

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

Année 2003

N° d'ordre : 3287

THESE

de DOCTORAT d'UNIVERSITE

**pour l'obtention du grade de
DOCTEUR EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

présentée par

Sylvie VINCENT



**INTERETS DES GENES A HOMEODOMAINES PAX-6 ET ENGRAILED-2
DANS LE DIAGNOSTIC ET LE PRONOSTIC DES TUMEURS
NEUROECTODERMIQUES PRIMITIVES HUMAINES**

Soutenu le 23 mai 2003 devant la commission d'examen

Jury

Président : Monsieur le Professeur Xavier Desbiens

Rapporteurs : Madame le Docteur Antoinette Gelot

Madame le Docteur Sylvie Mazan

Examineur : Monsieur le Professeur Patrick Dhellemmes

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur Simon Saule

Co-Directeur de thèse : Madame le Professeur Marie-Magdeleine Ruchoux

"L'imagination est plus importante que la connaissance."

Einstein

"Il y a des nuls parts qui sont au cœur des choses."

A mes petits monstres préférés,
Manon, Fanny et Chloé.

Remerciements

Madame le Professeur Marie-Magdeleine Ruchoux,

Je trouve ici l'occasion de vous remercier de m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire, d'avoir accepté de suivre mes travaux avec beaucoup d'intérêt, en me prodiguant des conseils toujours bienveillants et me consacrant votre temps, votre patience. Vous me faites l'honneur et le plaisir de siéger dans ce jury, soyez assurée de ma respectueuse et très sincère gratitude.

Monsieur le Docteur Simon Saule,

Je vous remercie très sincèrement d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse, d'avoir cru en ce sujet. Merci de m'avoir permis de mener ce travail avec vos anticorps. Je vous suis grée de votre soutien et vos encouragements ainsi que pour vos corrections minutieuses de ce manuscrit.

Monsieur le Professeur Xavier Desbiens,

Vous me faites l'honneur de présider le jury de cette thèse, veuillez trouver ici l'expression des mes sincères remerciements et soyez assuré de ma profonde gratitude.

Madame le Docteur Antoinette Gelot et Madame le Docteur Sylvie Mazan,

Je suis particulièrement honorée que vous ayez accepté de juger cette thèse en qualité de rapporteurs. Soyez assurées de mes profonds remerciements.

Monsieur le Professeur Patrick Dhellemmes,

Je tiens à vous remercier tout particulièrement d'avoir accepté d'examiner cette thèse, d'avoir toujours été disponible lorsque j'avais besoin de renseignements sur vos patients.

Le personnel de Lille I qui se reconnaîtra et † Monsieur André Verbert,

Je profite de cette occasion pour vous remercier sincèrement pour votre soutien et pour tous vos conseils avisés. Je vous remercie d'avoir suivi mon cursus ainsi que l'avancement de ce travail avec beaucoup d'intérêt.

Tout le personnel du laboratoire de Neuropathologie,

Je remercie tout le personnel du laboratoire pour le soutien et la gentillesse que vous avez témoignée à mon égard. De m'avoir initié les ficelles et les tours de main des techniques histologiques et immunohistochimiques.

Christophe, Manue, Jean-Luc, Catherine, Sylvie et Marie,

Pour m'avoir toujours soutenue, d'être présents lorsque j'avais besoin de vous et de m'avoir "bottée les fesses" lorsque l'occasion s'en faisait sentir. Je vous en remercie et surtout restez fidèles à vous-mêmes.

Mes parents, mes sœurs et frère Anne, Lise et Thierry,

Pour avoir toujours cru en moi sans défaillance mais avec patience. Pour tous les conseils pratiques et techniques dans la mise en page de ce manuscrit prodigué par mon petit frère.

SOMMAIRE

Abréviations	9
Glossaire	11
Liste des figures	14
Liste des tableaux	15
INTRODUCTION	
I. Prolifération cellulaire	17
1.1. Oncogènes	17
1.1.1. Les facteurs de croissance	
1.1.2. Les récepteurs membranaires	
1.1.3. Les molécules de la transduction du signal	
1.1.4. Facteurs de transcription	
1.1.4.1. Le domaine Homéo	
1.1.4.2. Le domaine Paired	
1.2. Cycle cellulaire	23
1.3. Régulateurs	24
1.3.1. Les cyclines et les cyclines dépendantes des kinases	
1.3.2. Les inhibiteurs des CDKs	
1.3.2.1. Famille CIP/KIP	
1.3.2.2. Famille INK4	
1.3.3. Les produits des gènes anti-oncogènes	
1.3.4. Caractère "multi-étapes" de la cancérogenèse	
II. Apoptose	27
2.1. Définition et contrôle	28
2.2. Rôle de l'apoptose	29
2.2.1. Au cours du développement	
2.2.2. A l'âge adulte	
2.2.3. Dans les cancers	
III. Développement et organisation du SNC humain	31
3.1. Mise en place du tube neural	31
3.1.1. La gastrulation	
3.1.2. La neurulation	
3.1.3. La polarisation du tissu nerveux	
3.1.3.1. Gradient caudo-rostral	
3.1.3.2. Gradient dorso-ventral	
3.2. Du tube neural au cerveau	36
3.2.1. Le télencéphale	
3.2.1.1. Histogenèse (phase de construction)	
3.2.1.1.1. Neurogenèse	
3.2.1.1.2. Migration	
3.2.1.1.3. Formation du plateau cortical	
3.2.1.1.4. Mise en place des faisceaux d'axones	
3.2.1.2. Morphogenèse cérébrale (phase de construction)	
3.2.1.3. Phase de construction fonctionnelle : deuxième moitié de la grossesse	
3.2.1.3.2. Histogenèse de la 27 ^e SG au terme	
3.2.1.3.2. Gyration cérébrale	
3.2.2. Développement du tronc et du cervelet	

3.3. L'œil	48
3.3.1. Développement de l'œil	
3.3.2. Développement de la rétine	
3.3.3. Facteurs de transcription exprimés dans le développement de l'œil	
IV. Différenciation	52
4.1. Gènes de développement	53
4.1.1. Les gènes homéotiques	
4.1.1.1. Les gènes homéotiques chez la drosophile	
4.1.1.2. Conservation des gènes à homéodomaine	
4.1.1.3. Classification des protéines à homéodomaine	
4.2. Les gènes Pax	55
4.2.1. Famille des gènes Pax	
4.2.2. Expression au cours du développement	
4.2.3. La sous-classe Pax-2, 5 et 8	
4.3. Pax-6	58
4.3.1. Expression au cours du développement	
4.3.2. Altérations de Pax-6 chez la souris et l'homme	
4.3.3. Potentiel oncogénique	
4.4. Engrailed	65
4.4.1. Rôle au cours du développement neural	
4.4.2. Engrailed, un répresseur transcriptionnel	
4.4.3. Localisation extra-nucléaire	
4.4.4. Engrailed et Pax-6	
4.4.5. Engrailed et les cellules de Purkinje	
V. Les tumeurs embryonnaires du SNC humain	68
5.1. Historique, histogenèse, classification historique	69
5.2. Classification mondiale	69
5.3. Epidémiologie	70
5.4. Les tumeurs embryonnaires	70
5.4.1. Historique	
5.4.2. Les marqueurs des tumeurs	
5.4.3. Immunohistochimie et Histogenèse	
5.5. Médulloblastome	73
5.5.1. Histogenèse	
5.5.2. Clinique	
5.5.3. Histologie	
5.5.4. Critères de pronostic	
5.5.5. Evolution	
5.5.6. Génétique	
5.5.6.1. L'isochromosome 17q	
5.5.6.2. Chromosome 1	
5.5.6.3. Les autres chromosomes	
5.5.7. Divers mécanismes d'oncogenèse proposés	
5.6. Le rétinoblastome	81
5.6.1. Clinique	
5.6.2. Histologie	
5.6.3. Génétique moléculaire	
5.6.4. Evolution	
MATERIEL ET METHODE	
I. Patients	86
1.1. Dossiers analysés	

1.2. Dossiers cliniques	
1.3. Rétinoblastomes	
II. Prélèvement, fixation	87
2.1. Prélèvement	
2.2. Fixation	
III. Différents traitements des blocs	88
3.1. Inclusion, coupe, étalement	
3.1.1. Inclusion	
3.1.2. Coupe et étalement	
3.2. Déparaffinage et réhydratation	
3.3. Coloration	
IV. Immunohistochimie	89
4.1. Anticorps primaires de routine	
4.2. Anticorps primaires de recherche	
4.3. Révélation et montage	
4.4. Témoins	
V. Cotation des résultats	91
5.1. Anticorps de routine	
5.2. Ki-67	
5.3. PAX-6 et EN-2	
5.4. Etude statistique	
RESULTATS	
I. Résultats histologiques	102
1.1. Les dossiers cliniques	
1.2. Premières constatations	
II. Résultats immunohistochimiques	103
2.1. Marqueurs de différenciation	103
2.1.1. Marqueurs de différenciation gliale	
2.1.2. Marqueurs de différenciation neuronale	
2.1.3. Marqueurs de mémoire épithéliale	
2.2. Index de prolifération	105
2.3. PAX-6 et EN-2	105
2.3.1. PAX-6	
2.3.2. EN-2	
2.3.3. Relation entre PAX-6 et EN-2	
2.3.3.1. PAX-6 et EN-2 positifs	
2.3.3.2. PAX-6 et EN-2 négatifs	
III. Western blot	110
IV. Corrélations entre les différents résultats	110
4.1. PAX-6, EN-2 comparés aux différenciations dans la tumeur	111
4.1.1. PAX-6	
4.1.2. EN-2	
4.2. Survie, PAX-6, EN-2	111
4.2.1. Survie	
4.2.2. Les enfants	
4.2.3. Les adultes	
V. Quelques médulloblastomes particuliers	113
5.1. Médulloblastome à grandes cellules	
5.2. PNET multidifférenciée	
5.3. Médulloépithéliome ayant une longue survie	
5.4. Médulloblastomes et Calbindin-D _{28k}	

VI. Rétinoblastomes	118
ARTICLES	
Article I :	132
Differential expression between PAX-6 and EN proteins in medulloblastoma.	
Article II :	142
Large-cell medulloblastoma with arrestin-like protein expression.	
Article III :	151
Intracerebral medulloepithelioma with a long survival.	
Article IV :	160
Calbindin-D _{28k} : a marker of recurrence for medulloblastomas.	
DISCUSSION	171
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	182
BIBLIOGRAPHIE	184
LISTE DES PUBLICATIONS	206
SUMMARY	207

Mots clés : gènes de développement, PNET, Pax-6, En-2, immunohistochimie.

ABREVIATIONS

aa	acide aminé
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AEV	Virus de l'Erythroblastose Aviaire
AFA	Acide acétique Formol Alcool
AIF	Apoptosis Inducing Factor
AN	ANiridie
Antp	Antennapedia
APAF	Apoptosis Protease-Activating Factor
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	ARN messenger
Bcd	Bicoïd
BMP	Bone Morphogenetic Protein
CAM	Molécules d'Adhésion Cellulaire
CCG	Couche des Cellules Ganglionnaires
cCR	Cajal-Retzius
CDK	Cyclin Dependent Kinase
CED	cell death
CGE	Couche des Grains Externes
CGEr	Couche Granulaire Externe
CGI	Couche des Grains Internes
CGIr	Couche Granulaire Interne
CGH	Hybridation Génomique Comparative
CKI	Cyclin dependent Kinase Inhibitor
CN	Crête Neurale
CNE	Couche Nucléaire Externe
CNI	Couche Nucléaire Interne
CPE	Couche Plexiforme Externe
CPI	Couche Plexiforme Interne
CPM	Cellules Post-Mitotiques
Crx	Cone rod homeobox
E	jour embryonnaire
ED	Eau Distillée
EGF	Epidermal Growth Factor
En	Engrailed
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
Ey	Eyeless
FGF	Fibroblast Growth Factor
FISH	Fluorescence In Situ Hybridation
Gr	Gray
Gsb	Gooseberry
Gsb d	Gooseberry distal
Gsb n	Gooseberry neuro
Gsb p	Gooseberry proximal
HD	Homéodomaine
HE	Hemalun Eosine
HITC	Hypertension intra crânienne
HOM-C	HOMeotic Complex
Hox	Homeobox

HLH	Helix-Loop-Helix (hélice-boucle-hélice)
HTH	Helix-Turn-Helix (hélice-coude-hélice)
IRM	Imagerie par résonance magnétique
kb	kilobase
kDa	kilodalton
KIP	Kinase Inhibiting Protein
LCR	liquide céphalorachidien
MAP kinases	Mitogen-Activated Protein kinases
MB	Médulloblastome
ME	Médulloépithélium
Mitf	Microphthalmia-associated Transcript Factor
NGF	Nervous Growth Factor
OCT	octapeptide
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAX	PAired boX
pb	paire de base
PBS	Phosphate Buffer Sulfate
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PNET	Primitive NeuroEctodermal Tumor
POU	Pit-1, Oct-2 (et Oct-1), Unc-86
Pox m	Pox meso
Pox n	Pox neuro
PRD	domaine Paired
QNR	Quail neuroretina (neurorétine de caille)
Rb	rétinoblastome
RPE	Reticulum Pigmentaire Epithelial
Sey	Small eye
SG	Semaine de Gestation
Shh	Sonic HedgeHod
SN	Système Nerveux
SNC	Système Nerveux Central
TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumor Necrosis Factor
Tp	Tampon
V 4	4 ^e Ventricule
VIP	Vasoactive Intestinal Peptide
Waf1/Cip1	Wild type p53-activated fragment et Cdk2 inhibitive protein
Wnt	Wingless
ZV	Zone Ventriculaire

Les anticorps utilisés :

GFAP	Glial Filament Anticorps protein	Ag S	Antigène S
NF	NeuroFilament	Chromo	Chromogranine
NSE	Neurone Specific Enolase	Cyto K	Cytokératine
S 100	protéine S 100	MIB	Ki-67
Synapto	Synaptophysine	Vim	Vimentine
EMA	Antigen epithelial membranaire		

GLOSSAIRE

Agénésie : absence d'un organe consécutive à l'absence d'ébauche embryonnaire.

Anaplasie : perte de la différenciation cellulaire.

Anisocaryose : modification de la taille et de la forme du noyau d'une cellule.

Anophtalmie : désigne une absence d'œil.

Aplasia : absence de développement d'une ébauche embryonnaire.

Apoptose : mécanisme de mort cellulaire programmée.

Astrocyte : cellule gliale qui maintient les neurones et assure la régulation de l'environnement extracellulaire chimique et ionique.

Ataxie : mouvement mal coordonné et inapproprié, parfois associé à un dysfonctionnement cérébelleux.

Atrophie cellulaire : une diminution réversible du volume cellulaire.

Cellule amacrine : neurone situé dans la couche plexiforme interne de la rétine.

Cellule bipolaire : cellule qui connecte les photorécepteurs aux cellules ganglionnaires.

Cellule de Purkinje : cellule du cortex cérébelleux qui innerve les noyaux profonds du cervelet.

Cervelet : structure dérivée du rhombencéphale, rattachée au tronc cérébral et au pont.

Colobome : malformation se caractérisant par une fissure (fente) pouvant siéger à différents niveaux de l'organisme.

Cortex cérébelleux : couche de substance grise, située sous la surface de la pie-mère dans le cervelet.

Desmoplasie : formation et développement d'un tissu fibreux.

Dysplasie : organisation anormale des cellules composant un tissu pouvant atteindre un seul organe ou plusieurs organes.

Glie radiaire : cellule gliale du cerveau embryonnaire qui envoie un prolongement de la zone ventriculaire à la surface du cerveau, le long duquel se fait la migration des neurones immatures et des cellules gliales.

Hétérotopie : ectopie ou emplacement anormal d'un organe ou d'un tissu.

Holoprosencéphalie : anomalie due à un défaut de développement de la partie antérieure de l'encéphale, associée à une malformation de la région médiane de la face.

Hyperplasie : augmentation de la masse d'un tissu, d'un organe ou d'une portion d'organe due à une augmentation anormale du nombre de ces cellules, sans modification de

l'architecture. Elle est souvent associée à une hypertrophie cellulaire et à une hyperactivité fonctionnelle. Elle peut être physiologique ou pathologique.

Hypertrophie cellulaire : augmentation réversible de la taille cellulaire liée à une augmentation du volume ou du nombre de ses constituants.

Hypoplasie : insuffisance de développement d'un organe ou d'un tissu composant un organe.

LCR : liquide céphalo-rachidien produit par les plexus choroïdes qui s'écoule à travers le système ventriculaire, dans l'espace subarachnoïdien.

Médulloblastome : tumeur de blastème maligne rencontrée surtout chez l'enfant, siégeant dans la fosse postérieure, au niveau du vermis cérébelleux avec infiltration dans la cavité du quatrième ventricule. Les métastases sont fréquentes.

Médulloépithéliome : tumeur embryonnaire maligne, très rare, ressemblant à l'épithélium du tube neural embryonnaire.

Métaplasie : une anomalie acquise résultant de la transformation d'un tissu en un autre tissu, de structure et de fonction différentes, normal quant à son architecture, mais anormal quant à sa localisation. Elle peut être physiologique, mais en fait le plus souvent pathologique.

Nécrose : correspond à la mort cellulaire qui comporte différents types de lésions nucléaires et cytoplasmiques. Il existe deux types de nécrose : la nécrose de coagulation ou nécrose ischémique qui est liée à une interruption brutale de la vascularisation d'un tissu (infarctus et nécrose tumorale par exemple) et la nécrose de liquéfaction ou nécrose suppurée (autolyse avec digestion cellulaire et désintégration des structures).

Néoplasie : toute nouvelle formation tissulaire (prolifération cellulaire excessive) ressemblant (plus ou moins) au tissu normal homologue (adulte ou embryonnaire) aux dépens duquel elle s'est développée, qui a tendance à persister et à s'accroître et qui échappe aux règles biologiques de la croissance et de la différenciation cellulaire.

Neuroblaste : neurone immature, avant la différenciation cellulaire.

Névraxe : ensemble formé par l'encéphale et la moelle épinière.

Nystagmus : mouvements involontaires d'oscillation de faible amplitude et de rotation du globe oculaire.

Oligodendrocyte : entoure les neurones et leurs prolongements dans le SNC. Certains d'entre eux fabriquent la myéline du SNC.

Oncogène : gène régulateur de la croissance.

PNET : tumeur primitive neuroectodermique.

Proto-oncogène : la composante cellulaire du gène ou c-onc.

Rétinoblastome : tumeur de blastème du jeune enfant, provenant de l'épithélium rétinien, par prolifération des cellules indifférenciées (rétinoblastes).

Rhodopsine : photopigment des photorécepteurs des bâtonnets.

Tumeur : prolifération cellulaire anormale. Une dissémination à distance signe la nature maligne d'une tumeur.

LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1</i>	Les différents protagonistes intervenant dans la cancérisation.	18
<i>Figure 2</i>	Le cycle cellulaire comprenant les cyclines et les CDKIs.	25
<i>Figure 3</i>	Polarisation au cours du développement.	35
<i>Figure 4</i>	Le cerveau. Schémas A et B.	44
<i>Figure 5</i>	Les différentes couches et les cellules qui composent la rétine.	50
<i>Figure 6</i>	Expression des gènes Pax chez la souris dans le SNC.	56
<i>Figure 7</i>	Les différents isoformes de Pax-6.	59
<i>Figure 8</i>	Importance de Pax-6 dans la différenciation des neurones de la rétine.	63
<i>Figure 9</i>	IRM d'un médulloblastome.	75
<i>Figure 10</i>	Prise en charge des patients.	77
<i>Figure 11</i>	Répartition des tumeurs en fonction de l'âge et du sexe.	102
<i>Figure 12</i>	Survie des patients en fonction de l'âge.	112
<i>Figure 13</i>	Survie des patients en fonction de l'expression de PAX-6 (n=54).	112
<i>Figure 14</i>	Survie des patients en fonction de l'expression de PAX-6 (n=40).	118
<i>Figure 15</i>	Expression de PAX-6, EN-2 et MITF dans la rétine.	120
<i>Figure 16</i>	Différenciations observées dans les tumeurs et PAX-6.	121
<i>Figure 17</i>	Différenciations observées dans les tumeurs et EN-2.	122

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1</i>	Classification des gènes Pax.	55
<i>Tableau 2</i>	Expression de Pax-2, Pax-5 et Pax-8 au cours du développement chez la souris.	58
<i>Tableau 3</i>	Expression de Pax-6 au cours du développement chez la souris.	60
<i>Tableau 4</i>	Expression de Pax-6 au cours du développement embryonnaire chez l'homme.	61
<i>Tableau 5</i>	Classification de l'OMS des tumeurs embryonnaires du SNC.	72
<i>Tableau 6</i>	Origine des anticorps primaires de routine.	94
<i>Tableau 7</i>	Conditions d'usage des anticorps primaires de routine.	94
<i>Tableau 8</i>	Dossiers cliniques des patients.	95
<i>Tableau 9</i>	Survie des patients en fonction de l'âge et de la tumeur.	103
<i>Tableau 10</i>	Marqueurs de différenciation en fonction de l'âge.	103
<i>Tableau 11</i>	Les tumeurs en file indienne.	106
<i>Tableau 12</i>	Tumeurs de l'enfant ayant moins de 3 ans.	106
<i>Tableau 13</i>	Tumeurs initiales et leurs récurrences.	107
<i>Tableau 14</i>	Résultats immunohistochimiques des anticorps testés.	124
<i>Tableau 15</i>	Résultats immunohistochimiques de 20 rétinoblastomes.	130

INTRODUCTION

Les tumeurs cérébrales constituent l'un des problèmes majeurs de la cancérologie et réalisent, comme toutes les tumeurs, un modèle de développement anormal du tissu cérébral. Pour mieux comprendre la genèse de ces tumeurs et le rôle de certains facteurs de transcription contrôlant le développement du système nerveux, nous allons dans un premier temps décrire la machinerie moléculaire qui permet la prolifération cellulaire, et dans un deuxième temps, celle qui permet le développement du Système Nerveux Central (SNC). Le développement normal correspond à la succession et à l'intrication de plusieurs événements : la prolifération cellulaire, l'apoptose (mort cellulaire programmée), la différenciation conduisant à l'organogenèse sous le contrôle des gènes du développement. Dans les tumeurs, ces événements semblent se dérouler de façon anarchique.

