



**HAL**  
open science

# Etude des relations génotype/phénotype dans le rétinoblastome

Laurent Castéra

► **To cite this version:**

Laurent Castéra. Etude des relations génotype/phénotype dans le rétinoblastome. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2012. Français. NNT: 2012PA05T059. tel-00794201

**HAL Id: tel-00794201**

**<https://theses.hal.science/tel-00794201>**

Submitted on 25 Feb 2013

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

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

# THÈSE

Pour l'obtention du grade de  
**Docteur de l'Université Paris Descartes**

**Discipline: Génétique**

Présentée et soutenue publiquement le 22 novembre 2012

Par

**Laurent Castéra**

« Etude des relations génotype/phénotype dans le  
rétinoblastome »

## COMPOSITION DU JURY

<b>Président :</b>	<b>Pr. François Doz</b>
<b>Rapporteur :</b>	<b>Pr. Sylvie Odent</b>
<b>Rapporteur :</b>	<b>Dr. Marie-Pierre Buisine</b>
<b>Examineur :</b>	<b>Pr. Thierry Frebourg</b>
<b>Examineur :</b>	<b>Dr. François Radvanyi</b>
<b>Directeur de thèse :</b>	<b>Pr. Dominique Stoppa-Lyonnet</b>
<b>Co-directeur de thèse :</b>	<b>Dr. Claude Houdayer</b>

A Marie, Alexis et Elsa

Je souhaite tout d'abord remercier Dominique Stoppa-Lyonnet pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse et pour ces quatre années passées dans son service de génétique. A vos côtés, j'ai véritablement appris la génétique humaine. C'est avec précision, pertinence et toujours avec une grande gentillesse que vous savez transmettre les connaissances. Merci également pour vos conseils avisés et toutes les autres choses.

Merci également à Claude Houdayer qui m'a beaucoup enseigné toujours dans une atmosphère amicale et confraternelle. Je me suis enrichi de tes conseils, explications et de nos nombreuses discussions au fil de ces quatre années. Merci de ton indispensable présence au cours de cette thèse.

J'adresse mes remerciements à Sylvie Odent et Marie-Pierre Buisine pour avoir accepté spontanément d'évaluer mon travail en tant que rapporteurs de ma thèse.

Je remercie François Doz qui me fait l'honneur de présider le jury de cette thèse et qui n'a jamais été loin de ces travaux.

Je remercie François Radvanyi pour les échanges scientifiques, nombreux et enrichissants, au sein du « PIC rétinoblastome » et pour sa participation à mon jury.

Je remercie également Thierry Frebourg d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Je remercie bien sûr l'ensemble de l'unité de génétique constitutionnelle de l'Institut Curie, particulièrement Marion Gauthier-Villars, Catherine Dehainault et Dorothee Michaux avec qui l'on peut parler « rétinoblastome ». Il est difficile de résumer en quelques mots le plaisir que j'ai eu à travailler au laboratoire avec vous tous.

Je remercie Dominique Vaur, Sophie Krieger et Agnès Hardouin pour leur accueil amical dans le laboratoire du Centre François Baclesse de Caen. Merci du temps que vous avez su m'aménager pour terminer ces travaux. Merci à l'ensemble du laboratoire pour avoir rendu facile mon intégration auprès de vous.

Merci à toute ma famille et belle famille sans qui cette aventure n'aurait pas été possible. Au contraire elle a été agréable et joyeuse grâce à vous et surtout à votre présence.

Enfin, merci Marie de ton inébranlable soutien au cours de ces derniers mois de changements intenses dans notre vie. Ce n'est parfois pas facile mais toujours pour le mieux. On ne remercie pas ses enfants, Alexis et Elsa, mais pourquoi pas, puisqu'ils sont des lumières dans notre vie et des sources de joies perpétuelles.

## Résumé

Le rétinoblastome est une tumeur rare qui touche la rétine du jeune enfant. L'inactivation bi-allélique du gène *RBI* est à l'origine du développement tumoral. *RBI* est le premier gène suppresseur de tumeur qui ait été identifié et la prédisposition au rétinoblastome constitue un véritable paradigme de la prédisposition aux cancers. Dans les formes non prédisposées génétiquement, les deux mutations apparaissent dans une cellule rétinienne unique ; le rétinoblastome est alors unilatéral. Dans les formes à prédisposition génétique, la première mutation est constitutionnelle et la deuxième est somatique. La mutation constitutionnelle est une néo-mutation pré- ou post-zygotique dans les formes sporadiques, alors qu'elle est héritée dans les formes familiales. Dans les formes avec prédisposition génétique, le diagnostic est plus précoce que dans les formes sans prédisposition et la bilatéralisation du rétinoblastome est généralement la règle. Néanmoins, de rares familles présentent une pénétrance réduite et une variabilité phénotypique se traduisant par la coexistence de patients atteints de rétinoblastome bilatéral ou unilatéral, d'apparentés porteurs sains et d'apparentés présentant des rétinomes. Les mécanismes responsables de la variabilité phénotypique intrafamiliale sont inconnus et l'existence de facteurs génétiques modulant le phénotype tumoral est probable.

L'origine de la variabilité de l'expression phénotypique du rétinoblastome peut être la résultante (i) de l'existence de mutations en mosaïque, (ii) de mutations de *RBI* et (iii) de facteurs modificateurs génétiques indépendants du locus de *RBI*. Trois axes distincts et originaux basés sur ces origines possibles de variabilité phénotypique ont été développés pour caractériser les relations génotype/phénotype dans le rétinoblastome. Premièrement, les conséquences d'une mosaïque somatique ont été illustrées grâce à l'étude d'une famille ayant bénéficié de cinq diagnostics prénatals. Dans ces familles, certains fœtus porteurs de l'allèle à risque identifié par une approche indirecte basée sur l'étude de microsatellites au locus de *RBI*, n'étaient pas porteurs de la mutation du parent atteint, lui-même atteint d'un rétinoblastome bilatéral. Ainsi, nous avons démontré la présence d'une mosaïque somatique et gonadique chez ce parent lourdement atteint. La conséquence de l'existence de patients présentant une mosaïque dans le cadre du conseil génétique a été discutée. La suite de nos travaux a pris en compte ces résultats afin de limiter les biais que pourrait induire la présence de mutations en mosaïque dans des études de corrélation génotype/phénotype dans le rétinoblastome. Deuxièmement, l'association de grandes délétions emportant *RBI* avec des retards psychomoteurs chez des patients atteints de rétinoblastome a été étudiée. Une

approche de CGH hautement résolutive, ciblée sur le locus de *RBI*, a été mise en place afin de caractériser le rôle des gènes contigus de *RBI* dans ce syndrome. Ainsi, cette approche a permis de définir une zone à risque de retard psychomoteur que nous proposons comme seuil d'alerte pour le généticien. Cette zone définit un gène, *PCDH8* d'expression cérébrale exclusive, comme un excellent candidat au retard psychomoteur. Enfin, troisièmement, une approche « gène candidat » reposant sur l'étude du SNP309 du promoteur de *MDM2*, a été mise en œuvre. En effet, l'allèle minoritaire de ce SNP (pour Single Nucleotide Polymorphism) de *MDM2*, issu d'une transversion T>G est décrit comme étant responsable d'une surexpression de cet allèle. Les liens étroits entre *MDM2*, *TP53* et *RBI* dans la tumorigénèse du rétinoblastome faisaient de ce SNP fonctionnel un très bon candidat dans le contrôle de l'expressivité de la maladie. Les études de liaison familiale entreprises dans l'ensemble des familles de rétinoblastome recensées au niveau national ont permis de mettre en évidence une association significative entre la présence de l'allèle G du SNP309 et l'apparition d'un rétinoblastome ( $p=0.001$ ). Ainsi, nous avons caractérisé *MDM2* comme le premier gène modificateur du rétinoblastome.

Mots-clés : Rétinoblastome, mosaïque, *MDM2*, CGH, faible pénétrance, retard psychomoteur, facteurs modificateurs

## Résumé en anglais

Retinoblastoma is the most common intraocular childhood cancer and occurs when both alleles of the *RBI* gene are inactivated in the retina. In patients without genetic predisposition, the two mutations occurred in a single unique retinal cell. In subjects with a genetic predisposition to retinoblastoma, the first *RBI* mutation is found in the germline and the second appears as a somatic mutation. Germline carriers usually develop bilateral or multifocal tumors and the diagnosis is earlier. However, some rare families exhibit low penetrance and variable expressivity of the disease because bilaterally affected, unilaterally affected, and unaffected mutation carriers are known to coexist. The existence of genetic modifiers in retinoblastoma therefore appears highly probable and must be considered. The lack of penetrance and the variable expressivity could be the sum of three independent causes. The presence of a mosaic can affect the phenotype, the nature of the mutation can drive low penetrance and particular phenotype like psychomotor delay in case of large genomic deletions and genetic modifier factors could modulate the phenotype. These three major keys have been studied in order to highlight the relations between the phenotype and the genotype. Firstly, the consequences of mosaicism have been illustrated by a prenatal diagnosis concerning a couple with a bilateral retinoblastoma-affected male patient who requested five successive prenatal diagnoses and in whom *RBI* mutation mosaicism had important implications. Implications of mosaicism in genetic counseling have been discussed and taken into consideration in order to limit bias in the two following genotype/phenotype studies. Secondly, the association between whole germline monoallelic deletions of the *RBI* gene and psychomotor delay was studied by a high-resolution CGH array focusing on *RBI* and its flanking region. Comparative analysis detected a four megabase critical interval including a candidate gene, protocadherin 8 (*PCDH8*). *PCDH8* is thought to function in signaling pathways and cell adhesion in a central nervous system-specific manner, making loss of *PCDH8* one of the probable causes of psychomotor delay in *RBI*-deleted patients. Thirdly, a candidate gene approach based on partners that are necessary for the development of the tumor attempted to find possible genetic modifiers. *MDM2*, which increases p53 and pRB catabolism, was therefore a prominent candidate. The minor allele of *MDM2* that includes a 309T>G transversion (SNP rs2279744) in the *MDM2* promoter is known to enhance *MDM2* expression. In family-based association analyses performed in 70 retinoblastoma families, the *MDM2* 309G allele was found to be statistically significantly associated with incidence of

bilateral or unilateral retinoblastoma among members of retinoblastoma families under a recessive model ( $Z = 3.305$ , two-sided exact  $P = .001$ ). The strong association of this genotype with retinoblastoma development designates *MDM2* as the first modifier gene to be identified among retinoblastoma patients

Key words: Retinoblastoma, mosaicism, MDM2, CGH, low penetrance, psychomotor delay, modifier gene



# Table des matières

Liste des abréviations .....	10
Liste des travaux.....	11
Avant-propos.....	12
Partie 1. Introduction.....	13
I. Généralité .....	13
I.1. Epidémiologie .....	13
I.2. Diagnostic et traitement .....	13
I.2.a. Diagnostic .....	13
I.2.b. Traitement.....	16
II. La génétique du rétinoblastome .....	18
II.1. Le modèle de Knudson complété par Comings .....	18
II.1.a. Présentation familiale du rétinoblastome .....	18
II.1.b. L’hypothèse de Knudson complétée par Comings .....	19
II.1.c. Prédisposition génétique et risque de deuxième tumeur .....	20
II.2. Le gène <i>RBI</i> .....	21
II.2.a. Identification du gène <i>RBI</i> .....	21
II.2.b. Description du gène <i>RBI</i> et son produit .....	22
II.3. Fonction de la protéine pRb .....	23
II.3.a. <i>RBI</i> et contrôle du cycle cellulaire .....	23
II.3.b. <i>RBI</i> et contrôle de l’apoptose .....	24
II.3.c. <i>RBI</i> et contrôle de la différenciation cellulaire .....	24
II.4. Pathologie moléculaire .....	25
II.4.a. Méthodes du diagnostic moléculaire du gène <i>RBI</i> .....	25
II.4.b. Les mutations constitutionnelles du gène <i>RBI</i> .....	26
II.4.c. Les mutations somatiques du gène <i>RBI</i> .....	28
II.4.d. Les relations génotype/phénotype : La nature de la mutation comme support des pénétrances réduites .....	29
II.4.d.i Les mutations de l’exon 1 de <i>RBI</i> .....	30
II.4.d.ii Les délétions complètes de <i>RBI</i> : faible pénétrance et retard du développement psychomoteur.....	30
II.4.d.iii Les mutations affectant l’épissage de <i>RBI</i> et la régulation de la transcription.....	32
II.4.d.iv Les mutations faux-sens de <i>RBI</i> .....	33
II.4.d.v Les mutations du promoteur de <i>RBI</i> .....	33
II.4.e. Modification de l’empreinte: effet parental de la mutation et risque lié à la fécondation <i>in vitro</i> .....	34
II.4.f. Les néomutations de <i>RBI</i> : impact des mosaïques sur l’appréciation de la pénétrance et de l’expressivité de la maladie .....	35
II.5. Le conseil Génétique dans le rétinoblastome.....	37
II.5.a. En l’absence d’étude moléculaire de <i>RBI</i> .....	37
II.5.b. Apport des études moléculaires constitutionnelles directes ou indirectes et des études tumorales .....	40
II.5.c. Défaut de pénétrance et mosaïque : impact pour le conseil génétique .....	44
III. Génétique tumorale du rétinoblastome .....	46
III.1. Modèle général de la tumorigénèse du rétinoblastome.....	46
III.2. Les événements nécessaires au développement du rétinoblastome. ....	46
III.3. Rétinoblastome et inhibition de la voie p53.....	48
Partie 2. Objectifs de la thèse et présentation des travaux de thèse .....	51

I.	Population d'étude.....	54
II.	Articles .....	58
II.1.	Première publication .....	59
II.1.a.	Introduction au premier travail .....	59
II.1.b.	Résumé .....	61
II.1.c.	Tiré à part du premier travail.....	61
II.1.d.	Discussion.....	65
II.2.	Deuxième publication .....	70
II.2.a.	Introduction au deuxième travail.....	70
II.2.b.	Résumé .....	72
II.2.c.	Tiré à part du deuxième travail.....	72
II.2.d.	Supplementary Information (données publiées).....	78
II.2.e.	Discussion.....	81
II.3.	Troisième publication.....	86
II.3.a.	Introduction du troisième travail .....	86
II.3.a.i	Polymorphismes communs et risques associés.....	86
II.3.a.ii	Polymorphismes fonctionnels et modulation des risques majeurs de prédisposition aux cancers .....	87
II.3.a.iii	Polymorphismes fonctionnels et rétinoblastome .....	88
II.3.a.iv	Hypothèses de l'étude .....	89
II.3.b.	Résumé .....	92
II.3.c.	Tiré à part du troisième travail .....	92
II.3.d.	Données complémentaires.....	97
II.3.d.i	Supplementary Information (données publiées).....	97
II.3.d.ii	Données complémentaires (données non publiées).....	102
II.3.e.	Discussion du troisième travail.....	107
Partie 3.	Discussion générale et perspectives.....	112
Bibliographie	.....	119
Annexes	.....	132

## LISTE DES ABREVIATIONS

Rb : rétinoblastome

FIV : fécondation *in vitro*

pRb: protéine codée par le gène RB1

PTC: premature termination codon

DER: disease eyes ratio

LOH: loss of heterozygosity

NMD: nonsense-mediated mRNA decay

DPN: diagnostic prénatal

GWAS: genome-wide association study

CGH: comparative genomic hybridation

SNP : single nucleotide polymorphism

## LISTE DES TRAVAUX

Castéra, L., C. Dehainault, D. Michaux, Lumbroso-Le Rouic, Aerts, I., Doz, F., Pelet, A., Couturier, J., Stoppa-Lyonnet, D., Gauthier-Villars, M., Houdayer, C. (2012). "Fine mapping of whole *RBI* gene deletions in retinoblastoma patients confirms PCDH8 as a candidate gene for psychomotor delay " Eur J Hum Genet: 2012 Aug 22. doi: 10.1038/ejhg.2012.186. [Epub ahead of print]

Castéra, L., Gauthier-Villars, M., Dehainault, C., Michaux, D., Benachi, A., Lumbroso-Le Rouic, L., Stoppa-Lyonnet, D., Houdayer, C. (2011). "Mosaicism in clinical practice exemplified by prenatal diagnosis in retinoblastoma." Prenat Diagn **31**(11): 1106-1108.

Castéra, L., Sabbagh, A., Dehainault, C., Michaux, D., Mansuet-Lupo, A., Patillon, B., Lamar, E., Aerts, I., Lumbroso-Le Rouic, L., Couturier, J., Stoppa-Lyonnet, D., Gauthier-Villars, M., Houdayer, C. (2010). "MDM2 as a modifier gene in retinoblastoma." J Natl Cancer Inst **102**(23): 1805-1808.

## AVANT-PROPOS

Le rétinoblastome est le premier modèle décrit de prédisposition génétique à un cancer et le gène muté responsable de la prédisposition, le gène *RBI*, est le premier gène suppresseur de tumeur cloné. Les différentes présentations cliniques et familiales du rétinoblastome ont inspiré la théorie de Knudson complétée par Comings. Puisque le conseil génétique du rétinoblastome est parfois rendu complexe par l'existence de familles présentant des pénétrances variables, nous avons donc souhaité explorer les relations entre le génotype et le phénotype dans le rétinoblastome. Nous avons abordé au cours de ce travail trois origines possibles de la variabilité phénotypique: l'existence de mosaïques, la nature de la mutation touchant le gène *RBI* et la présence de facteurs génétiques modificateurs indépendants de *RBI*. Cette thèse regroupe donc une publication pour chacun de ces trois versants (Castera, 2010; Castera, 2011; Castera, 2012). Ce travail a également été complété par la rédaction d'un chapitre dans un livre scientifique publié dans le cadre de cette thèse et présenté en annexe (Houdayer, 2012).

# **PARTIE 1. INTRODUCTION**

## **I. Généralité**

### **I.1. Epidémiologie**

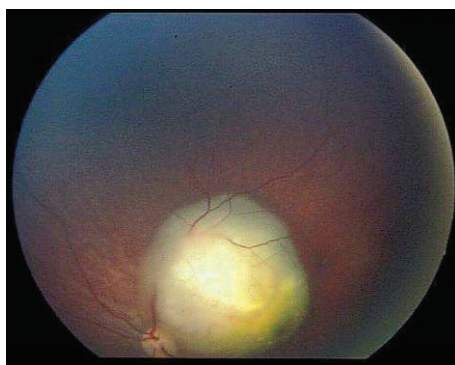
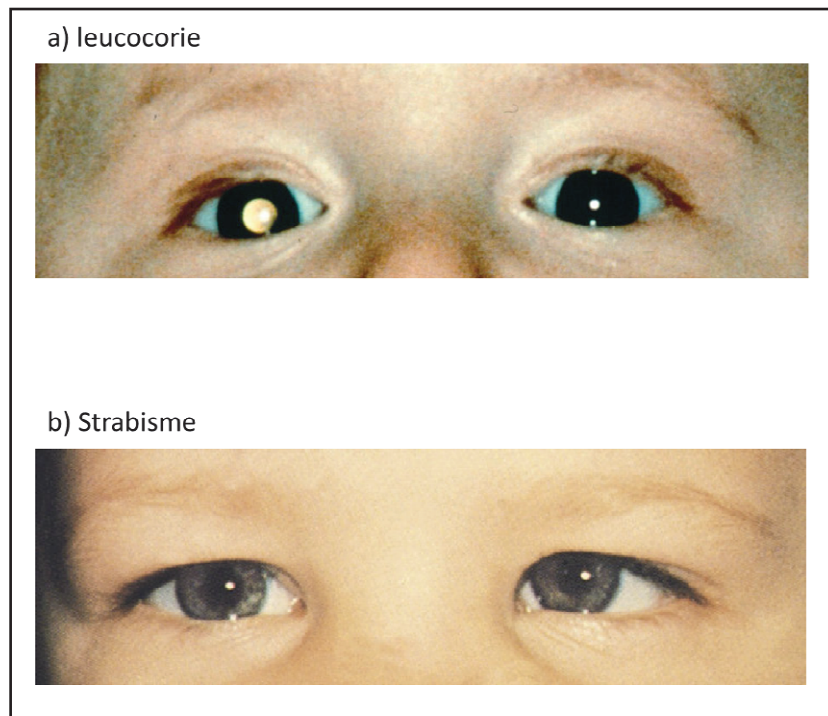
Le rétinoblastome (Rb) est une tumeur maligne embryonnaire de l'enfant se développant à partir des cônes rétiniens. Son incidence est de 1/15000 à 1/20000, ce qui correspond à 40 à 50 nouveaux cas par année en France (Aerts, 2006). Au diagnostic, plusieurs présentations sont possibles : il s'agit d'un rétinoblastome bilatéral quand les deux rétines sont touchées ; il est dit unilatéral si une seule rétine développe une tumeur; il peut également être bilatéral métachrone en cas de bilatérisation postérieure au diagnostic primitif d'un rétinoblastome unilatéral. Dans 90% des cas, le diagnostic est porté avant l'âge de 3 ans. Le diagnostic d'un rétinoblastome chez l'adolescent est exceptionnel. Néanmoins, même s'ils concernent toujours les jeunes enfants, les âges moyens au diagnostic sont très nettement supérieurs dans les pays en voie de développement. En effet, la méconnaissance des signes discrets précoces de la pathologie et les manques de moyens des systèmes médicaux dans ces pays sont responsables de retards au diagnostic qui compromettent le pronostic vital. Environ 70% de mortalité est rapportée dans les pays en développement alors qu'elle est comprise entre 5 et 10 % dans les pays d'Europe ou d'Amérique du Nord avec un minimum de 1% pour le Canada (Dimaras, 2012).

### **I.2. Diagnostic et traitement**

#### **I.2.a. Diagnostic**

La découverte d'une leucocorie ou d'un strabisme (Figure 1 ; page 14) persistant chez le jeune enfant ou le nourrisson sont souvent les premiers signes du rétinoblastome. Les formes exophtalmiques fréquentes dans les pays en voie de développement sont actuellement rares en France (Houdayer, 2012). Le diagnostic repose essentiellement sur un examen du fond d'œil, sous anesthésie générale, en milieu spécialisé. La lésion apparaît en relief, blanche

et hypervascularisée (Figure 1). Le diagnostic différentiel doit être réalisé avec la Maladie de Coats (développement anormal des vaisseaux de la rétine), certaines pathologies infectieuses (maladie des griffes du chat ; *Bartonella henselae*) ou parasitaires (larva migrans, *Toxocara canis*), des affections malformatives de l'œil et astrocytomes bénins. Le diagnostic est complété par une échographie oculaire, une IRM et/ou une tomodensitométrie (CT-scan).



**Figure 1 : Premiers signes cliniques de rétinoblastome et tumeur vue au fond d'œil (issu de (Aerts, 2006) et (Doz, 2006))**

L'examen ophtalmologique détermine l'atteinte bilatérale ou unilatérale des lésions tumorales, le nombre de tumeurs, leurs situations dans la rétine (pôle postérieur, antérieur de la rétine), la taille des tumeurs, la présence d'un décollement séreux rétinien, d'une prolifération tumorale vitrénne, et la situation anatomique par rapport à la macula et au nerf optique. Le pronostic clinique est évalué par la classification de Reese Ellworth et plus récemment par la classification internationale ABC qui reprennent ces éléments ophtalmologiques (respectivement table 1 et table 2). Ces classifications permettent d'évaluer la pertinence ou non d'un traitement conservateur, le groupe V de Reese Ellworth étant en faveur d'une énucléation (Linn Murphree, 2005).

<p><b>Groupe I</b></p> <p>a) tumeur unique, &lt; 4 mm de diamètre, sur ou derrière l'équateur  b) tumeurs multiples, &gt;4 mm de diamètre, sur ou derrière l'équateur</p>
<p><b>Groupe II</b></p> <p>a) tumeur unique, 4–10 mm de diamètre, sur ou derrière l'équateur  b) tumeurs multiples, 4–10 mm de diamètre, derrière l'équateur</p>
<p><b>Groupe III</b></p> <p>a) toute lésion antérieure à l'équateur  b) tumeur unique &gt;10 mm de diamètre derrière l'équateur</p>
<p><b>Groupe V</b></p> <p>a) tumeur massive s'étendant à plus de la moitié de la rétine  b) dissémination vitrénne</p>

**Table 1: classification de Reese Ellworth**



<p><b>Groupe A: petites tumeurs loin de la fovéa et du disque optique</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• tumeurs &lt;3 mm confinées à la rétine</li> <li>• localisées à au moins 3 mm de la fovéa et 1,5mm du disque optique</li> </ul>
<p><b>Groupe B: Toutes les tumeurs restantes limitées la rétine</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Toutes les autres tumeurs limitées à la rétine et non inclus dans le groupe A</li> <li>• décollement séreux rétinien (sans prolifération sous rétinienne) &lt; 3 mm de la base de la tumeur</li> </ul>
<p><b>Groupe C: prolifération locale dans les fluides sous-rétiens ou dans la vitrée</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• décollement séreux rétinien seul &gt;3 mm and &lt; 6 mm de la tumeur</li> <li>• prolifération vitréenne ou sous-réтинien à &lt; 3 mm de la tumeur</li> </ul>
<p><b>Groupe D: fluide sous rétinien diffus ou prolifération</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• fluide sous rétinien &gt; 6 mm de la tumeur</li> <li>• prolifération vitréenne ou sous-réтинiens à &gt; 3 mm de la tumeur</li> </ul>
<p><b>Groupe E: présence d'au moins un ou plusieurs marqueurs de mauvais pronostic pour la conservation oculaire</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Plus des 2/3 du globe sont infiltrés par la tumeur</li> <li>• Tumeur dans le segment antérieur ou antérieur à la vitrée</li> <li>• tumeur dans ou sur le corps ciliaire</li> <li>• Néovascularisation de l'Iris</li> <li>• Glaucome néovasculaire</li> <li>• Plage opaque hémorragique intravitréenne</li> <li>• Tumeur nécrotique avec une cellulite orbitale aseptique</li> <li>• phtise du globe</li> </ul>

**Table 2: classification ABC**

En cas d'énucléation première, un examen histopathologique est réalisé, jugeant de l'envahissement tumoral intra et extra-oculaire et définissant des facteurs de risque histologiques (notons ici qu'il n'existe pas de facteurs de risque biologiques). Le niveau d'envahissement permet l'orientation ou non vers une chimiothérapie adjuvante.

### **I.2.b.Traitement**

Dans le cas d'un rétinoblastome unilatéral, l'énucléation première est réalisée chez 80% des patients, le diagnostic étant tardif et l'envahissement de l'œil important. L'absence d'envahissement du nerf optique ou des enveloppes oculaires permet d'éviter un traitement adjuvant. Le recours à la radiothérapie en cas d'envahissement est aujourd'hui évité en raison des risques de séquelles liées à l'irradiation (retentissement sur la croissance osseuse, cataracte et rétinopathie externe, risque de tumeur radio-induite). Une chimiothérapie associée

à une curiethérapie orbitale est préférée. De plus, chez les patients atteints de la forme familiale du Rb, la radiothérapie externe est associée à un sur-risque de cancer radio-induit (cf. §II.2.a. (Gonin-Laurent, 2007)). Chez les patients avec un Rb bilatéral, le traitement conservateur de l'œil est privilégié et repose sur la chimiothérapie, la radiothérapie, la photocoagulation, la cryothérapie ou la protonthérapie. Toutefois, un traitement conservateur de l'œil est également envisagé si la tumeur est unilatérale, petite, et épargnant la macula. Le pronostic visuel est donc le véritable enjeu dans les pays aux systèmes de soin développés et la précocité du diagnostic est un élément essentiel à la mise en place d'un traitement conservateur (Moll, 1996). Bien que les stratégies de traitement aient connues de grandes avancées, le pronostic visuel reste préoccupant, d'autant plus que la lésion est proche de la macula. Le traitement conservateur doit donc être tenté à chaque fois que cela est possible, y compris dans les formes sporadiques (Doz, 2006). Enfin, les formes extra-oculaires orbitaires, ganglionnaires voire métastatiques (principalement osseuses mais aussi du système nerveux central) répondent à la radiothérapie et à la chimiothérapie conventionnelle qui peut être intensifiée grâce à l'apport des autogreffes de cellules souches hématopoïétiques. Le pronostic du rétinoblastome est généralement bon, et l'augmentation du nombre de cas familiaux en est un marqueur indirect.

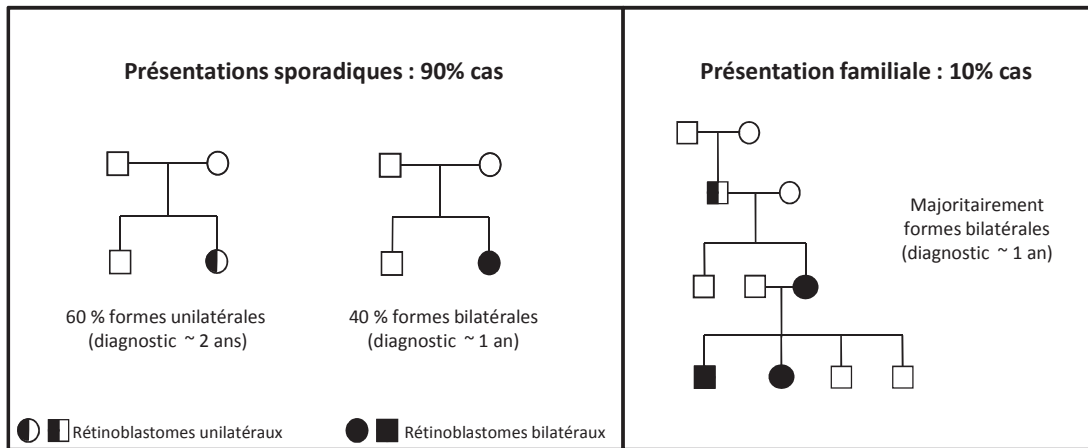
La recherche de traitements novateurs est active dans le rétinoblastome et elle est soutenue par l'Institut Curie, centre de référence en France pour le diagnostic et le traitement du rétinoblastome, sous la forme de Programme Incitatif et Coopération (PIC). Il s'agit de programmes pluridisciplinaires visant à améliorer la compréhension de la génétique du rétinoblastome (versant auquel appartient ce travail de thèse), à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques en caractérisant les voies de signalisation nécessaires au développement tumoral et à développer de nouveaux traitements ainsi que de nouvelles méthodes de suivi d'efficacité thérapeutique (IRM du sodium). Parmi les axes de recherches soutenus par ces programmes, des essais de photothérapie dynamique basée sur l'administration d'un agent photoactivable sont en développement (Aerts, 2010). Des essais précliniques visant à étudier les effets d'anti-angiogéniques dans les rétinoblastomes sont mis en place dans des modèles de xéno-greffes de lignées primaires de rétinoblastome humain chez la souris.

## **II. La génétique du rétinoblastome**

### **II.1. Le modèle de Knudson complété par Comings**

#### **II.1.a. Présentation familiale du rétinoblastome**

Dans moins de la moitié des cas de rétinoblastome la lésion est bilatérale et l'âge au diagnostic est très précoce avec une médiane d'âge au diagnostic de 1 an. Le diagnostic est possible pendant la période néonatale. Dans 90% des cas, la présentation est sporadique, c'est-à-dire isolée, sans histoire familiale associée, et les patients présentent des formes unilatérales dans environ 2/3 des cas, le diagnostic est alors plus tardif. Dans 10 % des cas de rétinoblastome, il existe une histoire familiale. La présentation du rétinoblastome est alors généralement bilatérale ou unilatérale multifocale (plusieurs tumeurs indépendantes dans la même rétine) et le diagnostic précoce. La distribution des cas au sein de ces familles est compatible avec l'existence d'un gène de susceptibilité au cancer transmis selon un modèle autosomique dominant avec une pénétrance élevée estimée à 95% (Figure 2 page 19 et cf. partie 1.II.1.b). La pénétrance est définie par le rapport du nombre de personnes développant le phénotype attendu, (ici un rétinoblastome) sur le nombre de personnes prédisposées. Dans de rares familles, la pénétrance est réduite et des patients atteints d'un rétinoblastome coexistent avec des personnes indemnes mais porteuses obligatoires du trait génétique (partie 1.II.5.C) du fait de leur position sur l'arbre. Ces mêmes familles sont souvent composées d'apparentés présentant des formes bilatérales, unilatérales, ainsi que des apparentés porteurs d'un rétinome (jusqu'à présent considéré comme des cicatrices de rétinoblastome ayant involué spontanément, cf. partie 1.II.2 et (Harbour, 2001)). Cette variabilité d'expression phénotypique (bilatérale, unilatérale, rétinome, indemne) dans des familles qui présentent une pénétrance incomplète est à l'origine de difficultés lors du conseil génétique pour un couple ayant un projet d'enfant et qui a soit un apparenté ayant un enfant atteint de rétinoblastome, soit déjà un premier enfant atteint de cette pathologie.



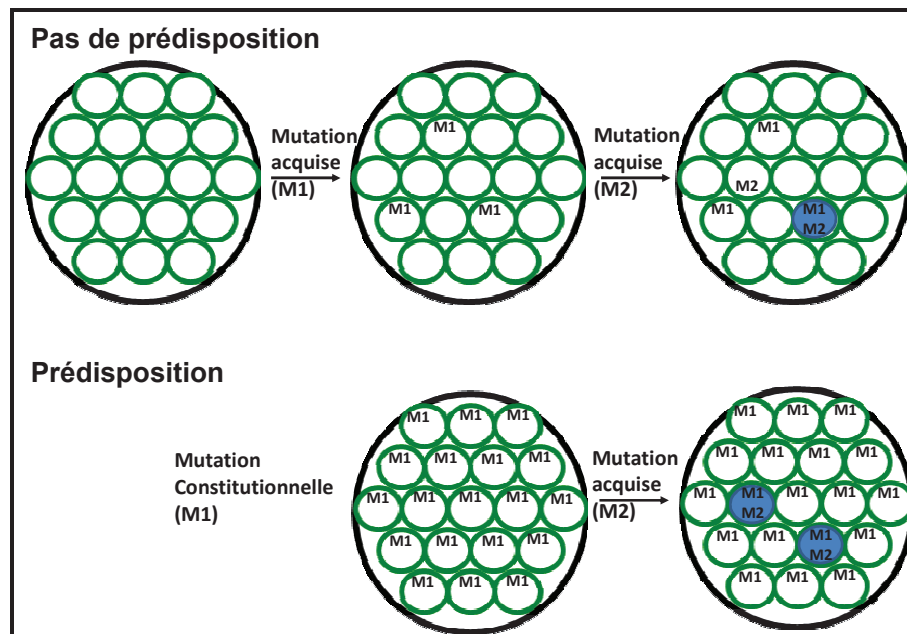
**Figure 2: Arbres familiaux représentatifs des différentes présentations de rétinoblastome**

### **II.1.b. L'hypothèse de Knudson complétée par Comings**

Knudson a proposé en 1971 un modèle mathématique qui rendait compte de la fréquence élevée des formes bilatérales de rétinoblastome, survenant dans les premiers mois de vie dans les cas familiaux, et, de la plus grande fréquence des formes unilatérales avec un diagnostic plus tardif dans les cas sporadiques (Knudson, 1971). Dans ce modèle, un rétinoblastome se développerait à partir d'une cellule rétinienne après la survenue de deux mutations dans le tissu cible. L'accumulation de ces deux événements est nécessaire mais possiblement non suffisante au développement tumoral. Dans les formes bilatérales, la première mutation serait constitutionnelle (mutation germinale), présente dans toutes les cellules de l'organisme, alors que la deuxième mutation serait acquise durant la vie fœtale ou au cours des premiers mois de vie (figure 3 page 20). Bien que la probabilité que deux mutations surviennent dans une même cellule soit très faible, l'apparition d'une seule mutation au sein d'un tissu n'est pas un événement rare (Morris, 1990). Si la première mutation est déjà présente dans l'ensemble des cellules de la rétine, le développement d'un rétinoblastome (lié à l'apparition de la deuxième mutation) est soumis à la probabilité qu'une mutation apparaît sur le deuxième gène cible.

Dans ce modèle, les patients porteurs d'une mutation germinale possèdent un risque très élevé de développer, à un âge précoce, une voire plusieurs tumeurs pouvant conduire à la bilatéralité de l'atteinte. Il existe aussi une susceptibilité à d'autres types de tumeurs chez les patients prédisposés (cf.II.5.c.). Comings complète le modèle de Knudson en 1973 en émettant l'hypothèse que les deux mutations nécessaires au développement du rétinoblastome

surviendraient sur les deux allèles d'un même gène provoquant l'inactivation du gène (Comings, 1973). Le gène (*RBI*) n'était alors pas encore identifié mais ce modèle a conduit à l'émergence du concept de gène suppresseur de tumeur.



**Figure 3 : Modèle de Knudson et Comings** Ici sont schématisés des rétines (grands cercles) et des cellules rétiniennes (petits cercles). Les tissus prédisposés portent la première mutation (M1) inactivant le premier allèle dans toutes les cellules. L'apparition d'une deuxième mutation (M2) inactivant le deuxième allèle d'un gène suppresseur de tumeur initie le développement d'un rétinoblastome (cercle bleu).

### II.1.c. Prédisposition génétique et risque de deuxième tumeur

Il existe un risque de cancer autre que le rétinoblastome chez les patients prédisposés. De rares patients développent une tumeur de la région pinéale ou épiphyse (pinéaloblastome), qui est une tumeur neuroectodermique primitive et qui est considérée comme un rétinoblastome ectopique. Il est courant de parler de rétinoblastome trilatéral chez les enfants atteints outre d'une forme bilatéral d'une localisation épiphysaire. Cet événement rare peut être synchrone avec le diagnostic de rétinoblastome bilatéral, mais, est généralement diagnostiqué plus tardivement vers 4-5 ans. Au cours du développement embryonnaire, le neuroectoderme est à

l'origine de la rétine et du tissu pinéal. Il en résulte des tumeurs histologiquement identiques mais de localisations différentes (Rodjan, 2012). Chez certains animaux tels que les reptiles et les amphibiens, la glande pinéale où l'on retrouve des photorécepteurs actifs est appelée le « troisième œil » (Bader, 1980). Les patients prédisposés présentent un sur-risque de cancer comparé à la population générale. Il existe une augmentation de l'incidence d'ostéosarcomes et de sarcomes des tissus mous en regard ou non d'une éventuelle zone d'irradiation. Il est clairement établi que l'irradiation thérapeutique chez les patients prédisposés augmente le risque de sarcomes. Il existe également à l'âge adulte une incidence plus élevée de mélanomes et de cancers épithéliaux (poumon, rein, sein) (Draper, 1986). Les patients prédisposés présentent également un taux de mortalité prématurée plus élevé que celui des patients non prédisposés et que celui de la population générale (Yu, 2009). Yu et al. ont mené une étude rétrospective portant sur plus de 1800 cas de patients ayant été atteints de rétinoblastome. Un ratio de mortalité standardisé (SMR) par cancer a été calculé à 35% (IC[30-40]) chez les patients prédisposés et à 2% (IC[1.3-4]) chez les patients non prédisposés. La mortalité cumulée par cancer après 50 ans était de 25% chez les patients prédisposés et de 1% chez les non prédisposés. Cette étude a mis aussi en évidence une surmortalité importante par cancer chez les patients ayant reçu de la radiothérapie.

## **II.2. Le gène *RBI***

### **II.2.a. Identification du gène *RBI***

L'identification en 1963 de délétions du chromosome 13, qui était classé parmi les chromosomes du groupe D (les techniques de coloration des bandes chromosomiques n'étant pas encore utilisées dans l'établissement des caryotypes), chez de rares patients présentant un rétinoblastome bilatéral associé à un retard mental et à un syndrome dysmorphique a permis de localiser un gène de prédisposition au rétinoblastome (Lele, 1963). L'analyse comparative de marqueurs génétiques polymorphes dans la tumeur et au niveau constitutionnel a démontré qu'environ 65% des tumeurs présentaient une perte d'hétérozygotie au locus 13q14. Dans plus de la moitié des cas, un gène de prédisposition serait altéré au niveau somatique par la perte complète de la région chromosomique dans lequel il serait situé. Cette hypothèse a été confirmée dans les formes familiales de rétinoblastome dans lesquelles l'allèle restant dans les tumeurs est toujours l'allèle commun présent chez les apparentés atteints d'une même famille.

L'allèle restant au niveau tumoral est donc l'allèle portant la prédisposition au rétinoblastome. L'analyse d'un grand nombre de rétinoblastomes a permis d'identifier une région minimale commune de délétion en 13q14. En 1986, un gène localisé dans cette région et siège de mutations constitutionnelles a été identifié chez les enfants atteints de rétinoblastome bilatéral. Il s'agissait donc du gène de prédisposition au rétinoblastome, appelé *RBI*. L'identification de *RBI* [MIM 180200] ainsi que la caractérisation de sa séquence nucléotidique complète (Toguchida, 1993), a donc confirmé l'hypothèse de Knudson ouvrant ainsi la voie au diagnostic moléculaire des prédispositions aux cancers et à l'identification des sujets à risque.

### **II.2.b. Description du gène *RBI* et son produit**

Le gène *RBI* est situé en région 13q14 proche du locus du gène de l'estérase D. Le gène *RBI* comporte 27 exons et conduit à un transcrit de 4,7 kilobases (Lohmann, 1999). Le cadre ouvert de lecture de 2,7 kb code pour une protéine nucléaire de 110 kD (UNIPROT accession number P06400) d'expression ubiquitaire appartenant à la famille « pocket protein ». La protéine pRb possède une conservation phylogénétique forte et présente un pourcentage d'homologie de séquences protéiques très important entre les mammifères (chimpanzé 99,9% ; souris 91,1% ; rat 90,5%, vache 93%, chien 94% avec l'homme), et qui reste élevé jusqu'aux amphibiens (grenouille 74%). Par ailleurs, il existe peu de polymorphismes exoniques fréquents entraînant le changement d'un acide aminé par rapport à la séquence de référence. Une recherche sur la base dbSNP (NCBI), de polymorphismes présentant un pourcentage d'hétérozygotie >10% dans la population caucasienne (CEU, Hapmap) et engendrant un faux sens trouve seulement trois variations (*(RBI[All Fields] AND "human snp"[Filter] AND (missense[Function\_Class] AND (40[HET] : 50[HET] OR 10[HET] : 20[HET] OR 20[HET] : 30[HET] OR 30[HET] : 40[HET]))*). Ces éléments suggèrent une pression de sélection importante sur le locus de *RBI* et un rôle important de pRb dans la machinerie nucléaire. Les fonctions de la protéine codée par *RBI* (pRb) seront abordées dans le paragraphe II.3 de cette partie. La protéine pRb est phosphorylable et partage une homologie de séquence avec deux protéines analogues p107 (codée par RBL1, retinoblastoma-like 1 situé en 20q11.2) et p130 (codée par RBL2, retinoblastoma-like 2 situé en 16q12.2). Cette petite famille de protéines nucléaires partage deux régions protéiques appelées « pocket domains » qui interagissent avec de nombreuses protéines partenaires de pRb mais aussi avec des oncoprotéines virales. La protéine pRb peut être inactivée par mutation (cf. partie 1.II.4), par phosphorylation (cf. partie

1.II.3), par dégradation protéolytique notamment lors des processus apoptotiques caspases dépendants, et également par des oncoprotéines virales tel que l'antigène T de papovavirus, l'adénovirus E1A, et le papillomavirus type 16 E7 (Phelps, 1992). A ce jour, aucune relation n'a été mise en évidence entre le développement du rétinoblastome et une activité virale (Mak, 1982; Suzuki, 1983).

### **II.3. Fonction de la protéine pRb**

Les rôles de pRb sont nombreux et souvent en relation avec de nombreuses interactions avec les facteurs de transcription de la famille des E2F. La protéine pRb exerce un rôle de répression de ces différents facteurs en les séquestrant (Zhu, 2005). De manière générale, la forme hypophosphorylée de pRb est active et permet l'inhibition de ses partenaires. Inversement la forme hyperphosphorylée est inactive. Par ailleurs, plus de 100 partenaires protéiques sont connus pour interagir avec pRb, laissant imaginer la complexité des mécanismes cellulaires sous-jacents comme l'illustre la description du « comprehensive pathway » de *RBI* à l'adresse internet <http://bioinfo-out.curie.fr/projects/rbpathway/main.html> (Calzone, 2008). Le rôle de pRb est bien connu dans le contrôle du cycle cellulaire. La protéine pRb possède également un rôle dans le contrôle de l'apoptose et dans le contrôle de la différenciation cellulaire. Ce dernier rôle permettrait d'expliquer la spécificité spatio-temporelle du rétinoblastome, c'est-à-dire la spécificité d'organe (l'œil) chez exclusivement de jeunes enfants alors que la protéine est ubiquitaire (Du, 2009)

#### **II.3.a. *RBI* et contrôle du cycle cellulaire**

La protéine Rb est phosphorylée par les cyclinD/cdk4, cyclinE/cdk2 et cyclinA/cdk2, elles-mêmes régulées par la protéine p16, au cours du cycle cellulaire. La protéine pRb contrôle la transition G1/S. Dans sa forme active, elle bloque la progression en phase S. L'hypophosphorylation de pRb permet de lever l'inhibition des facteurs de transcription E2F et notamment E2F1, E2F2 et E2F3 qui sont en interaction directe avec pRb (Classon, 2002). La protéine pRb est donc hypophosphorylée tôt en G1 du cycle cellulaire. Lorsque les cellules sont au milieu de la phase G1 les cyclinD/cdk4 ou 6 induisent l'hyperphosphorylation de pRb libérant ainsi les facteurs de transcription E2F permettant ainsi l'entrée en phase S. Les rôles



des facteurs de transcription E2F notamment dans le contrôle des gènes utiles à la réplication sont nombreux et encore mal connus (Chen, 2009)

### **II.3.b. RBI et contrôle de l'apoptose**

La protéine Rb régule l'apoptose via son interaction avec les protéines E2F et notamment E2F1. En effet, une surexpression d'E2F1 induit l'apoptose en activant la transcription des protéines codant pour p14Arf, p73, APAF-1 et la protéine pro-apoptotique SMAC/diablo (Du, 2009). La surexpression de Arf stabilise la protéine p53 notamment en inhibant MDM2, membre de la famille des Murine-Double Minute, impliquée dans la dégradation de p53 (cf. partie 1II.3)(Laurie, 2006; Brooks, 2007).

L'inhibition de Rb serait donc à l'origine de deux événements paradoxaux puisque l'accumulation des protéines E2F permet une entrée en phase S et promeut une prolifération cellulaire mais permet aussi une libération de protéines proapoptotiques. Un contrôle étroit des membres de la famille E2F paraît donc essentiel dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. En conséquence, la situation du rétinoblastome où *RBI* est inactivé sur ces deux allèles, implique la participation d'événements complémentaires nécessaires au développement tumoral (cf. partie 1.III).

### **II.3.c. RBI et contrôle de la différenciation cellulaire**

Les modèles murins ont permis de mettre en évidence le rôle de pRb dans le développement de la rétine embryonnaire. Au cours du développement embryonnaire, la couche neuroblastique abrite les cellules progénitrices rétiniennes qui se divisent et/ou se différencient en cellules rétiniennes transitoires. A la naissance, les cellules progénitrices rétiniennes sont rares et les cellules rétiniennes transitoires migrent et se différencient en bâtonnets, cônes, cellules horizontales, cellules bipolaires, cellules de Müller, cellules amacrines et en cellules ganglionnaires. La protéine Rb bloque la division des cellules rétiniennes transitoires et limiterait l'expansion des cellules progénitrices rétiniennes. Dans ces conditions, il a été suggéré que la perte de pRb permettrait une division ectopique des cellules rétiniennes transitoires dans la rétine en développement, en faisant des points de

départ théoriques idéaux du développement du rétinoblastome, d'autant que, ces cellules seraient programmées pour être résistantes à l'apoptose (Pacal, 2006).

#### **II.4. Pathologie moléculaire**

L'étude de la pathologie moléculaire de la prédisposition au rétinoblastome repose sur la recherche de mutations de *RBI* au niveau constitutionnel (à partir d'ADN extrait de leucocytes circulants principalement mais aussi de cellules jugales) ainsi qu'au niveau tumoral (lorsque la tumeur est accessible) chez le cas index. Cette analyse est longue et fait appel à plusieurs techniques de biologie moléculaire permettant l'étude de la séquence nucléotidique entière des exons et des jonctions intron/exon ainsi que du promoteur de *RBI*. Le spectre des mutations recherchées est complet et inclut la recherche des mutations de petites tailles (substitution d'une base, des insertions/délétions de quelques nucléotides) et de grande taille (perte, plus rarement duplication ou insertion, d'un fragment génomique de la taille d'un exon au locus entier du gène). Au niveau tumoral sont également recherchées la méthylation du promoteur et les pertes d'allèle repérées par une perte d'hétérozygotie au locus de *RBI*. Une fois une mutation constitutionnelle mise en évidence, un test génétique basé sur l'identification de cette mutation peut être mené chez les apparentés dans des délais rapides.

##### **II.4.a. Méthodes du diagnostic moléculaire du gène *RBI***

Les variations de petite taille sont recherchées en séquençage Sanger direct qui est actuellement considéré comme la technique de référence. Elle peuvent être détectées par une méthode de pré-criblage telle que la détection des hétérodimères par DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography), ou EMMA (Enhanced Mismatch Mutation Analysis) (Orita, 1989; Fodde, 1994; Xiao, 2001; Houdayer, 2004; Weber, 2007; Houdayer, 2010).

