dave, B.J., Coccia, P.F., Bridge, J.A., Lyden, E.R., Heerema, N.A., Lones, M.A., Harrison, L., Cairo, M.S., et al. (2010). An increased frequency of 13q deletions detected by fluorescence in situ hybridization and its impact on survival in children and adolescents with Burkitt lymphoma: results from the Children's Oncology Group study CCG-5961. *Br J Haematol* 148, 600-610.
- Neves Cde, O., Soares, A.B., Costa, A.F., de Araujo, V.C., Furuse, C., Juliano, P.B., and Altemani, A. (2010). CD10 (Neutral Endopeptidase) Expression in Myoepithelial Cells of Salivary Neoplasms. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 18, 172-178.
- Ng, S.B., Buckingham, K.J., Lee, C., Bigham, A.W., Tabor, H.K., Dent, K.M., Huff, C.D., Shannon, P.T., Jabs, E.W., Nickerson, D.A., et al. (2010). Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nat Genet* 42, 30-35.
- Ng, S.B., Turner, E.H., Robertson, P.D., Flygare, S.D., Bigham, A.W., Lee, C., Shaffer, T., Wong, M., Bhattacharjee, A., Eichler, E.E., et al. (2009). Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature* 461, 272-276.
- Nguyen, K.S., Kobayashi, S., and Costa, D.B. (2009). Acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancers dependent on the epidermal growth factor receptor pathway. *Clin Lung Cancer* 10, 281-289.
- Nicoloso, M.S., Spizzo, R., Shimizu, M., Rossi, S., and Calin, G.A. (2009). MicroRNAs--the micro steering wheel of tumour metastases. *Nat Rev Cancer* 9, 293-302.
- Nielaender, I., Martin-Subero, J.I., Wagner, F., Martinez-Climent, J.A., and Siebert, R. (2006). Partial uniparental disomy: a recurrent genetic mechanism alternative to chromosomal deletion in malignant lymphoma. *Leukemia* 20, 904-905.
- Nieman, M.T., Prudoff, R.S., Johnson, K.R., and Wheelock, M.J. (1999). N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *J Cell Biol* 147, 631-644.

- Nishimine, M., Nakamura, M., Kishi, M., Okamoto, M., Shimada, K., Ishida, E., Kirita, T., and Konishi, N. (2003). Alterations of p14ARF and p16INK4a genes in salivary gland carcinomas. *Oncol Rep* 10, 555-560.
- Noguchi, M., Morikawa, A., Kawasaki, M., Matsuno, Y., Yamada, T., Hirohashi, S., Kondo, H., and Shimosato, Y. (1995). Small adenocarcinoma of the lung. Histologic characteristics and prognosis. *Cancer* 75, 2844-2852.
- Nordkvist, A., Mark, J., Gustafsson, H., Bang, G., and Stenman, G. (1994). Non-random chromosome rearrangements in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *Genes Chromosomes Cancer* 10, 115-121.
- Nowak, M.A., Komarova, N.L., Sengupta, A., Jallepalli, P.V., Shih Ie, M., Vogelstein, B., and Lengauer, C. (2002). The role of chromosomal instability in tumor initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 16226-16231.
- Nowell, P.C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23-28.
- Nowell, P.C. (2002). Tumor progression: a brief historical perspective. *Semin Cancer Biol* 12, 261-266.
- Nowell, P.C., and Hungerford, D.A. (1960). Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst* 25, 85-109.
- Nowell, P.C., and Hungerford, D.A. (1960). Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst* 25, 85-109.
- Nucifora, G., Larson, R.A., and Rowley, J.D. (1993). Persistence of the 8;21 translocation in patients with acute myeloid leukemia type M2 in long-term remission. *Blood* 82, 712-715.
- Nussenzweig, A., and Nussenzweig, M.C. (2010). Origin of chromosomal translocations in lymphoid cancer. *Cell* 141, 27-38.
- Nussenzweig, M.C. (1998). Immune receptor editing: revise and select. *Cell* 95, 875-878.
- Nutt, S.L., and Kee, B.L. (2007). The transcriptional regulation of B cell lineage commitment. *Immunity* 26, 715-725.
- Nyberg, P., Xie, L., and Kalluri, R. (2005). Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Res* 65, 3967-3979.
- O'Brien, S.G., Guilhot, F., Larson, R.A., Gathmann, I., Baccarani, M., Cervantes, F., Cornelissen, J.J., Fischer, T., Hochhaus, A., Hughes, T., et al. (2003). Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 348, 994-1004.
- O'Neil, J., and Look, A.T. (2007). Mechanisms of transcription factor deregulation in lymphoid cell transformation. *Oncogene* 26, 6838-6849.
- Oh, I.H., and Reddy, E.P. (1999). The myb gene family in cell growth, differentiation and apoptosis. *Oncogene* 18, 3017-3033.
- Okawa, E.R., Gotoh, T., Manne, J., Igarashi, J., Fujita, T., Silverman, K.A., Xhao, H., Mosse, Y.P., White, P.S., and Brodeur, G.M. (2008). Expression and sequence analysis of candidates for the 1p36.31 tumor suppressor gene deleted in neuroblastomas. *Oncogene* 27, 803-810.
- Olive, K.P., Jacobetz, M.A., Davidson, C.J., Gopinathan, A., McIntyre, D., Honess, D., Madhu, B., Goldgraben, M.A., Caldwell, M.E., Allard, D., et al. (2009). Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science* 324, 1457-1461.

- Oliver, T.G., and Wechsler-Reya, R.J. (2004). Getting at the root and stem of brain tumors. *Neuron* 42, 885-888.
- Olivier, M., Hussain, S.P., Caron de Fromentel, C., Hainaut, P., and Harris, C.C. (2004). TP53 mutation spectra and load: a tool for generating hypotheses on the etiology of cancer. *IARC Sci Publ*, 247-270.
- Onciu, M., Schlette, E., Zhou, Y., Raimondi, S.C., Giles, F.J., Kantarjian, H.M., Medeiros, L.J., Ribeiro, R.C., Pui, C.H., and Sandlund, J.T. (2006). Secondary chromosomal abnormalities predict outcome in pediatric and adult high-stage Burkitt lymphoma. *Cancer* 107, 1084-1092.
- Orkin, S.H. (2000). Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet* 1, 57-64.
- Orkin, S.H. (2003). Priming the hematopoietic pump. *Immunity* 19, 633-634.
- Orkin, S.H., and Zon, L.I. (2008). Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 132, 631-644.
- Orlic, M., Spencer, C.E., Wang, L., and Gallie, B.L. (2006). Expression analysis of 6p22 genomic gain in retinoblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 45, 72-82.
- Orom, U.A., Nielsen, F.C., and Lund, A.H. (2008). MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell* 30, 460-471.
- Osborne, C.S., Chakalova, L., Mitchell, J.A., Horton, A., Wood, A.L., Bolland, D.J., Corcoran, A.E., and Fraser, P. (2007). Myc dynamically and preferentially relocates to a transcription factory occupied by Igh. *PLoS Biol* 5, e192.
- Ostrand-Rosenberg, S., and Sinha, P. (2009). Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J Immunol* 182, 4499-4506.
- Ota, A., Tagawa, H., Karnan, S., Tsuzuki, S., Karpas, A., Kira, S., Yoshida, Y., and Seto, M. (2004). Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma. *Cancer Res* 64, 3087-3095.
- Pages, F., Galon, J., Dieu-Nosjean, M.C., Tartour, E., Sautes-Fridman, C., and Fridman, W.H. (2010). Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene* 29, 1093-1102.
- Palaskas, N., Larson, S.M., Schultz, N., Komisopoulou, E., Wong, J., Rohle, D., Campos, C., Yannuzzi, N., Osborne, J.R., Linkov, I., et al. (2011). 18F-fluorodeoxy-glucose positron emission tomography marks MYC-overexpressing human basal-like breast cancers. *Cancer Res* 71, 5164-5174.
- Pao, W., Miller, V., Zakowski, M., Doherty, J., Politi, K., Sarkaria, I., Singh, B., Heelan, R., Rusch, V., Fulton, L., et al. (2004). EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13306-13311.
- Pao, W., Wang, T.Y., Riely, G.J., Miller, V.A., Pan, Q., Ladanyi, M., Zakowski, M.F., Heelan, R.T., Kris, M.G., and Varmus, H.E. (2005). KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Med* 2, e17.
- Paraskevaidis, E., Zioga, C., Chouliara, S., Koliopoulos, G., Tzioras, S., and Lolis, D. (2001). Adenoid cystic carcinoma of Bartholin's gland: a case report. *Clin Exp Obstet Gynecol* 28, 109-110.
- Paris, P.L., Andaya, A., Fridlyand, J., Jain, A.N., Weinberg, V., Kowbel, D., Brebner, J.H., Simko, J., Watson, J.E., Volik, S., et al. (2004). Whole genome scanning identifies genotypes associated with recurrence and metastasis in prostate tumors. *Hum Mol Genet* 13, 1303-1313.

- Park, J.I., Venteicher, A.S., Hong, J.Y., Choi, J., Jun, S., Shkreli, M., Chang, W., Meng, Z., Cheung, P., Ji, H., et al. (2009). Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin. *Nature* 460, 66-72.
- Parsa, N.Z., Gaidano, G., Mukherjee, A.B., Hauptschein, R.S., Lenoir, G., Dalla-Favera, R., and Chaganti, R.S. (1994). Cytogenetic and molecular analysis of 6q deletions in Burkitt's lymphoma cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* 9, 13-18.
- Pasmant, E., Laurendeau, I., Heron, D., Vidaud, M., Vidaud, D., and Bieche, I. (2007). Characterization of a germ-line deletion, including the entire INK4/ARF locus, in a melanoma-neural system tumor family: identification of ANRIL, an antisense noncoding RNA whose expression coclusters with ARF. *Cancer Res* 67, 3963-3969.
- Pasqualucci, L., Neumeister, P., Goossens, T., Nanjangud, G., Chaganti, R.S., Kuppers, R., and Dalla-Favera, R. (2001). Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* 412, 341-346.
- Peinado, H., Marin, F., Cubillo, E., Stark, H.J., Fusenig, N., Nieto, M.A., and Cano, A. (2004). Snail and E47 repressors of E-cadherin induce distinct invasive and angiogenic properties in vivo. *J Cell Sci* 117, 2827-2839.
- Pellicci, P.G., Knowles, D.M., 2nd, Magrath, I., and Dalla-Favera, R. (1986). Chromosomal breakpoints and structural alterations of the c-myc locus differ in endemic and sporadic forms of Burkitt lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 2984-2988.
- Perkins, S.L. (2000). Work-up and diagnosis of pediatric non-Hodgkin's lymphomas. *Pediatr Dev Pathol* 3, 374-390.
- Perl, A.K., Wilgenbus, P., Dahl, U., Semb, H., and Christofori, G. (1998). A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* 392, 190-193.
- Perner, S., Demichelis, F., Beroukhi, R., Schmidt, F.H., Mosquera, J.M., Setlur, S., Tchinda, J., Tomlins, S.A., Hofer, M.D., Pienta, K.G., et al. (2006). TMPRSS2:ERG fusion-associated deletions provide insight into the heterogeneity of prostate cancer. *Cancer Res* 66, 8337-8341.
- Perner, S., Wagner, P.L., Demichelis, F., Mehra, R., Lafargue, C.J., Moss, B.J., Arbogast, S., Soltermann, A., Weder, W., Giordano, T.J., et al. (2008). EML4-ALK fusion lung cancer: a rare acquired event. *Neoplasia* 10, 298-302.
- Persson, M., Andren, Y., Mark, J., Horlings, H.M., Persson, F., and Stenman, G. (2009). Recurrent fusion of MYB and NFIB transcription factor genes in carcinomas of the breast and head and neck. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 18740-18744.
- Persson, M., Andren, Y., Moskaluk, C.A., Frierson, H.F., Jr., Cooke, S.L., Futreal, P.A., Kling, T., Nelander, S., Nordkvist, A., Persson, F., et al. (2012). Clinically significant copy number alterations and complex rearrangements of MYB and NFIB in head and neck adenoid cystic carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*.
- Perzin, K.H., Gullane, P., and Clairmont, A.C. (1978). Adenoid cystic carcinomas arising in salivary glands: a correlation of histologic features and clinical course. *Cancer* 42, 265-282.
- Pham, D., Kris, M.G., Riely, G.J., Sarkaria, I.S., McDonough, T., Chuai, S., Venkatraman, E.S., Miller, V.A., Ladanyi, M., Pao, W., et al. (2006). Use of cigarette-smoking history to estimate the likelihood of

- mutations in epidermal growth factor receptor gene exons 19 and 21 in lung adenocarcinomas. *J Clin Oncol* 24, 1700-1704.
- Phan, R.T., and Dalla-Favera, R. (2004). The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature* 432, 635-639.
- Phan, T.G., Paus, D., Chan, T.D., Turner, M.L., Nutt, S.L., Basten, A., and Brink, R. (2006). High affinity germinal center B cells are actively selected into the plasma cell compartment. *J Exp Med* 203, 2419-2424.
- Pinkel, D., and Albertson, D.G. (2005). Comparative genomic hybridization. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 6, 331-354.
- Pinkel, D., Landegent, J., Collins, C., Fuscoe, J., Segraves, R., Lucas, J., and Gray, J. (1988). Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 9138-9142.
- Pinkel, D., Segraves, R., Sudar, D., Clark, S., Poole, I., Kowbel, D., Collins, C., Kuo, W.L., Chen, C., Zhai, Y., et al. (1998). High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 20, 207-211.
- Pipiras, E., Coquelle, A., Bieth, A., and Debatisse, M. (1998). Interstitial deletions and intrachromosomal amplification initiated from a double-strand break targeted to a mammalian chromosome. *EMBO J* 17, 325-333.
- Pleasance, E.D., Cheetham, R.K., Stephens, P.J., McBride, D.J., Humphray, S.J., Greenman, C.D., Varela, I., Lin, M.L., Ordonez, G.R., Bignell, G.R., et al. (2010). A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. *Nature* 463, 191-196.
- Poirel, H.A., Cairo, M.S., Heerema, N.A., Swansbury, J., Auperin, A., Launay, E., Sanger, W.G., Talley, P., Perkins, S.L., Raphael, M., et al. (2009). Specific cytogenetic abnormalities are associated with a significantly inferior outcome in children and adolescents with mature B-cell non-Hodgkin's lymphoma: results of the FAB/LMB 96 international study. *Leukemia* 23, 323-331.
- Polager, S., and Ginsberg, D. (2009). p53 and E2f: partners in life and death. *Nat Rev Cancer* 9, 738-748.
- Politi, K., Zakowski, M.F., Fan, P.D., Schonfeld, E.A., Pao, W., and Varmus, H.E. (2006). Lung adenocarcinomas induced in mice by mutant EGF receptors found in human lung cancers respond to a tyrosine kinase inhibitor or to down-regulation of the receptors. *Genes Dev* 20, 1496-1510.
- Pollack, J.R., Perou, C.M., Alizadeh, A.A., Eisen, M.B., Pergamenschikov, A., Williams, C.F., Jeffrey, S.S., Botstein, D., and Brown, P.O. (1999). Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet* 23, 41-46.
- Pollmann, M., Parwaresch, R., Adam-Klages, S., Kruse, M.L., Buck, F., and Heidebrecht, H.J. (2006). Human EML4, a novel member of the EMAP family, is essential for microtubule formation. *Exp Cell Res* 312, 3241-3251.
- Pop, M., and Salzberg, S.L. (2008). Bioinformatics challenges of new sequencing technology. *Trends Genet* 24, 142-149.
- Porter, D.A., Krop, I.E., Nasser, S., Sgroi, D., Kaelin, C.M., Marks, J.R., Riggins, G., and Polyak, K. (2001). A SAGE (serial analysis of gene expression) view of breast tumor progression. *Cancer Res* 61, 5697-5702.

- Povirk, L.F. (2006). Biochemical mechanisms of chromosomal translocations resulting from DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)* 5, 1199-1212.
- Powell, C.A., Bueno, R., Borczuk, A.C., Caracta, C.F., Richards, W.G., Sugarbaker, D.J., and Brody, J.S. (2003). Patterns of allelic loss differ in lung adenocarcinomas of smokers and nonsmokers. *Lung Cancer* 39, 23-29.
- Press, R.D., Reddy, E.P., and Ewert, D.L. (1994). Overexpression of C-terminally but not N-terminally truncated Myb induces fibrosarcomas: a novel nonhematopoietic target cell for the myb oncogene. *Mol Cell Biol* 14, 2278-2290.
- Pulec, J.L., Parkhill, E.M., and Devine, K.D. (1963). ADENOID CYSTIC CARCINOMA (CYLINDROMA) OF THE EXTERNAL AUDITORY CANAL. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 67, 673-694.
- Pushkarev, D., Neff, N.F., and Quake, S.R. (2009). Single-molecule sequencing of an individual human genome. *Nat Biotechnol* 27, 847-850.
- Qian, B.Z., and Pollard, J.W. (2010). Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141, 39-51.
- Qian, F., Kruse, U., Lichter, P., and Sippel, A.E. (1995). Chromosomal localization of the four genes (NFIA, B, C, and X) for the human transcription factor nuclear factor I by FISH. *Genomics* 28, 66-73.
- Queimado, L., Reis, A., Fonseca, I., Martins, C., Lovett, M., Soares, J., and Parreira, L. (1998). A refined localization of two deleted regions in chromosome 6q associated with salivary gland carcinomas. *Oncogene* 16, 83-88.
- Quintana, E., Shackleton, M., Sabel, M.S., Fullen, D.R., Johnson, T.M., and Morrison, S.J. (2008). Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature* 456, 593-598.
- Rabbitts, T.H. (2009). Commonality but diversity in cancer gene fusions. *Cell* 137, 391-395.
- Rabbitts, T.H., Forster, A., Larson, R., and Nathan, P. (1993). Fusion of the dominant negative transcription regulator CHOP with a novel gene FUS by translocation t(12;16) in malignant liposarcoma. *Nat Genet* 4, 175-180.
- Radford, D.M., Fair, K.L., Phillips, N.J., Ritter, J.H., Steinbrueck, T., Holt, M.S., and Donis-Keller, H. (1995). Allelotyping of ductal carcinoma in situ of the breast: deletion of loci on 8p, 13q, 16q, 17p and 17q. *Cancer Res* 55, 3399-3405.
- Rafii, S., Meeus, S., Dias, S., Hattori, K., Heissig, B., Shmelkov, S., Rafii, D., and Lyden, D. (2002). Contribution of marrow-derived progenitors to vascular and cardiac regeneration. *Semin Cell Dev Biol* 13, 61-67.
- Rafnar, T., Sulem, P., Stacey, S.N., Geller, F., Gudmundsson, J., Sigurdsson, A., Jakobsdottir, M., Helgadóttir, H., Thorlacius, S., Aben, K.K., et al. (2009). Sequence variants at the TERT-CLPTM1L locus associate with many cancer types. *Nat Genet* 41, 221-227.
- Raghavan, M., Lillington, D.M., Skoulakis, S., Debernardi, S., Chaplin, T., Foot, N.J., Lister, T.A., and Young, B.D. (2005). Genome-wide single nucleotide polymorphism analysis reveals frequent partial uniparental disomy due to somatic recombination in acute myeloid leukemias. *Cancer Res* 65, 375-378.
- Raica, M., Cimpean, A.M., and Ribatti, D. (2009). Angiogenesis in pre-malignant conditions. *Eur J Cancer* 45, 1924-1934.

- Rajagopalan, H., Nowak, M.A., Vogelstein, B., and Lengauer, C. (2003). The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 3, 695-701.
- Rajewsky, K. (1996). Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381, 751-758.
- Ramiro, A.R., Jankovic, M., Callen, E., Difilippantonio, S., Chen, H.T., McBride, K.M., Eisenreich, T.R., Chen, J., Dickins, R.A., Lowe, S.W., et al. (2006). Role of genomic instability and p53 in AID-induced c-myc-Igh translocations. *Nature* 440, 105-109.
- Ramiro, A.R., Jankovic, M., Eisenreich, T., Difilippantonio, S., Chen-Kiang, S., Muramatsu, M., Honjo, T., Nussenzweig, A., and Nussenzweig, M.C. (2004). AID is required for c-myc/IgH chromosome translocations in vivo. *Cell* 118, 431-438.
- Ramiro, A.R., Stavropoulos, P., Jankovic, M., and Nussenzweig, M.C. (2003). Transcription enhances AID-mediated cytidine deamination by exposing single-stranded DNA on the nontemplate strand. *Nat Immunol* 4, 452-456.
- Ramsay, R.G., and Gonda, T.J. (2008). MYB function in normal and cancer cells. *Nat Rev Cancer* 8, 523-534.
- Rand, V., Parker, H., Russell, L.J., Schwab, C., Ensor, H., Irving, J., Jones, L., Masic, D., Minto, L., Morrison, H., et al. (2011). Genomic characterization implicates iAMP21 as a likely primary genetic event in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 117, 6848-6855.
- Rao, P.H., Roberts, D., Zhao, Y.J., Bell, D., Harris, C.P., Weber, R.S., and El-Naggar, A.K. (2008). Deletion of 1p32-p36 is the most frequent genetic change and poor prognostic marker in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *Clin Cancer Res* 14, 5181-5187.
- Raza, A., Franklin, M.J., and Dudek, A.Z. (2010). Pericytes and vessel maturation during tumor angiogenesis and metastasis. *Am J Hematol* 85, 593-598.
- Reddel, R.R. (2003). Alternative lengthening of telomeres, telomerase, and cancer. *Cancer Lett* 194, 155-162.
- Reddy, E.P., Reynolds, R.K., Santos, E., and Barbacid, M. (1982). A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature* 300, 149-152.
- Redon, R., Ishikawa, S., Fitch, K.R., Feuk, L., Perry, G.H., Andrews, T.D., Fiegler, H., Shaperro, M.H., Carson, A.R., Chen, W., et al. (2006). Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 444, 444-454.
- Reitman, Z.J., and Yan, H. (2010). Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cancer: alterations at a crossroads of cellular metabolism. *J Natl Cancer Inst* 102, 932-941.
- Ren, B., Yee, K.O., Lawler, J., and Khosravi-Far, R. (2006). Regulation of tumor angiogenesis by thrombospondin-1. *Biochim Biophys Acta* 1765, 178-188.
- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., and Weissman, I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105-111.
- Reya, T., O'Riordan, M., Okamura, R., Devaney, E., Willert, K., Nusse, R., and Grosschedl, R. (2000). Wnt signaling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism. *Immunity* 13, 15-24.
- Reynaud, C.A., Aoufouchi, S., Faili, A., and Weill, J.C. (2003). What role for AID: mutator, or assembler of the immunoglobulin mutasome? *Nat Immunol* 4, 631-638.

- Rhodes, J., Hagen, A., Hsu, K., Deng, M., Liu, T.X., Look, A.T., and Kanki, J.P. (2005). Interplay of pu.1 and gata1 determines myelo-erythroid progenitor cell fate in zebrafish. *Dev Cell* 8, 97-108.
- Ribatti, D. (2009). Endogenous inhibitors of angiogenesis: a historical review. *Leuk Res* 33, 638-644.
- Rieder, C.L., Cole, R.W., Khodjakov, A., and Sluder, G. (1995). The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores. *J Cell Biol* 130, 941-948.
- Riely, G.J., Kris, M.G., Rosenbaum, D., Marks, J., Li, A., Chitale, D.A., Nafa, K., Riedel, E.R., Hsu, M., Pao, W., et al. (2008). Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 14, 5731-5734.
- Rikova, K., Guo, A., Zeng, Q., Possemato, A., Yu, J., Haack, H., Nardone, J., Lee, K., Reeves, C., Li, Y., et al. (2007). Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell* 131, 1190-1203.
- Robbiani, D.F., Bothmer, A., Callen, E., Reina-San-Martin, B., Dorsett, Y., Difilippantonio, S., Bolland, D.J., Chen, H.T., Corcoran, A.E., Nussenzweig, A., et al. (2008). AID is required for the chromosomal breaks in c-myc that lead to c-myc/IgH translocations. *Cell* 135, 1028-1038.
- Robbiani, D.F., Bunting, S., Feldhahn, N., Bothmer, A., Camps, J., Deroubaix, S., McBride, K.M., Klein, I.A., Stone, G., Eisenreich, T.R., et al. (2009). AID produces DNA double-strand breaks in non-Ig genes and mature B cell lymphomas with reciprocal chromosome translocations. *Mol Cell* 36, 631-641.
- Roberts, D.D., Isenberg, J.S., Ridnour, L.A., and Wink, D.A. (2007). Nitric oxide and its gatekeeper thrombospondin-1 in tumor angiogenesis. *Clin Cancer Res* 13, 795-798.
- Roche-Lestienne, C., Soenen-Cornu, V., Grardel-Duflos, N., Lai, J.L., Philippe, N., Facon, T., Fenaux, P., and Preudhomme, C. (2002). Several types of mutations of the Abl gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to STI571, and they can pre-exist to the onset of treatment. *Blood* 100, 1014-1018.
- Rodenhuis, S., van de Wetering, M.L., Mooi, W.J., Evers, S.G., van Zandwijk, N., and Bos, J.L. (1987). Mutational activation of the K-ras oncogene. A possible pathogenetic factor in adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med* 317, 929-935.
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L., and Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 14, 1902-1910.
- Roijer, E., Dahlenfors, R., Mark, J., and Stenman, G. (1997). Observations by chromosome banding, FISH and immunohistochemistry in an adenoid cystic carcinoma with del(17)(p13) as the sole deviation. *Virchows Arch* 430, 339-342.
- Roman-Gomez, J., Agirre, X., Jimenez-Velasco, A., Arqueros, V., Vilas-Zornoza, A., Rodriguez-Otero, P., Martin-Subero, I., Garate, L., Cordeu, L., San Jose-Eneriz, E., et al. (2009). Epigenetic regulation of microRNAs in acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 27, 1316-1322.
- Romana, S.P., Mauchauffe, M., Le Coniat, M., Chumakov, I., Le Paslier, D., Berger, R., and Bernard, O.A. (1995). The t(12;21) of acute lymphoblastic leukemia results in a tel-AML1 gene fusion. *Blood* 85, 3662-3670.
- Rooney, S., Chaudhuri, J., and Alt, F.W. (2004). The role of the non-homologous end-joining pathway in lymphocyte development. *Immunol Rev* 200, 115-131.