I. PROLIFERATION CELLULAIRE

Pendant le développement normal comme dans les processus tumoraux, les cellules doivent se diviser. Le contrôle du cycle cellulaire et des événements activateurs de celui-ci est au centre de la transformation cellulaire.

1.1. Oncogènes

Les "oncogènes" sont des gènes physiologiquement impliqués dans le contrôle des processus de maturation, de division et de différenciation cellulaire et dont l'altération ("activation") peut entraîner la transformation d'une cellule normale en cellule maligne. Le terme oncogène désigne une multitude de gènes (plus d'une centaine à ce jour) régulateurs de la croissance tissulaire pouvant contribuer au développement de cancer après des stimuli très variés. La plupart des oncogènes transforment la cellule en agissant en combinaison. Les oncogènes dominants, agissant seuls pour transformer la cellule, sont essentiellement trouvés dans les modèles de transformation animale. Les oncogènes cellulaires ont seulement des analogies structurales avec des oncogènes de virus animaux, dont les progéniteurs cellulaires ne sont plus identifiables comme chez les virus à ADN. Par contre dans le cas des rétrovirus transformants, les oncogènes viraux sont le produit de la recombinaison avec des gènes cellulaires (appelés proto-oncogènes) et leur sont donc très proches. C'est en effet l'étude du génome des rétrovirus aviaires qui est à l'origine de la caractérisation des oncogènes avec l'identification en 1976 (Stehelin *et al.*, 1976) de l'oncogène src dans le génome du Rous Sarcoma Virus (RSV). Les oncogènes exercent un effet positif sur la division cellulaire, bloquent l'apoptose et la différenciation cellulaire.

On peut distinguer plusieurs familles d'oncogènes (ou de proto-oncogènes), en se basant sur le rôle physiologique de la protéine normale (Figure 1).

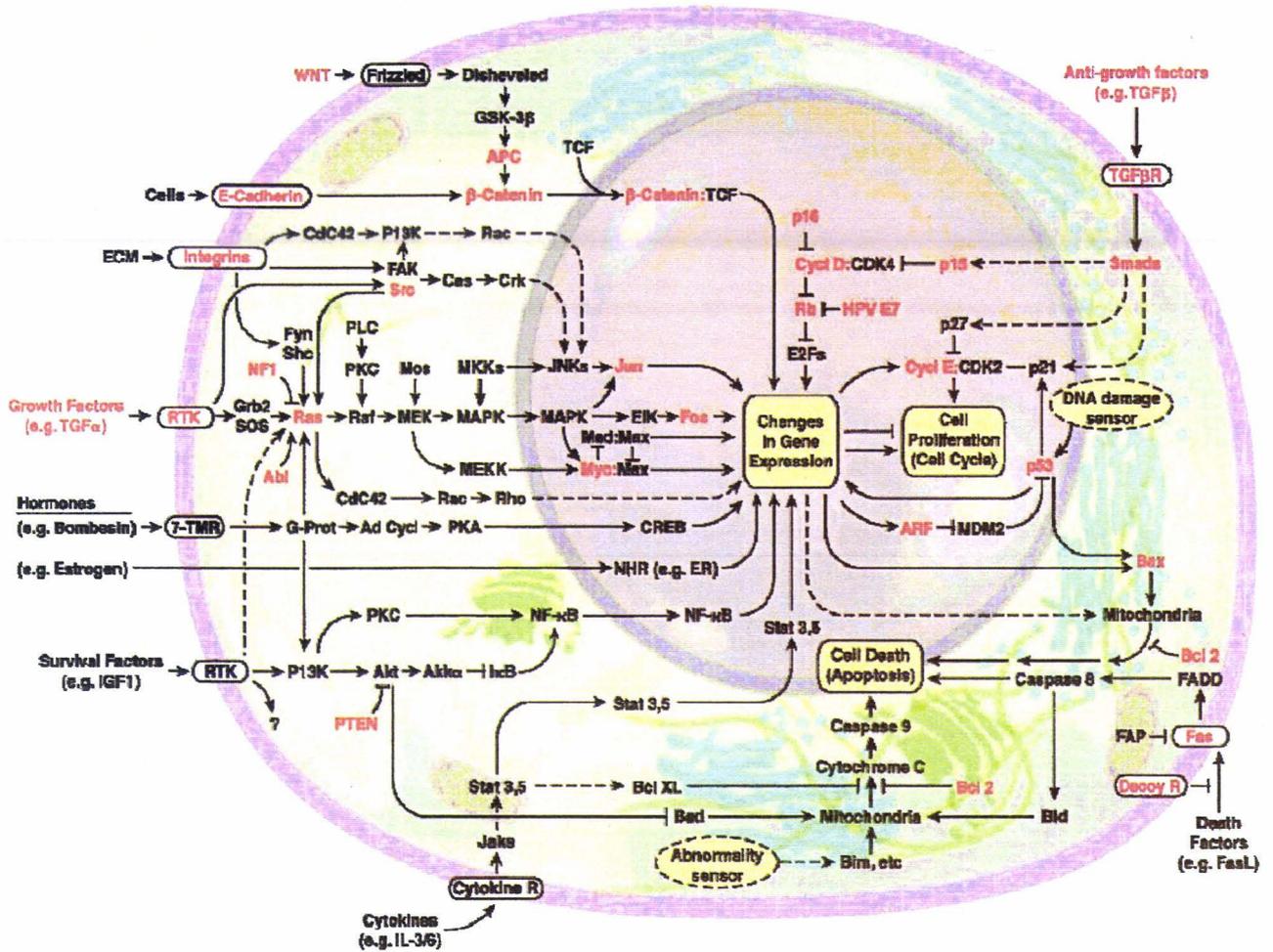


Figure 1 : Les différents protagonistes intervenant dans la cancérisation (d'après Hanahan et Weinberg, 2000). Les oncogènes sont indiqués en rouge.

1.1.1. Les facteurs de croissance

Ils peuvent intervenir dans le maintien de la viabilité cellulaire, la stimulation de la multiplication, la différenciation cellulaire, voire de l'apoptose. Ces facteurs sont présents à l'extérieur de la cellule, soit libres, soit liés à la matrice extracellulaire, et peuvent activer pour beaucoup d'entre eux, des récepteurs transmembranaires. Parmi les oncogènes qui codent des facteurs de croissance, citons sis qui code une sous unité du Platelet Derived Growth Factor (PDGF), présent au sein du virus du sarcome simien SSV.

Les facteurs de croissance, mais également les hormones et le facteur de nécrose des tumeurs (Tumor Necrosis Factor ou TNF) peuvent également jouer un rôle dans la régulation du cycle cellulaire, et à ce titre être impliqués dans la transformation cellulaire.

Par exemple, le récepteur des hormones thyroïdiennes, c-erbA est un des oncogènes du virus de l'érythroblastose aviaire (AEV).

1.1.2. Les récepteurs membranaires

Les récepteurs transmembranaires sont de plusieurs types. Les premiers à être décrits ont une activité tyrosine kinase qui est stimulée par la fixation de leur ligand. L'activation des récepteurs peut entraîner des réponses physiologiques très variées, suivant le type cellulaire et le type du récepteur (Simon, 2000 ; Madhani, 2001). Une cellule répondra à un facteur (Transforming Growth Factor ou TGF- β) par une évolution vers la différenciation, à un autre facteur (Fibroblast Growth Factor ou FGF) par une prolifération cellulaire et à un troisième (PDGF) par une survie des cellules différenciées (Newman *et al.*, 2000). Le même facteur d'inhibition (TGF- β) peut inhiber la prolifération des fibroblastes en présence d'un autre facteur de croissance (Epidermal Growth Factor ou EGF) ou au contraire la stimuler en présence d'un troisième (PDGF) (Rizzino *et al.*, 1986). Il semble donc exister des substrats variés en aval des récepteurs, selon le type cellulaire et sa situation physiologique (Simon, 2000 ; Madhani, 2001). Parmi les différents récepteurs, citons les oncogènes : v-erb-B qui est l'homologue du récepteur du facteur de croissance épidermal (EGFR), trouvé comme erb-A au sein de AEV, v-kit analogue du récepteur pour les cellules souches (SCFR pour Stem Cell Factor Receptor), v-fms homologue du récepteur CSF-1 (Colony Stimulating Factor), ces derniers trouvés au sein du génome de virus de chat.

1.1.3. Les molécules de la transduction du signal

Une fois activé par son ligand, le récepteur transmembranaire va initier une cascade biochimique conduisant à la mise en route d'une succession de kinases et de protéines adaptatrices connectant le récepteur transmembranaire à sa cible ultime, les facteurs de transcription. L'effet des facteurs de croissance sur la cellule nécessite la mise en route ou l'extinction de gènes pour que la cellule s'adapte au signal (prolifératif, antiprolifératif, de différenciation, voire d'apoptose) délivré par le facteur extracellulaire. Cette cascade biochimique est composée de molécules formant les différentes voies de transduction du signal et capables de se connecter physiquement par des motifs protéiques définis (src homology domains (SH), phosphotyrosine-binding domains (PTB) (Hunter, 2000). Si on se limite à la voie des Map Kinases, qui est la plus ancienne connue, les différents éléments qui la constituent sont codés par des oncogènes (Hunter, 2000).

Les MAP Kinases (Mitogen-Activated Protein Kinases) sont des sérines/thréonines kinases activées par un grand nombre de stimuli et regroupées en trois grandes familles :

les Extracellular signal-Regulated Kinases (ou ERKs), les c-Jun NH₂-terminal Kinases (ou JNKs) et les p38^{MAPKs}. Elles sont impliquées dans différentes fonctions cellulaires telles que la prolifération, la différenciation, la migration et les réponses au stress (Lenormand *et al.*, 1993 ; Su et Karin, 1996). Les protéines ERK1 et ERK2 ont été les premières clonées et sont aujourd'hui les plus étudiées (Boulton *et al.*, 1991). Ce sont des protéines de 44 et 42 kDa respectivement codées par deux gènes distincts (localisés sur les chromosomes 16 et 22), mais possédant 90 % d'homologie de séquences entre eux.

Stimulées par une grande variété d'inducteurs (facteurs de croissance, cytokines, hormones, protéines de la matrice extra-cellulaire), les MAP Kinases sont activées par différents types de récepteurs et en particulier les récepteurs à activité tyrosine kinase. Quel que soit le type de récepteur activé et quelle que soit la famille de MAP Kinases impliquée, l'activation d'une MAP Kinase résulte de l'activation successive :

- d'une MAP kinase kinase kinase (MAPKKK), codée par le proto-oncogène raf (oncogène du rat fibro sarcoma virus, Rapp *et al.*, 1983)
- et d'une MAP kinase kinase (MAPKK ou MEK), responsable de l'activation de la MAP kinase.

Les voies d'activation des MAPKs peuvent être regroupées en deux modules d'activation. Le premier module est la voie d'activation la plus fréquemment rencontrée dans les cellules de mammifères et place le système MAPKKK/MAPKK/MAPK sous le contrôle d'une petite protéine de 21 kDa (RAS) codée par le proto-oncogène ras qui interagit physiquement avec raf (Vojtek *et al.*, 1993) (Figure 1). La protéine RAS a la propriété de se lier aux nucléotides à guanine : GDP/GTP. A l'état normal, la protéine est liée au GDP. A l'état stimulé, RAS se dissocie du GDP et fixe le GTP (Bar-Sagi et Hall, 2000). L'activation en oncogène des protéines RAS se traduit par des transformations morphologiques d'un grand nombre de cellules épithéliales et de fibroblastes et par l'apparition d'un phénotype malin retrouvé dans certaines cellules cancéreuses. Ainsi, dans environ 20 % des cancers, des mutations activatrices dans l'oncogène ras rendent la protéine RAS, ainsi que toutes les voies de signalisation sous le contrôle de ras, constitutivement actives (Khleif *et al.*, 1999).

Les MAP kinases jouent un rôle important dans la prolifération cellulaire. Les cibles de ERK1/2 sont (entre autre) des facteurs de transcription, comme c-Myc qui régule l'expression de gènes précoces indispensables à la progression dans la phase G1 (Hashemolhosseini *et al.*, 1998 ; Treisman, 1996). Les protéines ERK1/2 régulent positivement la deuxième partie de phase G1 et la transition G1/S en induisant l'expression

de la cycline D1. De même elles semblent réguler les inhibiteurs des Cdks (Ckis) p16, p21 et p27 (Kortylewski *et al.*, 2001) (Figure 1).

1.1.4. Facteurs de transcription

L'activité des facteurs de transcription permet à la cellule de s'adapter aux variations de son milieu en induisant et réprimant les gènes requis pour cela (Shaulian et Karin, 2002). Cette activité est contrôlée en fin de cascade, par une phosphorylation de ces facteurs sous l'effet des Map Kinases (Valk *et al.*, 2000 ; Adachi *et al.*, 2002). Les facteurs de transcription sont des protéines qui font le lien entre la région promotrice des gènes qu'ils contrôlent (par leur domaine de liaison à l'ADN) et la machinerie transcriptionnelle de base avec laquelle ils rentrent en contact par l'intermédiaire de leurs domaines activateurs ou inhibiteurs. Ainsi, les facteurs de transcription sont des protéines possédant un ou plusieurs domaines fonctionnels physiquement séparables. Certains facteurs de transcription contiennent plusieurs domaines de liaison à l'ADN physiquement séparables ou plusieurs domaines de régulation de la transcription ou plusieurs domaines de dimérisation.

De très nombreux facteurs de transcription sont des oncogènes, la plupart de ceux-ci ont été découverts au sein de rétrovirus transformants, tels les oncogènes myc du virus de la myélocytomatose aviaire, myb de la myéloblastose aviaire (Roussel *et al.*, 1979) ou les oncogènes fos du virus murin FBJ induisant des fibrosarcomes ou encore l'oncogène jun de l'isolat aviaire ASV17 (Angel et Karin, 1991).

Le domaine de liaison à l'ADN est le domaine qui permet la reconnaissance de l'ADN car il se fixe sur une séquence bien précise et particulière pour chaque famille de facteur de transcription. Plusieurs structures ont été décrites, mais nous ne discuterons que de celle déjà présente chez les procaryotes, le motif Hélice-Coude-Hélice (HTH pour Helix-Turn-Helix).

La première détermination de ce type de structure a été réalisée pour les répresseurs procaryotiques du phage λ (Anderson *et al.*, 1981 ; McKay et Steitz, 1981). Ces protéines procaryotiques adoptent, dans leur domaine de liaison à l'ADN, une structure constituée de deux hélices α de 8 à 10 aa (hélices 2 et 3), séparées par 3 aa formant un coude β . Ces protéines se lient à l'ADN sous forme de dimères, sur une séquence palindromique, chaque protéine fixant un héli-site. La première hélice contacte non spécifiquement l'ADN et joue un rôle de stabilisation. L'hélice 3 reconnaît spécifiquement des séquences d'ADN situées dans le grand sillon. Il est intéressant de noter que ces grandes caractéristiques structurales sont conservées chez les espèces supérieures et se retrouvent notamment dans

des protéines qui possèdent un domaine de fixation à l'ADN appelé domaine homéo (homéoprotéines).

1.1.4.1. Le domaine Homéo

Chez les eucaryotes, la recherche de gènes associés à des mutations homéotiques du développement a permis l'isolement de gènes possédant un domaine comparable. Ce domaine est largement représenté dans les gènes homéotiques de drosophile puis chez les mammifères (Duboule et Morata, 1994). Le domaine homéo, extrêmement conservé au cours de l'évolution, est composé de 60 aa (Gehring, 1993). On le retrouve également dans des organismes non segmentés tels que la levure. La détermination de la structure tridimensionnelle des homéoprotéines Antennapedia (Antp), Engrailed (EN), et MAT α 2 (protéine de levure) démontre que le domaine homéo est formé de trois ou quatre hélices α et contient un motif HTH (Qian *et al.*, 1989 ; Kissinger *et al.*, 1990 ; Wolberger *et al.*, 1991). Les hélices 2 et 3 forment la structure hélice-coude-hélice et sont superposables aux hélices de stabilisation et de reconnaissance des procaryotes. L'hélice 3 du domaine homéo, hélice de reconnaissance, se couche dans le grand sillon de l'ADN et interagit avec certaines bases du site de reconnaissance. Celui-ci est une séquence riche en bases AT dont le motif central est TAAT. Cependant les bases adjacentes à ce motif sont importantes pour la reconnaissance. Ainsi les homéoprotéines Bicoïd (Bcd) et En reconnaissent des sites différents dans les bases adjacentes en ayant pourtant un cœur ATTA de reconnaissance identique. Cette différence est due à un acide aminé situé en position 50 du domaine homéo, correspondant au résidu 9 de l'hélice 3 (Hanes et Brent, 1989 ; Treisman *et al.*, 1989).

Le type d'acide aminé situé en position 50 de l'homéodomaine confère à ce dernier une spécificité de reconnaissance à l'ADN et a été utilisé pour classer les différents types d'homéodomains (par rapport à leur spécificité de reconnaissance) : glutamine pour les homéodomains de type HOX ou EN ; sérine pour ceux de type Paired ; cystéine pour les homéodomains de type POU (Pit-1, Oct-2 (et Oct-1) et Unc-86) ; lysine pour ceux de type Bcd. Enfin certaines homéoprotéines se caractérisent par la présence d'un deuxième domaine de liaison à l'ADN. Les facteurs à homéodomains ont été décrits comme des oncogènes notamment responsables de leucémies (Taketani *et al.*, 2002 ; Ballerini *et al.*, 2002).

1.1.4.2. Le domaine Paired

Ce domaine de 128 aa initialement découvert dans la protéine Paired de drosophile (Prd), est prédit comme étant aussi de structure HTH (Bopp *et al.*, 1986). Il est présent

dans d'autres homéoprotéines de drosophile telles que Gooseberry proximal (Gsb-p), Gooseberry distal (Gsb-d), Gooseberry neuro (Gsb-n), Pox neuro, meso (Pox-n, Pox-m), eyeless (ey) (Strachan et Read, 1994 ; Quiring *et al.*, 1994), et fonctionne comme un domaine de liaison à l'ADN autonome et indépendant de l'homéodomaine (Treisman *et al.*, 1989). Des gènes possédant un domaine paired ont été retrouvés chez les mammifères et portent le nom de gènes pax (pour PAired boX) dont certains sont des oncogènes (Barr, 2001 ; Cazzaniga *et al.*, 2001). Ces gènes seront présentés ultérieurement. Le gène Pax-6 dont le domaine paired a été cristallisé (Xu *et al.*, 1999) possède la particularité d'avoir deux sous-domaines de liaison à l'ADN (un sous-domaine amino et un sous-domaine carboxy-terminal), tous deux capables de se lier indépendamment à l'ADN et structurés comme l'homéodomaine (Epstein *et al.*, 1994 a et b).

L'effet des oncogènes sur la cellule va être de conduire celle-ci à proliférer et donc à enchaîner les cycles cellulaires sans pauses. La mise en route (ou non) du cycle cellulaire normal est dépendante de l'intégration par la cellule de tous les signaux de son environnement.