Les grands réarrangements génomiques (mutations de grande taille) sont généralement recherchés par une approche semi-quantitative de dosage génique tels que la QMPSF (Quantitative Multiplex PCR of Short fluorescent PCR), la MLPA (Multiplex Ligation Probe Amplification), la MP/LC (Multiplex PCR/liquid chromatography assay)(Duponchel, 2001; Schouten, 2002; Dehainault, 2004). Les très grandes délétions emportant l'ensemble du locus de *RBI* peuvent être mises en évidence par une analyse caryotypique ou par FISH, parfois,

dans un contexte d'exploration de retard mental (Baud, 1999). Un caryotype ou des méthodes pangénomiques de biologie moléculaire telles que des analyses en CGH (puces SNP ou puces d'oligonucléotides) sont donc indiquées en première intention chez les patients atteints de retard mental ou d'un syndrome malformatif associé à un rétinoblastome. Le caryotype peut également mettre en évidence des délétions en mosaïque (cf. partie 2.II.2) et des translocations.

Au niveau tumoral l'hyperméthylation du promoteur peut être recherchée par séquençage après traitement de l'ADN au bisulfite, par une méthode de PCR spécifique de la méthylation du promoteur et également par une méthode d'analyse quantitative de l'allèle méthylé (Richter, 2003; Zeschnigk, 2004; De La Rosa-Velazquez, 2007). De manière alternative, l'ADN tumoral est digéré par une enzyme sensible à la méthylation (CfoI par exemple), une PCR spécifique du promoteur est alors réalisée suivie d'une séparation par électrophorèse en gel d'agarose ou une méthode de détection semiquantitative tel que la QMPSF (Taylor, 2007)

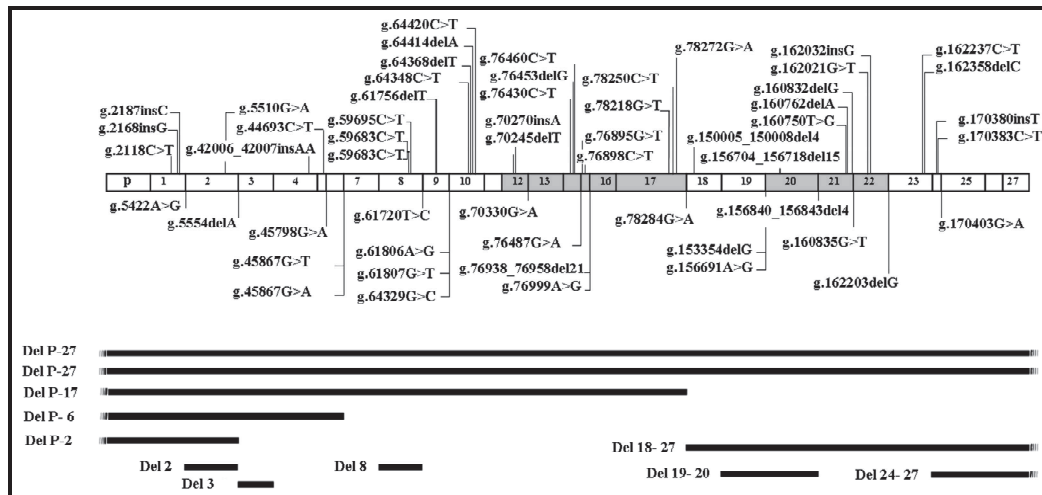
L'étude de marqueurs polymorphes du type microsatellites liés au locus de *RBI* (marqueurs intragéniques et extragéniques) permet, lorsqu'aucune mutation n'est ou n'a pas été identifiée, de mener des études familiales indirectes et d'identifier l'allèle *RBI* causal dans les formes familiales (l'allèle toujours présent chez les personnes atteintes d'une même famille) ou potentiellement à risque dans les formes sporadiques (allèles du cas index). Ce point sera abordé dans le paragraphe dédié au conseil génétique. Egalement, ces études permettent lorsqu'elles sont réalisées sur de l'ADN tumoral, de mettre en évidence une perte d'hétérozygotie (l'allèle restant étant l'allèle causal ou à risque), ce qui peut augmenter l'informativité d'une étude familiale.

#### **II.4.b. Les mutations constitutionnelles du gène *RBI***

La pathologie moléculaire de *RBI* est variée et un grand nombre de mutations inactivatrices est référencé dans deux bases de données en accès libre sur internet (<http://RBI-lsdb.d-lohmann.de>, Dr Lohmann et <http://www.es.embnet.org/Services/MolBio/rbgmdb>, Dr Pestaña). Quelques mutations sont récurrentes mais il n'existe pas de « hot spot » de mutations (Figure 4 page 28). Les mutations mises en évidence provoquent des pertes de fonction de la protéine et il n'a pas été décrit de mutations possédant un effet dominant

négatif (qui serait très probablement létal considérant le rôle majeur de pRb dans l'homéostasie cellulaire). Ces mutations se répartissent sur toute la région codante jusque dans le promoteur où des variations nucléotidiques très probablement causales sont mises en évidence. Il n'a jamais été retrouvé de mutations dans les deux derniers exons, exceptée une, récemment mise en évidence dans l'exon 27, celle-ci étant associée à une faible pénétrance (Mitter, 2009). Le spectre des mutations montre 40% de mutations non-sens, 25 % de mutations type insertion/délétions de quelques bases décalant le cadre de lecture et responsables de l'apparition d'un codon stop prématuré (PTC pour « premature termination codon »), 20% de mutations d'épissage localisées ou non dans les sites consensus d'épissage et conduisant à des sauts d'exon complet ou partiel et souvent à une rupture du cadre de lecture (Cartegni, 2002; Houdayer, 2008) et 10% de réarrangements chromosomiques, délétions ou duplications d'un ou plusieurs exons voire du gène entier (Alonso, 2001; Richter, 2003; Houdayer, 2004). Enfin, de rares faux-sens (cf. partie 1.II.4.d.iv) et des mutations sur le promoteur de *RBI* (cf. partie 1.II.4.d.iv) ont été mis en évidence et sont parfois associés à de pénétrances réduites (figure 4 page 28).

L'activité de diagnostic moléculaire du laboratoire de l'Institut Curie montre que 20 % des mutations sont trouvées lors de l'exploration du cas index d'une famille. La sensibilité des méthodes mises en œuvre est excellente puisque un taux de détection de 100 % est obtenu chez les patients de deuxième génération d'une famille de rétinoblastome (10% des présentations). En conséquence, 80% des mutations mises en évidence sont *de novo*. Elles sont retrouvées dans 82% des patients présentant un rétinoblastome bilatéral dans un cadre sporadique (38% des présentations) et 9,3% chez les patients atteints d'une forme unilatérale dans un cadre sporadique (52% des présentations). Le plus faible taux de détection de mutations dans les formes bilatérales sporadiques est très probablement lié au fait qu'un certain nombre de cas est la résultante de neomutation post-zygotique et d'état en mosaïque (cf. partie III.4.f). La présence de mutation en mosaïque (80% des mutations étant *de novo*) est un élément essentiel à prendre en compte dans la prise en charge génétique des patients atteints de rétinoblastome. De plus, l'existence de mutations introniques profondes, comme cela a précédemment été mis en évidence, peut mettre en défaut la détection d'une mutation causale que ce soit dans un contexte sporadique ou familial (Dehainault, 2007)).

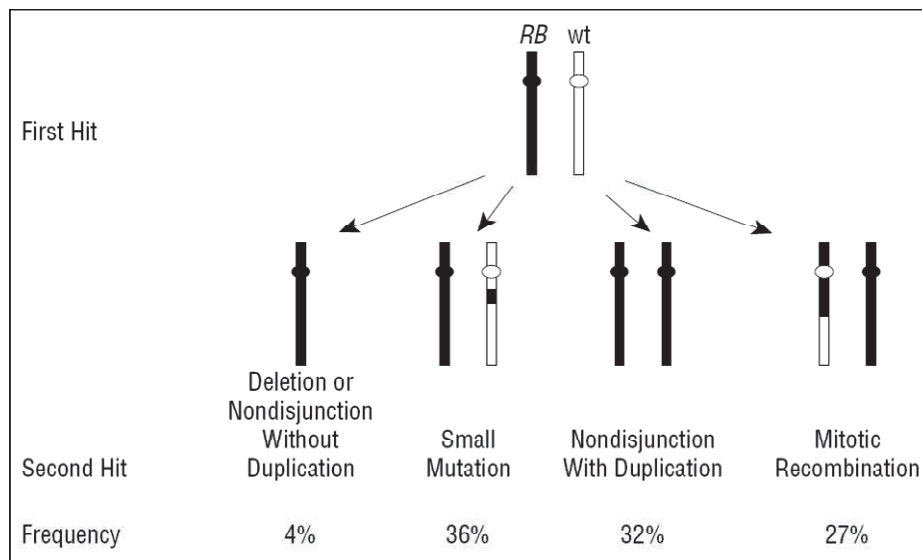


**Figure 4 : Mutations mise en évidence dans une série de 192 patients atteint de rétinoblastome (adaptée de (Houdayer, 2004)).** Les exons de *RBI* sont représentés numérotés. Les exons en gris codent pour les domaines pocket A et B. Les grandes délétions sont représentées par des lignes noires.

#### **II.4.c. Les mutations somatiques du gène *RBI***

Des évènements mutationnels de même nature que ceux mis en évidence au niveau constitutionnel sont retrouvés dans les tumeurs avec une exclusivité pour l'inactivation allélique par méthylation du promoteur, jamais mise en évidence sur du matériel constitutionnel (données internes). L'inactivation somatique du deuxième allèle de *RBI* est donc un évènement essentiel au développement d'un rétinoblastome. Ce deuxième évènement somatique peut prendre la forme d'une petite mutation, d'un grand réarrangement génomique et d'une méthylation du promoteur. Une perte d'hétérozygotie (LOH pour « Loss of heterozygosity) est observée dans environ 65% des tumeurs et est le reflet d'une grande délétion génomique simple du locus de *RBI* sans re-duplication, d'une non disjonction avec duplication de l'allèle muté ou d'une recombinaison mitotique (figure 5 page 29)(Harbour, 2001).

A titre d'exemple sur une série diagnostique de 78 tumeurs réalisée au laboratoire, 72% des tumeurs présentaient une LOH. L'analyse de la répartition des mutations constitutionnelles et somatiques ne montrait pas de différence significative. En dehors des évènements liés à l'inactivation du promoteur par méthylation (3% du spectre tumoral), ce sont donc les mêmes évènements mutationnels qui concourent à l'inactivation allélique de *RBI* en somatique et en constitutionnel. Ces données, constitutionnelles et somatiques, sont en cohérence avec les données de la littérature (Richter, 2003)



**Figure 5 : Fréquence des événements somatiques menant à l'inactivation bi allélique de *RB1*. Illustration issue de Harbour et al. (Harbour, 2001)**

#### **II.4.d. Les relations génotype/phénotype : La nature de la mutation comme support des pénétrances réduites**

Le mode de transmission mendélienne de la prédisposition au rétinoblastome obéit à un mode autosomique dominant dans lequel la pénétrance est retenue comme très élevée mais incomplète (>90%). Il existe donc de rares familles où la pénétrance est réduite, où le risque individuel de développer une tumeur est difficile à évaluer. L'origine moléculaire des faibles pénétrances est aujourd'hui bien identifiée par les études de génotype/phénotype (Taylor, 2007).

Généralement les mutations de forte pénétrance sont des mutations qui engendrent l'apparition d'un codon stop prématuré (PTC). Le transcrite est pris en charge par le système du nonsense-mediated mRNA decay (NMD) dont le rôle est de dégrader les transcrits aberrants et de prévenir l'apparition d'une « protéine tronquée », il en résulte l'expression d'un seul allèle (Cartegni, 2002; Houdayer, 2008).

De manière générale, les mutations qui sauvegardent une activité résiduelle de la protéine mutée, ou qui sont à l'origine d'une perte d'expression allélique partielle, sont des mutations qui peuvent être suspectées comme étant responsables d'une faible pénétrance. Ainsi, les mutations induisant l'utilisation d'un codon d'initiation de la traduction alternatif, les

mutations faux-sens, les mutations du promoteur, les délétions intragéniques conservant le cadre de lecture de la traduction (délétions génomiques, ou, secondaires à un saut d'exon sur les transcrits en cas de mutation d'épissage) et les mutations situées en dehors des sites canoniques consensus d'épissage doivent faire l'objet d'une attention particulière. D'autre part les grandes délétions emportant tout le locus de *RBI*, sont également parfois associées à des pénétrance réduites et à des phénotypes particuliers qui seront évoqués par la suite (Harbour, 2001; Albrecht, 2005; Sanchez-Sanchez, 2007; Taylor, 2007).

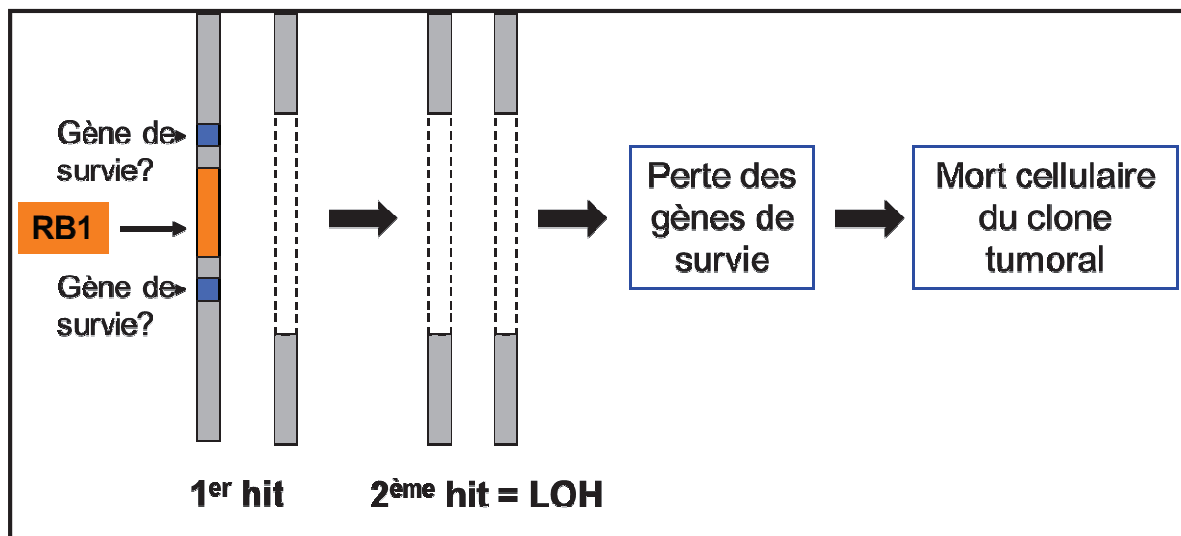
#### **II.4.d.i Les mutations de l'exon 1 de *RBI***

Les mutations de l'exon 1 sont associées à une faible pénétrance. Cette faible pénétrance peut être expliquée par l'inaptitude du NMD à éliminer les ARN porteurs d'un codon stop en 5' (Inacio, 2004) et par la possibilité d'une ré-initiation de la traduction en aval du codon stop prématuré comme cela est également décrit dans d'autres pathologies (Ozisik, 2003; Howard, 2004). Ainsi, Sanchez-Sanchez et al. ont démontré que les mutations engendrant un codon stop prématuré en aval du codon 113 de *RBI* échappent au NMD et sont à l'origine d'une ré-initiation de la traduction à partir de ce codon qui partage une similarité de séquence avec le codon initiateur physiologique (Sanchez-Sanchez, 2007). Une protéine plus courte privée de 112 acides-aminés dans sa partie N-terminale est alors traduite. Cette protéine conserverait tout ou une partie de l'activité de la protéine sauvage, expliquant ainsi l'observation de nombreux porteurs sains dans les familles où ségrège ce type de mutation. Ainsi, la variabilité d'expression phénotypique au sein de ces familles serait liée au niveau plus ou moins important de ré-initiation de la traduction.

#### **II.4.d.ii Les délétions complètes de *RBI* : faible pénétrance et retard du développement psychomoteur**

Les réarrangements chromosomiques (délétion ou duplication d'un ou plusieurs exons, voire du gène entier) sont associés à une pénétrance variable (Thienpont, 2005). Un défaut de pénétrance associé à une grande variabilité d'expression (coexistence de porteurs sains, de personnes atteints de rétinomes et de patients atteints de forme bilatérale) est décrite dans les familles au ségrège une délétion complète de *RBI* (Albrecht, 2005). Les délétions dont le point de cassure est intra-génique et qui emporte la partie 5' ou 3' sont systématiquement

associées à des pénétrances élevées. Il en est de même pour les délétions ou duplications intragéniques décalant le cadre de lecture. Pour expliquer ce paradoxe, il a été émis l'hypothèse que les délétions complètes du locus *RB1* étaient à l'origine d'un faible développement tumoral à cause de la présence, en position télomérique et centromérique du locus *RB1* de gènes indispensables (chacun étant suffisant) à la survie du clone tumoral. En cas de perte d'hétérozygotie dans un contexte de transformation tumorale, une cellule qui aurait perdu ces gènes (du fait d'une hémizygotie pour une grande délétion du locus de *RB1*) entrerait dans un processus de mort cellulaire (figure 6).



**Figure 6 : Mécanisme possible d'un défaut de pénétrance lors d'une délétion complète encadrant le gène *RB1* (cf. texte pour détail)**

Outre une faible pénétrance, les grandes délétions de *RB1* sont associées à l'apparition d'un autre phénotype clinique particulier. En effet, les délétions interstitielles du 13q emportant *RB1* et ses régions flanquantes ont rapidement été associées à un syndrome dysmorphique, avec des anomalies des pieds et des mains, mais également associées à des retards du développement psychomoteur et une hypotonie musculaire (Bunin, 1989; Baud, 1999). L'hypothèse communément admise est celle d'un syndrome de gènes contigus, les éléments du phénotype reflétant la délétion de gènes associés chacun à un phénotype spécifique. Ainsi, les données caryotypiques ont permis de mettre en évidence que les anomalies du développement psychomoteur étaient restreintes aux délétions dépassant la bande chromosomique 13q14. En effet, Baud et al. repérèrent des dysmorphies chez les 22 patients étudiés présentant une délétion détectée par analyse caryotypique. Les patients



présentaient des lobes d'oreilles épais et antéversés, un front haut et large front, un philtrum long, un nez court ou/et une lèvre inférieure retournée épaisse. Les auteurs retiennent que les délétions dépassant la région 13q14 étaient associées à un retard du développement psychomoteur. Les approches caryotypiques n'ont pas permis de mettre en évidence de phénotypes spécifiques en fonction de la taille et la position de la délétion du fait d'une résolution de cartographie trop faible. Ainsi, les gènes responsables des anomalies du développement (dysmorphie et retard psychomoteur) qui seraient adjacents à *RBI* n'ont pas pu être mis en évidence par ces analyses. Des approches plus fines de cartographie génomique étaient donc nécessaires afin d'affiner le rôle précis des régions adjacentes au locus de *RBI* (cf. partie 2.II.2).

#### **II.4.d.iii Les mutations affectant l'épissage de *RBI* et régulation de la transcription**

De manière générale, les mutations d'épissage provoquant un saut hors phase d'un ou plusieurs exons sur les transcrits de *RBI* et à l'origine d'un PTC ou une délétion en phase emportant un domaine fonctionnel majeur (pocket domain) sont à l'origine d'une pénétrance élevée. Néanmoins, la pénétrance de ces mutations est plus faible que celle des mutations à l'origine d'un PTC au niveau génomique suggérant l'influence de facteurs modificateurs en lien avec l'épissage et le contrôle de la transcription. Il est ainsi suggéré que l'expression phénotypique du Rb, n'est pas exclusivement liée à l'apparition (saut d'un ou plusieurs exons rompant le cadre ouvert de lecture) ou non (délétion d'un ou plusieurs exon conservant le cadre de lecture) d'un PTC (Taylor, 2007; Zhang, 2008). La possible utilisation de site cryptique d'épissage alternatif maintenant le cadre de lecture, l'expression résiduelle d'un transcrit sauvage par l'allèle muté, voire une surexpression de l'allèle sauvage sont des hypothèses qu'il faut avancer pour expliquer ces défaut de pénétrance (Lohmann, 2004).

Notons ici que la compensation de la perte d'un allèle de *RBI* par une surexpression de l'allèle sauvage a été explorée dans diverses pathologies autosomiques introduisant l'hypothèse que les niveaux résiduels d'expression de l'allèle sauvage étaient corrélés avec le phénotype. Le contrôle du phénotype par les niveaux d'expression de l'allèle sauvage a été reporté dans la rétinite pigmentaire-11, l'hypertension artérielle pulmonaire et le syndrome de Marfan (Hutchinson, 2003; Rivolta, 2006; Hamid, 2009). Le contrôle de l'expression allélique par des cis ou trans-activateurs contrôlant le promoteur des gènes responsables a

donc été suspecté. La mutation d'épissage récurrente g.45867G>T(IVS06+1G>T) de *RBI* est un bon exemple qui illustre ces hypothèses. Cette mutation provoque un saut hors phase de l'exon 6 sur les transcrits de *RBI* et elle est retrouvée dans des familles où la pénétrance est réduite. Les études de cette mutation ont montré que les porteurs sains dans les familles où ségrège cette mutation maintiennent un niveau élevé de transcrit sauvage (Klutzn, 2002; Taylor, 2007). Le contrôle fin des niveaux de transcription de *RBI* est donc un mécanisme qui pourrait contrôler l'expression phénotypique dans le rétinoblastome et qui finalement pourrait expliquer l'apparition d'un phénotype atténué ou un défaut de pénétrance quel que soit le type de mutation.

#### **II.4.d.iv Les mutations faux-sens de *RBI***

De rares mutations faux-sens ont été identifiées dans des familles à faible pénétrance telle la mutation p.Arg661Trp (R661W) dans l'exon 20 de *RBI* qui est fréquente (Onadim, 1992). Il est suggéré que la protéine mutante conserve une activité résiduelle capable de conserver en partie les propriétés de suppresseur de tumeur. Ainsi, les études *in vitro* ont montré que la R661W présentait une capacité de fixation sur E2F1 diminuée mais que la protéine mutante conservait la capacité de subir une hyperphosphorylation cycline dépendante (Otterson, 1997). Néanmoins, les phénotypes atténués ne sont pas la règle dans toutes les familles où ségrègent cette mutation et l'existence de facteurs modificateurs génétiques qui viendraient moduler favorablement ou défavorablement l'impact de cette mutation est un paramètre à prendre en compte lors du conseil génétique (Taylor, 2007).

#### **II.4.d.v Les mutations du promoteur de *RBI***

Dans certaines familles, des substitutions nucléotidiques situées sur le promoteur de *RBI* ont été mises en évidence. Jusqu'à présent, aucune étude fonctionnelle des promoteurs mutants n'a été menée. Néanmoins, ces variations interfèrent avec des sites de fixation de différents facteurs de transcription tel que SP1 et ATF (Sakai, 1991; Cowell, 1996). Comme ces variations ségrègent avec la maladie dans ces différentes familles, leur caractère délétère ou leur liaison avec un événement causal, qui serait en cis, semble acquis. Dans ces familles, la pénétrance peut être faible et les niveaux d'expression résiduels de *RBI* ont été suspectés comme étant un paramètre contrôlant l'apparition du rétinoblastome.

#### **II.4.e. Modification de l’empreinte: effet parental de la mutation et risque lié à la fécondation *in vitro***

De nombreuses observations ont convergé vers un effet parental de la mutation de *RBI*. Ainsi Kato et al. ont décrit un âge au diagnostic plus tardif en lien avec une perte de l’allèle maternel sur le chromosome 13 dans les tumeurs (Kato, 1995). Cette étude fut reproduite sur une large cohorte de patients sporadiques atteints de rétinoblastome unilatéral mais c’était cette fois l’allèle paternel qui était perdu (Schuler, 2005). Il a aussi été reporté dans les études portant sur la mutation de faible pénétrance IVS06+1G>T (délétion en phase de l’exon 6 sur les transcrits de *RBI*) que le maintien du niveau élevé d’ARNm issu de l’allèle sauvage était sous le contrôle différentiel de l’origine parentale de cet allèle (Klutz, 2002; Taylor, 2007). Ainsi, un contrôle fin des niveaux de transcription du gène *RBI* sous la dépendance de l’origine parentale de l’allèle muté a été suggéré comme un des éléments contrôlant l’expressivité variable de la pathologie.

Certaines observations s’appuient sur le fait que des régions soumises à empreinte ont été mises en évidence au locus de *RBI* donnant des arguments supplémentaires à cette hypothèse (Kato, 1996). Récemment, un promoteur alternatif de *RBI*, localisé dans l’intron 2 du gène, a été décrit comme soumis à empreinte génétique. Ce promoteur induirait une expression préférentielle de l’allèle maternel de *RBI*, laissant suggérer que les patients porteurs sur l’allèle maternel d’une mutation prédisposante présenteraient un phénotype plus sévère en relation avec une expression résiduelle de *RBI* sauvage plus faible (Kanber, 2009). Ainsi, l’apparition de phénotype atténué pourrait être liée à une compensation de la perte de *RBI* par une surexpression de l’allèle sauvage sous le contrôle d’empreinte parentale.

D’autre part, une incidence plus élevée de rétinoblastome chez les enfants conçus après fécondation *in vitro* (FIV) a été décrite (Moll, 2003; Marees, 2009). Un effet d’une modification de l’empreinte génomique a été suspecté puisque la FIV est également connue comme augmentant l’incidence des syndromes d’Angelman (Ludwig, 2005) et de Beckwith-Wiedemann (Lim, 2009), deux syndromes en partie liés à des événements épigénétiques affectant l’empreinte des gènes responsables. Néanmoins, une étude récente des cas incidents de rétinoblastome sporadique en France tend à démontrer que la FIV n’est pas un facteur de risque de rétinoblastome (Foix-L'helias, 2012).

Les connaissances dans ce domaine n’étant pas encore totalement établies et les études donnant parfois des résultats contradictoires, ses observations ne sont pas prises en compte actuellement dans le conseil génétique.

#### **II.4.f. Les néomutations de *RBI* : impact des mosaïques sur l'appréciation de la pénétrance et de l'expressivité de la maladie**

La nature de la mutation de *RBI* conférant le sur-risque de cancer sert donc de support moléculaire aux faibles pénétrances comme nous venons de le détailler au paragraphe précédent (Harbour, 2001). Néanmoins, devant un phénotype atténué (Rb unilatéral, porteur sain, rétinome), il convient d'identifier, certains facteurs confondant tels que la présence de mutations en mosaïque. Dans les cas familiaux, la mutation est transmise par un des parents, le phénotype est généralement bilatéral en dehors des mutations de faible pénétrance. Dans les présentations sporadiques, la mutation est *de novo* et est survenue soit chez l'un des deux parents (au niveau de ses gamètes, la mutation est pré-zygotique), soit chez le fœtus (à un stade précoce du développement embryonnaire, la mutation est post-zygotique). Le fœtus est dans ce second cas une mosaïque. Après la naissance, l'enfant prédisposé présente alors soit un rétinoblastome bilatéral, soit un rétinoblastome unilatéral qui peut être multifocal « vrai » (« vrai » puisqu'il semble difficile de distinguer au fond de l'œil, une multifocalité tumorale, d'une tumeur invasive qui re-« bourgeonnerait » au niveau de la rétine). La plupart des présentations unilatérales sont induites par l'apparition au hasard de deux mutations inactivatrices du gène suppresseur de tumeur dans la même cellule au niveau somatique et des mutations de *RBI* ne sont pas mises en évidence au cours des diagnostics moléculaires. Néanmoins, une mutation constitutionnelle est présente dans environ 10 % des patients avec une forme unilatérale de rétinoblastome conférant donc un phénotype que l'on peut considérer comme atténué chez une personne prédisposée. Ce phénotype atténué peut s'expliquer soit par la présence d'une mutation de faible pénétrance ou par la présence d'une mosaïque somatique. Une mosaïque peut apparaître lorsque la mutation de *RBI* intervient au cours du développement embryonnaire et le degré de mosaïcisme (pourcentage de cellules mutées) est d'autant plus élevé que la mutation est précoce au cours du processus embryonnaire. Ainsi, un individu en mosaïque peut présenter un pourcentage variable de cellules mutées dans différents organes et tous les cas de figures peuvent théoriquement être décrits. La mosaïque peut être strictement rétinienne mais peut également se retrouver aux niveaux des cellules hématopoïétiques ou dans tout autre organe et notamment au niveau gonadique. Des mosaïques gonadiques strictes ne sont pas à exclure et expliquent des récurrences de rétinoblastome dans des fratries sans que la mutation causale puisse être mise en évidence chez aucun des deux parents. Il n'est donc pas rare qu'un patient porteur de première génération dans une famille présente un rétinoblastome unilatéral ou soit un porteur sain de la

mutation familiale. En effet, le premier membre d'une famille étant lors de son diagnostic, et par définition un rétinoblastome sporadique, la présence d'une mutation en mosaïque chez ce patient est possible. Dans ce contexte, certaines variabilités phénotypiques (âge au diagnostic, caractère bilatéral ou unilatéral des tumeurs, indolence de la pathologie chez un porteur sain) pourrait être également les résultantes d'une mosaïque somatique chez les porteurs de première génération (Carlson, 1979; Sippel, 1998).

Sippel et al. ont étudié 156 familles et montrent que dans 10% des familles l'individu le plus « haut » dans la généalogie et qui porte la mutation responsable du trait génétique est une mosaïque. Selon les auteurs, ce pourcentage est probablement sous-estimé puisqu'il est difficile de faire la preuve directe de la présence d'une mutation en mosaïque. Les auteurs se sont principalement basés sur les ratios alléliques observés sur les électrophorogrammes de séquençage mais aussi sur des analyses haplotypiques familiales. Les patients en mosaïque (n=15) étaient dans 40% des cas des porteurs sains, dans 10% des cas des patients ayant développé un rétinoblastome unilatéral, et dans 50% des cas des patients bilatéraux. Les auteurs proposent donc que le statut de mosaïque soit un des éléments pouvant expliquer la variabilité d'expression phénotypique du rétinoblastome. L'atténuation du phénotype chez les patients en mosaïque serait directement liée au nombre de cellules cibles pour le deuxième hit selon Knudson (c'est-à-dire le pourcentage de cellules mutées de façon constitutionnelle). Aussi, dans une autre étude, les auteurs ont effectué le criblage moléculaire de plus de 1000 patients atteints de rétinoblastome (quel que soit le contexte familial). Ils ont rajouté à leur procédure diagnostique une approche par PCR spécifique pour rechercher certaines mutations récurrentes de *RBI*. Les mutations de *RBI* ont été recherchées par séquençage direct et par QM-PCR (Quantitative-Multiplex PCR). Les auteurs ont mis au point 11 PCR spécifiques ciblant les mutations R320X, R455X, R556X, R251X, R358X, R445X, R552X, R787X, R255X, R579X et R467X. Ces mutations ont été recherchées par PCR en temps réel permettant un dosage génique. Cette approche a permis d'améliorer sensiblement le pourcentage de détection des mutations de *RBI* (Rushlow, 2009). Cette étude identifie formellement 5,5% de patients bilatéraux, 3,8% des patients unilatéraux comme étant porteurs d'une mutation en mosaïque. De plus sur 350 patients unilatéraux, un des parents était porteur sain en mosaïque de la mutation mise en évidence chez son enfant. Les auteurs montrent que 10% des parents d'un enfant porteur d'une mutation de *RBI* sont également porteurs sains de cette mutation. Ce pourcentage est cohérent avec les calculs de risque habituellement utilisés pour le conseil génétique (figure 7 page 39)

Le conseil génétique doit donc prendre en compte ces données dans l'évaluation du risque tumoral. Ainsi, les mosaïques peuvent causer des variabilités d'expressivité de la pathologie favorisant les formes atténuées (les formes unilatérales) ou des défauts de pénétrance (parents porteur sains de la mutation d'un enfant malade). La présence d'une mosaïque est donc un point essentiel à prendre en compte lors du conseil génétique.

## **II.5. Le conseil Génétique dans le rétinoblastome**

Quelle que soit la présentation, bilatérale ou unilatérale, les conséquences d'un test génétique sur la prise en charge immédiate du cas index sont très limitées. En effet, la surveillance des enfants atteints de rétinoblastome est très étroite afin de détecter une éventuelle rechute, ou, une bilatérisation chez un patient atteint de rétinoblastome unilatéral, même en l'absence de mutation identifiée dans le but de couvrir le risque de mosaïque somatique.

Le conseil génétique du rétinoblastome répond cependant à plusieurs situations cliniques différentes. Il s'agit premièrement d'évaluer pour les apparentés de l'enfant atteint (fratrie, cousins), les risques de récurrence de la maladie. L'impact de la mise en évidence d'une mutation est réelle pour la fratrie car elle permet de libérer de la surveillance ophtalmologique les apparentés non porteurs. Actuellement, la mise en évidence d'événements mutationnels post-zygotiques grâce aux approches tumorales permet de lever les surveillances chez un grand nombre d'apparentés d'enfants atteints de rétinoblastome unilatéral (cf. ci-après). Le conseil génétique permet aussi d'accompagner les parents d'un enfant atteint dans un nouveau désir de projet parental ou un patient adulte dès son premier projet parental. Selon les situations et le désir des parents, un test peut être proposé et discuté en post-natal, en prénatal ou dans le cadre d'un diagnostic préimplantatoire.

### **II.5.a. En l'absence d'étude moléculaire de *RBI***

Le conseil génétique est basé sur l'évaluation du risque de récurrence chez les jeunes apparentés d'un patient atteint de rétinoblastome unilatéral ou bilatéral. L'analyse de l'histoire familiale est essentielle afin de guider les surveillances ophtalmologiques chez les membres de la famille. Il est possible de calculer les probabilités relatives grâce aux paramètres suivants :

- 100% des rétinoblastomes bilatéraux et 10 % des rétinoblastomes unilatéraux présentent une prédisposition génétique
- Le mode de transmission est autosomique dominant
- La pénétrance est de 90%, rendant compte qu'un adulte qui n'a pas développé de rétinoblastome dans sa jeunesse a 10 fois moins de risque d'être porteur d'une prédisposition qu'à sa naissance.

Les surveillances se déroulent, en milieu spécialisé, selon des schémas qui sont conditionnés par les calculs de probabilité. Ces schémas sont résumés dans la figure 7 (page 39) et sont issus de l'expérience du centre français de référence pour le rétinoblastome (Institut Curie) et des données de la littérature (Musarella, 1987; Abramson, 1998; Moll, 2000). Celles-ci sont maintenues en l'absence de possibles tests génétiques.

Au cours d'une consultation de génétique, une étude moléculaire du gène *RBI* doit-être proposée à tout patient atteint de rétinoblastome quelle que soit la présentation clinique. Cette étude doit être réalisée dans un contexte de prise en charge multidisciplinaire impliquant les ophtalmologistes, les pédiatres, les oncologues, les radiothérapeutes et les généticiens en charge du traitement de l'enfant en milieu spécialisé. Au cours de cette consultation de génétique, l'histoire familiale de cancer et particulièrement de rétinoblastome est reconstituée. L'information sur le risque de prédisposition est donnée au patient ou à ses parents et la nécessité de la réalisation d'un fond de l'œil chez les parents à la recherche de « cicatrices rétiniennes » (rétinomes) est rappelée afin d'identifier une histoire familiale restée méconnue jusque-là. Après obtention d'un consentement éclairé signé par le patient majeur ou ses représentants légaux, un prélèvement sanguin et un frottis jugal de préférence sont réalisés. L'étude du cas index a pour but d'identifier une mutation. Le deuxième prélèvement permet d'assurer une identito-vigilance mais permet également d'apprécier l'existence éventuelle d'une mosaïque (présence de la mutation dans les cellules circulantes et absence ou diminution de représentativité dans les cellules jugales ou inversement). L'étude moléculaire du cas index repose donc sur un ensemble de méthodes moléculaires permettant la détection des mutations de petites et de grandes tailles (réarrangements génomiques) au niveau génomique. Aujourd'hui, la recherche de mutations prédisposantes est réalisée en première intention par une approche d'analyse de la tumeur lorsqu'elle est disponible. De plus une analyse de cytogénétique ou de biologie moléculaire pangénomique est réalisée en première intention dans le cas d'une présentation d'un syndrome dysmorphique ou de retard du développement psychomoteur.



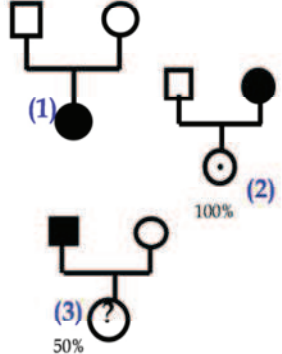
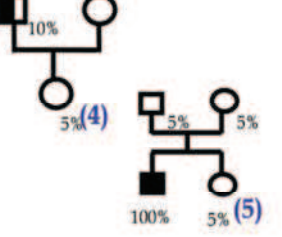
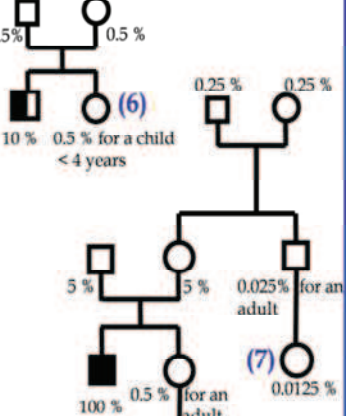
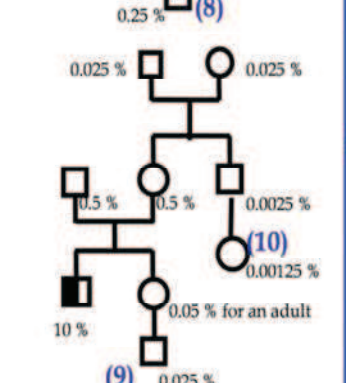
	<p><b>(1) Patient with unilateral or bilateral retinoblastoma</b></p> <p><b>Risk of retinoblastoma between 50% and 100%</b></p> <p>(2) Unaffected child with a <i>RBI</i> gene mutation  (3) Offspring of a patient presumed to have a <i>RBI</i> gene mutation (patient with bilateral or multifocal unilateral or familial retinoblastoma) with no identified <i>RBI</i> gene mutation</p> <p>First week of life (unaffected infant)  Every month until the age of 18 months  Gradually prolong intervals to every 3 months until the age of 4 years  Every 4 to 6 months until the age of 20  Annually for life</p>
	<p><b>Risk of retinoblastoma of 5% (1/20)</b></p> <p>(4) Offspring of a patient with unilateral, unifocal, non-familial retinoblastoma  (5) Siblings of a patient with bilateral or multifocal unilateral, non-familial retinoblastoma</p> <p>First month of life  Every 2 months until the age of 4 years  Every 6 months until the age of 4 years  Annually until the age of 20</p>
	<p><b>Risk of retinoblastoma of about 0.5% (1/200) to 0.0125% (1/8,000)</b></p> <p>(6) Siblings of a patient with unilateral, unifocal, non-familial retinoblastoma,  (7) Second cousins of a patient with non-familial bilateral retinoblastoma  (8) Nephews and nieces of a patient with non-familial bilateral retinoblastoma  (9) Nephews and nieces of a patient with non-familial unilateral retinoblastoma</p> <p>First month of life  Every 3 months until the age of 2 years  Every 6 months until the age of 4 years</p>
	<p><b>Risk of retinoblastoma of about 0.005% (1/20,000)</b>  (~ risk in the general population)</p> <p>(10) Second cousins of a patient with non-familial unilateral retinoblastoma</p> <p>No follow-up required</p> <p>Risk calculations take into account the fact that: (1) 100% of patients with bilateral retinoblastoma and 10% of patients with unilateral retinoblastoma are carriers, (2) dominant transmission, (3) 90% penetrance at birth; the corollary is that an adult who did not develop retinoblastoma during childhood has a tenfold lower probability of being a carrier compared to the probability at birth.</p> <p>■ bilateral retinoblastoma  ■ unilateral retinoblastoma</p>

Figure 7 : Schéma des surveillances ophtalmologiques en l'absence de test génétique (Houdayer, 2012)



## **II.5.b. Apport des études moléculaires constitutionnelles directes ou indirectes et des études tumorales**

La détection d'une mutation chez le cas index permet la réalisation d'un test ciblé chez les apparentés, basée sur l'identification celle-ci. Un résultat négatif permet de lever les surveillances ophtalmologiques.

Dans un couple si un des parents est porteur de la mutation prédisposante, un diagnostic prénatal peut être proposé en cas de nouveau projet parental. Un diagnostic préimplantatoire peut être envisagé. Il est à noter que le diagnostic postnatal est toujours proposé. Lorsqu'une mutation constitutionnelle a été mise en évidence chez l'enfant atteint et qu'aucun des parents n'en est porteur ou que l'enfant en est porteur à l'état mosaïque, cela permet de rassurer la fratrie de ces derniers. Il n'y a pas de risques de récurrence, si ce n'est celui de la population générale (1/20 000). En revanche, ceci n'élimine pas un risque de récurrence dans la fratrie de l'enfant atteint, l'un des deux parents pouvant présenter une mosaïque somatique ou gonadique. (Barbosa, 2008). Un test génétique à chaque nouvelle naissance est alors indiqué en période néonatale afin de lever au plus vite les surveillances ophtalmologiques en cas d'absence de mutation chez le nouveau-né. Le diagnostic prénatal (DPN) peut-être envisagé en regard du risque de mosaïque gonadique mais est à balancer avec le risque de perte fœtale induite par le prélèvement de villosités choriales ou de la ponction du liquide amniotique. Il est à noter que les techniques de DPN sur ADN fœtal circulant dans le plasma maternel vont permettre de lever ces risques. Le diagnostic préimplantatoire n'est pas proposé puisque la mutation doit être formellement identifiée chez un des deux parents.

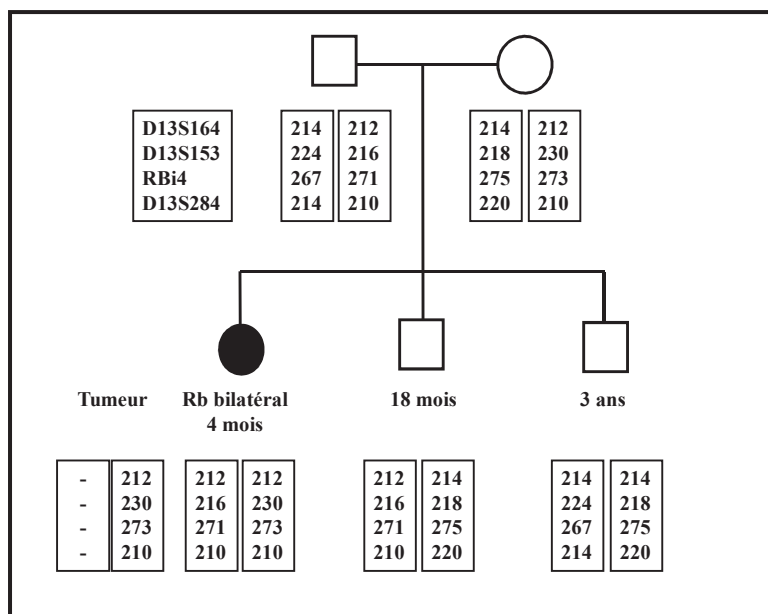
Lorsqu'aucune mutation n'est mise en évidence en constitutionnel, la prise en charge dépend de la présentation du rétinoblastome :

- Dans le cas d'un parent qui a été atteint d'un rétinoblastome bilatéral, il est proposé de réitérer l'étude génétique à chaque nouvelle naissance afin de mettre en évidence une éventuelle mutation qui n'aurait pas été détectée du fait d'une mutation à l'état mosaïque. Si la mutation est présente dans les gonades, le risque de récurrence reste élevé. Néanmoins, il est impossible en pratique de juger de ce niveau de risque.
- Dans le cas d'un rétinoblastome unilatéral, le conseil génétique est plus rassurant. En effet, en prenant en compte une sensibilité de détection de mutation de 90% (liée à la présence de mosaïque principalement), le risque résiduel d'être porteur

d'une mutation prédisposant passe de 10 % à 1%. La surveillance ophtalmologique reste recommandée pour les descendants. Ce niveau de risque permet d'arrêter les surveillances ophtalmologiques chez les neveux du patient atteints (cf. figure 7 page 39). En théorie, il pourrait être proposé de réitérer l'étude génétique à chaque nouvelle naissance. La probabilité d'une récurrence est bien plus faible que dans la descendance des bilatéraux, mais elle est imprévisible. En pratique, cette démarche n'est pas réalisée surtout parce que les moyens de laboratoire sont limités.

- Dans les rares cas familiaux sans mutation identifiée, une étude indirecte familiale par l'étude de microsatellites polymorphes intra-géniques et extra-géniques en liaison avec *RBI* permet facilement de mettre en évidence l'allèle à risque et ainsi définir les niveaux de risque pourvu que l'ADN de deux personnes atteintes soit disponible. La détection de l'allèle à risque (commun aux membres atteints) permet également de conduire un diagnostic prénatal et un diagnostic préimplantatoire (le diagnostic préimplantatoire n'étant mis au point sur une mutation spécifique de *RBI* mais sur la ségrégation des marqueurs au locus *RBI*).

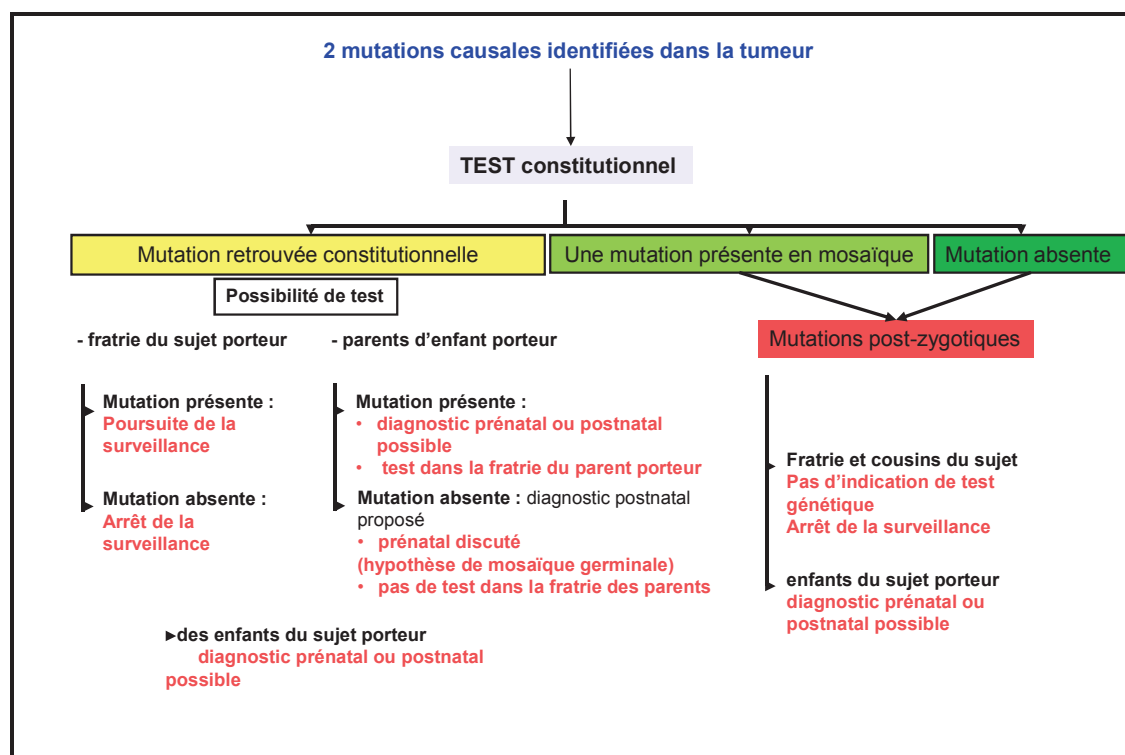
Sans possibilité de test génétique, chez l'apparenté (nouveau-né), lorsque l'étude du cas index (frère ou sœur atteinte) est négative dans un cadre de rétinoblastome sporadique, une étude indirecte familiale peut également être proposée. En effet, si l'enfant né ne partage aucun allèle de *RBI* avec son frère ou sa sœur atteint, la surveillance ophtalmologique du nouveau-né peut être interrompue. L'étude de la tumeur peut également être utile puisque une perte d'hétérozygotie au locus de *RBI* permet d'identifier l'allèle putativement à risque (l'allèle restant dans la tumeur porte une éventuelle mutation constitutionnelle) (Figure 8 page 42).



**Figure 8 : Exemple d'étude indirecte familiale conduite alors qu'aucune mutation *RB1* n'a été identifiée.** Pour chaque marqueur microsatellite la taille de l'allèle est indiquée. En dessous de chaque membre de la famille les haplotypes sont indiqués. Chaque rectangle symbolise un allèle. La tumeur du patient atteint est également analysée. L'étude familiale seule permet d'éliminer un risque de récurrence chez le frère de 3 ans, celui-ci n'ayant aucun allèle en commun avec sa sœur atteinte. La prise en compte de l'étude tumorale et la détection d'une perte d'allèle permet également de lever la surveillance du frère de 18 mois, celui-ci n'étant pas porteur de l'allèle putativement à risque identifié dans la tumeur comme l' « allèle restant ».