- Rowinsky, E.K. (2004). The erbB family: targets for therapeutic development against cancer and therapeutic strategies using monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors. *Annu Rev Med* 55, 433-457.
- Rowley, J.D. (1973a). Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243, 290-293.
- Rowley, J.D. (1973b). Identification of a translocation with quinacrine fluorescence in a patient with acute leukemia. *Ann Genet* 16, 109-112.
- Rowley, J.D. (1998). Seminars from the University of Minnesota. Chromosome translocations: dangerous liaisons. *J Lab Clin Med* 132, 244-250.
- Rowley, J.D. (2008). Chromosomal translocations: revisited yet again. *Blood* 112, 2183-2189.
- Rowley, J.D., and Blumenthal, T. (2008). Medicine. The cart before the horse. *Science* 321, 1302-1304.
- Rubio-Moscardo, F., Climent, J., Siebert, R., Piris, M.A., Martin-Subero, J.I., Nielander, I., Garcia-Conde, J., Dyer, M.J., Terol, M.J., Pinkel, D., et al. (2005). Mantle-cell lymphoma genotypes identified with CGH to BAC microarrays define a leukemic subgroup of disease and predict patient outcome. *Blood* 105, 4445-4454.
- Rudkin, G.T., and Stollar, B.D. (1977). High resolution detection of DNA-RNA hybrids in situ by indirect immunofluorescence. *Nature* 265, 472-473.
- Ruthenburg, A.J., Allis, C.D., and Wysocka, J. (2007). Methylation of lysine 4 on histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark. *Mol Cell* 25, 15-30.
- Rutherford, S., Hampton, G.M., Frierson, H.F., and Moskaluk, C.A. (2005). Mapping of candidate tumor suppressor genes on chromosome 12 in adenoid cystic carcinoma. *Lab Invest* 85, 1076-1085.
- Rutherford, S., Yu, Y., Rumpel, C.A., Frierson, H.F., Jr., and Moskaluk, C.A. (2006). Chromosome 6 deletion and candidate tumor suppressor genes in adenoid cystic carcinoma. *Cancer Lett* 236, 309-317.
- Sabatier, L., Ricoul, M., Pottier, G., and Murnane, J.P. (2005). The loss of a single telomere can result in instability of multiple chromosomes in a human tumor cell line. *Mol Cancer Res* 3, 139-150.
- Sagara, N., Toda, G., Hirai, M., Terada, M., and Katoh, M. (1998). Molecular cloning, differential expression, and chromosomal localization of human frizzled-1, frizzled-2, and frizzled-7. *Biochem Biophys Res Commun* 252, 117-122.
- Salaverria, I., Zettl, A., Bea, S., Hartmann, E.M., Dave, S.S., Wright, G.W., Boerma, E.J., Kluin, P.M., Ott, G., Chan, W.C., et al. (2008). Chromosomal alterations detected by comparative genomic hybridization in subgroups of gene expression-defined Burkitt's lymphoma. *Haematologica* 93, 1327-1334.
- Sanchez-Cespedes, M., Ahrendt, S.A., Piantadosi, S., Rosell, R., Monzo, M., Wu, L., Westra, W.H., Yang, S.C., Jen, J., and Sidransky, D. (2001). Chromosomal alterations in lung adenocarcinoma from smokers and nonsmokers. *Cancer Res* 61, 1309-1313.
- Sandlund, J.T., Downing, J.R., and Crist, W.M. (1996). Non-Hodgkin's lymphoma in childhood. *N Engl J Med* 334, 1238-1248.
- Sandros, J., Mark, J., Happonen, R.P., and Stenman, G. (1988). Specificity of 6q- markers and other recurrent deviations in human malignant salivary gland tumors. *Anticancer Res* 8, 637-643.
- Sandros, J., Stenman, G., and Mark, J. (1990). Cytogenetic and molecular observations in human and experimental salivary gland tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 44, 153-167.

- Sanlaville, D. (2012). L'analyse chromosomique sur Puce ADN devient l'outil stratégique prioritaire pour la recherche d'aneusomie segmentaire. Expérience du réseau national. Paper presented at: Assises de Génétique humaine et médicale (Marseille).
- Sansal, I., and Sellers, W.R. (2004). The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *J Clin Oncol* 22, 2954-2963.
- Santarius, T., Shipley, J., Brewer, D., Stratton, M.R., and Cooper, C.S. (2010). A census of amplified and overexpressed human cancer genes. *Nat Rev Cancer* 10, 59-64.
- Saporita, A.J., Maggi, L.B., Jr., Apicelli, A.J., and Weber, J.D. (2007). Therapeutic targets in the ARF tumor suppressor pathway. *Curr Med Chem* 14, 1815-1827.
- Savelyeva, L., and Schwab, M. (2001). Amplification of oncogenes revisited: from expression profiling to clinical application. *Cancer Lett* 167, 115-123.
- Schiffman, J.D., Lorimer, P.D., Rodic, V., Jahromi, M.S., Downie, J.M., Bayerl, M.G., Sanmann, J.N., Althof, P.A., Sanger, W.G., Barnette, P., et al. (2011). Genome wide copy number analysis of paediatric Burkitt lymphoma using formalin-fixed tissues reveals a subset with gain of chromosome 13q and corresponding miRNA over expression. *Br J Haematol* 155, 477-486.
- Schilham, M.W., Oosterwegel, M.A., Moerer, P., Ya, J., de Boer, P.A., van de Wetering, M., Verbeek, S., Lamers, W.H., Kruisbeek, A.M., Cumano, A., et al. (1996). Defects in cardiac outflow tract formation and pro-B-lymphocyte expansion in mice lacking Sox-4. *Nature* 380, 711-714.
- Scholtysik, R., Kreuz, M., Klapper, W., Burkhardt, B., Feller, A.C., Hummel, M., Loeffler, M., Rosolowski, M., Schwaenen, C., Spang, R., et al. (2010). Detection of genomic aberrations in molecularly defined Burkitt's lymphoma by array-based, high resolution, single nucleotide polymorphism analysis. *Haematologica* 95, 2047-2055.
- Schouten, J.P., McElgunn, C.J., Waaijer, R., Zwijnenburg, D., Diepvens, F., and Pals, G. (2002). Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 30, e57.
- Schreiber, R.D., Old, L.J., and Smyth, M.J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331, 1565-1570.
- Schrock, E., du Manoir, S., Veldman, T., Schoell, B., Wienberg, J., Ferguson-Smith, M.A., Ning, Y., Ledbetter, D.H., Bar-Am, I., Soenksen, D., et al. (1996). Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 273, 494-497.
- Schwartzman, J.M., Sotillo, R., and Benezra, R. (2010). Mitotic chromosomal instability and cancer: mouse modelling of the human disease. *Nat Rev Cancer* 10, 102-115.
- Seab, J.A., and Graham, J.H. (1987). Primary cutaneous adenoid cystic carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 17, 113-118.
- Seabright, M. (1971). A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 2, 971-972.
- Seethala, R.R. (2009). An update on grading of salivary gland carcinomas. *Head Neck Pathol* 3, 69-77.
- Seethala, R.R., Cieply, K., Barnes, E.L., and Dacic, S. (2011). Progressive genetic alterations of adenoid cystic carcinoma with high-grade transformation. *Arch Pathol Lab Med* 135, 123-130.

- Selzer, R.R., Richmond, T.A., Pofahl, N.J., Green, R.D., Eis, P.S., Nair, P., Brothman, A.R., and Stallings, R.L. (2005). Analysis of chromosome breakpoints in neuroblastoma at sub-kilobase resolution using fine-tiling oligonucleotide array CGH. *Genes Chromosomes Cancer* 44, 305-319.
- Semenza, G.L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3, 721-732.
- Semenza, G.L. (2010). HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr Opin Genet Dev* 20, 51-56.
- Semenza, G.L. (2010). Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* 29, 625-634.
- Shaffer, A.L., Rosenwald, A., Hurt, E.M., Giltmane, J.M., Lam, L.T., Pickeral, O.K., and Staudt, L.M. (2001). Signatures of the immune response. *Immunity* 15, 375-385.
- Shaffer, L., Slovak, M., and Campbell, L. (2009). An International System For Human Cytogenetic Nomenclature (2009). (Basel, Karger).
- Sharpless, N.E., and DePinho, R.A. (2007). How stem cells age and why this makes us grow old. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 703-713.
- Shay, J.W., and Bacchetti, S. (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 33, 787-791.
- Shay, J.W., and Wright, W.E. (2000). Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 72-76.
- Shendure, J., Porreca, G.J., Reppas, N.B., Lin, X., McCutcheon, J.P., Rosenbaum, A.M., Wang, M.D., Zhang, K., Mitra, R.D., and Church, G.M. (2005). Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. *Science* 309, 1728-1732.
- Shepherd, F.A., Rodrigues Pereira, J., Ciuleanu, T., Tan, E.H., Hirsh, V., Thongprasert, S., Campos, D., Maoleekoonpiroj, S., Smylie, M., Martins, R., et al. (2005). Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 353, 123-132.
- Shields, J.D., Kourtis, I.C., Tomei, A.A., Roberts, J.M., and Swartz, M.A. (2010). Induction of lymphoidlike stroma and immune escape by tumors that express the chemokine CCL21. *Science* 328, 749-752.
- Shigematsu, H., Takahashi, T., Nomura, M., Majumdar, K., Suzuki, M., Lee, H., Wistuba, II, Fong, K.M., Toyooka, S., Shimizu, N., et al. (2005). Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas. *Cancer Res* 65, 1642-1646.
- Shih, C., Padhy, L.C., Murray, M., and Weinberg, R.A. (1981). Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature* 290, 261-264.
- Shih, I.M., Zhou, W., Goodman, S.N., Lengauer, C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (2001). Evidence that genetic instability occurs at an early stage of colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 61, 818-822.
- Shih, T.A., Meffre, E., Roederer, M., and Nussenzweig, M.C. (2002). Role of BCR affinity in T cell dependent antibody responses in vivo. *Nat Immunol* 3, 570-575.
- Shimura, K., Kageyama, S., Tao, H., Bunai, T., Suzuki, M., Kamo, T., Takamochi, K., Suzuki, K., Tanahashi, M., Niwa, H., et al. (2008). EML4-ALK fusion transcripts, but no NPM-, TPM3-, CLTC-, ATIC-, or TFG-ALK fusion transcripts, in non-small cell lung carcinomas. *Lung Cancer* 61, 163-169.
- Sieben, N.L., Macropoulos, P., Roemen, G.M., Kolkman-Uljee, S.M., Jan Fleuren, G., Houmadi, R., Diss, T., Warren, B., Al Adnani, M., De Goeij, A.P., et al. (2004). In ovarian neoplasms, BRAF, but not KRAS, mutations are restricted to low-grade serous tumours. *J Pathol* 202, 336-340.

- Simsek, D., and Jasin, M. (2010). Alternative end-joining is suppressed by the canonical NHEJ component Xrcc4-ligase IV during chromosomal translocation formation. *Nat Struct Mol Biol* 17, 410-416.
- Singh, A., Greninger, P., Rhodes, D., Koopman, L., Violette, S., Bardeesy, N., and Settleman, J. (2009). A gene expression signature associated with "K-Ras addiction" reveals regulators of EMT and tumor cell survival. *Cancer Cell* 15, 489-500.
- Sinha, S., and Levine, B. (2008). The autophagy effector Beclin 1: a novel BH3-only protein. *Oncogene* 27 Suppl 1, S137-148.
- Slater, R.M., Behrendt, H., and van Heerde, P. (1982). Cytogenetic studies on four cases of non-endemic Burkitt lymphoma. *Med Pediatr Oncol* 10, 71-84.
- Smirnov, D.A., Burdick, J.T., Morley, M., and Cheung, V.G. (2004). Method for manufacturing whole-genome microarrays by rolling circle amplification. *Genes Chromosomes Cancer* 40, 72-77.
- Smith, C.L., and Peterson, C.L. (2005). ATP-dependent chromatin remodeling. *Curr Top Dev Biol* 65, 115-148.
- Smyth, G.K., Michaud, J., and Scott, H.S. (2005). Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics* 21, 2067-2075.
- Smyth, M.J., Dunn, G.P., and Schreiber, R.D. (2006). Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol* 90, 1-50.
- Snijders, A.M., Fridlyand, J., Mans, D.A., Segraves, R., Jain, A.N., Pinkel, D., and Albertson, D.G. (2003). Shaping of tumor and drug-resistant genomes by instability and selection. *Oncogene* 22, 4370-4379.
- Snijders, A.M., Nowak, N., Segraves, R., Blackwood, S., Brown, N., Conroy, J., Hamilton, G., Hindle, A.K., Huey, B., Kimura, K., et al. (2001). Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. *Nat Genet* 29, 263-264.
- Snijders, A.M., Schmidt, B.L., Fridlyand, J., Dekker, N., Pinkel, D., Jordan, R.C., and Albertson, D.G. (2005). Rare amplicons implicate frequent deregulation of cell fate specification pathways in oral squamous cell carcinoma. *Oncogene* 24, 4232-4242.
- Sobol, H., Benziane, A., Kerangueven, F., Yin, L., Noguchi, T., Pauly, S., Eisinger, F., Longy, M., Romeo, G., Lenoir, G., et al. (2002). Genome-wide search for loss of heterozygosity in Burkitt lymphoma cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* 33, 217-224.
- Soda, M., Choi, Y.L., Enomoto, M., Takada, S., Yamashita, Y., Ishikawa, S., Fujiwara, S., Watanabe, H., Kurashina, K., Hatanaka, H., et al. (2007). Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 448, 561-566.
- Solinas-Toldo, S., Lampel, S., Stilgenbauer, S., Nickolenko, J., Benner, A., Dohner, H., Cremer, T., and Lichter, P. (1997). Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 20, 399-407.
- Solomon, D.A., Kim, T., Diaz-Martinez, L.A., Fair, J., Elkahloun, A.G., Harris, B.T., Toretsky, J.A., Rosenberg, S.A., Shukla, N., Ladanyi, M., et al. (2011). Mutational inactivation of STAG2 causes aneuploidy in human cancer. *Science* 333, 1039-1043.
- Sotillo, R., Schwartzman, J.M., Succi, N.D., and Benezra, R. (2010). Mad2-induced chromosome instability leads to lung tumour relapse after oncogene withdrawal. *Nature* 464, 436-440.
- Soussi, T. (1999). [Record no. 23: hMLH1]. *Bull Cancer* 86, 245-246.

- Speicher, M.R., Gwyn Ballard, S., and Ward, D.C. (1996). Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 12, 368-375.
- Spiro, R.H., and Huvos, A.G. (1992). Stage means more than grade in adenoid cystic carcinoma. *Am J Surg* 164, 623-628.
- Stenman, G., Andersson, M.K., and Andren, Y. (2010). New tricks from an old oncogene: gene fusion and copy number alterations of MYB in human cancer. *Cell Cycle* 9, 2986-2995.
- Stenman, G., Sandros, J., Dahlenfors, R., Juberg-Ode, M., and Mark, J. (1986). 6q- and loss of the Y chromosome--two common deviations in malignant human salivary gland tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 22, 283-293.
- Stephens, P., Hunter, C., Bignell, G., Edkins, S., Davies, H., Teague, J., Stevens, C., O'Meara, S., Smith, R., Parker, A., et al. (2004). Lung cancer: intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours. *Nature* 431, 525-526.
- Stephens, P.J., Greenman, C.D., Fu, B., Yang, F., Bignell, G.R., Mudie, L.J., Pleasance, E.D., Lau, K.W., Beare, D., Stebbings, L.A., et al. (2011). Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell* 144, 27-40.
- Stojic, L., Brun, R., and Jiricny, J. (2004). Mismatch repair and DNA damage signalling. *DNA Repair (Amst)* 3, 1091-1101.
- Strahl, B.D., and Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45.
- Stratton, M.R. (2011). Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise. *Science* 331, 1553-1558.
- Stratton, M.R., Campbell, P.J., and Futreal, P.A. (2009). The cancer genome. *Nature* 458, 719-724.
- Strauss, D.C., and Thomas, J.M. (2010). Transmission of donor melanoma by organ transplantation. *Lancet Oncol* 11, 790-796.
- Suda, K., Tomizawa, K., Yatabe, Y., and Mitsudomi, T. (2011). Lung cancers unrelated to smoking: characterized by single oncogene addiction? *Int J Clin Oncol* 16, 294-305.
- Sudakin, V., Ganoth, D., Dahan, A., Heller, H., Hershko, J., Luca, F.C., Ruderman, J.V., and Hershko, A. (1995). The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Mol Biol Cell* 6, 185-197.
- Sun, S., Schiller, J.H., and Gazdar, A.F. (2007). Lung cancer in never smokers--a different disease. *Nat Rev Cancer* 7, 778-790.
- Sun, Y., Ren, Y., Fang, Z., Li, C., Fang, R., Gao, B., Han, X., Tian, W., Pao, W., Chen, H., et al. (2010). Lung adenocarcinoma from East Asian never-smokers is a disease largely defined by targetable oncogenic mutant kinases. *J Clin Oncol* 28, 4616-4620.
- Szanto, P.A., Luna, M.A., Tortoledo, M.E., and White, R.A. (1984). Histologic grading of adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *Cancer* 54, 1062-1069.
- Tabin, C.J., Bradley, S.M., Bargmann, C.I., Weinberg, R.A., Papageorge, A.G., Scolnick, E.M., Dhar, R., Lowy, D.R., and Chang, E.H. (1982). Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* 300, 143-149.
- Taft, R.J., Pang, K.C., Mercer, T.R., Dinger, M., and Mattick, J.S. (2010). Non-coding RNAs: regulators of disease. *J Pathol* 220, 126-139.

- Tagawa, H., and Seto, M. (2005). A microRNA cluster as a target of genomic amplification in malignant lymphoma. *Leukemia* 19, 2013-2016.
- Takahashi, M., Ritz, J., and Cooper, G.M. (1985). Activation of a novel human transforming gene, *ret*, by DNA rearrangement. *Cell* 42, 581-588.
- Takeuchi, K., Choi, Y.L., Togashi, Y., Soda, M., Hatano, S., Inamura, K., Takada, S., Ueno, T., Yamashita, Y., Satoh, Y., et al. (2009). KIF5B-ALK, a novel fusion oncokine identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res* 15, 3143-3149.
- Takeuchi, K., Soda, M., Togashi, Y., Suzuki, R., Sakata, S., Hatano, S., Asaka, R., Hamanaka, W., Ninomiya, H., Uehara, H., et al. (2012). RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med* 18, 378-381.
- Talmadge, J.E., and Fidler, I.J. (2010). AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res* 70, 5649-5669.
- Tam, I.Y., Chung, L.P., Suen, W.S., Wang, E., Wong, M.C., Ho, K.K., Lam, W.K., Chiu, S.W., Girard, L., Minna, J.D., et al. (2006). Distinct epidermal growth factor receptor and KRAS mutation patterns in non-small cell lung cancer patients with different tobacco exposure and clinicopathologic features. *Clin Cancer Res* 12, 1647-1653.
- Tang, X., Varella-Garcia, M., Xavier, A.C., Massarelli, E., Ozburn, N., Moran, C., and Wistuba, II (2008). Epidermal growth factor receptor abnormalities in the pathogenesis and progression of lung adenocarcinomas. *Cancer Prev Res (Phila)* 1, 192-200.
- Tang, Y.C., Williams, B.R., Siegel, J.J., and Amon, A. (2011). Identification of aneuploidy-selective antiproliferation compounds. *Cell* 144, 499-512.
- Tang, Z., Du, R., Jiang, S., Wu, C., Barkauskas, D.S., Richey, J., Molter, J., Lam, M., Flask, C., Gerson, S., et al. (2008). Dual MET-EGFR combinatorial inhibition against T790M-EGFR-mediated erlotinib-resistant lung cancer. *Br J Cancer* 99, 911-922.
- Tanke, H.J., Wiegant, J., van Gijlswijk, R.P., Bezrookove, V., Pattenier, H., Heetebrij, R.J., Talman, E.G., Raap, A.K., and Vrolijk, J. (1999). New strategy for multi-colour fluorescence in situ hybridisation: COBRA: COmbined Binary RATio labelling. *Eur J Hum Genet* 7, 2-11.
- Taub, R., Kirsch, I., Morton, C., Lenoir, G., Swan, D., Tronick, S., Aaronson, S., and Leder, P. (1982). Translocation of the *c-myc* gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 7837-7841.
- Taube, J.H., Herschkowitz, J.I., Komurov, K., Zhou, A.Y., Gupta, S., Yang, J., Hartwell, K., Onder, T.T., Gupta, P.B., Evans, K.W., et al. (2010). Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 15449-15454.
- Telenius, H., Pelmear, A.H., Tunnacliffe, A., Carter, N.P., Behmel, A., Ferguson-Smith, M.A., Nordenskjold, M., Pfragner, R., and Ponder, B.A. (1992). Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes. *Genes Chromosomes Cancer* 4, 257-263.
- Teng, M.W., Swann, J.B., Koebel, C.M., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2008). Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. *J Leukoc Biol* 84, 988-993.
- Thatcher, N., Chang, A., Parikh, P., Rodrigues Pereira, J., Ciuleanu, T., von Pawel, J., Thongprasert, S., Tan, E.H., Pemberton, K., Archer, V., et al. (2005). Gefitinib plus best supportive care in previously treated

- patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: results from a randomised, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer). *Lancet* 366, 1527-1537.
- The 1000 Genomes Project, C. (2010). A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 467, 1061-1073.
- Thiagalasingam, S., Laken, S., Willson, J.K., Markowitz, S.D., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Lengauer, C. (2001). Mechanisms underlying losses of heterozygosity in human colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2698-2702.
- Thiery, J.P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2, 442-454.
- Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y., and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871-890.
- Thiery, J.P., and Sleeman, J.P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 131-142.
- Thompson, S.L., Bakhoun, S.F., and Compton, D.A. (2010). Mechanisms of chromosomal instability. *Curr Biol* 20, R285-295.
- Thomson, J.M., Newman, M., Parker, J.S., Morin-Kensicki, E.M., Wright, T., and Hammond, S.M. (2006). Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes Dev* 20, 2202-2207.
- Thorgeirsson, T.E., Geller, F., Sulem, P., Rafnar, T., Wiste, A., Magnusson, K.P., Manolescu, A., Thorleifsson, G., Stefansson, H., Ingason, A., et al. (2008). A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease. *Nature* 452, 638-642.
- Thu, K.L., Vucic, E.A., Chari, R., Zhang, W., Lockwood, W.W., English, J.C., Fu, R., Wang, P., Feng, Z., MacAulay, C.E., et al. (2012). Lung adenocarcinoma of never smokers and smokers harbor differential regions of genetic alteration and exhibit different levels of genomic instability. *PLoS One* 7, e33003.
- Thun, M.J., Hannan, L.M., Adams-Campbell, L.L., Boffetta, P., Buring, J.E., Feskanich, D., Flanders, W.D., Jee, S.H., Katanoda, K., Kolonel, L.N., et al. (2008). Lung cancer occurrence in never-smokers: an analysis of 13 cohorts and 22 cancer registry studies. *PLoS Med* 5, e185.
- Till, J.E., and Mc, C.E. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 14, 213-222.
- Tjio, J., and A, L. (1956). The chromosome number of man. *Hereditas* 42, 1-6.
- Tjio, J.H., and Whang, J. (1962). Chromosome preparations of bone marrow cells without prior in vitro culture or in vivo colchicine administration. *Stain Technol* 37, 17-20.
- Tlsty, T.D., Margolin, B.H., and Lum, K. (1989). Differences in the rates of gene amplification in nontumorigenic and tumorigenic cell lines as measured by Luria-Delbruck fluctuation analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 9441-9445.
- Toh, C.K., and Lim, W.T. (2007). Lung cancer in never-smokers. *J Clin Pathol* 60, 337-340.
- Tomita, K., van Bokhoven, A., van Leenders, G.J., Ruijter, E.T., Jansen, C.F., Bussemakers, M.J., and Schalken, J.A. (2000). Cadherin switching in human prostate cancer progression. *Cancer Res* 60, 3650-3654.

- Tomizawa, K., Suda, K., Onozato, R., Kosaka, T., Endoh, H., Sekido, Y., Shigematsu, H., Kuwano, H., Yatabe, Y., and Mitsudomi, T. (2011). Prognostic and predictive implications of HER2/ERBB2/neu gene mutations in lung cancers. *Lung Cancer* 74, 139-144.
- Tomlins, S.A., Rhodes, D.R., Perner, S., Dhanasekaran, S.M., Mehra, R., Sun, X.W., Varambally, S., Cao, X., Tchinda, J., Kuefer, R., et al. (2005). Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 310, 644-648.
- Tomlinson, I.P., Beck, N.E., and Bodmer, W.F. (1996). Allele loss on chromosome 11q and microsatellite instability in malignant melanoma. *Eur J Cancer* 32A, 1797-1802.
- Tomlinson, I.P., Novelli, M.R., and Bodmer, W.F. (1996). The mutation rate and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14800-14803.
- Toujani, S., Dessen, P., Ithzar, N., Danglot, G., Richon, C., Vassetzky, Y., Robert, T., Lazar, V., Bosq, J., Da Costa, L., et al. (2009). High resolution genome-wide analysis of chromosomal alterations in Burkitt's lymphoma. *PLoS One* 4, e7089.
- Toyooka, S., Tokumo, M., Shigematsu, H., Matsuo, K., Asano, H., Tomii, K., Ichihara, S., Suzuki, M., Aoe, M., Date, H., et al. (2006). Mutational and epigenetic evidence for independent pathways for lung adenocarcinomas arising in smokers and never smokers. *Cancer Res* 66, 1371-1375.
- Trahey, M., and McCormick, F. (1987). A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science* 238, 542-545.
- Trapnell, C., and Salzberg, S.L. (2009). How to map billions of short reads onto genomes. *Nat Biotechnol* 27, 455-457.
- Travis, W. (2004). Adenocarcinoma. In *Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*, W.D. Travis, E. Brambilla, H.K. Müller-Hermelink, and C.C. Harris, eds. (Lyon, France, IARC press).
- Travis, W.D., Brambilla, E., Noguchi, M., Nicholson, A.G., Geisinger, K.R., Yatabe, Y., Beer, D.G., Powell, C.A., Riely, G.J., Van Schil, P.E., et al. (2011). International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 6, 244-285.
- Trentesaux, C., and Riou, J.F. (2010). [Senescence and cellular immortality]. *Bull Cancer* 97, 1275-1283.
- Truong, T., Hung, R.J., Amos, C.I., Wu, X., Bickeboller, H., Rosenberger, A., Sauter, W., Illig, T., Wichmann, H.E., Risch, A., et al. (2010). Replication of lung cancer susceptibility loci at chromosomes 15q25, 5p15, and 6p21: a pooled analysis from the International Lung Cancer Consortium. *J Natl Cancer Inst* 102, 959-971.
- Tsao, M.S., Sakurada, A., Cutz, J.C., Zhu, C.Q., Kamel-Reid, S., Squire, J., Lorimer, I., Zhang, T., Liu, N., Daneshmand, M., et al. (2005). Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med* 353, 133-144.
- Turner, H.E., Harris, A.L., Melmed, S., and Wass, J.A. (2003). Angiogenesis in endocrine tumors. *Endocr Rev* 24, 600-632.
- Tuxhorn, J.A., McAlhany, S.J., Yang, F., Dang, T.D., and Rowley, D.R. (2002). Inhibition of transforming growth factor-beta activity decreases angiogenesis in a human prostate cancer-reactive stroma xenograft model. *Cancer Res* 62, 6021-6025.