1.2. Cycle cellulaire

Le cycle cellulaire se compose de quatre phases successives : G1, S (phase de synthèse où a lieu le doublement de l'ADN), G2 (phase de repos pré-mitotique) et M (répartition des chromosomes en deux lots et division proprement dite en deux cellules), avec un état de repos Go éventuel où les cellules ne se divisent plus, correspondant à la sortie du cycle. Entre ces différentes phases, il existe des points de contrôles qui permettent de vérifier l'intégrité de la transmission de l'ADN de la cellule mère vers les cellules filles et la qualité de l'ADN transmis. Chacune des étapes du cycle cellulaire est sous la dépendance de mécanismes de régulation positifs ou négatifs en fonction de la situation de la cellule normale (multiplication réactionnelle, cicatrisation, contrôle de l'homéostasie, etc.). La cellule intègre un certain nombre de régulations à l'aide de deux types de molécules particulières : les cyclines avec leurs kinases associées, et leurs régulateurs. Ces molécules sont essentielles pour comprendre la physiopathologie du cancer et font partie des oncogènes ainsi que des gènes suppresseurs de tumeur, de découverte plus récente. La plupart de ces régulateurs présentent des anomalies (mutations, délétions, amplifications, surexpressions, etc.) dans les tumeurs humaines, permettant au cycle cellulaire d'échapper

à ses contrôles normaux et affranchissant la cellule tumorale des contraintes de la régulation normale.

1.3. Régulateurs

1.3.1. Les cyclines et les cyclines dépendantes des kinases

Au cœur de la régulation du cycle cellulaire se trouve une famille de sérines/thréonines kinases, les CDKs ("Cyclin Dependent Kinases"), et un ensemble de protéines activatrices ou inhibitrices de leur fonction (Serrano *et al.*, 1993 ; Kamb *et al.*, 1994 b). Les CDKs sont en fait les sous-unités catalytiques de complexes hétérodimériques formés avec les sous-unités régulatrices nécessaires à leur activation, les cyclines, dont l'expression est périodique au cours du cycle cellulaire (Morgan, 1995 ; Sherr, 1996). A ce jour, 9 CDKs (CDKs1 à 9) et 12 cyclines ont été mises en évidence chez l'homme (Borgne *et al.*, 1999). Les cyclines sont des protéines présentes à des taux variables dans le cytoplasme ou, pour certaines, dans les noyaux des cellules selon les étapes du cycle cellulaire, dont la concentration varie au cours du cycle. Elles constituent la partie régulatrice du couple cycline-cdk. Il existe différentes cyclines : A, B, D et E. Les cyclines de la phase G1 sont les cyclines D et E. Les phases S, G2 et M sont caractérisées par les cyclines A et B. Le substrat principal des CDKs *in vitro* est la protéine Rb (pour rétinoblastome) (Bartek *et al.*, 1997). Cette protéine est une sorte de gardienne moléculaire qui empêche la progression en phase G1. La forme active de la molécule pRb est hypophosphorylée lors de la première partie de G1 et devient phosphorylée (et donc inactive) aux alentours du point de restriction après lequel la mitose ne peut plus être retardée. Selon le modèle qui apparaît actuellement le plus probable, les complexes cdk-cyclines phosphorylent la pRb, inhibant ainsi son activité anti-proliférative.

L'activité de ces complexes cdk-cyclines peut être inhibée, soit par des mécanismes de phosphorylation soit par liaison à des protéines inhibitrices, les CKIs ("Cyclin dependent Kinase Inhibitor") (Peter et Herskowitz, 1994 ; Sherr et Roberts, 1999). Ces inhibiteurs paraissent jouer un rôle essentiel dans le contrôle du cycle et de la croissance cellulaire en retardant l'activation des divers complexes cycline/cdks spécifiques de G1/S jusqu'au moment adéquat et en assurant leur mise en œuvre ordonnée (Figure 2).

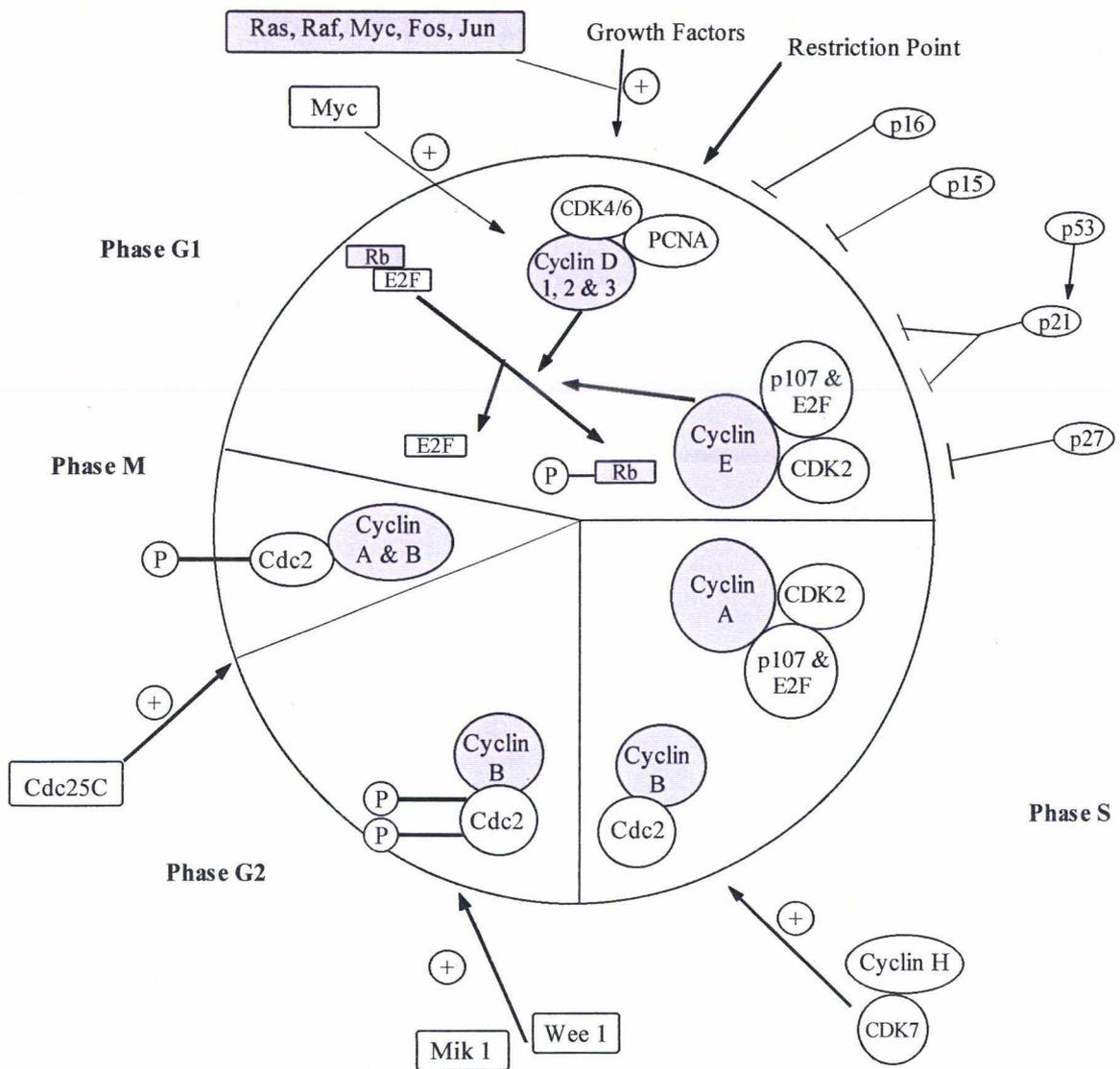


Figure 2 : Le cycle cellulaire comprenant les cyclines et les CDKs (d'après Hunter et Pines, 1994).

1.3.2. Les inhibiteurs des CDKs

Deux familles de molécules sont impliquées dans l'inhibition des CDKs. Les mutations de ces protéines au cours du cancer les désignent potentiellement comme de possibles gènes suppresseurs de tumeurs, encore appelés anti-oncogènes.

1.3.2.1. Famille CIP/KIP

C'est un ensemble de protéines inhibitrices des CDKs de la phase G1, telle que la protéine p21 fabriquée par le gène *waf1/cip1* (pour Wild type p53-Activated Fragment et Cdk2 Inhibitive Protein) dont l'activité est en rapport avec la protéine p53 (activée en présence d'anomalies de l'ADN induites par une irradiation, une chimiothérapie ou un toxique). Les protéines p27 et p57 fabriquées sous la dépendance du gène *kip* (Kinase Inhibiting Protein) qui seraient stimulées par la présence d'un facteur de croissance négatif le TGF- β , sont également des inhibiteurs des CDKs. La protéine p21 se lie aux *cdk2*, *cdk4*,

cdk6 et bloque le passage de G1 vers S. Il n'existe que peu de mutations connues du gène *waf1/cip1* au cours du cancer.

1.3.2.2. Famille INK4

Ces protéines sont appelées ainsi parce qu'elles inhibent la *cdk4*, parmi celles-ci on connaît trois protéines : *p16*, *p15* et *p18*. Elles se lient sélectivement avec les *cdk4* et *cdk6*, peut-être en déplaçant la cycline D du complexe cycline D-*cdk4*. De nombreux travaux ont bien montré que des régulateurs du cycle cellulaire, particulièrement ceux qui contrôlent la progression cellulaire en phase G1 sont des cibles privilégiées des processus oncogéniques (Sherr, 1996 ; Sandhu et Slingerland, 2000). Seules les cyclines D voire la cycline E ont été fréquemment impliquées dans les tumeurs. En revanche, des désordres similaires des *cdks* ont rarement été rapportés. Pourtant, l'activité des ces complexes *cdk*-cyclines est évidemment perturbée par la perte ou le dysfonctionnement des *ckis* précédemment citées. En effet, le gène codant pour la protéine *p16* (de même que son cousin *p15*) a été localisé sur la région *p21* du chromosome 9, région trouvée très souvent remaniée dans de nombreuses lignées cellulaires tumorales, des tumeurs primitives dont le mélanome cutané et les hémopathies (Cairns *et al.*, 1994 ; Kamb *et al.*, 1994 a ; Nobori *et al.*, 1994 ; Pines, 1995). Par ailleurs, *p16* et *p15* sont impliquées dans les tumeurs humaines. On n'a pas, à de rares exceptions près, trouvé de mutation des gènes *p18* et *p19*. La protéine alternative *p19^{ARF}* codée par le gène *p16* a certaines caractéristiques d'un gène suppresseur de tumeur (en particulier, elle bloque le cycle cellulaire) mais les conséquences de son activation sur un processus oncogénique ne sont pas connues. Les remaniements observés ont conduit à considérer *p16* comme un gène suppresseur de tumeur. Par contre, les mutations de *p21* et *p27* sont exceptionnelles (Ponce-Castaneda *et al.*, 1995).

1.3.3. Les produits des gènes anti-oncogènes

La suppression totale ou partielle de ces gènes est indispensable au développement tumoral. Plusieurs gènes ont pu être mis en évidence dont le gène *Rb*, *p53* (rôle charnière entre le développement de tumeur, l'arrêt du cycle cellulaire, la différenciation et l'apoptose) (Vousden, 2000), *BRCA1* et *BRCA2* (cancers du sein, breast carcinoma cancer antigen), *WT1* (tumeur de Wilms), *APC* (cancers du colon) et *NF-1* (neurofibromatose de type 1) pour n'en citer que quelques-uns.

Ces protéines sont des éléments clés du "freinage" exercé en permanence par la cellule pour contrôler sa division, sa maturation et sa différenciation normales. La protéine *p53*, en très petite quantité dans les cellules normales, se trouve en abondance dans les cellules transformées en culture ou dans les tumeurs humaines. Cette protéine intervient

dans l'arrêt du cycle cellulaire entre la phase G1 et la phase S, mais également dans la mort cellulaire par apoptose (Vousden, 2000). Un des rôles de la protéine p53 est d'activer le gène *waf-1/cip1* produisant la protéine p21. Cela inhibe l'action du couple cycline E-cdk4 qui inactive la liaison cycline E-cdk2 et ainsi empêche la libération de la protéine Rb du facteur de transcription E2F qui se fixe aux éléments de la boîte TATA permettant les transcriptions d'un grand nombre de gènes. La cellule s'arrête avant la synthèse de l'ADN et peut ainsi réparer d'éventuels dommages. Dans de nombreuses pathologies cancéreuses, on observe des délétions ou des mutations de p53 (environ 60 % des cancers).

1.3.4. Caractère "multi-étapes" de la cancérogenèse

De nombreuses études, dont celles effectuées sur des tumeurs humaines, montrent qu'un seul oncogène ne suffit pas à transformer les cellules et qu'il existe, en général, la modification de plusieurs gènes au sein d'une même tumeur : par exemple le gène *myc* amplifié et N-Ras activé dans certaines leucémies, le gène *myc* réarrangé et le gène N-Ras activé dans les lymphomes, 6 gènes différents activés dans les cancers coliques. Au cours de l'évolution de plusieurs types de cancers, on identifie au niveau tissulaire les étapes successives conduisant de l'aspect normal à l'aspect néoplasique en passant par différents états "pré-cancéreux". Dans la leucémie myéloïde chronique, la maladie ne consiste à la phase "chronique" qu'en une accumulation de cellules "jeunes" non néoplasiques mais dont le taux de renouvellement est anormalement élevé et qui présentent toutes la même anomalie chromosomique. Lors de la "transformation blastique", on observe l'apparition de cellules dont le phénotype est malin et qui ont acquis des anomalies chromosomiques nouvelles et variées venant s'ajouter à la translocation 9-22 (Prigogina *et al.*, 1978 ; Scolnik *et al.*, 1998). A l'échelon moléculaire la cascade d'événements conduisant à la transformation maligne comporte donc non seulement des étapes d'activation d'oncogènes impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire mais aussi des phénomènes de suppression de blocages cellulaires de sécurité exercés en permanence par l'environnement cellulaire ou par la cellule elle-même.

II. APOPTOSE

L'apoptose, mot grec signifiant "chute" des pétales d'une fleur ou des feuilles d'un arbre, introduit en 1972 par Kerr *et al.* Ce terme désigne une forme particulière de mort cellulaire, la mort programmée ou suicide cellulaire (Arends et Wyllie, 1991) où, après de profonds remaniements structuraux et fonctionnels différents de ceux observés dans la

nécrose, la cellule apoptotique se détache de ses voisines pour être détruite par des macrophages. On distingue très nettement l'apoptose de la nécrose, qui détruit immédiatement tous les organites cellulaires, avec une conservation de la forme générale (fantômes de cellules). La nécrose est une explosion incontrôlée de la cellule, pendant laquelle la membrane cytoplasmique s'ouvre, déversant le contenu sur les cellules voisines et la matrice extracellulaire, ce qui entraîne une réaction inflammatoire. Les cellules médiatrices de l'inflammation vont isoler et éliminer la cellule nécrotique, mais ce faisant elles induisent la mort des cellules voisines (Zimmermann et Green, 2001).

2.1. Définition et contrôle

C'est un phénomène physiologique régulateur équilibrant le nombre de cellules d'un tissu normal (Wyllie, 1992) assurant ainsi l'homéostasie tissulaire. L'apoptose a été décrite il y a un siècle, mais ses effecteurs moléculaires n'ont pu être caractérisés que grâce à l'étude récente du ver *caenorhabditis elegans*. Chez ce ver transparent qui contient 959 cellules, il a été montré qu'avant maturité, le ver contient 1090 cellules, 131 de plus que chez l'adulte, cellules qui vont disparaître par apoptose (Metzstein *et al.*, 1998). En traitant les vers avec des substances mutagènes, l'équipe du Pr. Horvitz a cherché des mutants ayant plus de cellules (pas assez d'apoptose, gène pro-apoptotique muté) ou moins de cellules (trop d'apoptose, gène anti-apoptotique touché). Deux gènes pro-apoptotiques (*ced3* et *ced4* pour cell death abnormal) (Reddien *et al.*, 2001) et un anti-apoptotique *ced9* (Conradt et Horvitz, 1998) ont été isolés. *Ced3* s'est révélé être le chef de file d'une famille de protéases particulières les caspases, *ced4* s'est avéré être l'orthologue d'APAF1 (pour Apoptosis Protease-Activating Factor 1) (Cecconi, 1999) et *ced9* apparenté à *Bcl2* (Adams et Cory, 1998). Cette dernière famille de facteurs est complexe car elle contient à la fois des gènes anti et pro-apoptotiques. De nombreux facteurs interviennent pour susciter l'apoptose. Une cellule qui reçoit un signal pro-apoptotique n'est pas encore déterminée à mourir. C'est le bilan de la balance entre les signaux pro et anti-apoptotique qui va décider *in fine* du devenir de la cellule.

La mitochondrie joue un rôle essentiel dans ces événements. Dans une cellule normale, elle séquestre plusieurs types de molécules inductrices d'apoptose, comme le cytochrome *c* ou l'AIF (Apoptosis Inducing Factor). Elle porte également sur sa membrane externe une partie des protéines de la famille *Bcl2*. Cette famille a été dénommée en fonction du premier gène découvert suite à une translocation (Break point cluster 2 avec l'oncogène *Myc*, Adams et Cory, 1985 et 1998 ; Antonsson, 2001 ; Gross, 2001). Depuis

de nombreux produits apparentés ont été découverts, ces protéines se répartissant en deux catégories d'effets opposés : les anti-apoptotiques, comme la protéine BCL2, BCLX-L, BCLW et les pro-apoptotiques comme BAX, BAD, BID, BCLX-S, BAK, HRK, BOK, BIK, etc. Ces protéines sont capables de s'homo et/ou de s'hétéro-dimériser entre elles. Par exemple, dans une cellule saine, BAX est hétérodimérisé avec la protéine BCL2 qui l'inhibe. En présence d'un stimulus pro-apoptotique, la protéine BAD déplace l'hétérodimère et s'apparie à BCL2. BAX déplacé se dimérise et se transloque à la membrane mitochondriale pour former des pores permettant la sortie du cytochrome *c* (Schlesinger *et al.*, 1997). Le cytochrome *c* est un activateur de la protéine APAF1 qui peut alors fixer la pro-caspase 9. Cette protéine fait partie d'une famille de 14 protéases (à ce jour) qui coupent leur substrat après un acide aspartique (Slee *et al.*, 1999 b). Le complexe cytochrome *c*/APAF1 et pro-caspase 9 appelé apoptosome va activer la caspase 9 qui va déclencher une cascade d'activation d'autres caspases, dont les caspases 3 et 6 premiers maillons de la voie finale d'exécution de l'apoptose. BCL2 et BCLX-L sont capables d'inhiber l'apoptose même après la sortie du cytochrome *c* en séquestrant l'apoptosome à la membrane mitochondriale et en empêchant l'activation de la caspase 9 (Hausmann *et al.*, 2000) (Figure 1).

2.2. Rôle de l'apoptose

2.2.1. Au cours du développement

Le développement normal d'un organe s'effectue non seulement par modelage mais aussi par sculpture : les cellules sont produites en grand excès puis certaines meurent, en fonction de critères particuliers requis. L'apoptose survient fréquemment au cours de l'histogenèse et de l'organogenèse normales. Dès les premiers stades de développement, une partie des cellules du blastocyste meurt par apoptose. Pendant la période embryonnaire, des cellules germinales et de nombreux neurones disparaissent aussi par apoptose. La mort neuronale par apoptose est également constatée plus tardivement pendant les périodes fœtale et post-natale lorsque les neurones n'établissent pas de connexions ou n'établissent pas de plaques motrices avec les cellules musculaires. L'apoptose survient toujours au même endroit dans le tissu embryonnaire et à des moments précis de son développement (Wyllie *et al.*, 1980 ; Arends et Wyllie, 1991). Les souris dépourvues du gène APAF1 meurent *in utero* ou tout de suite après la naissance avec de grandes malformations cranio-faciales, une croissance excessive du cerveau, la rétention

des membranes interdigitales, résultant d'un défaut dans l'exécution du programme apoptotique (Hickman et Helin, 2002).

2.2.2. A l'âge adulte

Dans le tissu normal, il existe un équilibre constant entre prolifération cellulaire et apoptose. La mort cellulaire programmée correspond à une élimination normale des cellules qui sont continuellement renouvelées mais aussi pour éliminer sélectivement les cellules devenues indésirables (les cellules lésées, les cellules reconnues comme étrangères ou tumorales). Les cellules nécessitent en permanence certains "facteurs de croissance" pour survivre comme le TGF β 1, l'activine et le facteur de croissance nerveux (NGF) qui permet la survie des neurones sympathiques. Les hormones (ex. les glucocorticoïdes, les hormones sexuelles), les cytokines (ex. le TNF α) ainsi que le monoxyde d'azote qui provoque une apoptose des neurones (Boje et Arora, 1992) jouent également un rôle dans l'induction (directe ou indirecte) ou non de l'apoptose. Dans le système immunitaire, l'apoptose est responsable de la délétion des cellules T auto-réactives (permettant la tolérance du "soi"), et la sélection des lymphocytes B responsables de la réponse immunitaire.