Actuellement, il est conseillé de commencer, lorsque cela est possible, par une étude génétique de la tumeur chez tout nouveau cas de rétinoblastome. L'étude de la tumeur est possible chez 80% des rétinoblastomes unilatéraux dont le diagnostic tardif conduit à une énucléation première. Le gain en terme de conseil génétique est majeur puisque dans cette population (qui représente la présentation de rétinoblastome majoritaire), 10% seulement des enfants atteints sont porteurs d'une mutation qui pourra être recherchée chez les apparentés et ainsi lever des surveillances ophtalmologiques. La mise en évidence des deux événements mutationnels sur le gène *RBI* responsable de son inactivation biallélique permet de rechercher ces deux événements dans un second temps en constitutionnel chez le cas index. L'absence des deux mutations ou la présence en mosaïque d'une seule permet de confirmer le caractère post-zygotique de l'événement mutationnel et ainsi lever d'emblée les surveillances dans la

fratrie et chez les cousins puisque le risque de récurrence est égal à zéro. Un grand nombre de surveillances peuvent alors être arrêtées sur l'objectivation que les événements menant au rétinoblastome sont uniquement survenus chez le cas index. Néanmoins, lorsque la mutation n'est pas mise en évidence en constitutionnel chez l'enfant atteint, celui-ci peut être porteur en mosaïque (risque qui doit toujours rester à l'esprit lors du conseil génétique du rétinoblastome), et possède un risque de transmettre une des deux mutations retrouvées à sa descendance. Un conseil génétique basé sur l'identification de ces deux mutations sera alors mis en place chez ses enfants à naître. L'algorithme décisionnel résumant cette approche est décrit dans la figure 9.



**Figure 9 : Arbre de décision en cas de recherche de mutation chez un cas index par l'abord tumoral.**

Les deux événements mutationnels sur *RBI* sont d'abord recherchés dans la tumeur (recherche des mutations ponctuelles, des réarrangements de grande taille, d'une perte d'hétérozygotie, d'une méthylation du promoteur). Si les deux événements sont mis en évidence, ils sont recherchés (ici appelé test constitutionnel) dans l'ADN extrait de leucocytes circulants du cas index. Trois cas de figures sont alors possibles. Dans le cas où une des deux mutations est retrouvée chez le cas index, des tests génétiques sont alors proposés aux apparentés de la famille. La surveillance peut être levée dans la fratrie si la

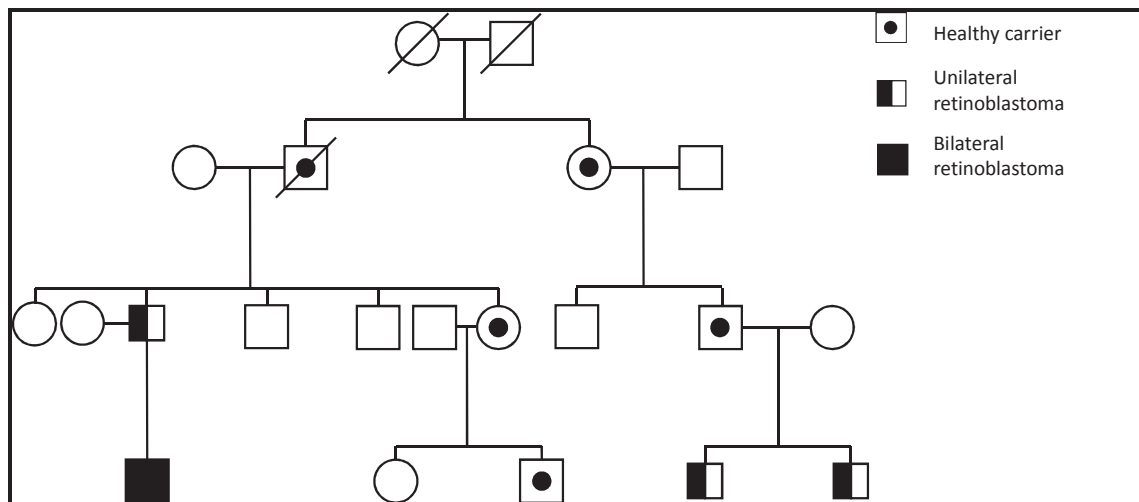
mutation est absente. Une mutation chez les parents doit faire aborder la question du projet parental pour lequel le diagnostic prénatal ou le diagnostic postnatal peut être programmé. Si la mutation est absente chez les parents, et puisque le risque de mosaïque chez l'un de ces derniers ne peut être exclu, un diagnostic postnatal est recommandé pour les enfants à naître. Dans les cas où les mutations sont absentes chez le cas index, ou, dans le cas où une des deux mutations est retrouvée en mosaïque, il est certain que les deux événements responsables du rétinoblastome sont des événements post-zygotiques. Dans ces deux dernières situations, le sujet est alors considéré comme porteur en mosaïque pour les deux mutations, ou une seule, si une d'elles est clairement identifiée en mosaïque lors des analyses moléculaires. En conséquence, la surveillance peut être levée pour l'ensemble de la fratrie du sujet ainsi que ses cousins, le cas échéant. Dans tous les cas, une fois adulte, il sera proposé au sujet porteur ou porteur en mosaïque (prouvée ou non), un conseil génétique pour accompagner un éventuel projet parental.

### **II.5.c. Défaut de pénétrance et mosaïque : impact pour le conseil génétique**

Le phénotype est donc variable au sein des patients présentant une prédisposition génétique. La présence d'une mutation en mosaïque peut expliquer un phénotype unilatéral chez un patient prédisposé ou un défaut de pénétrance chez des parents porteurs sains (cf. §II.5.f. et (Sippel, 1998)). Mais, l'apparente présentation sporadique de certains cas peut également être expliquée par une pénétrance incomplète dans certaines familles dont l'histoire tumorale serait restée silencieuse (Taylor, 2007). Dans ces rares familles, le fond d'œil met en évidence un rétinome chez certains individus sains porteurs obligatoires du trait génétique. Il est donc très important d'examiner par un fond de l'œil, chaque parent, indépendamment de toute histoire familiale.

Dans les familles présentant une pénétrance réduite des porteurs sains coexistent souvent avec des membres atteints présentant une hétérogénéité phénotypique, puisque, des patients atteints des présentations de rétinoblastome bilatéral, unilatérale, de rétinomes se rencontrent (Harbour, 2001; Taylor, 2007). La sévérité du risque intrafamilial peut être évalué par le ratio d'œil atteints (disease-eye ratio, DER) qui semble être un bon marqueur de pénétrance et

d'expressivité de la pathologie (Lohmann, 1994). Le DER est le ratio du nombre d'yeux atteints sur le nombre de porteurs de la mutation au sein d'une famille. Les familles avec un  $DER > 1.5$  sont considérées comme de forte pénétrance (pénétrance complète). Un  $DER < 1$  définit les faibles pénétrances (figure 10).



**Figure 10 : Exemple de famille de patients prédisposés par une mutation de faible pénétrance.** Ici le  $DER = 5/9 = 0.55$

Dans ces familles, l'évaluation du risque pour les enfants à naître est une problématique pour le conseil génétique. Malgré la pénétrance incomplète et une diminution des risques individuels, le conseil génétique reste complexe puisque les mécanismes qui contrôlent la variabilité phénotypique reste inconnus. Il est, en effet, impossible de rassurer les parents porteurs sains d'une mutation de faible pénétrance sur le risque de développer la maladie pour leurs enfants nés porteurs ou à naître. En effet, un DER très faible dans une famille n'élimine pas le risque de formes sévères de rétinoblastome même si les risques semblent plus faibles.

Il est donc nécessaire d'étudier ces familles afin d'améliorer les connaissances des mécanismes qui gouvernent cette variabilité phénotypique. Ainsi, il semble bien établi que la nature de la mutation est à l'origine de pénétrance incomplète (Harbour, 2001) et il est fortement probable que des facteurs génétiques modificateurs puissent contrôler la variabilité phénotypique soit en modulant l'effet de la mutation soit en agissant sur les voies de la tumorigénèse (Taylor, 2007).

### **III. Génétique tumorale du rétinoblastome**

#### **III.1. Modèle général de la tumorigénèse du rétinoblastome**

Deux événements clés apparaissent essentiels afin qu'un clone cellulaire acquiert les caractéristiques nécessaires à sa prolifération et sa survie. Ces deux événements sont 1) l'inactivation de la voie de pRb par un mécanisme mutationnel ou par la régulation des protéines en amont qui provoquent son hypophosphorylation assurant ainsi une entrée dans le cycle cellulaire et 2) l'inactivation de la voie de p53 qui contrôle le cycle cellulaire en réponse aux dommages cellulaires. L'inactivation de ces deux voies permettrait l'émergence d'un clone pré-tumoral doué d'un avantage de survie et de prolifération qui pourrait alors accumuler l'ensemble des mutations et remaniements génétiques lui conférant les capacités invasives d'une cellule tumorale (Vogelstein, 2004). L'inactivation biallélique de *RBI* est un événement nécessaire au développement du rétinoblastome qui remplit donc une première condition au développement de la tumeur. Néanmoins, il n'a jamais été décrit de mutations sur le gène *TP53* dans le rétinoblastome (Kato, 1996) et l'inactivation de *RBI* devrait activer la voie p53 par l'intermédiaire de l'expression de p14ARF sous le contrôle d'E2F1 et induire la mort par apoptose. La protéine p53 est un facteur de transcription qui en réponse au stress cellulaire régule de nombreux gènes afin d'induire, en fonction du stress, l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose, la réparation de l'ADN ou la sénescence. La perte de *RBI* ne semble donc pas conférer un avantage sélectif. Des événements mutationnels complémentaires qui viendraient soit inhiber p53 ou entrer en compétition avec cette voie sont donc nécessaires au développement du rétinoblastome. Le rétinoblastome serait donc la résultante d'une accumulation de mutations dont le premier événement serait l'inactivation des deux allèles de *RBI*, le clone invalidé pour *RBI* deviendrait alors tumoral après acquisition somatique des événements nécessaires à sa survie et sa prolifération. Parmi ces événements le contrôle de la voie p53 semble être un élément primordial à la survie cellulaire.

#### **III.2. Les événements nécessaires au développement du rétinoblastome.**

L'inactivation biallélique de *RBI* est nécessaire mais non suffisante au développement d'un rétinoblastome. La cytogénétique traditionnelle a identifié des réarrangements

chromosomiques récurrents laissant présager que des événements autres que la perte de *RBI* intervenaient dans le processus tumoral. Ainsi des isochromosomes 6p, des trisomies partielles ou complètes du 1q, des monosomies du chromosome 16 et des duplications du 1p ont pu être mises en évidence. Les analyses plus fines de cartographie par « Comparative Genomic Hybridation » (CGH) ont mis également des duplications du 6p dans 55%, des duplications du 1q dans 50%, des pertes du 16q dans 45% et des duplications du 2p dans 40 % des tumeurs. Ces analyses ont permis de mettre en évidence des gains segmentaires fréquents du 2p, 7q, 11, 13q, 17q, 19, and 20. De manière récurrentes, des amplifications de la région 2p23-p25 ont été observées et sont associées à des amplifications de *MYCN* (cf. ci-après). Les pertes segmentaires sont moins fréquentes et concernent les régions 13q14–13q21 et 1p35–1p36 (Mairal, 2000).

Les études des remaniements chromosomiques récurrents observables par CGH ont permis de mettre en évidence, en étudiant les zones de gains ou pertes minimales, plusieurs gènes candidats qui lorsqu'ils sont dupliqués ou délétés semblent participer au développement tumoral (Corson, 2007). Ainsi, les gains du bras long du chromosome 1q identifient *KIF14* qui est un oncogène retrouvé également surexprimé dans d'autres cancers (médulloblastomes, cancers du sein, cancer du poumon). Des gains de *KIF14* ont été retrouvés dans 60% des rétinoblastomes. *KIF14* est trouvé surexprimé dans 90% des tumeurs comparés à l'expression de celui-ci dans de la rétine fœtale normale. *MDM4* fait également partie de cette région et son expression semble être un des éléments permettant d'inhiber la voie de p53 (cf. paragraphe suivant). Les gains du bras court du chromosome 2 (2p) mettent en avant une surexpression de *MYCN* et *DDX1*. L'expression de *MYCN* pourrait être essentielle à la survie du rétinoblastome et son amplification (3% des Rb) semble liée à une plus grande agressivité de la tumeur. Les gains du 6p définissent *DEK* et *E2F3* qui sont également retrouvés amplifiés dans d'autres tumeurs (Chen, 2009). Enfin, les pertes du 16q indiquent que *CDH11* pourrait avoir un rôle important notamment dans les capacités invasives du rétinoblastome.

Les analyses en CGH ont permis également de montrer que le nombre d'aberrations chromosomiques était plus important dans des yeux opérés tardivement c'est-à-dire au-dessus de 36 mois comparé aux patients plus jeunes (pour un même stade d'envahissement de la cavité orbitaire). Ceci pourrait rendre compte de l'existence deux voies distinctes de tumorigénèse: (i) une voie responsable d'une croissance rapide dans laquelle les réarrangements chromosomiques (rares) ne sont pas des éléments nécessaires au



développement du rétinoblastome mais seraient des accompagnants, et (ii) une voie responsable d'une croissance lente autorisant l'accumulation des anomalies chromosomiques du fait de l'instabilité génomique de la tumeur, voie dont la croissance finirait par être accélérée après acquisition d'une anomalie lui conférant un cycle cellulaire plus rapide (Lillington, 2003).

Plus récemment, il a été suggéré que ces gains ou ces pertes étaient l'exclusivité des rétinoblastomes proliférants. En effet, une étude de typage moléculaire des rétinomes tend à montrer que ces derniers ne surexpriment pas les oncogènes détectés précédemment, et présenteraient un niveau d'instabilité génomique plus faible que les rétinoblastomes (Dimaras, 2008). Les rétinomes seraient indolents et faiblement prolifératifs alors qu'ils présentent une inactivation biallélique de *RBI*. De plus, les rétinomes surexprimeraient *p16INKA4* qui serait responsable d'une inhibition de la prolifération en partenariat avec les autres membres de la famille pRb, p107 et p130. Ainsi, les auteurs de cette étude suggèrent l'existence d'une succession d'événements mutationnels, dont les temps M1 et M2 (inactivation biallélique de *RBI*), induiraient un stade peu proliférant mais instable de la cellule précurseur du rétinoblastome, c'est-à-dire un rétinome, qui dans ce modèle, ne serait pas une cicatrice d'un rétinoblastome ayant spontanément involué mais un stade pré-tumoral (Gallie, 1982). Un troisième événement M3 (surexpression de *MDM4* par exemple) permettrait au précurseur de développer le phénotype tumoral complet (prolifération, avantage de survie, invasivité).

Ainsi, des événements supplémentaires sont donc nécessaires au développement du rétinoblastome, suggérant que la voie de tumorigénèse initiée par la perte de *RBI* peut être modulée (accélérée, ralentie voire inhibée). L'étude des événements et des partenaires qui participent à cette voie pourrait donc apporter des éléments de compréhension à la variabilité d'expression phénotypique de la pathologie observée dans les familles à faible pénétrance.

### **III.3. Rétinoblastome et inhibition de la voie p53**

Une surexpression tumorale des protéines MDM2 et MDMX (également appelée MDM4), qui sont des membres de la famille Murine-Double Minute, a été décrite dans 10% et 65% des rétinoblastomes. MDM2 et MDM4, sont des régulateurs négatifs clés de la voie p53 (pour revue (Haines, 1997; Vassilev, 2004; Toledo, 2006; Brooks, 2007)). MDM2 est une protéine ubiquitine-ligase du type RING finger qui entraîne la dégradation de p53 par le

protéasome de manière ubiquitine dépendante. L'ubiquitination des lysines en C-terminal par MDM2 entraîne le catabolisme de p53. MDM2 inhibe également les capacités transactivatrices de p53 en empêchant le recrutement de protéines co-activatrices. En dehors de tout stress cellulaire, p53 est maintenue inactive principalement grâce à l'action de MDM2. En condition de stress cellulaire p53 est phosphorylée avec pour conséquence une diminution de l'affinité de MDM2 sur p53. L'accumulation de p53 sous forme de tétramère dans les noyaux cellulaires permet à p53 de se stabiliser et de jouer son rôle de transactivateur. La protéine p53 active alors de nombreux partenaires tel que p21, impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire, des protéines pro-apoptotiques (PUMA, BAX), des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN, et dans la sénescence. De manière intéressante, p53 active la transcription de *MDM2* créant ainsi une boucle de régulation négative de l'activité de p53. MDM4 (Shvarts, 1997) est également un inhibiteur de p53. Il se fixe au domaine de transactivation de p53 et limite l'accès aux co-activateurs de p53. Les rôles respectifs de MDM2 et MDM4 semblent non redondants et MDM2 aurait un rôle principal de contrôle de l'apoptose induite par p53 alors que MDM4 aurait un rôle de régulation de la prolifération cellulaire. Néanmoins, la participation respective de chacun des partenaires dans l'atténuation de la voie p53 reste à élucider. Il semble par contre assez clair que MDM2 module l'activité de p53 en contrôlant principalement sa stabilité et que MDM4 joue un rôle d'antagoniste de l'activité transcriptionnelle de p53.

*MDM2* et *MDM4* sont deux importants oncogènes retrouvés amplifiés chacun dans 10% des tumeurs et leur surexpression est corrélée avec une inhibition de la voie de p53. Dans ce contexte, la participation des membres de la famille des Murine-Double Minute a été suspectée dans la tumorigénèse du rétinoblastome où les clones tumoraux n'ont jamais été trouvés invalidés pour *TP53*. L'amplification de *MDM4* a été montrée comme facilitant la transformation des cellules rétinienne ayant perdu les deux copies de *RBI* vers un stade plus immature (Laurie, 2007). Cette étude montre que les rétinoblastomes surexpriment p14arf comparé à l'expression retrouvée dans une rétine fœtale humaine normale, suggérant ainsi que les mécanismes de surveillance cellulaire liés à p53 sont actifs dans les rétinoblastomes. Les rétinoblastomes humains étaient par ailleurs capables d'accumuler la forme phosphorylée de p53 en réponse aux rayons ionisants démontrant ainsi la fonctionnalité de la voie. Cette réponse aux rayons ionisants a été inhibée par MDM4. De plus, la surexpression de *MDM4* dans des lignées primaires de rétines humaines, inactivées pour *RBI* par une approche de siRNA, déclenche une augmentation de la prolifération. Cet effet a été trouvé accompagné par

un phénotype cellulaire immature et une diminution de l'apoptose en culture. Enfin, Laurie *et al.* ont induit l'apoptose dans des lignées de rétinoblastome humain en les traitant avec une petite molécule inhibitrice de l'interaction MDM2-p53 appelée Nutlin-3. Ainsi, l'inhibition de p53 permet aux cellules d'échapper à la mort cellulaire et mène à une division incontrôlée. La surexpression de *MDM4* bloque la mort cellulaire et induit une rapide réduction des marqueurs de surface de différenciation rétinienne.

L'inhibition de la voie p53, pourrait donc être un événement essentiel dans le développement tumoral. Des événements supplémentaires à la perte de *RBI*, mettant en jeu différents partenaires tels que *MDM2* et *MDM4*, semblent donc nécessaires au développement tumoral. Il est donc probable que ces partenaires soient capables de moduler le développement tumoral et ainsi avoir une action sur le phénotype observé chez les patients, phénotype caractérisé par le nombre de rétinoblastome.

## **PARTIE 2. OBJECTIFS DE LA THESE ET PRESENTATION DES TRAVAUX DE THESE**

Ce travail de thèse propose d'étudier les relations entre le génotype et le phénotype dans le rétinoblastome. Les mécanismes responsables des faibles pénétrances et de la variabilité d'expression phénotypique rencontrées dans le rétinoblastome ont été explorés dans le but d'optimiser le conseil génétique des patients atteints et de leur famille.

L'origine moléculaire des faibles pénétrances et des expressivités variables de la pathologie repose principalement sur la présence de mutation en mosaïque et sur la nature de la mutation prédisposante.

La prédisposition au rétinoblastome est une pathologie reposant sur une forte proportion de néo mutations (80% de mutations *de novo*) qui peuvent apparaître soit chez les parents et être transmises à un enfant, soit chez le fœtus en développement.

D'une part, une mosaïque somatique et/ou gonadique chez les parents est responsable de plusieurs situations :

- d'un défaut de pénétrance quand la mutation est détectée chez un des parents indemnes d'un enfant atteint ;
- d'un phénotype atténué (unilatéralité, rétinome) ;
- d'un risque de récurrence difficile à prendre en compte chez les patients unilatéraux puisqu'il est toujours possible qu'une mutation, non détectée dans les leucocytes circulants, se présente en mosaïque somatique (notamment rétinienne à l'origine d'un phénotype unilatéral) et aussi en mosaïque gonadique (à l'origine d'un risque de récurrence probablement proportionnel au pourcentage de cellules gonadiques mutées).

D'autre part, l'apparition d'une mutation au cours du développement fœtal est responsable d'une mosaïque chez l'enfant à naître. L'expressivité de la pathologie est certainement dépendante du pourcentage de cellules mutées dans le tissu cible, pourcentage lui-même dépendant du moment et de la localisation de l'apparition de la mutation au cours du développement embryonnaire.

La présence d'une mutation en mosaïque est donc un des éléments qui influe sur l'apparition de la maladie et son expressivité.

Par ailleurs, il est actuellement bien établi que la nature de la mutation contrôle l'expressivité de la maladie. En effet, certains phénotypes particuliers comme des syndromes dysmorphiques et des retards du développement psychomoteur sont associés aux grandes délétions génomiques du locus de *RBI*. D'autre part, des mutations particulières sont responsables de pénétrances réduites associées à des phénotypes variables au sein des familles où elles ségrègent. Des formes sévères (rétinoblastome bilatéral), atténuées (rétinoblastome unilatéral) voire bénignes (rétinomes) sont possibles dans ces rares familles, sans que les mécanismes qui gouvernent l'apparition d'un phénotype sévère ou atténué soient connus. Une première hypothèse est intimement liée à la nature de la mutation dont l'impact serait sous la dépendance de modulateurs spécifiques. Par exemple, il pourrait exister des modulateurs de la traduction protéique en cas de mutations tronquantes de l'exon 1 ou des modulateurs de la machinerie de l'épissage en cas de mutations responsables de transcrits aberrants (cf. partie 1.II.4.d). Ainsi, l'existence de mutations de faible pénétrance laisse la place à des facteurs modificateurs qui en moduleraient l'impact.

Ces modulateurs seraient donc spécifiques de la nature de la mutation. Nous émettons ici l'hypothèse que des facteurs génétiques indépendants de *RBI* seraient aussi capables de moduler la pénétrance et l'expressivité de la pathologie. En effet, des événements complémentaires à l'inactivation biallélique de *RBI* sont indispensables au développement d'un rétinoblastome. Il apparaît donc probable que la modulation des partenaires de *RBI* responsables du processus de la tumorigénèse soit capable d'influencer l'apparition de la maladie et/ou son expressivité.

Ce travail de thèse s'appuie sur le recrutement de patients atteints de rétinoblastome disponible au laboratoire de génétique de l'Institut Curie. L'Institut Curie est le centre national de référence pour cette pathologie et le laboratoire exécute les analyses de génétique moléculaire de l'ensemble des cas incidents de rétinoblastomes sporadiques et familiaux du territoire national. Ce recrutement de l'ensemble des cas diagnostiqués en France donne également accès au matériel génétique de nombreux membres de familles où ségrègent une mutation prédisposante du gène *RBI*. L'accès à ce matériel nous a permis d'explorer les trois niveaux possibles de contrôle des pénétrances réduites et les variabilités d'expression

phénotypique. Ce travail a donné lieu à trois publications présentées dans ce mémoire et qui abordent respectivement les notions de mosaïques, de nature de la mutation et de facteurs génétiques modificateurs.

Le premier article est basé sur une observation clinique impliquant cinq diagnostics prénatals dans une même famille et dans laquelle nous avons mis en évidence la présence d'une mosaïque gonadique et constitutionnelle ayant des conséquences directes dans la prise en charge des grossesses. Cette observation a permis l'étude de l'impact des mosaïques sur le phénotype tumoral et la prise en charge thérapeutique qui en découle dans un contexte de diagnostic prénatal. Elle ouvre la discussion à la prise en charge des mosaïques dans les pathologies génétiques à taux élevé de néomutations. Le biais créé par les mosaïques dans l'étude des phénotypes observés a été pris en compte par la suite.

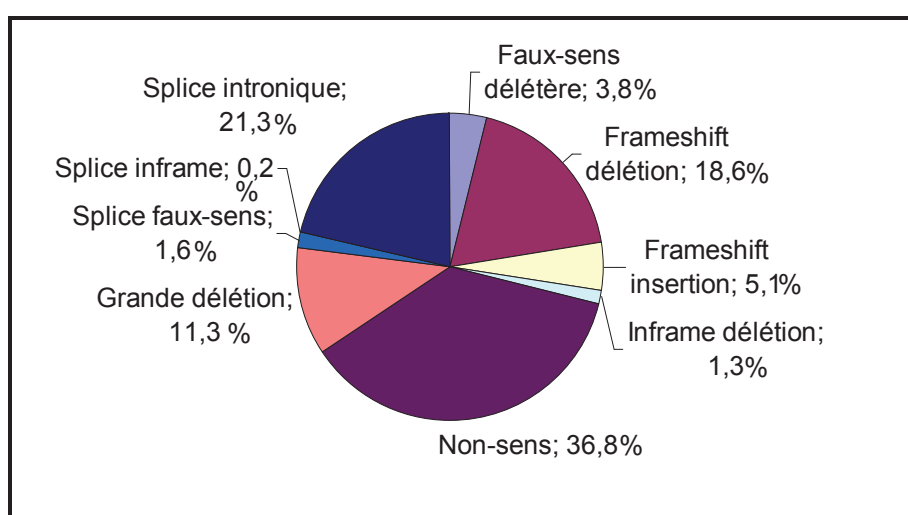
Le deuxième angle est à la fois clinique et biologique puisqu'il met à profit les capacités des essais de CGH en haute résolution afin de mettre en lumière les relations entre les grandes délétions qui emportent le locus de *RBI* et les retards de développement psychomoteur qui accompagnent ce syndrome. Cette approche a permis d'identifier clairement *PCDH8* comme un gène candidat dans les retards psychomoteurs.

Enfin, des facteurs génétiques modificateurs du phénotype ont été recherchés par une approche gènes candidats issue de l'analyse de la tumorigénèse du rétinoblastome. Des études d'association familiale ont été mises en place dans l'objectif de mettre en évidence les facteurs qui pourraient réguler l'apparition des phénotypes tumoraux variables. Ainsi, nos recherches ont mis en lumière *MDM2* comme le premier gène modificateur connu dans le rétinoblastome.

## I. Population d'étude

Une section « Patients et Méthodes » est développée dans chacun des trois articles réalisés au cours de cette thèse. Néanmoins, il nous est paru important de préciser l'origine du recrutement ainsi que quelques paramètres supplémentaires décrivant notre cohorte d'étude. De plus, certains choix méthodologiques liés aux caractéristiques de la cohorte sont abordés au cours de ce chapitre.

Le laboratoire de génétique de l'Institut Curie prend en charge le diagnostic moléculaire de l'ensemble des nouveaux cas de rétinoblastomes diagnostiqués en France. Le cas échéant le laboratoire réalise la recherche de mutations connues sur l'ADN extrait de villosités choriales ou d'amniocytes dans le cadre d'un diagnostic prénatal. Jusqu'en 2011, 1160 cas consécutifs de patients atteints de rétinoblastome ont bénéficiés d'une analyse moléculaire du gène *RBI* dans le cadre de leur prise en charge thérapeutique. Parmi ceux-ci, 320 patients étaient porteurs d'une mutation constitutionnelle. Soixante et un pourcent de ces mutations entraînaient un codon stop prématuré, 23% étaient des mutations entraînant une anomalie de l'épissage du transcrite de *RBI*, 11 % étaient des réarrangements de grande taille emportant soit un ou plusieurs exons jusqu'au gène entier, 4 % étaient des mutations faux sens connue pour leur caractère causal et 1% des délétions conservant le cadre de lecture de la traduction (figure 11).



**Figure 11 : Type de mutations mise en évidence chez les patients atteints de rétinoblastome**

Les patients porteurs d'une délétion du locus entier de *RBI* ont été étudiés par une analyse en CGH array pour préciser les relations entre les retards de développement psychomoteur et la nature des délétions génomiques (taille et localisation). La présence d'un retard psychomoteur a été évaluée chez ces patients et les éventuels dysmorphismes relevés au cours des différentes consultations ont été notés mais pas spécifiquement recherchés. En effet, notre travail tendait à préciser les rôles des gènes contigus au locus de *RBI* dans l'apparition d'un retard psychomoteur afin de définir au mieux une zone génomique d'alerte que le généticien prendrait en compte pour une prise en charge rapide d'un éventuel déficit mental ou moteur. Ce travail n'ayant pas pour objectif principal de dresser une liste exhaustive des relations génotype/phénotype dans ce contexte particulier, nous avons défini le retard psychomoteur comme une variable binaire (présent / absent) qui est suffisante pour définir une zone génomique « à risque ». D'autre part, l'âge au moment du dernier examen a été recueilli pour chaque patient, permettant ainsi de définir sans ambiguïté le phénotype (plus l'âge est élevé et plus le phénotype est fiable). Le type de présentation du rétinoblastome, sporadique ou familiale, a été enregistré pour tous les sujets.

Les analyses d'association familiale utilisées dans le troisième article de cette thèse reposent sur les patients dont le diagnostic moléculaire a été réalisé à l'Institut Curie jusqu'en avril 2008. Durant cette période, 650 patients ont bénéficié d'une analyse moléculaire du gène *RBI* durant leur prise en charge thérapeutique. Dans cette série, 70 cas index ont été diagnostiqués dans un cadre de rétinoblastome familial. Dans ces 70 familles, 212 porteurs de mutation de *RBI* ont été détectés (113 patients atteints de Rb bilatéral, 40 de Rb unilatéral, 53 étaient des porteurs sains et 6 ont montré un rétinome au fond d'œil). De plus, l'ADN de 114 apparentés de ces familles, non porteurs de la mutation familiale, a été exploité pour mettre en œuvre les analyses d'association familiale. Nous disposons également de 209 patients atteints de rétinoblastome bilatéral sans histoire familiale porteurs d'une mutation causale de *RBI*. Parmi eux, 98 trios (enfant malade, père et mère indemnes non porteurs de la mutation mis en évidence) ont permis de mener des études d'association. Ces données sont compilées dans la table 3.



Patients	N=	Age au diagnostic (mois)		
		moyenne	SD	médiane
Patients prédisposés sporadiques (Bilateral)	209	12.1	10.4	9
Patients prédisposés dans un contexte familial	153	12.5	13.3	9
“statut tumoral”				
Bilateral	113	10.5	11.4	7
Unilatéral	40	17.8	16.5	12
Non porteur de 1 <sup>ère</sup> génération	25	14.4	14.1	11
Porteur de 1 <sup>ère</sup> génération	15	24.9	19.4	20

**Table 3 : Caractéristiques des patients atteints de rétinoblastome présents dans les études d’association familiale**

Le statut tumoral définit le nombre d’yeux atteints. Le terme de porteur de 1<sup>ère</sup> génération définit l’ancêtre le plus éloigné du cas index chez qui la mutation a été détectée (SD : Standard Déviation)

L’analyse des âges au diagnostic a permis d’orienter les analyses statistiques. L’âge au diagnostic entre les patients atteints de rétinoblastomes familiaux comparé à l’âge au diagnostic des patients bilatéraux diagnostiqués dans un cadre sporadique ne montre pas de différence significative (Student test,  $p=0.78$ ). De manière surprenante, l’âge au diagnostic des patients atteints de rétinoblastomes bilatéral familial est plus précoce que celui des patients atteints de rétinoblastome unilatéral familial (Student test,  $p=0.017$ ). Néanmoins, il n’y a pas de différence significative si on restreint la comparaison avec les patients atteints de rétinoblastomes unilatéraux familiaux qui ne sont pas des porteurs de première génération de la mutation familiale (Mann-Whitney test,  $p=0,15$ ). En contrepartie, la différence reste significative si la comparaison est restreinte aux patients rétinoblastomes unilatéraux familiaux porteurs de première génération. (Mann-Whitney test,  $p < 0.001$ ). En conséquence, l’âge au diagnostic des patients porteurs de première génération est plus élevé que celui des patients ayant reçu la mutation de leur parent (Mann-Whitney test,  $p=0.03$ ). Ces observations alimentent l’hypothèse que l’expressivité variable de la pathologie et les défauts de pénétrance observés chez les patients porteurs de première génération sont au moins en partie liés à la présence d’une mosaïque somatique. En conséquence, et afin d’éliminer les biais que pourraient induire la présence d’un mosaïque cellulaire, les patients unilatéraux et porteurs sains de première génération ont été exclus des analyses d’association familiale. De la même

manière, les patients atteints de rétinoblastome unilatéral, diagnostiqués dans un cadre sporadique, n'ont pas été étudiés ici puisque la présence d'une mosaïque somatique ne peut pas être exclue.

## **II. Articles**

### **Note 1 :**

Pour chacun des articles des données complémentaires seront ajoutés le cas échéant.

Les méthodologies employées sont décrites dans chacun des articles et feront l'objet de précisions si nécessaires. Pour répondre aux trois points abordés dans cette thèse nous avons mise en place des méthodologies variées :

- Séquençage direct selon la technique Sanger (Article 1, 2 et 3)
- Etudes de ségrégation allélique par étude de microsatellites polymorphes (Article 2)
- Essais de CGH (Article 2)
- Mise en culture de lignées lymphoblastoïdes (Article 3)
- Dosages protéiques par la technique ELISA (Article 3)
- Génotypage de polymorphismes en discrimination allélique par la Méthode TaqMan® (PCR en temps réel) (Article 3)
- Analyse d'association familiale avec la suite logicielle FBAT (Article 3)

### **Note 2 :**

Chaque article fera l'objet d'une introduction et une discussion particulière.

## **II.1. Première publication**

### **II.1.a. Introduction au premier travail**

En France, le diagnostic prénatal au même titre que le diagnostic préimplantatoire est accordé aux patients porteurs d'une mutation de *RBI* après évaluation de la demande par un Centre Pluridisciplinaire de Diagnostic Prénatal. La demande est généralement accordée puisque le risque de cancer est majeur chez le jeune enfant et également chez l'adulte. De plus, les moyens de préventions sont limités. Seule la détection précoce, voire en période néonatale, des rétinoblastomes chez un nouveau-né prédisposé permet de détecter dans le meilleur des cas des tumeurs inférieures à 1mm de diamètre, qui, si la localisation est favorable sont de pronostic excellent en terme de sauvegarde visuelle. Néanmoins, le parcours des surveillances ophtalmologiques en milieu spécialisé et le risque lié à l'anesthésie générale chez de très jeunes enfants couplé à l'angoisse du diagnostic sont difficilement tolérables pour les parents. D'autre part, les situations favorables ne sont pas toujours présentes et l'atteinte oculaire peut être importante malgré la précocité des surveillances. Dans ces cas, les thérapeutiques sont invalidantes et le pronostic visuel plus sombre. Environ, une dizaine de diagnostics prénatals (DPN) sont réalisés tous les ans en France. Le diagnostic prénatal est également accordé aux couples ayant un enfant atteint de rétinoblastome bien que la mutation identifiée chez l'enfant ne soit pas été identifiée chez un des deux parents. Le risque de mosaïque germinale chez un des deux parents (voire de mosaïque somatique non détectable dans les cellules circulantes périphériques) est pris en compte. Bien que difficile à estimer précisément, le risque de récurrence rejoint le risque minimal indiqué pour le DPN de la trisomie 21. Les demandes de DPN dans ces présentations de rétinoblastome sporadique sont considérées donc comme recevables (« Diagnostic prénatal, interruption médicale de grossesse, diagnostic préimplantatoire et formes héréditaires de cancers » rapport de l'agence de la biomédecine et de l'INCa, 2007).

L'existence de mosaïques chez les patients prédisposés intervient dans de nombreux aspects du rétinoblastome (cf. Partie 1). Finalement, tous les cas de figures sont possibles de la mosaïque somatique à la mosaïque gonadique. La possibilité d'une présentation en mosaïque somatique et germinale est donc toujours prise en compte au cours du conseil

génétique et notamment dans un contexte de diagnostic prénatal (pour revue, (De, 2011) et (Youssoufian, 2002))

Nous présentons ici, dans le but d'explorer l'impact des mosaïques sur la prise en charge des patients, la découverte inattendue d'une mosaïque gonadique et probablement somatique dans le cadre d'un diagnostic prénatal réalisé à la demande d'un couple dont le père était atteint d'une forme bilatérale de rétinoblastome.

### **II.1.b. Résumé**

Nous reportons ici le cas d'une famille dans laquelle le père, atteint d'un rétinoblastome bilatéral et porteur d'une mutation de *RBI*, (g.44693/p.Gln176X), a eu recours à cinq diagnostics prénatals consécutifs. Chaque diagnostic a été réalisé par une combinaison de séquençage direct et une approche indirecte utilisant 8 marqueurs microsatellites du locus de *RBI*. Le premier et le deuxième fœtus diagnostiqués étaient porteurs de la mutation paternelle et l'étude indirecte a permis d'identifier l'allèle à risque portant la mutation. Le troisième fœtus diagnostiqué n'était pas porteur de la mutation de *RBI* mais de manière surprenante présentait l'allèle à risque. Afin d'éliminer une éventuelle erreur d'identification des prélèvements, l'analyse complète a été reproduite avec les mêmes résultats. L'analyse a été recommencée avec un nouveau couple d'amorce afin d'éliminer l'éventuelle présence d'une néomutation située en cis de la mutation de *RBI*, qui serait située sur les sites d'hybridation des amorces initialement utilisées et qui pourrait provoquer une situation d'allèle « drop-out ». L'absence de mutation a été confirmée. La grossesse a été menée à son terme et l'enfant nouveau-né qui est resté indemne n'a pas subi de surveillance ophtalmologique. Cette situation a été reproduite chez le cinquième fœtus, le quatrième était porteur de la mutation et de l'allèle à risque et a conduit à une interruption de grossesse. La réanalyse *a posteriori* des électrophorogrammes de séquence du père atteint a montré que les ratios d'hétérozygotie de la mutation étaient déséquilibrés. Ces éléments pris ensemble suggèrent clairement que le père est en mosaïque somatique et germinale (incluant les cellules gonadiques) pour la mutation responsable. Ces cas démontrent que les examens de diagnostic génétique prénatal et par extension préimplantatoire doivent être réalisés par une approche de test direct de la mutation causale afin d'éviter des interruptions médicales de grossesse non justifiées ou une non implantation d'embryons indemnes. Au final, l'importance d'envisager un statut de mosaïque chez tous les porteurs de mutation de première génération quel que soit le phénotype clinique est discutée.

### **II.1.c. Tiré à part du premier travail**

## RESEARCH LETTER

# Mosaicism in clinical practice exemplified by prenatal diagnosis in retinoblastoma

Laurent Castéra<sup>1</sup>, Marion Gauthier-Villars<sup>1</sup>, Catherine Dehainault<sup>1</sup>, Dorothée Michaux<sup>1</sup>, Alexandra Benachi<sup>2</sup>, Livia Lumbroso-Le Rouic<sup>3</sup>, Dominique Stoppa-Lyonnet<sup>1,4,5</sup> and Claude Houdayer<sup>1,5\*</sup>

<sup>1</sup>Service de Génétique Oncologique, Institut Curie, Paris, France

<sup>2</sup>Service de Service de Gynécologie-Obstétrique et de Médecine de la Reproduction, Hôpital Antoine Bécère, APHP, Université Paris 11, Clamart, France

<sup>3</sup>Service d'ophtalmologie, Institut Curie, Paris, France

<sup>4</sup>INSERM U830, Pathologie Moléculaire des Cancers, Institut Curie, Paris, France

<sup>5</sup>Université Paris Descartes, Paris, France

KEY WORDS: genetic counselling; prenatal diagnosis; retinoblastoma; mosaic; single gene disorders; childhood cancer

Retinoblastoma (Rb) [MIM 180200] is an embryonic neoplasm of retinal origin with an incidence of 1 in 15,000. It almost always arises in early childhood. Retinal inactivation of both alleles in the *RBI* tumour-suppressor gene (MIM# 180200) in chromosome band 13q14.2, (Friend *et al.*, 1986) promotes retinoblastoma development.

In non-hereditary retinoblastoma, both somatic mutations in *RBI* occur in a single retinal cell that subsequently develops into a tumour; non-predisposed patients are therefore unilaterally affected. In contrast, in hereditary retinoblastoma, the first mutation is a germline mutation and the second mutation is a somatic mutation (Knudson, 1971, Comings, 1973). The germline mutation is associated with predisposition to retinoblastoma and Rb is usually bilateral. The germline mutation is inherited from an affected parent (hereditary familial Rb) or is a *de novo* mutation (hereditary *de novo* Rb) that occurred either in gonadic tissue, or early in embryonic development, and the foetus therefore presents a somatic mosaic.

In hereditary forms, predisposition to Rb segregates as an autosomal dominant trait with high penetrance and predisposition probability in first-degree relatives of an affected patient is equal to 50%. However, it should be emphasized that 80% of Rb cases are due to *de novo* mutations, which is why somatic and germline mosaicism must be taken into account in genetic counselling (Rushlow *et al.*, 2009).

In France, prenatal and preimplantation genetic diagnoses (PND and PGD, respectively) are authorized by evaluation of each individual case by a CPDPN ("Centre Pluridisciplinaire de Diagnostic Prenatal"), a group of experts (including obstetricians, geneticists, paediatricians, foetal pathologists and ultrasonographers) attached to a non-profit-making hospital. PND and PGD are accepted for Rb predisposition in most cases. We report a couple with a bilateral

retinoblastoma-affected male patient who requested 5 successive prenatal diagnoses and in whom *RBI* mutation mosaicism had important implications.

The patient developed a first retinoblastoma in the right eye early in infancy at 3 months of life. The first tumour was treated by enucleation only. Ophthalmological follow-up diagnosed a second Rb tumour in the left eye 16 years later. This was an exceptionally late bilateralization of the tumour (see discussion). The second tumour was small and peripheral. Treatment was conservative. After adequate genetic counselling, individual written consent was obtained for Rb molecular diagnosis which revealed a heterozygous germline deleterious g.44693 C > T / p.Gln176X mutation in the *RBI* gene. (Houdayer *et al.*, 2004). The patient's wife was unaffected and had no family history of tumour. The couple wanted to have children and 5 consecutive prenatal diagnoses were performed using a combination of direct and indirect testing.

DNA was extracted from chorionic villi or amniocytes (depending on the pregnancies) and the mutation status was determined by sequencing. Amplicons were purified and sequenced using the BigDye Terminator Cycle Sequencing V1.1 Ready Reaction kit (Life Technologies, Carlsbad, CA), followed by electrophoresis in an ABI 3130xl genetic analyzer (Life Technologies, Carlsbad, CA). Systematic indirect testing was used to check for maternal contamination of foetal tissue using 8 micro-satellite markers from the *RBI* locus (D13S168, D13S287, D13S164, D13S153, RBi4, D13S165, D13S273, D13S284 in which D13S153 and RBi4 are intragenic markers in intron 2 and intron 4, respectively). Indirect testing was also useful to define the at-risk haplotype. Briefly, PCRs were performed with 5' labelled fluorescent sense primers and allele sizes were determined after electrophoretic migration on an ABI 3130xl genetic analyzer (Life Technologies, Carlsbad, CA). Indirect testing was used as a control for direct testing. The detailed protocol is available on request.

\*Correspondence to: Claude Houdayer, Service de Génétique Oncologique, Institut Curie, F75248 Paris, France.  
E-mail: claud.houdayer@curie.net

No maternal contamination was detected on any of the prenatal diagnoses. The first foetus studied carried the F1 mutation (II-1, Figure 1a), allowing definition of the paternal morbid haplotype. The second PND (II-2, Figure 1a) also

demonstrated a carrier foetus that, like II-1, also carried the morbid haplotype. Surprisingly, and in marked contrast with the previous 2 PNDs, the third foetus (II-3, Figure 1a) did not carry the mutation but harboured the morbid haplotype.

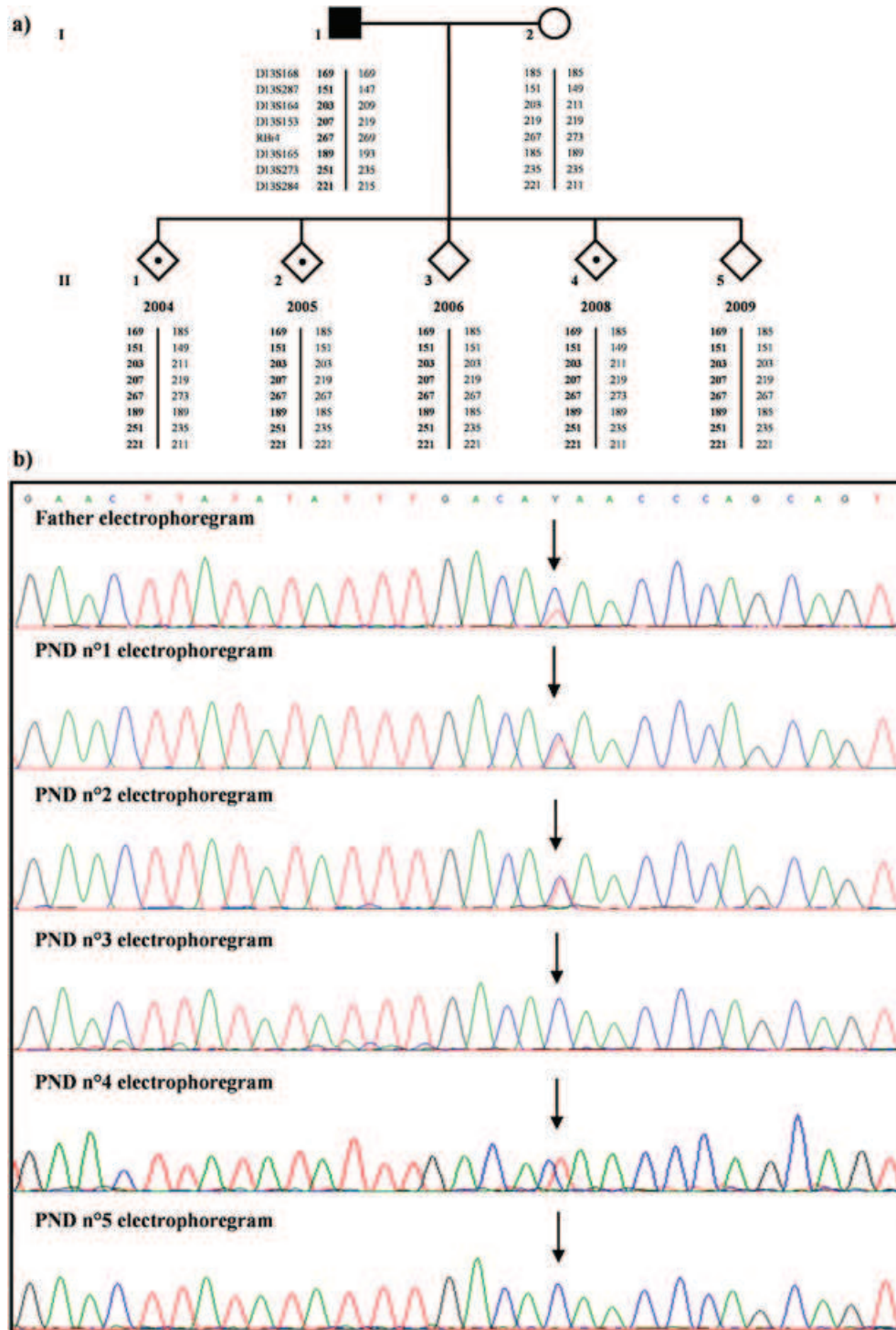


Figure 1—**a)** Indirect testing using 8 microsatellite markers at the *RB1* locus; D13S153 and RBi4 are intragenic markers. Allele sizes are indicated for each marker. The morbid haplotype is represented in bold type; the blackened square represents the bilaterally affected father; diamonds represent foetuses and the year of PND is indicated below the corresponding symbol; a dot indicates the presence of the predisposing mutation. **b)** Sequencing electrophoregrams focused on the g.44693 C > T / p.Gln176X mutation (position marked by the arrow) in the father's DNA extracted from blood and DNA extracted from chorionic villi or amniocytes of the five foetuses, from top to bottom. C/T height ratio is close to 2 in the father, suggesting a somatic mosaic. C/T height ratios are close to 1 for PNDs 1, 2 and 4. PNDs 3 and 5 are not carriers of the mutation.



These results were confirmed by two independent mutation screens using two different primer sets and new DNA extractions (data not shown). Analysis of the affected father's sequencing electrophoregram obtained from DNA extracted from blood showed a disequilibrium of the g.44693 C > T substitution between the C and T peaks with a C/T height ratio close to 2 instead of 1 (Figure 1b). This was confirmed on both strands. In contrast, the C/T height ratio was close to 1 for the two carrier fetuses (II-1 and II-2). This finding was highly suggestive of paternal somatic and germline mosaicism. Consequently, indirect testing was not considered for final interpretation of the prenatal diagnosis. Two other pregnancies resulted in a similar situation (II-4 and II-5). Medical termination of pregnancy was performed for mutation carrier fetuses and the two live-born infants were freed from eye examination.

In this report, 5 consecutive PNDs for a bilaterally-affected Rb father were performed with apparently conflicting results between direct and indirect studies in the family. The presence/absence of the mutation on the same haplotype shows that the affected father was at least a gonadic mosaic carrier of the *RBI* mutation. Sequencing data (Figure 1b) further supported this interpretation and also demonstrated somatic mosaicism. Unfortunately, the father's parents were not available for testing. Overall, these data suggest that the *de novo* mutation appeared in the early stage of embryonic development. Rare revertant mosaicism by intragenic mitotic recombination, which might explain the absence of the mutation, (Jonkman *et al.*, 1997) was ruled out by the familial segregation microsatellite markers used in the indirect approach (Figure 1a).