- Urbich, C., Kuehbach, A., and Dimmeler, S. (2008). Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc Res* 79, 581-588.
- Uro-Coste, E. (2009). [2009 update in salivary gland tumoral pathology]. *Ann Pathol* 29, 274-285.
- Vader, G., and Lens, S.M. (2008). The Aurora kinase family in cell division and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1786, 60-72.
- Vainchenker, W., Dusa, A., and Constantinescu, S.N. (2008). JAKs in pathology: role of Janus kinases in hematopoietic malignancies and immunodeficiencies. *Semin Cell Dev Biol* 19, 385-393.
- Vajdic, C.M., and van Leeuwen, M.T. (2009). Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation. *Int J Cancer* 125, 1747-1754.
- Valastyan, S., and Weinberg, R.A. (2011). Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell* 147, 275-292.
- Van Buggenhout, G., Melotte, C., Dutta, B., Froyen, G., Van Hummelen, P., Marynen, P., Matthijs, G., de Ravel, T., Devriendt, K., Fryns, J.P., et al. (2004). Mild Wolf-Hirschhorn syndrome: micro-array CGH analysis of atypical 4p16.3 deletions enables refinement of the genotype-phenotype map. *J Med Genet* 41, 691-698.
- van den Berghe, H., Parloir, A., Gosseye, S., Englebienne, V., Cornu, G., and Sokal, G. (1979). Variant translocation in Burkitt lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1, 9-14.
- van Kouwenhove, M., Kedde, M., and Agami, R. (2011). MicroRNA regulation by RNA-binding proteins and its implications for cancer. *Nat Rev Cancer* 11, 644-656.
- van Krieken, J.H. (2004). Lymphoproliferative disease associated with immune deficiency in children. *Am J Clin Pathol* 122 Suppl, S122-127.
- Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T., and Kroemer, G. (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 700-714.
- Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324, 1029-1033.
- Vasilatou, D., Papageorgiou, S., Pappa, V., Papageorgiou, E., and Dervenoulas, J. (2010). The role of microRNAs in normal and malignant hematopoiesis. *Eur J Haematol* 84, 1-16.
- Vassilev, L.T., Vu, B.T., Graves, B., Carvajal, D., Podlaski, F., Filipovic, Z., Kong, N., Kammlott, U., Lukacs, C., Klein, C., et al. (2004). In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 303, 844-848.
- Vasudevan, S., Tong, Y., and Steitz, J.A. (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318, 1931-1934.
- Vekony, H., Ylstra, B., Wilting, S.M., Meijer, G.A., van de Wiel, M.A., Leemans, C.R., van der Waal, I., and Bloemena, E. (2007). DNA copy number gains at loci of growth factors and their receptors in salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Clin Cancer Res* 13, 3133-3139.
- Ventura, A., Young, A.G., Winslow, M.M., Lintault, L., Meissner, A., Erkeland, S.J., Newman, J., Bronson, R.T., Crowley, D., Stone, J.R., et al. (2008). Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell* 132, 875-886.
- Verhaak, R.G., Hoadley, K.A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M.D., Miller, C.R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J.P., et al. (2010). Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of

- glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17, 98-110.
- Vesely, M.D., Kershaw, M.H., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2011). Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol* 29, 235-271.
- Visel, A., Thaller, C., and Eichele, G. (2004). GenePaint.org: an atlas of gene expression patterns in the mouse embryo. *Nucleic Acids Res* 32, D552-556.
- Vleminckx, K., Vakaet, L., Jr., Mareel, M., Fiers, W., and van Roy, F. (1991). Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* 66, 107-119.
- Vogelstein, B., Fearon, E.R., Kern, S.E., Hamilton, S.R., Preisinger, A.C., Nakamura, Y., and White, R. (1989). Allelotyping of colorectal carcinomas. *Science* 244, 207-211.
- Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10, 789-799.
- Vogt, N., Lefevre, S.H., Apiou, F., Dutrillaux, A.M., Cor, A., Leuraud, P., Poupon, M.F., Dutrillaux, B., Debatisse, M., and Malfoy, B. (2004). Molecular structure of double-minute chromosomes bearing amplified copies of the epidermal growth factor receptor gene in gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11368-11373.
- Volpert, O.V., Dameron, K.M., and Bouck, N. (1997). Sequential development of an angiogenic phenotype by human fibroblasts progressing to tumorigenicity. *Oncogene* 14, 1495-1502.
- Volpert, O.V., Zaichuk, T., Zhou, W., Reiher, F., Ferguson, T.A., Stuart, P.M., Amin, M., and Bouck, N.P. (2002). Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor. *Nat Med* 8, 349-357.
- von Hansemann, D. (1890). Ueber asymmetrische Zelltheilung in epithel Krebsen und deren biologische Bedeutung. *Virchow's Arch Path Anat* 119, 2999.
- Vousden, K.H., Crook, T., and Farrell, P.J. (1993). Biological activities of p53 mutants in Burkitt's lymphoma cells. *J Gen Virol* 74 (Pt 5), 803-810.
- Vyas, P., and Jacobsen, S.E. (2011). Clever leukemic stem cells branch out. *Cell Stem Cell* 8, 242-244.
- Waddington, C.H. (1939). Preliminary Notes on the Development of the Wings in Normal and Mutant Strains of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 25, 299-307.
- Wagner, S.D., and Neuberger, M.S. (1996). Somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Annu Rev Immunol* 14, 441-457.
- Wakelee, H.A., Chang, E.T., Gomez, S.L., Keegan, T.H., Feskanich, D., Clarke, C.A., Holmberg, L., Yong, L.C., Kolonel, L.N., Gould, M.K., et al. (2007). Lung cancer incidence in never smokers. *J Clin Oncol* 25, 472-478.
- Waldman, F.M., DeVries, S., Chew, K.L., Moore, D.H., 2nd, Kerlikowske, K., and Ljung, B.M. (2000). Chromosomal alterations in ductal carcinomas in situ and their in situ recurrences. *J Natl Cancer Inst* 92, 313-320.
- Wang, C.C., See, L.C., Hong, J.H., and Tang, S.G. (1996). Nasopharyngeal adenoid cystic carcinoma: five new cases and a literature review. *J Otolaryngol* 25, 399-403.
- Wang, G.G., Allis, C.D., and Chi, P. (2007). Chromatin remodeling and cancer, Part I: Covalent histone modifications. *Trends Mol Med* 13, 363-372.
- Wang, J.C., and Dick, J.E. (2005). Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends Cell Biol* 15, 494-501.

- Wang, J.H., Gostissa, M., Yan, C.T., Goff, P., Hickernell, T., Hansen, E., Difilippantonio, S., Wesemann, D.R., Zarrin, A.A., Rajewsky, K., et al. (2009). Mechanisms promoting translocations in editing and switching peripheral B cells. *Nature* 460, 231-236.
- Wang, Y., Broderick, P., Webb, E., Wu, X., Vijayakrishnan, J., Matakidou, A., Qureshi, M., Dong, Q., Gu, X., Chen, W.V., et al. (2008). Common 5p15.33 and 6p21.33 variants influence lung cancer risk. *Nat Genet* 40, 1407-1409.
- Wang, Z., Gerstein, M., and Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 10, 57-63.
- Wang-Rodriguez, J., Urquidi, V., Rivard, A., and Goodison, S. (2003). Elevated osteopontin and thrombospondin expression identifies malignant human breast carcinoma but is not indicative of metastatic status. *Breast Cancer Res* 5, R136-143.
- Warburg, O. (1956). On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124, 269-270.
- Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science* 123, 309-314.
- Wassmann, K., and Benzra, R. (1998). Mad2 transiently associates with an APC/p55Cdc complex during mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11193-11198.
- Watnick, R.S., Cheng, Y.N., Rangarajan, A., Ince, T.A., and Weinberg, R.A. (2003). Ras modulates Myc activity to repress thrombospondin-1 expression and increase tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 3, 219-231.
- Watson, J.D., and Crick, F.H. (1974). Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. J.D. Watson and F.H.C. Crick. Published in *Nature*, number 4356 April 25, 1953. *Nature* 248, 765.
- Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M.B., Ramos, L., Paabo, S., Rebhan, M., and Schubeler, D. (2007). Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet* 39, 457-466.
- Weill, J.C., Weller, S., and Reynaud, C.A. (2009). Human marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol* 27, 267-285.
- Weinberg, R.A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81, 323-330.
- Weinberg, R.A. (2007). *The biology of cancer* (New York, Garland Science).
- Weinrich, S.L., Pruzan, R., Ma, L., Ouellette, M., Tesmer, V.M., Holt, S.E., Bodnar, A.G., Lichtsteiner, S., Kim, N.W., Trager, J.B., et al. (1997). Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTERT. *Nat Genet* 17, 498-502.
- Weinstein, I.B., and Joe, A. (2008). Oncogene addiction. *Cancer Res* 68, 3077-3080; discussion 3080.
- Weir, B.A., Woo, M.S., Getz, G., Perner, S., Ding, L., Beroukhi, R., Lin, W.M., Province, M.A., Kraja, A., Johnson, L.A., et al. (2007). Characterizing the cancer genome in lung adenocarcinoma. *Nature* 450, 893-898.
- Weiss, M.M., Kuipers, E.J., Postma, C., Snijders, A.M., Pinkel, D., Meuwissen, S.G., Albertson, D., and Meijer, G.A. (2004). Genomic alterations in primary gastric adenocarcinomas correlate with clinicopathological characteristics and survival. *Cell Oncol* 26, 307-317.
- Welch, J.S., Westervelt, P., Ding, L., Larson, D.E., Klco, J.M., Kulkarni, S., Wallis, J., Chen, K., Payton, J.E., Fulton, R.S., et al. (2011). Use of whole-genome sequencing to diagnose a cryptic fusion oncogene. *JAMA* 305, 1577-1584.

- West, L., Vidwans, S.J., Campbell, N.P., Shrager, J., Simon, G.R., Bueno, R., Dennis, P.A., Otterson, G.A., and Salgia, R. (2012). A novel classification of lung cancer into molecular subtypes. *PLoS One* 7, e31906.
- West, R.B., Kong, C., Clarke, N., Gilks, T., Lipsick, J.S., Cao, H., Kwok, S., Montgomery, K.D., Varma, S., and Le, Q.T. (2011). MYB expression and translocation in adenoid cystic carcinomas and other salivary gland tumors with clinicopathologic correlation. *Am J Surg Pathol* 35, 92-99.
- Wetterskog, D., Lopez-Garcia, M.A., Lambros, M.B., A'Hern, R., Geyer, F.C., Milanezi, F., Cabral, M.C., Natrajan, R., Gauthier, A., Shiu, K.K., et al. (2012). Adenoid cystic carcinomas constitute a genomically distinct subgroup of triple-negative and basal-like breast cancers. *J Pathol* 226, 84-96.
- White, E., and DiPaola, R.S. (2009). The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clin Cancer Res* 15, 5308-5316.
- White, E., Karp, C., Strohecker, A.M., Guo, Y., and Mathew, R. (2010). Role of autophagy in suppression of inflammation and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 22, 212-217.
- Wikenheiser-Brokamp, K.A. (2006). Retinoblastoma regulatory pathway in lung cancer. *Curr Mol Med* 6, 783-793.
- William, J., Euler, C., Christensen, S., and Shlomchik, M.J. (2002). Evolution of autoantibody responses via somatic hypermutation outside of germinal centers. *Science* 297, 2066-2070.
- Willis, T.G., Zalcborg, I.R., Coignet, L.J., Wlodarska, I., Stul, M., Jadayel, D.M., Bastard, C., Treleaven, J.G., Catovsky, D., Silva, M.L., et al. (1998). Molecular cloning of translocation t(1;14)(q21;q32) defines a novel gene (BCL9) at chromosome 1q21. *Blood* 91, 1873-1881.
- Wilson, A., Oser, G.M., Jaworski, M., Blanco-Bose, W.E., Laurenti, E., Adolphe, C., Essers, M.A., Macdonald, H.R., and Trumpp, A. (2007). Dormant and self-renewing hematopoietic stem cells and their niches. *Ann N Y Acad Sci* 1106, 64-75.
- Wilson, B.G., and Roberts, C.W. (2011). SWI/SNF nucleosome remodellers and cancer. *Nat Rev Cancer* 11, 481-492.
- Wilson, J.F., Kjeldsberg, C.R., Sposto, R., Jenkin, R.D., Chilcote, R.R., Coccia, P., Exelby, R.R., Kersey, J., Meadows, A., Siegel, S., et al. (1987). The pathology of non-Hodgkin's lymphoma of childhood: II. Reproducibility and relevance of the histologic classification of "undifferentiated" lymphomas (Burkitt's versus non-Burkitt's). *Hum Pathol* 18, 1008-1014.
- Wilusz, J.E., Sunwoo, H., and Spector, D.L. (2009). Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world. *Genes Dev* 23, 1494-1504.
- Wiman, K.G., Magnusson, K.P., Ramqvist, T., and Klein, G. (1991). Mutant p53 detected in a majority of Burkitt lymphoma cell lines by monoclonal antibody PAb240. *Oncogene* 6, 1633-1639.
- Winslow, M.M., Dayton, T.L., Verhaak, R.G., Kim-Kiselak, C., Snyder, E.L., Feldser, D.M., Hubbard, D.D., DuPage, M.J., Whittaker, C.A., Hoersch, S., et al. (2011). Suppression of lung adenocarcinoma progression by Nkx2-1. *Nature* 473, 101-104.
- Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R.I., and Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* 11, 228-234.
- Wold, B., and Myers, R.M. (2008). Sequence census methods for functional genomics. *Nat Methods* 5, 19-21.
- Wong, D.W., Leung, E.L., Wong, S.K., Tin, V.P., Sihoe, A.D., Cheng, L.C., Au, J.S., Chung, L.P., and Wong, M.P. (2011). A novel KIF5B-ALK variant in nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 117, 2709-2718.

- Wong, M.P., Fung, L.F., Wang, E., Chow, W.S., Chiu, S.W., Lam, W.K., Ho, K.K., Ma, E.S., Wan, T.S., and Chung, L.P. (2003). Chromosomal aberrations of primary lung adenocarcinomas in nonsmokers. *Cancer* 97, 1263-1270.
- Wong, M.P., Lam, W.K., Wang, E., Chiu, S.W., Lam, C.L., and Chung, L.P. (2002). Primary adenocarcinomas of the lung in nonsmokers show a distinct pattern of allelic imbalance. *Cancer Res* 62, 4464-4468.
- Xiao, C., Calado, D.P., Galler, G., Thai, T.H., Patterson, H.C., Wang, J., Rajewsky, N., Bender, T.P., and Rajewsky, K. (2007). MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb. *Cell* 131, 146-159.
- Xiao, C., Srinivasan, L., Calado, D.P., Patterson, H.C., Zhang, B., Wang, J., Henderson, J.M., Kutok, J.L., and Rajewsky, K. (2008). Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat Immunol* 9, 405-414.
- Yamamoto, K., Okamoto, A., Isonishi, S., Ochiai, K., and Ohtake, Y. (2001). A novel gene, CRR9, which was up-regulated in CDDP-resistant ovarian tumor cell line, was associated with apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 280, 1148-1154.
- Yamamoto, Y., Virmani, A.K., Wistuba, II, McIntire, D., Vuitch, F., Albores-Saavedra, J., and Gazdar, A.F. (1996). Loss of heterozygosity and microsatellite alterations in p53 and RB genes in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *Hum Pathol* 27, 1204-1210.
- Yamamoto, Y., Wistuba, II, Kishimoto, Y., Virmani, A.K., Vuitch, F., Albores-Saavedra, J., and Gazdar, A.F. (1998). DNA analysis at p53 locus in adenoid cystic carcinoma: comparison of molecular study and p53 immunostaining. *Pathol Int* 48, 273-280.
- Yan, C.T., Boboila, C., Souza, E.K., Franco, S., Hickernell, T.R., Murphy, M., Gumaste, S., Geyer, M., Zarrin, A.A., Manis, J.P., et al. (2007). IgH class switching and translocations use a robust non-classical end-joining pathway. *Nature* 449, 478-482.
- Yanaihara, N., Caplen, N., Bowman, E., Seike, M., Kumamoto, K., Yi, M., Stephens, R.M., Okamoto, A., Yokota, J., Tanaka, T., et al. (2006). Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 9, 189-198.
- Yancopoulos, G.D., Davis, S., Gale, N.W., Rudge, J.S., Wiegand, S.J., and Holash, J. (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407, 242-248.
- Yang, J., and Weinberg, R.A. (2008). Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell* 14, 818-829.
- Yang, L., Pang, Y., and Moses, H.L. (2010). TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol* 31, 220-227.
- Yarden, R.I., Pardo-Reoyo, S., Sgagias, M., Cowan, K.H., and Brody, L.C. (2002). BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage. *Nat Genet* 30, 285-289.
- Yatabe, Y., Takahashi, T., and Mitsudomi, T. (2008). Epidermal growth factor receptor gene amplification is acquired in association with tumor progression of EGFR-mutated lung cancer. *Cancer Res* 68, 2106-2111.
- Yen, K.E., Bittinger, M.A., Su, S.M., and Fantin, V.R. (2010). Cancer-associated IDH mutations: biomarker and therapeutic opportunities. *Oncogene* 29, 6409-6417.

- Yendamuri, S., and Calin, G.A. (2009). The role of microRNA in human leukemia: a review. *Leukemia* 23, 1257-1263.
- Yilmaz, O.H., Valdez, R., Theisen, B.K., Guo, W., Ferguson, D.O., Wu, H., and Morrison, S.J. (2006). Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells. *Nature* 441, 475-482.
- Ylstra, B., van den Ijssel, P., Carvalho, B., Brakenhoff, R.H., and Meijer, G.A. (2006). BAC to the future! or oligonucleotides: a perspective for micro array comparative genomic hybridization (array CGH). *Nucleic Acids Res* 34, 445-450.
- Yoshida, T., Ng, S.Y., Zuniga-Pflucker, J.C., and Georgopoulos, K. (2006). Early hematopoietic lineage restrictions directed by Ikaros. *Nat Immunol* 7, 382-391.
- Yoshida, Y., Shibata, T., Kokubu, A., Tsuta, K., Matsuno, Y., Kanai, Y., Asamura, H., Tsuchiya, R., and Hirohashi, S. (2005). Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in atypical adenomatous hyperplasia and bronchioloalveolar carcinoma of the lung. *Lung Cancer* 50, 1-8.
- Yoshiura, K., Machida, J., Daack-Hirsch, S., Patil, S.R., Ashworth, L.K., Hecht, J.T., and Murray, J.C. (1998). Characterization of a novel gene disrupted by a balanced chromosomal translocation t(2;19)(q11.2;q13.3) in a family with cleft lip and palate. *Genomics* 54, 231-240.
- You, M., Wang, D., Liu, P., Vikis, H., James, M., Lu, Y., Wang, Y., Wang, M., Chen, Q., Jia, D., et al. (2009). Fine mapping of chromosome 6q23-25 region in familial lung cancer families reveals RGS17 as a likely candidate gene. *Clin Cancer Res* 15, 2666-2674.
- Yu, Y., Baras, A.S., Shirasuna, K., Frierson, H.F., Jr., and Moskaluk, C.A. (2007). Concurrent loss of heterozygosity and copy number analysis in adenoid cystic carcinoma by SNP genotyping arrays. *Lab Invest* 87, 430-439.
- Yuan, T.L., and Cantley, L.C. (2008). PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* 27, 5497-5510.
- Zandi, S., Bryder, D., and Sigvardsson, M. (2010). Load and lock: the molecular mechanisms of B-lymphocyte commitment. *Immunol Rev* 238, 47-62.
- Zech, L., Haglund, U., Nilsson, K., and Klein, G. (1976). Characteristic chromosomal abnormalities in biopsies and lymphoid-cell lines from patients with Burkitt and non-Burkitt lymphomas. *Int J Cancer* 17, 47-56.
- Zee, Y.K., O'Connor, J.P., Parker, G.J., Jackson, A., Clamp, A.R., Taylor, M.B., Clarke, N.W., and Jayson, G.C. (2010). Imaging angiogenesis of genitourinary tumors. *Nat Rev Urol* 7, 69-82.
- Zell, J.A., Ou, S.H., Ziogas, A., and Anton-Culver, H. (2005). Epidemiology of bronchioloalveolar carcinoma: improvement in survival after release of the 1999 WHO classification of lung tumors. *J Clin Oncol* 23, 8396-8405.
- Zhang, L., Reynolds, T.L., Shan, X., and Desiderio, S. (2011). Coupling of V(D)J recombination to the cell cycle suppresses genomic instability and lymphoid tumorigenesis. *Immunity* 34, 163-174.
- Zhang, Y., Gostissa, M., Hildebrand, D.G., Becker, M.S., Boboila, C., Chiarle, R., Lewis, S., and Alt, F.W. (2010). The role of mechanistic factors in promoting chromosomal translocations found in lymphoid and other cancers. *Adv Immunol* 106, 93-133.
- Zhang, Y., and Rowley, J.D. (2006). Chromatin structural elements and chromosomal translocations in leukemia. *DNA Repair (Amst)* 5, 1282-1297.

- Zhang, Z., Wang, Y., Vikis, H.G., Johnson, L., Liu, G., Li, J., Anderson, M.W., Sills, R.C., Hong, H.L., Devereux, T.R., et al. (2001). Wildtype Kras2 can inhibit lung carcinogenesis in mice. *Nat Genet* 29, 25-33.
- Zhao, X., Li, C., Paez, J.G., Chin, K., Janne, P.A., Chen, T.H., Girard, L., Minna, J., Christiani, D., Leo, C., et al. (2004). An integrated view of copy number and allelic alterations in the cancer genome using single nucleotide polymorphism arrays. *Cancer Res* 64, 3060-3071.
- Zhao, X., Weir, B.A., LaFramboise, T., Lin, M., Beroukhi, R., Garraway, L., Beheshti, J., Lee, J.C., Naoki, K., Richards, W.G., et al. (2005). Homozygous deletions and chromosome amplifications in human lung carcinomas revealed by single nucleotide polymorphism array analysis. *Cancer Res* 65, 5561-5570.
- Zhu, C., Mills, K.D., Ferguson, D.O., Lee, C., Manis, J., Fleming, J., Gao, Y., Morton, C.C., and Alt, F.W. (2002). Unrepaired DNA breaks in p53-deficient cells lead to oncogenic gene amplification subsequent to translocations. *Cell* 109, 811-821.
- Zhu, C.Q., da Cunha Santos, G., Ding, K., Sakurada, A., Cutz, J.C., Liu, N., Zhang, T., Marrano, P., Whitehead, M., Squire, J.A., et al. (2008). Role of KRAS and EGFR as biomarkers of response to erlotinib in National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study BR.21. *J Clin Oncol* 26, 4268-4275.
- Zhuang, Z., Park, W.S., Pack, S., Schmidt, L., Vortmeyer, A.O., Pak, E., Pham, T., Weil, R.J., Candidus, S., Lubensky, I.A., et al. (1998). Trisomy 7-harboring non-random duplication of the mutant MET allele in hereditary papillary renal carcinomas. *Nat Genet* 20, 66-69.
- Zimonjic, D.B., Keck-Waggoner, C., and Popescu, N.C. (2001). Novel genomic imbalances and chromosome translocations involving c-myc gene in Burkitt's lymphoma. *Leukemia* 15, 1582-1588.
- Zunino, A., Viaggi, S., Ottagio, L., Fronza, G., Schenone, A., Roncella, S., and Abbondandolo, A. (2000). Chromosomal aberrations evaluated by CGH, FISH and GTG-banding in a case of AIDS-related Burkitt's lymphoma. *Haematologica* 85, 250-255.

ANNEXES

Article 4 : Itzhar et al, 2010

Chromosomal Minimal Critical Regions in Therapy-Related Leukemia Appear Different from Those of *De Nov* Leukemia by High-Resolution aCGH.

Plos one 2011 Février, 6 (2) :e16623

Chromosomal Minimal Critical Regions in Therapy-Related Leukemia Appear Different from Those of *De Novo* Leukemia by High-Resolution aCGH

Nathalie Itzhar^{1,2,3}, Philippe Dessen^{1,2,4}, Saloua Toujani^{1,2}, Nathalie Auger^{1,2,3}, Claude Preudhomme⁵, Catherine Richon⁴, Vladimir Lazar^{3,4}, Véronique Saada^{3,6}, Anelyse Bennaceur^{3,6}, Jean Henri Bourhis⁶, Stéphane de Botton⁶, Alain Bernheim^{1,2,3*}

1 Institut de la Santé et de la Recherche Médicale U985, Génétique des tumeurs, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France, 2 Université Paris XI, Paris Sud, Orsay, France, 3 Molecular Pathology, Villejuif, France, 4 Institut Gustave Roussy, Functional Genomics Unit, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France, 5 Department of Hematology, Centre de Biologie-Pathologie, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille, Lille, France, 6 Department of Hematology, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

Abstract

Therapy-related acute leukemia (t-AML), is a severe complication of cytotoxic therapy used for primary cancer treatment. The outcome of these patients is poor, compared to people who develop *de novo* acute leukemia (p-AML). Cytogenetic abnormalities in t-AML are similar to those found in p-AML but present more frequent unfavorable karyotypes depending on the inducing agent. Losses of chromosome 5 or 7 are observed after alkylating agents while balanced translocations are found after topoisomerase II inhibitors. This study compared t-AML to p-AML using high resolution array CGH in order to find copy number abnormalities (CNA) at a higher resolution than conventional cytogenetics. More CNAs were observed in 30 t-AML than in 36 p-AML: 104 CNAs were observed with 63 losses and 41 gains (mean number 3.46 per case) in t-AML, while in p-AML, 69 CNAs were observed with 32 losses and 37 gains (mean number of 1.9 per case). In primary leukemia with a previously "normal" karyotype, 18% exhibited a previously undetected CNA, whereas in the (few) t-AML with a normal karyotype, the rate was 50%. Several minimal critical regions (MCRs) were found in t-AML and p-AML. No common MCRs were found in the two groups. In t-AML a 40kb deleted MCR pointed to *RUNX1* on 21q22, a gene coding for a transcription factor implicated in frequent rearrangements in leukemia and in familial thrombocytopenia. In *de novo* AML, a 1Mb MCR harboring *ERG* and *ETS2* was observed from patients with complex aCGH profiles. High resolution cytogenomics obtained by aCGH and similar techniques already published allowed us to characterize numerous non random chromosome abnormalities. This work supports the hypothesis that they can be classified into several categories: abnormalities common to all AML; those more frequently found in t-AML and those specifically found in p-AML.