2.2.3. Dans les cancers

On peut trouver des foyers d'apoptose près des foyers de nécrose, dans de nombreux cancers non traités mais aussi après une irradiation, de la chimiothérapie, une hyperthermie modérée, une suppression hormonale (cancer de la prostate) ou au contraire la surcharge en corticoïdes (leucémies et lymphomes). Au cours du processus de cancérisation, il existe des défauts de mise en route de l'apoptose. Le gène Bcl-2 peut bloquer l'apoptose dépendante de l'anti-oncogène p53 (Chiou *et al.*, 1994) ainsi que celle induite par l'oncogène c-myc (Bissonnette *et al.*, 1992). Le promoteur du gène APAF1 est méthylé dans certains mélanomes (Soengas *et al.*, 2001) ce qui conduit à l'extinction de l'expression du gène, dont le produit ne peut plus activer la caspase 9 nécessaire au bon déroulement du programme apoptotique. APAF1 est de surcroît la cible transcriptionnelle des facteurs E2F et p53. Quand les cellules surexpriment E2F, ou quand Rb est muté (ce qui a le même effet) E2F induit l'expression de APAF1 qui conduira les cellules en prolifération incontrôlée dans la voie de l'apoptose (Hickman et Helin, 2002). La protéine p53, stabilisée ou activée par les agents génotoxiques va également induire l'expression d'APAF1 et d'autres gènes pro-apoptotiques comme Bax (Moroni *et al.*, 2001), (Figure 1).

De façon schématique, on peut dire que le développement d'un cancer nécessite successivement l'activation d'un oncogène, l'inactivation d'un anti-oncogène et la neutralisation de l'apoptose (activation d'un gène anti-apoptotique, ou inhibition d'une voie pro-apoptotique).

III. DEVELOPPEMENT ET ORGANISATION DU SNC HUMAIN

Comme nous le verrons dans les chapitres suivants, la classification des tumeurs est basée sur l'aspect morphologique des cellules qui la composent. Les tumeurs embryonnaires du SNC, qui sont étudiées dans ce travail, sont, par définition, constituées de cellules souches (le blastème) et de cellules plus ou moins différenciées qui en proviennent. Nous insisterons plus particulièrement sur les premières phases de la construction du SNC en abordant l'aspect moléculaire de l'organisation du SNC avec l'expression des gènes du développement dans les localisations préférentiellement de ces tumeurs ; c'est-à-dire le cervelet, les hémisphères cérébraux et l'œil.

La formation du SNC débute dès la 3^e semaine de gestation (SG), quand le disque embryonnaire diblastique entre dans la phase de gastrulation. A ce stade, vont se mettre en place les deux structures impliquées dans la formation du SNC : l'ectoblaste, futur tissu nerveux, et le mésoblaste, tissu inducteur et organisateur du premier.

Le développement précoce du SNC se déroule en deux étapes successives : l'induction neurale qui donne naissance à la plaque neurale puis au tube neural, suivie de l'étape de différenciations régionales spécifiques qui aboutiront à l'acquisition des polarités antéro-postérieure et dorso-ventrale. Ces étapes sont caractérisées par la mise en place de groupes de cellules souches en des positions strictement déterminées le long des axes antéro-postérieur et dorso-ventral. Ce positionnement strict est rendu possible par l'activation sélective dans le temps et dans l'espace des gènes du développement.

3.1. Mise en place du tube neural

3.1.1. La gastrulation

A la 3^e SG, se déroule le phénomène de la gastrulation. Le disque embryonnaire possède deux feuillets : l'épiblaste superficiel et l'hypoblaste profond. Les cellules de l'épiblaste vont amorcer un mouvement de migration vers le centre du disque avant de s'invaginer en profondeur le long d'une ligne sagittale, c'est la ligne primitive. Le nœud de Hensen forme l'extrémité antérieure de la ligne médiane.

Les cellules épiblastiques se glissent entre les deux feuillets et forment un 3^e feuillet : le mésoblaste, précurseur des tissus mésenchymateux (tissus de soutien, muscles, réseau vasculaire,...). Les cellules épiblastiques qui s'invaginent au niveau du nœud de Hensen migrent sagittalement vers le pôle rostral du disque embryonnaire et constituent une structure mésoblastique médiane : le canal chordal, future notochorde. Le canal chordal progresse en profondeur et rostralement jusqu'à ce qu'une zone d'accolement entre l'épiblaste et l'entoblaste ne stoppe sa croissance, c'est la plaque préchordale. Les cellules épiblastiques restées en surface constituent l'ectoblaste, précurseur du tissu épithélial et nerveux. Ainsi, le phénomène de gastrulation met en place :

- la ligne médiane de l'ensemble de l'embryon (ligne primitive et structures mésoblastiques médianes)
- les centres organisateurs précoces du système nerveux (SN) : le nœud de Hensen, la notochorde et la plaque préchordale qui vont transformer le tissu ectoblastique sus-jacent en tissu neural.

3.1.2. La neurulation

En regard de la notochorde, le tissu ectoblastique se transforme en tissu nerveux (neurulation) et forme la plaque neurale puis le tube neural.

Les centres organisateurs du SN vont sécréter des protéines ayant un effet neuralisant (chordine, follistatine, noggine). Ces protéines confèrent une identité nerveuse au tissu sus-jacent en inhibant les effets des protéines sécrétées par les cellules ectoblastiques (activine, BMR-4 pour Bone Morphogenetic Protein). L'ensemble des cellules induites forme la plaque neurale, une bande de tissu nerveux qui coiffe la notochorde et qui, comme elle, a une organisation longitudinale et médiane, allant du pôle antérieur de l'embryon jusqu'au pôle postérieur.

Durant la 4^e SG, les berges latérales de la plaque neurale vont se soulever et fusionner dorsalement pour former le tube neural (neurulation).

Lors de la fusion, il y a individualisation des crêtes neurales (CN), qui sont des formations se disposant en position para-axiale, dorsale, sur toute la longueur du tube neural. Les CN ont la capacité de migrer entre le tube neural et l'ectoderme, au sein du tissu mésenchymateux qu'elles envahissent (dérivé du mésoblaste latéral) et où elles se multiplient pour former des structures spécifiques (bourgeons faciaux et arcs brachiaux, système nerveux autonome, système APUD, mélanocytes...). Ainsi elles participent à la création de l'orbite et de la face. Les cellules de la CN formeront le stroma cornéen et l'endothélium, le muscle ciliaire, le stroma uvéal et les mélanocytes, une partie de la sclère,

les gaines méningées et le tissu conjonctif du nerf optique. Au niveau de la face, les cellules de la CN vont donner les paupières, la conjonctive, l'orbite. Seuls l'endothélium des vaisseaux et les muscles striés ont comme origine le mésoderme para-axial et les somites pré-optiques.

3.1.3. La polarisation du tissu nerveux

L'induction du tissu nerveux s'accompagne de l'apparition de polarisations au sein du tube neural (Lumsden et Krumlauf, 1996). Schématiquement, la polarisation de la plaque puis du tube neural résulte de la mise en place de deux gradients liés à la diffusion de protéines : le premier est rostro-caudal et il est mis en place le long de la notochorde, le deuxième est ventro-dorsal et il est mis en place à partir de la notochorde (Figure 3).

3.1.3.1. Gradient caudo-rostral

Au niveau du tube neural postérieur : moelle, bulbe et rhombencéphale

- La sécrétion caudale d'acide rétinoïque par le nœud de Hensen puis sa diffusion vers l'avant du disque embryonnaire contribuent à la mise en place d'un gradient caudo-rostral. L'acide rétinoïque a des propriétés "posteriorisantes" dans les zones où sa concentration est la plus élevée. Ainsi, la partie caudale du tube neural se transforme en moelle et rhombencéphale (Smith, 1994). L'acide rétinoïque induit l'expression de gènes Hox le long du tube neural postérieur (rhombencéphale, futur tronc cérébral, cervelet et moelle). Ces gènes induisent l'expression séquentielle de gènes homéotiques (conférant une identité précise à la région cérébrale où ils sont exprimés). De ce fait, le rhombencéphale et la moelle seront constitués de segments identiques répétés à intervalles réguliers (respectivement rhombomères et métamères).

- L'acide rétinoïque agit également en favorisant la sortie du cycle mitotique des cellules de la zone ventriculaire (ZV) donc en réduisant le nombre de mitoses et par cela même le nombre de cellules produites. Ainsi les structures nerveuses les plus caudales seront de plus petit volume et accéderont au stade mature plus tôt que les structures les plus rostrales : à la naissance, les structures médullaires et du tronc cérébral sont matures pour la plupart, tandis que les volumineuses structures télencéphaliques n'atteindront leur maturité qu'en période péri, voire post-natale). Des signaux apparaissant focalement le long de la notochorde complètent ce gradient rostro-caudal.

Au niveau du mésencéphale

Le mésencéphale se trouve au-delà de l'aire d'expression des gènes Hox. Il s'agit d'une région cérébrale non segmentée, dont la polarité s'exprime dans la cytoarchitecture (lamination du tectum) et dans la construction spatiale des circuits rétino-tectaux.

L'apparition de la polarité du mésencéphale est sous la dépendance de l'expression graduelle de deux gènes En-1 et En-2, dont le produit se distribue dans le tectum selon un gradient qui guide la construction des réseaux synaptiques et la lamination tectale. Pax-6 définit la jonction entre le diencéphale et le mésencéphale en réprimant l'expression d'En-1 et Pax-2 (Matsunaga *et al.*, 2000).

La sécrétion focale par la notochorde de FGF 8 induit l'apparition de l'isthme (limite entre le rhombencéphale et le mésencéphale). Fgf 8 contrôle l'expression de gènes en cascade : la sécrétion de WNT-1 dans la partie mésencéphalique de l'isthme, qui induit à son tour l'expression de En-1 et En-2, lesquels diffusent de part et d'autre de l'isthme (Figure 3). Cela aboutit à l'apparition de structures différentes de part et d'autre de l'isthme : en avant le mésencéphale et en arrière le rhombencéphale (pont et cervelet). Expérimentalement, le rôle de ces gènes dans la morphogenèse cérébrale a largement été démontré par l'étude des mutants négatifs. Ainsi, les mutants *fgf-8* *-/-* et les mutants *Wnt-1* *-/-* ont une agénésie du cervelet et du mésencéphale avec altération de l'expression de En, et les mutants *En-2* *-/-* ont une hypoplasie et une anomalie de foliation du cervelet. En pathologie humaine, la preuve de l'implication de ces gènes n'a pas été apportée à ce jour, bien qu'étant fortement suspectée, comme par exemple devant une malformation comportant une agénésie du mésencéphale et du pont et une hypoplasie cérébelleuse (Sarnat *et al.*, 2002).

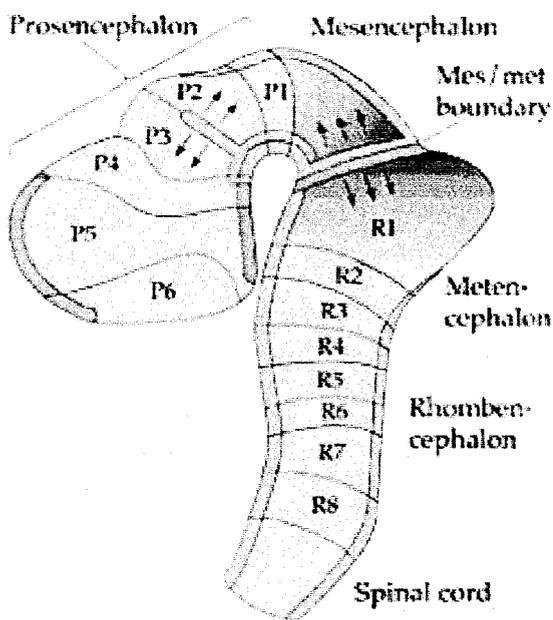
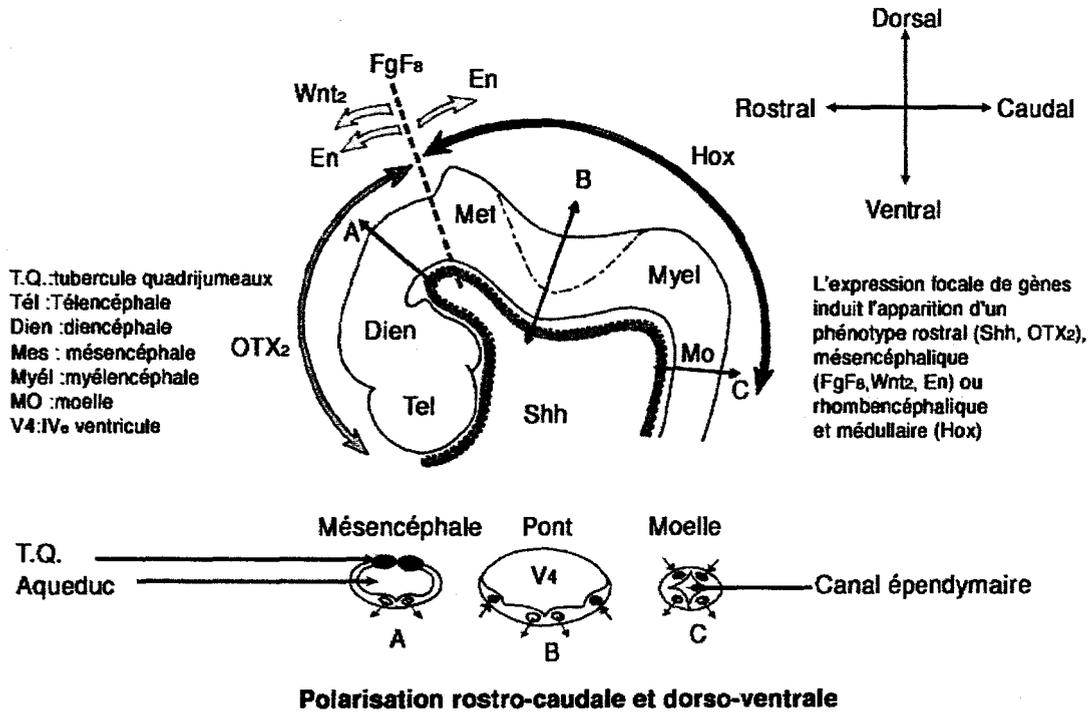
Pax-5 participe avec Pax-2 et Pax-8, à la spécification de l'isthme ; les mutants négatifs pour Pax-5 n'ont pas d'isthme et n'expriment ni En ni Wnt-1. Le gène En possède un site de liaison pour le produit des gènes Pax-2/5/8 (Li Song et Joyner, 2000), et l'expression des gènes Pax est contrôlée par *fgf-8*, ce qui ramène le contrôle de l'ensemble du réseau de signaux sous la dépendance du mésoderme axial (Garda *et al.*, 2001).

3.1.3.2. Gradient dorso-ventral

Il résulte de la mise en place de la ligne médiane. Elle est secondaire à la sécrétion de Sonic Hedgehog (Shh) par la notochorde et de la plaque préchordale. Ceci correspond à l'individualisation d'un groupe de cellules qui sécrètent à leur tour SHH qui induit l'expression de gènes ventralisants et réprime celle des gènes dorsalisants. SHH diffuse selon un gradient décroissant vers les parties latérales et dorsales du tube neural. Les protéines BMPs sécrétées par l'ectoderme recouvrant le tube neural stimulent l'expression de gènes dorsalisants. La mise en place de ces deux gradients détermine la polarisation dorso-ventrale. La portion centrale du tube est spécifiée par l'action de l'acide rétinoïque produit par le mésoderme paraxial (Pierani *et al.*, 1999).

Figure 3 : Polarisation au cours du développement.

Polarisation rostro-caudale et dorso-ventrale (d'après Adamsbaum *et al.*, 2001).



Structure neuromérique du cerveau avec les événements inductifs hypothétiques superposés. La frontière de mésencéphale/métencéphale est positive pour l'expression des gènes Fgf8 et Wnt1. La frontière p2/p3 semble être la source de la protéine sonique hedgehog (d'après Bally-Cuif et Wassef, 1995).

- En (Engrailed)
- Fg8 (Fibroblast growth factor)
- Wnt1
- ▨ shh (sonic hedgehog)

Dans le prosencéphale, Shh intervient dans l'apparition des deux vésicules cérébrales, deux évaginations latérales du diencephale qui vont croître et devenir les hémisphères cérébraux. De ce fait, Shh est indispensable à la division du champ optique primitif (partie la plus rostrale du diencephale, initialement continue sur la ligne médiane) en deux champs optiques latéralisés (les deux nerfs optiques). Les mutants Shh sont cyclopes et ne possèdent qu'une vésicule cérébrale unique. Chez l'homme, des mutations de Shh ont été rapportées dans des cas d'holoprosencéphalie (individualisation plus ou moins complète de deux hémisphères cérébraux et fusion des noyaux de la base). Shh permet également l'expression ventrale de Nkx2.1 un gène qui contrôle l'apparition de l'hypothalamus et de Emx2 qui est un gène exprimé dans le télencéphale dorsal (Brunelli *et al.*, 1996).

Le prosencéphale semble divisé en deux bandes longitudinales : l'une ventrale contenant le striatum et une dorsale renfermant le pallidum. En faveur de cette hypothèse, chacune de ces bandes exprime des gènes de régulation différents : ainsi la bande ventrale exprime Dlx-1 et Dlx-2, la bande dorsale exprime Emx-1, Emx-2, Pax-6 et Tbr-1, et possède des propriétés adhésives différentes. Ainsi les neurones en migration à l'intérieur de la zone germinative, qui se déplacent sur de longues distances, ne franchissent pas la frontière d'expression de ces groupes de gènes.

Dans le mésencéphale, le rhombencéphale et la moelle, SHH induit l'expression de Pax-6 qui détermine le phénotype moteur au niveau de la moelle, un phénotype sérotoninergique ou catécholaminergique au niveau du mésencéphale. Dans les structures dorsales, où SHH manque, apparaît un phénotype sensitif (tubercules quadrijumeaux dans le mésencéphale, noyaux sensitifs des nerfs crâniens dans le tronc cérébral, cornes postérieures de la moelle).

3.2. Du tube neural au cerveau

Le tube neural ainsi formé se présente comme une structure :

- allongée selon l'axe rostro-caudal de l'embryon,
- centrée par une lumière (les futures cavités ventriculaires, le futur aqueduc de Sylvius et le futur canal de l'épendyme),
- constituée de cellules qui se divisent dans la partie bordant la lumière (zone germinative), puis s'accumulent en périphérie lorsqu'elles ont quitté le cycle mitotique (zone sub-ventriculaire).

Selon les régions, les cellules post-mitotiques vont soit gagner la surface du tube (migration dans la zone intermédiaire) pour adopter une position sous-méningée (cortex),

soit se différencier localement, à proximité de la cavité ventriculaire (noyaux gris centraux, noyaux du tronc cérébral, noyaux de la moelle).

L'histogenèse est l'ensemble des phénomènes cellulaires qui aboutissent à la mise en place de cellules différenciées dans le parenchyme cérébral. Elle se déroule selon plusieurs étapes. La neurogenèse est la phase de production des cellules nerveuses à partir de cellules souches qui sont en mitose dans la zone germinative peri-ventriculaire. Durant la phase de migration, les neurones produits dans la zone germinative profonde se déplacent au travers de la zone intermédiaire, future substance blanche, vers le cortex superficiel, sous-méningé. L'ensemble de ces phénomènes cellulaires aboutit à la construction cérébrale puis dans un deuxième temps on assiste à la mise en fonction de cette machinerie si complexe. C'est la synaptogenèse qui met en place les contacts entre les neurones, quand ceux-ci ont atteint leur position définitive dans le cortex. Tout ceci aboutit à des modifications considérables observées macroscopiquement que nous verrons rapidement dans la morphogenèse.

Ces phénomènes sont différents dans le télencéphale, le cervelet et le tronc cérébral et se déroulent pendant des périodes différentes, ce qui nous amène à les décrire séparément.

3.2.1. Le télencéphale

3.2.1.1. Histogenèse (phase de construction)

La neurogenèse et la migration neuronale se déroulent durant les deux premiers trimestres de la grossesse, elles participent à la construction cérébrale. La synaptogenèse est un événement plus tardif, débutant à la fin du deuxième trimestre de grossesse et se prolongeant après la naissance, son apparition conditionne la survenue des deux phénomènes ultimes du développement cérébral : la gyration cérébrale et la myélinisation.

3.2.1.1.1. Neurogenèse

Les cellules souches sont des cellules à haut potentiel mitotique qui produisent des cellules filles identiques à elles-mêmes, après un nombre prédéterminé de mitoses, apparaissent des cellules-précurseurs.