Mosaicism is well known in retinoblastoma (Sippel *et al.*, 1998). However, this case is of particular interest, as the affected father, despite bilateral disease and identification of the mutation in blood, was a mosaic. This particular situation has several implications. In the context of PND in first generation carriers of a predisposing mutation, this report illustrates the importance of direct testing, as the misleading conclusions based on indirect testing could lead to medical termination of healthy embryos. Preimplantation genetic diagnosis should therefore also be performed using direct testing to avoid non-implantation of healthy embryos.

Mosaicism in first generation carriers must be considered in terms of the risk of recurrence. If the causal mutation is post-zygotic and, depending on the stage of embryonic development, mosaicism may extend to various organs (e.g. gonads) of the index case. This germline mosaicism can therefore explain the lack of recurrence sometimes observed in offspring of affected parents. Consequently, when a predisposing mutation is identified in sporadic cases, we recommend independent targeted testing in another tissue (e.g. a buccal swab) to document possible mosaicism. Unfortunately, detection of a mosaic in blood is a difficult procedure in routine molecular diagnosis of Rb, as the detection threshold is close to 10%-20% of mutated alleles with Sanger sequencing. In the great majority of *de novo* Rb, a mosaic status therefore cannot be detected. Today, deep sequencing provided by massively parallel sequencing

could be useful to increase the sensitivity of mutation detection, increase the number of mosaics detected and refine recurrence risk.

Another striking feature of this family is the late bilateralization of the father's retinoblastoma. This delayed bilateralization could be partly linked to the mosaic status, as it is generally accepted that mosaic status can be associated with an attenuated or mild phenotype and should be considered in terms of the genotype/phenotype relationship (Taylor *et al.*, 2007). Because retinoblastoma is a disease with a high rate of *de novo* mutations, some of the phenotype variability may be due to somatic mosaicism in first-generation carriers, (Sippel *et al.*, 1998, Castera *et al.*, 2010) which could cause variable expressivity and penetrance. In the case of retinal mosaicism, *RBI*-mutated cone precursors, which are suspected to be precursors of Rb, (Xu *et al.*, 2009) are mixed with non-*RBI*-mutated precursors. The number of cells in which a second spontaneous mutation can emerge is therefore low and, in agreement with the Knudson model, (Knudson, 1971) the risk of developing a retinoblastoma should consequently be decreased, explaining the possibility of delayed bilateralization, or in extreme cases, absence of bilateralization. The late bilateralization reported here also implies that Rb precursors persisted in the patient's retina until late childhood.

Finally, this report has implications that extend well beyond Rb, as it exemplifies the difficulties raised by mosaics for geneticists in all genetic diseases with high *de novo* mutation rates, such as haemophilia (MIM 306700), Duchenne muscular dystrophy (MIM 310200), type 1 and 2 neurofibromatosis (MIM 162200 and MIM 101000, respectively), familial adenomatous polyposis (MIM 175100). Mosaicism should be considered in all first generation carriers of a germline mutation, regardless of the clinical phenotype, as it has major implications for genetic counselling.

## REFERENCES

- Castera L, Sabbagh A, Dehainault C, *et al.* 2010. MDM2 as a modifier gene in retinoblastoma. *J Natl Cancer Inst* **102**: 1805–1808.
- Comings DE. 1973. A general theory of carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **70**: 3324–3328.
- Friend SH, Bernards R, Rogelj S, *et al.* 1986. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* **323**: 643–646.
- Houdayer C, Gauthier-Villars M, Lauge A, *et al.* 2004. Comprehensive screening for constitutional RB1 mutations by DHPLC and QMPSF. *Hum Mutat* **23**: 193–202.
- Jonkman MF, Scheffer H, Stulp R, *et al.* 1997. Revertant mosaicism in epidermolysis bullosa caused by mitotic gene conversion. *Cell* **88**: 543–551.
- Knudson AG Jr. 1971. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* **68**: 820–823.
- Rushlow D, Piovesan B, Zhang K, *et al.* 2009. Detection of mosaic RB1 mutations in families with retinoblastoma. *Hum Mutat* **30**: 842–851.
- Sippel KC, Fraioli RE, Smith GD, *et al.* 1998. Frequency of somatic and germ-line mosaicism in retinoblastoma: implications for genetic counseling. *Am J Hum Genet* **62**: 610–619.
- Taylor M, Dehainault C, Desjardins L, *et al.* 2007. Genotype-phenotype correlations in hereditary familial retinoblastoma. *Hum Mutat* **28**: 284–293.
- Xu XL, Fang Y, Lee TC, *et al.* 2009. Retinoblastoma has properties of a cone precursor tumor and depends upon cone-specific MDM2 signaling. *Cell* **137**: 1018–1031.

#### **II.1.d. Discussion**

Au-delà du diagnostic prénatal et préimplantatoire cet article met en avant les difficultés rencontrées dans le conseil génétique du rétinoblastome face à l'existence de mosaïque. Le problème se résume finalement au fait que nous savons que la présence de mosaïques est une réalité bien acquise dans cette pathologie mais qu'elle est rarement prouvée. L'exemple de la neurofibromatose de type 1 montre que si la mutation apparaît précocement dans le stade embryonnaire, celle-ci a de grande chance d'être représentée dans un grand nombre de tissus de l'organisme (Kehrer-Sawatzki, 2008). Mais, le pourcentage de cellules mutées dans chaque tissu, en cas de mosaïque, est un élément variable. Il est d'abord dépendant du rapport du nombre de cellules mutées par rapport aux cellules non mutées s'engageant dans un processus de différenciation tissulaire au cours de l'embryogénèse. Il est également dépendant de la tolérance de la cellule mutée vis-à-vis de la mutation. Il est possible que la mutation interdise la différenciation de la cellule (l'activité du gène muté serait indispensable à la différenciation cellulaire) vers un tissu spécifique ou que la présence de la mutation dans l'environnement cellulaire du tissu différencié confère un désavantage de survie, la cellule mutée serait alors éliminée totalement ou en partie du tissu mature. D'autre part des phénomènes de réversion de mutation restent possibles. La cellule peut à tout moment retrouver un génotype normal et par expansion clonale restaurer un phénotype normal (ou atténué qui serait fonction du pourcentage de cellules mutées) comme cela a été décrit dans les syndrome de Bloom (Ellis, 2001) ou les maladies de Fanconi (Gross, 2002). Plusieurs mécanismes peuvent aboutir à une réversion génotypique. Au cours des maladies récessives, la recombinaison dans une cellule hétérozygote composite pour un locus morbide peut après crossing-over et ségrégation des chromosomes produire deux cellules filles, dont, l'une portera un allèle alors sauvage et un allèle muté par une des mutations, et, l'autre portera un allèle sauvage et un allèle muté par les deux mutations alors nouvellement en cis. Un retour de mutation, ou « back mutation », est également possible, c'est-à-dire qu'une nouvelle substitution restaure le génotype sauvage. Enfin, des phénomènes de mutations compensatrices sont décrits dans lesquels une nouvelle mutation sur le même locus peut rétablir la phase de lecture de la traduction ou une substitution sur le même codon peut

transformer un codon stop prématuré en un codon codant pour un acide aminé qui serait toléré en terme d'activité résiduelle protéique.

Ces mécanismes sont donc responsables d'une hétérogénéité au sein même d'un individu porteur d'une mutation en mosaïque puisque le degré de mosaïcisme au sein des tissus est possiblement variable, allant de 0 à 100% de cellules mutées, quel que soit le moment d'apparition de la mutation pendant le développement embryonnaire. Le corolaire est qu'un organe peut être porteur de la mutation mais au sein même de cet organe des plages entières de tissu ne portant pas la mutation responsable de la maladie peuvent coexister. Certaines pathologies dermatologiques, telles que les épidermolyses bulleuses atrophiques bénignes généralisées causées par des mutations de *COL17A1*, sont des exemples frappants puisque l'organe cible (la peau) peut présenter de grandes plages de tissu sain accolées à d'autres parties atteintes (Jonkman, 1997). En résumé, un tissu entier peut ne pas comporter de cellules mutées ou en présenter dans des pourcentages qui seraient bien en dessous du seuil de détection des techniques habituellement utilisées pour le diagnostic moléculaire, même si, la mutation intervient à un stade très précoce de l'embryogénèse.

Une mosaïque doit donc être envisagée dans toutes les présentations sporadiques quelques soit le phénotype clinique et le statut mutationnel. C'est également le cas de tous les patients porteurs de première génération mis évidence dans un contexte familial de rétinoblastome. La présence d'une mosaïque est donc une variable à considérer dans les recherches visant à identifier l'origine de la variabilité phénotypique dans le rétinoblastome. En effet, une mutation en mosaïque est un des éléments qui peut expliquer l'apparition d'un phénotype atténué ou un défaut de pénétrance. Pour éviter les biais que pourraient engendrer la présence de mosaïque, les patients de première génération porteurs sains ou présentant un phénotype atténué ont été censurés au cours de nos recherches (Taylor, 2007). Ainsi, les patients porteurs d'une grande délétion au locus de *RBI* en mosaïque ont été écartés des analyses des relations génotype/phénotype effectuées dans le deuxième travail de cette thèse (Castera, 2012). Egalement, les patients de première génération, porteurs sains, unilatéraux et présentant un rétinome ont été exclus des études visant à caractériser des facteurs génétiques modificateurs (Castera, 2010).

L'amélioration des techniques et des procédures permettant la mise en évidence des mutations permet d'optimiser le conseil génétique. La première ligne du diagnostic moléculaire du rétinoblastome repose aujourd'hui sur l'analyse de la tumeur afin de mettre en évidence les deux mutations inactivatrices de *RBI* responsables de l'apparition de la tumeur

(cf. partie 1.II.6.b). L'absence des deux mutations en constitutionnel chez le patient permet de prouver le caractère de novo et postzygotique des événements et ainsi libérer les apparentés de la famille. Cette approche rend de nombreux services notamment chez les patients unilatéraux à présentation sporadique (80 % d'énucléation première) puisque dans 90% des cas aucune mutation n'est mise en évidence et aucun test ne peut être réalisé dans la famille. En prenant en compte les aléas techniques liés à l'accessibilité à la tumeur et à la qualité du prélèvement, environ 70% des familles (données internes au laboratoire) avec un seul cas de rétinoblastome unilatéral sont libérées de la surveillance ophtalmologique des apparentés (contre 10% avec une approche strictement constitutionnelle). C'est donc une avancée majeure pour le conseil génétique. Néanmoins, si le caractère postzygotique des événements est mis en évidence chez 90 % des patients unilatéraux bénéficiant d'une étude tumorale contributive (c'est-à-dire que les deux événements mutationnels ont été mis en évidence), le fait que le patient soit lui-même une mosaïque ne peut pas être exclu. La même situation est retrouvée chez les parents indemnes et non porteurs de la mutation mis en évidence chez un enfant atteint de rétinoblastome bilatéraux. Finalement, ces difficultés sont le résultat de la faible sensibilité des techniques pour mettre en évidence les mutations en mosaïque et notamment du séquençage selon la méthode de Sanger, qui est mis en œuvre dans la réalisation des tests génétiques ciblés. En effet, il est admis que la sensibilité du séquençage Sanger permet de détecter une mutation hétérozygote si la représentativité de l'allèle muté est supérieure à 20% des allèles (ratio allélique de la mutation). Actuellement, il est envisageable de mettre à profit dans le diagnostic moléculaire du rétinoblastome, les grandes capacités de séquençage qu'offrent les séquenceurs de dernière génération (Liu, 2012; Quail, 2012). Ces séquenceurs de dernière génération sont capables en une seule expérience de générer un nombre de séquences équivalent à plusieurs génomes humains entiers en quelques jours. Ici, il ne s'agirait pas de séquencer des génomes entiers comme cela est aujourd'hui possible mais de mettre à profit les grandes capacités de ces machines pour séquencer un très grand nombre de fois le gène *RBI* afin de détecter des allèles très faiblement représentés en constitutionnel (on parle alors de grande profondeur de séquençage, la profondeur est exprimée en  $x$  ;  $100x$  voulant dire qu'une base est séquencée 100 fois). Théoriquement, si par exemple au cours d'un séquençage la profondeur est de  $10000x$  et que la mutation est séquencée en  $1x$ , une mutation avec un ratio allélique de 0.01% serait détectée. Il faut néanmoins pondérer ce chiffre par la justesse de ces nouvelles approches de séquençage, mais, comme les automates les plus performants dépassent actuellement, sous certaines conditions, des scores de vraisemblance que la base lue est exacte de 40 (une base a 10000 fois plus de chance d'être

correctement détecté), la mise en œuvre de ces méthodes ou d'adaptations dans la détection de mutation en mosaïque semble tout à fait pertinente (Schmitt, 2012). Ainsi, une meilleure sensibilité de détection des mutations permettrait de revoir les niveaux de risques résiduels, dans les cas de rétinoblastomes bilatéraux ou unilatéraux chez qui une mutation ne serait pas mise en évidence par ces nouvelles techniques. Le risque individuel d'atteinte controlatérale chez un patient atteint d'un Rb unilatéral pourrait éventuellement être défini par cette approche. Le risque de bilatéralisation pourrait être proportionnel à l'étendue de la mosaïque (une ou deux rétines touchées). Il paraît possible d'évaluer l'étendue du mosaïcisme par séquençage haut débit à grande profondeur sur ADN leucocytaire (ou de cellules jugales) en faisant l'hypothèse que le risque de mutation de la seconde rétine est proportionnel à l'importance de la mosaïque médullaire. Le niveau de mosaïcisme médullaire serait alors un marqueur pronostic de la récurrence en recherchant un niveau de mosaïcisme au-dessus duquel il y a risque de bilatéralisation. Les approches de séquençage haut débit semblent, dans ces hypothèses, pouvoir améliorer et optimiser le conseil génétique du rétinoblastome

Enfin, deux études récentes démontrent que la proportion d'individus de la population générale porteurs de variations génomiques en mosaïque a été sous-estimée (Jacobs, 2012; Laurie, 2012). En effet, les événements en mosaïque sont seulement détectés lorsqu'une étiologie à un phénotype particulier est recherchée. L'incidence réelle d'événements en mosaïque est donc largement méconnue. Les auteurs de ces deux études ont étudié la présence de grands réarrangements génomiques constitutionnels dans des cohortes de patients malades et de témoins de 50000 et 30000 individus dans chaque groupe. Ces données proviennent d'études génomiques d'associations cas témoins antérieures (genome-wide association study, GWAS). Les auteurs ont mis à profit les résultats des nombreuses puces pangénomiques de type SNP pour mettre en évidence des anomalies chromosomiques en mosaïque avec une sensibilité de 5% de cellules présentant des anomalies que les auteurs nomment « detectable clonal mosaicism. » Ce mosaïcisme est d'autant plus important que la personne est âgée (moins de 1 % pour les personnes âgées de moins de 50 ans et jusqu'à 3% chez celles âgées de plus de 70 ans). Ces anomalies en mosaïques sont clairement associées à un sur-risque de cancers hématologiques (10 fois et 35 fois) et dans une moindre mesure dans ces études avec un risque de tumeurs solides. En conséquence, comme il s'agit ici de mosaïques détectables (sous-entendu par les techniques mises en œuvre), rien n'interdit de penser qu'une mosaïque visible lorsque la personne est âgée (finalement lorsque le risque de cancer est le plus élevé au niveau individuel) reste invisible chez l'individu jeune jusqu'à ce que l'expansion clonale de

ce tissu soit détectable. Ainsi, l'impact des mosaïques et donc des mutations de novo sur le risque de cancer semble actuellement très sous-estimé d'autant que ce type d'observations reste actuellement inaccessible dans les tissus autres qu'hématopoïétiques ou jugaux et n'interrogent pas le panel des petites mutations géniques. Dans le contexte du rétinoblastome, rechercher un marqueur médullaire prédictif du développement tumoral (mutation de *RBI*) par des techniques de plus en plus sensibles prend tout son sens puisqu'il s'agit de repousser les limites de détections de la mosaïque somatique prédictive de l'histoire rétinienne. Finalement, les présentations de rétinoblastome par néomutations postzygotiques pourraient se résumer à un concept de mosaïcisme détectable, comme tout cancer, mais qui serait ici dans un processus de développement et de prolifération clonal très rapide dans un contexte spatio-temporel défini strictement (le jeune enfant, la rétine).

## **II.2. Deuxième publication**

### **II.2.a. Introduction au deuxième travail**

L'observation de patients atteints de rétinoblastome, d'un syndrome dysmorphique d'anomalies du développement et de retard psychomoteur a été rapidement associée aux délétions du bras long du chromosome 13 (cf. Partie 1.II.5.d.ii.) Les premières observations de ce phénotype particulier associé au rétinoblastome datent des années soixante (Lele, 1963; Taktikos, 1964). Très vite, il a été mis en évidence que les délétions partielles du chromosome 13 n'étaient pas systématiquement mais souvent associées au développement du rétinoblastome et que le spectre des anomalies observées était large. Finalement, les délétions partielles du 13q définissent un syndrome spécifique dans lequel l'apparition du rétinoblastome est un des symptômes parmi le retard mental, les dysmorphies (notamment du visage) et des anomalies cérébrales. Les études, peu nombreuses, ayant pour but de corréler les phénotypes observés dans ce syndrome et la localisation chromosomique des délétions ont permis dans un premier temps grâce aux analyses caryotypiques de définir trois groupes autour de la région 13q32 (Brown, 1995). Cette région comporte le gène *ZIC2* dont les mutations monoalléliques ont été montrées par la suite comme étant responsables de l'holoprosencéphalie (malformation cérébrale complexe) qui est un syndrome rencontré également dans les délétions du 13q. Le groupe 1 comprend la délétion proximale épargnant le locus 13q32 dans lequel sont observés des retards mentaux modérés à sévères, des syndromes dysmorphiques variables, des retards de croissance, et de manière inconstante des rétinoblastomes (13q14). Le groupe 2 montre des délétions plus distales emportant le 13q32 et les malformations décrites sont majeures telles que des microcéphalies, des malformations du cerveau (holoprosencéphalie), des malformations oculaires (microphthalmie sévère par exemple) et des malformations des membres, malformations de l'appareil génital et gastro-intestinal. Le groupe 3 concerne les délétions distales impliquant le 13q33 et le 13q34 où des retards mentaux sévères sont observés sans malformation majeure ni retard de croissance. Afin de caractériser ce syndrome de gènes contigus, les approches plus fines de génétique moléculaire, basées sur la mise en œuvre de CGH ont cherché à établir les relations entre le génotype (localisation et taille de la délétion) et les phénotypes observés afin d'identifier des gènes spécifiquement impliqués dans le retard mental, les malformations ou les dysmorphies (Quelin, 2009).



Le rétinoblastome est donc un syndrome de groupe 1 et la porte d'entrée qui mène à la découverte d'une délétion du 13q est double. Le tableau principal peut être malformatif ou marqué par un retard du développement associé à des dysmorphies plus ou moins importantes, ou alors, le tableau principal est centré sur le rétinoblastome. La découverte d'une délétion du 13q lors de l'étude moléculaire doit donc faire envisager la possibilité d'un retard du développement psychomoteur et doit faire rechercher des malformations restées discrètes.

L'objectif du travail présenté ici était de clairement définir des limites génomiques autour du locus de *RBI* qui définiraient une zone à risque de retard psychomoteur dans le but d'améliorer le conseil génétique et la considération précoce d'un risque de retard psychomoteur.

Le choix méthodologique utilisé pour cette étude a été orienté par l'observation que le retard de développement psychomoteur n'apparaissait que chez les patients atteints de rétinoblastome chez qui la délétion du locus de *RBI* dépassait la région 13q14 exclusivement (Baud, 1999). Les approches de cytogénétiques conventionnelles étaient limitées pour explorer et localiser des microdélétions du locus de *RBI* qui par ailleurs sont dans certains cas inaccessibles au caryotype mais détectables uniquement par FISH (Fluorescence in situ Hybridization).

Des approches de cartographies fines de la délétion ont donc été mises en œuvre par CGH array. Afin d'obtenir une analyse la plus résolutive possible nous avons dessiné une puce à sondes nucléotidiques centrée sur *RBI* afin d'obtenir une résolution maximale de 100 paires de bases. Cette approche de CGH array à très haute résolution a donc permis d'identifier une zone à risque précise et de mettre en évidence des gènes candidats pour le retard psychomoteur directement contigus à *RBI*. Dans ce travail nous avons souhaité préciser les conditions d'apparition des retards psychomoteurs et avons donc cherché une définition moléculaire prédictive de ce syndrome qui alerterait le généticien.



## II.2.b. Résumé

Le rétinoblastome résulte de l'inactivation biallélique des deux allèles du gène *RBI* localisé dans la bande chromosomique 13q14.2. Les délétions constitutionnelles monoalléliques complètes du gène *RBI* représentent environ 6% du spectre mutationnel de *RBI*. Les délétions du locus entier de *RBI* sont parfois associées à des degrés variables de retard psychomoteur ainsi qu'à des dysmorphies. Les points de cassure bordant la délétion mise en évidence chez douze patients atteints de rétinoblastome présentant ou non un retard psychomoteur ont été localisés dans le but de définir la ou les régions adjacentes de *RBI* impliquées dans l'apparition du retard psychomoteur. Une puce CGH haute résolution centrée sur *RBI* et ses régions flanquantes a été dessinée et mise en œuvre pour préciser les régions perdues. Les analyses comparatives ont permis de détecter une région critique de 4 mégabases incluant un gène candidat, *PCDH8* (protocadhérine 8). *PCDH8* est connu pour jouer un rôle spécifique dans le système nerveux central notamment dans l'adhésion cellulaire et la signalisation. La perte de *PCDH8* est ainsi une cause probable de retard psychomoteur chez les patients présentant une délétion du locus de *RBI*. En conséquence, nous proposons d'utiliser systématiquement les puces CGH en haute résolution dans les cas de perte totale de *RBI* mais aussi en cas de délétion partielle emportant les régions télomériques dans le but de mieux caractériser les pertes de *PCDH8* et affiner ainsi les relations génotype/phénotype afin d'optimiser le conseil génétique et le suivi psychomoteur des patients porteurs d'une grande délétion de *RBI*.

## II.2.c. Tiré à part du deuxième travail

SHORT REPORT

# Fine mapping of whole *RB1* gene deletions in retinoblastoma patients confirms *PCDH8* as a candidate gene for psychomotor delay

Laurent Castéra<sup>1</sup>, Catherine Dehainault<sup>1</sup>, Dorothee Michaux<sup>1</sup>, Livia Lumbroso-Le Rouic<sup>2</sup>, Isabelle Aerts<sup>3</sup>, Francois Doz<sup>3,4</sup>, Anna Pelet<sup>5</sup>, Jérôme Couturier<sup>1,6</sup>, Dominique Stoppa-Lyonnet<sup>1,4,6</sup>, Marion Gauthier-Villars<sup>1</sup> and Claude Houdayer<sup>\*,1,4,6</sup>

Retinoblastoma (Rb) results from inactivation of both alleles of the *RB1* gene located in 13q14.2. Whole-germline monoallelic deletions of the *RB1* gene (6% of *RB1* mutational spectrum) sometimes cause a variable degree of psychomotor delay and several dysmorphic abnormalities. Breakpoints in 12 Rb patients with or without psychomotor delay were mapped to specifically define the role of chromosomal regions adjacent to *RB1* in psychomotor delay. A high-resolution CGH array focusing on *RB1* and its flanking region was designed to precisely map the deletion. Comparative analysis detected a 4-Mb critical interval, including a candidate gene protocadherin 8 (*PCDH8*). *PCDH8* is thought to function in signalling pathways and cell adhesion in a central nervous system-specific manner, making loss of *PCDH8* one of the probable causes of psychomotor delay in *RB1*-deleted patients. Consequently, we propose to systematically use high-resolution CGH in cases of partial or complete *RB1* deletion encompassing the telomeric flanking region to characterize the putative loss of *PCDH8* and to better define genotype/phenotype correlations, eventually leading to optimized genetic counselling and psychomotor follow-up.

European Journal of Human Genetics advance online publication, 22 August 2012; doi:10.1038/ejhg.2012.186

**Keywords:** retinoblastoma; *RB1*; *PCDH8*; CGH array; psychomotor delay; large-scale rearrangement

## INTRODUCTION

Retinoblastoma (Rb) is a rare embryonic neoplasm of retinal origin resulting from inactivation of both alleles of the *RB1* gene (MIM no.180200) located in chromosome band 13q14.2.<sup>1</sup> Predisposition to Rb must be suspected independently of family history and regardless of the clinical presentation, because 100 and 10% of bilateral and unilateral cases, respectively, carry an inherited or *de novo* germline mutation. Screening for the predisposing *RB1* mutation should therefore be proposed to all Rb patients.<sup>2,3</sup> The pattern of mutations found in molecular studies revealed the existence of 6% of complete deletions of the *RB1* gene that are associated with variable phenotypes.<sup>4,5</sup>

Interstitial 13q deletions involving *RB1* and its flanking regions, initially revealed by karyotype analyses in Rb patients, were found to be associated with dysmorphic, cranial and hand/foot abnormalities, psychomotor delay and hypotonia.<sup>6,7</sup> Correlations between the size of the deletion and the phenotype were therefore investigated. Although a correlation between the size of the deletion and a specific pattern of malformations and dysmorphism was not established, psychomotor delay was suspected to be restricted to patients harbouring a deletion that encompasses more than the 13q14 band.<sup>7</sup> The size and location of the deletion may therefore define the risk of psychomotor delay in a context of contiguous gene syndrome as previously demonstrated, for example, in neurofibromatosis type 1.<sup>8</sup> The correlation between

the size of the deletion and psychomotor delay in Rb has not yet been determined because of the limited resolution of karyotype analysis. High-resolution analysis of deletions, for example, by CGH, allows this issue to be properly addressed. This work is a nice follow-up of previous studies,<sup>9,10</sup> as it specifically tackles for the first time the issue of psychomotor delay in *RB1*-deleted patients. We used a dedicated *RB1*-customized CGH-array designed to define a critical interval and consequently identify candidate genes. This study also provides clues concerning the role of CGH array in Rb molecular diagnosis and parent/patient information regarding genetic counselling.

## PATIENTS AND METHODS

### Patients

Diagnosis of Rb was established on the basis of examinations by an ophthalmologist and a paediatrician, and by histopathological criteria when the tumour was available. Rb patients were offered genetic counselling, and individual written consent was obtained from all sampled individuals or their legal guardians. In this series of 1160 consecutively ascertained cases, 320 mutations were found, and a total of 17 patients were diagnosed with a complete deletion of the *RB1* gene by QMPSF or karyotype analyses. A sufficient amount of DNA was available for CGH analysis in 12 of these patients. Psychomotor delay was reported either when a paediatrician, geneticist and/or psychometrician observed a delayed motor development or speech acquisition delay, or when the patient was taken into care by a specialized educational structure (reported in Table 1 as a binary variable 'yes' or 'no').

<sup>1</sup>Département de Biologie des Tumeurs, Institut Curie, Paris, France; <sup>2</sup>Service d'Ophtalmologie, Institut Curie, Paris, France; <sup>3</sup>Service de Pédiatrie, Institut Curie, Paris, France; <sup>4</sup>Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France; <sup>5</sup>Hôpital Necker Enfants Malades, INSERM U781, Paris, France; <sup>6</sup>Institut Curie, INSERM U830, Paris, France

\*Correspondence: Dr C Houdayer, Service de Génétique Oncologique, Institut Curie, Université Paris Descartes, 26 rue d'Ulm, F75248 Paris Cedex 05, France.

Tel: +33 1 56 24 58 37; Fax: +33 1 53 10 26 48; E-mail: claud.houdayer@curie.net

Received 3 April 2012; revised 20 June 2012; accepted 17 July 2012

**Table 1 Patient characteristics and cytogenetic results**

Patient ID	Rb phenotype	Origin of deletion	Age at diagnosis (month)	Psychomotor delay	Age at last examination (years) <sup>a</sup>	Other	Cytogenetic analysis	CGH array analysis:			Size of deletion (bp)
								Last present proximal	First present distal	oligonucleotide	
1	Bilateral	De novo	n.r.	No	22	n.r.	46, XX,	47530000	49383000	n.d.	1 853 000 <sup>b</sup>
2	Bilateral	De novo	3	No	12	Macrocrania	n.p.	47644400	49592400	g.476445203_49591383del	1 946 179
3	Bilateral	Inherited	1	No	28	Blind uvula	46, XY	47358800	50134000	g.47359006_50133362del	2 774 357
4	Bilateral	Inherited	2, 5	No	17	n.r.	n.p.	45962800	48755600	g.45962864_48748560del	2 785 697
5	Bilateral	De novo	4	Yes	18	Documented fetal suffering	46, XX	45471400	52239000	g.45471625_52237785del	6 766 161
6	Unilateral	Inherited	10	No	14	n.r.	46, XY	42449700	50716400	g.42449743_50715540del	8 265 798
7	Bilateral	De novo	<12	Yes	15	Epilepsy	46, XX, del(13)(q14.1q14.3) t(14;19)(p13;q12)	43212100	54502000	g.43213373_54501464del	11 288 092
8	Bilateral	De novo	60	No	31	n.r.	46, XY (13 mitosis) 46, XY, del(13)(q14) (7 mitosis)	44701200	61288700	n.d.	16 587 500 <sup>b</sup>
9	Unilateral multi-focal	De novo	11	Yes	8	n.r.	46, XX, del(13)(q13q21.3)	39587600	66345200	n.d.	26 757 600 <sup>b</sup>
10	Bilateral	De novo	30	Yes	14	Facial dysmorphism	46, XY, del(13)(q13q21.1)	38819600	67215300	g.38819991_67214419del	28 394 429
11	Bilateral	De novo	12	Yes	2	Epilepsy	46, XY, del(13)(q13q21) (3 mitosis) 46, XY (9 mitosis)	38447600	> 74000000	n.d.	> 35 552 400 <sup>b</sup>
12	Unilateral	De novo	12	Yes	6	Multiple dysmorphism	46, XY, del(13)(q13q32)	36383200	> 74000000	n.d.	> 37616800 <sup>b</sup>

Abbreviations: n.r., not reported; n.p., not performed; n.d., not determined.

<sup>a</sup>Age at last follow-up exam by a geneticist and/or a paediatrician.

<sup>b</sup>Size of deletion estimated by CGH analysis.

**Cytogenetic analysis**

Karyotype analyses with RHG banding and FISH with an *RBI* probe (Vysis, Downers Grove, IL, USA) were performed according to standard cytogenetic procedures. A customized CGH array centred on the *RBI* locus was designed on a 1 × 385-K oligonucleotide CGH microarray (Roche NimbleGen, Madison, WI, USA). The covered region corresponded to the genomic position Chr13:34000000–74000000 (Hg18), for example, a 100-bp resolution. Data were analysed using VAMP software.<sup>11</sup>

**Characterization and sequencing of breakpoints**

First, MP/LC<sup>12,13</sup> was used to refine CGH analysis. MP/LC is a technique for the detection of chromosomal rearrangements, which combines the advantages of semiquantitative multiplex PCR and quality of separation of DHPLC. Long-range PCRs were then performed using TripleMaster PCR System (Eppendorf, Hamburg, Germany). Amplicons were sequenced using the BigDye Terminator V1.1 Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), followed by electrophoresis in an ABI 3130xl (Life Technologies).

**RESULTS**

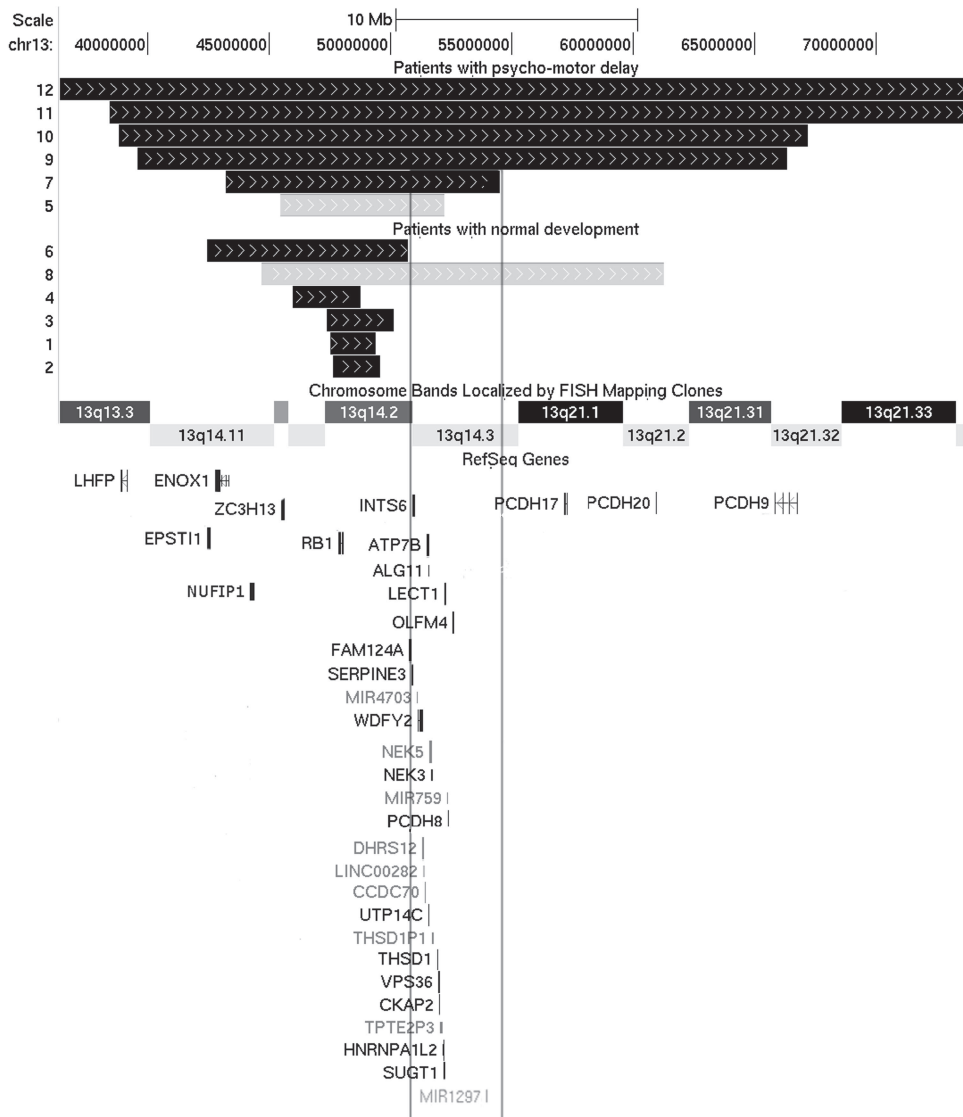
The 13q deletion in all 12 patients was characterized by our *RBI*-customized CGH array (Table 1 and Figure 1). The largest deletion that was not detected by karyotype analysis measured 8.2 Mb and the smallest deletion detected by karyotype analysis measured 11 Mb. The karyotype resolution was therefore about 10 Mb, which is consistent with routine diagnostic practice. The sequencing experiment (Figure 2) demonstrated good accuracy of the CGH array, as the mean difference of location between the sequencing and CGH mapping results was equal to 1.08 kb (± 1.7 kb, SD). Unfortunately, long-range PCRs and breakpoint sequencing failed in five cases due to low complexity and/or repeated regions. Nevertheless, CGH resolution was sufficient to allow breakpoint location, for example, for *PCDH9* (see below).

Patients 1 to 6 presented a molecular microdeletion (not detected by karyotype analysis), and patients 7 to 12 presented a cytogenetic deletion centred around the 13q14.2 band. One of the 6 patients with a molecular microdeletion and 5 of the 6 patients with a cytogenetic deletion presented psychomotor delay (Table 1). Cytogenetic deletions in a context of Rb were therefore associated with psychomotor delay ( $P = 0.03$ ; Fisher's exact test; two-sided). To define the minimal deletion associated with psychomotor delay, patient 5 (with psychomotor delay) and patient 8 (without psychomotor delay) were excluded from the following analysis because they presented documented fetal suffering or mosaicism documented by karyotype, respectively (Table 1; see Discussion).

The largest deletion found without psychomotor delay measured 8.2 Mb (Table 1, patient 6). Sequencing analysis (Figure 2) showed that the breakpoint were located inside the *EPSTI1* and *FAM124* genes. This interval (chr13:42449743\_50715540) of deletion was inherited from the patient's father. In patients 2 and 4, who did not present psychomotor delay, sequencing analysis localized breakpoints inside the *DLEU2* and *CDACCI* genes. The deletion identified in patient 7 (chr13:13213373\_54501464) was the smallest deletion (11.2 Mb) associated with psychomotor delay. The breakpoint was found inside the *ENOX1* gene (Figure 2). Combining these results with those from patient 6, the chr13:50715540\_54501464 interval defined an *RBI*-flanking telomeric region where candidate genes for psychomotor delay may be found (Figure 1). Twenty-five Refseq genes have been reported inside this region, including *PCDH8* (Supplementary Table 1).

**DISCUSSION**

High-resolution CGH reliably defined a deleted interval not associated with psychomotor delay (chr13:42449743\_50715540; Table 1

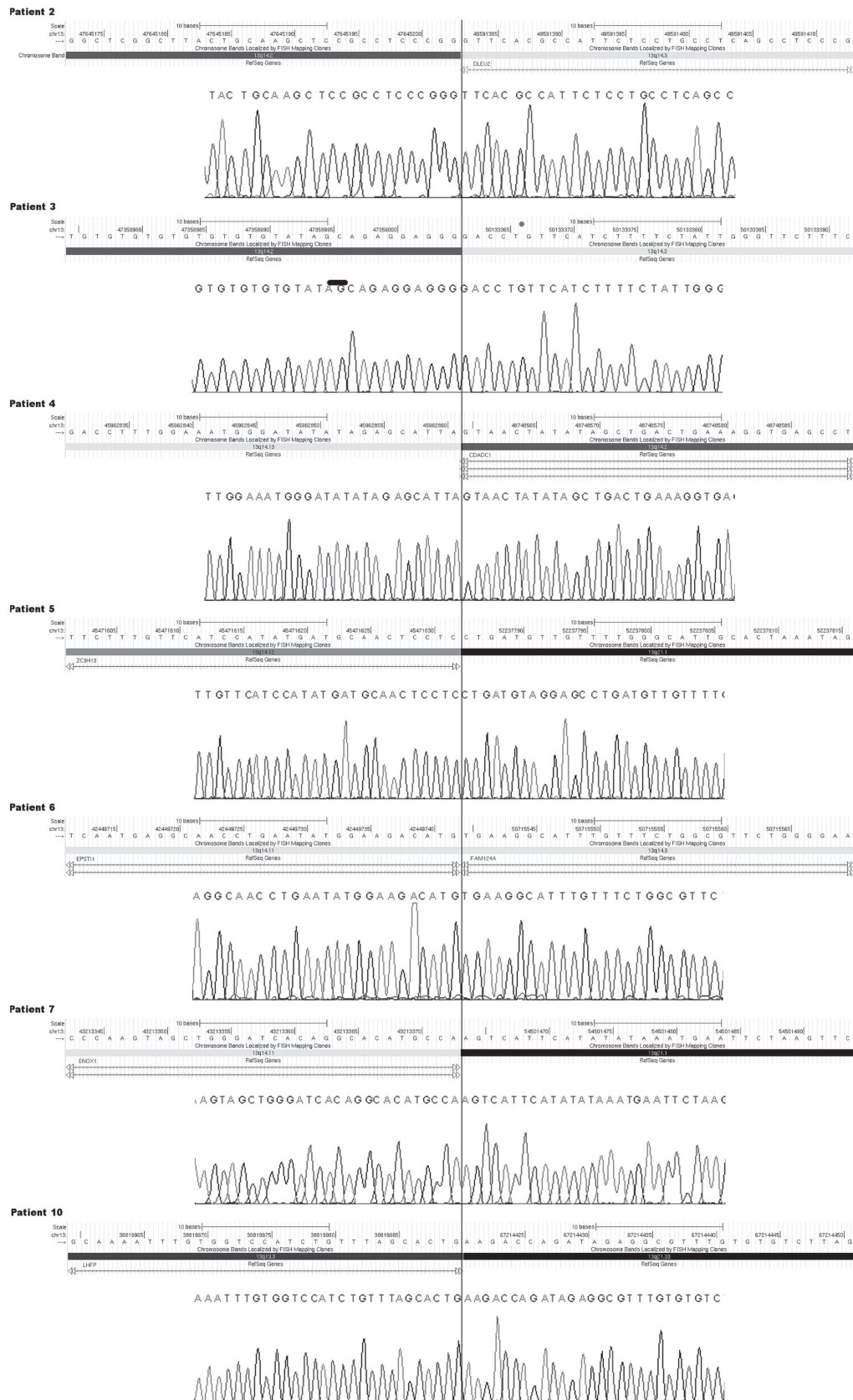


**Figure 1** CGH array results from 12 Rb patients harbouring a complete *RB1* deletion. Adapted view from UCSC. From top to bottom, schematic view of chromosome, deletion mapped by CGH array labelled with the patient number, representation of cytogenetic bands and Refseq genes. Deletions represented by a grey bar were excluded from the definition of 'the zone of interest' (flanked by the black frame) because of mosaicism or confounding diagnosis. *PCDH8* loss was always associated with psychomotor delay, whereas a deletion encompassing *NUFIP1* cosegregated in patient 6 and his affected relatives, without any detectable impact on psychomotor development (see text for details). The Refseq genes shown are only those cited in the text, as well as all those included in the zone of interest.

and Figure 1). This deletion was inherited (Table 1), conferring a high degree of confidence to our results, by excluding the mosaicism bias. On the other hand, mosaicism led to exclusion of patient 8, as a mosaic status can be associated with an attenuated phenotype and should not be considered in terms of the genotype/phenotype relationship.<sup>14</sup> As *Rb* is a disease with a high rate of *de novo* mutations, an attenuated phenotype (ie, an absence of psychomotor delay in a patient harbouring a cytogenetic deletion) in first-generation mutation carriers is not unexpected.<sup>15,16</sup> Patient 5 was also excluded from the analysis because fetal suffering can be responsible for psychomotor delay, thereby introducing another analysis bias.

The breakpoints of the deletion located in patients with normal development demonstrated that *DLEU2*, *CDACCI*, *EPST1* and *FAM124A* genes, disrupted by the deletion, therefore cannot be

associated with psychomotor delay. A breakpoint in the *ENOX1* gene was also found in a patient with psychomotor delay. Inhibition of *ENOX1* has been reported to decrease angiogenesis in tumour growth.<sup>17</sup> *ENOX1* was found with a high but not exclusive expression level in fetal brain (see <http://biogps.org>), but no other data are available in the literature to incriminate this gene in the context of psychomotor delay. Comparative analysis of deleted intervals in delayed and non-delayed patients identified *PCDH8* as a candidate gene for psychomotor delay (Figure 1). *PCDH8* (MIM no. 603580), for protocadherin 8, is located in 13q14.3, and belongs to a subclass of cadherins.<sup>18</sup> *PCDH8* has a brain-specific expression making this gene a good candidate gene for psychomotor delay. Furthermore, previous linkage data suggested *PCDH8* as a candidate gene for schizophrenia.<sup>19</sup> Also of interest is that protocadherin *PCDH19* has been previously involved in the female-restricted





epilepsy and mental retardation syndrome.<sup>20</sup> Interestingly, 2 patients (Figure 1; patient 7 and 11) with psychomotor impairment and loss of a *PCDH8* copy suffered from epilepsy. Also, our data clearly point to *PCDH8* as one of the putative genes responsible for psychomotor delay in the context of Rb, acting either directly or indirectly via regulatory mechanisms. An autosomic dominant model linked to *PCDH8* loss-of-function could be suspected, but a recessive model driven by epigenetic inactivation of the second allele of *PCDH8* cannot be excluded, as the *PCDH8* promoter has been found to be methylated.<sup>21</sup> Two previous studies also suggested the role of *PCDH8*, but did not formally map this gene, as confounding factors such as mosaicism and alternative causes of psychomotor delay were not evaluated.<sup>9,10</sup> Nevertheless, one study described a few deleted patients without *PCDH8* involvement, who did present psychomotor delay, leading authors to designate *NUFIP1* as another possible candidate gene.<sup>10</sup> Overall data show that loss of neither *PCDH8* nor *NUFIP1* can explain all delayed cases, but *PCDH8* loss is always associated with psychomotor delay, as opposed to *NUFIP1* (see patient 6, Figure 1).

Another interesting finding was that the deletion breakpoints in patient 9, who presented psychomotor delay, were located inside the *PCDH9* gene (Figure 1). On the basis of the role of protocadherins in neuronal development and neuronal plasticity,<sup>22</sup> a *PCDH* dose/effect in the expression of psychomotor delay, implying genetic heterogeneity, could be proposed in the context of complete *RB1* deletion.

In summary, we demonstrated that loss of *PCDH8* in the context of complete deletion of *RB1* should alert geneticists to the risk of psychomotor delay. Fine mapping of deletion breakpoints is therefore mandatory in Rb patients in case of the following: (i) complete or partial *RB1* deletion encompassing a flanking region and (ii) mental delay either isolated or associated with dysmorphic features. This could be performed by CGH array of the chromosome 13 or, in the near future, by a global approach such as massively parallel sequencing. This second line of investigation will precisely define the deleted genes flanking *RB1*, and thereby improve genetic counselling/information and define the most appropriate follow-up options.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the 'Programme Incitatif et Coopératif sur le Rétinoblastome' (Institut Curie) and RETINOSTOP. We thank Laurence Desjardins, Virginie Moncoutier, Carole Tirapo, Catherine Dubois d'Enghien, Anthony Laugé, Isabelle Eugène, Sandrine Miglierina, Catherine Rougeron and Catherine Gilbon for their helpful support during the study. We also thank clinicians from the GGC (Groupe Génétique et Cancer) for referring patients.

- 1 Friend SH, Bernards R, Rogelj S *et al*: A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 1986; **323**: 643–646.
- 2 Knudson Jr AG: Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; **68**: 820–823.
- 3 Comings DE: A general theory of carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973; **70**: 3324–3328.
- 4 Albrecht P, Anspenger-Rescher B, Schuler A, Zeschnick M, Gallie B, Lohmann DR: Spectrum of gross deletions and insertions in the *RB1* gene in patients with retinoblastoma and association with phenotypic expression. *Hum Mutat* 2005; **26**: 437–445.
- 5 Houdayer C, Gauthier-Villars M, Lauge A *et al*: Comprehensive screening for constitutional *RB1* mutations by DHPLC and QMPSF. *Hum Mutat* 2004; **23**: 193–202.
- 6 Bunin GR, Emanuel BS, Meadows AT, Buckley JD, Woods WG, Hammond GD: Frequency of 13q abnormalities among 203 patients with retinoblastoma. *J Natl Cancer Inst* 1989; **81**: 370–374.
- 7 Baud O, Cormier-Daire V, Lyonnet S, Desjardins L, Turleau C, Doz F: Dysmorphic phenotype and neurological impairment in 22 retinoblastoma patients with constitutional cytogenetic 13q deletion. *Clin Genet* 1999; **55**: 478–482.
- 8 Pasmant E, Sabbagh A, Spurlock G *et al*: NF1 microdeletions in neurofibromatosis type 1: from genotype to phenotype. *Hum Mutat*, **31**: E1506–E1518.
- 9 Caselli R, Speciale C, Pescucci C *et al*: Retinoblastoma and mental retardation microdeletion syndrome: clinical characterization and molecular dissection using array CGH. *J Hum Genet* 2007; **52**: 535–542.
- 10 Mitter D, Ullmann R, Muradyan A *et al*: Genotype-phenotype correlations in patients with retinoblastoma and interstitial 13q deletions. *Eur J Hum Genet* 2011; **19**: 947–958.
- 11 La Rosa P, Viara E, Hupe P *et al*: VAMP: visualization and analysis of array-CGH, transcriptome and other molecular profiles. *Bioinformatics* 2006; **22**: 2066–2073.
- 12 Dehainault C, Lauge A, Caux-Moncoutier V *et al*: Multiplex PCR/liquid chromatography assay for detection of gene rearrangements: application to *RB1* gene. *Nucleic Acids Res* 2004; **32**: e139.
- 13 Delnatte C, Sanlaville D, Mougnot JF *et al*: Contiguous gene deletion within chromosome arm 10q is associated with juvenile polyposis of infancy, reflecting cooperation between the *BMPR1A* and *PTEN* tumor-suppressor genes. *Am J Hum Genet* 2006; **78**: 1066–1074.
- 14 Taylor M, Dehainault C, Desjardins L *et al*: Genotype-phenotype correlations in hereditary familial retinoblastoma. *Hum Mutat* 2007; **28**: 284–293.
- 15 Sippel KC, Fraioli RE, Smith GD *et al*: Frequency of somatic and germ-line mosaicism in retinoblastoma: implications for genetic counseling. *Am J Hum Genet* 1998; **62**: 610–619.
- 16 Castéra L, Sabbagh A, Dehainault C *et al*: *MDM2* as a modifier gene in retinoblastoma. *J Natl Cancer Inst* 2010; **102**: 1805–1808.
- 17 Geng L, Rachakonda G, Morre DJ *et al*: Indolyl-quinuclidinols inhibit *ENOX* activity and endothelial cell morphogenesis while enhancing radiation-mediated control of tumor vasculature. *FASEB J* 2009; **23**: 2986–2995.
- 18 Strehl S, Glatt K, Liu QM, Glatt H, Lalonde M: Characterization of two novel protocadherins (*PCDH8* and *PCDH9*) localized on human chromosome 13 and mouse chromosome 14. *Genomics* 1998; **53**: 81–89.
- 19 Bray NJ, Kirov G, Owen RJ *et al*: Screening the human protocadherin 8 (*PCDH8*) gene in schizophrenia. *Genes Brain Behav* 2002; **1**: 187–191.
- 20 Jamal SM, Basran RK, Newton S, Wang Z, Milunsky JM: Novel de novo *PCDH19* mutations in three unrelated females with epilepsy female restricted mental retardation syndrome. *Am J Med Genet A* 2010; **152A**: 2475–2481.
- 21 Yu JS, Koujak S, Nagase S *et al*: *PCDH8*, the human homolog of *PAPC*, is a candidate tumor suppressor of breast cancer. *Oncogene* 2008; **27**: 4657–4665.
- 22 Kim SY, Mo JW, Han S *et al*: The expression of non-clustered protocadherins in adult rat hippocampal formation and the connecting brain regions. *Neuroscience* 2010; **170**: 189–199.