Citation: Itzhar N, Dessen P, Toujani S, Auger N, Preudhomme C, et al. (2011) Chromosomal Minimal Critical Regions in Therapy-Related Leukemia Appear Different from Those of *De Novo* Leukemia by High-Resolution aCGH. PLoS ONE 6(2): e16623. doi:10.1371/journal.pone.0016623

Editor: Anita Kloss-Brandstaetter, Innsbruck Medical University, Austria

Received: May 4, 2010; **Accepted:** January 7, 2011; **Published:** February 14, 2011

Copyright: © 2011 Itzhar et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: IGR Taxe Apprentissage. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: bernheim@igr.fr

Introduction

Therapy-related myeloblastic leukemia, including therapy-related myelodysplasia, (t-AML), constitutes approximately 10% of AML and has several characteristic features [1,2]. As the incidence of cancers increases, so does that of t-AML. Nowadays, thanks to treatment intensification, the cure rate of primary neoplasia has increased but these very treatments are also implicated in severe therapy-related hematological consequences.

Factors associated with the development of t-AML include prior cytotoxic therapy. Two different types of t-AML are to be distinguished. The first one is due to prior therapy with alkylating agents (AA) or radiotherapy [1,2,3,4]. It occurs generally after a latency period of 5 to 7 years. This kind of t-AML is often preceded by a preleukemic period of myelodysplasia (t-MDS). Approximately 90% of the patients with AA-related t-AML exhibit clonal chromosomal aberrations including monosomy or deletions on chromosome 5 and/or 7, or complex aberrations involving chromosome 3, 12, 17 and 21. Drugs that target topoisomerase II

(ATII), such as etoposide and anthracyclines may induce the second type of t-AML [1,2,3,4]. It occurs in a median of 2 years and is not preceded by MDS. Cytogenetic analysis shows a high frequency of rearrangements of chromosome band 11q23 but also recurrent balanced rearrangements t(8;21), t(15;17) and inv(16) [1,2].

The prognosis is poor in t-AML, excepted in case of t(8;21), t(15;17) and inv(16) which follow the same course as p-AML and the karyotype is more frequently modified with at least 2 abnormalities or more.

p-AML are also heterogeneous entities, classified according to bone marrow cell morphology and karyotype with the recent addition of several gene mutations. AML was among the first diseases to be treated and monitored according to somatic acquired chromosomal abnormalities, including the first successful targeted treatment against a pathological gene product in AML3.

As t-AML appear to have a particular leukemogenesis pathway [3,4], the aims of this work were:

1) to analyze t-AML using high resolution array CGH in order to find genome region or even gene-specific copy number abnormalities (CNA) at a higher resolution than conventional cytogenetics; 2)

Table 1. Clinical, biological features and karyotype of t-AML patients.

Pts ¹	Age ² / Sex	Primary ³ - Cancer ³ -	PC Tt ⁴	FAB ⁵	Karyotype at diagnosis of t-AML	FISH ⁶	p-AML Type ⁷	AML Tt ⁸	Allog. ⁹	Survival > 12 month
t-1	71/F	Ovarian C.	Tax/SP/PSC833/Iressa	RAEB	57,XXX,+1,+4,del(5)(q15;q33)×2,-7,+8,+9, +13,+14,-17,+18,+19,-20,+22,+mar [4]	MLL WT	A	no	no	no
t-2	67/F	VLSL	Fluda/Chlorambucil	AML-M5	44, XX, 5q-, -7, -12, -14, -18, + der(12?) +mar [20]	MLL WT	A	no	no	dead at diagnosis
t-3	44/F	Breast C Lipo- sarcoma	Alk/AT II	AML-M0	46,XX,der(1)t(1;17)(p36;?),der(7) t(7;?)p15;?,der(10)(7;10;17)(?;p11; q?21),der(17)(q11?),ins(17?) [11]	MLL ND	U	yes	yes	yes
t-4	45/F	Astrocy- toma + skin T NHL	RT/BCNU/Alk/ AT II, Autograft	AML-M0	45,XX,dup(2)(q22;q34),-3p21, t(5;13)(p15;q14),t(6;8)(p21;q24),+i(7q) ,der(7)t(7;15)(q10;q10),der(12) t(12;17)(p13;q11),-15,-17 [18]	MLL WT	U	yes	no	no
t-5	72/M	Esophag. C	5FU/SP/RT/curie	RAEB	45,XY,add(1)(q41),-5,-7,+mar [11]/ 45,XY,add(1)q41,-5,-7, t(12;20?)(p12;q12),+mar [11]	MLL ND	A	no	no	no
t-6	44/M	Follicular NHL	ATII/Alk/Oncovin Alk/AT II/TBI/ Alk Fluda	AML	46,del(X)(q23),Y,der?(6),t(2;6)(q12; q21),-7,del(18?)(q12),add(20)(q12) but uncertain conclusion at diagnosis	MLL ND	A	no	no	no
t-7	73/M	Multiple myeloma	Alk/steroids/INF/ AT II/BCNU	AML + Myeloma	46-47,XY,-7,-8,+r+dm [20]	MLL ND	A	no	no	no
t-8	72/M	Follicular NHL	Alk/ATII/Fluda/ Chlorambucil, Rituximab/ Spleen RT	AML-M5	47,XY,del(7)(q21q32),+13 [11]	MLL ND	A	yes	no	no
t-9	69/M	Head and Neck C.	RT	AML-M5	45,XY, -7 [12]	MLL WT	A	no	no	no
t-10	57/M	Bladder Cancer	RT/SP	MDS	46,XY, [14]/46-47,XY,del(7q-) [5]	MLL ND WCP 7	A	no	no	no
t-11	62/M	Follicular NHL	Alk/ATII/INF/ MethylGAG Rituximab/skin RT	AML-M5	NA#	MLL ND	A	yes	no	no
t-12	63/M	NSCLC	AT II/SP/RT	AML	46 XY,t(8;21)(q22;q22) [1]/46 XY, t(8;21)(q22;q22),del(7)(q11q34) [13]	MLL ND	U	no	no	no
t-13	38/F	Breast Cancer	Alk/RT/ ATII/RT/AM	AML	46,XX,add(1)(q 3?) [25]	MLL ND	U	yes	no	no
t-14	25/F	Endometre cancer	Alk/AT II/SP, Actinomycine	AML-M4	47,XX, +8 [14]	MLL WT	U	yes	yes	yes
t-15	52/F	Breast Cancer	Alk/AT II/RT	biphenotypic AML-M4	48,XX,+8,t(9;22)(q34;q11),+17 [12]	MLL ND WCP 8 + WCP 17 BCR-ABL fus	U	yes	no	no
							T	yes	no	yes
							T	yes	no	yes
							T	yes	no	yes
t-19	55/F	Breast Cancer	Alk/ATII/RT/HT/ Tax	AML-M5	46,XX,t(9;11)(p21;q23) [21]	MLL ND	T	yes	no	no
t-20	61/F	Breast C.	Alk/AT II/RT/HT	AML-M5	46,XX,t(9;11)(p22;q23) [14]	MLL sep	T	yes	yes	no

Table 1. Cont.

Pts ¹	Age ² / Sex	Primary ³ - Cancer ³ -	PC Tt ⁴	FAB ⁵	Karyotype at diagnosis of t-AML	FISH ⁶	p-AML Type ⁷	AML Tt ⁸	Allog. ⁹	Survival ^{>} 12 month
t-21	60/F	NHL	Alk/AT II, Autograft	AML-M5	46,XX,t(9;11)(p22;q23) [12]	MLL sep	T	yes	no	no
t-22	19/M	Osteo- sarcoma	Alk/AT II/SP	AML-M5	46,XY,t(9;11)(p21;q23) [8]/ 46,XY,t(9;11)(p21;q23),+8 [10]	MLL sep	T	yes	no	yes
t-23	22/F	HL	Alk/ATII/Bleo/ Oncov	AML-M5	46,XX,t(11;19)(q23;q13) [12]	MLL sep	T	yes	no	dead at diagnosis
t-24	44/F	Ovarian cancer	Tax/SP/AT II/ Iressa	biphenotypic AML	46,XX, [2]	MLL sep	T	yes	no	no
t-25	64/F	Ovarian cancer	Tax/SP/Iressa	MDS	46,XX [17]	MLL WT	U	no	no	no
t-26	51/F	Anal + Breast C	RT, Alk/AT II/RT	AML	46,XX [5]	MLL WT	U	yes	no	no
t-27	47/F	Breast C.	Alk/AT II/RT/HT	AML-M2	46,XX [20]	MLL WT	U	yes	no	U
t-28	54/F	Breast C	Alk/AT II/RT	AML-M1	46,XX [16]	MLL WT	U	yes	yes	yes
t-29	71/M	Prostatic cancer.	RT	AML	46,XY [20]	MLL WT	U	no	no	no
t-30	67/M	Head and Neck C.	AT II/SP/Bleo/RT	AML-M5	46,XY [21]	MLL WT	U	yes	no	no

1 = patients. 2 = age at diagnosis of AML. 3 = Primary cancer; NHL: Follicular non hodgkin lymphoma, NSCLC: Non small cell lung cancer, VLSL: Villositary lymphocyte splenic lymphoma. 4 = Primary cancer treatment; Alk: alkylating agent, RT: radiotherapy, AT II: anti-topoisomerase II, AM: anti-metabolite, brachy: brachytherapy, Clo: Chlorambucyl, Tax: taxane, Fluda: fludarabine, SP: platinum, Bleo: bleomycin, HT: hormonotherapy, INF: interferon, Rit: Rituximab, RT: Radiotherapy, TBI: Total Body Irradiation, Oncov: Oncovin, A: alkylating-agent-inducing type, T: anti-topoisomerase-inducing type, U: undetermined. 5 = FAB classification: biph = biphenotypic. 6 = FISH column: MLL WT = MLL Wild Type, MLL R = MLL rearranged, ND = Not Done. 7 = Type of t-AML; A: alkylant induced, T anti-topoisomerase-induced. 8 = AML treatment. 9 = Allograft as treatment.

This patient had secondary MDS for several years before the leukemia, with transitory partial monosomy 7, that had disappeared a year later, two years later the t-AML appeared.

doi:10.1371/journal.pone.0016623.t001

to delimitate minimal critical regions (MCR) in order to identify potential candidate genes induced by AA or ATII implicated in oncogenesis: 3) to perform a similar analysis for p-AML and 4) to compare these two AML entities in our series and in the literature.

Materials and Methods

Patients

The patients were studied according to protocols approved by the Institut Gustave Roussy (Villejuif, France) Ethics Committee. Between 1995 and 2007, 30 t-AML and 36 p-AML with various karyotype results were collected at disease onset. (table 1 and 2).

Cytogenetic analysis

Cytogenetic analyses were performed on metaphase spreads obtained from tumor, bone marrow or blood. In each case, 20 RHG-banded metaphases were analyzed when possible.

Fluorescence in situ hybridization (FISH) studies

A set of commercial probes was used to search for abnormalities such as WCP1, WCP2, WCP5, WCP7, WCP8, t(8;21) RUNX1-ETO fusion probes (fp), t(9;22)BCR-ABL (fp), MLL dissociation probes, WCP14, t(15;17) PML-RARA (fp), WCP17 (tables 1 and 2). They were used according to the manufacturer's protocol (Vysis® or Kreatech®).

Cell culture

Most samples were diagnosis bone marrow cells except for patients t-4, t-9, t-11, t-17, t-19, t-26 and p-33 derived from whole

blood. After thawing, all t-AML samples were cultured for 24h (20% fetal calf serum in RPMI 1640 with antibiotics) without selecting CD34+ cells. The mononuclear cells were collected and washed before DNA extraction. Bone marrow was cultured in the same flask with the same media, to allow adherent cell proliferation in order to obtain constitutional fibroblasts from the patient. However, no adherent cells were obtained from this procedure. Pooled commercial DNA (Promega®) was thus used for all t-AML and p-AML work in order to maintain a homogenous process for the 64 AML.

Oligonucleotide aCGH

Tumor genomic DNA was isolated according to Qiagen protocols with modifications [5]. Samples containing more than 60% of blasts were chosen in order to analyze a majority of pathological cells. High-molecular-weight genomic DNA was extracted from the cell lines with a DNeasy extraction kit (Qiagen).

Patient leukemia samples were analyzed using 244 K microarrays (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Only t-AML were processed as dye-swap pairs. In all experiments, sex-matched DNA from a pooled human female or male individual (Promega, Madison, WI) was used as the reference. Oligonucleotide aCGH processing was performed as detailed in the manufacturer's protocol (version 4.0; <http://www.agilent.com>). Data were extracted from scanned images using Feature extraction® software (version A.8.5.3, Agilent). Raw data text files from the latter were then imported for analysis into CGH Analytics® 3.4.40. Aberrations were detected with the ADM2

Table 2. Clinical, biological features and karyotype of the p-AML patients.

Patients	Age ¹ /	FAB	Karyotype	FISH	Allograft	Survival
	Sex					duration > 12 months
p-1	68/F	M1	45,XX,-7	ND	No info	No info
p-2	34/M	M6	45,XY,-7	ND	no	no info
p-3	66/M	M1	48,XY,+8,+13	ND	No	Yes
p-4	54/F	M5	47,XX,+i(21q)	ND	Yes	Yes
p-5	32/M	M5	47,XY,t(2;14)(q21;q32),+4	wcp2, wcp14	No	No
p-6	44/F	M5	46,XX,der(5)t(1;5)(q32;q35),inv(9)(p12q13)[20]. ish(5p15,5q31)×2,add(5)(q35?)(wcp1+)	MLL WT, wcp1, wcp5,wcp17	No	No info
p-7	68/M	M5	46,XY,del(7)(q21q31),der(9)(WPC9+),?der(11)(q23)/46,XY[2]	MLL WT	No	No
p-8	25/F	M3	46,XX,t(15;17)(q22;q21)	PML-RARA fus		
p-9	46/F	M3	46,XX,t(15;17)(q22;q21)	PML RARA fus	No	No info
p-10	46/F	M3	46,XX,t(15;17)(q22;q21)	PML RARA fus	No	Yes
p-11	27/M	M3	46,XY,i(3)(p10),i(3q),t(15;17)(q22;q21)	PML RARA fus	No	Yes
p-12	47/M	M3	46,XY,t(15;17)(q22;q21)	PML RARA fus	No	No
p-13	73/M	M3	46,XY,t(15;17)(q22;q21)	PML RARA fus	No	Yes
p-14	35/M	M3	46,XY,t(15;17)(q22;q21)	PML RARA fus	No	Yes
p-15	57/M	M3	46,XY,t(15;17)(q22;q21)	PML RARA fus	No	Yes
p-16	54/M	M4	46,XY,t(16;16)(p13;q22)	CBFB sep	Yes	No
p-17	26/M	M4Eo	46,XY,t(16;16)(p13;q22)	ND	Yes	Yes
p-18	19/M	M2	45,XY,t(8;21)(q22;q22),del(9)(q31q34)	ND	No	Yes
p-19	37/M	M1	45,XY,t(9;11)(p22;q23),del(7)(p12;p21)	MLL sep	No	Yes
p-20	25/M	M1	46,XY,t(9;11)(p22;q23)	MLL sep	Yes	Yes
p-21	80/M	M1	46,XY[3]/50-53,XY,-1,-3,-4,-15?,-21,+7 to 10 mar	ND	No	No
p-22	42/M	M1	46,XY,t(3;5)(q25;q34),del(4)(q26),der(12)t(4;12) (q28?;p12),der(18)t(12;18)(p12;q21),mar?	WCP(3; 4) WCP(5; 12)	Yes	Yes
p-23	30/M	M5	46,XY,t(11;12)(q13;p13)[2]46,XY,id,der(1)t(1;1) (p16;q12)[1]/46,XY,id,der(7)t(1;7)(q12;q36)[1]/ 46,XY,id,der(9)t(1;9)(q12;p24)[2]46,XY,id,der(14) t(1;14)(q12;p10)[2]46,XY,id,der(20)t(1;20)(q12;p12) [1]46,XY,id,der(20)t(1;20)(q12;q13)[2]46,XY,id, der(21)t(1;21)(q12;q10)[3]	ND	No	No
p-24	71/M	M2	43-46,XY,-2,-5,-7,-16,+mar1,+mar2,+mar3, +mar4, variations	ND	No	No
p-25	63/F	M2	46,XX	ND	No	Yes
p-26	52/F	M2	46,XX	MLL WT	Yes	Yes
p-27	23/F	M2	46,XX	MLL WT	No	Yes
p-28	23/F	M5	46,XX	MLL WT	Yes	Yes
p-29	45/F	M5	46,XX	ND	No	No
p-30	73/F	M5	46,XX	ND	No	No
p-31	31/M	M0	46,XY	MLL WT	No	No info
p-32	75/M	M1	46,XY	MLL WT	No	No
p-33	41/M	M1	46,XY	MLL WT	Yes	No info
p-34	48/M	M2	46,XY	MLL WT	Yes	Yes
p-35	38/M	M2	46,XY	MLL WT	No	No
p-36	63/M	M4	46,XY	ND	No	No

1 = age at diagnosis of AML. FAB column: FAB classification. FISH column: MLL WT = MLL Wild Type; MLL sep = MLL rearranged (separated); PML-RARA fus = fusion of PML and RARA gene; WCP = whole chromosome paint; ND = Not Done.
doi:10.1371/journal.pone.0016623.t002

Table 3. Germinal and immunoglobulin genes related CNVs.

Location	Some CNV genes	miRNA
Germinal CNVs		
-1p36.13 <16.71–17.14>	CROCC MSTP9 ESPNP	
-1q21.3 <150.82–150.84>	NLCE3C	
-1q23.3 <159.75–159.90>	FCGR2A FCGR2B FCGR3A HSPA6	
-1q44 <246.79–246.86>	OR2T34 OR2T10 OR2T11	
+/-3q29 <196.90–196.96>	MUC20	mir-570
+/-4q13.2 <69.05–69.16>	UGT2B17	
+5p15.33 <0.76–0.87>	ZDHHC11	
-6p25.3 <0.20–0.32>	DUSP22	
+/-6p21.2 <32.56–32.72>	HLA-DQA1 HLA-DRB1 HLA-DRB5 HLA-DRB6	
+/-8p11.3 <39.35–39.50>	ADAM3A	
-10q11.22 <46.37–47.73>	ANXA8 PPYR1 GPRIN2 SYT15 ANTXRL	
+11q11 <55.12–55.20>	OR4P4 OR4C11 OR4S2 OR4C6	
+12p12 <19.36–19.46>	PLEKHA5	
+/-14q11.2 <18.62–19.49>	OR4K5 OR4K1 OR4N2 OR4K2 OR4Q3 OR4M1	
+/-15q11.2 <18.65–20.08>	BCL8 NF1P1 OR4N4 OR4M2	mir-1268
+/-15q14 <32.51–32.62>	GOLGABB	mir-1233
+/-16p11.2 <31.86–33.53>	TP53TG3 SLC6A10P HERC2P4...	mir-1826
+17q21.31 <41.52–41.57>	KIAA1267	
-17q21.31 <41.55–42.04>	NSF LRRC37A ARL17P1 KIAA1267 LRRC37A2	
-19q13.2 <48.20–48.43>	PSG1 PSG3 PSG6 PSG7 PSG11	
+/-22q11.23 <22.65–22.72>	GSTT1.	
Immunoglobulin genes related CNVs		
-2p11.2 <89.10–89.26>	IGKC IGKV1-5 IGKV3D-15 IGKV1D-13 IGKV3-20 IGKV2-24	
+/-7p14.1 <38.22–38.41>	TRGC2 TRGV5 TRGV7 TRGV9 STARD3NL	
+/-14q11.2 <21.43–22.04>	TRA@ TRD@ TRDV1 TRAV20 TRAJ17 TRAC	
-14q32.33 <105.13–106.00>	IGH@ IGHA1 IGHA2 IGHG1 IGHG2 IGHG4 IGHV4-31 C14orf81	

The CNVs are either lost or gained as indicated by a “-” or a “+”. Locations on chromosomes are described according to the ISCN 2009 with slight modifications: sequence numbers are included between <> and expressed in Mb, with a resolution of 10kb. Column 2: coding genes included in the CNVs; Column 3; miRNA genes included in the CNVs.

doi:10.1371/journal.pone.0016623.t003

algorithm and the filtering options of a minimum of 5 probes and $\text{abs}(\log_2\text{Ratio}) > 0.3$. Aberration segments were individually reviewed using build 35, hg18 from the UCSC Genome browser [6]. Anomalies that were localized to regions with high-copy repetitive or GC-rich DNA sequences including telomeric regions were excluded. We defined gains and losses for the oligonucleotide dataset as a linear ratio ≥ 1.2 or ≤ 0.8 respectively. High and low-level amplification events were defined as a linear ratio ≥ 4 or between < 2 and < 4 respectively. The data are described in accordance with MIAME guidelines and have been deposited in ArrayExpress under accession number E-TABM-1014.

Results

Copy Number Variations (CNV)

As no paired DNA had been obtained, Copy Number Variations (CNV) were distinguished from Copy Number Abnormalities (CNA) based on various criteria: i) sequence size below 2 Mb; ii) the presence of repetitive identical breakpoints between patients; iii) the genes involved such as olfactory receptor genes, the NF1P1 locus or GSTT1 (chromosome 22) and iv)

consultation of the Database of Genomic Variants [7]. Many Mendelian CNVs, that are present throughout the entire genome [8], were seen in the two AML samples (table 3). Together with classic genes, four microRNA embedded in CNV regions were found: mir-570 in 3q29 within MUC20, mir-1268 in 15q11 within NF1P1, BCL8 and olfactory receptors, mir-1233 in 15q14 within GOLGABB, and mir-1826 in 16p11.2 within TP53TG3 HERC2P4 (table 3).

Deletions inside immunoglobulin gene (IG) clusters, consecutive to VDJ rearrangement were observed mainly in t-AML. These illegitimate recombinations were considered as acquired CNVs [5], characteristic of the malignant clone. In t-AML, four losses were located in 2p11 in IGLK and 9 in 14q32.3 in IGH. Two t-AML were bi-phenotypic acute leukemia (cases 2 and 7). In three cases (t-15, t-17 and t-25), both genes were rearranged (table 4). No relationships were observed with MLL or other translocations. In p-AML (table 5), only 2 rearrangements were observed: on IGLK (case p-21) and on IGH (case p-24). No rearrangement of IGLL on 22q11 was observed. The difference in the proportion of IG rearrangements in t-AML compared to p-AML was statistically significant with a $p < 0.002$.

Table 4. Gains and losses CNA in t-AML and revised karyotype after aCGH.

Patients	Gains	Losses	Revised karyotypes
t-2	+14q11.2q12<24.09–26.24>[1.23]	–1q44<241.94–247.19>[0.61]	44,XX,–1q44,–5q14.3q35,–7,–7q33q34,–12p11.2p13.2,
	+14q12q13.3<29.52–35.74>[1.26]	–5q14.3q35<85.18–167.84>[0.58]	–12p11.2q12,–12q13.1,–12q13.3q22,–12q23.3,
	+14q21.1q21.2<41.52–44.69>[1.23]	–7pterp22.3<0.14–2.67>[0.65]	–14q12,+14q12,–14q12,+14q12q13.3,
	+14q21.3q22.1<47.25–52.51>[1.54]	–7p21.3<8.21–11.79>[0.64]	–14q21.2,+14q21.1q21.2,–14q21.2,+14q21.3q22.1,
		–7p15.2q14.3<27.40–33.28>[0.67]	–18q11.1qter,–18q11.2q12.1,
		–7p14.1q33<39.89–135.74>[0.63]	–18q22.3q23
		–7q33q34<135.74–137.48>[0.16]	
		–7q34qter<137.48–158.76>[0.60]	
		–12p13p11.2<11.27–25.37>[0.61]	
		–12p11.2q12<32.77–37.09>[0.65]	
		–12q13.1<47.09–49.44>[0.66]	
		–12q13.3q22<55.30–92.75>[0.63]	
		–12q23.3<105.58–107.51>[0.68]	
		–14q11.2<23.73–24.07>[0.70]	
		–14q12<26.25–27.10>[0.65]	
		–14q21.2<35.77–37.62>[0.66]	
		–14q21.2<44.69–45.26>[0.66]	
	–18q11.1q11.2<16.79–21.74>[0.59]		
	–18q11.2q12.1<21.74–24.41>[0.22]		
	–18q12.1q22.3<24.41–71.05>[0.59]		
	–18q22.3q23<71.06–71.76>[0.23]		
	–18q23<71.76–76.11>[0.59]		
t-24	+17q11.1qter<22.80–78.65>[1.39]	–2p11<89.65–91.05>[0.62]*	46,XX,t(11;?)(q23;?),i(17)(q10),–19p13.3,+19p13.3
	+19p13.3<4.96–6.82>[1.44]	–17pterp11.2<0.28–21.22>[0.63]	
		–19p13.3<0.21–4.96>[0.60]	
t-8	+13q11qter<18.36–114.10>[1.46]	–7q31.1q36.1<107.67–150.28>[0.55]	47,XY,–Xp11.4,–7q31.1q36.1,+13,–21q22.1
		–21q22.1<35.01–35.60>[0.11]	
		–Xp11.4<39.25–39.85>[0.16]	
t-13	+2p16.1p25.3<0.02–54.88>[1.46]	–1q42.3.q44<233.13–247.19>[0.53]	46,XX,der(1)t(1;2)(q42.3;p16.1),–10q11.2
		–10q11.2<45.53–47.97>[0.78]	
t-30		–2p23.3<25.31–25.60>[0.50]	46,XY,–2p23.3
		–14q32.3<105.96–106.00>[0.65]*	
t-15	+8pterqter<0.16–146.26>[1.31]	–2p11<88.98–91.05>[0.46]*	46,XX,+8,t(9;22)(q34;q11),+17
	+17pterqter<0.02–78.65>[1.31]	–4q31.2<146.62–146.67>[0.68]	
		–14q32.3<105.40–106.15>[0.34]*	
t-4	+2q14.3q32.3<128.11–193.87>[1.34]	–1p36.11<26.73–27.04>[0.64]	46,XX,dup(2)(q14.3q32.3),t(5;13)(p15;q14)
	+7q11.2q36.3<61.46–158.81>[1.65]	–1q43<237.92–238.50>[0.62]	–5q31.3q32,+i(7)(q10),der(7)t(7;15)(q10;q21.3),
	+12p12.1 p11.2<24.32–30.60>[1.37]	–5q31.1q33.1<142.91–148.19>[0.63]	der(12)t(12;17)(p12.1;q11),+12p11.2p12.1,
		–7p11.1p22.3<0.14–57.89>[0.65]	–15pterq21.2,–17p11.2p13.3,–17q23.2
		–12pterp12.1<0.05–21.96>[0.63]	
		–14q32.3<105.13–105.84>[0.68]*	
		–15q11.2q21.3<20.24–55.80>[0.65]	
	–17p13.3p11.2<0.02–22.07>[0.65]		
	–17q22<51.84–54.75>[0.64]		
t-16	+7p15.2<27.15–27.18>[1.33]		46,XX,+7p15.2,+8q24.2q24.3,inv(16)(p13;q22)
	+8q24.2q24.3<139.48–140.18>[1.46]		
t-23	+4q35.1q35.2<187.17–187.37>[1.49]	–14q32.3<106.21–106.25>[0.66]*	46,XX,+4q35.1q35.2,t(11;19)(q23;q13)
t-17	+7p15.2<27.15–27.18>[1.26]	–2p11<89.10–89.89>[0.70]*	–3p12.3p14.1,+7p15,t(15;17)(q22;q21) ⁺
	+6q27<168.12–168.84>[1.20]	–3p12.3p14.1<69.07–79.19>[0.54]	.ish(PML;RARA)
		–14q32.3<105.85–105.89>[0.59]*	

Table 4. Cont.