1- Les cellules souches expriment des proneurogènes, qui confèrent à une cellule la compétence à produire des neurones. L'expression de ces gènes, qui permet aux cellules ectodermiques de devenir des cellules de la plaque neurale, est sous le contrôle des gènes du développement intervenant dans l'induction neurale et est, de ce fait, imprégnée des informations spatiales relatives à la polarisation du futur tube neural. Ainsi, selon la localisation -rostrale/caudale, médiane/ventrale ou latérale/dorsale-, les proneurogènes, tout en ayant la même fonction, seront différents.

2- Les cellules-précurseurs ont également un haut pouvoir mitotique, une de leur mitose produit une cellule souche et une cellule-précurseur. Après un nombre défini de mitoses, les cellules-précurseurs cessent de se diviser et deviennent des cellules post-mitotiques (CPM). Les CPM quittent la zone germinative et gagnent la zone intermédiaire où va débiter leur migration. Les cellules-précurseurs expriment des gènes neuronogéniques qui définissent parmi les cellules souches les cellules qui deviendront effectivement des neurones. Les cellules-précurseurs sont de 2 types : neuronales (ne produiront que des neurones) ou neuro-gliales (neurones et glie radiaire).

3- La neurogenèse détermine le nombre et le phénotype des neurones. Le nombre de neurones produits est fonction du nombre de mitoses des cellules souches et des cellules-précurseurs. Au cours du cycle cellulaire, la mitose survient si le point G1/S est franchi, alors la synthèse d'ADN survient et la cellule est irréversiblement engagée dans la mitose. Dans le cas contraire, elle quitte le cycle cellulaire et devient post-mitotique, ce qui est également un état irréversible pour le neurone. Deux types de molécules peuvent agir sur le cycle cellulaire :

i) celles qui favorisent la sortie, donc qui sont susceptibles de diminuer le nombre de cellules produites comme l'acide rétinoïque, les hormones thyroïdiennes et les glucocorticoïdes. Ainsi, en cas d'ablation des surrénales chez la rate gestante, on observe chez les rats des zones germinales plus épaisses et avec une activité mitotique plus prolongée (Demir et Demir, 2001).

ii) celles qui favorisent le franchissement du point G1/S, notamment les facteurs de croissance, qui "réactivent" les cellules souches quiescentes dans la ZV du cerveau adulte (Craig *et al.*, 1996).

Certaines molécules, en agissant sur le type de mitose, symétrique ou asymétrique, contrôlent l'apparition des CPM : les mutants nuls Pax-6 ont une maturation cérébrale accélérée du fait du raccourcissement du délai nécessaire à l'apparition des CPM (Estivill-Torres *et al.*, 2002).

Le phénotype du neurone s'acquiert au stade de neurone post-mitotique : quand ce dernier quitte la ZV, il n'est défini qu'en tant que neurone (il exprime alors les gènes précurseurs neuronaux), mais son phénotype neuronal (type de neuromédiateur, site de projection : expression de gènes du phénotype) n'est pas défini. Il est décrit comme "une feuille blanche" sur laquelle les facteurs environnementaux vont écrire son "destin" phénotypique. Ces facteurs sont les cellules environnantes : par exemple, des zones germinatives greffées

gèneront des neurones de type concordant avec le site hôte, indépendamment du site d'origine du greffon (Englund *et al.*, 2002).

3.2.1.1.2. Migration

1- Le neurone post-mitotique, pourvu de ses "instructions phénotypiques" va entamer un déplacement vers le plateau cortical. Il s'enroule pour cela autour du guide que constituent les prolongements de la glie radiaire tendus entre le bord ventriculaire et la surface méningée. Ce processus est la migration radiaire. Les premiers neurones à migrer (9^e SG) vers la surface des vésicules cérébrales pour y constituer le plateau cortical initial sont de deux types ; les neurones de Cajal-Retzius (cCR) qui constituent la couche marginale en superficie (couche I), et les neurones de la sous-plaque qui constituent une couche immédiatement sous-jacente (Meyer et Wahle, 1999). La sous-plaque est une couche transitoire du cortex, qui disparaîtra lorsque le plateau cortical sera formé, soit après la 27^e SG. Entre la 9^e et la 27^e SG, les neurones atteignent le plateau cortical par vagues de migrations successives. Au fur et à mesure que les neurones migrants atteignent le plateau cortical, ils vont s'intercaler entre les deux couches pré-existantes (la moléculaire et la sous-plaque) en adoptant à chaque fois la position la plus superficielle possible (ils s'arrêtent au contact des cCR) et donc en refoulant les neurones déjà en place vers la profondeur.

La migration radiaire se fait à la faveur de phénomènes de reconnaissance intercellulaire entre des substances sécrétées par les neurones et leurs récepteurs exprimés par les neurones et la glie radiaire. Certaines des molécules impliquées dans le phénomène de migration sont connues ; leurs modes d'action sont divers : maintien de la trophicité de la glie radiaire, reconnaissance neurone/glie, mobilité cellulaire, etc.

Parmi celles-ci, citons :

Les neurorégulines agissent sur la croissance et la différenciation de la glie radiaire, l'astrostatine est un récepteur exprimé par les neurones post-mitotiques qui leur permet de se lier aux cellules gliales et de migrer le long des prolongements radiaires (Zheng *et al.*, 1996) ; les souris mutantes nulles pour l'astrotactine ont des liaisons astro-gliales de mauvaise qualité et une migration ralentie (Adams *et al.*, 2002).

La reeline est une protéine extra-cellulaire sécrétée par les cellules de cCR. Sa fonction est de stopper la migration des neurones au contact de la couche I en rompant la liaison neurone/glie. En l'absence de reeline, les premiers neurones formés migrent dans la couche I, tandis que les neurones suivants stoppent leur migration à leur contact, inversant ainsi le schéma de construction du plateau cortical (les derniers neurones générés se retrouvent

dans la profondeur du cortex). En cas d'ablation des cCR durant la formation du plateau cortical (Super *et al.*, 2000), on observe un arrêt de la migration des neurones générés le plus tardivement avec une disparition trop précoce de la glie radiaire, du fait de sa transformation en astrocytes. Ces faits indiquent que les domaines d'intervention de la reeline dans le processus de migration sont multiples.

La filamine-1 est une phosphoprotéine intra-cellulaire qui lors de la reconnaissance récepteur/ligand induit une réorganisation du réseau d'actine, donc un déplacement de la cellule concernée (Fox *et al.*, 1998). Dans les cas humains avec mutation de ce gène, il existe des hétérotopies de neurones en position péri-ventriculaire, c'est-à-dire au niveau de leur site de genèse, et une désorganisation des fibres radiaires, témoins de l'altération du processus de migration (Santi et Golden, 2001).

La protéine LIS-1 intervient dans le secteur intra-cellulaire, en contrôlant les mouvements du cytosquelette (Tai *et al.*, 2002) ; elle intervient donc, outre la migration radiaire, dans les divisions cellulaires et la morphogenèse cellulaire et interagit avec le complexe Dynéine/Dynactine et Clip-170 pour se fixer aux extrémités plus des microtubules (Coquelle *et al.*, 2002). Un défaut de dosage, ou la mutation de l'un des allèles induit des troubles de la migration et de la morphologie des cellules neuronales et gliales (Cahana *et al.*, 2001).

La double cortine est une protéine liée aux microtubules du cytosquelette neuronal (Yoshiura *et al.*, 2000) ; elle stabilise les réseaux de microtubules ; elle est exprimée au cours du développement par les neurones post-mitotiques en migration (Mizuguchi *et al.*, 1999) et dans le système nerveux adulte par les neurones matures, qui ont conservé l'aptitude à construire des synapses (Nacher *et al.*, 2001) ; son excès inhibe la croissance des neurites (donc la synaptogenèse) (Shmueli *et al.*, 2001), ce qui reflète la séquence développementale normale du neurone : celui-ci ne débute sa différenciation morphologique (croissance de neurites) que lorsque sa migration est terminée.

3.2.1.1.3. Formation du plateau cortical

Jusqu'à ces dernières années, la théorie de la corticogenèse était celle proposée par Sidman et Rakic (Rakic et Sidman, 1970 ; Sidman et Rakic, 1973) à savoir que :

- tous les neurones corticaux sont générés dans la zone germinale péri-ventriculaire ;
- ils gagnent le plateau cortical par migration radiaire le long de la glie radiaire ;

- à la fin de la formation du plateau cortical, les premiers neurones à avoir migré sont situés dans les couches profondes (V, VI), les derniers dans les couches superficielles (II et III).

Des données récentes ont bouleversé cette conception classique :

1- Tous les neurones corticaux ne sont pas générés dans les mêmes sites : si les neurones destinés aux couches les plus profondes (V-VI) sont bien générés dans la ZV, ceux destinés aux couches superficielles (II, III, IV) sont générés, plus tardivement, dans la zone sub-ventriculaire, immédiatement adjacente à la ZV (Tarabybin *et al.*, 2001). Les neurones de la couche I "la moléculaire" sont générés en deux temps chez le primate : les volumineuses cCR qui sont Reeline(+), Calretinine(+) et GABA(-) sont générés précocement dans la ZV ; par contre les neurones GABA(+), de plus petites tailles sont générés plus tardivement, en dehors de la ZV des ventricules latéraux (éminence ganglionnaire et ventricule olfactif) et gagnent le cortex via la couche sous-piale (Zecevic et Rakic, 2001). Les neurones GABA(+) intra-corticaux sont tous générés en dehors de la ZV, dans les zones de neurogenèse tardive et colonisent le plateau cortical déjà constitué par la couche sous-piale.

2- Outre la migration radiaire, un autre type de migration, non radiaire, consiste en une migration tangentielle qui se déroule à la surface cérébrale, dans la couche sous-piale, et qui débute avant la formation du plateau cortical et se poursuit, alors que la migration radiaire met en place le plateau cortical. Chez l'homme, (Meyer et Wahle, 1999), la couche sous-piale qui se forme à la surface cérébrale dès la 11^e SG à partir de précurseurs générés dans la ZV du bulbe olfactif, s'étend progressivement à la surface de l'ensemble du cerveau par un mouvement de migration ventro-dorsale. La migration tangentielle concerne des neurones générés en dehors de la ZV, dans les aires de neurogenèse rostrales décrites chez le primate (Zecevic et Rakic, 2001) et chez le fœtus humain (Meyer et Wahle, 1999) ; ce type de neurogenèse implique initialement la ZV du bulbe olfactif et secondairement la ZV située en avant de la tête du noyau caudé, et de l'éminence ganglionnaire. Cette dernière zone persiste d'ailleurs chez le fœtus humain durant le troisième trimestre de grossesse alors que toutes les autres zones de neurogenèse péri-ventriculaire ont disparu. Ce type de migration est considéré comme mettant en place entre autres, toute la population d'inter-neurones GABAergique (fonction inhibitrice) du cortex et des neurones de la couche I, exprimant la reeline, et suppléant les cCR dans leur fonction de contrôle de la migration radiaire.

3- Récemment, un autre type de migration a été mis en évidence, qui se déroule de façon inverse à la migration radiaire classique, depuis le plateau cortical vers la ZV (Nadarajah *et al.*, 2002). Ce type de migration concerne les neurones GABAergiques générés dans l'éminence ganglionnaire qui, dans un premier temps gagnent le cortex par la couche sous-piale, puis "plongent" vers la ZV dans laquelle ils observent une pause, puis regagnent à nouveau le plateau cortical par migration radiaire. Cette sortie transitoire du plateau cortical est interprétée comme nécessaire à l'acquisition par ces inter-neurones d'informations sur leur positionnement intra-cortical futur.

4- La mise en place des couches du plateau cortical selon le gradient "inside-out" où les premières couches formées se retrouvent progressivement refoulées vers la profondeur nécessiterait l'expression coordonnée de deux molécules. La reeline exprimée par les cCR superficielles, stoppe la migration des neurones au contact de la couche I et rompt la liaison neurone/glie radiaire, libérant ainsi le guide glial pour les neurones migrant ultérieurement. La protéine kinase CDK5 inhibe la formation de liaisons intercellulaires entre les neurones déjà en place, et permet aux neurones parvenant au plateau cortical de traverser les couches déjà formées et d'atteindre une position superficielle (Aboitiz *et al.*, 2002). Ce scénario explique que tant chez les mutants *reeler* que chez les mutants *Cdk5*, la constitution du cortex est inversée, les neurones les premiers formés se trouvant au contact de la couche I, les derniers formés.

3.2.1.1.4. Mise en place des faisceaux d'axones

Dès le début de la phase de migration, les neurones émettent leur axone qui va se diriger vers sa cible, à la faveur de signaux de reconnaissance inter-cellulaires (entre le cône de croissance : extrémité de l'axone en croissance, et les protéines de la matrice extra-cellulaire, sécrétées par les cellules environnantes, gliales et neuronales). Certains de ces signaux sont attractifs, comme les molécules d'adhésion cellulaire (CAMs et particulièrement la glycoprotéine L1), d'autres ont un effet répulsif comme les protéines NOGO ou MAG sécrétées par les neurones (Skaper *et al.*, 2001). Le site de projection d'un neurone est l'un des paramètres de sa différenciation phénotypique (avec le type de neuromédiateur sécrété), il est déterminé dès le stade de neurone post-mitotique dans la ZV. La croissance axonale qui se produit au cours de la migration aboutit donc d'emblée à la formation de faisceaux distincts. La fasciculation d'axones homotypiques et la ségrégation entre axones d'origines différentes est également sous la dépendance de protéines de la matrice extra-cellulaires sécrétées par les axones d'un type donné et qui ont pour effet de repousser les axones d'autres types (Bagnard *et al.*, 2001).

- les faisceaux cortico-spinaux, émis par les axones de la couche V (Galea et Darian-Smith, 1995), dès la 8^e SG, sont formés par des axones à progression rostro-caudale, qui cheminent au travers des noyaux gris centraux puis dans le rhombencéphale où ils s'apposent à la face ventrale du tube neural, mêlés aux noyaux pontiques puis en avant des olives bulbaires.
- les axones calleux, émis par les neurones situés dans la couche III, se dirigent vers la ligne médiane à partir de la 12^e SG, guidés par les interactions entre les signaux émis par la glie de la ligne médiane et les protéines qu'ils expriment ;
- les axones thalamo-corticaux vont contacter dès la 8^e SG les neurones de la sous-plaque dans l'attente de la mise en place de leurs neurones-cibles dans le plateau cortical (neurones de la couche IV).

3.2.1.2. Morphogenèse cérébrale (phase de construction)

Macroscopiquement, la régionalisation du tube neural se traduit par l'apparition des traits morphologiques spécifiques.

Les courbures : les courbures mésencéphalique et cervicale, à la 4^e SG, et la courbure pontique à la 5^e SG.

Les vésicules cérébrales : elles sont d'abord au nombre de 3 à la 4^e SG. On distingue ainsi, d'avant en arrière : une vésicule prosencéphalique unique, futur diencéphale (futurs V3 et thalami), le mésencéphale et le rhombencéphale (futurs pont et bulbe). A la fin de la 5^e SG, 2 invaginations latérales apparaissent dans la partie antérieure du prosencéphale. Du fait de l'intense activité mitotique des structures rostrales, les vésicules cérébrales vont croître rapidement. A la 7^e SG, le cerveau est constitué de 5 vésicules (les 3 vésicules prosencéphaliques, le mésencéphale et le rhombencéphale) (Figure 4, Schéma A).

3.2.1.3. Phase de construction fonctionnelle : deuxième moitié de la grossesse

A la 27^e SG, la mise en place du plateau cortical par la migration radiaire est terminée, les axones des premiers neurones parvenus au cortex sont proches de leur cible ou arrivés à destination. Avec la synaptogenèse débute la phase de construction des circuits qui histologiquement va se traduire par la différenciation neuronale et anatomiquement par l'apparition de la gyration à la surface des cortex cérébraux et cérébelleux.

Figure 4 : Le cerveau (d'après Langman, 1976).

Schéma A : L'encéphale. Rappel embryologique.

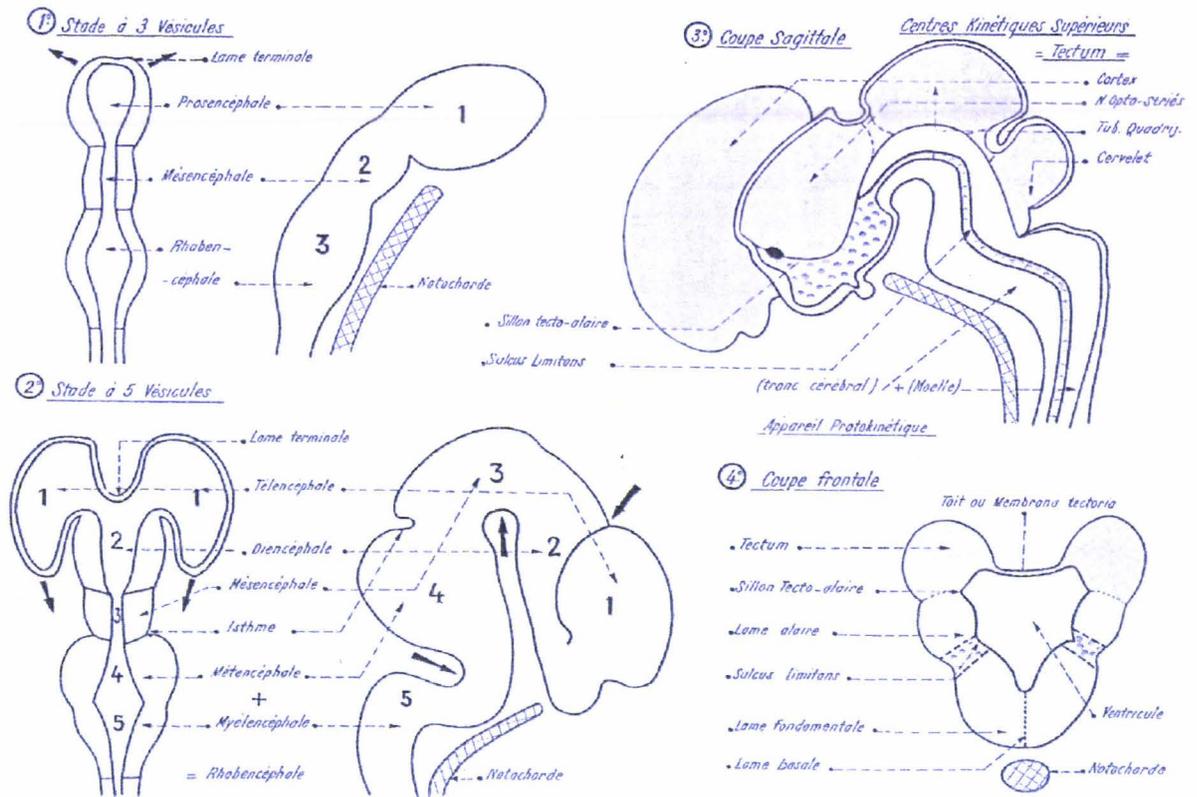
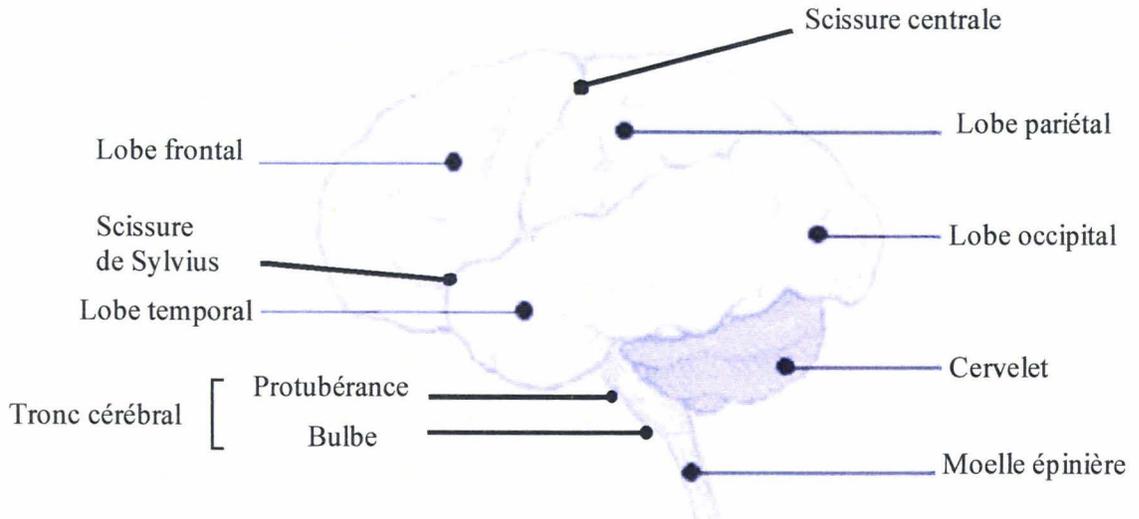


Schéma B : Rappel anatomique.