Supplementary Information accompanies the paper on European Journal of Human Genetics website (<http://www.nature.com/ejhg>)

## II.2.d. Supplementary Information (données publiées)

**Supplementary Table 1: Brief description of the 25 Refseq genes found in the zone of interest (see text for definition)**

Refseq Gene	OMIM	OMIM summary	EntrezGene summary	Preferential Tissue expression (GNF Expression Atlas 2 Data)
<b>FAM124A</b>	no entry	-	hypothetical protein LOC220108	none
<b>SERPINE3</b>	no entry	-	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 3	none
<b>INTS6</b>	*604331	putative tumour suppressor gene adjacent to, but separate from, the <i>RBI</i> gene	DEAD box proteins, characterised by the conserved motif Asp-Glu-Ala-Asp (DEAD), are putative RNA helicases	Blood cell
<b>MIR4703</b>	no entry	-	unknown function	-
<b>WDFY2</b>	*610418	endocytosis partner	encodes a protein that contains two WD domains and an FYVE zinc finger region. The function of this gene is unknown	none
<b>DHRS12</b>	no entry	-	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 12	none
<b>LINC00282</b>	no entry	-	non-protein coding RNA 282	-
<b>CCDC70</b>	no entry	-	coiled-coil domain containing 70	testis
<b>ATP7B</b>	*277900	Wilson disease (autosomic recessive)	member of the P-type cation transport ATPase family. This protein functions as a monomer, exporting copper out of the cells, such as the efflux of hepatic copper into the bile	most abundant in liver and kidney and also found in brain
<b>ALG11</b>	*613661	Congenital disorder of glycosylation, type I <sub>p</sub> (autosomic recessive; hypotonia, seizures, developmental retardation, epilepsy, early death)	encodes a GDP-Man:Man3GlcNAc2-PP-dolichol- $\alpha$ 1,2-mannosyltransferase which is localized to the cytosolic side of the endoplasmic reticulum (ER)	none
<b>UTP14C</b>	no entry	-	U3 small nucleolar ribonucleoprotein, homolog C	none
<b>NEK5</b>	no entry	-	serine/threonine-protein kinase Nek5	n/a
<b>NEK3</b>	*604044	serine-threonine kinase activity, expressed in various tissues	encodes a member of the NimA (never in mitosis A) family of serine/threonine protein kinases. Activated by prolactin stimulation, leading to phosphorylation of VAV2 guanine nucleotide exchange factor, paxillin, and activation	none

Refseq Gene	OMIM	OMIM summary	EntrezGene summary	Preferential Tissue expression (GNF Expression Atlas 2 Data)
			of the RAC1 GTPase	
<b>THSD1P1</b>	no entry	-	thrombospondin, type I, domain containing 1 pseudogene	none
<b>THSD1</b>	no entry	-	encodes a protein that contains a type 1 thrombospondin domain, which is found in a number of proteins involved in the complement pathway, as well as in extracellular matrix proteins	none
<b>VPS36</b>	*610903	complex involved in endocytosis of ubiquitinated membrane proteins	VPS36, VPS22 (SNF8; MIM 610904), and VPS25 (MIM 610907) form ESCRT-II (endosomal sorting complex required for transport II)	Blood cell
<b>CKAP2</b>	*611569	cytoskeleton-associated protein involved in mitotic progression	tumour-associated microtubule-associated protein	Blood cell
<b>TPTE2P3</b>	no entry	-	transmembrane phosphoinositide 3-phosphatase and tensin homolog 2 pseudogene 3	n/a
<b>HNRNPA1L2</b>	no entry	-	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-like 2	n/a
<b>SUGT1</b>	*60409	required for both the G1/S and G2/M transitions in the cell cycle	This gene is homologous to the yeast gene SGT1, which encodes a protein involved in kinetochore function and required for the G1/S and G2/M transitions.	none
<b>LECT1</b>	*605147	involved in endochondral bone formation during embryogenesis and cartilage development	The mature protein promotes chondrocyte growth and inhibits angiogenesis. This gene is expressed in the avascular zone of prehypertrophic cartilage and its expression decreases during chondrocyte hypertrophy and vascular invasion.	none
<b>MIR759</b>	no entry	-	unknown function	
<b>PCDH8</b>	*603580	belongs to a subclass of protocadherins, expressed exclusively in foetal and adult brain.	encodes an integral membrane protein that is thought to function in cell adhesion in a CNS-specific manner.	brain
<b>OLFM4</b>	*614061	myeloid lineage development regulator	encodes a member of the olfactomedin family. The encoded protein is an antiapoptotic factor that promotes tumour growth and is	none



Refseq Gene	OMIM	OMIM summary	EntrezGene summary	Preferential Tissue expression (GNF Expression Atlas 2 Data)
			an extracellular matrix glycoprotein that facilitates cell adhesion	
<b>MIR1297</b>	no entry	-	unknown function	n/a

### **II.2.e. Discussion**

Dans cet article, nous définissons une région génomique autour de *RBI* associée à une absence de retard psychomoteur. Ce résultat est rendu possible grâce à une définition stricte du phénotype qui évite les facteurs confondants que sont les étiologies incertaines de retard psychomoteur (souffrance fœtale par exemple) et la présence de mutation en mosaïque, souvent responsables de phénotypes atténués (cf. discussion de la première publication). Le fait que l'allèle muté soit transmis chez le patient présentant la « plus grande » microdélétion (patient 6) et qu'il ne souffre pas de retard des acquisitions, permet de définir avec un niveau élevé de certitude, une zone à risque, qui, si elle est dépassée doit alerter l'oncogénéticien. La puce CGH haute résolution, dans un contexte diagnostique, permettra donc de préciser le risque de retard psychomoteur en cas de délétion du locus de *RBI* chez un patient présentant un rétinoblastome. Ces résultats nous permettent de recommander l'usage de cette technologie dans ce contexte précis du conseil génétique. Par ailleurs, la mise en œuvre systématique d'une cartographie moléculaire du bras long du chromosome 13 dans les cas de délétion du locus *RBI* permettra d'enrichir les connaissances sur les rôles des gènes contigus à *RBI* et de contribuer à une meilleure compréhension des phénotypes observés dans le syndrome de délétion du 13q.

Notre étude permet d'apporter des éléments complémentaires dans la compréhension des phénotypes observés. Grâce à l'analyse comparative de régions délétées de nos patients, nous avons mis en évidence une région génomique très étroite en position distale de *RBI* dans laquelle *PCDH8* apparaît comme un candidat sérieux dans l'étiologie des retards du développement psychomoteur. Les membres de la famille PCDH (protocadhérines) sont des partenaires importants du développement cérébral et ont été associés à certains troubles cognitifs ou relationnels tels que la schizophrénie et la maladie d'Alzheimer (pour revue (Kim, 2011)). Nous émettons également comme une hypothèse possible, puisque d'autres membres de la famille des PCDH sont présents plus loin encore en position distale de *RBI*, que la perte de plusieurs gènes de la famille serait à l'origine d'une hétérogénéité génétique dans l'apparition des retards du développement psychomoteur.

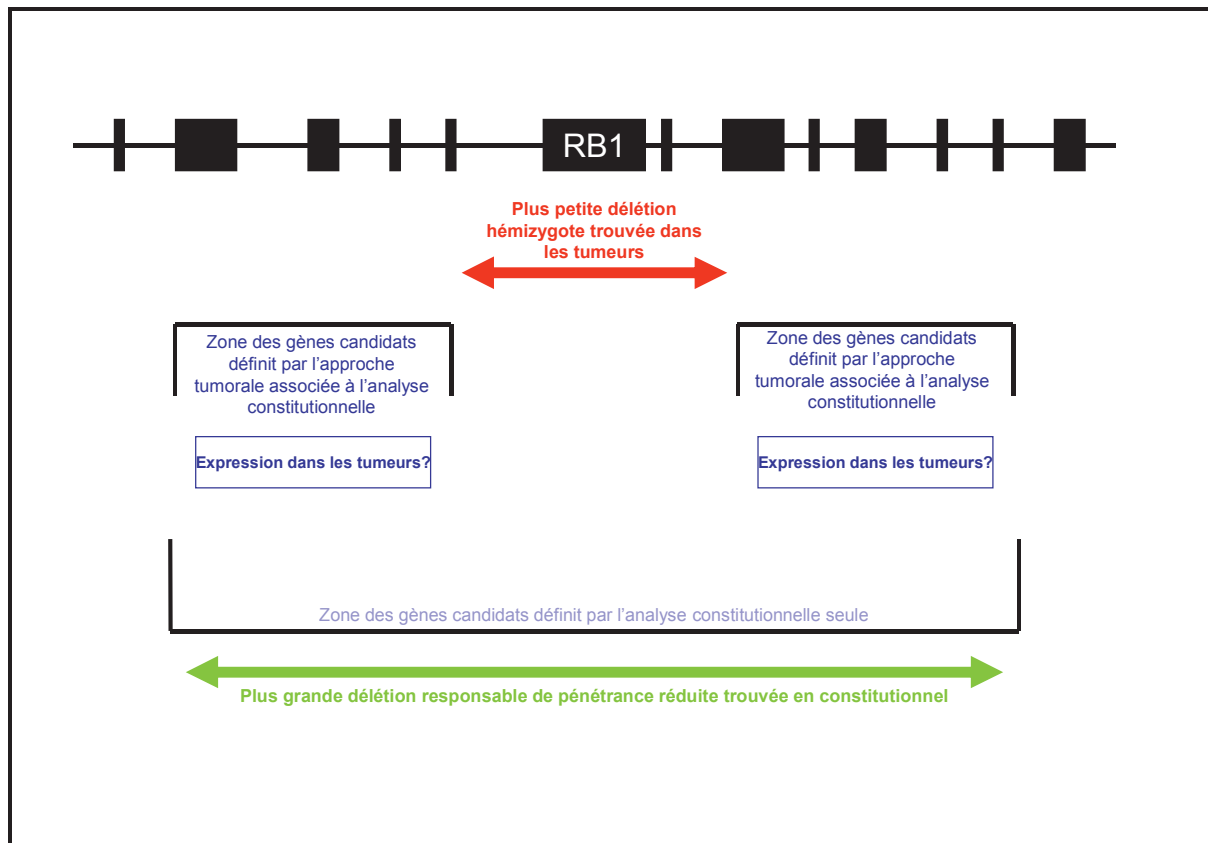
Ces résultats ont été rendus possibles par une approche de puces CGH permettant de cartographier précisément le locus *RBI* et de mettre en évidence les points de cassures des délétions. D'autres études ont tenté précédemment d'affiner la compréhension des relations génotype/phénotype dans le cadre des délétions *RBI*, sans dégager de gènes candidats uniques pouvant expliquer l'apparition de phénotypes variés et sans trouver d'explication aux différents niveaux de gravité (Caselli, 2007; Mitter, 2011). Caselli et al. ont étudié, les premiers, avec une puce CGH possédant une résolution de 25 kb, 3 patients atteints de rétinoblastome et porteurs d'une délétion du locus de *RBI*. Les auteurs ont identifié une microdélétion de 1,7 Mégabases (Mb) centrée sur *RBI* chez un patient au développement psychomoteur normal. Les auteurs définissent ainsi une zone qu'ils décrivent comme critique. C'est finalement une zone trop étroite qui ne permettrait pas de discriminer les patients de notre étude. En effet, la zone critique que nous définissons ici est de l'ordre de 8 Mb. Dans cette première étude, la plus petite délétion retrouvée chez un des deux patients atteints de retard psychomoteur était de 19 Mb ne permettant pas d'identifier de manière non équivoque de gènes candidats dont les délétions sont responsables du retard psychomoteur (il fallait chercher des gènes candidats dans une région de  $19\text{Mb} - 1.7\text{Mb} = 17.3$ ). Les auteurs notent finalement que proche de la zone critique identifiée lors de cette étude plusieurs gènes seraient de bons candidats tel que *NUFI1*, *HTR2A*, *PCDH8* et *PCDH17*. En effet *NUFI1* (Bardoni, 2003) serait impliqué dans la plasticité neuronale, *PCDH8* et *PCDH17* (Strehl, 1998) dans le développement neuronal et *HTR2A* est un récepteur à la sérotonine, neuromédiateur essentiel dans le développement cérébral (OMIM\*182135). Mitter et al. étudient une cohorte de 38 patients par CGH array présentant une délétion du locus de *RBI*. De nombreux gènes candidats pouvant être corrélés aux syndromes dysmorphiques sont mis en évidence. Au final, les résultats de 10 patients, suffisamment documentés, permettent d'aborder l'origine génétique des retards psychomoteurs chez les patients atteints de rétinoblastome porteur d'une délétion du locus de *RBI*. Dans cette étude, des patients porteurs de délétions plus petites que la zone critique nous définissons sont atteints de retard psychomoteur, d'autres montrent des délétions plus grandes sans retard des acquisitions (cf. patient 8 de notre étude). Ces différences peuvent s'expliquer par le fait que les auteurs ne recherchent pas de causes pouvant confondre le diagnostic et ne prennent pas en compte la mosaïque comme modificateur de l'expressivité de la pathologie. Il est d'ailleurs intéressant de noter qu'un patient décrit par Baud et al., porteur d'une délétion non restreinte à la bande 13q14 avait un développement psychomoteur normal. Ce dernier était porteur en mosaïque d'une délétion (Baud, 1999). Finalement, Mitter et al. suspectent également *PCDH8* et

*NUFIP1*, dans cette étude, comme étant des responsables plausibles des retards du développement psychomoteur. Nous excluons avec notre étude un modèle où une perte de *NUFIP1* serait suffisante pour induire l'apparition de retard psychomoteur. En contrepartie, dans l'ensemble des cas recensés dans la littérature, la perte de *PCDH8* est associée à un retard psychomoteur dans un contexte de rétinoblastome (contrairement à *NUFIP1*). L'association de *PCDH8* avec un retard psychomoteur paraît donc être spécifique mais nous ne pouvons pas exclure un modèle polygénique.

Par ailleurs, le patient 6 de notre étude est un patient ayant développé un rétinoblastome unilatéral. Il est maintenant bien connu que les grandes délétions du gène *RBI* sont associées à des pénétrances réduites et des expressivités variables de la pathologie. L'observation que de grandes délétions de *RBI* n'étaient pas toujours associées à un phénotype bilatéral ou unilatéral (voire associées à un défaut de pénétrance) a soulevé l'hypothèse de l'existence de gènes létaux fonctionnant sur un mode récessif contigus à *RBI* (John K. Cowel, 1988, Hum genet). Cette hypothèse est complétée par Albrecht et al. qui émettent l'hypothèse qu'il existerait deux gènes de survie de part et d'autre du locus de *RBI* puisque seuls les patients qui présentent une délétion emportant tout le locus sont concernés par un défaut de pénétrance ou un phénotype atténué. Les patients, chez qui un des points de cassure de la délétion est intragénique, présenteraient des pénétrances élevées. Il existerait donc un ou plusieurs gènes nécessaires à la survie du rétinoblastome parmi les gènes contigus à *RBI*. ((Albrecht, 2005) et paragraphe II.4.d.ii).

L'identification de ces gènes de survie est d'un intérêt majeur puisque ils pourraient représenter des cibles thérapeutiques nouvelles dans la mesure où le rôle de ceux-ci ne serait pas ubiquitaire mais spécifique au développement tumoral. Une des pistes pouvant mener à l'identification de ces gènes est portée par le patient 4 de notre étude. En effet, ce patient atteint de rétinoblastome bilatéral a une sœur porteuse saine de la délétion. Le père de ces deux enfants était porteur sain de première génération. Il est donc probable que le ou les gènes de survie se situent dans l'intervalle de cette délétion. Quatorze gènes, qu'il faudrait tester fonctionnellement, sont compris dans cette zone. Plusieurs moyens mis en œuvre actuellement permettent de limiter le nombre de candidats. Premièrement, l'analyse des tumeurs de patients qui présentent une délétion hémizygote étudiée par des essais de CGH haute résolution permet de définir la taille de la délétion maximale que tolère une cellule tumorale. Deuxièmement des données de transcriptomes de tumeurs déjà disponibles dans le

cadre des collaborations au sein du « PIC rétinoblastome » permettent d'identifier les gènes de cette région qui ne s'expriment pas dans les tumeurs et ne semblent pas nécessaires à la survie (une vérification par dosage en PCR en temps réel est réalisée pour confirmer les résultats d'expression pangénomique). Troisièmement l'expression des gènes candidats peut être testée sur une lignée de rétinoblastome (Y79) (Figure 12).



**Figure 12 : Définition des gènes candidats nécessaires à la survie d'un rétinoblastome par approche mixte constitutionnelle et tumorale (cf. texte pour détail)**

Ainsi, la convergence de ces informations a permis de mettre en évidence deux gènes candidats qui ne seront pas cités ici pour des raisons de confidentialité et qui sont actuellement en test pour leur participation fonctionnelle dans le rétinoblastome. La mise en évidence d'un ou plusieurs gènes de survie grâce à cette double approche de cartographie moléculaire en constitutionnel et en tumoral permettait de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques dans le rétinoblastome.

Au final, la caractérisation des rôles des gènes contigus à *RBI* permettrait non seulement d'affiner le conseil génétique en précisant les phénotypes associés mais également d'identifier de nouvelles cibles d'intérêt thérapeutique.

## **II.3. Troisième publication**

### **II.3.a. Introduction du troisième travail**

#### **II.3.a.i Polymorphismes communs et risques associés**

Le séquençage du génome humain a permis de mettre en évidence une grande variabilité de celui-ci (Sachidanandam, 2001; Venter, 2001). Ainsi, de nombreux polymorphismes tels que de simples substitutions nucléotidiques (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) ont rapidement été mis en évidence (Cargill, 1999) illustrant une grande hétérogénéité allélique ( $7.10^6$  SNP avec une fréquence de l'allèle mineur  $>5\%$ ). Il est actuellement possible de déterminer de manière simultanée le génotype d'un très grand nombre de SNP à l'échelle d'un génome c'est-à-dire, en théorie, de tester l'ensemble des SNP fréquents connus, ou de manière plus raisonnée un ensemble de « Tag SNP » (environ 300000 SNP serait suffisant), qui sont des marqueurs de blocs haplotypiques renseignant le génotype des SNP en très fort déséquilibre de liaison à l'intérieur de ce bloc (interroger un Tag SNP revient à obtenir de l'information sur l'ensemble des SNP du bloc haplotypique). En pratique, des essais de SNP regroupant maintenant jusqu'à plus de 2 millions de marqueurs sont disponibles. Cette technologie a été le support d'étude de la théorie dit du « Common Disease / Common Variant » (« Maladie commune / variant commun ») qui propose d'expliquer la part génétique des maladies communes (schizophrénie, troubles bipolaires, diabète, hypertension artérielle, cancers par exemple). Ainsi, des allèles fréquents mais responsables d'un risque faible seraient à l'origine du déterminisme génétique de ces pathologies complexes elles-mêmes sous influence environnementale.

Il a été proposé de rechercher les polymorphismes « à risque » ou en fort déséquilibre de liaison avec le locus à risque réel par des analyses d'association ou « cas/témoin » (Risch, 1996; Sachidanandam, 2001). Ces études visent à identifier les SNP transmis en excès à la population atteinte de la pathologie testée. Le génotype des SNP fréquents est déterminé de manière pangénomique (Génome Wide association Studies). En contrepartie, cette approche revient à réaliser un nombre très important de tests et donc à augmenter la probabilité d'erreur de type 1 (l'hypothèse d'association est acceptée alors qu'elle est fautive, car fortuite). Ainsi, des groupes importants de patients et d'individus « témoins » doivent être réalisés afin d'obtenir la puissance statistique nécessaire (Correction de Bonferroni). De plus, ces groupes

de patients et de témoins doivent être parfaitement appariés (les deux populations doivent partager les mêmes caractéristiques en âge, en origine ethnique par exemple) afin de limiter les biais de stratification. En effet, l'existence d'un effet de « structure » au sein d'une des populations amènerait alors un facteur de confusion qui pourrait induire une conclusion d'association erronée.

Ces approches ont permis d'identifier des locus à risque avec succès notamment dans le domaine de la cancérologie (Easton, 2007). Ainsi, en guise d'exemple et afin de donner la mesure de ces études, Easton et al. ont employé une stratégie en trois temps afin de mener des études d'association qui ont permis de mettre en évidence de nouveaux *loci* de susceptibilité dans le cancer du sein (~260 000 SNP chez 400 cas et 400 témoins ; puis 12 000 SNP sélectionnées par la première étude chez 4000 cas et 4 000 témoins et enfin 30 SNP chez 22000 cas et 22000 témoins). Une association avec 7 SNP a été mise en évidence de manière très significative. Par exemple, l'allèle rare du SNP rs2981582 localisé dans le gène *FGFR2* était associé à un risque de cancer du sein de façon très significative ( $p=2 \times 10^{-76}$ ), mais avec un odd ratio cependant très faible (1,63 [IC(1,53-1,72)]). Les niveaux de risque restaient donc modérés.

### **II.3.a.ii Polymorphismes fonctionnels et modulation des risques majeurs de prédisposition aux cancers**

De manière très intéressante, les polymorphismes identifiés par Easton et al. ont été décrits comme pouvant modifier le risque de cancer chez les patientes porteuses d'une mutation des gènes *BRCA1* ou *BRCA2* associée à une prédisposition génétique au cancer du sein et de l'ovaire. Le caractère multiplicatif des risques a été démontré au cours de ces études puisque l'association des allèles minoritaires de deux SNP précédemment mis en évidence comme associés à un sur-risque de cancer du sein (rs2981582 et rs3803662), multiplie par deux les risques de cancer chez les patientes porteuses d'une mutation *BRCA2* comparé à l'association allélique « la moins à risque » (niveau de risque cumulé passant de 40% à 80%) (Antoniou, 2008). Ces polymorphismes fréquents sont donc capables de moduler les risques élevés présents dans les syndromes de prédisposition aux cancers répondant à un modèle mendélien. Ainsi, la variabilité des risques et des phénotypes observés, induits par la présence d'une mutation causale sur un gène de prédisposition au cancer, pourrait être expliquée par le rôle de SNP dits « fonctionnels » ou en fort déséquilibre de liaison avec un locus fonctionnel.



Il paraît donc pertinent de rechercher une association entre les SNP présents dans les gènes d'une voie de tumorigénèse et l'apparition du syndrome tumoral correspondant.

### **II.3.a.iii Polymorphismes fonctionnels et rétinoblastome**

Répondant à cette hypothèse l'équipe de Gareth L. Bond a mis en évidence un SNP en position 309 (rs2279744, T>G, hétérozygotie 40%) du promoteur de *MDM2* situé dans une région de fixation du facteur de transcription Sp1. L'allèle minoritaire G de ce SNP (appelé SNP309) induit une plus grande affinité pour Sp1 comparé à l'allèle majoritaire T. Par la suite, les auteurs ont démontré que le SNP309 est responsable d'une surexpression de *MDM2* comparé à l'expression induite par l'allèle majoritaire. Cette surexpression de *MDM2* a été décrite comme responsable d'une atténuation de la voie de p53 (Bond, 2004). En effet *MDM2* est un important répresseur de p53 (Haines, 1997). *MDM2* inhibe l'activité transcriptionnelle de p53 par une interaction directe avec celui-ci en provoquant sa dégradation par le protéasome de manière ubiquitine dépendante (Honda, 1997; Shvarts, 1997; Brooks, 2007).

Bond et al. ont donc émis l'hypothèse que la surexpression de *MDM2* par le SNP309 pouvait être responsable d'une accélération de la tumorigénèse chez des patients porteurs d'une mutation constitutionnelle monoallélique de *TP53*. Ces patients sont atteints du syndrome de Li-Fraumeni caractérisé par une prédisposition sévère aux cancers (OMIM #151623). Les porteurs d'une mutation de *TP53* développent généralement tôt et parfois dans l'enfance un syndrome tumoral multiple dont le spectre est varié (sarcome des tissus mous, ostéosarcome, tumeur cérébrale, carcinome corticosurrénalien, cancer du sein pré-ménopausique, principalement, mais aussi leucémie, lymphome, carcinomes gastrique, éventuellement tumeur gonadique, cancer du côlon et cancer du poumon). Un âge plus précoce d'apparition de la première tumeur a été décrit chez les patients Li-Fraumeni porteur du SNP309 (homozygote ou hétérozygote) comparé aux porteurs de l'allèle majoritaire. Les auteurs suggèrent donc que la surexpression de *MDM2* liée à la présence du SNP309 est responsable d'une accélération de la tumorigénèse chez les patients atteints du syndrome de Li-Fraumeni (Bond, 2005). Cette étude initiale a été répliquée par trois études indépendantes (Bougeard, 2006) (Ruijs, 2007; Fang, 2010).

Par ailleurs, la région du promoteur de *MDM2* où est localisé le SNP309, est un site de fixation des récepteurs aux œstrogènes. Il a été montré que les récepteurs aux œstrogènes induisaient une surexpression de *MDM2* et puisque leur site de fixation était localisé au locus

du SNP309, il a été suggéré qu'une voie des œstrogènes active était nécessaire au rôle pro-tumorigène du SNP309 (Bond, 2007). Cette hypothèse a été vérifiée dans le syndrome de Li-Fraumeni dans lequel le risque de cancer a été retrouvé davantage augmenté chez les femmes porteuses d'une mutation de *TP53* et du SNP309 (Atwal, 2008; Fang, 2010). L'implication du SNP309 a été intensément étudié comme facteur de prédisposition dans de nombreux types de cancers (Hu, 2007).

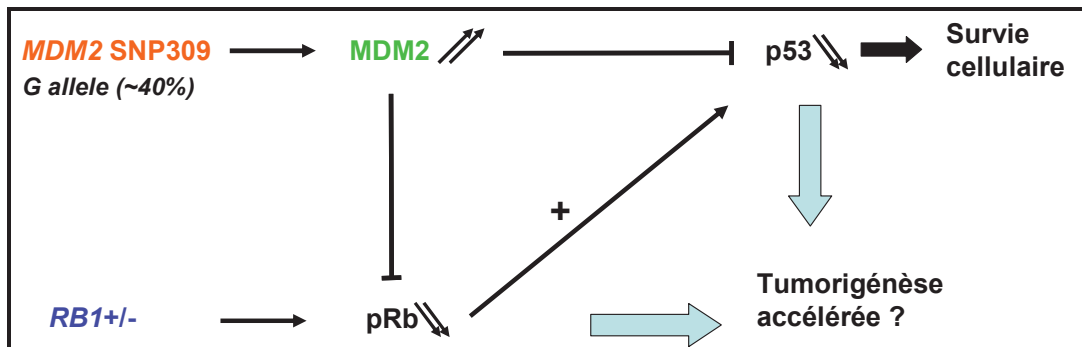
Le SNP309 de par son rôle de facteur de prédisposition au cancer, répond à la définition de facteur génétique modificateur du phénotype puisqu'il est capable de moduler dans le sens d'une aggravation les phénotypes attendus dans des syndromes de prédisposition majeure aux cancers. Il est également intéressant de noter que certains SNP de *MDM4*, également un répresseur de p53 de la même famille que MDM2, ont été suspectés plus récemment de jouer un rôle de modulateur de l'efficacité de la voie de p53 au même titre que MDM2 (Atwal, 2009; Kulkarni, 2009).

Devant ces observations, nous avons émis l'hypothèse que des facteurs modificateurs de la pénétrance et de l'expressivité du rétinoblastome pouvaient être mis en évidence chez les partenaires de la voie de pRb. Puisque *TP53* n'est pas muté dans le rétinoblastome et *a priori* fonctionnel, la perte de *RBI* ne confère pas un avantage de croissance du fait d'une activation théorique de la voie de p53 (cf. partie 1.III.3 et (Nork, 1997)). Des événements qui viendraient donc bloquer ou atténuer l'activité de p53 semblent donc nécessaires pour le développement du rétinoblastome. Les protéines MDM2 et MDM4 sont toutes les deux exprimées dans les cellules de rétinoblastome et parfois les régions géniques correspondantes sont amplifiées (cf. §4.2.2 et (Guo, 2008)). Ces protéines ont donc la capacité d'inhiber les fonctions transactivatrices de p53 et ainsi inhiber les processus apoptotiques induits par la voie de p53 active et donc de conférer un avantage de survie aux cellules du rétinoblastome. Comme précédemment mentionné, l'amplification de *MDM4* a été décrite comme inhibant la voie p53 et facilitant la transformation des cellules rétiniennes à un stade plus précoce de différenciation lorsque les deux allèles de *RBI* ont été perdus.

#### **II.3.a.iv Hypothèses de l'étude**

MDM2 a été impliquée dans la dégradation par le protéasome de p53 mais aussi de pRb (Honda, 1997; Sdek, 2005; Uchida, 2005; Brooks, 2007). En conséquence, les variations des

niveaux d'expression de *MDM2* pourraient également être associées à la variabilité phénotypique du rétinoblastome comme cela a été documenté dans le syndrome de Li-Fraumeni. Ainsi, par similarité, la présence de l'allèle G du SNP309 pourrait être associée à une augmentation de la dégradation de pRb et à une accélération de la tumorigénèse *via* l'inhibition de la voie de p53. (Figure 13).



**Figure 13 : Hypothèse décrivant la participation du SNP309 de MDM2 dans la tumorigénèse du rétinoblastome dans un contexte de prédisposition génétique.**

La diminution de pRb introduite par la mutation d'un allèle RB1 serait majorée par une surexpression constitutionnelle de *MDM2* induite par la présence du SNP309. Parallèlement, cette surexpression conférerait un avantage de survie par une atténuation de la voie de p53.

Nous avons donc souhaité explorer la participation du SNP309 de *MDM2* dans l'expressivité du rétinoblastome. Un SNP de *MDM4* a également été étudié en réponse à de nouvelles données au cours de ce travail (Atwal, 2009; Kulkarni, 2009). Cette approche employant des SNP « candidats » permet de limiter le nombre de tests et d'hypothèses et ainsi d'atteindre une puissance statistique suffisante lors d'études d'association dans de petites cohortes. Afin de tirer avantage de la disponibilité de l'ADN de membres de familles entières nous avons mis en place des analyses d'association familiale. Dans le cadre de rétinoblastomes bilatéraux sporadiques, nous avons considéré de petites familles nucléaires sous la forme de trio (enfant atteint, père et mère par définition non atteints). La méthode d'analyse d'association familiale employée au cours de cette étude est une adaptation du transmission disequilibrium test (TDT) implémenté dans la suite logicielle FBAT (Family

Based Association Test) (Spielman, 1993; Ewens, 2008). Le TDT s'appuie sur l'étude des parents hétérozygotes pour le marqueur génétique associé à la maladie en évaluant la fréquence de transmission des allèles à la descendance atteinte. Il y a alors une association entre un des allèles et la pathologie si cet allèle est transmis aux enfants atteints plus que ne le prévoit le hasard. Cette approche n'utilise donc pas de population témoin et s'affranchit du biais de stratification. Cette méthodologie s'est montrée parfaitement adaptée à notre population d'étude, certes exhaustive, mais néanmoins petite (Castera, 2010).

### **II.3.b. Résumé**

Dans les formes prédisposées de rétinoblastome, la bilatéralisation du rétinoblastome est généralement la règle. Néanmoins, de rares familles présentent une pénétrance réduite et une variabilité phénotypique (Rb bilatéral, unilatéral, rétinome, porteur sain) suggérant l'existence de facteurs modificateurs du phénotype. Ces facteurs modificateurs peuvent être des partenaires des voies de signalisation de p53 et de pRb, toutes deux impliquées dans le développement du rétinoblastome. Ainsi, MDM2, favorisant la dégradation médiée par le protéasome de p53 et de pRb, est un bon candidat. De plus, l'allèle G d'un polymorphisme fonctionnel situé sur le promoteur de *MDM2* en position 309 (SNP309 ; rs2279744) est connu pour augmenter l'expression de *MDM2*. Afin d'évaluer l'impact de *MDM2* sur le développement du rétinoblastome, nous avons étudié le déséquilibre de transmission allélique du SNP309 dans 70 familles de rétinoblastome représentant 212 porteurs d'une mutation constitutionnelle (113 Rb bilatéraux, 40 Rb unilatéraux, 53 porteurs sains, et 6 patients atteints de rétinome). Le génotype du SNP309 a été corrélé au statut tumoral. Les tests d'association basés sur l'analyse de trios (FBAT package) montrent une association significative de l'allèle G du SNP309 de *MDM2* avec les patients bilatéraux et unilatéraux dans un modèle récessif ( $Z = 3.305$ , exact P value = 0.001). Ainsi, cette forte association suggère que, sous l'influence de l'allèle G du SNP309 de *MDM2*, l'exacerbation de la diminution des niveaux de pRb ainsi que l'augmentation de la résistance à l'apoptose liée à la diminution de p53 sont deux événements favorisant l'apparition de la tumeur et désignent *MDM2* comme le premier gène modificateur du risque de rétinoblastome.

### **II.3.c. Tiré à part du troisième travail**

## BRIEF COMMUNICATION

# **MDM2 as a Modifier Gene in Retinoblastoma**

Laurent Castéra, Audrey Sabbagh, Catherine Dehainault, Dorothée Michaux, Audrey Mansuet-Lupo, Blandine Patillon, Estelle Lamar, Isabelle Aerts, Livia Lumbroso-Le Rouic, Jérôme Couturier, Dominique Stoppa-Lyonnet, Marion Gauthier-Villars, Claude Houdayer

Manuscript received March 2, 2010; revised September 21, 2010; accepted September 22, 2010

**Correspondence to:** Claude Houdayer, Pharm D, PhD, Department of Oncogenetics, Institut Curie, 75005 Paris, France (e-mail: claude.houdayer@curie.net).

**Variability in the age of onset and number of tumors is occasionally described among retinoblastoma patients, and possible genetic modifiers might lie in the pRB or p53 pathways, both of which are involved in the development of retinoblastoma. MDM2, which increases p53 and pRB catabolism, is therefore a prominent candidate. The minor allele of MDM2 that includes a 309T>G transversion (single-nucleotide polymorphism rs2279744) in the MDM2 promoter is known to enhance MDM2 expression. Its genetic transmission was studied in 326 individuals including 212 RB1 mutation carriers in 70 retinoblastoma families, and the marker genotype was tested for association with age at diagnosis and disease phenotype. In family-based association analyses, the MDM2 309G allele was found to be statistically significantly associated with incidence of bilateral or unilateral retinoblastoma among members of retinoblastoma families ( $Z = 3.305$ , two-sided exact  $P = .001$ ) under a recessive model (ie, affected patients tend to be homozygous for the G allele); in transmission disequilibrium analyses using the recessive model, the association was also observed (estimated odds ratio = 4.0, 95% confidence interval = 1.3 to 12.0). The strong association of this genotype with retinoblastoma development designates MDM2 as the first modifier gene to be identified among retinoblastoma patients and suggests that enhancement of pRB haploinsufficiency and/or resistance to p53-mediated apoptosis is critical to tumor formation.**

**J Natl Cancer Inst 2010;102:1805–1808**

Retinoblastoma is the most common intra-ocular childhood cancer and occurs when both alleles of the *RB1* gene are inactivated in the retina. In subjects with a genetic predisposition to retinoblastoma, the first *RB1* mutation is found in the germline, and the second appears as a somatic mutation (1–4). Germline carriers usually develop bilateral or multifocal tumors. However, some rare families exhibit low penetrance and variable expressivity of the disease because bilaterally affected, unilaterally affected, and unaffected mutation carriers are known to coexist (5). The existence of genetic modifiers in retinoblastoma therefore appears highly probable and must be considered (6).

Modifiers of retinoblastoma expressivity and penetrance could be components of the

*RB1* protein (pRB) pathway. Because *TP53* is generally not mutated in retinoblastoma, complete loss of *RB1* activates p53-mediated apoptosis and would not confer a growth advantage (7). MDM (Murine Double Minute) family proteins such as MDM2 and MDM4, which are both expressed in retinoblastoma cells (8), are key negative regulators of the p53 pathway: their amplification would be expected to inhibit p53-mediated transactivation activity targeting p53 for proteasomal degradation, thereby bypassing p53-mediated apoptosis and conferring a cell growth advantage when *RB1* expression has been lost. Amplification of *MDM4* (9) has been shown to repress p53-mediated apoptosis and facilitate retinal cell transformation and tumorigenesis associated with inactivation of both

*RB1* allele in the context of retinoblastoma (10). MDM2 (11) has been shown to enhance proteasome-dependent degradation of p53 (12) and also to promote pRB degradation by ubiquitin-dependent or -independent mechanisms (11,13–15). Changes in MDM2 expression levels may therefore be associated with variable phenotypic expression of retinoblastoma as previously demonstrated in patients with Li-Fraumeni syndrome, who have autosomal-dominant germline mutations in *TP53* (16).

A single-nucleotide polymorphism (SNP) located at nucleotide 309 in the *MDM2* promoter, the *MDM2* 309T>G SNP (rs2279744, also referred to as “SNP309”), has been described to enhance transcription of *MDM2* and accumulation of MDM2 protein, resulting in attenuation of the p53 pathway. The *MDM2* SNP309 G allele has been clearly shown to be associated with earlier age of onset of tumors among Li-Fraumeni patients (16,17). Because MDM2 interacts directly with pRB (13), presence of the SNP309 G allele might similarly be associated with enhanced pRB degradation and accelerated tumorigenesis, explaining the variable expression of pRB in retinoblastoma.

We investigated the possible association of *MDM2* SNP309 with retinoblastoma clinical outcome by using software for the family-based allelic association test (FBAT), a generalized version of the original transmission disequilibrium test (TDT) (18–20). We assessed *MDM2* SNP309 genotype in 326 individuals from 70 retinoblastoma families, including 212 carriers of a germline mutation (113 bilaterally affected patients, 40 unilaterally affected patients, 53 unaffected mutation carriers, and six patients with retinoma) and 114 relatives (Supplementary Table S1, available online). The subjects were included from 650 consecutive retinoblastoma patients, who were tested for germline *RB1* mutations at the Institut Curie from September 2000 to April 2008, and their relatives. Individual written consent was obtained from all sampled individuals or their legal guardians. *MDM2* SNP309 genotype was determined by sequencing, and family-based association analyses were conducted as described

**Table 1.** Association of *MDM2* SNP309 and tumor incidence in 70 pedigrees with familial retinoblastoma\*

Marker	Allele	Frequency†	Family‡	S§	$E(S)$	$Var(S)$ ¶	Z#	Asymptotic P**	Exact P††
<b>Additive model</b>									
SNP309	T	0.604	39	53	60	14.36	-1.847	.065	.085
SNP309	G	0.396	39	49	42	14.36	1.847	.065	.085
<b>Recessive model</b>									
SNP309	T	0.604	30	17	17.17	8.84	-0.056	.562	1.0
SNP309	G	0.396	16	15	8.17	4.28	3.305	<.001	.001

\* Values shown are from family-based allelic association test (FBAT) analyses that tested associations of bilateral or unilateral tumor presentation vs no tumor presentation among familial retinoblastoma patients carrier of the segregating *RB1* mutation with either allele of *MDM2* single-nucleotide polymorphism (SNP) 309. Familial retinoblastoma was defined as families with two or more carriers of an *RB1* gene mutation in a family. In the additive model, cumulative effect of both transmitted alleles of SNP309 was tested for association. In the recessive model, effect of homozygous genotype of SNP309 was tested for association. *P* values for the dominant model are the inverse of those of the recessive model. The dominant asymptotic *P* value for SNP309 are .0009 for the T allele and .562 for the G allele.

† Frequency represents the single allele frequency.

‡ Number of informative families for the specific allelic test (ie, families with at least one heterozygous parent).

§ S represents the test statistic of FBAT and expresses the observed number of transmitted alleles to the affected mutation carrier offspring.

||  $E(S)$  is the value expected for S under the null hypothesis of no biased transmission.

¶  $Var(S)$  is the asymptotic variance.

# Z-score (S normalized using  $E(S)$  and  $Var(S)$ ).

\*\* Asymptotic two-sided *P* values as calculated by FBAT, uncorrected for multiple testing.

†† Exact two-sided *P* values as calculated by exact family-based association tests, uncorrected for multiple testing.

(see supplementary information, available online).

FBAT tests revealed a statistically significant association of the *MDM2* SNP309 G allele with the presence of bilateral or unilateral tumors among mutation carriers ( $Z = 3.305$ , exact  $P = .001$ ; Table 1), reflecting a recessive contribution of *MDM2* to tumor susceptibility, as previously suggested (21). Association of the *MDM2*

SNP309 G allele with retinoblastoma development remained statistically significant after Bonferroni correction for multiple testing (the threshold for a 5% significance level would be 0.0125). By contrast, FBAT analysis did not demonstrate any statistically significant association between the presence of SNP309 and a patient's age at diagnosis of retinoblastoma (Supplementary Table S2, available online). However, age

at diagnosis may represent a poor marker of disease severity in familial retinoblastoma due to changing ophthalmologic follow-up in more recent years.

Association of *MDM2* SNP309 with retinoblastoma development was then tested using a subset composed of 52 retinoblastoma families with a high penetrance mutation in *RB1*. This analysis also demonstrated a statistically significant association

**Table 2.** Association of *MDM2* SNP309 and tumor incidence in the subset of 52 pedigrees with familial retinoblastoma and a high penetrance mutation in *RB1*\*

Marker	Allele	Frequency†	Family‡	S§	$E(S)$	$Var(S)$ ¶	Z#	Asymptotic P**	Exact P††
<b>Additive model</b>									
SNP309	T	0.631	29	43	48	10.86	-1.517	.129	.17
SNP309	G	0.369	29	37	32	10.86	1.517	.129	.17
<b>Recessive model</b>									
SNP309	T	0.631	23	14	13.67	7.08	0.125	.90	1.0
SNP309	G	0.369	12	11	5.67	3.03	3.066	.002	.003

\* Values shown are from family-based allelic association test (FBAT) analyses that tested associations of bilateral or unilateral tumor presentation vs no tumor presentation among familial retinoblastoma patients carrier of the segregating *RB1* mutation with either allele of *MDM2* single-nucleotide polymorphism (SNP) 309. Familial retinoblastoma was defined as families with two or more carriers of an *RB1* gene mutation in a family. In the additive model, cumulative effect of both transmitted alleles of SNP309 was tested for association. In the recessive model, effect of homozygous genotype of SNP309 was tested for association. The *RB1* mutation was classified as either a "low penetrance mutation" (18 families) or a "high penetrance mutation" (52 families), depending on the documented effect of the mutation in the literature (see supplementary information on line).

† Frequency represents the single allele frequency.

‡ Number of informative families for the specific allelic test (ie, families with at least one heterozygous parent).

§ S represents the test statistic of FBAT and expresses the observed number of transmitted alleles to the affected mutation carrier offspring.

||  $E(S)$  is the value expected for S under the null hypothesis of no biased transmission.

¶  $Var(S)$  is the asymptotic variance.

# Z-score (S normalized using  $E(S)$  and  $Var(S)$ ).

\*\* Asymptotic two-sided *P* values as calculated by FBAT, uncorrected for multiple testing.

†† Exact two-sided *P* values as calculated by exact family-based association tests, uncorrected for multiple testing.



under a recessive model ( $Z = 3.066$ ,  $P = .003$ ; Table 2) and showed that the variable penetrance of germline *RB1* mutation cannot account for the observed association of the *MDM2* SNP309 G allele with tumor status. The analysis was not performed in low penetrance families due to an insufficient number of informative families. However, when the classical TDT test was performed on the whole set of retinoblastoma patients, a statistically significant association of SNP309 with tumor status was also observed (asymptotic  $P = .007$ ; empirical  $P = .019$ , with an estimated odds ratio = 4.0, 95% confidence interval = 1.3 to 12.0; supplementary information, available online). The TDT test performed in the subset of retinoblastoma patients with a high penetrance mutation in *RB1* also yielded a statistically significant result (asymptotic  $P = .008$ ; empirical  $P = .016$ , with an estimated odds ratio = 4.7, 95% confidence interval = 1.3 to 16.2; supplementary information, available online).

Since we obtained these results, two recent publications have suggested that certain SNPs in the human *MDM4* gene might also modify the efficacy of the p53 pathway (22,23). *MDM4* is considered to be an important component of p53 regulation (24), although its precise role is less clear than that of *MDM2* (there are 120 PubMed references focusing on *MDM4* vs 3599 on *MDM2*). No statistically significant association was found between the presence of the *MDM4* C>T SNP rs1563828 and tumor incidence (Supplementary Table S3, available online). This complementary investigation, therefore, did not support a role for *MDM4* in hereditary predisposition to retinoblastoma in humans. *MDM4* amplification may be restricted to proliferating cells in the tumor, as previously suggested (25).

By contrast, our results do show that the *MDM2* SNP309 G/G genotype could accelerate tumor formation in *RB1*+/- cells. Several mechanisms can be proposed based on the role of pRB on genomic instability and apoptosis. Several lines of evidence indicate that *RB1* inactivation enhances DNA double-strand break accumulation and participates in genetic instability in a dose-dependent manner (26). Specifically, in mouse embryonic stem cells, loss of one *RB1* allele causes an increase in genetic instability (27). A recent publication (28) has

proposed that human retinoblastoma originates in L/M cone precursors of the retina in the context of constitutive overexpression of *MDM2* mediated by activation of its promoter. In an L/M cone precursor that is genetically predisposed to retinoblastoma, overexpression of *MDM2* could enhance *RB1* haploinsufficiency and therefore the acquisition of DNA double-strand breaks and genetic instability. Furthermore, pRB has recently been described as a stress-induced activator of apoptosis (29), prompting those authors to suggest that germline *RB1* carriers might have a higher risk of cellular transformation because apoptosis in response to DNA damage is compromised, thereby enabling the acquisition of other mutations. In the context of genetic predisposition to retinoblastoma, therefore, the *MDM2* SNP309 G/G genotype could exacerbate all of the effects of *RB1* haploinsufficiency (13,14). Consequently, genomic instability could arise, and somatic mutations could accumulate in *RB1*+/- apoptosis-resistant cells, prompting the emergence of clonal *RB1* -/- tumor(s).

One limitation of our study is that the contribution of *MDM2* to disease severity was measured with just three phenotypes, depending on the number of affected eyes (unaffected, unilateral, and bilateral disease). This categorization obviously represents a clinical marker of disease severity but not a marker for the biological aggressiveness of retinoblastoma per se. Such marker should indeed include the number of affected eyes but also other parameters (eg, histopathological data, age at diagnosis, and occurrence of secondary nonretinal tumors). However, histopathological evaluation cannot always be used because (fortunately) not all retinoblastoma patients are enucleated. Moreover, a young child with an early-stage tumor could indeed be categorized as having a true "aggressive tumor" but could also be found to represent early detection of a "nonaggressive tumor" on ophthalmologic follow-up. These limitations may be partially overcome with a prospective study in fully genotyped retinoblastoma families followed by homogeneous protocols.

However, our findings may have therapeutic implications. Nutlin-3 (30) is an inhibitor of the *MDM2* and *MDM4* gene products that has an antitumor activity (31)

that has been shown to be more effective in chronic lymphocytic leukemia cells carrying the *MDM2* SNP309 G allele than in similar cells carrying the T allele (32). The *MDM2* SNP309 genotype should therefore be considered in clinical trials of *MDM2* inhibitors among retinoblastoma patients.

Overall, this study demonstrates a clear association between the presence of the *MDM2* 309G allele and retinoblastoma development in predisposed patients with *RB1* mutations. Therefore, we propose *MDM2* to be the first modifier gene identified to date in retinoblastoma.

## References

1. Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971;68(4):820-823.
2. Comings DE. A general theory of carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1973;70(12):3324-3328.
3. Toguchida J, McGee TL, Paterson JC, et al. Complete genomic sequence of the human retinoblastoma susceptibility gene. *Genomics*. 1993;17(3):535-543.
4. Friend SH, Bernards R, Rogelj S, et al. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature*. 1986;323(6089):643-646.
5. Harbour JW. Molecular basis of low-penetrance retinoblastoma. *Arch Ophthalmol*. 2001;119(11):1699-1704.
6. Taylor M, Dehainault C, Desjardins L, et al. Genotype-phenotype correlations in hereditary familial retinoblastoma. *Hum Mutat*. 2007;28(3):284-293.
7. Nork TM, Poulsen GL, Millecchia LL, Jantz RG, Nickells RW. p53 regulates apoptosis in human retinoblastoma. *Arch Ophthalmol*. 1997;115(2):213-219.
8. Guo Y, Pajovic S, Gallie BL. Expression of p14ARF, MDM2, and MDM4 in human retinoblastoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;375(1):1-5.
9. Shvarts A, Bazuine M, Dekker P, et al. Isolation and identification of the human homolog of a new p53-binding protein, Mdmx. *Genomics*. 1997;43(1):34-42.
10. Laurie NA, Donovan SL, Shih CS, et al. Inactivation of the p53 pathway in retinoblastoma. *Nature*. 2006;444(7115):61-66.
11. Haines DS. The mdm2 proto-oncogene. *Leuk Lymphoma*. 1997;26(3-4):227-238.
12. Honda R, Tanaka H, Yasuda H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett*. 1997;420(1):25-27.
13. Sdek P, Ying H, Chang DL, et al. MDM2 promotes proteasome-dependent ubiquitin-independent degradation of retinoblastoma protein. *Mol Cell*. 2005;20(5):699-708.