Patients	Gains	Losses	Revised karyotypes
t-29		-14q32.3<105.94–106.00>[0.66]* -21q22.1<34.98–35.29>[0.59]	46,XY,- 21q22.1
t-3	+8q24.3<143.73–143.90>[1.50]	-14q32.3<104.96–105.22>[0.76]*	46,XX,t(1;17)(p36;?),t(7;7)(p15;?),+8q24.3, t(7;10;17)(?;p11;q21;?)
t-26	+2q11.2<98.43–98.63>[1.42]		46,XX,+ 2q11.2
t-12	+21q22.1qter<35.07–46.91>[1.19]	-7q22.1q36.3<101.85–158.79>[0.80]	46,XY,-7q21.2q36.3,t(8;21)(q22;q22),+ 21q22.1qter
t-9	+4p16.3<1.20–1.30>[1.38] +6q27<168.08–168.32>[1.50]	-7pterqter<0.14–158.76>[0.56]	45,XY,+ 4p16.3 , -7
t-11		-21q22.12<35.11–35.15>[0.68]	46,XY,- 21q22.12
t-14	+7p15.2<27.15–27.18>[1.38] +8pterq24.3<0.16–142.23>[1.35] +8q24.3<142.23–145.81>[1.52] +8q24.3<145.81–146.26>[1.35]	-14q32.3<105.96–106.00>[0.60]* -17q11.2<25.96–27.38>[0.72]	47,XX,+ 7p15 ,+8,-17q11.2
t-1		-5q15qter<94.36–177.87>[0.79]	57,XXX,+1,+4,del(5)(q15q33)×2,-7,+8,+9,+der(11), +13,+14,-17,+18,+19,-20,+22,+mar
t-5	+5p15.2p14.3<10.78–21.71>[1.27] +5p13.3q11.2<31.24–53.59>[1.31] +21q22.1<36.40–36.53>[1.60]	-3p14.1p12.3<69.67–80.18>[0.54] -5pterp15.2<0.09–10.76>[0.57] -5q12.3qter<65.23–180.64>[0.57] -7pterp11.1<0.14–57.66>[0.57] -7q21.3q36.3<97.13–158.76>[0.57] -12p13.2p13.1<11.82–13.33>[0.62]	46 ,XY,- 3p12.2p14.1 ,- 5p15.2pter ,+5 p14.3p15.2, +5p12q12.3 ,- 5q12.3qter ,- 7p11.1p22.3 , -7q21.3q32.1 ,- 12p13.1p13.2 ,+ 21q22.1
t-10	+1q44<246.44–247.06>[1.32]	-7p22.2<3.02–3.12>[0.48] -7q11.2<64.40–75.85>[0.77] -7q21.3q22.1<97.69–101.88>[0.77]	46,XY,+ 1q44 ,- 7p22.2 ,- 7q11.2 ,- 7q21.3q22.1
t-7	+9q34.3<135.98–139.80>[1.30] +12p13.1<14.25–14.61>[1.36] +12p11.1<31.55–34.64>[1.34] +12q13.1q14.3<47.69–51.83>[1.42] +12q14.1q14.3<58.80–64.31>[1.33] +21q21.2q21.3<23.17–30.35>[1.42] +21q22.1q22.3<36.20–43.01>[1.58]	-7pterqter<0.14–158.81>[0.79] -12q12<36.73–42.14>[0.65] -12q13.1<45.33–47.69>[0.68] -17pterp11.3<0.02–21.23>[0.78] -21q21.1q21.2<19.84–23.05>[0.65] -21q22.1<34.38–36.12>[0.66] -21q22.3<43.02–43.08>[0.65]	45 ,XY,-7,+ 9q34.3 ,+ 12p13.1 ,+ 12p11.1 ,- 12q11q12 ,- -12q13.1 ,+ 12q13.12q14.3 ,- 17p11.2p13.3 , -21q21.1q21.2 ,+ 21q21.2q21.3 ,- 21q22.11q22.12 , +21q22.12q23 ,- 21q22.3
t-6		-7pterqter<0.14–158.76>[0.70]	45,XY,t(2;6)(q12;q21), -7
t-22	+2p25.2<2.54–3.57>[1.37] +8pterqter<0.16–146.26>[1.40]		46,XY,+ 2p25.3 ,+8,t(9;11)(p21;q23)
t-19	+7p15.2<27.15–27.18>[1.40]	No CNA	46,XX,+7p15.2,t(9;11)(p22;q23)
t-21	No CNA	No CNA	46,XX,t(9;11)(p22;q23)
t-20	No CNA	No CNA	46,XX,t(11;19)(p22;q23)
t-18	No CNA	-14q32.3<105.94–106.00>[0.64]*	46,XX,t(15;17)(q22;q21)
t-25	No CNA	-2p11<89.10–91.05>[0.69]*. -14q32.3<105.96–106.00>[0.61]*	46,XX
t-27	No CNA	No CNA	46,XX
t-28	No CNA	No CNA	46,XX

Column 2 and 3: The CNA are either lost or gained as indicated by a “-” or a “+”; locations on chromosomes are described according to the ISCN 2009 with slight modifications: sequence numbers are included between <> and expressed in Mb, with a resolution of 10kb; linear ratios are written between brackets after an “x”; CNAs with a linear ratio >2 (low level of amplification) or losses <0.25 are labeled in **bold** and *italics*; “*” indicates CNA that are probably part of a rearrangement of the immunoglobulin genes. They have not been included in the synthetic karyotypes because they could be considered as an acquired CNV which is characteristic of monoclonal proliferation.

Column 4: In **bold** are new data or those modified by aCGH in the synthetic karyotypes; CNAs that were contiguous but whose ratios were not too different were fused to express overall chromosome abnormality for readability.

doi:10.1371/journal.pone.0016623.t004

Table 5. Gains and losses CNA in p-AML and revised karyotype.

Patients	Gains	Losses	Revised karyotypes
p-24	+1p36.3<1.52–7.56>[1.26]	–2pterp22.3<0.02–32.60>[0.66]	46,XY,+1p34.2p36.3,–2pterp22.3,–2p14p13.3,
	+1q21q22<153.19–154.64>[1.67]	–2p14p13.3<68.01–71.72>[0.66]	–2q35qter,+3p21.3,–3p21.3p22.2,+4p16.3,
	+3p21.3<50.26–50.29>[2.54]	–2q35qter<219.02–242.39>[0.66]	–5q14.2q33.3,–7p15.2p15.3,–7q11.2,–7q21.1q22.2,
	+3p21.3<52.29–52.31>[4.00]	–3p22p21.3<38.35–49.66>[0.66]	–7q31.3q36.3,+15q11.2,+15q22.2q26.2,
	+4p16.3<0.99–1.65>[1.61]	–5q14.2q33.3<82.18–158.75>[0.61]	+15q23,–15q26.2q26.3,–16p13.3q23.1,
	+15q22.2q23<56.84.18–67.10>[2.05]	–7p15.2p15.3<19.64–26.31>[0.63]	+16q23.3q24.3,–17p11.2q12,–17q21.31q21.3,
	+15q23<67.44–68.37>[3.64]	–7q11.22q11.23<69.84–72.44>[0.65]	+19p13.3p13.1, +20p12.3p13, +21q22.1q22.3,+22q13.1
	+15q24.1<70.42–72.67>[2.89]	–7q21.12q22.2<87.65–105.96>[0.71]	
	+15q24.1q26.2<72.70–94.54>[1.30]	–7q31.32q36.3<123.35–158.81>[0.64]	
	+16q23.3q24.3<82.61–88.67>[1.8]	–14q32.3<105.60–105.70>[0.74]*	
	+19p13.3p13.1<0.64–19.72>[1.41]	–15q26.2q26.3<94.55–100.21>[0.75]	
	+20p12.3p13<0.27–9.14>[1.26]	–16p13.3q23.1<15.38–78.80>[0.74]	
	+21q22.1<33.30–37.23>[1.79]	–17p11.2q12<0.18–29.54>[0.65]	
	+21q22.1<37.24–38.54>[2.5]	–17q21.3q21.33<38.29–46.94>[0.66]	
	+21q22.1<38.54–39.38>[3.00]		
	+21q22.2q22.3<39.40–43.22>[2.18]		
+21q22.3<43.23–46.89>[1.70]			
+22q13.1<35.86–37.20>[1.33]			
p-21	+3p14.3p14.2<57.97–62.19>[1.48]	–1q21.1q44<147.21–247.19>[0.62]	50–53,XY,–1q21.1q44,–2p24.3,
	+3p14.2p14.1<63.60–64.29>[1.31]	–2p11.2<89.38–91.05>[0.61]*	–3p12.1p14.1,+3p14.1,–3p14.1,+3p14.1p14.2,
	+3p14.1<64.32–65.50>[4.61]	–2pterp24.3<0.02–16.22>[0.61]	+3p14.2p14.3,–3p14.3p24.3,+3p11.2qter,
	+3p14.1<66.40–67.67>[4.71]	–3 p24.3p14.3<0.03–57.40>[0.63]	–4q22.1q27,–9q22.3q31.1,
	+3p11.2qter<89.28–199.32>[1.35]	–3p14.2<62.20–63.58>[0.60]	+21q11.2q21.1,
	+21q11.2q21.1<14.29–17.97>[5.46]	–3p14.1<65.51–66.11>[0.60]	+21q22.1qter
	+21q22.1q22.3<38.27–43.54>[5.45]	–3p14.1p12.1<67.68–86.30>[0.67]	
	+21q22.3<43.59–45.12>[2.11]	–4q22.1q27<88.94–123.72>[0.61]	
+21q22.3qter<45.12–46.91>[1.7]	–9q22.3q31.1<93.92–103.86>[0.63]		
p-22		–4q28.2q28.3<130.24–134.36>[0.55]	46,XY,t(3;5)(q25;q34),del(4)(q28.2q28.3),
		–12p12.1p13.2<11.40–21.20>[0.55]	der(12)t(4;12;18)(q28?p12;q21),
		–18q21.2<48.99–51.05>[0.55]	–12p12.1p13.2,–18q21.2,–18q22.3q23
		–18q22.3q23<69.56–76.03>[0.55]	
p-23	+1q23.2qter<158.48–247.17>[1.24]	No CNA	46,XY, t(11;12)(q13;p13)/46,XY,id,der(1)t(1;1)(p16;q12)/
			46,XY,id,der(7)t(1;7)(q12;q36)/
			46,XY,id,der(9)t(1;9)(q12;p24)/46,XY,id,
			der(14)t(1;14)(q12;p10)/46,XY,id,der(20)t(1;20)
			(q12;p12)/46,XY,id,der(20)t(1;20)(q12;q13)/
		46,XY,id,der(21)t(1;21)(q12;q10),+1q23.2qter	
p-5	+4pterqter<0.06–191.02>[1.43]	No CNA	47,XY,t(2;14)(q21;q32),+4
p-32		–3p21.3p21.3<44.20–49.02>[0.59]	46,XY,–3p21.3
p-6	+1q32.1qter<201.31–247.10>[1.39]		46,XX,der(5)t(1;5)(q32;q35),inv(9)(p12q13)
p-1		–7<0.14–158.76>[0.61]	45,XX,–7
p-2	+Xp22.2<15.95–16.61>[2.04]	–7<0.14–158.76>[0.55]	45,XY,+Xp22.2,–7,–22q11.2
		–22q11.2<21.36–21.41>[0.52]	
p-7	+11q24.2qter<124.85–134.43>[1.23]	–7q31.2qter<115.49–158.78>[0.77]	46,XY,–7q31.2q36.3, +11q24.2q25
p-3	+8pterqter<0.16–146.25>[1.27]	–2p11.2<88.93–89.14>[0.69]*	48,XY,+8,+13
	+13pterqter<18.31–114.12>[1.28]		
p-18	No CNA	–8q21.3q22.1<93.15–94.17>[0.63]	46,XY,t(8;21)(q22;q22),del(8)(q21.3q22.1),–9q12q31.1
		–9q12q31.1<67.20–104.45>[0.62]	
p-13	+17q21.2<35.76–35.84>[1.49]	No CNA	46,XY,t(15;17)(q22;q21),+17q21.2
p-4	+21q11.2qter<14.31–46.91>[1.77]	No CNA	47,XX,+i(21q)

Table 5. Cont.

Patients	Gains	Losses	Revised karyotypes
p-8	No CNA	No CNA	46,XX,t(15;17)(q22;q21)
p-9	No CNA	No CNA	46,XX,t(15;17)(q22;q21)
p-10	No CNA	No CNA	46,XY,t(15;17)(q22;q21)
p-11	No CNA	No CNA	46,XY,t(15;17)(q22;q21)
p-12	No CNA	No CNA	46,XY,t(15;17)(q22;q21)
p-14	No CNA	No CNA	46,XY,t(15;17)(q22;q21)
p-15	No CNA	No CNA	46,XY,t(15;17)(q22;q21)
p-16	No CNA	No CNA	46,XY,t(16;16)(p13;q22)
p-17	No CNA	No CNA	46,XY,t(16;16)(p13;q22)
p-19	No CNA	-14q32.3<105.02-105.04>[0.76]*	45,t(9;11)(p22;q23),del(7)(p12;p21)
p-20	No CNA	No CNA	46,XY,t(9;11)(p22;q23)
p-25	No CNA	-14q32.3<105.96-105.94>[0.61]*	46,XX
p-26	No CNA	No CNA	46,XX
p-27	No CNA	No CNA	46,XX
p-28	No CNA	No CNA	46,XX
p-29	No CNA	No CNA	46,XX
p-30	No CNA	No CNA	46,XX
p-31	No CNA	No CNA	46,XY
p-33	No CNA	No CNA	46,XY
p-34	No CNA	No CNA	46,XY
p-35	No CNA	No CNA	46,XY
p-36	No CNA	No CNA	46,XY

Column 2 and 3: The CNA were either lost or gained as indicated by a “-” or a “+”; the locations on the chromosomes are described according to the ISCN 2009 with slight modifications: sequence numbers are included between <> and expressed in Mb, with a resolution of 10kb; linear ratios are written between brackets after an “x”; CNAs with a linear ratio >2 (low level of amplification) or losses <0.25 are labeled in **bold** and *italics*; “*” indicates CNA that are probably part of a rearrangement of the immunoglobulin genes. They are not included in the synthetic karyotypes as they could be considered as an acquired CNV characteristic of monoclonal proliferation.

Column 4: In **bold** are new data or those modified by aCGH in the synthetic karyotypes; CNAs that were contiguous but whose ratios were not too different were fused to express overall chromosome abnormality for readability.

doi:10.1371/journal.pone.0016623.t005

Karyotypes and CNA

Karyotypes and aCGH were well correlated, with few exceptions. Ninety-six unbalanced chromosomal abnormalities previously undetected by mitotic karyotypes, were detected after high resolution aCGH (tables 1, 2, 4 and 5). Most of the additional abnormalities were too small to be detected by karyotypes. Some revealed masked rearrangements (Figure 1). In case t-1, the discrepancy between the karyotype and aCGH was probably due to a combination of hyperploidy, genetic heterogeneity and the presence of normal cells resulting in aCGH detection of only the del(5q).

In both groups of AML, 25 cytogenetically balanced translocations (table 1, 2 tables 4 and 5) did not show any cryptic rearrangement (gain or loss) at their breakpoint locations. In 5 cases (t-3, t-5, t-12, p-18, p-13), a CNA was found near the breakpoints. Patient t-3 was considered as having multiple balanced translocations that could not be further analyzed due to insufficient material. Patient t-5 had a poorly defined translocation implicating 12p and according to aCGH analysis, a small loss began in the middle of ETV6, suggesting a rearrangement of this gene. Patient t-12, had a standard t(8;21) and following “good practice” rules, no further investigation was initially performed. aCGH revealed a duplication of 21q22.1qter that was confirmed by FISH as another translocation or insertion on an unidentified chromosome. The unbalanced translocation breakpoint was 30 Kb centromeric to the 3’ end of RUNX1 suggesting a possible double event. Patient p-18, with a t(8;21) p-AML, had a 1Mb

loss that included the first two exons of RUNX1 on 8q21.3. Patient p13 had a t(15;17) accompanied by a small duplication of the telomeric part of RARA and of the TOP2A genes (table 5).

In some cases the confrontation between aCGH and the karyotype allowed us to better define the previously diagnosed rearrangements. In patient t-13, an add(1)(q3?) was found in the morphological karyotype. With aCGH, it was concluded that it resulted from an unbalanced translocation der(1)t(1;2)(q42.3;p16.1). The breakpoint was virtually cloned from the arrays: on 1q42.3<231.374>, it was sitting in the middle of PCNX2, between exons 11 and 12. On 2p16.1<54.943>, it was lying in an EML6 gene in the vicinity of exon 12 of the gene. P-22, a primary AML with a t(3;5), had a loss of 10Mb of 12p13 secondary to a additional complex translocation encompassing ETV6 and CDKN1B (table 5).

t-AML

All patients (excepted three who had received radiotherapy alone) had been treated with multi-agent chemotherapy (AA and ATII) combined or not with radiotherapy. Thus, the type of induction mechanism was most of the time, deduced from the observed chromosomal abnormalities (table 1): 9 cases were probably AA induced, 9 were ATII-induced and in 12, the mechanism could not be determined because CNA categorization was indistinguishable between t-AML induced by AA or by ATII. The medium time elapsed between cancer therapy and the

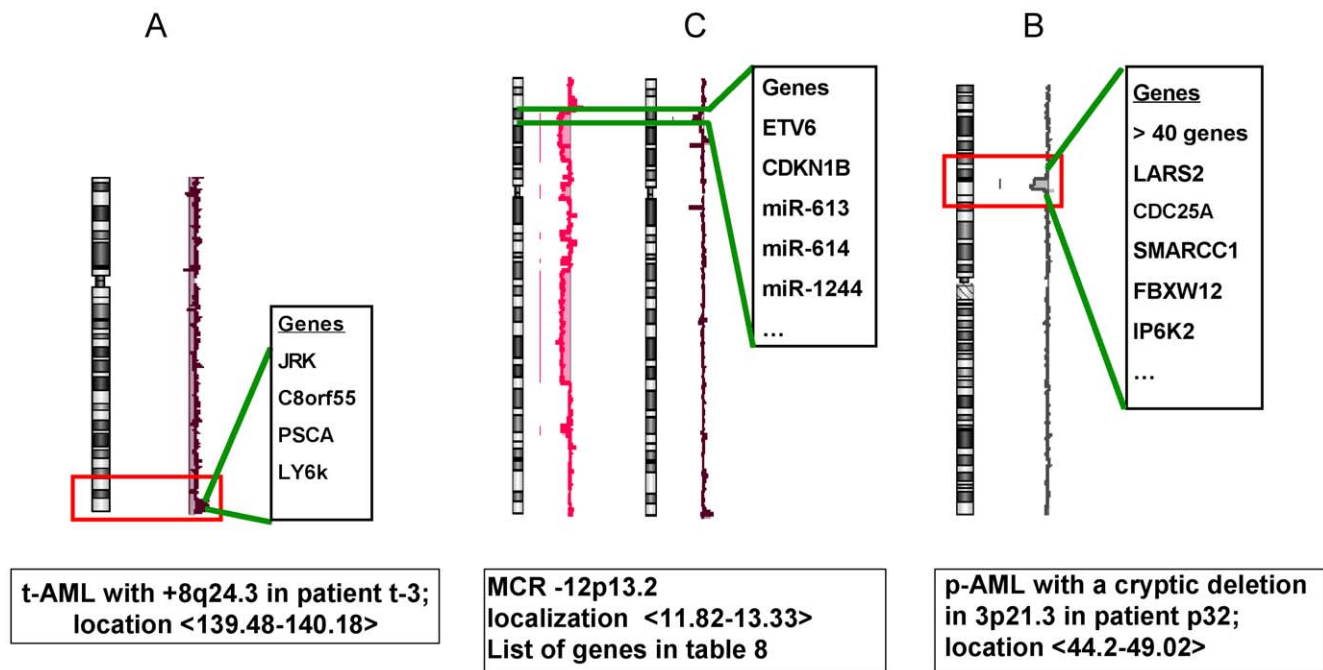


Figure 1. Details of critical rearrangements concerning MCRs. A = gain on 8q24.3 in a t-AML; B = loss of 12 p13 in t-AML (patients t-4 and t-5); C = loss of 3p21.3 in a p-AML.
doi:10.1371/journal.pone.0016623.g001

diagnosis of t-AML was 5.1 years, 2.3 years and 4.7 years respectively.

Twenty-five patients (80%) with 104 CNA exhibited 41 gains and 63 losses (table 4). The mean number per total case number was 3.46. Six patients with a normal karyotype had at least one CNA. Six patients (20%) had no CNA, 3 had a normal karyotype and the 2 others had a balanced translocation (one a t(15;17) and one a MLL rearrangement). The mean CNA length was 4.1Mb for the t-AML patients with at least an unbalanced rearrangement.

The twelve losses in the immunoglobulin genes (IG) on 2p11 and 14q32.3 were considered as a special category of CNA. Among the 8 patients with IG rearrangements, 2 had bi-phenotypic leukemia and the others had various forms of AML.

p-AML

Among 36 patients, 12 had a normal karyotype, 4 exhibited an anomaly on chromosomes 5 or 7. A t(15;17)(q22;q21), characterizing AML-M3, was present in 9 cases (table 2).

In p-AML, 64 CNAs were observed (table 5) with 30 losses and 34 gains while the mean number was 1.78. Twenty-two patients had no CNA, 11 had a recurrent balanced translocation while the 11 others had a normal karyotype. The mean number of CNA among p-AML patients with unbalanced rearrangements was 2.66. This value was due to 4 patients with very complex genomic rearrangements (>8 chromosomal abnormalities).

Minimal Critical Regions (MCR)

A MCR was defined as such if 2 cases or more shared a common genomic location. Twelve MCRs were observed in t-AML and eight in p-AML (table 6).

The size of MCRs was smaller in t-AML, with a minimum of 0.04 Mb compared to p-AML with a minimum of 0.95 Mb. The longest MCR in t-AML was 36.44 Mb, of the same order of magnitude as in p-AML where it was 45.69 Mb.

Unique CNA

These single cases were of various sizes, from 0.04Mb to 26.89 Mb. Most of them were small and not known as polymorphisms. They are detailed in table 7.

Discussion

The CNVs

As we were obliged to use a pool of normal DNA as a reference, Mendelian CNVs that are present throughout the entire genome [8], were revealed by the 244K aCGH (table 3). They were identified in the Toronto Database [7] in order to avoid including them in the analysis of somatic CNA. However, as a relationship between some CNVs and malignancy has already been suggested [9], several of them were retained in a separate table (table 3). For example a GSTT gene cluster was reported to be a susceptibility co-factor in cancer [10,11,12]. It is noteworthy that several miRNA, i.e. mir-570, mir-1268, mir-1233 and mir-1826 were found embedded in CNVs, with a possible multigene regulatory effect, as reported by Lin [13].

High resolution aCGH allowed us to study the whole set of IG gene rearrangements [5]. VDJ rearrangement in immunoglobulin genes (IG) has been described in AML [14,15] and associated with MLL rearrangements [16]. The two series of patients (t-AML vs p-AML), were found to be significantly different, with a p value of <0.002. The fact that a quarter (8/30) of t-AML exhibited a VDJ rearrangement suggests that the transformed cells are often multipotent in these diseases.

The CNAs

The acquired chromosomal abnormalities detected by morphological cytogenetics were quite similar in t-AML and p-AML. The CNA patterns were well correlated between the morphological cytogenetics and aCGH. Their frequency was increased after high resolution aCGH. Losses were more frequent than gains in both series. The number of CNAs was higher in t-AML (n = 104, mean

Table 6. Minimal Critical Region in the two groups of patients.

MCR (localization by aCGH)	Patients	Size (Mb)	Possible genes
t-AML			
-1q44 <241.94–247.19>	t-2, t-13	5.25	>25 genes among them SMYD3
-3p14.1p12.3 <69.67–79.19>	t-5, t-17	9.52	MITF FOXP1 EIF4E3 GRP27 PROK2 RYBP SHQ1 PPP4R2 PDZRN3 CNTN3 FAM86D FRG2C ZNF717 ROBO2 ROBO1
-5q31.3q33.1 <142.91–148.19>	t-1, t-2, t-4, t-5	5.28	ADRB2 DPYSL3 HTR44 POU4F3 PPP2R2B SPINK1 JAKMIP2 TCERG1 SPINK5 LARS RBM27 KCTD16 HMHB1 FBXO38 YIPF5 SPINK7SCGB3A2 GPR151 PRELID2 SH3RF2 PLAC8L1 STK32A SPINK6 SPINK9
+6q27 <168.12–168.32> [1.50]	t-9, t-17	0.20	KIF25 FRMD1 HGC 6.1.1
-7p22.2 <3.02–3.12>	t-5, t-6, t-7, t-9, t-10	0.10	GNA12 CARD11
+7p15.2 <27.15–27.18>	t-14, t-16, t-17, t-19	0.03	HOXA6 HOXA7 HOXA9 HOXA10 miR-196b
-7q21.3 <97.69–101.88>	t-2, t-5, t-6, t-7, t-9, t-10	4.19	NPTX2 LMTK2 BRI3 BAIAP2L1 BHLHB8 CUX1 miR-86 miR-93miR-106b miR-548o
-7q33q34 <135.74–137.48>	t-2 , t-5, t-6, t-7, t-8, t-9	1.74	CHMR2 PTN DGK1 CREB3L2 miR-490
+8q24.3 <143.73–143.9>	t-3 , t-14	0.17	PSCA LY6D JRK C8orf55 LY6K SLURP1 LYNX1 LYPD2
-12p13.2p13.1 <11.82–13.33>	t-2, t-4, t-5	1.51	ETV6 CDKN1B CREBL2 EMP1 GPR19 LRP6 GPRC5A HEBP1DDX47 MANSC1 GPRC5D KIAA1467 BCL2L14 DUSP16 APOLD1 GSG1 HTR7P miR-613 miR-614 miR1244
+17q21.3 <22.80–78.65>	t-15, t-24	55.85	Whole 17q
-21q22.1 <35.11–35.15>	t-7, t-8, t-11 , t-29	0.04	RUNX1
p-AML			
+1q21q22 <153.19–154.64>	p-23, p-24	1.4	>25 genes EFNA4 R1AP1 DPM3 YY1AP1 DAP3 ROBLD3 CCT3 CLK2
+1q32.1q44 <201.31–247.19>	p-6, p-23	45.69	Numerous genes
-3p21.3 <44.20–49.02>	p-21, p-24, p-32	5.18	>40 genes SMARCC1 NCKIPSD
-7q31.2q36.3 <115.49–158.78>	p-1 and p-2, p-7	43.29	Numerous genes
-9q22.3q31.1 <93.92–103.96>	p-18, p-21	9.81	>60genes FANCC XPA
Amp 21q21.1 <14.29–17.97> [5.46]	p-4, p-21	3.78	LIPI ABCC13 RBM11 HSPA13 SAMSN1 NRIP1 USP25 C21orf34 CXADR BTG3 miR-99a miR-125b-2hsa-let-7c
Amp 21q22.2 <38.27–43.54> [3 & 5.2]	p-4, p-21, p-24	5.25	DSCR4 KCNJ15 ERG ETS2 BRWD1 other genes
+21q22.3qter <43.54–46.91>	p-4, p-21, p-24	7.49	>50 genes

Column 1, the location of the MCR that follows the rules of tables 4 and 5; the figures in brackets and in bold are the ratios of the amplified regions. Column 2, patients; the figures in bold indicate the smaller CNA.

doi:10.1371/journal.pone.0016623.t006

number 3.5), than in p-AML (n = 69, mean = 1.9). The value found here is of the same order of magnitude than that reported elsewhere [17,18,19,20]. Subcytogenetic CNA were present in half of the t-AML with normal karyotypes (table 4) while only 1 case (p-32) was observed in p-AML (tables 5 and 7). These findings are in accordance with the role of cytotoxic drugs in oncogenesis in t-AML [4,21].