3.2.1.3.2. Histogenèse de la 27^e SG au terme

Une fois parvenu à destination, le neurone va pouvoir établir des contacts synaptiques. Cette mise en place des circuits va se faire en 2 étapes : i) reconnaissance de la cible, établissement du contact initial et apparition de l'activité synaptique, ii) remodelage des contacts initiaux par l'activité synaptique.

L'établissement du contact initial clôture la phase de croissance et de guidage axonal vers sa cible. Ce phénomène est sous-tendu par des phénomènes de reconnaissance réciproques entre l'axone en croissance et les récepteurs portés par les cellules-cibles. Elle contribue à la mise en place d'un contact synaptique initial (Haydon et Drapeau, 1995) et à l'apparition d'une activité synaptique.

Le remodelage des circuits initiaux est un phénomène dépendant de l'activité synaptique. Parmi les contacts synaptiques initiaux, les synapses établies par certains axones vont régresser tandis que celles portées par d'autres axones seront maintenues et vont se multiplier. Ce phénomène se traduit par la disparition de certains axones (élimination des collatérales) et par le développement de l'arbre dendritique du neurone-cible sur lequel les synapses sont maintenues. Il aboutit à la création des réseaux synaptiques adultes.

Ce phénomène a une expression macroscopique qui est la diminution de la surface de section du corps calleux (Clarke *et al.*, 1989). Mais il existe dans les autres faisceaux, comme le faisceau cortico-spinal (Galea et Darian-Smith, 1995). Si chez les rongeurs, ce phénomène aboutit à l'élimination des axones projetés dans des régions ou des couches corticales non adéquates, chez les primates, la projection se fait d'emblée dans la bonne région et dans la bonne couche, pourtant, l'élimination des axones y est bien plus marquée que chez les rongeurs. Il semble en fait que les axones projettent en excès dans la zone adaptée et que la dégénérescence axonale touche les prolongements qui n'ont pas encore établi de synapses (Galea et Darian-Smith, 1995).

La sélection des synapses maintenues (et donc des axones) est basée sur leur "efficacité" à transmettre l'influx nerveux. Expérimentalement, l'intervention de l'activité synaptique est démontrée par l'inhibition du phénomène (la section du corps calleux reste constante) en cas d'hypothyroïdie (les axones restent immatures et ne peuvent établir des contacts matures), ou d'épilepsie précoce (activité synchrone ne permettant pas la sélection de circuits).

La mise en place des synapses entraîne le développement des arbres dendritiques des neurones contactés. Histologiquement, cela se traduit par l'apparition des différenciations des neurones. Au niveau du cortex cérébral, les deux types de neurones intracorticaux

(pyramidaux ou granulaires) apparaissent tandis qu'émergent les diverses couches (couches II et IV : neurones granulaires ; couches III, V : neurones pyramidaux). Les couches les plus profondes (V et IV) sont discernables entre la 27^e et la 32^e SG, tandis que les plus superficielles (III et II) le sont après la 32^e SG.

3.2.1.3.2. Gyration cérébrale

Le développement des arborisations dendritiques a pour effet d'augmenter la surface cérébrale, ce qui entraîne l'apparition de sillons à la surface des hémisphères cérébraux. La mise en place de la gyration est donc dépendante du degré de maturation du cerveau et du niveau d'organisation du cortex ; un trouble de la corticogenèse se révélera à ce stade tardif même s'il résulte d'une perturbation plus précoce du processus développemental.

Plusieurs études anatomiques ont étudié le déroulement de la gyration cérébrale (Chi et Dooling, 1976 ; Armstrong *et al.*, 1995 ; Adamsbaum *et al.*, 2001) et décrivent une chronologie précise. Les fissures primaires apparaissent dès la 14^e SG et se mettent en place jusqu'à la 31^e semaine. Avant la 27^e SG, sont visibles la fissure inter-hémisphérique, le sillon olfactif, la scissure sylvienne, le sillon pariéto-occipital, la scissure calcarine, qui délimitent les lobes cérébraux entre eux. A la 27^e SG sont discernables le sillon central et la scissure temporale supérieure. Entre la 27^e et la 32^e SG apparaissent des sillons au sein des lobes précédemment délimités : les sillons pré-central, frontal supérieur, post-central, intra-pariétal, temporal inférieur et le sillon occipito-temporal (Figure 4, Schéma B).

Après la 35^e SG apparaissent les sillons secondaires, les sillons tertiaires après la 38^e SG et leur mise en place s'effectue jusqu'aux premiers mois post-nataux ; contrairement aux sillons primaires qui sont identiques d'un individu à l'autre, les sillons secondaires et tertiaires s'expriment avec une variabilité croissante entre individus.

La construction laminaire du cortex intervient dans l'apparition de la gyration : la plus grande richesse en synapses des couches superficielles associatives (IV, III) entraînerait une expansion du volume de ces couches plus grand que celui des couches profondes, et la différence de croissance de ces deux groupes de couches aboutirait à l'apparition de gyri à la surface cérébrale (Richman *et al.*, 1975).

3.2.2. Développement du tronc et du cervelet

Les premières ébauches du cervelet apparaissent à la 7^e SG à la face dorsale du premier rhombomère sous la forme du tubercule cérébelleux primordial. Le tubercule cérébelleux primordial va croître d'avant en arrière à la face dorsale du rhombencéphale à

la faveur d'évènements développementaux étroitement liés avec ceux qui impliquent le tronc cérébral :

1) la zone germinative péri-ventriculaire va générer les neurones des noyaux des nerfs crâniens pour le tronc cérébral, les neurones de Purkinje et des noyaux profonds qui vont coloniser le toit du rhombencéphale dans sa partie la plus rostrale pour former le tubercule cérébelleux primordial (jusqu'à la 12^e SG).

2) le long de l'insertion du voile médullaire (toit du V4) sur le rhombencéphale va apparaître une nouvelle structure, sous la forme d'un épaissement tissulaire : la lèvre rhombique. De plus, dans la partie rostrale du rhombencéphale, là où le tubercule cérébelleux primordial "coiffe" la cavité rhombencéphalique, il existe également un composant cérébelleux de la lèvre rhombique.

La lèvre rhombique rhombencéphalique est une zone germinative qui va produire :

- les neurones du pont dans sa partie rostrale
- les neurones de l'olive et du noyau arqué dans sa portion caudale

Ces neurones générés dans l'angle externe du V4 vont devoir migrer pour rejoindre leur position définitive, ils constituent une lame cellulaire qui recouvre la face antérieure du rhombencéphale, le tractus ponto-bulbaire (neurones olivaires inférieurs et pontiques) ou qui s'insère dans le parenchyme, ventralement (noyaux olivaires accessoires). Le tractus ponto-bulbaire se forme de la 8^e à la 20^e SG.

Les neurones olivaires parviennent à destination séquentiellement : tout d'abord ceux de l'olive accessoire ; puis ceux de l'olive inférieure.

Les neurones pontiques se disposent également séquentiellement : tout d'abord le long de la ligne médiane ; puis en couches successives (alternant avec les faisceaux des fibres pyramidales) disposées de plus en plus latéralement et ventralement.

Les constituants issus de la lèvre rhombique confèrent au rhombencéphale sa configuration adulte en lui adjoignant ventralement le pont et les olives.

La lèvre rhombique cérébelleuse est une zone germinative qui va produire des cellules qui vont migrer à la surface du tubercule cérébelleux primordial jusqu'à le recouvrir totalement et former la couche des grains externes (CGE). Ces cellules sont elles-mêmes des cellules en mitose qui vont continuer à se multiplier à la surface cérébelleuse. Au terme de leur cycle mitotique, les cellules post-mitotiques migrent en profondeur vers les cellules de Purkinje pour constituer la couche des grains internes (CGI). Les CGI sont au contact avec les cellules de Purkinje avec lesquelles ils établissent des synapses. Les cellules de Purkinje acquièrent une morphologie mature après la 30^e SG, tandis que la couche des

grains internes se met en place. Jusqu'à la 30^e SG, la production de CGE puis la mise en place de CGI est continue mais modérée.

Parallèlement, les axones des neurones olivaires, après avoir traversé la ligne médiane dans le rhombencéphale, cheminent et se fasciculent en pédoncule cérébelleux inférieur et gagnent le tubercule cérébelleux. Ils y établissent des synapses avec les cellules de Purkinje situées dans le vermis (axones issus des olives accessoires) et dans les hémisphères (olive inférieure). La mise en place de synapses avec les cellules de Purkinje contribue à l'apparition d'une foliation primaire.

L'activité mitotique au sein de la CGE va s'intensifier après la 30^e SG et demeurer ainsi jusqu'à la fin de la première année post-natale. Cela aboutit à un épaissement de la CGE, une production importante de neurones post-mitotiques qui vont migrer et mettre en place une CGI dense.

Les neurones de la CGI, une fois leur destination définitive atteinte, vont établir des synapses avec les cellules de Purkinje ce qui va entraîner la différenciation de celles-ci avec développement de leur arbre dendritique, augmentation de la surface cérébelleuse et apparition de la foliation cérébelleuse secondaire.

La foliation cérébelleuse apparaît progressivement à partir de la 24^e SG, quand la couche des grains externes est en place et commence à produire des neurones pour le cortex cérébelleux ; mais elle s'accroît considérablement après la 32^e SG, tandis que le volume cérébelleux croît très rapidement.

Finalement, le cortex cérébelleux (hémisphérique et vermien) est constitué de 3 couches, résultat des différentes migrations : la couche moléculaire, la couche des cellules de Purkinje et la couche des grains.

3.3. L'œil

3.3.1. Développement de l'œil

Le développement de l'œil implique des interactions entre plusieurs tissus : le neuroectoderme du cerveau antérieur, l'ectoderme de surface et le mésenchyme dérivé des crêtes neurales. Il commence au 22^e jour de gestation (J22) chez l'homme. Au moment de la fermeture du tube neural, se forme deux excroissances latérales, les primordia optiques, ces 2 sillons sont situés entre le télencéphale et le diencephale et sont donc formés par l'invagination des plis neuraux. Chacune des excroissances s'allonge vers l'ectoderme sus-jacent en une tige optique. Lorsque le neuropore se ferme le 24^e jour, les ébauches optiques s'évagincent à J25 pour former les vésicules optiques. Ces vésicules sont en continuité avec

le tube neural. La pression qui règne dans le liquide contenu dans le tube neural va permettre une expansion de ces vésicules optiques. Les vésicules se développent et viennent au contact de l'ectoderme. Une constriction va apparaître entre les vésicules et le tube neural. Après l'apposition de la couche cellulaire de la vésicule optique et de l'ectoderme, on observe un épaissement de ces deux couches (J27) puis la vésicule optique d'une part, le disque épaissi de l'ectoderme (appelé placode cristalline) d'autre part, s'invaginent.

La vésicule optique invaginée, forme la cupule optique, alors que le cristallin se forme à partir d'un détachement de l'ectoderme de surface. L'invagination est complète chez l'homme à J29. La vésicule optique, toujours reliée au cerveau par la tige optique, n'est pas uniformément ronde, mais présente en position ventrale la fissure optique.

La vésicule optique après son invagination présente une structure en deux feuillets, le feuillet interne se différenciera en neurorétine, le feuillet externe en rétine pigmentaire.

3.3.2. Développement de la rétine

La neurorétine est une structure très organisée. Elle est constituée, au début du développement, d'une seule couche cellulaire appelée couche neuroblastique. La différenciation des différentes couches cellulaires de la neurorétine commence au pôle postérieur de la cupule optique près de la tige optique, et progresse ensuite de manière centrifuge. Vers le début de la 7^e SG chez l'homme, les cellules nouvellement formées dans la couche neuroblastique migrent vers l'intérieur pour former la couche neuroblastique interne correspondant aux futures cellules ganglionnaires, leurs axones grandissent et s'introduisent dans la tige optique vers la 8^e SG. La couche, que ces cellules ont quitté devient la couche neuroblastique externe. Elle se divisera en deux couches distinctes, la couche granulaire externe (CGEr) et la couche granulaire interne (CGIr). Cette séparation se fait entre la 10^e et la 12^e SG chez l'homme. Les précurseurs des cellules bipolaires et horizontales se retrouvent au milieu de la couche nucléaire externe après sa séparation et migrent. Elles se différencient puis migrent dans la CGIr.

Cette stratification est retrouvée chez l'adulte, puisque la neurorétine comporte trois couches cellulaires et deux couches acellulaires (Figure 5). En partant de l'extérieur, la couche cellulaire la plus externe, qui est en contact avec les cellules de la RPE (pour Reticulum Pigmentaire Epithelial), est la CGEr composée des photorécepteurs, cônes et bâtonnets. La deuxième couche cellulaire est la CGIr, contenant les corps cellulaires des interneurons : cellules horizontales, cellules bipolaires, cellules amacrines, ainsi que les corps cellulaires des cellules de Müller (cellules gliales de même origine que les neurones).

La troisième couche cellulaire est la couche des cellules ganglionnaires (CCG). En plus des cellules ganglionnaires, cette couche contient également les corps cellulaires de cellules amacrines déplacées. Entre ces couches cellulaires se trouvent deux couches acellulaires, la couche plexiforme externe (CPE), entre la CGEr et la CGIr contenant des connexions entre les cellules horizontales, bipolaires et les photorécepteurs et la couche plexiforme interne (CPI) entre la CGIr et la CCG contenant les connexions entre cellules bipolaires, amacrines et les cellules ganglionnaires (Sterling, 1990).

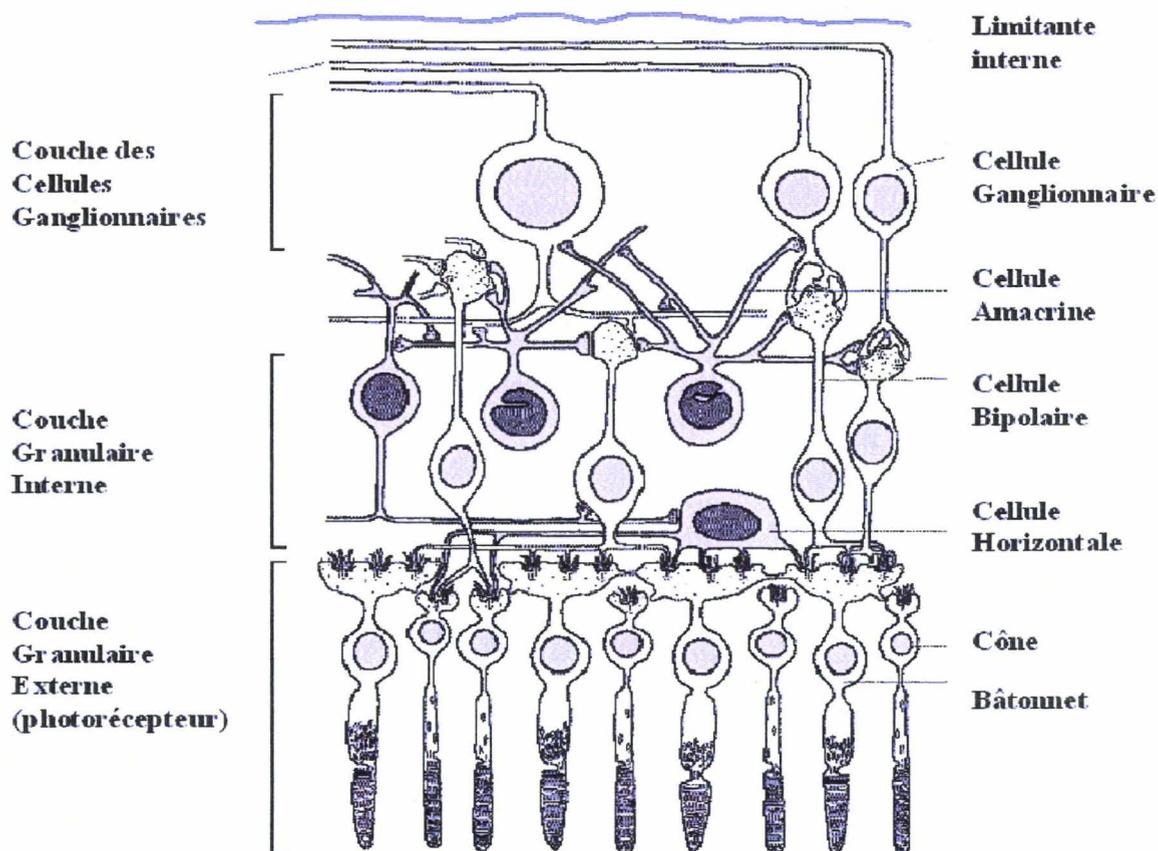


Figure 5 : Les différentes couches et les cellules qui composent la rétine (d'après Bevelander, 1970).

3.3.3. Facteurs de transcription exprimés dans le développement de l'œil

L'étude des anomalies du développement de l'œil a permis d'identifier un certain nombre de gènes programmeurs. Nous retiendrons les anomalies retrouvées chez l'homme. Le gène Pax-2 est exprimé durant les processus d'induction qui conduisent à la formation de l'œil (Nornes *et al.*, 1990). Il s'exprime au début du développement exclusivement dans la partie ventrale de la vésicule optique puis reste restreint aux cellules de la racine du nerf optique. Les cellules qui expriment Pax-2 n'expriment pas Pax-6 et

réciproquement (Schwarz *et al.*, 2000). Il a été récemment montré que ces deux gènes inhibaient mutuellement leur expression. Les mutations du gène Pax-2 sont responsables de colobome du nerf optique (Cunliffe *et al.*, 1998 ; Chu *et al.*, 2001).

Six-3, ce gène a été localisé dans une région chromosomique où a été cartographié le locus responsable d'une holoprosencéphalie avec cyclopie (Pasquier *et al.*, 2000).

Le gène Crx (Cone Rod homeobox), codant un facteur de transcription, est fondamental dans le développement, la différenciation et la maintenance des photorécepteurs rétiniens, cônes et bâtonnets (Furukawa *et al.*, 1999 ; Germot *et al.*, 2001 et in press).

Le gène Chx10 joue un rôle dans la différenciation de la neurorétine. Ce gène contient un homeobox de type paired mais pas de paired box. Il s'exprime surtout dans la zone qui va donner la rétine et, son expression se restreint aux cellules bipolaires. Une mutation dans ce gène est responsable de microphthalmie (Percin *et al.*, 2000).

Le gène Pitx2 (anciennement Rieg), chez l'homme, la mutation de ce gène est responsable du syndrome de Rieger qui associe des anomalies de la chambre antérieure de l'œil avec glaucome, une hypoplasie dentaire, un dysmorphisme cranio-facial et une anomalie de la paroi ombilicale. On décrit six mutations de ce gène. La maladie est autosomique dominante. Ce gène a été décrit en 4q25 et un autre locus a été trouvé en 13q14 (Flomen *et al.*, 1998 ; Kulak *et al.*, 1998 ; Borges *et al.*, 2002).

Le gène Mitf (pour Microphthalmia-associated Transcript Factor) dont ces mutations, chez l'homme, donnent le syndrome de Waardenburg de type II et ont été décrites en 3p14.1-p12.3 (Tachibana *et al.*, 1994 ; Tassabehji *et al.*, 1994). Ce gène code un facteur de transcription à domaines b-HLH-LZ (b : domaine basique de liaison à l'ADN ; HLH : hélice boucle hélice ; LZ : Leucine Zipper, ces deux motifs étant impliqués dans les interactions protéiques). Il se fixe à l'ADN sous forme d'homodimères. Les parties amino- et carboxy-terminales de la protéine MITF possèdent une activité transactivatrice. La protéine mutante Mi peut être affectée dans la partie N-terminale, le domaine basique, le HLH, ou encore dans le Leucine Zipper. Il s'agit parfois de mutations ponctuelles changeant un acide aminé en un autre ou créant un codon stop, mais aussi de délétions internes plus ou moins grandes, ou d'ajouts de bases.

L'organisation génomique du gène a été caractérisée chez l'homme et la souris (Yasumoto *et al.*, 1998). Il existe quatre isoformes de MITF, générées à partir de quatre promoteurs différents et par épissage alternatif : une forme M, qui est la forme spécifiquement exprimée dans les mélanocytes issus de la crête neurale, une forme A qui est la plus abondante dans la rétine pigmentaire, une forme C et une forme H.