14. Uchida C, Miwa S, Kitagawa K, et al. Enhanced Mdm2 activity inhibits pRB function via ubiquitin-dependent degradation. *EMBO J*. 2005;24(1):160–169.
15. Brooks CL, Li M, Gu W. Mechanistic studies of MDM2-mediated ubiquitination in p53 regulation. *J Biol Chem*. 2007;282(31):22804–22815.
16. Bond GL, Hu W, Bond EE, et al. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell*. 2004;119(5):591–602.
17. Bougeard G, Baert-Desurmont S, Tournier I, et al. Impact of the MDM2 SNP309 and p53 Arg72Pro polymorphism on age of tumour onset in Li-Fraumeni syndrome. *J Med Genet*. 2006;43(6):531–533.
18. Laird NM, Horvath S, Xu X. Implementing a unified approach to family-based tests of association. *Genet Epidemiol*. 2000;19(S1):S36–S42.
19. Horvath S, Xu X, Laird NM. The family based association test method: strategies for studying general genotype-phenotype associations. *Eur J Hum Genet*. 2001;9(4):301–306.
20. Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet*. 1993;52(3):506–516.
21. Hu Z, Jin G, Wang L, Chen F, Wang X, Shen H. MDM2 promoter polymorphism SNP309 contributes to tumor susceptibility: evidence from 21 case-control studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007;16(12):2717–2723.
22. Kulkarni DA, Vazquez A, Haffty BG, et al. A polymorphic variant in human MDM4 associates with accelerated age of onset of estrogen receptor negative breast cancer. *Carcinogenesis*. 2009;30(11):1910–1915.
23. Atwal GS, Kirchoff T, Bond EE, et al. Altered tumor formation and evolutionary selection of genetic variants in the human MDM4 oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(25):10236–10241.
24. Toledo F, Wahl GM. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(12):909–923.
25. Dimaras H, Khetan V, Halliday W, et al. Loss of RB1 induces non-proliferative retinoma: increasing genomic instability correlates with progression to retinoblastoma. *Hum Mol Genet*. 2008;17(10):1363–1372.
26. Pickering MT, Kowalik TF. Rb inactivation leads to E2F1-mediated DNA double-strand break accumulation. *Oncogene*. 2006;25(5):746–755.
27. Zheng L, Flesken-Nikitin A, Chen PL, Lee WH. Deficiency of Retinoblastoma gene in mouse embryonic stem cells leads to genetic instability. *Cancer Res*. 2002;62(9):2498–2502.
28. Xu XL, Fang Y, Lee TC, et al. Retinoblastoma has properties of a cone precursor tumor and depends upon cone-specific MDM2 signaling. *Cell*. 2009;137(6):1018–1031.
29. Ianari A, Natale T, Calo E, et al. Proapoptotic function of the retinoblastoma tumor suppressor protein. *Cancer Cell*. 2009;15(3):184–94.
30. Vassilev LT, Vu BT, Graves B, et al. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science*. 2004;303(5659):844–848.
31. Laurie NA, Schin-Shih C, Dyer MA. Targeting MDM2 and MDMX in retinoblastoma. *Curr Cancer Drug Targets*. 2007;7(7):689–695.
32. Seyfried I, Hofbauer S, Stoecher M, Greil R, Tinhofer I. SNP309 as predictor for sensitivity of CLL cells to the MDM2 inhibitor nutlin-3a. *Blood*. 2008;112(5):2168. author reply 2169.

## Funding

“Programme Incitatif et Coopératif sur le Rétinoblastome” (Institut Curie) and RETINOSTOP.

## Notes

No conflicts of interest are declared. The funders did not have any involvement in the design of the study; the collection, analysis, and interpretation of the data; the writing of the manuscript; or the decision to submit the manuscript for publication.

The authors thank François Doz, Laurence Desjardins, Virginie Moncoutier, Carole Tirapo, Catherine Dubois d’Enghien, Anthony Laugé, Isabelle Eugène, Sandrine Miglierina, Catherine Rougeron and Catherine Gilbon for their helpful support during the study. We also thank clinicians from the GGC (Groupe Génétique et Cancer) for referring patients.

**Affiliations of authors:** Department of Oncogenetics, Institut Curie, Paris, France (LC, CD, DM, AM-L, BP, EL, JC, DS-L, MG-V, CH); UMR INSERM 745, Université Paris Descartes, Paris, France (AS); Department of Molecular Genetics, Hôpital Beaujon, Clichy, France (AS); Department of Pediatric Oncology, Institut Curie, Paris, France (IA); Department of Ophthalmology, Institut Curie, Paris, France (L-LR); INSERM U830, Pathologie Moléculaire des Cancers, Institut Curie, Paris, France (DS-L); Université Paris Descartes, Paris, France (DS-L, CH).

### **II.3.d. Données complémentaires**

#### **II.3.d.i Supplementary Information (données publiées)**

##### **Patients and Methods**

###### **Patients**

About 650 consecutive retinoblastoma patients underwent germline molecular analysis of the *RBI* gene at the Institut Curie from September 2000 to April 2008. Diagnosis of Rb was established on the basis of examinations by an ophthalmologist and a pediatrician and by histopathologic criteria when the tumor was available. Patients were offered genetic counselling and, once the germline *RBI* gene mutation had been determined (Houdayer, 2004), molecular testing was extended to relatives (ie, children, siblings, parents, and ancestors). Individual written consent was obtained from all sampled individuals or their legal guardians. Rb families were defined as those with two or more carriers of an *RBI* gene mutation. Among the 650 consecutive retinoblastoma patients, 70 index cases of familial retinoblastoma were identified by genetic counselling and all were included in the study. The 70 retinoblastoma families included 212 carriers of a germline mutation (113 bilaterally affected patients, 40 unilaterally affected patients, 53 unaffected mutation carriers, and 6 patients with retinoma) and 114 relatives who were not carriers of the germline mutation; all were studied for presence of the SNP309 genotype (see Supplementary Table S1).

Because retinoblastoma is disease with a high rate of new mutations, some of the variability in tumor phenotype (ie, age at diagnosis, bilateral or unilateral onset, or indolence among healthy *RBI* mutation carriers) may arise from somatic mosaicism in first-generation carriers (Carlson, 1979; Sippel, 1998), which could cause variable expressivity and penetrance. To address the possibility of mosaicism and eliminate it as an issue, unilaterally affected and unaffected first-generation carriers were excluded from the family-based association studies. Because the etiology of retinoma (a retinal scar) is controversial (benign manifestation or spontaneous involution of Rb(Gallie, 1982)), patients with retinoma were also excluded from the analysis.

## Genotyping

*MDM2* SNP309 status was determined by sequencing using previously published primers (Bond, 2004): 5'-CGGGAGTTCAGGGTAAAGGT-3' and 5'-AGCAAGTCGGTGCTTACCTG-3'. Briefly, amplicons were purified and sequenced using the BigDye Terminator Cycle Sequencing V1.1 Ready Reaction kit (Life Technologies, Foster City, CA), followed by electrophoresis in an ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer and analyzed using the Collection and Sequence Analysis software package (Life Technologies). Genotypes were checked for Mendelian inheritance errors using family-based allelic association tests (FBAT (Laird, 2000; Horvath, 2001; Horvath, 2004). Hardy-Weinberg equilibrium was tested in the parental data by using the  $\chi^2$  goodness-of-fit test and no statistically significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was observed when considering the unrelated founders of the sample ( $P > .05$ ).

## Family-based association analysis

To identify a possible association between *MDM2* SNP309 genotype and clinical outcome, patients were characterized for tumor status and age at diagnosis. Tumor status was analyzed as a binary variable (unaffected vs bilaterally and unilaterally affected mutation carrier patients). Because of substantial skewness of the data, age at diagnosis values were natural log-transformed prior to analysis (skewness: 1.41 before transformation vs 0.30 after transformation). A family-based association test was first performed using the whole set of retinoblastoma family patients. Subsequently, because the allelic heterogeneity of the germline *RBI* mutation may affect both the time and location of retinoblastoma tumor incidence, a similar FBAT analysis was performed on the subset of retinoblastoma family patients (207 individuals from 52 extended families) who carried a high penetrance mutation in *RBI* to control for the potential confounding effect of the variable penetrance of the *RBI* mutation. A similar analysis in the subgroup of 119 patients (from 18 extended families) who carried low penetrance mutations could not be carried out because there were too few informative families available to perform the association test (only four informative families under a recessive model).

Germline *RBI* mutations were classified as either 'low penetrance mutations' (18 extended families) or a 'high penetrance mutation' (52 extended families), depending on the documented effect of the mutation in the literature (Harbour, 2001; Albrecht, 2005; Sanchez-Sanchez, 2007; Taylor, 2007). The following types of mutations were considered to be "low penetrance": all missense mutations, nonsense or frameshift mutations that allowed possible

reinitiation of translation at codon 113, complete deletions of the *RBI* gene, in-frame deletions outside of known functional domains (see accession numbers P06400 in UNIPROT database) of pRb (at the genomic level or on mRNA related to a splice mutation), all splice mutations situated more than 10 base pairs away from the canonical splice sites, the recurrent splice mutation g.45867G > T (IVS06+1 G > T) and promoter mutation.

The FBAT v2.0.2c software package was used to test for an association of *MDM2* SNP309 with retinoblastoma clinical outcome (Laird, 2000; Horvath, 2001; Horvath, 2004). FBAT provides a better control of heterogeneity and stratification in the study population (Ewens, 2008). This method is a generalized version of the original transmission disequilibrium test (TDT) (Spielman, 1993) which incorporates a set of statistical procedures to accommodate variable pedigree constellations, dichotomous or quantitative phenotypes, phenotype-unknown subjects, and various genetic models. It decomposes pedigrees into individual nuclear families and treats them as independent. The pedigree's contribution to the FBAT test statistic is then obtained by adding together the data from all nuclear families within the pedigree.

*P* values were derived from the asymptotic distribution of the FBAT statistic. However, because asymptotic *P* values for small sample sizes are unreliable under the assumption that the FBAT test statistic has a Chi-square distribution, exact *P* values were also computed using the EFBAT tool to ensure that they were valid regardless of the number of informative families or the distribution of the test statistic (Schneiter, 2007).

Some other FBAT parameters need to be explained. The quantitative trait “age at diagnosis” was analyzed using the mean score as offset. Two genetic models were examined, a recessive model, in which a homozygous genotype is tested for association (in which a biallelic single nucleotide polymorphism [SNP] is equivalent to a dominant model for the other allele), and an additive model, in which the cumulative effect of both alleles is tested for association. At least 10 informative families were necessary to perform the analyses. Because the size of genetic effect, in terms of the odds ratio (OR), cannot be estimated with FBAT, a classical transmission disequilibrium (TDT) test was also performed using PLINK software (Purcell, 2007). The PLINK TDT test computes a  $\chi^2$  statistic to assess the presence and statistical significance of transmission biases. An empirical *P* value was estimated from a permutation procedure using 10,000 permutations. The TDT OR was calculated with 95% confidence interval (CI). To address the issue of multiple-testing and to determine the statistical significance of the results, the Bonferroni correction was applied in which the

nominal alpha is adjusted for the number of tests performed. With two phenotypes and two genetic models tested, the threshold for a 5% significance level would be  $.05 \div 4 = .0125$

**Table S1: Familial retinoblastoma patients description according to mutation type**

Mutation Type	Phenotype	No. of patients	Mean (SD) age at diagnosis, months
<b>High penetrance</b>			
	Bilaterally affected	92	9.2 (10.4)
	Unilaterally affected	22	20.8 (19.2)
	Rétinoma	6	NA
	Healthy carriers	9	NA
<b>Low penetrance</b>			
	Bilaterally affected	21	16.6 (13.8)
	Unilaterally affected	18	14.2 (12.2)
	Healthy carriers	44	NA
<b>Total</b>		212	15.2

NA: Not Applicable because retinoma is always a retrospective diagnosis following identification of an index case with Rb and healthy carriers do not develop Rb.

**Table S2: Association of MDM2 SNP309 and age at diagnosis in 70 pedigrees with familial retinoblastoma\***

Marker	Allele	Frequency <sup>†</sup>	Families <sup>‡</sup>	S-E(S) §	Var(S)	Z¶	P #
Additive model							
SNP309	T	0.604	40	-1.70	4.04	-0.845	.398
SNP309	G	0.396	40	1.70	4.04	0.845	.398
Recessive model							
SNP309	T	0.604	31	-2.01	2.59	-1.252	.211
SNP309	G	0.396	16	-0.54	1.06	-0.528	.597

\* Values shown are from family-based allelic association test (FBAT) analyses that tested associations of age at diagnosis among familial retinoblastoma patients with either allele of *MDM2* single nucleotide polymorphism SNP309. Age at diagnosis values were natural log-transformed prior to analysis. Familial retinoblastoma was defined as families with two or more carriers of an *RBI* gene mutation. In the additive model, the cumulative effect of both transmitted alleles of SNP309 was tested for association. In the recessive model, effect of homozygous genotype of SNP309 was tested for association.

<sup>†</sup> Frequency represents the single allele frequency.

<sup>‡</sup> Number of informative families for the specific allelic test (i.e. families with at least one heterozygous parent).

§ S, test statistic for observed number of transmitted alleles to the affected mutation carrier offspring as calculated by FBAT; E(S), expected value of S under the null hypothesis of no biased transmission as calculated by FBAT.

|| Var(S) is the asymptotic variance.

¶ Z-score (S normalized using E(S) and Var(S)).

# Asymptotic two-sided P values as calculated by FBAT, uncorrected for multiple testing.

**Table S3. Association of *MDM4* SNP rs1563828 and tumor incidence in 70 pedigrees with familial retinoblastoma**

Marker	Allele	Frequency <sup>†</sup>	Families <sup>‡</sup>	S-E(S) §	Var(S)	Z¶	P#
Additive model							
rs1563828	C	0.591	34	-0.483	13.35	-0.132	0.895
rs1563828	T	0.409	34	0.483	13.35	0.132	0.895
Recessive model							
rs1563828	C	0.591	27	0.191	7.29	0.071	0.943
rs1563828	T	0.409	17	0.675	4.31	0.325	0.745

\* Values shown are from family-based allelic association test (FBAT) analyses that tested associations of bilateral or unilateral tumor presentation vs no tumor presentation among familial retinoblastoma patients with either allele of *MDM4* single nucleotide polymorphism (SNP) rs1563828. Familial retinoblastoma was defined as families with two or more carriers of an *RBI* gene mutation in a family. In the additive model, cumulative effect of both transmitted alleles of SNP309 was tested for association. In the recessive model, effect of homozygous genotype of SNP309 was tested for association.

<sup>†</sup> Frequency represents the single allele frequency.

<sup>‡</sup> Number of informative families for the specific allelic test (i.e. families with at least one heterozygous parent).

§ S, test statistic for observed number of transmitted alleles to the affected mutation carrier offspring as calculated by FBAT; E(S), expected value of S under the null hypothesis of no biased transmission as calculated by FBAT.

|| Var(S) is the asymptotic variance.

¶ Z-score (S normalized using E(S) and Var(S)).

# Asymptotic two-sided P values as calculated by FBAT, uncorrected for multiple testing.

### II.3.d.ii Données complémentaires (données non publiées)

Puisque l'âge au diagnostic était le paramètre le plus sensible pour mesurer l'effet du SNP309 de *MDM2* sur l'expressivité tumorale chez les patients atteints du syndrome de Li Fraumeni, ce paramètre a été introduit dans notre étude. L'hypothèse formulée est la suivante : puisque nous étudions une population homogène de patients prédisposés, un âge au diagnostic précoce est généralement attendu (avant 1 ans), l'apparition d'un diagnostic plus tardif de rétinoblastome peut être soit liée à un retard au diagnostic (peu probable au cours d'une surveillance d'enfant porteur d'une mutation de *RBI* d'une famille de rétinoblastome mais possible dans le cas de patients atteints d'une forme bilatérale et sans histoire familiale), soit à une expressivité variable du rétinoblastome, qui serait alors le reflet d'une tumorigénèse moins rapide. Dans ce dernier cas la surexpression de *MDM2* induite par la présence de l'allèle G, pourrait induire une tumorigénèse accélérée et un diagnostic plus précoce. L'association entre l'âge au diagnostic et le statut du SNP309 de *MDM2* a donc été étudié dans la cohorte de patients atteints de rétinoblastome familial publiée dans ce troisième article et dans une cohorte complémentaire de 98 patients bilatéraux sporadiques porteurs d'une mutation identifiée chez qui l'ADN des parents était disponible (cf. partie 2.II.).

L'âge au diagnostic a été utilisé comme une variable binaire (au-dessus et en dessous de l'âge moyen au diagnostic des deux cohortes). Les analyses d'association familiale ne montrent pas d'association statistiquement significative entre l'âge au diagnostic et le SNP309 de *MDM2*, ni chez les patients atteints de rétinoblastome familial (Figure S2 des données publiées page 100) ni dans la cohorte des rétinoblastomes bilatéraux sporadiques (Figure npS1 des données non publiées page 103). Cette même étude a également été menée dans l'évaluation du SNP rs1563828 de *MDM4*. Notons ici que la détermination des génotypes de *MDM4* au cours de ces études avait été réalisée par une approche de discrimination allélique en PCR en temps réel par la technologie TaqMan (TaqMan SNP genotyping Assays, Life Technologies, Foster City, CA). Aucune association statistiquement significative n'a été mise en évidence entre le statut du SNP rs1563828 de *MDM4* et l'âge au diagnostic (table npS2 et npS3 page 103 et 104)



**Table npS1. FBAT results for the association of *MDM2* SNP309 and age at diagnosis in 98 complete trios with bilateral sporadic retinoblastoma**

Marker	Allele	Frequency <sup>a</sup>	Families <sup>b</sup>	S-E(S) <sup>c</sup>	Var(S) <sup>d</sup>	Z <sup>e</sup>	P value <sup>f</sup>
<i>(A) Additive model</i>							
SNP309	T	0.684	68	0.04	1.87	0.029	0.976
SNP309	G	0.316	68	-0.04	1.87	-0.029	0.976
<i>(B) Recessive model</i>							
SNP309	T	0.684	60	-0.19	1.37	-0.163	0.871
SNP309	G	0.316	23	-0.23	0.38	-0.375	0.708

Age at diagnosis values were natural log-transformed prior to analysis.

<sup>a</sup> Frequency represents the single allele frequency.

<sup>b</sup> Number of informative families for the specific allelic test (i.e. families with at least one heterozygous parent).

<sup>c</sup> S, test statistic for observed number of transmitted alleles to the affected mutation carrier offspring as calculated by FBAT; E(S), expected value of S under the null hypothesis of no biased transmission as calculated by FBAT.

<sup>d</sup> Var(S) is the asymptotic variance.

<sup>e</sup> Z-score (S normalized using E(S) and Var(S)).

<sup>f</sup> Asymptotic P values as calculated by FBAT, uncorrected for multiple testing.

**Table npS2. FBAT results for the association of *MDM4* SNP rs1563828 and age at diagnosis in 70 pedigrees with familial retinoblastoma**

Marker	Allele	Frequency <sup>a</sup>	Families <sup>b</sup>	S-E(S) <sup>c</sup>	Var(S) <sup>d</sup>	Z <sup>e</sup>	P value <sup>f</sup>
<i>(A) Additive model</i>							
rs1563828	C	0.591	36	2.04	3.11	1.158	0.247
rs1563828	T	0.409	36	-2.04	3.11	-1.158	0.247
<i>(B) Recessive model</i>							
rs1563828	C	0.591	29	1.11	1.72	0.845	0.398
rs1563828	T	0.409	17	-0.91	1.00	-0.907	0.364

Age at diagnosis values were natural log-transformed prior to analysis.

<sup>a</sup> Frequency represents the single allele frequency.

<sup>b</sup> Number of informative families for the specific allelic test (i.e. families with at least one heterozygous parent).

<sup>c</sup> S, test statistic for observed number of transmitted alleles to the affected mutation carrier offspring as calculated by FBAT; E(S), expected value of S under the null hypothesis of no biased transmission as calculated by FBAT.

<sup>d</sup> Var(S) is the asymptotic variance.

<sup>e</sup> Z-score (S normalized using E(S) and Var(S)).

<sup>f</sup> Asymptotic P values as calculated by FBAT, uncorrected for multiple testing.



**Table npS3. FBAT results for the association of *MDM4* SNP rs1563828 and age at diagnosis in 98 complete trios with bilateral sporadic retinoblastoma**

Marker	Allele	Frequency <sup>a</sup>	Families <sup>b</sup>	S-E(S) <sup>c</sup>	Var(S) <sup>d</sup>	Z <sup>e</sup>	P value <sup>f</sup>
<i>(A) Additive model</i>							
rs1563828	C	0.562	72	0.38	2.86	0.226	0.821
rs1563828	T	0.438	72	-0.38	2.86	-0.226	0.821
<i>(B) Recessive model</i>							
rs1563828	C	0.562	56	0.85	1.48	0.701	0.483
rs1563828	T	0.438	41	0.47	1.00	0.470	0.638

Age at diagnosis values were natural log-transformed prior to analysis.

<sup>a</sup> Frequency represents the single allele frequency.

<sup>b</sup> Number of informative families for the specific allelic test (i.e. families with at least one heterozygous parent).

<sup>c</sup> S, test statistic for observed number of transmitted alleles to the affected mutation carrier offspring as calculated by FBAT; E(S), expected value of S under the null hypothesis of no biased transmission as calculated by FBAT.

<sup>d</sup> Var(S) is the asymptotic variance.

<sup>e</sup> Z-score (S normalized using E(S) and Var(S)).

<sup>f</sup> Asymptotic P values as calculated by FBAT, uncorrected for multiple testing.

Ainsi, l'âge au diagnostic ne semble pas être un bon marqueur de gravité dans le rétinoblastome à l'inverse de ce qui est observé dans le syndrome de Li Fraumeni. L'absence d'association entre l'âge au diagnostic et *MDM4* n'est pas surprenante au vu des résultats déjà présentés dans l'article correspondant. Des résultats significatifs avec *MDM2* étaient néanmoins attendus. Il est possible que ce paramètre ne propose pas dans le cadre du rétinoblastome une gamme de valeurs mesurables (nombre de mois) suffisamment large pour mettre en évidence un effet dans le rétinoblastome puisque la majorité des manifestations tumorales apparaissent avant 3 ans. D'autre part, ce paramètre est très probablement biaisé dans les familles. Les modalités de surveillance entre les différentes générations d'une famille sont différentes et des diagnostics plus précoces d'une génération à l'autre peuvent exister sans que cela soient des phénomènes d'anticipation, ni le reflet de tumeurs plus rapidement proliférantes, mais le résultat des améliorations de la surveillance. L'âge au diagnostic peut également être biaisé dans un cadre sporadique en fonction du niveau socio-culturel de l'enfant atteint, puisque le manque d'information est à l'origine d'une méconnaissance et de non détection de signes discrets précurseurs du développement tumoral (strabisme et leucocorie). Ces résultats négatifs mettent en avant la nécessité d'un contrôle strict du phénotype dans les études de corrélations entre le génotype et le phénotype.

Au cours de cette étude, parce que MDM2 est responsable de la dégradation protéolytique de pRb et parce que l'allèle G du SNP309 de *MDM2* augmente l'expression de MDM2, nous avons spéculé que les porteurs de l'allèle G, particulièrement les patients homozygotes, pourraient présenter un niveau d'expression constitutionnel de pRb plus bas que les porteurs de l'allèle T. Un dosage de pRb a donc été mis au point par la technique ELISA afin de corréler le génotype du SNP309 de *MDM2* avec le niveau d'expression protéique de *RBI* mesuré sur du matériel biologique constitutionnel de patients prédisposés atteints d'un rétinoblastome bilatéral. Dans cet objectif, 36 lignées lymphoblastoïdes de patients présentant une mutation de forte pénétrance ont été établies. Ces 36 patients étaient tous porteurs d'une mutation responsable d'un codon stop prématuré en dehors de l'exon 1 de *RBI* afin de doser l'expression résiduelle de protéine sauvage codé par un seul allèle. Les lignées lymphoblastoïdes ont été entretenues dans du RPMI 1640 (10% sérum de veau fœtal complété par un mélange pénicilline-streptomycine) jusqu'à une concentration de  $10^6$  cellules /ml dans 25ml de milieu. Les protéines totales cellulaires ont été extraites après lavage en PBS. Les concentrations en protéines totales ont été déterminées par un kit de dosage BCA (Perbio®). Les concentrations cellulaires de pRb ont été déterminées avec le kit ELISA (RB (Total) Human ELISA Kit, Invitrogen). L'analyse a été réalisée en utilisant le logiciel Magellan (Tecan). Un test de Kruskal-Wallis a été réalisé afin d'étudier les concentrations de pRb normalisées sur les concentrations en protéines totales en fonction du génotype du SNP309 déterminé chez les 36 patients (Table npS4).

**Table npS4: Influence of SNP309 status on intracellular pRb concentration in Rb predisposed patients**

SNP309 Status	pRB/total Protein <sup>a</sup>			P value
	N=	Median	SD	
TT	16	470	151	0.9
TG	15	468	170	
GG	5	425	109	

<sup>a</sup>The pRb concentrations were normalized by the concentration of total protein

A cause de la petite taille de la cohorte étudiée ici à l'origine d'une faible puissance statistique, seule une légère tendance montre une baisse des concentrations de pRb chez les patients homozygotes pour l'allèle G du SNP309. Le plus notable dans cette expérience

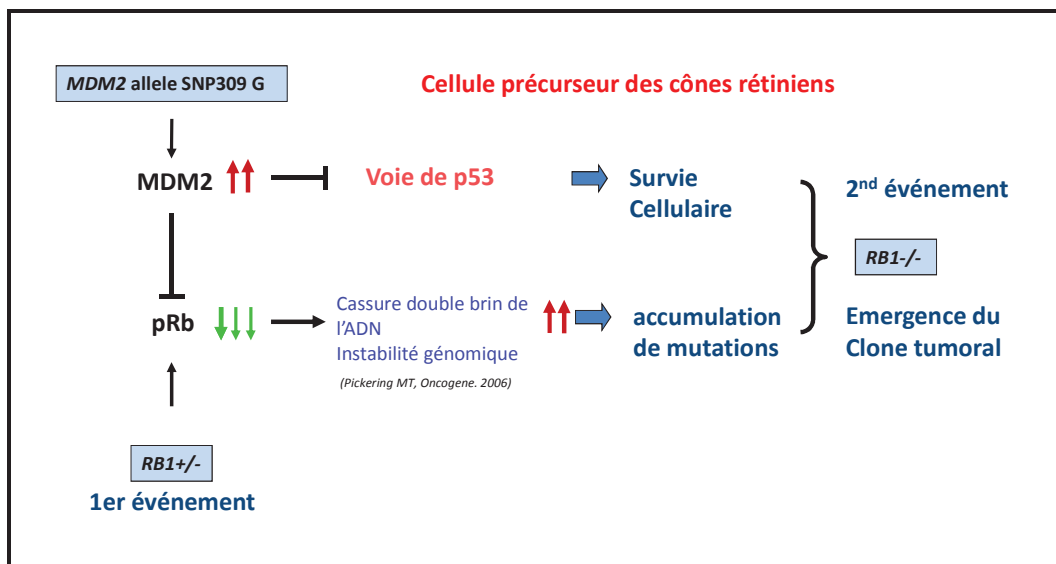
préliminaire est le large éventail des concentrations intracellulaires de pRb qui peuvent possiblement refléter l'existence de nombreux autres facteurs impliqués dans le contrôle de l'expression de pRb.

### II.3.e. Discussion du troisième travail

Ainsi, *MDM2* est le premier gène modificateur décrit dans le rétinoblastome. Les études d'association familiale mises en place à l'occasion de cette étude montrent donc une puissance nécessaire pour tirer profit d'une petite cohorte de patients en évitant les biais de stratification. A titre d'exemple et faisant suite à nos résultats, deux études en « cas témoins » aux résultats contradictoires ont étudié l'association entre le SNP309 et l'apparition d'un rétinoblastome (Epistolato, 2011; de Oliveira Reis, 2012). Ces deux études reposent sur un nombre de patients plus faibles que la nôtre et ne disposent pas d'une cohorte homogène de cas familiaux. Si l'étude publiée en 2011 ne trouve pas d'association avec l'allèle G du SNP309, l'étude la plus récente réplique nos résultats chez les patients porteurs d'une mutation constitutionnelle et montrent également que les porteurs de l'allèle G présentent un taux de survie plus bas que les patients homozygotes pour l'allèle T.

L'association de l'allèle G du SNP309 de *MDM2* avec l'apparition d'un rétinoblastome chez les patients prédisposés, met en avant le rôle essentiel que représente l'inhibition de la voie de p53 dans le développement tumoral. *MDM2* serait alors un des acteurs majeurs. Nous avons proposé au cours de cette étude un modèle de tumorigénèse qui serait accéléré en cas de présence de l'allèle G du SNP309. Ce modèle prend en compte la découverte que les cellules précurseurs du rétinoblastome sont des précurseurs de cônes L/M décrits comme naturellement résistants à l'apoptose induite par l'activation de la voie de p53 grâce à une surexpression constitutive de *MDM2* indépendante de toute amplification génique (Xu, 2009). La surexpression de *MDM2* dans les précurseurs des cônes rétiniens permettrait d'entrer en compétition avec la surexpression de p14ARF induite par la perte de *RBI* qui par l'intermédiaire de l'activation de E2F1 (cf. partie 1.II.3.b) est responsable de l'activation de la voie de p53 (Komori, 2005). Finalement, nous émettons l'hypothèse que dans un contexte de prédisposition, la perte de pRb induirait d'une part une instabilité génomique responsable d'une plus grande mutabilité des cellules, comme cela a déjà été suggéré (Pickering, 2006), d'autre part une diminution de la réponse apoptotique en réponse au stress cellulaire (Ianari, 2009), mais induirait également une activation de la voie de p53 (Laurie, 2006). Une cellule dans un contexte de prédisposition au rétinoblastome serait alors dans un système où le contrôle de la balance entre les éléments pro- et anti-apoptotiques serait essentiel à l'apparition et au maintien de la perte du deuxième allèle de *RBI*. La surexpression de *MDM2*

dans les précurseurs des cônes rétiniens, qui semble également nécessaire à la maturation des cônes rétiniens, conférerait une résistance naturelle à l'apoptose induite par l'activation de la voie p53. Ces cellules sont donc naturellement propices au développement tumoral induit par la perte de *RB1* (figure 14).



**Figure 14 : Modèle proposé de participation de l'allèle G du SNP309 dans le développement d'un rétinoblastome dans un contexte de prédisposition au rétinoblastome (cf. Texte pour détails)**

Cette hypothèse est un élément d'explication au spectre spatio-temporel étroit du développement du rétinoblastome. En effet, les rétinoblastomes ne se développent que précocement dans la jeune enfance et le spectre tumoral chez les patients prédisposés est étonnamment étroit pour une protéine ubiquitaire possédant des rôles clés dans l'homéostasie cellulaire. De manière concordante avec les hypothèses formulées précédemment dans la littérature (Pacal, 2006), le tissu cible pour le développement du rétinoblastome doit pouvoir tolérer, en terme de survie cellulaire, la perte de pRb et le fait que les précurseurs des cônes rétiniens surexpriment MDM2 en font donc des candidats idéaux pour être les cellules à l'origine des rétinoblastomes. La présence de l'allèle G du SNP309 amplifierait alors tout ce modèle à l'origine d'une accumulation de mutations (instabilité génomique) et d'un avantage de survie (inhibition de l'apoptose) dans une cellule immature du développement embryonnaire (précurseurs des cônes rétiniens).

Une limite de ce modèle centrée sur un rôle majeur de MDM2 est peut-être illustrée par l'observation que *MDM2* n'est surexprimé que dans 10 % des rétinoblastomes à l'inverse de *MDM4* qui serait amplifié dans 60% des cas. Néanmoins, il semblerait que les amplifications de *MDM2* et de *MDM4* soient mutuellement exclusives bien que de simples gains des deux gènes puissent coexister dans les tumeurs. D'autre part, la co-expression, même à faible niveau, de MDM2 et MDM4 semble produire quantitativement les mêmes niveaux d'inhibition de la voie de p53 que l'amplification génique isolée de *MDM2* ou *MDM4*. En conséquence, l'absence de surexpression de *MDM2* et de *MDM4* dans une tumeur qui conserve *TP53* non muté ne présage pas de l'absence de participation de ces deux gènes dans l'atténuation de cette voie de signalisation. D'autre part, les niveaux d'expression de MDM2 étant sous le contrôle de l'activité de p53 par une boucle de régulation négative, il apparaît difficile de conclure à l'absence d'inhibition de p53 par MDM2 dans des tumeurs qui ne surexpriment pas *MDM2* (Toledo, 2006). Ainsi, la participation de MDM2 dans l'atténuation de la voie p53, dans un processus tumoral, peut être envisagée en l'absence d'amplification ou de surexpression de *MDM2* comme cela est montré dans les précurseurs des cônes réiniens.

Une autre limite au modèle tient également sur le fait que d'autres études plus récentes remettent partiellement en cause les précurseurs des cônes réiniens comme étant les cellules à l'origine du rétinoblastome. En effet, les profils d'expression pangénomique obtenus à partir de rétinoblastomes humains, montrent des signatures moléculaires correspondant aux bâtonnets plus robustes que celles des cônes mais qui sont également fortes (Justina McEvoy, 2011). Par ailleurs, cette même étude trouve des signatures moléculaires proches de celles des cellules progénitrices réiniennes et des cellules amacrines. Les auteurs de cette étude suggèrent donc que les rétinoblastomes sont des cellules hybrides exprimant des éléments du programme de différenciation de cellules progénitrices, des photorécepteurs et des cellules amacrines. L'origine cellulaire du rétinoblastome est donc toujours débattue. Néanmoins, le rôle des membres de la famille des MDM dans l'inhibition de la voie p53 semble encore ici mis en évidence, avec cette fois, une plus large participation de MDM4. Encore une fois, dans les rétinoblastomes, la dualité entre pRb et p53 est mise en avant, et l'inhibition de la voie de p53 par un mécanisme non mutationnel qui pourrait emprunter plusieurs voies cellulaires alternatives (MDM2, MDM4 ou autres partenaires à découvrir) apparaît comme un événement indispensable au développement tumoral.

Il est donc probable que tout modulateur de l'efficacité de la voie de p53 soit un bon candidat pouvant expliquer la variabilité phénotypique observée dans le rétinoblastome. Par exemple, il est montré que malgré une surexpression génique de *PI4ARF*, l'expression protéique de ARF n'est pas corrélée et est mesurée dans des niveaux bas dans les rétinoblastomes (Guo, 2008). Un autre mécanisme basé alors sur une régulation post-traductionnelle de ARF est envisageable. Non seulement une surexpression de MDM2 pourrait maintenir la voie p53 inactivée mais une diminution des niveaux de ARF (inhibiteur de MDM2) pourrait y contribuer. L'intervention de petits ARN inhibiteurs de la traduction protéique (miRNA) a été recherchée. L'un d'entre eux, le miR-24 est décrit comme prépondérant dans les rétines fœtales et responsables du maintien d'un niveau bas de ARF dans les rétinoblastomes humains, laissant suggérer aux auteurs que le développement d'un rétinoblastome dans un précurseur rétinien est en partie lié à une surexpression de MDM2 mais également à une inhibition de son répresseur ARF par l'action du miR-24 (To, 2012). Les mécanismes qui régulent l'expression des miRNA pourraient donc également être de bons candidats responsables de la modulation de la pénétrance et l'expressivité du rétinoblastome. A titre d'exemple, le miR-335 a été montré comme interagissant directement sur *RBI* après activation de la voie p53 induisant alors une boucle de rétrocontrôle (Scarola, 2010). Des données récentes de la littérature montrent que l'inhibition de *Dicer1* inhibe le développement de rétinoblastome chez la souris, cet effet est médié par *miR-17-92* et toléré par les cellules pro-génitrices rétiniennes. Les miR17 et miR20a sont également responsables d'une inhibition de la croissance de lignée de rétinoblastomes humains en partenariat avec la voie p53 (Nittner, 2012). Prises ensemble ces données suggèrent que les miRNA sont des cibles thérapeutiques potentielles dans le rétinoblastome et de probables modificateurs dans l'apparition du rétinoblastome. Au final, *MDM2*, dont l'allèle G du SNP309 est associé à l'apparition d'un rétinoblastome chez les individus prédisposés, pourrait être le premier d'une série de facteurs modificateurs du rétinoblastome liés à la voie p53 et dont les effets pourraient être évalués par le modèle d'étude présenté au cours de cette thèse.

L'identification de facteurs modificateurs pourrait en outre affiner les risques de cancer chez les patients prédisposés et mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques. C'est le cas du SNP309 de *MDM2*, même si la détermination du génotype du SNP309 de *MDM2* ne paraît pas avoir d'impact sur le conseil génétique, des thérapeutiques basées sur l'inhibition spécifique des membres de la famille des MDM sont en cours de développement

(Laurie, 2007). L'efficacité des petites molécules inhibitrices de MDM2, telle que la Nutlin-3, semblent plus importante chez des porteurs de l'allèle G du SNP309 (Seyfried, 2008) et l'établissement du génotype pourrait être alors un biomarqueur théranostique prédictif du traitement mais également du pronostic (Liu, 2009). Des tests précliniques semblent montrer une bonne efficacité de la molécule administrée localement (Brennan, 2011).

En conclusion de cette partie, la découverte de *MDM2* comme le premier gène modificateur du rétinoblastome ouvre un champ d'exploration vaste de facteurs constitutionnels qui permettrait d'affiner le conseil génétique des prédispositions, l'évaluation du pronostic et éventuellement de la réponse au traitement.



### **PARTIE 3. DISCUSSION GENERALE et PERSPECTIVES**

Aujourd'hui, l'extraordinaire bond technologique que représente le séquençage de seconde génération bouleverse le paysage de la génétique humaine. Ce séquençage de masse pourrait révolutionner le diagnostic prénatal. En effet, il semble actuellement possible de séquencer l'ensemble des exons d'un génome fœtal (exome fœtal) isolé des cellules nucléées du sang périphérique d'une femme enceinte à partir des cellules fœtales circulantes (Fan, 2012). Les risques liés au prélèvement de villosités choriales ou d'amniocytes seraient alors complètement réduits à zéro. Il n'existe donc plus vraiment de limites techniques au diagnostic prénatal des pathologies induites par des néo-mutations germinales et peut-être des néomutations post-zygotiques. Les questions éthiques qui découlent de ces capacités technologiques ne seront pas discutées ici, mais les risques de dérives et d'instrumentalisation de ces techniques à d'autres fins que médicales existent et doivent être considérées.

Ce séquençage à très haut débit avec une profondeur de lecture élevée pourrait également repousser les limites de détection des mutations en mosaïque et donc offrir la possibilité théorique de redéfinir les risques individuels et des apparentés de patients atteints de rétinoblastome (cf. partie 2.II.1.d). Plus généralement, la présence de mosaïques soulève la complexité qu'induit l'existence de néomutations en génétique humaine (Veltman, 2012). Comme discuté précédemment, la présence en mosaïque de mutations causales de maladies génétiques, semble tout à fait sous-estimée ((Jacobs, 2012; Laurie, 2012) et cf. partie 2.II.1.d). Il est probable que l'apparition d'un cancer soit en partie liée à la présence d'une mutation en mosaïque dans le tissu cible et que la précocité de développement de la pathologie soit liée à l'étendue de la mosaïque. Par analogie avec le rétinoblastome où la seule bilatéralité de l'atteinte fait envisager d'emblée un contexte de prédisposition, une prédisposition aux cancers peut être envisagée devant toute forme de cancer chez le sujet jeune. En effet, la présence d'une néomutation chez le sujet atteint est toujours envisageable. De plus, si cette mutation est post-zygotique et donc en mosaïque, elle peut être restreinte à un nombre de tissus limités, qui incluent *de facto* le tissu cible, sans être suffisamment étendue pour être détectable dans les cellules nucléées périphériques par des moyens techniques conventionnels.

A cette hypothèse se rajoute la possibilité d'une hétérogénéité génique, actuellement bien connue par exemple dans l'étiologie des prédispositions génétiques aux cancers du sein et de l'ovaire (Akbari, 2010). Il existe actuellement des efforts importants pour caractériser d'autres gènes de prédispositions au cancer dont l'imputabilité de leurs mutations, souvent privées, est peu fréquente (Walsh, 2010). Ces deux notions d'hétérogénéité génique et de néo-mutations pourraient expliquer des présentations de cancers évocatrices d'une prédisposition génétique (âge précoce au diagnostic, multifocalité) alors qu'aucune histoire familiale n'est reportée et qu'aucune mutation dans les gènes classiquement étudiés n'a été identifiée (par exemple *BRCA1* et *BRCA2* dans le cancer du sein et de l'ovaire, les gènes du complexe Mismatch Repair dans le syndrome de Lynch, *TP53* et syndrome de Li Fraumeni). Il s'agirait alors de rechercher des néomutations possiblement en mosaïque dans une série de gènes candidats pour la pathologie voire dans l'ensemble des exons d'un génome (exome) par séquençage massivement parallèle (Ng, 2010). Les études de trio de parents indemnes et d'enfants atteints semblent être pertinentes pour découvrir les mutations dans les gènes responsables. Grâce au séquençage très haut débit, les variations mises en évidence chez l'individu atteint mais pas chez ses parents, sont d'excellents candidats qu'il faut filtrer pour leur causalité et leur pertinence dans le syndrome exploré. Cette approche a déjà montré quelques succès comme par exemple l'identification de mutations responsables d'anomalie de développement notamment dans le syndrome de Baraitser-Winter (Riviere, 2012) et semble prometteuse dans l'exploration de certaines formes de cancers.

Plus proche du rétinoblastome, le séquençage d'exomes pourrait répondre à l'exploration des relations entre le génotype et le phénotype. En effet, la recherche de facteurs modificateurs influençant l'impact d'une mutation de faible pénétrance pourrait tirer profit de cette approche. Dans le cadre de l'exploration des faibles pénétrances et des variabilités d'expressivité induites par la mutation récurrente R661W de *RBI* (cf. partie 1.II.4.d.iv), l'analyse de dix arbres familiaux ou ségrègent cette mutation montrait une structure de ségrégation du trait génétique compatible avec un facteur génétique modificateur du phénotype qui, s'il est commun entre les familles, pourrait être identifiable par une étude de liaison génétique. Nous avons donc initié une étude de ces familles par une approche d'étude de liaison génétique (Puce SNP) dont les données sont en cours d'analyse. Il est envisageable que des données d'exomes dans ces familles apporteraient une puissance supplémentaire afin d'identifier les régions qui ségrègent avec un phénotype atténué ou un phénotype sévère, et, de manière simultanée, de déterminer l'événement lié (Rabbani, 2012).

D'autres approches permettraient d'avancer dans la découverte des facteurs modificateurs des mutations de faible pénétrance qui seraient liés au contrôle de la transcription et/ou de l'épissage (partie 1.II.4.2.iii.). Deux hypothèses sont possibles, soit il existe une compensation de la perte d'un allèle de *RBI* par une surexpression de l'allèle sauvage, (mécanisme en trans) soit il existe des facteurs modulant l'activité du « spliceosome » et l'allèle muté serait encore capable de coder pour du transcrit sauvage (mécanisme en cis). Une expression allélique différentielle est difficile à prouver dans le cadre de *RBI* puisque ce gène ne possède pas de polymorphisme exonique fréquent rendant les études d'expression allèle spécifique difficiles à mettre en œuvre. En guise de données préliminaires, nous avons tenté de généraliser le concept, sans *a priori* du mécanisme sous-jacent, en mettant en place des dosages d'expression de *RBI* total, dans les familles à faible pénétrance afin de tenter une corrélation entre le nombre d'yeux atteints et l'expression de *RBI*. Des données ont été obtenues à partir de 14 lignées de donneurs sains (témoins), 12 lignées de patients porteurs d'une mutation de forte pénétrance à l'origine d'un codon stop prématuré (témoin muté) et de 29 lignées de patients de familles où ségrège une mutation de faible pénétrance, quelle que soit la nature. Ces premiers résultats montrent que le dosage détecte la perte d'un allèle de *RBI* chez les témoins. Le dosage discrimine aussi les mutations de faible pénétrance qui, théoriquement, répriment l'expression de l'allèle muté (mutation non-sens activant le NMD, mutation du promoteur, mutation d'épissage à l'origine d'un codon stop prématuré) des mutations qui conservent l'expression de l'allèle muté (faux sens, mutation conservant le cadre de lecture, non-sens dans l'exon 1) (figure 15 page 115).

Ces résultats préliminaires ouvrent déjà le champ à de nouvelles hypothèses. Ils montrent également, de manière surprenante, que les patients porteurs d'une mutation de faible pénétrance qui n'active pas le NMD présentent un niveau significativement plus bas que les témoins sauvages. Ces résultats suggèrent que la substitution nucléotidique responsable de la mutation est capable de déstabiliser le messager muté. Une des explications possibles serait l'activation par la mutation de sites d'hybridation de miRNA. Les détails des dosages dans les familles ne permettent pas de conclure sur un mécanisme, ou de valider voire d'invalider une hypothèse, l'échantillonnage étant trop faible et les mutations testées de nature probablement trop diverses. Néanmoins, ces premiers résultats offrent également de nouveaux champs d'exploration (figure 16 page 115).

Si une corrélation entre les niveaux d'expression de *RBI* et le phénotype reste probable dans le groupe des mutations réprimant l'expression de l'allèle muté, dans l'autre groupe, d'autres mécanismes doivent être envisagés. Aussi, il est inattendu de trouver des niveaux d'expression de *RBI* chez des porteurs sains comparables à ceux obtenus chez les contrôles mutés. Cette situation est probablement le résultat d'une variabilité physiologique de l'expression de *RBI* laissant spéculer que ces patients sont des représentants des valeurs extrêmes d'une répartition gaussienne des niveaux d'expression de *RBI* en constitutionnel. Il est aussi possible que ces valeurs plus basses soient le reflet d'une expression préférentielle de *RBI* par l'allèle maternel en lien avec un effet d'empreinte, en accord avec ce qui a déjà été suggéré (cf. partie I. II. 4. e et (Kanber, 2009)), puisque ces valeurs extrêmes sont associées à une transmission maternelle de la mutation dans notre série.

Ces valeurs basses ou très variables de l'expression chez des porteurs sains pourraient également alimenter l'hypothèse que l'origine des fortes pénétrances, cette fois ci, est liée à un effet dominant négatif d'une protéine « tronquée » résiduelle qui ne serait pas présente en cas de pénétrance réduite. Néanmoins, les premiers essais de Western Blot réalisés afin de détecter une protéine « tronquée », chez des patients porteurs d'une mutation de forte pénétrance, ne montrent pas de forme plus courte de pRb. Ces données préliminaires, illustrent donc bien la complexité et/ou la multiplicité des mécanismes qui soutiennent les pénétrances réduites ainsi que les variabilités d'expression tumorale. En perspective, de ces données, des expériences basées sur des techniques pangénomiques à haut débit (essais de SNP pangénomiques ou maintenant des essais de séquençage très haut débit) peuvent être envisagées sur des cohortes petites et permettraient de focaliser sur des mutations de natures homogènes (par exemple l'IVS6+1G>T) afin de mettre en évidence des éléments cis régulateurs (Lefebvre, 2012).