Twenty-five balanced translocations remained undetected (tables 4 and 5). No deletion or amplification at the breakpoint was observed in the five t-AML, nor in the two p-AML cases with rearranged MLL. The exceptions were two t(8;21) complex translocations resulting in detectable quantitative CNA at their breakpoints. In case t-12, a t-AML, a distal trisomy 21 began at the 5' extreme part of RUNX1

Table 7. Single CNA of interest.

Patients	MCR unic cases	Size (Mb)	Possible genes
t-AML			
t-2	+14q22.1 <47.25–52.51>	5.26	>30 genes
t-2	–18q11.2q12.1<21.74–24.41>[0.23]	2.67	SS18 (Synovialosarcoma translocation) +7 other genes
t-2	–18q22.3q23<71.06–71.76>	0.69	TSHZ1 Colon cancer ag a zinc finger protein
t-13	–1q42.3.q44<233.13–247.19>	14.06	>100 genes
t-13	–10q11.2<45.53–47.97>	2.44	>20 genes
t-5	–12p13.2p13.1<11.82–13.33>	1.51	>20 genes ETV6 CDKN1B miR613 miR614 miR1244
t-22	+2p25.3 <2.54–3.57>	1.03	TSSC1 TTC15 ADI1 RNASEH1
t-14	–17q11.2 <25.96–27.38>	1.42	EVI2A EVI2B NF1 OMG SH3GLP2 SUZ12 CRLF3 C17orf79
			CENTA2 UTP6 C17orf42 ATAD5 RNF135 RAB11FIP4
			LRRC37B SUZ12P miR193a miR365-2
t-15	–4q31.2 <146.62–146.67>	0.05	SMAD1
t-30	–2p23.3<25.31–25.60>	0.10	DNMT3A miR1301
p-AML			
p-24	+3p21.3<50.26–50.29>[2.54]	0.03	GNAI2 SEMA3B
p-24	+3p21.3<52.29–52.31>[4.00]	0.03	NCLYTK miR135a-1
p-21	+3p14.1<64.32–67.67>[4.59]	1.94	LR1G1
p-18	–8q21.3q22.1<93.15–94.17>[0.63]	1.02	RUNX1T1
p-22	–12p12.1p13.2<11.40–21.20>[0.55]	9.8	ETV6 CDKN1B among more than 20 genes
p-24	–17p11.2q12<0.18–29.54>[0.65]	29.36	multiple genes
p-24	+15q23<67.44–68.37>[3.64]	3.31	KIF23 RPLP1 TLE3 miR-629
p-22	–18q21.2<48.99–51.05>[0.55]	2.06	DCC and 4 other genes

Column 2: The CNA were either lost or gained as indicated by a “–” or a “+”; the locations on chromosomes are described following the ISCN 2009 with slight modifications: sequence numbers are included between <> and expressed in Mb, with a resolution of 10kb; linear ratios are written between brackets after an “x”; chromosomes with a linear ratio >2 (low level of amplification) or losses <0.25 are labeled in **bold** and *italics*.
doi:10.1371/journal.pone.0016623.t007

(chr21:35.08). FISH studies showed a distal 21q unbalanced translocation on an unidentified chromosome in addition to the classic t(8;21) derivatives. In case p-18, a p-AML with a t(8;21), a 1Mb loss on 8q21.3 amputated the first 5' exons of RUNX1T1, probably inactivating the ETO-AML1 chimeric gene on the der(21) and left the 3' RUNX1T1 coding sequence intact in the AML1-ETO transcript on the der(8) [22]. This cryptic rearrangement allowed a “virtual cloning” of the t(8;21). The detailed molecular mechanisms of these rearrangements with an apparently identical t(8;21) seems to be different in these secondary and *de novo* leukemias.

MCR

In the present series, twelve MCRs were isolated in t-AML and 8 in p-AML (table 6). The size of MCRs was smaller in t-AML, with a minimum of 0.04Mb compared to 1.4 Mb in p-AML. There were 7 MCR of <2Mb in p-AML compared to only 1 in t-AML. The longest MCR in t-AML was 55 Mb, of the same order of magnitude as in p-AML where it was 45.69 Mb. A quarter of MCR contained sites for microRNAs (miRNAs). They have been shown to be involved in different biological processes, and in particular, hematopoiesis [23,24]. They are also described as behaving as tumor suppressor genes or oncogenes [25,26]. Few new studies have reported on

molecular abnormalities implicating miRNAs that can be up- or down-regulated in AML [27].

Table 8 and table 9 present the MCR from the data reported in the literature [18,19,20,28,29,30,31,32,33,34]. Despite a certain amount of heterogeneity in the samples, the techniques, the genome constructs and other parameters, this table provides a global view of nearly 550 p-AML and 50 t-AML. It allowed us to clearly show the MCR and their frequencies.

When we compared the number of losses and gain in the “table” sample to those in the present series, a chi2 test showed that as they were not different, we could include them in the table. In all AML 123 MCR were losses and 51 were gains. In t-AML, 34 MCR were losses and 4 were gains while in p-AML 34 were losses and were 4 gains.

We will examine the lost and gained MCR found in our series together with the most specific or frequent MCR found in this table.

–1q

A small juxta-telomeric MCR loss in -1q44 was not reported in p-AML and does not seem to be very frequent (tables 8 and 9). Among more than twenty genes, SMYD3 is a histone methyltransferase that plays a role in transcriptional regulation as a member of an RNA polymerase complex. It is expressed in CD34 cells.

Table 8. Minimal critical regions in the literature including the present work: losses.

Chromosome	All	p (%)	t (%)	consensus MCR	References	Genes
abnormalities						
location in Mb						
1p36.2	6	6 (1)		7.81–7.89	A, D, E	PER3 UTS2
1p35.1	6	6 (1)		22.39–22.44	A, D, E	
1p34.2	3	3 (0.5)		42.07–42.45	A, D, E	KRC HIVEP3
1p31.3p31.1	3	2 (0.3)	1 (2)	67.07–69.95	A, D, E	WDR78 MIERS1 C1orf141 IL12RB2 SERBP1 GADD45A GNG12 DIRAS3 GPR177 RPE65 DEPDC1
1q42.1	3	3 (0.5)		222.6–222.9	D	CNIH4 WDR26 CR625980 CNIH3
1q44	2		2 (4)	241.94–247.19	K	WDR64 EXO1 MAP1LC3C PLD5?CEP170 AKT3 ZNF238 C1orf101 FAM36A EFCAB2 KIF26B SMYD3 TFB2M ADSS HNRNPU PPPDE1 AHCTF1
2p23.3	3	3 (0.5)		25.25–25.46	D, E	
2p23.1	3	3 (0.5)		30.29–30.95	A, D, E	
2q36.2	8	8 (1.4)		222.01–225.42	A, D, E	EPHA4 PAX3 FARSB MOGAT1 ACSL3 KCNE4 AP1S3 WDFY1 SERPINE2 MRPL44 FAM124B CUL3 SCG2
3p26.3-p25.3	4	3 (0.5)	1 (2)	0–9.14	D, G	
3p26.3	4	3 (0.5)	1 (2)	14.96–16.15	A, D	
3p21.3	8	5 (0.9)	3 (6)	44.46–49.64	A, D, K	Numerous ZNF more than 30 genes
3p14.1p12.3	3		3 (6)	69.67–79.19	A, K	MITF FOXP1 EIF4E3 GRP27 PROK2 RYBP SHQ1 PPP4R2 PDZRN3 CNTN3 FAM86D FRG2C ZNF717 ROBO2 ROBO1
3q11.2q13.3	5	5 (0.9)		95.03–120.21	D, E	more than 30 genes
3q13.1q13.3	2	1 (0.2)	1 (2)	106.75–109.60	D	
3q13.3	3	2 (0.3)	1 (2)	117.78–118.40	D	
3q24q29	3	2 (0.3)	1 (2)	160.62–162.14	D	
3q24q29	3	2 (0.2)	1 (2)	164.51–165.39	D	SI SLITRK3 CR612557
4q24	7	7 (1.2)		106.1–106.72	A, D	TET2 PPA2 FLJ20184 INTS12 GSTCD
4q27q28	6	5 (0.9)	1 (2)	122.92–124.45	D	ADAD1 IL21 BBS12 FGF2 NUDT6 SPATA5 SPRY1
4q31.2	4		4 (8)	146.62–146.67	D, K	SMAD1
5q11.1	3	2 (0.3)	1 (2)	50.16–50.21	D	
5q11.2	3	3 (0.5)		51.79–53.66	D	
5q11.2	5	4 (0.7)	1 (2)	55.73–56.92	A, D	
5q11.2	4	3 (0.5)	1 (2)	57.49–57.79	A, D	
5q12.1	7	5 (0.9)	2 (4)	59.54–59.87	A, D, E	
5q13	14	10 (1.9)	4 (8)	82.72–84.65	A, D, E, J	VCAN HAPLN1 EDIL3
5q14.3q15	20	17 (3)	3 (6)	86.54–95.19	A, D, E, J	CCNH TMEM161B MEF2C CETN3 POLR3G RASA1 LYSDM3 GPR98 VLGR1 ARRD3 NR2F1 FAM172A POU5F2 ANKRD32 MCTP1 UNQ630 TTC37 ARSK GPR150 RFESD RHOBTB3 GLRX
5q15q22.3	20	16 (2.6)	4 (8)	95.51–114.14	A, D, E, J	PCSK1 CAST ERAP1 ERAP2 LNPEP LIX1 2 RIOK CHD1 PAM HISPPD1 NUDT12 CR610784 RAB9P1 EFNA5 FBXL17 FER PJA2 MAN2A1 TMEM232 TSLP WDR36 CAMK4 STARD4 C5orf13 EPB41L4A APC SRP19 ZRSR2 REEP5 DCP2 MCC YTHDC2 KCNN2
5q22.3q31.1	16	13 (2.3)	3 (6)	129.23–131.96	A, D, E, J	CHSY3 LYRM7 CDC42SE2 RAPGEF6 FNIP1 ACSL6 CSF2 IL3 P4HA2 PDLIM4 IRF1 RAD50
5q31.1	21	12 (2.1)	9 (18)	133.52–134.26	A, D, E, H	PPP2CA CDKL3 UBE2B PHF15 SAR1B CAMLG DDX46 C5orf24 TXNDC15 PCBD2
5q31.3q33.1	19	11 (2)	8 (16)	142.91–148.19	A, D, E, J, K	HMHB1 YIPF5 PRELID2 GRXCR2 RBM27 POU4F3 LARS GPR151 PPP2R2B TCERG1 STK32A JAKMIP2

Table 8.Cont.

Chromosome	All	p (%)	t (%)	consensus MCR	References	Genes
abnormalities				location in Mb		
						SPINK1 SPINK5 SPINK6 SPINK7 SPINK9 FBXO38 HTR4 SH3TC2
5q33.3	14	10 (1.8)	4 (8)	156.39–156.51	A, D, E, J	
5q33.3	13	10 (1.8)	3 (6)	157.25–158.80	A, D, E, J	CLINT1 EBF1 RNF145 UBLCP1 IL12B
6p25.1p24.3	10	7 (1.2)	3 (6)	5.54–8.38	A, B, C, D	FARS2 NRN1 F13A1 LY86 MMD-1 Zep-1 RREB1 SSR1 CAGE1 RIOK1 DSP BMP6 TXNDC5 MUTEDEEF1E1
6p22.3p22.2	5	4 (0.7)	1 (2)	20.29–23.74	A, B, D	
6p22.2p22.1	6	5 (0.9)	1 (2)	24.15–26.16	A, B, D	DCDC2 KAAG1 MRS2 GPLD1 ALDH5A1 TTRAP ACOT13 GMNN FAM65B DKFZp686H12134 HIST1H cluster TRIM38 HFE
6q24.1	2	1 (0.2)	1 (2)	140.6–142.5	D, F	
6q25.3	2	1 (0.2)	1 (2)	156.39–156.61	D	
7p22.2	7	1 (0.2)	6 (12)	3.02–3.12	D, K	CARD11
7p14.1	4	3 (0.5)	1 (2)	39.5–41.7	D, F	
7p12.2	2	2 (0.3)		50.18–50.45	D	IKZF1
7q21.1	4	3 (0.5)	1 (2)	85.41–86.44	A, C, E	
7q21.1	5		5 (10)	90.21–90.44	A, D	PFTK1
7q21.3q22.1	14	6 (1)	8 (16)	97.69–100.36	A, D, E, K	LMTK2 BHLHA15 TECPR1 BRI3 NPTX2 TMEM130 TRRAP SMURF1 KPNA7 MYH16 ARPC1A PDAP1 BUD31 PTC1D1 CPSF4 ATP5J2 ZKSCAN5 CYP3A4 TRIM4 COPS6 MCM7 TAF6 GATS PILRB PILRA ZCWPW1 MEPCE FBXO24 GNB2 EPO mir-25 mir-93 mir-106b
7q31.3	16	15 (2.7)	1 (2)	121.7–123.9	B, D, F, J, K	PTPRZ1 LKR/SDH AASS FEZF1 CADPS2 RNF133 TAS2R16 NDUFA5 ASB15 WASL HYAL4
7q33q34	22	15 (2.7)	7 (14)	135.74–137.48	B, D, E, J, K	CALD1 TMEM140 STRA8 WDR91 CNOT4 NUP205 FAM180A TPN miR490
7q34	20	19 (3.4)	1 (2)	139.72–140.02	B, D, E, J, K	TBXAS1 PARP12 MST109 JHDM1D KIAA1718
7q35q36.1	16	16 (2.9)		146.12–148.2	B, D, E, J, K	CNTNAP2
7q36.1q36.2	16	15 (2.7)	1 (2)	152.02–152.80	A, B, D, E, J, K	MLL3 XRCC2 ACTR3B FABP5L3
8p23.2	3	2 (0.3)	1 (2)	3.48–3.58	A, D	
8p22p21.3	2	1 (0.2)	1 (2)	18.72–21.93	D	
8p21.2p12	2	1 (0.2)	1 (2)	24.40–36.30	D	
8q22.1	3	3 (0.5)		93.15–94.17	A, K	C8orf83
8q24.1	4	3 (0.5)	1 (2)	117.81–118.38	I	
8q24.1q24.2	4	3 (0.5)	1 (2)	126.54–129.58	A, D	
8q24.2	3	3 (0.5)		130.53–130.80	A, D	
8q24.2q24.3	3	2 (0.3)	1 (2)	131.51–146.26	A, D	
9p24.3p13.3	4	4 (0.7)		0.19–33.18	A, D, E	
9q21.3	5	4 (0.7)	1 (2)	82.37–84.44	B, C, D, E	
9q22.3q31.1	5	5 (0.9)		93.92–103.96	C, D, E, K	more than 30 genes
9q32q33.1	2	2 (0.3)		116.51–117.92	B, D	
10q23.1q23.3	4	4 (0.7)		87.93–90.77	C, D	
10q24.1q24.2	4	4 (0.7)		96.48–100.81	C, D	
11p15.5p15.4	8	7 (1.2)	1 (2)	2.48–3.35	B, C, D, E	KCNQ1 KCNQ1OT1 KCNQ1DN CDKN1C SLC22A18NAP1L4 PHLDA2 CARS

Table 8. Cont.

Chromosome	All	p (%)	t (%)	consensus MCR	References	Genes
abnormalities				location in Mb		
						OSBPL5 C11orf36 MRGPPE
11q12.3q13.1	3	3 (0.5)		63.98–65.65	D	
11q13.1q25	4	4 (0.7)		67.25–134.24	B, D, E	
11q23.3	4	2 (0.3)	2 (4)	117.86–119.81	A, D, E	
12p13.3	4	2 (0.3)	2 (4)	0.06–4.05	D, E	
12p13.2	10	6 (1)	4 (8)	10.62–11.72	C, D, E, J	
12p13.2	12	10 (1.8)	2 (4)	11.2–12.70	C, D, E, F, J	
12p13.2p13.1	17	14 (2.5)	3 (6)	12.20–13.13	C, D, E, J, K	ETV6 BCL2L14 LRP6 MANSC1 LOH12CR1 AX748225 DUSP16 CREBL2 GPR19 CDKN1B APOLD1 DDX47 GPRC5A TVAS4 HEBP1
12p12.3	7	5 (0.9)	2 (4)	15.54–19.17	C, D, E, J, K	PTPRO EPS8 STRAP MGST1 LMO3 RERGL PIK3C2G CAPZA3
12q12	3	2 (0.3)	1 (2)	42.64–43.26	A, D	
12q13.1	2	2 (0.3)		46.06–46.30	A, D	
12q24.3	4	3 (0.5)	1 (2)	81.57–105.06	A, D, E	
12q24.3	3	2 (0.3)	1 (2)	121.28–122.73	A, D	
12q24.3	3	3 (0.5)		128.71–128.91	A, D, E	
13q14.3	8	7 (1.2)	1 (2)	49.63–50.51	C, D, E	
13q21.1	4	4 (0.7)		54.33–54.45	B, D	
16p11.1q12.1	20	20 (3.6)		35.06–50.12	D, G	VPS35 SHCBP1 ORC6L MYLK3 GPT2 DNAJA2 NETO2 ITFG1 PHKB ABCC12 ABCC11 LONP2 SIAH1 LONP N4BP1 CBLN1 HEATR3
16q21	24	23 (4.1)	1 (2)	57.56–58.96	B, D, G	GPR114 GPR56 GPR97 CCDC135 KIFC3 CNGB1 TEPP MMP15 CSNK2A2 GINS3 NDRG4 SETD6 CNOT1 GOT2
16q21	26	24 (4.3)	2 (4)	62.51–63.81	D, G, J	
16q22.3	25	22 (4)	3 (6)	70.76–71.46	D, G, J	VAC14 HYDIN FTSJD1 CALB2
16q22.3q23.1	26	26 (4.7)		73.30–73.57	G, H, J	BC042734
16q24.1	24	23 (4.1)	1 (2)	83.37–85.07	D, G, J	CDH13 HSBP1 MLYCD OSGIN1 NECAB2 MBTPS1 HSDL1 LRRC50 TAF1C ADAD2 KCNG4 USP10
16q24.3	26	26 (4.7)		87.30–87.37	G, J, K	FBXO31
17p13.2p13.1	22	16 (2.9)	6 (12)	4.01–8.20	A, D, J	TP53 NLRP1 NUP88 C1QBP XAF1 and more than 30 genes
17p12p11.2	7	5 (0.9)	2 (4)	14.74–19.35	A, D, E	
17p11.2	4	3 (0.5)	1 (2)	20.02–21.45	C, D, E	
17q11.2	44	39 (7.1)	5 (10)	26.49–27.52	A, D, E, G, H, J, K	NF1 EVI2A EVI2A
17q21.33	4	2 (0.3)	2 (4)	44.98–45.43	D, E	
17q21.33	3	3 (0.5)		46.22–47.56	D, E	
17q25.1q25.3	2	2 (0.3)		69.43–73.16	D	
18p11.32p11.31	14	12 (2.1)	2 (4)	1–4.62	D, G, J	C18orf2 METTL4 NDC80 SMCHD1 EMILIN2 LPIN2 MYOM1 MYL12B TGIF1 DLGAP1
18p11.23	17	16 (2.9)	1 (2)	7.42–7.58	G, H, J	PTPRM
18p11.22p11.21	5	4 (0.7)	1 (2)	9.03–13.81	D, H	
18q11.2	9	8 (1.4)	1 (2)	18.1–22.05	D, G	
18q11.2q12.2	21	18 (3.2)	3 (6)	21.74–33.13	D, G, K	CABYR OSBPL1A IMPACT HRH4 ZNF521 SS18 PSMA8 TAF4B CDH2 DSC3 DSC1 DSC2 DSG4 DSG3 DSG2 TTR RNF125 DTNA MAPRE2

Table 8. Cont.

Chromosome	All	p (%)	t (%)	consensus MCR	References	Genes
abnormalities				location in Mb		
18q21.1	21	20 (3.6)	1 (2)	43.39–46.37	D, E, G, K	HAUS1 LOXHD1 PIAS2 SMAD2
18q21.2	22	20 (3.6)	2 (4)	50.21–51.05	D, E, G, K	RAB27B CCDC68
18q21.32	22	20 (3.6)	2 (4)	55.08–55.51	D, E, G, J, K	ONECUT2 FECH NARS ATP8B1
18q22.3	23	22 (4.0)	1 (2)	69.06–69.18	D, E, G, K	
18q22.3q23	4	2 (0.3)	2 (4)	71.06–71.76	E, G, J	FBXO15
19p13.3	3	2 (0.3)	1 (2)	0.21–1.81	A, D	
19q13.2q13.43	2	2 (0.3)		46.16–63.43	C, D	
20q11.2q13.1	2	2 (0.3)		34.59–43.45	E	more than 30 genes
20q13.1q13.3	2	2 (0.3)		43.85–55.73	E	more than 30 genes
21q22.12	11	7 (1.2)	4 (8)	35.11–35.15	A, D, K	RUNX1
21q22.3	3	3 (0.5)		44.70–45.09	D	

The first column lists the chromosomal losses and gains. The second lists the absolute number of each rearrangement (excluding a single rearrangement). The third and the fourth are the absolute numbers in p-AML and t-AML respectively and the percentage is indicated between parenthesis. The chromosomal location is listed. The references are indicated by letters: A [32], B [33], C [34], D [18], E [19], F [28], G [29], H [30], I [31], J [20], K present work. The last column lists the genes included in those MCR.

doi:10.1371/journal.pone.0016623.t008

–3p

Two MCR were found. The most telomeric one on 3p21.3 was a 5.18 Mb recurrent loss covering more than 40 genes. It was found in p-AML (table 6, figure 1) but also in t-AML (tables 8 and 9).

A more centromeric 10Mb loss was found exclusively in t-AML. Both patients in the present work contributing to this MCR had been treated with RT and 5FU. PROK2, a prokineticin 2 isoform A precursor, is highly expressed in bone marrow [35] and could have chemokine-like activity [36]. Another gene, the SHQ1 homolog, expressed in CD34 cells has been purported to be required for the assembly of H/ACA small nucleolar and telomerase RNPs [35,37].

–4q

A specific loss in p-AML was found in 4q24 (table 8) including TET2, a tumor suppressor gene described in myeloid cancers [38].

A small loss of 4q31.2, exclusively in 8% of t-AML (tables 7 and 8) was found to delete the 5' half of SMAD1. This protein mediates the signals of bone morphogenetic proteins (BMPs), which are involved in a range of biological activities including cell growth, apoptosis, morphogenesis, development and immune responses. It is expressed in BM cells (UCSC).

–5q

The 5q- region was fragmented in more than twelve groups. In p-AML, the most frequent regions were comprised between 86.54 and 114.14 Mb, with proximal and distal “spreading”. This region contains the RASA1 gene which exhibits tumor suppressor activity on the RAS gene. RASA1 has been reported to be a CNA in breast cancers and a putative tumor suppressor gene [39]. PCSK1 may be implicated in malignancy [40]. APC and MCC genes are implicated in colorectal cancer. The more proximal area contains the AML/MDS region that Evers considered as a 5.2 Mb MCR [41].

Two MCR were observed in more than 10% of t-AML (table 8). Both were proximal to the previously reported 7.7 Mb 5q33.3 region [41]. The first MCR was located on 5q31 and was smaller than 1Mb. It contained several genes of interest such as CDKL3,

an important regulator of cell cycle progression, UBE2B that is required for post-replicative DNA damage repair, and the helicase DDX46 which is highly transcribed in bone marrow.

The second 5.22 Mb MCR in 5q31.3q32, was delineated by the present work (table 6). Among the 29 genes it harbored, several are overexpressed in bone [35]. PRELID2 codes for a protein containing a PRELI/MSF domain. It is an evolutionary conserved gene [42,43]. TCERG1 is a transcription factor that binds RNA polymerase II, inhibits the elongation of transcripts from target promoters and regulates transcription elongation in a TATA box-dependent manner. LARS encodes a cytosolic leucine-tRNA synthetase, a member of the class I aminoacyl-tRNA synthetase family. FBXO38 is a F-box protein 38 isoform A that is overexpressed in early erythroid cells. FBXO32, a family member of these cells, is a PRC2-targeted gene [44]. POU4F3, a POU class 4 homeobox 3 is a member of the POU-domain family of transcription factors that is not expressed in bone marrow but in monocytes. Furthermore, another member of the POU gene family, POU4F1, has been recently described to be associated with AML exhibiting t(8;21) [45]. RBM27 is a zinc finger RNA-binding protein member of the family that includes RBM15, alias OTT, which is involved in the regulation of hematopoietic stem cells and is fused with MKL1 in the t(1;22) of AML7 and plays a major role in the pathogenesis of this disease [46].

Finding different MCR with a maximum frequency in p-AML and in t-AML suggests different oncogenesis pathways on this chromosome.

7p MCR

A 90kb MCR in 7p22.2 (table 6 and 8) had deleted the CARD 11 gene in t-AML. The CARD domains of this caspase have been shown to activate NF-kappaB and to induce the phosphorylation of BCL10 when expressed in CD34+ cells [47]. CARD 11, via the immune cell restricted complex CARD11-BCL10-MALT1, [48] is implicated in lymphoma.