MITF intervient directement au niveau de la synthèse des mélanines en activant les gènes codant la tyrosinase, Trp1 et Trp2 (Shibahara *et al.*, 2000). C'est à cause du phénotype sévère au niveau de l'œil que le locus *Mi* a ainsi été dénommé par les généticiens, "microphthalmia" référant à la petite taille des yeux produits chez les souris par des mutations dans la séquence codante du gène. Tous les mutants *Mi* microphthalmiques ont, à l'âge adulte, une RPE peu, voire pas du tout pigmentée. L'analyse de ces mutants fait clairement apparaître qu'au cours du développement de l'œil, MITF joue un rôle capital dans sa différenciation pigmentaire. Une expression correcte de *Mitf* limite la prolifération de la RPE et contribue à en faire une monocouche de cellules pigmentées, suggérant ainsi un contrôle de *Mitf* sur le cycle cellulaire. MITF interagit avec PAX-6 et cette interaction inhibitrice serait essentielle pour expliquer la partition du neuroépithélium de la vésicule optique dans ces deux constituants, la rétine pigmentaire et la neurorétine (Planque *et al.*, 2001). En l'absence d'un gène MITF fonctionnel, la rétine pigmentaire se transdifférencie *in vivo* en neurorétine (Nguyen et Anheiter, 2000).

Comme nous venons de le voir, la période embryonnaire correspond à la mise en place des différentes ébauches embryonnaires des organes. Cette mise en place s'effectue par champs d'induction tissulaire, coordonnés dans l'espace et dans le temps. Ces champs, déduits de par la topographie des malformations observées chez l'homme, correspondent à des territoires soumis à l'influence d'une cascade de gènes d'organisation spatiale et de la différenciation des tissus. Certains de ces gènes régulant ces processus sont partiellement identifiés et ont été mentionnés précédemment. Dans ce chapitre, nous nous intéresserons plus particulièrement aux gènes Pax et Engrailed.

IV. DIFFERENCIATION

La différenciation est le résultat de l'extinction de gènes caractéristiques de l'état indifférencié et de l'expression de gènes marquant le nouvel état différencié de la cellule. Les gènes exprimés par une cellule dépendent de son origine embryonnaire, du stade de développement de l'organisme, de l'environnement du tissu ou de la cellule et des fonctions à remplir.

4.1. Gènes de développement

Les protéines à homéodomaine définissent une classe de protéines impliquées dans la régulation de l'expression des gènes au cours du développement. L'expression d'une combinaison de protéines à homéodomaine confère aux cellules et aux tissus une information dite de position quant à leur place au sein de l'embryon. C'est en fonction de cette information que sont décidées les voies de différenciation appropriées, qu'il s'agisse des lignages cellulaires ou des processus morphogénétiques engageant un ensemble de cellules.

4.1.1. Les gènes homéotiques

Un gène homéotique est par définition, un gène dont la mutation produit une homéose, c'est-à-dire l'apparition d'un organe bien formé mais à un mauvais emplacement du corps (tissu ectopique ou choristome). Un gène homéotique est donc défini par rapport au phénotype qu'il entraîne lorsqu'il est muté et non par sa séquence nucléotidique. Un segment de l'organisme possède toutes les potentialités et au cours du développement un "choix" s'opère ; lorsque ce choix est faux, le segment ne possède pas les organes attendus.

4.1.1.1. Les gènes homéotiques chez la drosophile

L'étude du développement segmenté chez la drosophile et ses nombreux mutants a permis d'identifier un grand nombre de gènes dont les produits codant pour des facteurs de transcription, contrôlent des étapes "clés" du développement, en jouant un rôle essentiel dans la spécification de l'identité cellulaire le long de l'axe antéro-postérieur. Ces gènes ont des profils d'expression restreints. Toutefois, même si de très nombreux gènes homéotiques sont des facteurs de transcription, d'autres types de protéines, tel par exemple le récepteur de l'EGF, peuvent avoir un rôle homéotique au cours du développement (Kumar et Moses, 2001).

Les premières étapes de la segmentation chez la drosophile sont initiées par 4 types de gènes : les gènes d'origine maternelle, les gènes "gap", les gènes "pair-rule" et les gènes de polarité de segments. Les différents facteurs issus de ces gènes agissent en cascade de façon combinée, pour ensuite activer les gènes homéotiques qui vont permettre aux différents segments d'acquérir leur identité sur l'axe antéro-postérieur. Chez la drosophile, il y a seulement 8 gènes qui vont contrôler la différenciation de 14 segments différents, ils sont groupés en 2 complexes génomiques situés sur le même chromosome, appelés de façon collective le HOM-C (Homeotic Complex). Les gènes homéotiques ont souvent des domaines d'expression chevauchant, ce qui permet des interactions entre leurs produits (Duboule et Dolle, 1989).

4.1.1.2. Conservation des gènes à homéodomaine

Chez les mammifères comme la souris et l'homme, les homologues de ces gènes sont organisés en 4 complexes génomiques (Hox-A, B, C, D) localisés sur différents chromosomes (Duboule et Dolle, 1989). Une caractéristique majeure de cette famille de protéines portant le même type de motif de liaison à l'ADN, l'homéodomaine, est leur extrême conservation. Cette conservation, structurelle et fonctionnelle, est illustrée par des expériences de complémentation génétique entre mammifères et arthropodes puisque des protéines de mouche peuvent remplacer leurs homologues absentes chez la souris, et réciproquement (Hanks *et al.*, 1998 ; Hauck *et al.*, 1999).

4.1.1.3. Classification des protéines à homéodomaine

Ces protéines à homéodomaine sont divisées en 22 classes, 7 classes comprises dans la super classe organisée en complexe génomique et 15 classes dans la super classe dite dispersée, les gènes de cette dernière étant dispersés dans tout le génome. Cette classification se base sur des critères évolutifs : les homologies de séquence entre les homéodomains et les séquences qui les encadrent, l'association avec d'autres motifs conservés et sur la position des introns.

La majorité des gènes à boîte homéo ne font pas partie de ces complexes homéotiques. Parmi les 15 différentes classes regroupées en fonction de leur structure, nous nous intéresserons plus particulièrement à la classe PAIRED et ENGRAILED (EN) :

- la classe Paired (PRD)

Les gènes Pax ont été isolés chez les mammifères sur la base d'une homologie de séquence avec la séquence codant le domaine paired de la protéine Paired. Ainsi, 9 gènes Pax (appelés Pax-1 à 9) ont pu être isolés chez les mammifères. Dans la partie amino-terminale de la protéine est localisée le domaine paired. Ce domaine est suivi d'une région charnière possédant pour toutes les protéines PAX, à l'exception de PAX-4 et PAX-6, une séquence octapeptide homologue à la séquence HSIDGILG présente dans d'autres protéines de drosophile. La fonction de ce motif n'est pas clairement établie mais il pourrait être impliqué dans les mécanismes de dimérisation entre protéines (Strachan et Read, 1994 ; Tremblay et Gruss, 1994).

En aval de la région charnière, les protéines PAX-3, PAX-7, PAX-4 et PAX-6, possèdent un second domaine de liaison à l'ADN de type homéo, avec une sérine comme acide aminé 50. Ce domaine est tronqué dans les protéines PAX-2, PAX-5 et PAX-8, et absent dans les protéines PAX-1 et PAX-9. Dans la portion carboxy-terminale de la

protéine un domaine de plus de 100 aa, riche en résidus proline, sérine et thréonine, présente les caractéristiques structurales de domaine d'activation transcriptionnelle.

- la classe *Engrailed*

Les gènes de type *Engrailed* sont caractérisés, outre la boîte homéo à glutamine comme acide aminé 50, par 4 régions codant des domaines conservés. Le premier domaine, EH1, d'environ 13 aa, est situé dans la région amino-terminale. Les deux domaines suivants qui sont adjacents, EH2 et EH3, sont en amont de l'homéodomaine et font respectivement 20 et 8 aa. Le quatrième domaine EH5 de 20 aa est situé directement en position carboxy-terminale de l'homéodomaine. Il existe deux gènes *Engrailed* chez les mammifères, *En-1* et *En-2* (Joyner et Martin, 1987). Cette classe *Engrailed* sera abordée de façon plus détaillée dans un chapitre ultérieur.

4.2. Les gènes Pax

4.2.1. Famille des gènes Pax

Les gènes Pax peuvent être classés en 4 sous-classes (Tableau 1) qui reflètent leurs homologies de structure ainsi que leurs modes d'expression au cours de l'embryogenèse (Stuart et Gruss, 1995 ; Attié-Bitach *et al.*, 1998).

	Drosophile	Souris	Chromosome	
			Souris	Homme
Sous-classe I				
PRD +	Pox meso (Pox m)	Pax-1	2	20p11
OCT +		Pax-9	12	14q12-q13
HD -				
Sous-classe II				
PRD +	Gooseberry (Gsb)	Pax-3	1	2q35
OCT +	Gooseberry neuro (Gsb _n)	Pax-7	4	11p36.2
HD +	Paired (PRD)			
Sous-classe III				
PRD +	Pox neuro (Pox n) HD -	Pax-2	19	10q25
OCT +		Pax-5	4	9p13
HD partiel		Pax-8	2	2q12-q14
Sous-classe IV				
PRD +	Eyeless (Ey)	Pax-6	2	11p13
OCT -		Pax-4	6	7q22-qter
HD +				

Tableau 1 : Classification des gènes Pax (adapté de Babinet, 1993).

PRD +/- : domaine paired présent ou absent ; HD +/- : homéodomaine présent ou absent ;

OCT +/- : octapeptide présent ou absent.

4.2.2. Expression au cours du développement

Chez les vertébrés, plusieurs gènes Pax s'expriment dans les tissus adultes mais l'expression initiale de tous les gènes Pax commence très tôt dans l'embryon. Ces gènes sont exprimés dans différents types cellulaires et, excepté Pax-1 et Pax-9, contribuent au développement précoce du SNC (Figure 6). De plus, contrairement aux gènes Hox qui ont une expression limitée le long de l'axe antéro-postérieur, les gènes Pax s'expriment sur toute la longueur du tube neural et cette expression diminue progressivement au cours du développement. Il y a bien une régionalisation de l'expression de ces gènes dans le tube neural mais sur l'axe dorso-ventral et dans les tissus d'origine mésodermique où l'expression semble comme confinée dans les structures segmentées (Gerard *et al.*, 1995 ; Terzic et Saraga-Babic, 1999). L'expression spatialement restreinte des gènes Pax dans la partie antérieure du tube neural suggère un rôle dans la régionalisation des différentes aires du cerveau. Cette hypothèse est soutenue par de nombreuses données, en particulier par l'observation des domaines d'expression des gènes Pax qui respectent les limites anatomiques des neuromères pendant le développement, suggérant un rôle pour ces gènes à la fois dans la différenciation neuronale et dans la maintenance des différents sous-types neuronaux (Stoykova et Gruss, 1994).

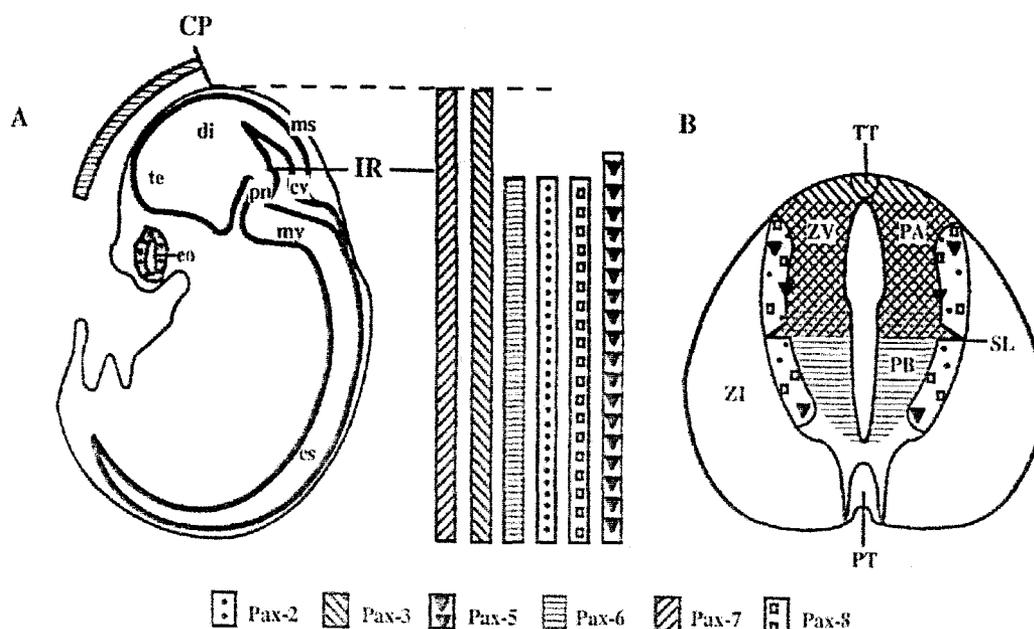


Figure 6 : Expression des gènes Pax chez la souris dans le système nerveux central.

(A) Distribution longitudinale à E12,5. (B) Expression sur une coupe de tube neural à E11,5. eo : épithélium olfactif, cs : corde spinale, my : myélocéphale, di : diencephale, ms : mésencéphale, cv : cervelet, te : télencéphale, pn : pons, TT : toit du tube neural, PA : plaque alaire, PB : plaque basale, PT : plancher du tube neural, SL : Sulcus limitans, ZI :

zone intermédiaire, ZV : zone ventrale, IR : isthme rhombencéphalique, CP : commissure postérieure (d'après Tremblay et Gruss, 1994).

4.2.3. La sous-classe Pax-2, 5 et 8

Pax-2 et Pax-8 sont initialement exprimés dans le tube neural et le rhombencéphale (Nornes *et al.*, 1990 ; Dressler *et al.*, 1990 ; Platchov *et al.*, 1990). Dans le tube neural, cette expression est restreinte à un groupe de neurones différenciés post-mitotiques de chaque côté de la limite dorso-ventrale. Ces cellules donneront les interneurons de la matière grise du tube neural. Dans le cerveau, Pax-2 et Pax-8 sont exprimés dans la zone entre le myélencéphale et le métencéphale, au-dessus de la limite cerveau moyen-rhombencéphale, alors que des taux élevés de Pax-5 sont détectés dans cette limite et au niveau du tegmentum mésencéphalique (Asano et Gruss, 1992) (Tableau 2). Les messagers de Pax-8 deviennent rapidement indécélabes dans le cerveau alors que Pax-2 continue à être transcrit durant tout le développement. Une analyse plus fine de Pax-2 et Pax-8 montre que ces deux gènes génèrent par épissage alternatif plusieurs messagers codant des protéines différentes, ces phénomènes d'épissage peuvent être régulés de façon différentielle au cours du développement (Kozmik *et al.*, 1993).

L'expression de Pax-5 est détectée à partir de E13 dans le foie fœtal quand commence la lymphopoïèse B. Il est ensuite exprimé dans les tissus lymphoïdes B et dans les cellules B à tous les stades de la différenciation. Cette expression persiste chez l'adulte dans tous les tissus lymphoïdes B en contraste avec son expression transitoire dans le SNC. Ses transcrits sont localisés dans les follicules de cellules B, la rate et les ganglions lymphatiques. L'annulation de Pax-5 par la technique de recombinaison homologue chez la souris provoque des altérations du cerveau moyen et du cervelet antérieur. Il y a également blocage complet de la différenciation des cellules B à partir d'un stade très précoce. La délétion de Pax-5 n'a pas d'effet semi-dominant comme les mutations de Pax-3, Pax-6 et Pax-1, et les souris hétérozygotes pour la délétion se développent normalement (Urbanek *et al.*, 1994).

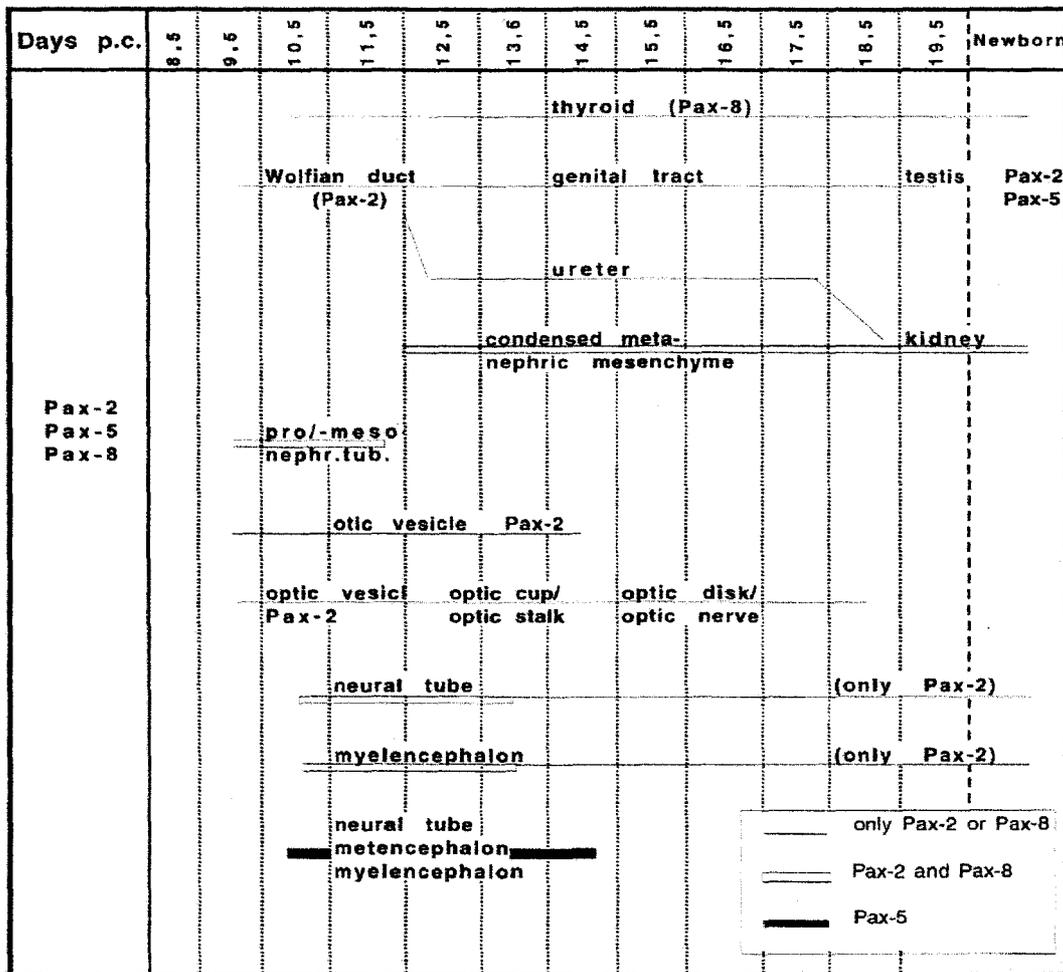


Tableau 2 : Expression de Pax-2, Pax-5 et Pax-8 au cours du développement chez la souris (d'après Tremblay et Gruss, 1994).

4.3. Pax-6

Le gène Pax-6 est exprimé dans le tube neural, le cerveau, la neurorétine, le cervelet, le pancréas endocrine et les cellules entéroendocrines du système digestif (Hill *et al.*, 1999 ; Walther et Gruss, 1991 ; Martin *et al.*, 1992 ; Turque *et al.*, 1994). Pax-6 est codé par 11 exons et peut générer par épissages alternatifs et initiation interne sur un AUG situé en aval du domaine paired, 4 types de protéines différentes (Carrière *et al.*, 1993 ; Dozier *et al.*, 1993). Trois de ces protéines (p46, p48 et p43) contiennent différentes versions du domaine paired, la quatrième issue de l'initiation interne est dépourvue de domaine paired (Figure 7). En fait, si on tient compte de la présence d'un épissage alternatif présent dans l'exon 10 du gène et qui ajoute (ou pas) 6 aa à chacune de ses protéines, la diversité des protéines codées par Pax-6 est bien plus grande encore. Les outils actuellement disponibles ne permettent pas de distinguer ces différentes formes, mais

ces protéines ont certainement des fonctions différentes du fait des grandes modifications qui affectent la structure du domaine paired selon les épissages.

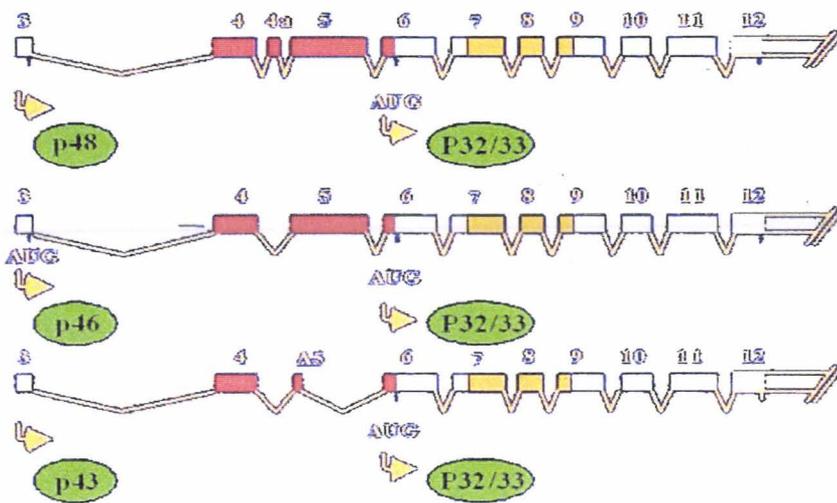


Figure 7 : Les différents isoformes de PAX-6 (d'après Carriere *et al.*, 1993).