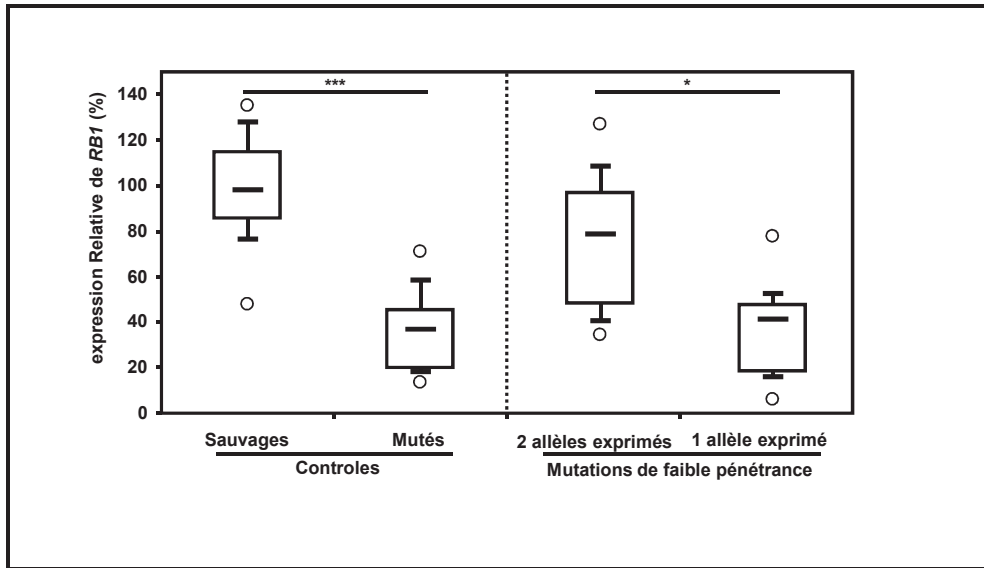


Figure 15 : Niveau d'expression de *RB1* chez les témoins et chez les patients porteurs d'une mutation de faible pénétrance. (cf. texte pour détail)

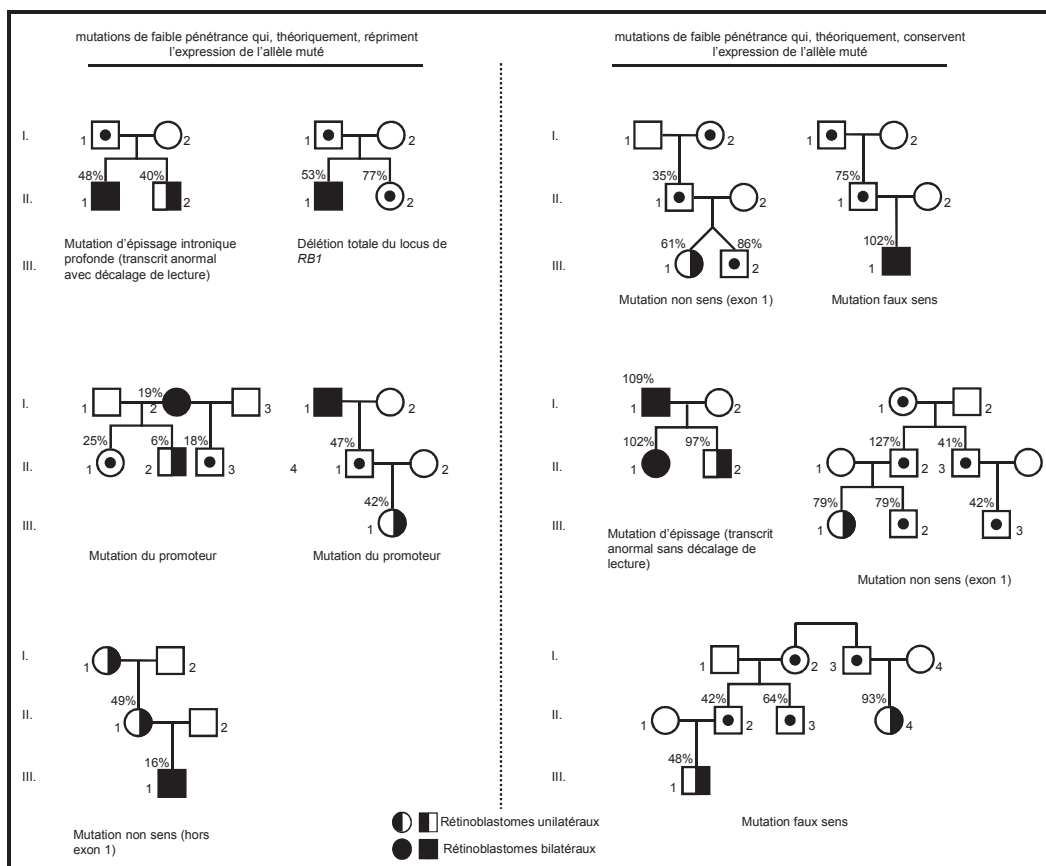


Figure 16 : Dosage de l'expression de *RB1* chez les familles à faible pénétrance. Le pourcentage de l'expression de *RB1* par rapport aux témoins normaux est noté au-dessus de chaque patient testé.

A la multitude de facteurs qui peuvent potentiellement influencer l'impact d'une mutation de faible pénétrance se rajoute la modulation possible des voies de signalisation. En effet, nous avons décrit le gène *MDM2* comme le premier gène modificateur du rétinoblastome. La fonctionnalité de l'allèle G du SNP309 de *MDM2* illustre parfaitement le fait que la modulation de la voie de p53 liée à la voie de pRb entre en jeu dans la détermination de l'expressivité du rétinoblastome. Comme discuté précédemment d'autres éléments partenaires de ces voies de la tumorigénèse sont également de bons candidats. *TP53*, lui-même, était également un excellent candidat au travers du polymorphisme Arg72Pro intensément étudié et impliqué dans un sur-risque à de très nombreux cancers et notamment suspecté dans le rétinoblastome (Epistolato, 2011; Francisco, 2011). D'autres mécanismes qui seraient épigénétiques semblent aussi jouer un rôle majeur dans le processus de transformation tumorale et des facteurs modificateurs pourraient être recherchés à partir des mécanismes découverts dans les tumeurs. Des données récentes de séquençage de masse ont mis en évidence l'existence de mécanismes épigénétiques qui seraient partagés par une grande majorité des rétinoblastomes. Le séquençage du génome entier de quatre rétinoblastomes montre que ces quatre tumeurs sont étonnement stables (Zhang, 2012). Les auteurs montrent que les seuls mécanismes mutationnels impliquant des gènes suppresseurs de tumeurs concernent uniquement *RBI* et *MYCN*. Il ne retrouve de mutations récurrentes que dans un seul gène, le BCL-6 co-repressor, *BCOR*, dans 13% des tumeurs. Des essais intégrés d'immunoprécipitation de la chromatine, de méthylation de l'ADN et d'expression génétique trouvent 104 gènes montrant une dérégulation par un mécanisme épigénétique. Parmi eux, les auteurs identifient *SYK*, seule kinase des 104 gènes identifiés, comme étant une cible thérapeutique majeure. Sur 82 tumeurs testées, toutes montraient une forte expression de *SYK*. De plus, l'inhibition de *SYK* par shRNA ou par de petites molécules inhibitrices déjà existantes, montrent une inhibition forte de la prolifération des rétinoblastomes. Il s'agit donc d'une découverte majeure qui ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques dans le rétinoblastome. Néanmoins, le nombre de tumeurs séquencées était faible et les auteurs ne discutent pas les récurrences des mutations sur *BCOR*. *BCOR* est également impliqué dans le remodelage chromatinien et est donc à l'origine de mécanismes épigénétiques qui seraient alors ici modulés par un mécanisme mutationnel « conventionnel ». Il semble donc que *BCOR* soit un partenaire à ne pas négliger (Murphree, 2012). *SYK* semble donc être un élément clé de la tumorigénèse du rétinoblastome, mais il est très probablement que d'autres partenaires clés existent, à l'image de *BCOR* qui a été décrit récemment comme muté de manière

récurrente dans les médulloblastomes (Pugh, 2012) et à l'origine de transcrits de fusion dans les sarcomes osseux (Pierron, 2012).

Il convient donc de ne pas généraliser les résultats de ces premiers génomes séquencés de rétinoblastome à l'ensemble des tumeurs. Pour illustration, il est connu que les tumeurs dont l'exérèse a été tardive sont très remaniées alors que les tumeurs énuclées précocément ne le sont pas, suggérant clairement l'existence d'histoires tumorales différentes impliquant probablement des voies alternatives (cf. partie 1.II.2). Le modèle décrit par Zhang et al. pourrait alors ne représenter qu'une seule de ces voies (la plus rapide ?). Il est donc probable que de nouveaux processus seront mis en évidence par le séquençage de génomes entiers d'autres tumeurs.

Quoiqu'il en soit, cette mise en avant de mécanismes épigénétiques dans le rétinoblastome, ouvrent une nouvelle porte à d'autres modulateurs potentiels de la pénétrance et de l'expressivité du rétinoblastome. En effet, il semble que le développement du rétinoblastome soit intimement lié aux processus régulant les signaux cellulaires de survie et d'apoptose spécifiques de la cellule à l'origine de rétinoblastome au cours du développement rétinien. Des données récentes suggèrent que l'expression de gènes clés de la différenciation tissulaire des cônes et des bâtonnets sont dépendants des profils de méthylation spécifiques et que le développement de la rétine des mammifères est lié à des processus de méthylation/déméthylation différentiels (Merbs, 2012). Ainsi des processus épigénétiques participeraient également à la définition de la cellule à l'origine du rétinoblastome, dont l'« environnement apoptotique » toléreraient la perte de *RBI* responsable de l'initiation des processus tumoraux. Le maintien de la tumeur serait alors dépendant de partenaires contrôlant la voie de p53 et de partenaires contrôlant des processus épigénétiques médiés éventuellement par des événements mutationnels.

En conclusion, les pénétrances variables et les modulations de l'expressivité du rétinoblastome trouvent leur origine dans de nombreux mécanismes faisant appel à des aspects variés de la génétique humaine. Les néomutations, les caractères héréditaires et les processus somatiques sont autant de variables dans l'équation qui définit le phénotype tumoral et qui pourraient, dans l'hypothèse où ceux-ci seraient tous connus, définir les risques de rétinoblastome, les cibles thérapeutiques idéales, un pronostic certain et une réponse au traitement.

## BIBLIOGRAPHIE

Abramson, D. H., M. E. Mendelsohn, C. A. Servodidio, T. Tretter, et al. (1998). "Familial retinoblastoma: where and when?" Acta Ophthalmol Scand **76**(3): 334-338.

Aerts, I., P. Leuraud, J. Blais, A. L. Pouliquen, et al. (2010). "In vivo efficacy of photodynamic therapy in three new xenograft models of human retinoblastoma." Photodiagnosis Photodyn Ther **7**(4): 275-283.

Aerts, I., L. Lumbroso-Le Rouic, M. Gauthier-Villars, H. Brisse, et al. (2006). "Retinoblastoma." Orphanet J Rare Dis **1**: 31.

Akbari, M. R., P. Tonin, W. D. Foulkes, P. Ghadirian, et al. (2010). "RAD51C germline mutations in breast and ovarian cancer patients." Breast Cancer Res **12**(4): 404.

Albrecht, P., B. Ansperger-Rescher, A. Schuler, M. Zeschmigg, et al. (2005). "Spectrum of gross deletions and insertions in the RB1 gene in patients with retinoblastoma and association with phenotypic expression." Hum Mutat **26**(5): 437-445.

Alonso, J., P. Garcia-Miguel, J. Abelairas, M. Mendiola, et al. (2001). "Spectrum of germline RB1 gene mutations in Spanish retinoblastoma patients: Phenotypic and molecular epidemiological implications." Hum Mutat **17**(5): 412-422.

Antoniou, A. C., A. B. Spurdle, O. M. Sinilnikova, S. Healey, et al. (2008). "Common breast cancer-predisposition alleles are associated with breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers." Am J Hum Genet **82**(4): 937-948.

Atwal, G. S., T. Kirchhoff, E. E. Bond, M. Montagna, et al. (2009). "Altered tumor formation and evolutionary selection of genetic variants in the human MDM4 oncogene." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(25): 10236-10241.

Atwal, G. S., R. Rabadan, G. Lozano, L. C. Strong, et al. (2008). "An information-theoretic analysis of genetics, gender and age in cancer patients." PLoS One **3**(4): e1951.

Bader, J. L., R. W. Miller, A. T. Meadows, L. E. Zimmerman, et al. (1980). "Trilateral retinoblastoma." Lancet **2**(8194): 582-583.

Barbosa, R. H., F. R. Vargas, F. C. Aguiar, S. Ferman, et al. (2008). "Hereditary retinoblastoma transmitted by maternal germline mosaicism." Pediatr Blood Cancer **51**(5): 598-602.



- Bardoni, B., R. Willemsen, I. J. Weiler, A. Schenck, et al. (2003). "NUFIP1 (nuclear FMRP interacting protein 1) is a nucleocytoplasmic shuttling protein associated with active synaptoneuroosomes." Exp Cell Res **289**(1): 95-107.
- Baud, O., V. Cormier-Daire, S. Lyonnet, L. Desjardins, et al. (1999). "Dysmorphic phenotype and neurological impairment in 22 retinoblastoma patients with constitutional cytogenetic 13q deletion." Clin Genet **55**(6): 478-482.
- Bond, G. L., W. Hu, E. E. Bond, H. Robins, et al. (2004). "A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans." Cell **119**(5): 591-602.
- Bond, G. L., W. Hu and A. Levine (2005). "A single nucleotide polymorphism in the MDM2 gene: from a molecular and cellular explanation to clinical effect." Cancer Res **65**(13): 5481-5484.
- Bond, G. L. and A. J. Levine (2007). "A single nucleotide polymorphism in the p53 pathway interacts with gender, environmental stresses and tumor genetics to influence cancer in humans." Oncogene **26**(9): 1317-1323.
- Bougeard, G., S. Baert-Desurmont, I. Tournier, S. Vasseur, et al. (2006). "Impact of the MDM2 SNP309 and p53 Arg72Pro polymorphism on age of tumour onset in Li-Fraumeni syndrome." J Med Genet **43**(6): 531-533.
- Brennan, R. C., S. Federico, C. Bradley, J. Zhang, et al. (2011). "Targeting the p53 pathway in retinoblastoma with subconjunctival Nutlin-3a." Cancer Res **71**(12): 4205-4213.
- Brooks, C. L., M. Li and W. Gu (2007). "Mechanistic studies of MDM2-mediated ubiquitination in p53 regulation." J Biol Chem **282**(31): 22804-22815.
- Brown, S., J. Russo, D. Chitayat and D. Warburton (1995). "The 13q- syndrome: the molecular definition of a critical deletion region in band 13q32." Am J Hum Genet **57**(4): 859-866.
- Bunin, G. R., B. S. Emanuel, A. T. Meadows, J. D. Buckley, et al. (1989). "Frequency of 13q abnormalities among 203 patients with retinoblastoma." J Natl Cancer Inst **81**(5): 370-374.
- Calzone, L., A. Gelay, A. Zinovyev, F. Radvanyi, et al. (2008). "A comprehensive modular map of molecular interactions in RB/E2F pathway." Mol Syst Biol **4**: 173.
- Cargill, M., D. Altshuler, J. Ireland, P. Sklar, et al. (1999). "Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes." Nat Genet **22**(3): 231-238.
- Carlson, E. A. and R. J. Desnick (1979). "Mutational mosaicism and genetic counseling in retinoblastoma." Am J Med Genet **4**(4): 365-381.
- Cartegni, L., S. L. Chew and A. R. Krainer (2002). "Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing." Nat Rev Genet **3**(4): 285-298.

- Caselli, R., C. Speciale, C. Pescucci, V. Uliana, et al. (2007). "Retinoblastoma and mental retardation microdeletion syndrome: clinical characterization and molecular dissection using array CGH." J Hum Genet **52**(6): 535-542.
- Castera, L., C. Dehainault, D. Michaux, L. Lumbroso-Le Rouic, et al. (2012). "Fine mapping of whole RB1 gene deletions in retinoblastoma patients confirms PCDH8 as a candidate gene for psychomotor delay " Eur J Hum Genet: accepté pour publication le 17th Jul 2012.
- Castera, L., M. Gauthier-Villars, C. Dehainault, D. Michaux, et al. (2011). "Mosaicism in clinical practice exemplified by prenatal diagnosis in retinoblastoma." Prenat Diagn **31**(11): 1106-1108.
- Castera, L., A. Sabbagh, C. Dehainault, D. Michaux, et al. (2010). "MDM2 as a modifier gene in retinoblastoma." J Natl Cancer Inst **102**(23): 1805-1808.
- Chen, H. Z., S. Y. Tsai and G. Leone (2009). "Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control." Nat Rev Cancer **9**(11): 785-797.
- Classon, M. and E. Harlow (2002). "The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer." Nat Rev Cancer **2**(12): 910-917.
- Comings, D. E. (1973). "A general theory of carcinogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **70**(12): 3324-3328.
- Corson, T. W. and B. L. Gallie (2007). "One hit, two hits, three hits, more? Genomic changes in the development of retinoblastoma." Genes Chromosomes Cancer **46**(7): 617-634.
- Cowell, J. K., B. Bia and A. Akoulitchev (1996). "A novel mutation in the promotor region in a family with a mild form of retinoblastoma indicates the location of a new regulatory domain for the RB1 gene." Oncogene **12**(2): 431-436.
- De La Rosa-Velazquez, I. A., H. Rincon-Arano, L. Benitez-Bribiesca and F. Recillas-Targa (2007). "Epigenetic regulation of the human retinoblastoma tumor suppressor gene promoter by CTCF." Cancer Res **67**(6): 2577-2585.
- de Oliveira Reis, A. H., I. N. de Carvalho, P. B. de Sousa Damasceno, S. E. Ferman, et al. (2012). "Influence of MDM2 and MDM4 on development and survival in hereditary retinoblastoma." Pediatr Blood Cancer **59**(1): 39-43.
- De, S. (2011). "Somatic mosaicism in healthy human tissues." Trends Genet **27**(6): 217-223.
- Dehainault, C., A. Lauge, V. Caux-Moncoutier, S. Pages-Berhouet, et al. (2004). "Multiplex PCR/liquid chromatography assay for detection of gene rearrangements: application to RB1 gene." Nucleic Acids Res **32**(18): e139.
- Dehainault, C., D. Michaux, S. Pages-Berhouet, V. Caux-Moncoutier, et al. (2007). "A deep intronic mutation in the RB1 gene leads to intronic sequence exonisation." Eur J Hum Genet **15**(4): 473-477.

- Dimaras, H., V. Khetan, W. Halliday, M. Orlic, et al. (2008). "Loss of RB1 induces non-proliferative retinoma: increasing genomic instability correlates with progression to retinoblastoma." Hum Mol Genet **17**(10): 1363-1372.
- Dimaras, H., K. Kimani, E. A. Dimba, P. Grons Dahl, et al. (2012). "Retinoblastoma." Lancet **379**(9824): 1436-1446.
- Doz, F. (2006). "[Retinoblastoma: a review]." Arch Pediatr **13**(10): 1329-1337.
- Draper, G. J., B. M. Sanders and J. E. Kingston (1986). "Second primary neoplasms in patients with retinoblastoma." Br J Cancer **53**(5): 661-671.
- Du, W. and J. S. Searle (2009). "The rb pathway and cancer therapeutics." Curr Drug Targets **10**(7): 581-589.
- Duponchel, C., C. Di Rocco, M. Cicardi and M. Tosi (2001). "Rapid detection by fluorescent multiplex PCR of exon deletions and duplications in the C1 inhibitor gene of hereditary angioedema patients." Hum Mutat **17**(1): 61-70.
- Easton, D. F., K. A. Pooley, A. M. Dunning, P. D. Pharoah, et al. (2007). "Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci." Nature **447**(7148): 1087-1093.
- Ellis, N. A., S. Ciocci and J. German (2001). "Back mutation can produce phenotype reversion in Bloom syndrome somatic cells." Hum Genet **108**(2): 167-173.
- Epistolato, M. C., V. Disciglio, G. Livide, P. Berchiolla, et al. (2011). "p53 Arg72Pro and MDM2 309 SNPs in hereditary retinoblastoma." J Hum Genet **56**(9): 685-686.
- Ewens, W. J., M. Li and R. S. Spielman (2008). "A review of family-based tests for linkage disequilibrium between a quantitative trait and a genetic marker." PLoS Genet **4**(9): e1000180.
- Fan, H. C., W. Gu, J. Wang, Y. J. Blumenfeld, et al. (2012). "Non-invasive prenatal measurement of the fetal genome." Nature **487**(7407): 320-324.
- Fang, S., R. Krahe, G. Lozano, Y. Han, et al. (2010). "Effects of MDM2, MDM4 and TP53 codon 72 polymorphisms on cancer risk in a cohort study of carriers of TP53 germline mutations." PLoS One **5**(5): e10813.
- Fodde, R. and M. Losekoot (1994). "Mutation detection by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)." Hum Mutat **3**(2): 83-94.
- Foix-L'helias, L., I. Aerts, L. Marchand, L. Lumbroso-Le Rouic, et al. (2012). "Are children born after infertility treatment at increased risk of retinoblastoma?" Hum Reprod **27**(7): 2186-2192.
- Francisco, G., P. R. Menezes, J. Eluf-Neto and R. Chammas (2011). "Arg72Pro TP53 polymorphism and cancer susceptibility: a comprehensive meta-analysis of 302 case-control studies." Int J Cancer **129**(4): 920-930.

- Gallie, B. L., R. M. Ellsworth, D. H. Abramson and R. A. Phillips (1982). "Retinoma: spontaneous regression of retinoblastoma or benign manifestation of the mutation?" Br J Cancer **45**(4): 513-521.
- Gonin-Laurent, N., N. S. Hadj-Hamou, N. Vogt, C. Houdayer, et al. (2007). "RB1 and TP53 pathways in radiation-induced sarcomas." Oncogene **26**(41): 6106-6112.
- Gross, M., H. Hanenberg, S. Lobitz, R. Friedl, et al. (2002). "Reverse mosaicism in Fanconi anemia: natural gene therapy via molecular self-correction." Cytogenet Genome Res **98**(2-3): 126-135.
- Guo, Y., S. Pajovic and B. L. Gallie (2008). "Expression of p14ARF, MDM2, and MDM4 in human retinoblastoma." Biochem Biophys Res Commun **375**(1): 1-5.
- Haines, D. S. (1997). "The mdm2 proto-oncogene." Leuk Lymphoma **26**(3-4): 227-238.
- Hamid, R., J. D. Cogan, L. K. Hedges, E. Austin, et al. (2009). "Penetrance of pulmonary arterial hypertension is modulated by the expression of normal BMPR2 allele." Hum Mutat **30**(4): 649-654.
- Harbour, J. W. (2001). "Molecular basis of low-penetrance retinoblastoma." Arch Ophthalmol **119**(11): 1699-1704.
- Honda, R., H. Tanaka and H. Yasuda (1997). "Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53." FEBS Lett **420**(1): 25-27.
- Horvath, S., X. Xu and N. M. Laird (2001). "The family based association test method: strategies for studying general genotype--phenotype associations." Eur J Hum Genet **9**(4): 301-306.
- Horvath, S., X. Xu, S. L. Lake, E. K. Silverman, et al. (2004). "Family-based tests for associating haplotypes with general phenotype data: application to asthma genetics." Genet Epidemiol **26**(1): 61-69.
- Houdayer, C., C. Dehainault, C. Mattler, D. Michaux, et al. (2008). "Evaluation of in silico splice tools for decision-making in molecular diagnosis." Hum Mutat **29**(7): 975-982.
- Houdayer, C., M. Gauthier-Villars, L. Castera, F. Doz, et al. (2012). Genetic Counseling and Molecular Diagnosis. Retinoblastoma: An Update on Clinical, Genetic Counseling, Epidemiology and Molecular Tumor Biology. Intech.
- Houdayer, C., M. Gauthier-Villars, A. Lauge, S. Pages-Berhouet, et al. (2004). "Comprehensive screening for constitutional RB1 mutations by DHPLC and QMPSF." Hum Mutat **23**(2): 193-202.
- Houdayer, C., V. Moncoutier, J. Champ, J. Weber, et al. (2010). "Enhanced mismatch mutation analysis: simultaneous detection of point mutations and large scale rearrangements by capillary electrophoresis, application to BRCA1 and BRCA2." Methods Mol Biol **653**: 147-180.

Howard, M. T., N. Malik, C. B. Anderson, J. L. Voskuil, et al. (2004). "Attenuation of an amino-terminal premature stop codon mutation in the ATRX gene by an alternative mode of translational initiation." J Med Genet **41**(12): 951-956.

Hu, Z., G. Jin, L. Wang, F. Chen, et al. (2007). "MDM2 promoter polymorphism SNP309 contributes to tumor susceptibility: evidence from 21 case-control studies." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **16**(12): 2717-2723.

Hutchinson, S., A. Furger, D. Halliday, D. P. Judge, et al. (2003). "Allelic variation in normal human FBN1 expression in a family with Marfan syndrome: a potential modifier of phenotype?" Hum Mol Genet **12**(18): 2269-2276.

Ianari, A., T. Natale, E. Calo, E. Ferretti, et al. (2009). "Proapoptotic function of the retinoblastoma tumor suppressor protein." Cancer Cell **15**(3): 184-194.

Inacio, A., A. L. Silva, J. Pinto, X. Ji, et al. (2004). "Nonsense mutations in close proximity to the initiation codon fail to trigger full nonsense-mediated mRNA decay." J Biol Chem **279**(31): 32170-32180.

Jacobs, K. B., M. Yeager, W. Zhou, S. Wacholder, et al. (2012). "Detectable clonal mosaicism and its relationship to aging and cancer." Nat Genet **44**(6): 651-658.

Jonkman, M. F., H. Scheffer, R. Stulp, H. H. Pas, et al. (1997). "Revertant mosaicism in epidermolysis bullosa caused by mitotic gene conversion." Cell **88**(4): 543-551.

Kanber, D., T. Berulava, O. Ammerpohl, D. Mitter, et al. (2009). "The human retinoblastoma gene is imprinted." PLoS Genet **5**(12): e1000790.

Kato, M. V., K. Ishizaki, T. Shimizu, J. Toguchida, et al. (1995). "Delayed development of retinoblastoma associated with loss of a maternal allele on chromosome 13." Int J Cancer **64**(1): 3-8.

Kato, M. V., T. Shimizu, K. Ishizaki, A. Kaneko, et al. (1996). "Loss of heterozygosity on chromosome 17 and mutation of the p53 gene in retinoblastoma." Cancer Lett **106**(1): 75-82.

Kato, M. V., T. Shimizu, M. Nagayoshi, A. Kaneko, et al. (1996). "Genomic imprinting of the human serotonin-receptor (HTR2) gene involved in development of retinoblastoma." Am J Hum Genet **59**(5): 1084-1090.

Kehrer-Sawatzki, H. and D. N. Cooper (2008). "Mosaicism in sporadic neurofibromatosis type 1: variations on a theme common to other hereditary cancer syndromes?" J Med Genet **45**(10): 622-631.

Kim, S. Y., S. Yasuda, H. Tanaka, K. Yamagata, et al. (2011). "Non-clustered protocadherin." Cell Adh Migr **5**(2): 97-105.

Klutzn, M., D. Brockmann and D. R. Lohmann (2002). "A parent-of-origin effect in two families with retinoblastoma is associated with a distinct splice mutation in the RB1 gene." Am J Hum Genet **71**(1): 174-179.

- Knudson, A. G., Jr. (1971). "Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma." Proc Natl Acad Sci U S A **68**(4): 820-823.
- Komori, H., M. Enomoto, M. Nakamura, R. Iwanaga, et al. (2005). "Distinct E2F-mediated transcriptional program regulates p14ARF gene expression." EMBO J **24**(21): 3724-3736.
- Kulkarni, D. A., A. Vazquez, B. G. Haffty, E. V. Bandera, et al. (2009). "A polymorphic variant in human MDM4 associates with accelerated age of onset of estrogen receptor negative breast cancer." Carcinogenesis **30**(11): 1910-1915.
- Laird, N. M., S. Horvath and X. Xu (2000). "Implementing a unified approach to family-based tests of association." Genet Epidemiol **19 Suppl 1**: S36-42.
- Laurie, C. C., C. A. Laurie, K. Rice, K. F. Doheny, et al. (2012). "Detectable clonal mosaicism from birth to old age and its relationship to cancer." Nat Genet **44**(6): 642-650.
- Laurie, N. A., S. L. Donovan, C. S. Shih, J. Zhang, et al. (2006). "Inactivation of the p53 pathway in retinoblastoma." Nature **444**(7115): 61-66.
- Laurie, N. A., C. Schin-Shih and M. A. Dyer (2007). "Targeting MDM2 and MDMX in retinoblastoma." Curr Cancer Drug Targets **7**(7): 689-695.
- Lefebvre, J. F., E. Vello, B. Ge, S. B. Montgomery, et al. (2012). "Genotype-based test in mapping cis-regulatory variants from allele-specific expression data." PLoS One **7**(6): e38667.
- Lele, K. P., L. S. Penrose and H. B. Stallard (1963). "Chromosome Deletion in a Case of Retinoblastoma." Ann Hum Genet **27**: 171-174.
- Lillington, D. M., J. E. Kingston, P. G. Coen, E. Price, et al. (2003). "Comparative genomic hybridization of 49 primary retinoblastoma tumors identifies chromosomal regions associated with histopathology, progression, and patient outcome." Genes Chromosomes Cancer **36**(2): 121-128.
- Lim, D., S. C. Bowdin, L. Tee, G. A. Kirby, et al. (2009). "Clinical and molecular genetic features of Beckwith-Wiedemann syndrome associated with assisted reproductive technologies." Hum Reprod **24**(3): 741-747.
- Linn Murphree, A. (2005). "Intraocular retinoblastoma: the case for a new group classification." Ophthalmol Clin North Am **18**(1): 41-53, viii.
- Liu, L., Y. Li, S. Li, N. Hu, et al. (2012). "Comparison of next-generation sequencing systems." J Biomed Biotechnol **2012**: 251364.
- Liu, W., L. He, J. Ramirez and M. J. Ratain (2009). "Interactions between MDM2 and TP53 Genetic Alterations, and Their Impact on Response to MDM2 Inhibitors and Other Chemotherapeutic Drugs in Cancer Cells." Clin Cancer Res **15**(24): 7602-7607.
- Lohmann, D. R. (1999). "RB1 gene mutations in retinoblastoma." Hum Mutat **14**(4): 283-288.



- Lohmann, D. R., B. Brandt, W. Hopping, E. Passarge, et al. (1994). "Distinct RB1 gene mutations with low penetrance in hereditary retinoblastoma." Hum Genet **94**(4): 349-354.
- Lohmann, D. R. and B. L. Gallie (2004). "Retinoblastoma: revisiting the model prototype of inherited cancer." Am J Med Genet C Semin Med Genet **129C**(1): 23-28.
- Ludwig, M., A. Katalinic, S. Gross, A. Sutcliffe, et al. (2005). "Increased prevalence of imprinting defects in patients with Angelman syndrome born to subfertile couples." J Med Genet **42**(4): 289-291.
- Mairal, A., E. Pinglier, E. Gilbert, M. Peter, et al. (2000). "Detection of chromosome imbalances in retinoblastoma by parallel karyotype and CGH analyses." Genes Chromosomes Cancer **28**(4): 370-379.
- Mak, S., I. Mak, B. L. Gallie, R. Godbout, et al. (1982). "Adenovirus-12 genes undetectable in human retinoblastoma." Int J Cancer **30**(6): 697-700.
- Marees, T., C. J. Dommering, S. M. Imhof, W. A. Kors, et al. (2009). "Incidence of retinoblastoma in Dutch children conceived by IVF: an expanded study." Hum Reprod **24**(12): 3220-3224.
- Merbs, S. L., M. A. Khan, L. Hackler, Jr., V. F. Oliver, et al. (2012). "Cell-specific DNA methylation patterns of retina-specific genes." PLoS One **7**(3): e32602.
- Mitter, D., D. Rushlow, I. Nowak, B. Ansperger-Rescher, et al. (2009). "Identification of a mutation in exon 27 of the RB1 gene associated with incomplete penetrance retinoblastoma." Fam Cancer **8**(1): 55-58.
- Mitter, D., R. Ullmann, A. Muradyan, L. Klein-Hitpass, et al. (2011). "Genotype-phenotype correlations in patients with retinoblastoma and interstitial 13q deletions." Eur J Hum Genet **19**(9): 947-958.
- Moll, A. C., S. M. Imhof, L. M. Bouter, D. J. Kuik, et al. (1996). "Second primary tumors in patients with hereditary retinoblastoma: a register-based follow-up study, 1945-1994." Int J Cancer **67**(4): 515-519.
- Moll, A. C., S. M. Imhof, J. R. Cruysberg, A. Y. Schouten-van Meeteren, et al. (2003). "Incidence of retinoblastoma in children born after in-vitro fertilisation." Lancet **361**(9354): 309-310.
- Moll, A. C., S. M. Imhof, A. Y. Meeteren and M. Boers (2000). "At what age could screening for familial retinoblastoma be stopped? A register based study 1945-98." Br J Ophthalmol **84**(10): 1170-1172.
- Morris, J. A. (1990). "Spontaneous mutation rate in retinoblastoma." J Clin Pathol **43**(6): 496-498.
- Murphree, A. L. and T. J. Triche (2012). "An epigenomic mechanism in retinoblastoma: the end of the story?" Genome Med **4**(2): 15.

- Musarella, M. A. and B. L. Gallie (1987). "A simplified scheme for genetic counseling in retinoblastoma." J Pediatr Ophthalmol Strabismus **24**(3): 124-125.
- Ng, S. B., K. J. Buckingham, C. Lee, A. W. Bigham, et al. (2010). "Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder." Nat Genet **42**(1): 30-35.
- Nittner, D., I. Lambertz, F. Clermont, P. Mestdagh, et al. (2012). "Synthetic lethality between Rb, p53 and Dicer or miR-17-92 in retinal progenitors suppresses retinoblastoma formation." Nat Cell Biol.
- Nork, T. M., G. L. Poulsen, L. L. Millecchia, R. G. Jantz, et al. (1997). "p53 regulates apoptosis in human retinoblastoma." Arch Ophthalmol **115**(2): 213-219.
- Onadim, Z., A. Hogg, P. N. Baird and J. K. Cowell (1992). "Oncogenic point mutations in exon 20 of the RB1 gene in families showing incomplete penetrance and mild expression of the retinoblastoma phenotype." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(13): 6177-6181.
- Orita, M., Y. Suzuki, T. Sekiya and K. Hayashi (1989). "Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction." Genomics **5**(4): 874-879.
- Otterson, G. A., W. Chen, A. B. Coxon, S. N. Khleif, et al. (1997). "Incomplete penetrance of familial retinoblastoma linked to germ-line mutations that result in partial loss of RB function." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(22): 12036-12040.
- Ozisik, G., G. Mantovani, J. C. Achermann, L. Persani, et al. (2003). "An alternate translation initiation site circumvents an amino-terminal DAX1 nonsense mutation leading to a mild form of X-linked adrenal hypoplasia congenita." J Clin Endocrinol Metab **88**(1): 417-423.
- Pacal, M. and R. Bremner (2006). "Insights from animal models on the origins and progression of retinoblastoma." Curr Mol Med **6**(7): 759-781.
- Phelps, W. C., K. Munger, C. L. Yee, J. A. Barnes, et al. (1992). "Structure-function analysis of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein." J Virol **66**(4): 2418-2427.
- Pickering, M. T. and T. F. Kowalik (2006). "Rb inactivation leads to E2F1-mediated DNA double-strand break accumulation." Oncogene **25**(5): 746-755.
- Pierron, G., F. Tirode, C. Lucchesi, S. Reynaud, et al. (2012). "A new subtype of bone sarcoma defined by BCOR-CCNB3 gene fusion." Nat Genet **44**(4): 461-466.
- Pugh, T. J., S. D. Weeraratne, T. C. Archer, D. A. Pomeranz Krummel, et al. (2012). "Medulloblastoma exome sequencing uncovers subtype-specific somatic mutations." Nature **488**(7409): 106-110.
- Purcell, S., B. Neale, K. Todd-Brown, L. Thomas, et al. (2007). "PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses." Am J Hum Genet **81**(3): 559-575.



- Quail, M., M. E. Smith, P. Coupland, T. D. Otto, et al. (2012). "A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion torrent, pacific biosciences and illumina MiSeq sequencers." BMC Genomics **13**(1): 341.
- Quelin, C., C. Bendavid, C. Dubourg, C. de la Rochebrochard, et al. (2009). "Twelve new patients with 13q deletion syndrome: genotype-phenotype analyses in progress." Eur J Med Genet **52**(1): 41-46.
- Rabbani, B., N. Mahdieh, K. Hosomichi, H. Nakaoka, et al. (2012). "Next-generation sequencing: impact of exome sequencing in characterizing Mendelian disorders." J Hum Genet.
- Richter, S., K. Vandezande, N. Chen, K. Zhang, et al. (2003). "Sensitive and efficient detection of RB1 gene mutations enhances care for families with retinoblastoma." Am J Hum Genet **72**(2): 253-269.
- Risch, N. and K. Merikangas (1996). "The future of genetic studies of complex human diseases." Science **273**(5281): 1516-1517.
- Riviere, J. B., B. W. van Bon, A. Hoischen, S. S. Kholmanskikh, et al. (2012). "De novo mutations in the actin genes ACTB and ACTG1 cause Baraitser-Winter syndrome." Nat Genet **44**(4): 440-444, S441-442.
- Rivolta, C., T. L. McGee, T. Rio Frio, R. V. Jensen, et al. (2006). "Variation in retinitis pigmentosa-11 (PRPF31 or RP11) gene expression between symptomatic and asymptomatic patients with dominant RP11 mutations." Hum Mutat **27**(7): 644-653.
- Rodjan, F., P. de Graaf, H. J. Brisse, S. Gorické, et al. (2012). "Trilateral retinoblastoma: neuroimaging characteristics and value of routine brain screening on admission." J Neurooncol.
- Ruijs, M. W., M. K. Schmidt, H. Nevanlinna, J. Tommiska, et al. (2007). "The single-nucleotide polymorphism 309 in the MDM2 gene contributes to the Li-Fraumeni syndrome and related phenotypes." Eur J Hum Genet **15**(1): 110-114.
- Rushlow, D., B. Piovesan, K. Zhang, N. L. Prigoda-Lee, et al. (2009). "Detection of mosaic RB1 mutations in families with retinoblastoma." Hum Mutat **30**(5): 842-851.
- Sachidanandam, R., D. Weissman, S. C. Schmidt, J. M. Kakol, et al. (2001). "A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms." Nature **409**(6822): 928-933.
- Sakai, T., N. Ohtani, T. L. McGee, P. D. Robbins, et al. (1991). "Oncogenic germ-line mutations in Sp1 and ATF sites in the human retinoblastoma gene." Nature **353**(6339): 83-86.
- Sanchez-Sanchez, F., C. Ramirez-Castillejo, D. B. Weekes, M. Beneyto, et al. (2007). "Attenuation of disease phenotype through alternative translation initiation in low-penetrance retinoblastoma." Hum Mutat **28**(2): 159-167.

Scarola, M., S. Schoeftner, C. Schneider and R. Benetti (2010). "miR-335 directly targets Rb1 (pRb/p105) in a proximal connection to p53-dependent stress response." Cancer Res **70**(17): 6925-6933.

Schmitt, M. W., S. R. Kennedy, J. J. Salk, E. J. Fox, et al. (2012). "Detection of ultra-rare mutations by next-generation sequencing." Proc Natl Acad Sci U S A.

Schneiter, K., J. H. Degnan, C. Corcoran, X. Xu, et al. (2007). "EFBAT: exact family-based association tests." BMC Genet **8**: 86.

Schouten, J. P., C. J. McElgunn, R. Waaijer, D. Zwiijnenburg, et al. (2002). "Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification." Nucleic Acids Res **30**(12): e57.

Schuler, A., S. Weber, M. Neuhauser, C. Jurklies, et al. (2005). "Age at diagnosis of isolated unilateral retinoblastoma does not distinguish patients with and without a constitutional RB1 gene mutation but is influenced by a parent-of-origin effect." Eur J Cancer **41**(5): 735-740.

Sdek, P., H. Ying, D. L. Chang, W. Qiu, et al. (2005). "MDM2 promotes proteasome-dependent ubiquitin-independent degradation of retinoblastoma protein." Mol Cell **20**(5): 699-708.

Seyfried, I., S. Hofbauer, M. Stoecher, R. Greil, et al. (2008). "SNP309 as predictor for sensitivity of CLL cells to the MDM2 inhibitor nutlin-3a." Blood **112**(5): 2168; author reply 2169.

Shvarts, A., M. Bazuine, P. Dekker, Y. F. Ramos, et al. (1997). "Isolation and identification of the human homolog of a new p53-binding protein, Mdmx." Genomics **43**(1): 34-42.

Sippel, K. C., R. E. Fraioli, G. D. Smith, M. E. Schalkoff, et al. (1998). "Frequency of somatic and germ-line mosaicism in retinoblastoma: implications for genetic counseling." Am J Hum Genet **62**(3): 610-619.

Spielman, R. S., R. E. McGinnis and W. J. Ewens (1993). "Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM)." Am J Hum Genet **52**(3): 506-516.

Strehl, S., K. Glatt, Q. M. Liu, H. Glatt, et al. (1998). "Characterization of two novel protocadherins (PCDH8 and PCDH9) localized on human chromosome 13 and mouse chromosome 14." Genomics **53**(1): 81-89.

Suzuki, N., T. Ueno, A. Kaneko, S. Fujii, et al. (1983). "Analysis of retinoblastoma for human adenovirus type 12 genome." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **220**(4): 167-170.

Taktikos, A. (1964). "Association of Retinoblastoma with Mental Defect and Other Pathological Manifestations." Br J Ophthalmol **48**: 495-498.

Taylor, M., C. Dehainault, L. Desjardins, F. Doz, et al. (2007). "Genotype-phenotype correlations in hereditary familial retinoblastoma." Hum Mutat **28**(3): 284-293.

Thienpont, B., J. R. Vermeesch and J. P. Fryns (2005). "25 Mb deletion of 13q13.3-->q21.31 in a patient without retinoblastoma." Eur J Med Genet **48**(3): 363-366.

To, K. H., S. Pajovic, B. L. Gallie and B. L. Theriault (2012). "Regulation of p14ARF expression by miR-24: a potential mechanism compromising the p53 response during retinoblastoma development." BMC Cancer **12**: 69.

Toguchida, J., T. L. McGee, J. C. Paterson, J. R. Eagle, et al. (1993). "Complete genomic sequence of the human retinoblastoma susceptibility gene." Genomics **17**(3): 535-543.

Toledo, F. and G. M. Wahl (2006). "Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas." Nat Rev Cancer **6**(12): 909-923.

Uchida, C., S. Miwa, K. Kitagawa, T. Hattori, et al. (2005). "Enhanced Mdm2 activity inhibits pRB function via ubiquitin-dependent degradation." Embo J **24**(1): 160-169.

Vassilev, L. T., B. T. Vu, B. Graves, D. Carvajal, et al. (2004). "In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2." Science **303**(5659): 844-848.

Veltman, J. A. and H. G. Brunner (2012). "De novo mutations in human genetic disease." Nat Rev Genet **13**(8): 565-575.

Venter, J. C., M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, et al. (2001). "The sequence of the human genome." Science **291**(5507): 1304-1351.

Vogelstein, B. and K. W. Kinzler (2004). "Cancer genes and the pathways they control." Nat Med **10**(8): 789-799.

Walsh, T., M. K. Lee, S. Casadei, A. M. Thornton, et al. (2010). "Detection of inherited mutations for breast and ovarian cancer using genomic capture and massively parallel sequencing." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(28): 12629-12633.

Weber, J., S. Miserere, J. Champ, R. Looten, et al. (2007). "High-throughput simultaneous detection of point mutations and large-scale rearrangements by CE." Electrophoresis **28**(23): 4282-4288.

Xiao, W. and P. J. Oefner (2001). "Denaturing high-performance liquid chromatography: A review." Hum Mutat **17**(6): 439-474.

Xu, X. L., Y. Fang, T. C. Lee, D. Forrest, et al. (2009). "Retinoblastoma has properties of a cone precursor tumor and depends upon cone-specific MDM2 signaling." Cell **137**(6): 1018-1031.

Yousoufian, H. and R. E. Pyeritz (2002). "Mechanisms and consequences of somatic mosaicism in humans." Nat Rev Genet **3**(10): 748-758.

Yu, C. L., M. A. Tucker, D. H. Abramson, K. Furukawa, et al. (2009). "Cause-specific mortality in long-term survivors of retinoblastoma." J Natl Cancer Inst **101**(8): 581-591.

Zeschnigk, M., S. Bohringer, E. A. Price, Z. Onadim, et al. (2004). "A novel real-time PCR assay for quantitative analysis of methylated alleles (QAMA): analysis of the retinoblastoma locus." Nucleic Acids Res **32**(16): e125.

Zhang, J., C. A. Benavente, J. McEvoy, J. Flores-Otero, et al. (2012). "A novel retinoblastoma therapy from genomic and epigenetic analyses." Nature **481**(7381): 329-334.

Zhang, K., I. Nowak, D. Rushlow, B. L. Gallie, et al. (2008). "Patterns of missplicing caused by RB1 gene mutations in patients with retinoblastoma and association with phenotypic expression." Hum Mutat **29**(4): 475-484.

Zhu, L. (2005). "Tumour suppressor retinoblastoma protein Rb: a transcriptional regulator." Eur J Cancer **41**(16): 2415-2427.

## ANNEXES

Houdayer, C., M. Gauthier-Villars, L. Castéra, F. Doz, D. Stoppa-Lyonnet (2012). Genetic Counseling and Molecular Diagnosis. "Retinoblastoma: An Update on Clinical, Genetic Counseling, Epidemiology and Molecular Tumor Biology". Intech.

# Retinoblastoma – Genetic Counseling and Molecular Diagnosis

Claude Houdayer<sup>1,4</sup>, Marion Gauthier-Villars<sup>1</sup>, Laurent Castéra<sup>1</sup>,  
Laurence Desjardins<sup>2</sup>, François Doz<sup>3,4</sup> and Dominique Stoppa-Lyonnet<sup>1,4,5</sup>

<sup>1</sup>*Genetics Department, Institut Curie, Paris*

<sup>2</sup>*Ophthalmology Department, Institut Curie, Paris*

<sup>3</sup>*Pediatrics Department, Institut Curie, Paris*

<sup>4</sup>*Université Paris Descartes, Paris*

<sup>5</sup>*INSERM U830, Pathologie Moléculaire des Cancers,*

*Institut Curie, Paris*

*France*

## 1. Introduction

Retinoblastoma is a malignant embryonal tumour of childhood arising at the expense of retinal cones. It has an incidence of 1 per 15,000 to 20,000 births. In 90% of cases, it is diagnosed before the age of 3 years. The possibility of conservative management depends on early diagnosis (Moll et al., 1996). However, although treatment strategies have advanced considerably, the visual prognosis is still a major source of concern, especially central vision when the tumour is situated at or close to the macula. In two-thirds of cases, the lesion is unilateral and the median age of diagnosis is 2 years. In the other third, the lesion is bilateral and the disease is diagnosed earlier, possibly even during the neonatal period, with a median age of diagnosis of 1 year. Most cases of unilateral and bilateral retinoblastoma are sporadic, with no family history. However, 10 to 15% of all cases of retinoblastoma present a family history. The distribution of cases within the family is compatible with the existence of a tumour susceptibility gene transmitted according to an autosomal dominant mode with high penetrance. In this case, the lesion is usually bilateral and diagnosed at an early age.

### 1.1 Diagnosis

The most frequent presenting signs are leukocoria (white pupillary reflex) and strabismus. Retinoblastoma may also be discovered on routine ocular fundus examination performed in a child from a high-risk family.

The diagnosis is essentially based on the ocular fundus examination under general anaesthesia, completed by ultrasound and CT. Tumour growth may be endophytic with invasion of the vitreous cavity or, more rarely, exophytic with retinal detachment. A precise description of the lesions based on funduscopy findings allows the lesion to be classified according to the 5 stages of the Reese-Ellsworth classification, associated with an increasingly severe prognosis. Ultrasound and orbital CT demonstrate tumour calcifications

highly suggestive of retinoblastoma and CT contributes to staging in advanced forms. In the case of enucleation, the diagnosis and staging are confirmed by histological criteria.

Conservative treatment must be attempted whenever possible: chemotherapy, radiotherapy, photocoagulation, and cryotherapy. Very advanced forms unsuitable for conservative treatment will require enucleation. This treatment is still unfortunately often required for sporadic retinoblastomas whose diagnosis is made late.

## 1.2 Predisposition to retinoblastoma

In 1971, Knudson proposed a model designed to explain why most familial retinoblastomas were bilateral and occurred at an early age and, inversely, why unilateral cases were usually isolated and diagnosed later (Knudson, 1971). He proposed the hypothesis that two mutations of key genes in the control of cell division occurring in a retinal neuroectodermal cell were necessary, but possibly not sufficient, for development of retinoblastoma. In bilateral forms, the first mutation is a germline mutation, present in all cells of the body and especially in all retinal neuroectodermal embryonal cells, while the second mutation is somatic, acquired during foetal life or the first months of neonatal life. Although the probability of two somatic mutations in two key genes in the same retinal cell is extremely low, development of a single mutation is not a rare event and induces development of a retinoblastoma when another mutation is already present. This explains why children with a germline mutation have a high risk of developing not just one, but two or more tumours. Comings completed Knudson's hypothesis in 1973 by postulating that the two mutations necessary for the development of retinoblastoma corresponded to inactivation of the two alleles of the same gene, that had not yet been identified at that time (Comings, 1973). The hypothesis of the existence of tumour suppressor genes, already suspected, became very likely.

In familial cases, the germline mutation is transmitted by one of the parents. In sporadic, bilateral and sometimes multifocal unilateral cases, the germline mutation usually corresponds to a *de novo* mutation arising in the gametes of one of the two parents (pre-zygotic) or at an early stage after fertilization (post-zygotic). Pre-zygotic *de novo* mutations are associated with advanced paternal age. In some cases, the apparently sporadic nature of retinoblastoma is related to incomplete penetrance in one carrier parent. As the risk of tumour is high, but incomplete, a parent with a germline mutation may fail to develop retinoblastoma during childhood or may have developed a spontaneously regressive retinoblastoma, which may leave a retinal scar or retinoma. It is therefore very important to perform an ocular fundus examination in each parent looking for retinoma, which would reveal a previously unknown family history that would consequently modify genetic counseling. This point is discussed in more detail in the "Notes" section of the chapter on "Genetic counseling".

Most unilateral cases are due to two mutations occurring only at the somatic level. However, it is estimated that almost 10% of patients with unilateral retinoblastoma have a germline mutation.