In three t-AML cases, a gain of 7p15 concerned the homeogene cluster of HOXA6, HOXA7, HOXA9 and HOXA10 (Table 6). This area has not been described as a CNV [7]. The HOXA

Table 9. Minimal critical regions in the literature including the present work: gains.

Chromosome	All	p (%)	t (%)	consensus MCR	References	Genes
abnormalities		location in Mb				
GAINS						
1q21.3q22	4	3 (0.5)	1 (2)	153.19–154.64	C, D, K	S100A8 S100A9 S100A13 S100A6 SNAPIN ILF2 NPR1 INTS3 VLCS-3 GATAD2B TORC2 CREB3L4 TPM3 HAX1 IL6R SHE UBE2Q1 ADAR CHRNB2
1q32.1	3	2 (0.3)	1 (2)	204.98–205.04	C, D	
1q32.1q44	6	5 (0.9)	1 (2.1)	235.00–235.10	A, B, K	BC016972 ?
3q26.3q29	2	2 (0.3)		182.99–133.31	E	more than 30 genes
4p13q12	2	2 (0.3)		42.30–58.23	B, D	
4q12q13.1	2	2 (0.3)		59.13–62.98	B, D	
4q28.3	2	2 (0.3)		132.8–136.7	B, G	
5p13.2q11.1	2	1 (0.2)	1 (2)	37.98–50.15	A, D	
5q11.2	3	2 (0.3)	1 (2)	51.21–54.12	A, D	
6q11.2q12	8	8 (1.4)		63.43–63.7	A, G	
6q27	3	2 (0.3)	1 (2)	168.12–168.32	D, K	MLL4 voir table 6
7p15.2	4		4 (8)	27.15–27.18	K	HOX genes
8q24.3	16	12 (2.1)	4 (8)	143.73–143.90	B, D, G, I, J, K	JRK PSCA LY6K C8orf55 LYPD2 SLURP1 LYNX1 LY6D
9p21.3	2	2 (0.3)		21.5–23.4	F, G	
9q13q21.3	2	2 (0.3)		70.23–83.52	E	FXN APBA1 TJP2 SMC5 TRPM3 GDA TCM1 ANXA1 RARB RFK GNA14 TLE4 TLE1
11q12.1q14.1	16	16 (2.9)		59.1–79.6	G	more than 50 genes
11q14.1	5	5 (0.9)		79.6–81.3	D, G	
11q24.2q24.3	31	31 (5.6)		126.53–130.23	D, E, G, J	KIRREL3 ETS1 FLI1 C11orf45 TP53AIP1 RICS BARX2 NFRKB PRDM10 APLP2 ST14 ZBTB44
12p13.33p11.21	13	13 (2.3)		0.1–32.7	E, G	no gene
13q12.11q13.1	3	3 (0.5)		19.9–31.7	G	
13q31.3	2	2 (0.3)		90.45–90.97	E	GPC5
15q21.1	3	3 (0.5)		46.52–47.36	B, D, E	
15q21.3q22.1	3	3 (0.5)		55.6–56.6	B, E, F	
15q23	5	5 (0.9)		67.44–68.37	B, E, J	SMAD3 AAGAB MAP2K5 LBXCOR1 PIAS1
15q26.q26.3	6	6 (1)		92.5–100.0	C, E, G	
17q12	6	4 (0.7)	2 (4)	32.82–33.20	C, D, E, J	TMEM132E
17q21.2q21.31	5	3 (0.5)	2 (4)	37.08–38.48	D, E, J	FBXO47 PLXDC1 FBXL20 MED1 CRKRS TCAP PGAP3 ERBB2 GRB7 IKZF3 GSDMB ORMDL3 PSMD3 CSF3 MED24 THRAP4 NR1D1 MSL1 CASC3 WIPF2 CDC6 RARA
19p13.3p13.12	13	13 (2.3)		2.19–14.11	D, G, J	
19p13.12p13.11	13	13 (2.3)		16.0–16.15	F, G, J	
19q13.31	2	2 (0.3)		49.2–49.9	D, F	
19q13.41	2	2 (0.3)		58.3–59.1	D, G	
20q11.1q11.21	3	3 (0.5)		28.2–30.5	E, G	
21q21.1	2	2 (0.3)		14.29–17.97	K	LIPI ABCC13 RBM11 HSPA13 SAMSN1 NRIP1 USP25 C21orf34 CXADR BTG3 miR-99a miR-125b-2 hsa-let-7c
21q22.2	18	18 (3.2)		38.65–38.85	C, D, G, J, K	ERG ETS2
21q22.3q	4	4 (0.7)		45.09–46.91	D, K	RRP1B PDXK RRP1 CSTB AGPAT3 TRAPPC10

Table 9. Cont.

Chromosome	All	p (%)	t (%)	consensus MCR	References	Genes
abnormalities				location in Mb		
GAINS						
						TMEM1 PWP2 C21orf33 ICOSLG DNMT3L AIRE
						PFKL TRPM2 LRRC3 UBE2G2 SUMO3 PTTG1IP PBF
						ITGB2 ADARB1 COL18A1
22q12.3	13	12 (2.1)	1 (2)	33.90–35.32	D, G	LARGE
22q13.1q13.2	14	13 (2.3)	1 (2)	36.78–42.24	D, G	more than 30 genes
22q13.31q13.32	11	10 (1.8)	1 (2)	44.92–48.08	D, G	PRR5 ARHGAP8 PHF21B NUP50 UPK3A SMC1B
						ATXN10 WNT7B GTSE1 GRAMD4

The first column lists the chromosomal losses and gains. The second lists the absolute number of each rearrangement (excluding a single rearrangement). The third and the fourth are the absolute numbers in p-AML and t-AML respectively and the percentage is indicated between parenthesis. The chromosomal location is listed. The references are indicated by letters: A [32], B [33], C [34], D [18], E [19], F [28], G [29], H [30], I [31], J [20], K present work. The last column lists the genes included in those MCR.

doi:10.1371/journal.pone.0016623.t009

family of genes encode HOX family transcription factors, which play an important role in the development of body segmentation and in the survival of hematopoietic stem cells. HOXA6 is directly implicated in the process of hematopoietic progenitor cell development. HOXA9, that can be fused with NUP98 in some AML [49], is fundamentally involved in the AML process in transgenic mice [50,51,52].

These genes belong to the HOXA5-11 cluster and are expressed throughout the CD34+ compartment [53,54]. The CD34+ level becomes important in AML due to the immature status of blastic cells.

As overexpression of Abd-B HOXA genes has been demonstrated in AML with a rearranged MLL [55], the gain of the HOXA cluster could be expected in case t-19 which had a t(9;11). The other t(v;MLL) did not exhibit this gain. The other two patients with such a gain (cases t-17 and t-14) had a t(15;17) and a +8 respectively. They were cytologically and cytogenetically different and had wild type MLL. The HOX gain was not detected in p-AML.

–7q

On 7q, the 11 MCR with a specificity for t-AML or p-AML were interlaced. Three MCR were reported in more than 10% of t-AML (table 8). The first one is 7q21.1 with a small region potentially implicating PFTK1, a member of a protein kinase family whose gain was recently shown to be involved in hepatocellular carcinoma cells.

The most frequent MCR in t-AML was 7q21.3q22.1 (tables 6 and 8). The number of genes present in this almost 3 Mb-long MCR prohibited extensive reviewing.

Three miRNA, mir-25, mir-93 and mir-106b were present in this deleted region (table 6 and table 8), regulating numerous genes. The miR-106b~25 cluster cooperates with its host gene MCM7 in cellular transformation both *in vitro* and *in vivo*, so that the concomitant overexpression of MCM7 and the miRNA cluster triggers prostatic intraepithelial neoplasia in transgenic mice [56]. MCM7 can be associated with CDK4 that may regulate the binding of this protein to the tumor suppressor protein RB1/RB. Among 30 genes, BRI3 appears to be overexpressed in BM-CD33+ cells. It seems to play a key role in TNF-induced cell death [57].

A defect in DNA repair was reported in TRRAP-deficient cells [58].

In 7q33q34, a 1.74Mb MCR had a low ratio in a patient (t-2), implying a probable double deletion, while the remaining ratio

could have been due to the few normal cells. This MCR was the third in t-AML. It contained miRNA-490 which was probably regulating fewer than a hundred genes, with a maximum context score for the FOS gene. Among several genes (table 6), CREB3L2 was overexpressed in BM-CD34+ cells. It is a DNA binding and basic leucine zipper dimerization (bZIP) transcription factor. It was reportedly fused with FUS in fibrosarcomas [59] via a t(7;16)(q34;p11) and with PPAR gamma in a subset of thyroid carcinoma via a t(3;7)(p25;q34) [60].

In our series of p-AML, a large 43 Mb MCR was situated between 7q31.3 and the telomere (table 6). Table 8 allowed us to divide this region into 5 smaller MCR that seemed to be different from those of t-AML. The only exception was the previously identified 7q33q34 MCR that was the only MCR common to t-AML and p-AML in the loss of 7q.

The most centromeric p-AML-specific deletion was a 2.2Mb MCR on 7q31.3. Among the 10 genes in the region, only WASL is reported to potentially play a role in the microthrombocytopenia, the characteristic sign of Wiskott-Aldrich syndrome [61].

The 7q34 MCR was the most frequent and the most specific in p-AML. It contains 5 genes (table 8) that are not obviously involved in malignancy and some (e.g. PARP12) are poorly known but all are more or less strongly expressed in CD33 myeloid cells.

They were located between 7q31.3 and 7q36.2. Obviously, there are too many genes in those 5 MCRs, but PTPRZ1, MLL3 and XRCC2 could be candidate leukemogenic genes.

+8q24.3

A gain of 170 Kb located on 8q24.3 was selected as a MCR from two cases in the present group of t-AML (Figure 1). This MCR was confirmed in other series (table 9), frequently in t-AML (8%) and less frequently in p-AML (2.1%). This finding is consistent with the +8q22qter MCR being the “drive” genes of trisomy 8 which can be observed in some t(8;21) AML [62]. This MCR was telomeric to the MYC and TRIB1 genes [63]. PSCA, implicated in prostate cancer and C8orf55, the “mesenchymal stem cell protein DSCD75” which plays a role in bone marrow cell interactions, could not be excluded. However JRK, which is moderately overexpressed in BM-CD34+ cells [6] encodes a putative DNA-binding protein [64] and exhibits homology with the CENP-B (centromere-binding protein B).

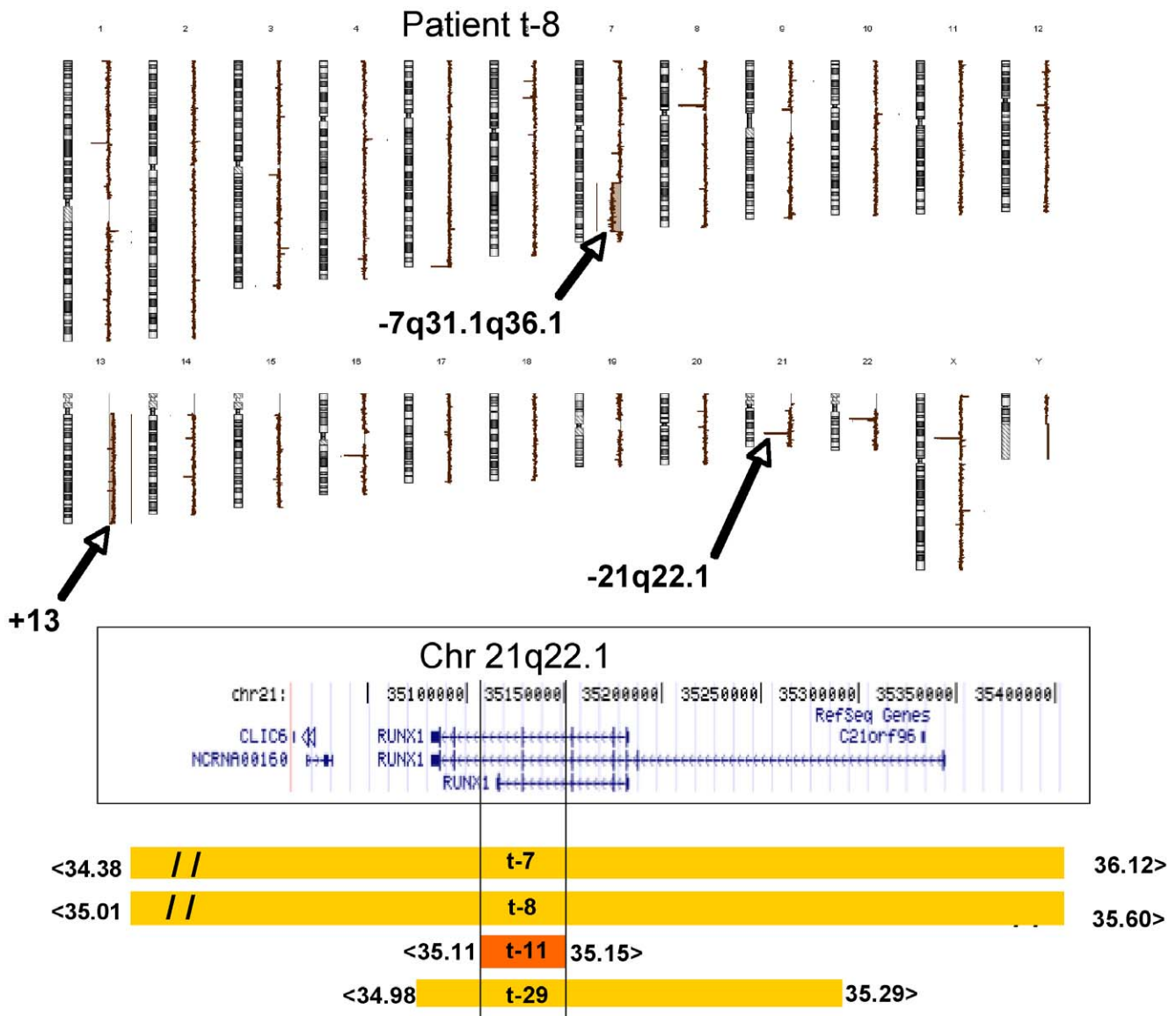


Figure 2. aCGH karyogram of patient t-8 and MCR delineation of RUNX1. A=A del (7q) and trisomy 13 are obvious. Cryptic deletions from 21q22.1 (corresponding to RUNX1) and from Xp11.4, that are smaller than 60kb, are nullosomic. On 22q11, the loss is a constitutive CNV of GGT1. B=A UCSC map (build 18) of the RUNX1 gene. C=The deletions of RUNX in four patients at the molecular level are labeled in orange and the smallest in red. The location of the breakpoints are indicated at the ends of the colored lines. Patient t-8 exhibits a homozygous 590 Kb deletion that encompassed the entire RUNX1 gene and could have occurred by an acquired isodisomy. Patient t-11 had the smallest deletion (40Kb) that was internal to RUNX1; t-29 had a deletion limited to RUNX1. doi:10.1371/journal.pone.0016623.g002

+11q24.2q24.3

Although no such result was found in our study, 5.6% of the p-AML in other series clearly showed gains or amplifications of this region that contains ETS1 and FLI1 genes. They are members of the ETS gene family that includes genes playing important roles in regulating hematopoiesis, proliferation, differentiation and apoptosis. Interestingly, these gains were found in cases presenting gains of the ETS2 and ERG genes (see below, the +21q22 paragraph).

-12p13

A 1.48Mb loss was defined as a MCR from three t-AML cases in the present report. The same area is recurrently lost in both types of AML (table 7, table 8). Among 17 genes, the 5' part of

ETV6 was lost. This ETS family transcription factor is a multi-partner gene with almost 28 different fusion genes via reciprocal translocations. It is implicated in multiple myeloid malignancies such as MDS and AML, but also in lymphoid malignancies and in fibrosarcomas [49]. CDKN1B encodes a cyclin-dependent kinase inhibitor. These two genes are considered as having tumor suppressor activity.

-17p13.2p13.1

Although no deletion of this region was found in our series, several reports claimed a loss of this MCR in 12% of t-AML and 3% of p-AML. This region, among several genes, exhibits loss of the TP53 tumor suppressor gene [49].

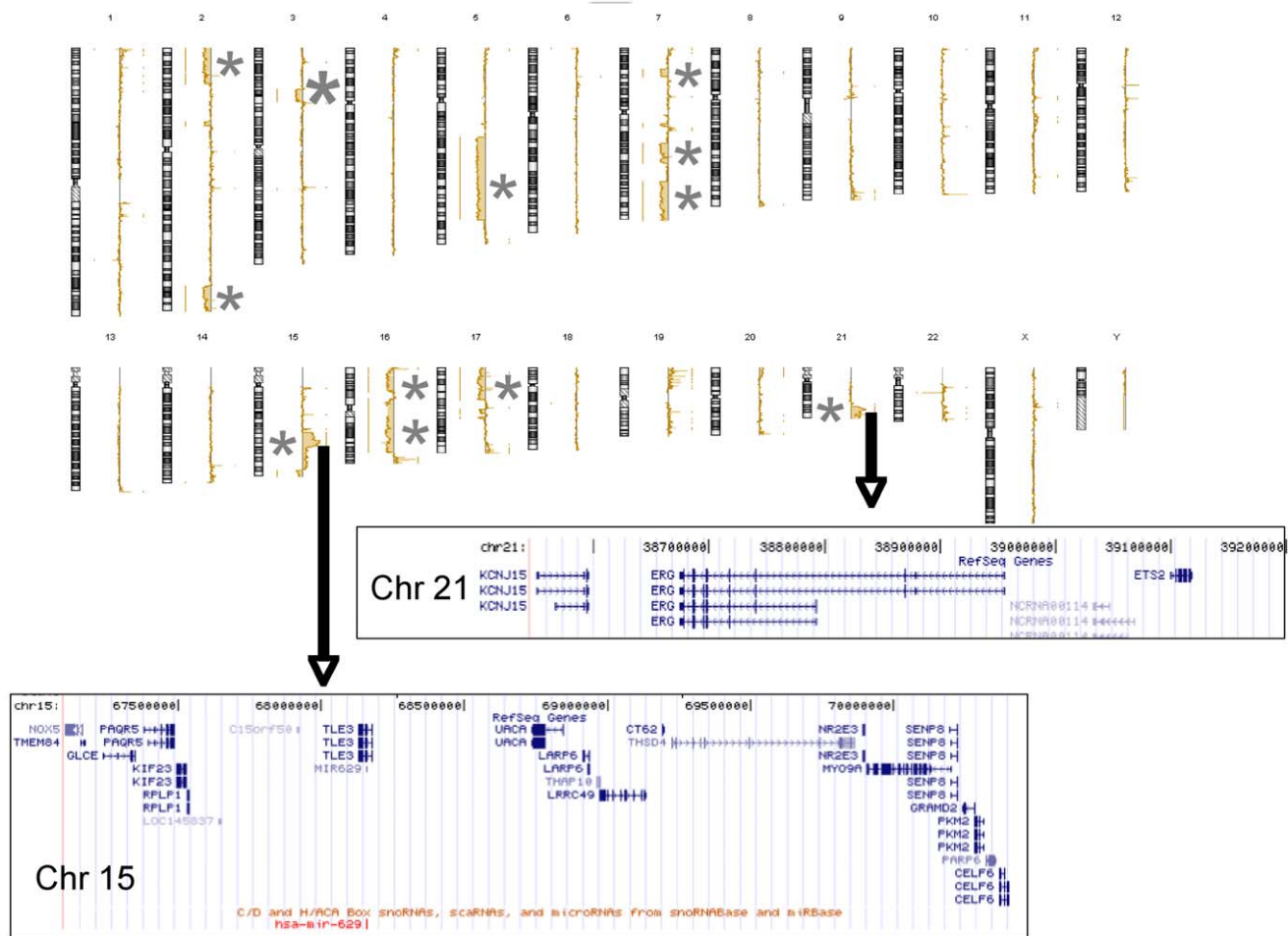


Figure 3. p-AML (case p24) with a complex karyotype. See the amplification of 15q23q24 and of 21q11.2q22.1 that are enlarged at the gene level. Multiple abnormalities (cf table 5) are asterisked. doi:10.1371/journal.pone.0016623.g003

–17q11.2

This MCR, that we found in a single case of t-AML (table 7), is the most frequent loss of the table 8 with 7.1% of in p-AML and 10% of in t-AML. This MCR contains the NF1 tumour suppressor gene NF1 which encodes neurofibromin, a GTPase-activating protein that negatively regulates RAS signaling by stimulating hydrolysis of Ras-GTP. Loss of NF1 can lead to a progressive myeloproliferative disorder in animal models [65] and in Juvenile myelomonocytic leukemia. Parkin [19] concluded that NF1 null states were present in 7% of AML. This important point confirmed that additional events were are required.

–18

Loss of different parts of chromosome 18 were highly recurrent in p-AML (table 8). In our series, we found a single p-AML with a 2.06 Mb deletion that had an equivalent MCR in table 8 which contains RAB27B and CCDC68 genes.

–21q22.12

This 40kb small MCR contains RUNX1 that was lost in 4 t-AML cases in the present series. Two patients had lost their two alleles either through double losses or deletion and D171N mutation. This mutation has been claimed to result in the proliferation of immature myeloid cells, an enhanced capacity

for self-renewal, and the proliferation of primitive progenitors [66].

Patient t-29 had a normal karyotype [32] and a 310kb deletion that deleted most of the gene in a radiotherapy-induced leukemia [67].

Three deleted cases were exposed to multi-agent chemotherapy with alkylating agents. They exhibited a 7q-/-7 as previously reported [68] as well as patient t-12 that had a balanced abnormality involving RUNX1, only detected by classical karyotype. It has been suggested that the mutation of RUNX1 and gene losses localized on 7q could cooperate in leukemogenesis and predispose to leukemic transformation into t-AML following alkylating agents (figure 2). In table 8, seven other cases were observed in p-AML.

RUNX1, the subunit alpha of the Core Binding Factor (CBF), a heterodimeric transcription factor, plays a key role in the regulation of hematopoietic stem cell proliferation and differentiation. It is one of the most frequent targets of chromosome translocations via nearly forty different partners [49] in various forms of leukemia.

A germline mono-allelic mutation or deletion of RUNX1 [69] has been described in FPD (Familial Platelet Dysfunction) disease. A second mutation may appear at the AML stage, mostly with an M0 type in the FAB classification [70].

Point mutations of RUNX1 have been described in radiation-induced MDS [67] or in therapy-induced transformation of myeloproliferative neoplasia [66].

Haploinsufficiency of RUNX1 leads to the loss of function of this gene (probably a tumor suppressor function). In the case of t-AML, the various point mutations are localized at the N-terminal, the DNA binding site [68].

+21q22

Distal 21q11.2qter polysomy was observed in three cases (table 6), two of which exhibited amplifications of this region in the context of a complex karyotype [21].

The first amplicon (table 5 and 6) from 14.29 to 17.97Mb harbored a cluster of miR-99a, miR-125b-2 and hsa-let-7c, each of which is predicted to regulate several hundred genes. Several of the genes in this amplicon (table 6) were overexpressed [35] in BM-CD34+ cells. SAMS1, a hematopoietic adaptor was found to contain the SH3 and SAM domains 1, HSP13, BTG3 and NRIP1. This region was reported to be amplified by BAC aCGH in a series of patients with complex karyotypes [71] which showed that NRIP1 and SAMS1 genes were up-regulated compared with their status in patients with normal karyotypes. The same area from LIP1 to miR-125b-2 is reported to be homozygously deleted in the Non-Small Cell Lung Cancer cell line Calu-6 [72].

The 1Mb-long second amplicon, observed in cases p-21 and p-24 was found to occur frequently in p-AML (table 9) and most of the cases also exhibited a gain of ETS1. It contained ERG and ETS2 genes. These two ETS transcription factor gene family members were overexpressed in BM-CD34+ cells. ERG can be fused with several genes in prostate cancer [73], in Ewing tumors [74] and in leukemias with a t(16;21)(p11;q22) and an FUS-ERG fusion [49]. It has been claimed that ERG is a megakaryocytic oncogene [75] together with ETS2 [76].

References

- Godley LA, Larson RA (2008) Therapy-related myeloid leukemia. *Semin Oncol* 35: 418–429.
- Leone G, Pagano L, Ben-Yehuda D, Voso MT (2007) Therapy-related leukemia and myelodysplasia: susceptibility and incidence. *Haematologica* 92: 1389–1398.
- Pedersen-Bjergaard J, Andersen MT, Andersen MK (2007) Genetic pathways in the pathogenesis of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. pp 392–397.
- Pedersen-Bjergaard J, Andersen MK, Andersen MT, Christiansen DH (2008) Genetics of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia* 22: 240–248.
- Toujani S, Dessen P, Ithzar N, Danglot G, Richon C, et al. (2009) High resolution genome-wide analysis of chromosomal alterations in Burkitt's lymphoma. *PLoS One* 4: e7089.
- Zhu J, Sanborn JZ, Benz S, Szeto C, Hsu F, et al. (2009) The UCSC Cancer Genomics Browser. *Nat Methods* 6: 239–240.
- Iafate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, et al. (2004) Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* 36: 949–951.
- Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, et al. (2006) Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 444: 444–454.
- Wong KK, deLeeuw RJ, Dosanjh NS, Kimm LR, Cheng Z, et al. (2007) A comprehensive analysis of common copy-number variations in the human genome. *Am J Hum Genet* 80: 91–104.
- Skjeldred CF, Saebø M, Hjartaker A, Grotmol T, Hansteen IL, et al. (2007) Meat, vegetables and genetic polymorphisms and the risk of colorectal carcinomas and adenomas. *BMC Cancer* 7: 228.
- Suzen HS, Guvenç G, Turanlı M, Comert E, Duydu Y, et al. (2007) The role of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms in head and neck cancer risk. *Oncol Res* 16: 423–429.
- Srećja L, Syamala V, Hariharan S, Syamala VS, Ravceendran PB, et al. (2008) Glutathione S-transferase M1, T1 and P1 polymorphisms: susceptibility and outcome in lung cancer patients. *J Exp Ther Oncol* 7: 73–85.
- Lin C-H, Li L-H, Ho S-F, Chuang T-P, Wu J-Y, et al. (2008) A large-scale survey of genetic copy number variations among Han Chinese residing in Taiwan. *BMC Genetics* 9: 92.
- Schmetzer HM, Braun S, Wiesner D, Duell T, Gerhartz HH, et al. (2000) Gene rearrangements in bone marrow cells of patients with acute myelogenous leukemia. *Acta Haematol* 103: 125–134.
- Roumier C, Eclache V, Imbert M, Davi F, MacIntyre E, et al. (2003) M0 AML, clinical and biologic features of the disease, including AML1 gene mutations: a report of 59 cases by the Groupe Français d'Hématologie Cellulaire (GFHC) and the Groupe Français de Cytogénétique Hématologique (GFCH). *Blood* 101: 1277–1283.
- Dupret C, Asnafi V, Leboeuf D, Millien C, Ben Abdelali R, et al. (2005) IgH/TCR rearrangements are common in MLL translocated adult AML and suggest an early T/myeloid or B/myeloid maturation arrest, which correlates with the MLL partner. *Leukemia* 19: 2337–2338.
- Schoch K, Haferlach T, Bursch S, Gerstner D, Schnittger S, et al. (2002) Loss of genetic material is more common than gain in acute myeloid leukemia with complex aberrant karyotype: a detailed analysis of 125 cases using conventional chromosome analysis and fluorescence in situ hybridization including 24-color FISH. *Genes Chromosomes Cancer* 35: 20–29.
- Parkin B, Erba H, Ouilllette P, Roulston D, Purkayastha A, et al. (2010) Acquired genomic copy number aberrations and survival in adult acute myelogenous leukemia. *Blood*.
- Parkin B, Ouilllette P, Wang Y, Liu Y, Wright W, et al. (2010) NF1 inactivation in adult acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res* 16: 4135–4147.
- Walter MJ, Payton JE, Ries RE, Shannon WD, Deshmukh H, et al. (2009) Acquired copy number alterations in adult acute myeloid leukemia genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 12950–12955.
- Mrozek K (2008) Cytogenetic, molecular genetic, and clinical characteristics of acute myeloid leukemia with a complex karyotype. *Semin Oncol* 35: 365–377.
- Peterson LF, Boyapati A, Ahn EY, Biggs JR, Okumura AJ, et al. (2007) Acute myeloid leukemia with the 8q22;21q22 translocation: secondary mutational events and alternative t(8;21) transcripts. *Blood* 110: 799–805.
- Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP (2004) MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 303: 83–86.
- Karp X, Ambros V (2005) Developmental biology. Encountering microRNAs in cell fate signaling. *Science* 310: 1288–1289.
- Calin GA, Croce CM (2006) MicroRNAs and chromosomal abnormalities in cancer cells. *Oncogene* 25: 6202–6210.