A risk of cancer different of retinoblastoma exists within retinoblastoma predisposition. Rare patients develop pineal region tumour but is considered like an ectopic intracranial retinoblastoma and so-called trilateral retinoblastoma. An increased risk of second cancers



for *RB1* mutation carriers, after retinoblastoma, is well documented. In childhood and early adulthood, these patients have a high incidence of osteosarcomas and soft tissue sarcomas. The incidence of these cancers can often be attributed to external beam radiation therapy, but many cases have been reported occurring outside of the field of radiation treatment and even for patients who received no radiation. A cumulative rate of second cancers is reported 18 years after the diagnosis of genetic retinoblastoma at 8.4% (and 6% for osteosarcomas alone) (Draper et al., 1986). Otherwise, *RB1* mutation carriers have also a high lifetime risk of developing a late onset epithelial cancer (lung, bladder, breast) and melanoma. In a historic series of 144 survivors of hereditary retinoblastomas, the cumulative cancer incidence to 85 years of age has been estimated to be 68.8% (CI= 48.0% to 87.4%) (Fletcher et al., 2004).

### 1.3 The *RB1* gene

The identification, in 1963, of germline deletions of chromosome 13 (then considered to be a group D chromosome) in rare patients with bilateral retinoblastoma and presenting mental retardation and a dysmorphic syndrome suggested that the retinoblastoma susceptibility gene was localized in this chromosomal region (Baud et al., 1999, Lele et al., 1963). Comparative analysis of highly polymorphic germline and tumour genetic markers localized in 13q14 subsequently demonstrated loss of heterozygosity in about 65% of tumours. In other words, in more than one half of tumours, the susceptibility gene is altered in somatic cells by complete loss of the chromosomal region in which it is localized. It has also been demonstrated that, in familial forms of retinoblastoma, the remaining allele in the tumour was always the allele common to all affected members of the family, i.e. the allele carrying the predisposition to retinoblastoma. Analysis of a large number of retinoblastomas identified the smallest common region of deletion in 13q14, which allowed research to be focussed on this region. In 1986, identification of a gene localized in the region of interest and constituting a site of inactivating germline mutations in children with bilateral retinoblastoma confirmed that this gene corresponded to the retinoblastoma susceptibility gene; it was called *RB1* (Friend et al., 1986). Identification of *RB1* confirmed the complementary hypotheses of Knudson and Comings, opened the way to cancer susceptibility gene testing and allowed definition of the risk of retinoblastoma within particular families.

The *RB1* gene codes for a 110 kD nuclear protein with an ubiquitous expression, which, together with proteins p107 and p130, belongs to the pocket protein family. These proteins share in common a domain corresponding to a highly conserved region, the pocket domain, which allows sequestration of transcription factors, such as those of the E2F family. During the G1/S transition of the cell cycle, the pRB protein binds to E2F factors and suppresses their activity, consequently blocking progression to S phase. Inversely, phosphorylation of pRB releases E2F factors, allowing completion of the cell cycle. The pRB protein is involved not only in regulation of the cell cycle, but also in control of termination of cellular differentiation and in exit of the cell from the cell cycle during development. It appears to interact with more than 100 different proteins (Zhu, 2005, Classon&Harlow, 2002, Chau&Wang, 2003, Bremner et al., 2004). It is probably this role in differentiation which explains the spatiotemporal specificity of the tumour risk associated with *RB1* gene mutations and consequently damage to retinal neuroectodermal cells during early childhood.



## 2. Genetic counseling protocols

### 2.1 Overview

Whenever unilateral or bilateral retinoblastoma is diagnosed in a child, it is important to consider the possibility of a genetic predisposition and therefore the risk of development of the disease in young children related to the patient.

Analysis of the family history and the tumour history of a patient treated for retinoblastoma is essential to evaluate the possibility of a genetic predisposition and the risk of development of the disease in other members of the child's family and to guide the ophthalmological surveillance of family members (siblings, cousins or offspring). It is therefore possible to calculate the probability of relatives of a child with retinoblastoma to present a genetic predisposition to this disease. These calculations are based on the following elements: (1) 100% of patients with bilateral retinoblastoma and 10% of patients with unilateral retinoblastoma are considered to present a genetic predisposition, (2) the mode of transmission is dominant; a carrier parent therefore has once chance in two of transmitting the susceptibility gene to each child, (3) the penetrance is 90% at birth, which means that an adult who did not develop retinoblastoma in childhood has a tenfold lower probability of being a carrier compared to the probability at birth (Figure 1).

Based on comparative analysis of the various approaches to ophthalmological surveillance in different countries and our multidisciplinary experience at Institut Curie, we can propose guidelines for the surveillance of relatives of patients followed for retinoblastoma (Figure 1) (Abramson et al., 1998, Moll et al., 2000, Musarella&Gallie, 1987). The modalities of this surveillance depend on the probability of predisposition of the child to be followed, which depends on the child's age and degree of kinship with the affected child, and on the age distribution at diagnosis in predisposed children followed since birth. In a series of 50 predisposed children followed since birth, the diagnosis of retinoblastoma was established before the age of 6 months in 80% of cases, before the age of 18 months in 92% of cases and at the age of 4 years in one case. Finally, even for the lowest levels of risk for which ophthalmological surveillance is recommended, ocular fundus examination must be performed at least every 3 months until the age of 24 months in order to ensure effective prevention. These surveillance guidelines are very rigorous: ocular fundus examination at the first month of life, or even the first week, in a specialized unit, with frequent follow-up examinations requiring general anaesthesia from the second or third examination. For example, in the case of a 50% risk of being a carrier (a child born to a patient with bilateral retinoblastoma), surveillance starts at the first week of life, and then once a month until the age of 18 months (Figure 1).

These guidelines must be maintained in the absence of genetic testing or while waiting for the results, as genetic testing in all patients with unilateral or bilateral retinoblastoma, followed by testing of the relatives, can eliminate the need for surveillance of a certain number of children, depending on the results.

### 2.2 Counseling

Molecular genetic studies of the *RB1* gene can now be proposed to all patients with familial or sporadic unilateral or bilateral retinoblastoma. Genetic testing must be performed in the

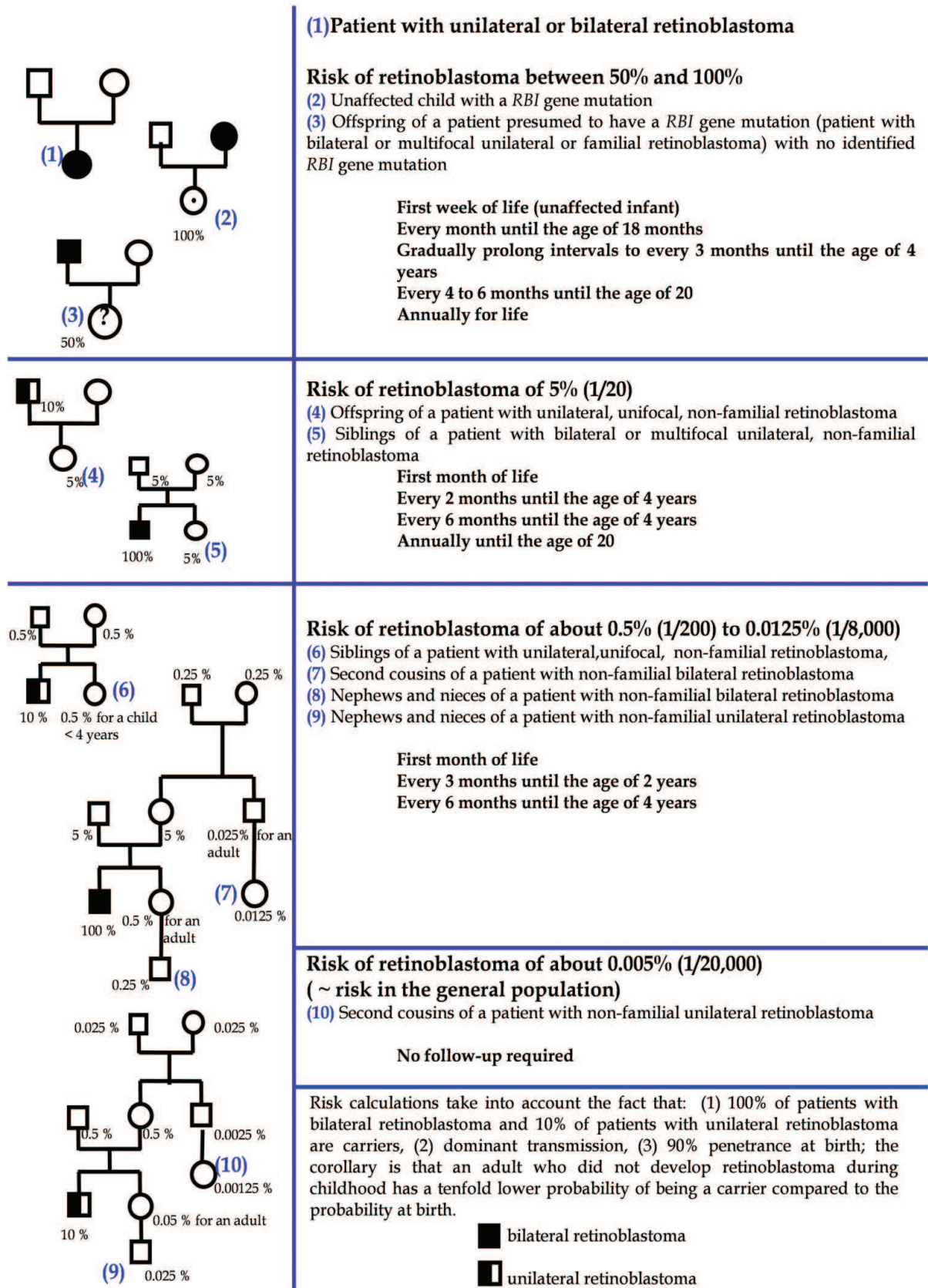


Fig. 1. Ophthalmological surveillance guidelines

context of a genetics consultation in collaboration with the ophthalmology, paediatric oncology and radiotherapy teams managing the child. During this consultation, the patient's pedigree is built looking for other tumour cases in the family and especially other retinoblastoma cases. Patient or parents of young patients are informed about retinoblastoma predisposition. Ocular fundus examination of parents is required to search for retinoma which would reveal a previously unknown family history. Follow up of young patient's relatives by ocular fundus is recommended. Blood sampling for *RB1* molecular analysis is proposed to search for germline mutation. Finally, an informed consent has to be signed by the patients or their legal guardians if *RB1* screening is accepted. Following *RB1* screening, results are delivered during another genetic consultation. The printed test results are given to the parents and are also kept by the genetics department for at least thirty years, so that they can be consulted by the child during early adulthood. Today, a first-line screening for the two inactivating somatic mutations in the tumor DNA (when available) is performed and represents an attractive alternative: identification of these mutations only in the tumour and not in the leukocytes of the patient eliminates the risk of recurrence in siblings and cousins (see below).

The assessment usually starts with molecular genetic testing but cytogenetic analysis is performed as first-line procedure in the case of associated mental retardation or characteristic dysmorphic syndrome.

### 2.3 Clinical management/surveillance (Figure 2)

When a mutation has been demonstrated in an affected child, genetic testing based on screening for this mutation, is recommended for the siblings. Ophthalmological surveillance can be stopped in a relative when genetic testing fails to reveal the mutation identified in the family. Genetic testing is also proposed to the parents. If one of the two parents carries the mutation, antenatal diagnosis may be proposed for a subsequent pregnancy. If the parents do not carry the mutation, their respective families can be reassured, eliminating the need for ophthalmological surveillance of the patient's cousins. In contrast, it is impossible to assess the level of representation of the mutation identified in the affected child in the gametes of the parent in which a *de novo* mutation has occurred (quantification of the germline mosaic), or, in other words, it is impossible to eliminate the risk of recurrence in the siblings of the affected child. In this case, for each new birth in the immediate family, a genetic test must be proposed during the neonatal period. Antenatal diagnosis can be proposed case by case.

When no *RB1* gene mutation is demonstrated in the affected child:

1. In the case of bilateral retinoblastoma, genetic screening techniques have certain limitations and may fail to demonstrate a mutation, in which case surveillance of the patient's relatives must be continued (Figure 1). Somatic mosaics may also be observed, as an alteration of the *RB1* gene can occur in the patient during embryonic development and may not be present in leukocyte DNA. If the mutation is present in the germline, this patient may transmit the mutation to his/her offspring. It is currently proposed to repeat *RB1* gene testing at the birth of each child of a patient with a history of bilateral retinoblastoma in childhood in whom molecular *RB1* gene testing was negative.



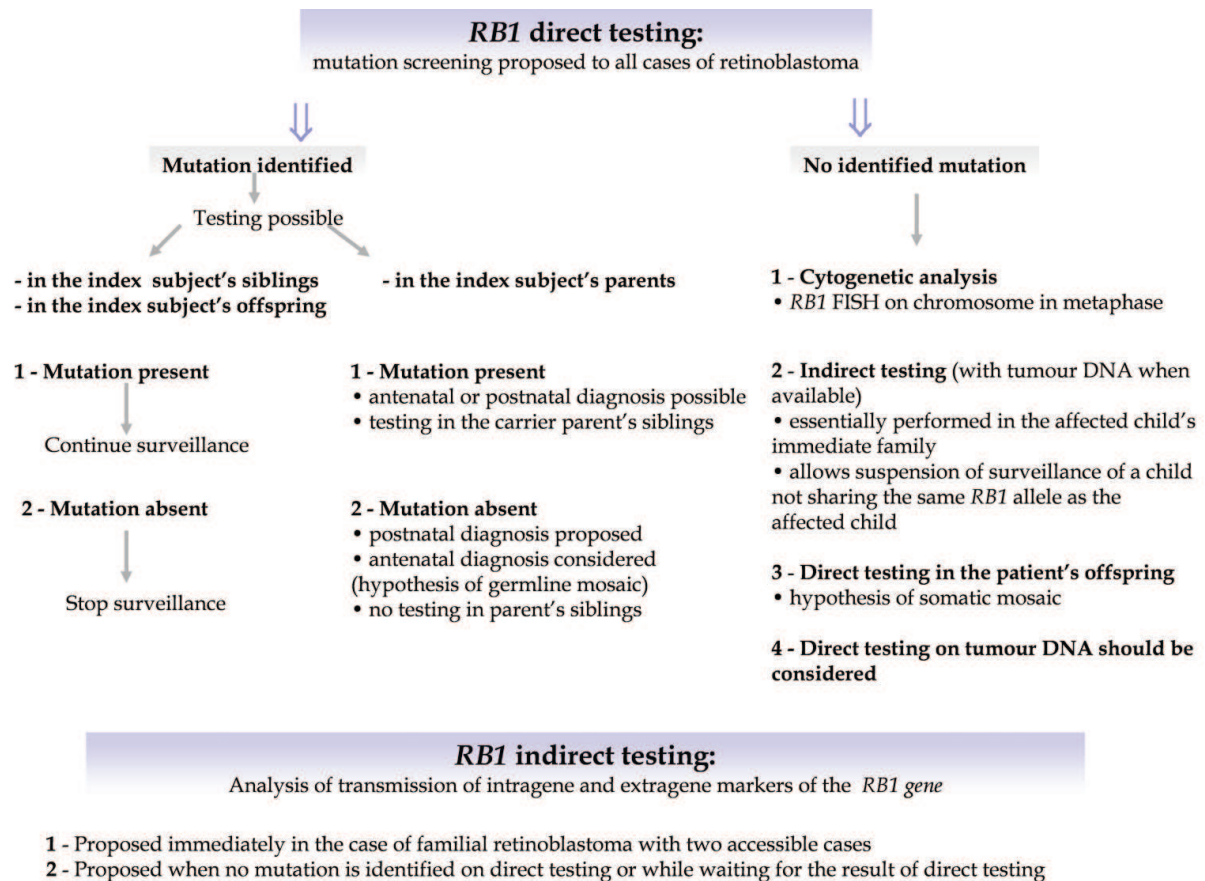


Fig. 2. Clinical management/surveillance

2. In the case of unilateral sporadic retinoblastoma, the genetic counsellor can be more reassuring, as the risk of a genetic predisposition is very low (1% instead of 10%, taking into account a 90% screening sensitivity, see below). However, once again, certain limitations of the techniques used and the risk of somatic mosaic must be kept in mind. It is therefore recommended to continue ophthalmological surveillance in the patient's offspring (Figure 1). However, if the probability of predisposition of a child with unilateral retinoblastoma is only 1%, the risk for his nephews is around 0,00125% or 1/80 000 i.e. lower than in the general population. As a result their ophthalmologic follow-up should be stopped.
3. In familial forms comprising two accessible cases, indirect genetic testing rapidly demonstrates the mutant allele of the *RB1* gene. This method can then be used to detect relatives with the cancer-predisposing allele and allows the possibility of antenatal diagnosis. Indirect molecular genetic testing can also be proposed for families with only one case of retinoblastoma, while waiting for the results of *RB1* screening or when no mutation is detected. The objective in this setting is to suspend surveillance of a child not sharing any *RB1* allele in common with its brother or sister with retinoblastoma, i.e. in one case in four, or even one case in two when loss of heterozygosity is demonstrated in the patient's tumour, designating the remaining allele as the putative predisposing allele. It should be stressed that even when a child shares an allele in common with the patient, the probability that he or she has an *RB1* gene mutation remains very low (Figure 1). However, as a precaution,

ophthalmological surveillance should be continued. Antenatal diagnosis cannot be considered in this particular setting.

## 2.4 Notes

For a long time, it was considered that all patients with a deleterious *RB1* gene mutation developed retinoblastoma regardless of the type of molecular lesion. However, the risk within a given family has now been clearly established to be heterogeneous, as some members do not develop retinoblastoma, while others develop bilateral retinoblastoma, or even a secondary tumour. The severity of the risk can be evaluated by the disease-eye-ratio (DER), which is a good marker of penetrance and level of expression (Lohmann et al., 1994). The DER is the ratio of the number of eyes affected over the number of carriers within the family. One of the problems of genetic counseling for retinoblastoma is therefore to evaluate the tumour risk for an unborn child with a germline *RB1* gene mutation, hence the importance of developing our knowledge of genotype-phenotype relationships.

In general, subjects with a mutation in the first generation may have an attenuated phenotype due to a possible mosaic. The type of lesion then varies according to the type of mutation (Lohmann&Gallie, 2004, Harbour, 2001, Taylor et al., 2007).

Subjects with a mutation leading to a truncated protein (stop, frameshift) have a high risk, greater than 90%, of bilateral retinoblastoma (mean DER = 1.85). Of note, some truncating mutations in exon 1 may lead to low-penetrance retinoblastoma through alternative translation initiation (Sanchez-Sanchez et al., 2007). The situation is more complex for the other types of mutations, as discussed below.

Splicing mutations are associated with a lower mean DER (1.5) and, in some cases, with high intrafamily variability with the presence of tumour-free and bilateral cases in the same family. The variability of the DER is mainly due to maintenance of the frame and/or the respect of functional domains. The case of IVS06+1G>T splicing mutation is quite remarkable, as this mutation is supposed to result in a skip of exon 6 out of phase and therefore in the absence of protein, as the truncated messenger is eliminated by Non sense Mediated Decay (NMD) (Holbrook et al., 2004). This mutation is actually associated with an extraordinary variability of intrafamily and interfamily penetrance. The mechanisms proposed to account for this phenomenon are maintenance and therefore translation of the truncated messenger, possibly related to a parental effect (Klutzn et al., 2002) or overexpression of the wild-type allele, resulting in a normal level of *RB1* expression (Taylor et al., 2007).

Anomalies of the promoter region are classically associated with variations of the level of expression of the messenger and result in variable but generally low DER.

Missense mutations are very rare. When they do not alter splicing (see above), they can be responsible for a partially functional protein (e.g. R661W), which results in a very low mean DER (0.3), but the possibility of bilateral cases cannot be excluded (Onadim et al., 1992).

Chromosomal rearrangements (deletion or duplication of one or several exons, or even the whole gene) are associated with a variable DER (mean: 1.4), particularly and surprisingly, deletions comprising all of *RB1*, for which the phenotype can vary from no lesion to bilateral retinoblastoma (Albrecht et al., 2005).

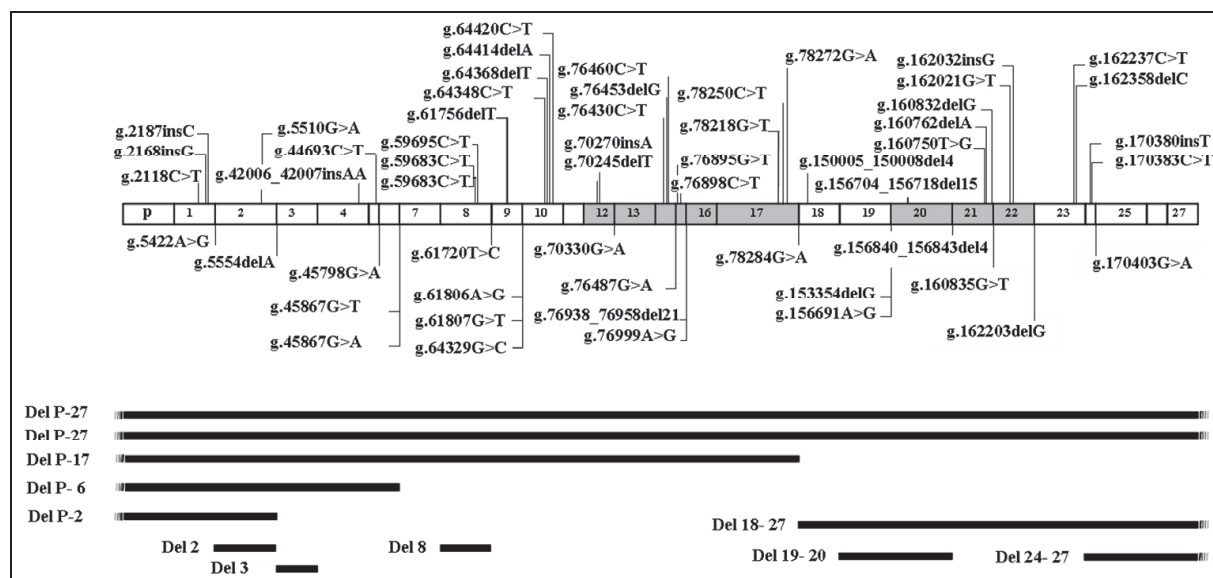
The type of mutation therefore affects the type of lesion, but modifying factors influencing splicing, the level of expression and/or cell survival also appear to be involved. As an example, the existence of these genetic modifiers in retinoblastoma have been suspected and searched in the pRB or p53 pathways in which MDM2 is a key regulator of both p53 and pRB catabolism. We have recently demonstrated that the minor allele of *MDM2* that includes a 309T>G transversion (SNP rs2279744) in the *MDM2* promoter is strongly associated under a recessive model with incidence of bilateral or unilateral retinoblastoma among members of retinoblastoma families (Castéra et al., 2010).

In the context of genetic counseling, the possibility of antenatal or even pre-implantation diagnosis can be proposed to couples with a 50% risk of transmitting an *RB1* gene mutation. The situation is obviously more delicate in families presenting an intrafamily heterogeneous risk, which makes genetic counseling more difficult. Although it appears impossible to reassure a parent with no history of retinoblastoma, but carrying an *RB1* mutation about the tumour risk for his/her offspring, it is very difficult to inform this subject about techniques allowing the birth of a mutation-free infant. It is therefore very important to continue the study of these families in order to improve genetic counseling in the context of retinoblastoma.

### 3. Molecular methods in genetic testing

#### 3.1 Overview

The molecular pathology of *RB1* is very diverse and about 500 distinct germline mutations have been described to date, some of which are listed in two databases managed by Dr Lohmann (<http://RB1-lsdb.d-lohmann.de>) and Dr Pestaña (<http://www.es.embnet.org/Services/MolBio/rbgmdb>). These mutations occur throughout the coding sequence and in the promoter region with the notable exception of the last 2 exons (figure 3). Most of these



*RB1* coding sequence is drawn to scale, and exons shown in grey are part of pocket domains A or B. Large deletions are represented as black lines.

Fig. 3. Pattern of mutations found in a series of 192 retinoblastoma patients (adapted from Houdayer et al., 2004)

mutations are *de novo* mutations. The spectrum of germline mutations mainly comprises nonsense mutations (about 40%), frameshift insertions or deletions of several bases (about 25%), altered splicing (about 20%) and chromosomal rearrangements, i.e. deletions/duplications of one or several exons, or even the entire gene (about 10%). The remaining mutations correspond to rare missense mutations and mutations of the promoter region. Variations of the relative proportions of these mutations have been reported, which can be explained by differences of the population studied, and environmental or stochastic factors, related to the high rate of *de novo* mutations (Dehainault et al., 2004, Alonso et al., 2001). Finally, constitutional inactivation of *RB1* can be due to exceptional cases of chromosomal rearrangements only visible on cytogenetics (e.g. translocations, inversions). These same types of alterations are also found in the tumour, as well as hypermethylation of the promoter region and large chromosomal losses comprising all of *RB1* and flanking regions (Richter et al., 2003). Tumoral events are now systematically searched when the tumor is available.

### 3.2 Materials

Analysis of the index case, which requires a larger amount of material, must be distinguished from that of relatives, in whom the search for a previously identified mutation requires less material.

#### 3.2.1 Study of the index case

Testing for germline *RB1* gene mutations is classically performed on DNA extracted from whole blood collected on EDTA. Two to 3 µg of genomic DNA are required for screening for point mutations and large mutations on the entire gene. Extraction can be performed with commercial kits or by phenol/chloroform or perchlorate/chloroform or salting out techniques (Johns&Paulus-Thomas, 1989, Miller et al., 1988).

When DNA is used for screening, RNA must also be available due to the frequency of splicing alterations. RNA analysis may be essential to demonstrate the impact of the presumptive mutation identified on genomic DNA. RNA is obtained from a blood sample collected on heparin, Acid Citrate Dextrose (ACD), or EDTA. Lymphoblastoid cell culture is an interesting option, as it provides an infinite source of nucleic acids, but it is expensive and requires cell culture facilities.

Finally, tumour DNA analysis is important for the molecular diagnosis of retinoblastoma. Samples fixed in Bouin's solution cannot be used, as this fixative degrades DNA, and frozen blocks are preferable to paraffin-embedded blocks. When the first-line analysis is performed on the tumour (see below), a sufficient amount of material must be available (2 to 3 µg). A small quantity is sufficient when looking for a known mutation and it is even possible to obtain genetic material by scratching a slide. Tumour DNA can be extracted with commercial kits or phenol/chloroform.

#### 3.2.2 Study of relatives

In this setting, genetic testing is designed to detect a previously identified mutation, and a small quantity of DNA is sufficient (about 50 ng) and can be extracted from buccal cells



collected by swabbing, a simple, noninvasive technique. FTA technology (Gaytmenn et al., 2002, Seah et al., 2003) is then the preferred method: swabs are applied onto FTA cards, buccal cells are then lysed and nucleic acids are immobilized and stabilized in the FTA matrix. The paper support is then punched out and the punch is washed and placed in the PCR reaction tube. Alternatively, buccal cells can be extracted from the swab by using standard commercial kits.

### 3.3 Methods

There are two types of diagnostic genetic molecular testing: direct testing and indirect testing.

#### 3.3.1 Direct testing

Direct testing consists of looking for a germline alteration of the *RB1* gene indicative of a predisposition to retinoblastoma. The first study performed in a family is time-consuming and generally takes several months. In contrast, when testing is performed to detect a mutation already identified in the family, targeted screening of the previously identified mutation takes only a few days. Direct testing is essentially performed on blood samples. It is good practice to verify the presence of a mutation on two DNA samples obtained independently: two blood samples taken at two different times, or a blood test and a buccal swab.

Direct testing can also be performed on the tumour. This screening can be very useful in bilateral cases in which no mutation is detected on leukocytes, but also for unilateral forms, as identification of a mutation only in the tumour would be very useful for genetic counselling, eliminating the risk of recurrence in siblings and cousins (but not in the offspring). Testing of tumour DNA is obviously subject to availability of material, i.e. enucleation.

The complexity of the mutational spectrum of the *RB1* gene requires analysis of the entire coding sequence and promoter region by several complementary techniques (see DNA methylation analysis).

##### 3.3.1.1 Detection of point mutations

Point mutations are usually investigated by Denaturing High Performance Liquid Chromatography (Xiao&Oefner, 2001, Dehainault et al., 2004) and/or direct DNA sequencing (Richter et al., 2003), or even Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (which is more complicated to perform) (Fodde&Losekoot, 1994) or Single Strand Conformational Polymorphism (low sensitivity) (Orita et al., 1989). Recently, we have adapted a novel HDA method (Houdayer et al., 2010) called Enhanced Mismatch Mutation Analysis (EMMA).

Regardless of the technique used, the gene is cut into amplicons corresponding to the exon sequence and intron/exon junctions in order to detect any abnormalities of splicing consensus sequences which can have major functional consequences.

DHPLC is an adaptation of high performance liquid chromatography for DNA applications, used for the detection of point mutations. It is based on the principle of physical separation, under denaturing conditions, of various DNA fragments in a mobile phase by differential



retention on a solid phase composed of a DNA column. DHPLC has a high sensitivity, making it a very useful tool in retinoblastoma for the study of tumours or mosaics, which are not uncommon. DHPLC is able to detect less than 20% of the minority allelic species, which corresponds to the accepted limit for sequencing. The limitations of DHPLC depend on the base composition of the DNA fragment studied (see “Notes” section).

EMMA is based on the use of innovative matrices increasing the electrophoretic mobility differences between homoduplex and heteroduplex. DNA Sensitivity is further improved by using nucleosides as additives to enhance single-base substitution detection. Nucleosides are expected to interact with mismatched bases of heteroduplexes, thereby increasing mobility differences with homoduplexes. Moreover, this method, in combination with adapted semiquantitative PCR conditions, can be used to simultaneously detect point mutations and large-scale rearrangement in a single run (Weber et al., 2006, Weber et al., 2007). This feature, combined with the use of a single set of separation conditions for all fragments and with the multiplexing capability of the method, leads to a considerable simplification and cost reduction compared to previous methods (Caux-Moncoutier et al., 2010).

Direct sequencing is the second option and is considered to be the reference technique. However, its performances are highly dependent on the apparatus, chemistry, polymers and software used. A study comparing DHPLC and direct sequencing for BRCA1 analysis concluded on a similar detection rate for the two techniques (Alonso et al., 2001).

Direct testing is also performed on RNA to characterize any abnormal splicing. Classically, after extraction of RNA and RT PCR, the cDNA region surrounding the putative anomaly is amplified to demonstrate abnormal transcripts. The instability of messenger RNA carrying a premature stop codon, or NMD (Holbrook et al., 2004), constitutes a real problem in diagnostic molecular genetics and is discussed in the “Notes” section.

### **3.3.1.2 Detection of chromosomal rearrangements**

Chromosomal rearrangements, i.e. deletion/duplication of one or several exons, cannot be detected by the techniques used to detect point mutations because the mutant allele is masked by the wild-type allele, as the retinoblastoma susceptibility gene segregates according to an autosomal dominant mode.

Specific gene assay techniques must be used in order to distinguish 2 copies of the target (wild-type status), one copy (deletion) or 3 copies (duplication). Semiquantitative techniques, such as Quantitative Multiplex PCR of Short fluorescent Fragments (QMPSF), Multiplex PCR/liquid chromatography assay (MP/LC) (Duponchel et al., 2001, Dehainault et al., 2004), and Multiplex Ligation Probe Amplification (MLPA) (Schouten et al., 2002) or quantitative techniques, i.e. real-time PCR, are used. QMPSF is a technique allowing simultaneous, semiquantitative amplification of several exons; the intensity of the signal obtained therefore depends on the number of copies of the gene of interest in the matrix DNA. After amplification of the exons followed by separation of the PCR products obtained by electrophoresis, the patient electrophoretograms are compared to those of normal and mutant controls. The signal intensity in the various samples is then evaluated and deletions of one or several amplicons are revealed by a 50% reduction of the corresponding peak(s). Data can be exported to an Excel spreadsheet and analysed by a macro. The advantage of

QMPSF and other semiquantitative multiplex PCR approaches is their high throughput and the small number of analytical steps, which is always appreciated in the diagnostic setting.

Another widely used semiquantitative technique, MLPA, is based on a step of hybridization of specific probes, fitted with a universal tail, and corresponding to the exons to be examined. The quantity of probe hybridized is therefore proportional to the quantity of target. After hybridization and ligation, probes are then amplified by PCR with a set of universal primers and PCR products are separated by capillary electrophoresis. Once again, the signal intensity, compared to that of normal and mutant controls, is used to detect chromosomal rearrangements. Despite a much higher multiplexing capacity, the throughput of MLPA is lower than that of semiquantitative multiplex PCR approaches due to an additional analytical step (ligation), but the advantage of this technique is that it is available in the form of ready-for-use kits for many genes including *RB1*.

These two approaches have similar performances and the choice between the two therefore depends on the user's priorities.

Real-time PCR techniques are particularly suitable for gene assays. They are based on either i) incorporation of a free fluorophore (typically SYBR Green) into the forming strands, which generates an increase in the intensity of fluorescence with the number of copies produced. The sensitivity of these techniques is enhanced by the use of fluorophore-labelled specific probes. Unfortunately, they have a low throughput, limited by the number of fluorophores available and are therefore not widely used for screening, especially as this low throughput is not justified by the gain in sensitivity.

An approach combining the search for point mutations and chromosomal rearrangements achieves a germline *RB1* gene mutation detection rate of about 90% among patients with bilateral retinoblastoma (Richter et al., 2003). The mutations that are not detected are probably deep intronic anomalies, responsible for alternative splicing defects that are not detected because they are situated outside of the zones usually studied (Dehainault et al., 2007). They can also correspond to mosaics, which cannot be detected on circulating leukocytes (see "Notes" section).

### 3.3.1.3 DNA methylation analysis

Hypermethylation of the promoter region is a common mutational event found in tumor (Richter et al., 2003). Hypermethylation of the promoter are investigated by bisulfite analysis followed either by sequencing, by methylation-specific PCR or by a quantitative analysis of methylated allele using specific Taqman® probes (De La Rosa-Velazquez et al., 2007, Richter et al., 2003, Zeschnigk et al., 2004). Alternatively, tumor DNA can be digested using methylation sensitive enzyme (CfoI as an example), followed by PCR amplification of the promoter and agarose gel electrophoresis or followed by a semiquantitative technique such as QMPSF (Taylor et al., 2007).

### 3.3.2 Indirect testing

Indirect testing is based on amplification of polymorphic markers of the *RB1* locus. Analysis of polymorphic genetic markers localized in and around the *RB1* gene in an affected child and his parents is designed to identify the *RB1* allele carrying or putatively carrying a predisposition to retinoblastoma. Indirect tests are very useful in familial cases, when

samples are available for at least two cases of retinoblastoma, to identify the allele of the *RB1* gene common to affected cases, i.e. to determine the allele that carries the mutation, even when the mutation has not been demonstrated directly. In non-familial forms, reconstitution of the affected child's alleles reveals the two alleles putatively associated with an alteration of the *RB1* gene. Tumour DNA studies (when available) reveal loss of an allele in 65% of cases and consequently allow identification of the remaining allele, i.e. potentially carrying a germline mutation. The indirect approach is technically simple and rapid, but nevertheless requires testing of the affected child, the parents, and possibly other relatives.

### 3.3.3 Cytogenetic analysis

Cytogenetic analysis comprises a standard karyotype and analysis of the *RB1* gene by FISH or CGH-array. The development of molecular genetic studies has considerably limited the applications of cytogenetics and its only first-line indication is for karyotyping in a child with mental retardation or a malformative syndrome associated with retinoblastoma. However, it remains useful for the detection of translocations and mosaic deletions and can help to estimate the size of very large deletions. It therefore reveals certain rare situations.

High density CGH array may be useful for fine mapping of deletion breakpoints in a context of a contiguous gene syndrome (Mitter et al., 2011)

## 3.4 Notes

### 3.4.1 General problems

#### 3.4.1.1 GC-rich regions

The 5' part of the *RB1* gene (promoter and exon 1) is particularly rich in GC, which can make it difficult to analyse, for the detection of both point mutations and rearrangements. Due to the high degree of similarity of the amplified region, nonspecific intrastrand base pairing tends to occur during PCR, resulting in nonspecific PCR. Consequently, some teams do not analyse this region, which makes the analysis incomplete, as mutations of the promoter region and exon 1 have been well documented. We have resolved these problems by the addition of dimethylsulfoxide (DMSO) to the reaction medium.

#### 3.4.1.2 Mosaics

The existence of somatic mosaics in retinoblastoma raises a major problem for molecular diagnosis, as the mutant clone may be below the limit of detection of the technique used, or may even be absent from the cells studied. We have identified a deleterious *RB1* mutation from a blood sample of an affected child in whom tumour material was not available. Surprisingly, this mutation was detected in a very small percentage (estimated at 10%) of buccal cells. DHPLC is particularly useful in this context because of its high sensitivity, but characterization of the anomaly by sequencing remains problematical and requires specific techniques (fraction collector, specific primers, cloning, etc.).

#### 3.4.1.3 Abnormalities of splicing

Splicing abnormalities represent 20% of the mutational spectrum of *RB1* and are therefore important to characterize. Unfortunately, the instability of messenger RNA carrying a premature stop codon means that the truncated messenger RNA is below the limit of

detection and only the wild-type transcript will be visible, wrongly suggesting the absence of an anomaly. This problem can sometimes be resolved by using translation inhibitors, such as puromycin, which eliminate NMD and therefore improve detection of the truncated messenger RNA (Andreutti-Zaugg et al., 1997).

Some deep intronic anomalies, responsible for alternative splicing, are probably not detected because they are situated outside the zones routinely studied. Systematic RNA analysis would be required to demonstrate these anomalies. This approach, unsuitable for routine testing, is nevertheless used in the case of failure of other techniques in situations of highly probable predisposition, such as cases of bilateral and/or familial retinoblastoma with no identified mutation (Dehainault et al., 2007).

### 3.4.2 Detection of point mutations by DHPLC

DHPLC is a sensitive and reliable technique for the detection of point mutations. However, its efficacy is subject to the availability of specific, high-yield PCR and rigorous system quality control, as the gradient drift can impair the quality of testing by modifying retention times and, much more insidiously, loss of calibration, even minimal, of the oven can be responsible for a drastic reduction of resolution for certain amplicons, generating false-negative results. It is therefore essential to ensure the integrity of the system each day by using control samples. Control samples should generate slight modifications of the profile, which can therefore only be detected with an optimally functioning system. The limitations of this method, which depend on the base composition of the DNA fragment studied, must be kept in mind. For example, despite all of our efforts, we have not been able to obtain reliable results for exon 8 of *RB1*, which must be sequenced as first-line procedure (Dehainault et al., 2004). This point has also been emphasized by P. Oefner, the inventor of DHPLC (Sivakumaran et al., 2005).

### 3.4.3 Detection of chromosomal rearrangements by semiquantitative techniques

MLPA or semiquantitative multiplex PCR techniques (such as QMPSF) are robust techniques, but highly dependent on the quality of the DNA studied. Degraded DNA will be responsible for loss of proportionality between signal intensity and copy number, particularly for large fragments, making the analysis uninterpretable. Contamination of DNA by phenol will have an even greater effect, because it generates a random fluctuation of signal intensity. Phenol-free extraction techniques should therefore be preferred (perchlorate/chloroform or column-based commercial kits) or a system ensuring the absence of contamination by phenol such as the gel lock extraction system, which uses a gel-barrier system (Eppendorf®).

It is also essential to adjust all DNA samples studied to a suitable working concentration, classically 50 ng/μl. If the DNA concentration is too high, for example, the proportionality between signal intensity and copy number will be lost, particularly for small fragments. DNA calibration can be performed with: i) a tube spectrophotometer (unsuitable for large series); ii) the NanoDrop from NanoDrop technologies (which has the advantage of tracing the spectrum of the sample); or iii) a plate reader (rapid, but reading at only one wavelength at a time). In our experience, the use of fluorescent dyes for the assay, such as PicoGreen (Molecular Probes), is unnecessary for these applications.

Finally, buccal swabs are poorly adapted to these analyses, including for the search of a mutation already identified in a relative, as DNA is often present in a low concentration and difficult to calibrate for FTA samples.

Due to the importance of quality/quantity/calibration of DNA solutions, laboratories often prefer to extract DNA locally and therefore ask to receive whole blood.

A classical trap in the interpretation of these techniques concerns the false-positive results generated by a PCR primer mismatch. Each deletion of a single exon must therefore be systematically checked by another technique and/or by shifting the primers (long range PCR, RNA studies, real-time PCR, for example). Finally, duplication of an isolated exon is the most difficult case to characterize. The ideal situation is therefore to have a duplicated control of the entire *RB1*, for example DNA from a case of trisomy 13.

#### 4. Conclusion

Finally, we recommend a systematic *RB1* molecular screening to all retinoblastoma patients as part of routine clinical care. Emphasis is placed on close collaboration between laboratory staff and clinicians to ensure effective communication and therefore adequate genetic counseling.

#### 5. Acknowledgments

We thank Christine Levy, Livia Lumbroso, Jean Michon, Isabelle Aerts, Gudrun Schleiermacher, Daniel Orbach, Hélène Pacquement, Jérôme Couturier, Catherine Dehainault, Dorothe e Michaux for participating in Institut Curie Retinoblastoma pluridisciplinary group. This work was supported by grants from the Programme Incitatif et Coopératif sur le Rétinoblastome (Institut Curie) and RETINOSTOP.

#### 6. References

- Abramson DH, Mendelsohn ME, Servodidio CA, et al. (1998). Familial retinoblastoma: where and when? *Acta Ophthalmol Scand* 76, pp 334-8
- Albrecht P, Ansperger-Rescher B, Schuler A, et al. (2005). Spectrum of gross deletions and insertions in the *RB1* gene in patients with retinoblastoma and association with phenotypic expression. *Hum Mutat* 26, pp 437-45
- Alonso J, Garcia-Miguel P, Abelairas J, et al. (2001). Spectrum of germline *RB1* gene mutations in Spanish retinoblastoma patients: Phenotypic and molecular epidemiological implications. *Hum Mutat* 17, pp 412-22
- Andreutti-Zaugg C, Scott RJ, Iggo R. (1997). Inhibition of nonsense-mediated messenger RNA decay in clinical samples facilitates detection of human *MSH2* mutations with an in vivo fusion protein assay and conventional techniques. *Cancer Res* 57, pp 3288-93
- Baud O, Cormier-Daire V, Lyonnet S, et al. (1999). Dysmorphic phenotype and neurological impairment in 22 retinoblastoma patients with constitutional cytogenetic 13q deletion. *Clin Genet* 55, pp 478-82
- Bremner R, Chen D, Pacal M, et al. (2004). The *RB* protein family in retinal development and retinoblastoma: new insights from new mouse models. *Dev Neurosci* 26, pp 417-34,
- Castera L, Sabbagh A, Dehainault C, et al. (2010). *MDM2* as a modifier gene in retinoblastoma. *J Natl Cancer Inst* 102, pp 1805-8



- Caux-Moncoutier V, Castera L, Tirapo C, et al. (2010). EMMA, a cost- and time-effective diagnostic method for simultaneous detection of point mutations and large-scale genomic rearrangements: application to BRCA1 and BRCA2 in 1,525 patients. *Hum Mutat*,
- Chau BN Wang JY. (2003). Coordinated regulation of life and death by RB. *Nat Rev Cancer* 3, pp 130-8,
- Classon MH Harlow E. (2002). The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nat Rev Cancer* 2, pp 910-7
- Comings DE. (1973). A general theory of carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70, pp 3324-8
- De La Rosa-Velazquez IA, Rincon-Arango H, Benitez-Bribiesca L, et al. (2007). Epigenetic regulation of the human retinoblastoma tumor suppressor gene promoter by CTCF. *Cancer Res* 67, pp 2577-85
- Dehainault C, Lauge A, Caux-Moncoutier V, et al. (2004). Multiplex PCR/liquid chromatography assay for detection of gene rearrangements: application to RB1 gene. *Nucleic Acids Res* 32, pp e139
- Dehainault C, Michaux D, Pages-Berhouet S, et al. (2007). A deep intronic mutation in the RB1 gene leads to intronic sequence exonisation. *Eur J Hum Genet* 15, pp 473-7,
- Draper GJ, Sanders BM Kingston JE. (1986). Second primary neoplasms in patients with retinoblastoma. *Br J Cancer* 53, pp 661-71
- Duponchel C, Di Rocco C, Cicardi M, et al. (2001). Rapid detection by fluorescent multiplex PCR of exon deletions and duplications in the C1 inhibitor gene of hereditary angioedema patients. *Hum Mutat* 17, pp 61-70
- Fletcher O, Easton D, Anderson K, et al. (2004). Lifetime risks of common cancers among retinoblastoma survivors. *J Natl Cancer Inst* 96, pp 357-63,
- Fodde RLosekoot M. (1994). Mutation detection by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Hum Mutat* 3, pp 83-94
- Friend SH, Bernards R, Rogelj S, et al. (1986). A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 323, pp 643-6
- Gaytmenn R, Hildebrand DP, Sweet D, et al. (2002). Determination of the sensitivity and specificity of sibship calculations using AmpF ISTR Profiler Plus. *Int J Legal Med* 116, pp 161-4
- Harbour JW. (2001). Molecular basis of low-penetrance retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 119, pp 1699-704
- Holbrook JA, Neu-Yilik G, Hentze MW, et al. (2004). Nonsense-mediated decay approaches the clinic. *Nat Genet* 36, pp 801-8
- Houdayer C, Gauthier-Villars M, Lauge A, et al. (2004). Comprehensive screening for constitutional RB1 mutations by DHPLC and QMPSF. *Hum Mutat* 23, pp 193-202
- Houdayer C, Moncoutier V, Champ J, et al. (2010). Enhanced mismatch mutation analysis: simultaneous detection of point mutations and large scale rearrangements by capillary electrophoresis, application to BRCA1 and BRCA2. *Methods Mol Biol* 653, pp 147-80
- Johns MB, Jr. Paulus-Thomas JE. (1989). Purification of human genomic DNA from whole blood using sodium perchlorate in place of phenol. *Anal Biochem* 180, pp 276-8
- Klutzn M, Brockmann D Lohmann DR. (2002). A parent-of-origin effect in two families with retinoblastoma is associated with a distinct splice mutation in the RB1 gene. *Am J Hum Genet* 71, pp 174-9
- Knudson AG, Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, pp 820-3
- Lele KP, Penrose LS Stallard HB. (1963). Chromosome Deletion in a Case of Retinoblastoma. *Ann Hum Genet* 27, pp 171-4

- Lohmann DR, Brandt B, Hopping W, et al. (1994). Distinct RB1 gene mutations with low penetrance in hereditary retinoblastoma. *Hum Genet* 94, pp 349-54
- Lohmann DR, Gallie BL. (2004). Retinoblastoma: revisiting the model prototype of inherited cancer. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 129, pp 23-8
- Miller SA, Dykes D, Polesky HF. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16, pp 1215
- Mitter D, Ullmann R, Muradyan A, et al. (2011). Genotype-phenotype correlations in patients with retinoblastoma and interstitial 13q deletions. *Eur J Hum Genet* 19, pp 947-958, 1476-5438 (Electronic) 1018-4813 (Linking).
- Moll AC, Imhof SM, Bouter LM, et al. (1996). Second primary tumors in patients with hereditary retinoblastoma: a register-based follow-up study, 1945-1994. *Int J Cancer* 67, pp 515-9
- Moll AC, Imhof SM, Meeteren AY, et al. (2000). At what age could screening for familial retinoblastoma be stopped? A register based study 1945-98. *Br J Ophthalmol* 84, pp 1170-2
- Musarella MA, Gallie BL. (1987). A simplified scheme for genetic counseling in retinoblastoma. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 24, pp 124-5
- Onadim Z, Hogg A, Baird PN, et al. (1992). Oncogenic point mutations in exon 20 of the RB1 gene in families showing incomplete penetrance and mild expression of the retinoblastoma phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, pp 6177-81
- Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, et al. (1989). Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5, pp 874-9
- Richter S, Vandezande K, Chen N, et al. (2003). Sensitive and efficient detection of RB1 gene mutations enhances care for families with retinoblastoma. *Am J Hum Genet* 72, pp 253-69,
- Sanchez-Sanchez F, Ramirez-Castillejo C, Weekes DB, et al. (2007). Attenuation of disease phenotype through alternative translation initiation in low-penetrance retinoblastoma. *Hum Mutat* 28, pp 159-67,
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, et al. (2002). Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 30, pp e57,
- Seah LH, Jeevan NH, Othman MI, et al. (2003). STR Data for the AmpFISTR Identifiler loci in three ethnic groups (Malay, Chinese, Indian) of the Malaysian population. *Forensic Sci Int* 138, pp 134-7,
- Sivakumaran TA, Shen P, Wall DP, et al. (2005). Conservation of the RB1 gene in human and primates. *Hum Mutat* 25, pp 396-409,
- Taylor M, Dehainault C, Desjardins L, et al. (2007). Genotype-phenotype correlations in hereditary familial retinoblastoma. *Hum Mutat* 28, pp 284-93,
- Weber J, Looten R, Houdayer C, et al. (2006). Improving sensitivity of electrophoretic heteroduplex analysis using nucleosides as additives: Application to the breast cancer predisposition gene BRCA2. *Electrophoresis* 27, pp 1444-52,
- Weber J, Miserere S, Champ J, et al. (2007). High-throughput simultaneous detection of point mutations and large-scale rearrangements by CE. *Electrophoresis* 28, pp 4282-8,
- Xiao W, Oefner PJ. (2001). Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. *Hum Mutat* 17, pp 439-74,
- Zeschmig M, Bohringer S, Price EA, et al. (2004). A novel real-time PCR assay for quantitative analysis of methylated alleles (QAMA): analysis of the retinoblastoma locus. *Nucleic Acids Res* 32, pp e125,
- Zhu L. (2005). Tumour suppressor retinoblastoma protein Rb: a transcriptional regulator. *Eur J Cancer* 41, pp 2415-27,