Conclusion

High resolution cytogenomics obtained by aCGH and similar techniques already published allowed us to characterize numerous untargeted non random chromosome abnormalities. This work supports the hypothesis that they can be classified into several categories: abnormalities common to all AML (e.g. 8q24.3 gain or 17q11.2 deletion involving NF1); those more frequently found in t-AML (e.g. 7q21 or 7q33 deletions or even the specific gain of HOX genes); and those specifically found in p-AML (e.g. loss of the 139 to 152.8 Mb of 7q, 11q24 gain or 21q22 with amplifications of ERG and ETS2).

The genes involved in AML MCRs are often very well known in leukemogenesis but many others need to be explored.

Acknowledgments

The authors thank Lorna Saint Ange for editing, Lydie Da Costa for her friendly help, Didier Fauvet, Philippe Leopoldie, Caroline Dubois Gache, Bernard Clause, Sebastien Forget for their invaluable assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: NI PD AB. Performed the experiments: NI PD AB ST CR NA CP VL VS ALB JHB SdB. Analyzed the data: NI PD AB ST CR NA CP VL VS ALB JHB SdB. Contributed reagents/materials/analysis tools: NI PD AB ST CR NA CP VL VS ALB JHB SdB. Wrote the paper: NI PD AB.

26. Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, Calin GA, Croce CM (2006) MicroRNA expression and function in cancer. *Trends Mol Med* 12: 580–587.
27. Dixon-McIver A, East P, Mein CA, Cazier JB, Molloy G, et al. (2008) Distinctive patterns of microRNA expression associated with karyotype in acute myeloid leukaemia. *PLoS One* 3: e21411.
28. Paulsson K, Heidenblad M, Strombeck B, Staaf J, Jonsson G, et al. (2006) High-resolution genome-wide array-based comparative genome hybridization reveals cryptic chromosome changes in AML and MDS cases with trisomy 8 as the sole cytogenetic aberration. *Leukemia* 20: 840–846.
29. Rucker FG, Bullinger L, Schwaenen C, Lipka DB, Wessendorf S, et al. (2006) Disclosure of candidate genes in acute myeloid leukemia with complex karyotypes using microarray-based molecular characterization. *J Clin Oncol* 24: 3887–3894.
30. Suela J, Alvarez S, Cigudosa JC (2007) DNA profiling by arrayCGH in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Cytogenet Genome Res* 118: 304–309.
31. Tybakinoja A, Elonen E, Piippo K, Porkka K, Knuutila S (2007) Oligonucleotide array-CGH reveals cryptic gene copy number alterations in karyotypically normal acute myeloid leukemia. *Leukemia* 21: 571–574.
32. Akagi T, Ogawa S, Dugas M, Kawamata N, Yamamoto G, et al. (2009) Frequent genomic abnormalities in acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome with normal karyotype. *Haematologica* 94: 213–223.
33. Akagi T, Shih LY, Kato M, Kawamata N, Yamamoto G, et al. (2009) Hidden abnormalities and novel classification of t(15;17) acute promyelocytic leukemia (APL) based on genomic alterations. *Blood* 113: 1741–1748.
34. Akagi T, Shih LY, Ogawa S, Gerss J, Moore SR, et al. (2009) Single nucleotide polymorphism genomic arrays analysis of t(8;21) acute myeloid leukemia cells. *Haematologica* 94: 1301–1306.
35. Su AI, Wiltshire T, Batalov S, Lapp H, Ching KA, et al. (2004) A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 6062–6067.
36. Monnier J, Samson M (2008) Cytokine properties of prokineticins. *FEBS J* 275: 4014–4021.
37. Grozdanov PN, Roy S, Kittur N, Meier UT (2009) SHQ1 is required prior to NAF1 for assembly of H/ACA small nucleolar and telomerase RNPs. *RNA* 15: 1188–1197.
38. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, et al. (2009) Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med* 360: 2289–2301.
39. Hu X, Stern HM, Ge L, O'Brien C, Haydu L, et al. (2009) Genetic alterations and oncogenic pathways associated with breast cancer subtypes. *Mol Cancer Res* 7: 511–522.
40. Stockwin LH, Vistica DT, Kenney S, Schrupp DS, Butcher DO, et al. (2009) Gene expression profiling of alveolar soft-part sarcoma (ASPS). *BMC Cancer* 9: 22.
41. Evers C, Beier M, Poelitz A, Hildebrandt B, Servan K, et al. (2007) Molecular definition of chromosome arm 5q deletion end points and detection of hidden aberrations in patients with myelodysplastic syndromes and isolated del(5q) using oligonucleotide array CGH. *Genes Chromosomes Cancer* 46: 1119–1128.
42. Gao M, Liu Q, Zhang F, Han Z, Gu T, et al. (2009) Conserved expression of the PRELI domain containing 2 gene (Prelid2) during mid-later-gestation mouse embryogenesis. *J Mol Histol* 40: 227–233.
43. Tahvanainen J, Kallonen T, Lahteenmaki H, Heiskanen KM, Westermark J, et al. (2009) PRELI is a mitochondrial regulator of human primary T-helper cell apoptosis, STAT6, and Th2-cell differentiation. *Blood* 113: 1268–1277.
44. Fiskus W, Wang Y, Sreekumar A, Buckley KM, Shi H, et al. (2009) Combined epigenetic therapy with the histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A and the histone deacetylase inhibitor panobinostat against human AML cells. *Blood* 114: 2733–2743.
45. Fortier JM, Payton JE, Cahan P, Ley TJ, Walter MJ, et al. (2010) POU4F1 is associated with t(8;21) acute myeloid leukemia and contributes directly to its unique transcriptional signature. *Leukemia* 24: 950–957.
46. Niu C, Zhang J, Breslin P, Onciu M, Ma Z, et al. (2009) c-Myc is a target of RNA-binding motif protein 15 in the regulation of adult hematopoietic stem cell and megakaryocyte development. *Blood* 114: 2087–2096.
47. Staudt LM (2010) Oncogenic activation of NF-kappaB. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a000109.
48. Ferch U, Kloob B, Gewies A, Pfander V, Duwel M, et al. (2009) Inhibition of MALT1 protease activity is selectively toxic for activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med* 206: 2313–2320.
49. Huret JL Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.
50. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, et al. (1999) Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 286: 531–537.
51. Thorsteinsdottir U, Mamo A, Kroon E, Jerome L, Bijl J, et al. (2002) Overexpression of the myeloid leukemia-associated Hoxa9 gene in bone marrow cells induces stem cell expansion. *Blood* 99: 121–129.
52. Eklund EA (2007) The role of HOX genes in malignant myeloid disease. *Curr Opin Hematol* 14: 85–89.
53. Sauvageau G, Lansdorp PM, Eaves CJ, Hogge DE, Dragowska WH, et al. (1994) Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 12223–12227.
54. Kawagoe H, Humphries RK, Blair A, Sutherland HJ, Hogge DE (1999) Expression of HOX genes, HOX cofactors, and MLL in phenotypically and functionally defined subpopulations of leukemic and normal human hematopoietic cells. *Leukemia* 13: 687–698.
55. Quentmeier H, Dirks WG, Macleod RA, Reinhardt J, Zaborski M, et al. (2004) Expression of HOX genes in acute leukemia cell lines with and without MLL translocations. *Leuk Lymphoma* 45: 567–574.
56. Polisenio L, Salmena L, Riccardi L, Fornari A, Song MS, et al. (2010) Identification of the miR-106b~25 microRNA cluster as a proto-oncogenic PTFEN-targeting intron that cooperates with its host gene MCM7 in transformation. *Sci Signal* 3: ra29.
57. Yamazaki T, Sasaki N, Nishi M, Yamazaki D, Ikeda A, et al. (2007) Augmentation of drug-induced cell death by ER protein BR13BP. *Biochem Biophys Res Commun* 362: 971–975.
58. Murr R, Loizou JI, Yang YG, Cuenin C, Li H, et al. (2006) Histone acetylation by Trapp-Tip60 modulates loading of repair proteins and repair of DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol* 8: 91–99.
59. Panagopoulos I, Storzazzi CT, Fletcher CD, Fletcher JA, Nascimento A, et al. (2004) The chimeric FUS/CREB3L2 gene is specific for low-grade fibromyxoid sarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 40: 218–228.
60. Lui WO, Zeng L, Rehrmann V, Deshpande S, Tretiakova M, et al. (2008) CREB3L2-PPARG fusion mutation identifies a thyroid signaling pathway regulated by intramembrane proteolysis. *Cancer Res* 68: 7156–7164.
61. Sabri S, Foudi A, Boukour S, Franc B, Charrier S, et al. (2006) Deficiency in the Wiskott-Aldrich protein induces premature proplatelet formation and platelet production in the bone marrow compartment. *Blood* 108: 134–140.
62. Farra C, Awwad J, Valent A, Lozach F, Bernheim A (2004) Complex translocation (8;12;21): a new variant of t(8;21) in acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 155: 138–142.
63. Storzazzi CT, Fioretto R, Surace C, Lonoce A, Mastroianni A, et al. (2006) MYC-containing double minutes in hematologic malignancies: evidence in favor of the episome model and exclusion of MYC as the target gene. *Hum Mol Genet* 15: 933–942.
64. Liu W, Seto J, Sibille E, Toth M (2003) The RNA binding domain of Jerky consists of tandemly arranged helix-turn-helix/homeodomain-like motifs and binds specific sets of mRNAs. *Mol Cell Biol* 23: 4083–4093.
65. Le DT, Kong N, Zhu Y, Lauchle JO, Aiyigari A, et al. (2004) Somatic inactivation of Nfl in hematopoietic cells results in a progressive myeloproliferative disorder. *Blood* 103: 4243–4250.
66. Ding Y, Harada Y, Imagawa J, Kimura A, Harada H (2009) AML1/RUNX1 point mutation possibly promotes leukemic transformation in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 114: 5201–5205.
67. Harada H, Harada Y, Tanaka H, Kimura A, Inaba T (2003) Implications of somatic mutations in the AML1 gene in radiation-associated and therapy-related myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia. *Blood* 101: 673–680.
68. Christiansen DH, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J (2004) Mutations of AML1 are common in therapy-related myelodysplasia following therapy with alkylating agents and are significantly associated with deletion or loss of chromosome arm 7q and with subsequent leukemic transformation. *Blood* 104: 1474–1481.
69. Beri-Dexheimer M, Latger-Cannard V, Philippe C, Bonnet C, Chambon P, et al. (2008) Clinical phenotype of germ-line RUNX1 haploinsufficiency: from point mutations to large genomic deletions. *Eur J Hum Genet* 16: 1014–1018.
70. Preudhomme C, Renneville A, Bourdon V, Philippe N, Roche-Lestienne C, et al. (2009) High frequency of RUNX1 biallelic alteration in acute myeloid leukemia secondary to familial platelet disorder. *Blood* 113: 5583–5587.
71. Baldus CD, Bullinger L (2008) Gene expression with prognostic implications in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Semin Oncol* 35: 356–364.
72. Yamada H, Yanagisawa K, Tokumaru S, Taguchi A, Nimura Y, et al. (2008) Detailed characterization of a homozygously deleted region corresponding to a candidate tumor suppressor locus at 21q11-21 in human lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 47: 810–818.
73. Clark JP, Cooper CS (2009) ETS gene fusions in prostate cancer. *Nat Rev Urol* 6: 429–439.
74. Janknecht R (2005) EWS-ETS oncoproteins: the linchpins of Ewing tumors. *Gene* 363: 1–14.
75. Salek-Ardakani S, Smooha G, de Boer J, Sebire NJ, Morrow M, et al. (2009) ERG is a megakaryocytic oncogene. *Cancer Res* 69: 4665–4673.
76. Stankiewicz MJ, Crispino JD (2009) ETS2 and ERG promote megakaryopoiesis and synergize with alterations in GATA-1 to immortalize hematopoietic progenitor cells. *Blood* 113: 3337–3347.
77. Santoro A, Maggio A, Carbone P, Mirto S, Caronia F, et al. (1992) Amplification of ETS2 oncogene in acute nonlymphoblastic leukemia with t(6;21;18). *Cancer Genet Cytogenet* 58: 71–75.

Communications scientifiques

N. Itzhar, **Saloua Toujani**, S. De Botton P, C. Richon, B. Clause, JH, Bourhis, P. Dessen, A. Bennaceur, Alain Bernheim. Détermination des régions minimales critiques dans les leucémies secondaires par CGH array haute résolution. *4^{ème} Assises de Génétique Humaine et Médicale. Janvier 2008. Lille-France. (Communication orale)*

Saloua Toujani, Philippe Dessen, Nathalie Itzhar, Gisèle Danglot, Catherine Richon, Yegor Vassetzky, Thomas Robert, Vladimir Lazar, Jacques Bosq, Lydie Da Costa, Christine Pérot, Vincent Ribrag, Catherine Patte, Joëlle Wiels, Alain Bernheim. Cartographie de haute résolution des altérations génomiques associées aux lymphomes de Burkitt. *5^{ème} Assises de Génétique Humaine et Médicale. Janvier 2010. Strasbourg-France (Communication orale).*

Toujani Saloua, Bernheim Alain, Dessen Philippe, Wiels Joelle, Itzhar Nathalie, Vassetzky Ygor, Ribrag Vincent, Patte Catherine. High resolution analysis of chromosomal abnormalities in Burkitt's lymphoma. *7th European Cytogenetics conference. July 2009. Stockholm, Sweden (communication affichée).*

RESUME

Le cancer est désormais considéré comme une maladie génomique de la cellule. Les moyens d'étude de l'oncogénome étaient basés sur les différentes modalités du caryotype, peu résolutif. L'application des techniques de micromatrices d'oligonucléotides, notamment l'aCGH, a permis une avancée majeure dans la caractérisation des génomes des cancers.

La première partie de notre travail a porté sur les lymphomes de Burkitt (LB), caractérisés par une translocation entre un gène d'immunoglobuline et *MYC*. L'étude portait sur 12 tumeurs primaires et 15 lignées cellulaires. L'aCGH (44K et 244K), concordait avec les cytogénétiques morphologique et moléculaire (FISH) sauf pour les translocations. Plus de la moitié des variations du nombre de copies (<2Mb) étaient des polymorphismes (CNV). Les anomalies pathologiques (CNA) (n=136) intéressaient les régions suivantes : gains 1q, 13q, 7q, 8q, 2p, 11q et 15q ; pertes 3p, 4p, 4q, 9p, 6p, 17p, 6q, 11pterp13 et 14q12q21.3. Vingt régions minimales critiques (MCR) d'une taille varie entre 0.07-71.36 Mb, étaient délimitées. Trois MCR étaient identifiées sur le 1q : 1q21.1q25.2, 1q32.1 et 1q44. La région proximale de 1q21.1q25.2 était le siège d'une amplification, contenant entre autres les gènes *BCA2*, *PIAS*, *BCL9*. L'étude par transcriptome, sur 15 lignées, a démontré la surexpression uniquement de *BCL9*, remanié dans les LAL B et faisant partie de la voie de signalisation de *MYC*. Sur la région 11q23.1, le gain intéressait le gène *POU2AF1* dont le messager était élevé. La MCR 13q31.3q32.1 était le siège d'une amplification contenant *ABCC4*, et le polycistron miR17-92. La corrélation des résultats d'aCGH à ceux du transcriptome et du mirnome ont démontré une surexpression du miR17-92 qui contrôle le développement des lymphocytes B et intervient dans la voie de signalisation de *MYC*. Sur le 9p21.3, la perte emportait le locus $p16^{\text{INK4A}}/p15^{\text{INK4B}}$. Le transcriptome avait démontré une sous expression de $p15^{\text{INK4B}}$. Le locus $p16^{\text{INK4A}}/p15^{\text{INK4B}}$ contrôle les 2 voies majeures, pRB et p53.

La seconde partie de notre travail a consisté à étudier 17 tumeurs congelées de carcinomes adénoïdes kystiques (CAK) par aCGH 44K. Les CNA étaient validées par FISH et/ou MLPA. L'expression protéique était étudiée par immunohistochimie. Les pertes excédaient les gains (41 versus 24). La t(6;9)(q23;p22) récurrente dans les CAK était indétectable car équilibrée. Dans un seul cas, le der(6)t(6;9) est probablement présent sur le profil aCGH. Les MCR les plus fréquentes (-6q22 et -6q24) n'incluaient pas 6q23. Treize MCR étaient identifiées. La MCR délétée en 8q impliquait le miR-124A2 qui régule les gènes *CDK6* et *MMP2*. Sur le 9p21.3, le locus $p16^{\text{INK4A}}/p15^{\text{INK4B}}$ était de nouveau perdu. Des gains isolés étaient observés au niveau des locus *CCND1*, *KIT/PDGFR/KDR*, *MDM2* et *JAK2*. Le gène *MDM2*, qui était amplifié sous forme de double minutes, est un élément clé de l'axe $p16^{\text{INK4A}}$ -ARF-p53.

Pour la troisième partie de notre travail nous avons étudié 60 tumeurs primaires d'adénocarcinomes pulmonaires (AD) de non fumeur par aCGH (244K). Dans 50/60 tumeurs, le nombre de MCR était de 14. Cinq MCR contenaient un seul gène (*MOCS2*, *NSUN3*, *KHDRBS2*, *SNTG1* et *ST18*). Une MCR gagnée, 5q35, contenait le gène *NSDI*. Une amplification, sous forme de HSR et mise en évidence par FISH, intéressait l'oncogène *FUS*. Une PCR quantitative avait permis de confirmer la surexpression *FUS*. A notre connaissance, c'est la première étude qui incrimine le gène *FUS* dans la carcinogenèse de l'AD du non-fumeur. D'autres gènes étaient également impliqués : *ARNT*, *BCL9*, *CDK4*, $p15^{\text{INK4B}}$, *EGFR*, *ERBB2*, *MDM2*, *MDM4*, *MET*, *MYC*, *NKX2-1* et *KRAS*. Un clustering non supervisé avait permis de dégager un groupe avec un gain de *MYC* ; un autre groupe caractérisé par la perte des gènes suppresseurs *RB* et *WRN* et un dernier groupe caractérisé par un gain 7p et 7q, et présentait une fréquence élevée de mutations de l'*EGFR*. Dans 10/60, le nombre de CNA était très rare et aucune MCR n'était détectée. Par FISH, des anomalies du gène *ALK*, probablement secondaire à une inversion inv(2)(p21p23), ont été mises en évidence dans 3/10 tumeurs dans un travail ultérieur.

L'a CGH est un outil puissant qui permet l'étude de l'oncogénome, quoiqu'il soit incapable de déceler les anomalies équilibrées. Cette étude a mis en exergue une hétérogénéité génétique intra et inter tumorale. Les t(MYC;IG), t(6;9)(q23; p23p24)/*MYB-NFIB* et les anomalies de l'*EGFR* sont spécifiques des LB, CAK et AD respectivement. Ces anomalies constituent des marqueurs de diagnostic. Les anomalies de *MYC* sont récurrentes dans les LB et au sein d'un sous-groupe d'AD du non fumeur. Les anomalies du locus $p16^{\text{INK4A}}/p15^{\text{INK4B}}$ et de l'axe ARF-MDM2-p53 sont

communes aux 3 types de tumeurs. Chacune de ces anomalies offre l'opportunité d'une thérapie personnalisée dans un avenir proche.

Abstract

Much of our current understanding of cancer is based on the hypothesis that it is a genetic disease, arising as a clone of cells that expand in an unregulated fashion because of somatically acquired mutations. High-throughput tools for nucleic acid characterization, such as array comparative genomic hybridization (aCGH), now provide the means to conduct comprehensive analyses of somatic anomalies in the oncogenome.

In the first part of our work we have carried out a fine mapping of additional chromosomal anomalies in Burkitt lymphoma (BL). The hallmark of this disease is the translocation $t(MYC;IG)$. We have applied whole-genome 244K and 44k oligonucleotide aCGH to 15 cell lines and 12 primary tumors of BL respectively. Karyotype and FISH analysis were used to validate aCGH results. As expected, all translocations remained undetectable with aCGH. More than half of the copy number alterations (CNAs) < 2 Mb were mapped to Mendelian CNVs, including *GSTT1*, and *BIRC6*. Somatic cell line-specific CNVs localized to the *IG* locus were consistently observed with the 244 K aCGH platform. Among 136 CNAs, gains were found in 1q, 13q, 7q, 8q, 2p, 11q and 15q. Losses were found in 3p, 4p, 4q, 9p, 13q, 6p, 17p, 6q, 11pterp13 and 14q12q21.3. Twenty one minimal critical regions (MCR), (range 0.04–71.36 Mb), were delineated in tumors and cell lines. Three MCRs were localized to 1q: 1q21.1q25.2, 1q32.1 et 1q44. The proximal one was mapped to 1q21.1q25.2 with a 6.3 Mb amplicon (1q21.1q21.3) harboring *BCA2*, *BCL9* and *PIAS3*. Only *BCL9* high level transcript was noted on oligonucleotide microarray gene expression that was done on 15 cell lines. *BCL9*, was implicated in a LAL B translocation $t(1;14)(q21;q32)$ and it is a member of *MYC* pathway. The 13q31.3q32.1, 89.58–96.81 Mb MCR contained an amplicon with several genes. The miR-17-92 cluster, upregulated on mirnome analysis that was done on 15 cell lines, is the gene driver of 13q MCR. The miR-17-92 cluster is a member of *MYC* pathway. The 9p21.3 MCR harbored $p16^{INK4A}/p15^{INK4B}$ locus which is downregulated. *MYC* activates ARF, a protein encoded by $p16^{INK4A}/p15^{INK4B}$ locus.

On the second part of our work, a 44k aCGH was applied on 17 frozen adenoid cystic carcinoma (ACC) to delineate with a high resolution the CNA associated with ACC. aCGH results were validated with FISH and/or MLPA. Protein expression was screened with immunohistochemistry analysis. The translocation $t(6;9)(q23;p23p24)/MYB-NFIB$ recurrent in ACC, was not detected with aCGH. In one case, the $der(6)t(6;9)$ was suspected in the aCGH pattern. There were recurrent gains at 7p15.2, 17q21–25, 22q11–13, and recurrent losses at 1p35, 6q22–25, 8q12–13, 9p21, 12q12–13, and 17p11–13. Thirteen MCR were detected. The recurrent deletion at 8q12.3–13.1 contained miRN124A2 gene, whose product regulates MMP2 and CDK6. The 9p21.3 MCR harbored $p16^{INK4A}/p15^{INK4B}$ locus which was deleted. On 17p11p13, the MCR contained several genes and *TP53* was deleted in 2 cases. The *MDM2* gene, a member of $p16^{INK4A}$ -ARF-p53 pathway, was amplified and overexpressed in one case. Among the other unique CNAs, gains harbored *CCND1*, *KIT/PDGFR/KDR*, and *JAK2*.

On the third part of this these, a high-resolution 244K aCGH was conducted on 60 frozen lung adenocarcinoma (AD) of never smokers patients in order to establish a catalog of CNA. In 50/60 tumors, fourteen new MCR of gain or loss was noted. One larger MCR of gain contained *NSD1*. One focal amplification and nine gains contained *FUS*. *NSD1* and *FUS* are oncogenes hitherto not known to be associated with lung cancer. *FUS* was over-expressed in 10 tumors with gain of 16p11.2 compared to 30 tumors without that gain. A *FUS* hsr was observed with FISH screening. *FUS* was over-expressed in 10 tumors with gain of 16p11.2 compared to 30 tumors without that gain. Other cancer genes present in aberrations included *ARNT*, *BCL9*, *CDK4*, $p15^{INK4B}$, *EGFR*, *ERBB2*, *MDM2*, *MDM4*, *MET*, *MYC*, *NKX2-1* and *KRAS*. Unsupervised hierarchical clustering with adjustment for false-discovery rate revealed clusters differing by the level and pattern of aberrations and displaying particular tumor characteristics. One cluster was strongly associated with gain of *MYC*. Another cluster was characterized by extensive losses containing tumor suppressor genes of which *RBI* and *WRN*. Tumors in that cluster frequently harbored a central scar-like fibrosis. A third cluster was associated with gains on 7p and 7q, containing *ETV1* and *BRAF*, and displayed the highest rate of *EGFR* mutations. SNP array analysis validated copy-number aberrations and revealed that *RBI* and *WRN* were altered by recurrent copy-neutral loss of heterozygosity. In 10/60 tumors, the rate of CNA was very low, there were no MCR. *ALK* gene abnormalities, probably second to $inv(2)(p21p23)$, were detected by FISH in 3/10 tumors

in an other report.

The t(MYC;IG), t(6;9)(q23; p23p24)/*MYB-NFIB* and *EGFR* anomalies are specific for BL, ACC and AD respectively. *MYC* abnormalities were common for BL and one group of lung AD of never smoker. Anomalies of *p16^{INK4A}/p15^{INK4B}* locus and *ARF-MDM2-p53* pathway are common for the 3 types of tumors. In conclusion, aCGH is a powerful method to study the oncogenome.