4.3.1. Expression au cours du développement

Pax-6 s'exprime très tôt dans le tube neural, juste après sa fermeture. Ensuite, il s'exprime dans le cerveau antérieur, le rhombencéphale et la moelle épinière. Ces patrons d'expression sont précoces et très spécifiques dans le temps et dans l'espace (Gérard *et al.*, 1995). Comme la plupart des gènes Pax s'exprimant pendant la neurogenèse précoce, les domaines d'expression de Pax-6 coïncident avec des limites morphologiques du système nerveux embryonnaire en développement (Tableaux 3 et 4). C'est le premier gène de cette famille à être exprimé dans le cerveau. Pax-6 est exprimé dans des zones précises du cerveau antérieur en développement, qui vont donner le diencéphale et le télencéphale, mais pas dans les futures régions mésencéphaliques et métencéphaliques (Walther *et al.*, 1991 ; Krauss *et al.*, 1991). Il est exprimé dans le neuroépithélium dorsal et latéral du télencéphale et dans le thalamus ventral du diencéphale ainsi que dans la partie dorsale du sulcus diencéphalus medius (Walther *et al.*, 1991). Son expression s'arrête de façon nette au niveau de la commissure postérieure qui marque la limite entre le cerveau moyen et le cerveau antérieur (c'est-à-dire diencéphale et mésencéphale). Plusieurs travaux ont montré que les gènes En-1 et En-2 sont exprimés dans la zone d'exclusion de Pax-6, à peu près aux mêmes stades, ces domaines d'expression étant limités par plusieurs rangées de cellules n'exprimant aucun de ces deux gènes (Püschel *et al.*, 1992). Par la suite, l'expression de Pax-6 est détectée dans le mésencéphale caudal et dans le métencéphale. Il est également présent dans le myélocéphale. Son expression va persister dans ces

structures pendant tout le développement. Une analyse plus fine au niveau du cervelet montre une expression différentielle de Pax-3 et Pax-6 : dans le cortex cérébelleux, la couche de cellules granulaire exprime des taux de Pax-6 élevés, alors que la glie de Bergmann et les cellules qui entourent les cellules de Purkinje expriment Pax-3 (Stoykova et Gruss, 1994).

Days p.c.	8,5	9,5	10,5	11,5	12,5	13,6	14,5	15,5	16,5	17,5	18,5	19,5	Newborn	
PAX-6														

Tableau 3 : Expression de Pax-6 au cours du développement chez la souris (d'après Tremblay et Gruss, 1994).

Dans le tube neural, son expression commence un peu plus tard que celle de Pax-3, juste avant la fermeture du tube neural. Comme celle de Pax-3 et Pax-7, son expression se fait dans des régions dorso-ventralement restreintes. Pax-6 est détectée dans la zone ventriculaire de la partie basale et latérale du tube, excepté dans le plancher du tube, et chevauche les domaines d'expression de Pax-3 et Pax-7. Très précocement, ces trois gènes sont exprimés dans des régions précises correspondant aux cellules neuroépithéliales en prolifération dans la zone ventriculaire du tube. Ces cellules vont ensuite migrer de façon radiale dans différentes couches et se différencier en neurones et cellules gliales (Walther

et al., 1991 ; Goulding *et al.*, 1991 ; Jostes *et al.*, 1991). Pax-6 joue un rôle actif dans la capacité des cellules gliales à engendrer des neurones (Heins *et al.*, 2002).

Classification Carnegie	Stade 10 : 3 sem.	Stade 15 : 5 sem.	Stade 17 : 6 sem.
PAX-3	Tube neural Début de la fusion	Mésencéphale Rhombencéphale Moelle épinière	Mésencéphale Rhombencéphale Moelle épinière Somites
PAX-5		Jonction Rhombencéphale Mésencéphale	Jonction Rhombencéphale Mésencéphale
PAX-6	Tube neural +++	Partie rostrale du cerveau antérieur ++ Vésicule optique ++ Moelle épinière +	Télocéphale +++ Diencephale +++ Vésicule optique +++ Rhombencéphale caudal +++ Axe spinal +

Tableau 4 : Expression de Pax-6 au cours du développement embryonnaire chez l'homme (adapté de Walther et al, 1991).

L'identité antéro-postérieure de chacune des vésicules du cerveau chez les mammifères est spécifiée pendant la gastrulation par le mésoderme préchordal et la notochorde. Cette spécification semblent être stabilisée au stade de la plaque neurale par des interactions dans l'ectoderme. Les facteurs de transcription Pax-2/5 et Pax-6 subdivisent le tube neural précocement en trois divisions. Les territoires d'expression des gènes Pax-2/5 et Pax-6 délimitent en premier le mésencéphale et le cerveau antérieur. Chez les souris mutantes sans Pax-5 et Pax-2, le mésencéphale entier est absent, le métencéphale se reliant directement au cerveau antérieur (Schwarz *et al.*, 1999). L'expression ectopique de Pax-6 dans le mésencéphale a permis de montrer que ce gène définit les frontières entre le diencephale et le mésencéphale en réprimant En-1 et Pax-2 (Matsunaga *et al.*, 2000).

La première expression de Pax-6 dans l'œil de vertébré est détectée au niveau de l'évagination latérale du cerveau antérieur. Pax-6 est exprimé dans la couche épithéliale de la vésicule et dans l'ectoderme de surface qui va générer le cristallin. La vésicule optique après son invagination présente une structure en deux feuillets ; le feuillet interne se différenciera en neurorétine, le feuillet externe en rétine pigmentaire. Pax-6 est fortement

exprimé dans toutes ces structures, mais son expression dans la portion ventrale de la rétine va graduellement décliner. Pax-2 sera lui exprimé en portion ventrale, à la base du futur nerf optique, et il existe une régulation inhibitrice entre Pax-6 et Pax-2 (Schwarz *et al.*, 2000). Au stade vésicule optique, l'interaction inhibitrice entre Pax-6 et d'autres facteurs de transcription, tel Mitf impliqué dans le contrôle de la pigmentation, est cruciale pour la différenciation ultérieure correcte du neuroépithélium (Planque *et al.*, 2001). Les messagers de Pax-6 sont détectés dans l'ectoderme de surface qui va générer la cornée. Le cristallin et la cornée, une fois différenciée, continuent à exprimer Pax-6 dans sa partie postérieure.

4.3.2. Altérations de Pax-6 chez la souris et l'homme

Pax-6 est localisé sur le chromosome 2 de la souris au voisinage d'un locus, appelé *small eye* (Sey) et auquel correspondent plusieurs mutations alléliques, qui ont un caractère semi-dominant. A l'état homozygote, on constate l'absence totale d'œil avec une orbite diminuée et une absence de chiasma optique ainsi que de cavité nasale et ces animaux meurent à la naissance. Au stade hétérozygote, on observe une réduction de la taille de l'œil. D'autres anomalies peuvent y être associées : une orbite réduite, une absence de chiasma optique, un amincissement des membranes externes de l'œil, en particulier le cristallin et une dégénérescence cellulaire. Pax-6 est le gène muté (Hill *et al.*, 1991 ; Favor *et al.*, 2001). On peut observer dans certains cas de délétions complètes du gène Pax-6, une hypoplasie de l'iris, une opacification de la cornée une vacuolisation du cristallin et l'absence des canaux de Schlemm dans le réseau trabéculaire (Baulmann *et al.*, 2002). Chez la souris Sey, la migration des pré-neurones corticaux est retardée d'une façon dépendante à la fois du stade, de la région et du dosage de Pax-6 et il y a des anomalies dans la différenciation neuronale et la croissance des axones (Schmal *et al.*, 1993).

Le rôle tardif de Pax-6 dans le développement des yeux a été étudié à l'aide de souris où l'inactivation conditionnelle de Pax-6 a été réalisée. Ce gène est en effet sous le contrôle de 2 promoteurs, dont le promoteur le plus en amont (P0) est sous le contrôle d'une séquence de régulation intragénique (enhancer α) s'exprimant spécifiquement au moment de la différenciation neuronale (Plaza *et al.*, 1993, 1995 a et b ; Kammandel *et al.*, 1999). L'utilisation de cet enhancer pour exprimer la recombinaison Cre a permis de déléter Pax-6, dans lequel les sites pour cette recombinaison ont au préalable été insérés par recombinaison homologue, spécifiquement dans les territoires d'expression de cet enhancer, en position distale de la rétine. La rétine est un tissu pluristratifié. Chez la souris, la zone qui deviendra la CPE (lieu de rencontre des prolongement cellulaire et dépourvue

de noyaux) apparaît au milieu des cellules destinées à être des photorécepteurs, un tiers d'entre eux se trouvant du mauvais côté (dans la CNI). Ils migrent les jours suivant de la CNI vers la CNE (Forrester *et al.*, 2002). Pax-6 est exprimé dans les cellules horizontales, amacrines et ganglionnaires (Belecky-Adams *et al.*, 1997). Les conséquences de la disparition de Pax-6 des cellules de la rétine en cours de différenciation sont les suivantes : seules les cellules amacrines sont capables de se différencier (Marquardt *et al.*, 2001). Il semble que Pax-6 contrôle l'expression des gènes bHLH de spécification neuronale, mais que NeuroD échappe à cette régulation, ce qui fait que les cellules amacrines peuvent se différencier (Figure 8, Schémas A et B). La délétion spécifique de Pax-6 dans l'ectoderme de surface, conduit à une spécification abortive de la placode cristalline (Ashery-Padan *et al.*, 2000).

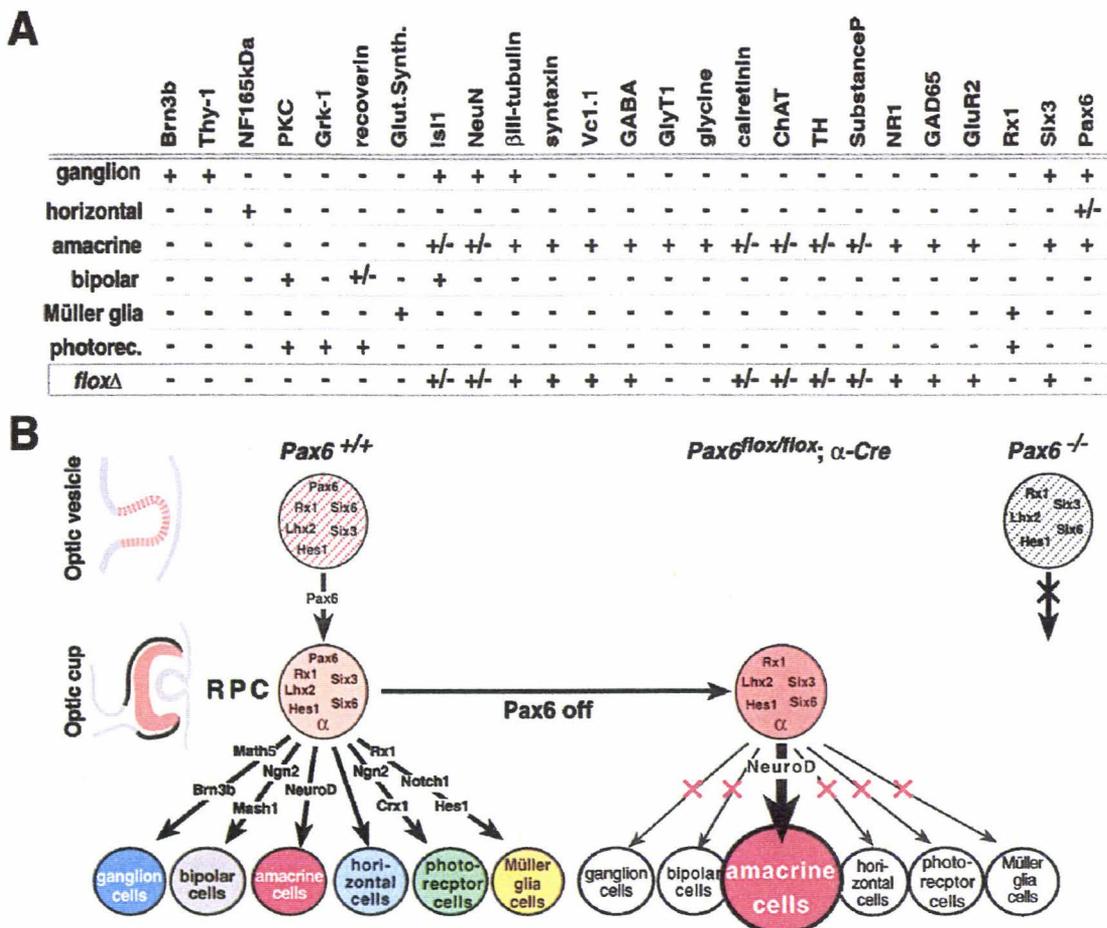


Figure 8 : Importance de Pax-6 dans la différenciation des neurones de la rétine (d'après Marquardt *et al.*, 2001). Schéma A : Les différents marqueurs des neurones de la rétine.

Schéma B : En l'absence de Pax-6, seules les cellules amacrines se différencient.

Il existe une maladie génétique humaine due à des mutations dans Pax-6, l'aniridie, une malformation des yeux qui peut aller d'une simple hypoplasie de l'iris jusqu'à une absence complète de ce dernier (Jordan *et al.*, 1992). D'autres anomalies oculaires peuvent s'y ajouter : cataracte, dislocation du cristallin, hypoplasie du nerf optique, nystagmus et glaucome. A l'état hétérozygote, Pax-6 donne plusieurs types de malformations, en fonction du site de mutation sur le gène Pax-6. Un hétérozygote composé a été décrit, il présente des anomalies cranio-faciales très sévères et, en particulier, une absence totale d'yeux et de bulbe olfactif ainsi que de nombreux défauts au niveau du développement du cerveau (Glaser *et al.*, 1994). Des mutations de Pax-6 ont été également identifiées dans des cas d'anomalie de Peters (Hanson *et al.*, 1994). C'est un défaut congénital de la chambre antérieure de l'œil, généralement une opacité du centre de la cornée générée par des adhérences entre le cristallin, la cornée et/ou l'iris. Plusieurs types de mutations ont été trouvés dans de nombreux cas d'aniridie/anomalie de Peters, incluant des délétions concernant le cadre de lecture, des insertions ou des délétions supprimant le cadre de lecture, des mutations dans les sites d'épissage, des mutations non sens et plus rarement faux sens (Martha *et al.*, 1994 a et b), ainsi que des altérations touchant des séquences de régulation situées jusqu'à 40 kb en aval de Pax-6 (Griffin *et al.*, 2002).

4.3.3. Potentiel oncogénique

Les facteurs de transcription en général sont capables de transformer les cellules quand ils sont surexprimés. Tous les phénomènes observés sur les gènes à boîte homéo suggèrent que ces derniers régulent de nombreux processus de la différenciation mais également que leur expression inappropriée peut être oncogénique. De fait, plusieurs gènes Hox sont oncogéniques quand ils sont surexprimés dans des lignées immortalisées, ces dernières pouvant ensuite engendrer des tumeurs dans les souris *nude* (Maulbecker et Gruss, 1993 a). La surexpression des gènes de la famille Pax conduit également à la transformation de cellules immortalisées et ces cellules transformées sont capables de développer des tumeurs dans des souris *nude* (Maulbecker et Gruss, 1993 b). Les gènes Pax interagissent dans le contrôle de la transcription de p53 (Stuart *et al.*, 1995) et Pax-6 forme un complexe protéique avec l'anti-oncogène Rb (Cvekl *et al.*, 1999). Le fait que les gènes Pax soient des oncogènes potentiels montre l'importance de ces gènes dans le contrôle de la prolifération cellulaire. Les souris mutantes dans Pax-6 ont un cycle cellulaire perturbé (Estivill-Torrus *et al.*, 2002), ce qui suggère une implication directe de ces protéines dans le déroulement du cycle.

4.4. Engrailed

Chez la drosophile, Engrailed (dont En-1 est un des homologues chez les vertébrés) est considéré comme l'archétype du gène sélecteur (Royet *et al.*, 1998 ; Hidalgo *et al.*, 1996). Il est exprimé dans tous les compartiments postérieurs : au niveau des segments d'abord, puis des disques imaginaux. Les cellules mutantes pour En perdent leurs caractéristiques de cellules postérieures et ne se mélangent plus avec les cellules postérieures exprimant Engrailed, ce qui provoque la formation d'une zone limite, les cellules mutantes sont alors capables de chevaucher ou de franchir la zone limite entre les deux compartiments pour gagner le compartiment antérieur.

4.4.1. Rôle au cours du développement neural

Les génomes de la souris et de l'homme contiennent chacun deux gènes, En-1 et En-2, étroitement liés au gène de segmentation de la drosophile Engrailed. Ces gènes, vraisemblablement issus par duplication, ont divergé entre eux mais également de l'En de la drosophile, tant dans leur séquence que dans leur régulation. L'homéodomaine humain contenu dans les gènes En-1 et En-2 est localisé respectivement sur les chromosomes 2 et 7. Chez l'embryon de souris, la première expression de ces gènes a été détectée à E8 dans les bandes superposées des plis neuraux antérieurs (McMahon *et al.*, 1992). A E12, les gènes sont exprimés dans les cellules à la jonction du mésencéphale/rhombencéphale dans le SNC. En-1 est également exprimé *de novo* dans deux raies transversales sur la longueur du rhombencéphale, le cordon médullaire, dans la colonne vertébrale en développement et dans les bourgeons de queue et de membre. Les gènes En-1 et En-2 jouent un rôle très tôt dans le développement en définissant des domaines spatiaux dans le SNC. Plus tard au cours du développement, les gènes En peuvent avoir une fonction supplémentaire dans la neurogenèse. Les homéogènes En-1 et 2 démarquent la frontière entre le mésencéphale et le métencéphale et sont fortement exprimés dans la partie postérieure du cerveau médian. Leur fonction est cruciale pour la morphogenèse du cervelet. Ils sont impliqués dans l'établissement précoce du domaine cérébelleux et du nombre de cellules progénitrices des feuillettes du cervelet. Leur inactivation par recombinaison homologue dans des cellules ES aboutit pratiquement à l'absence plus ou moins totale du cervelet. Un fragment minimum de 21.0 kb d'En contient les éléments de régulation multiple positif et négatif qui fonctionnent de concert pour établir l'expression précoce embryonnaire du mésencéphale. L'expression d'En-1 dans le tube péri-chordal en développement suggère qu'il peut être impliqué dans la formation des vertèbres (Joyner et Martin, 1987). En-1 est également détecté dans les cellules du dermomotome qui vont former les vertèbres et les muscles du

corps et de la tête (Davis et Joyner, 1988 ; Davis *et al.*, 1991). En-2 est exprimé dans une population de myoblastes (Logan *et al.*, 1993). La délétion ciblée d'En-1 est létale (Wurst *et al.*, 1994) alors que celle d'En-2 induit des anomalies au niveau du cervelet mais reste viable (Joyner *et al.*, 1991).

4.4.2. Engrailed, un répresseur transcriptionnel

Ces séquences de régulation du mésencéphale sont structurellement et fonctionnellement conservées chez l'homme. Les gènes de souris Pax-2, Pax-5 et Pax-8 contenant un domaine paired montrent une expression superposée avec les gènes En dans le développement cérébral. De manière significative, deux sites de liaison à l'ADN pour les protéines PAX-2, PAX-5 et PAX-8 ont été identifiés dans une séquence de régulation de 1.0 kb d'En-2, des mutations dans ces sites de liaison perturbent l'initiation et le maintien de l'expression dans les souris transgéniques. Les gènes Pax sont des régulateurs directs d'En-2 dans la cascade génique contrôlant le développement du mésencéphale. Ces études menées chez la souris ainsi que d'autres chez la drosophile et le poisson-zèbre sur le rôle des gènes Pax dans le contrôle de l'expression des membres de la famille En, indiquent qu'une voie génétique de Pax-En a été conservé au cours de l'évolution (Song, 1996).

L'optimisation d'oligonucléotide anti-sens d'engrailed-1 dans les embryons de souris a eu comme conséquence les niveaux réduits de protéine EN et a produit des anomalies du cerveau, du visage et du cœur et un raccourcissement de l'axe embryonnaire. Ainsi, en plus de participer à la voie de signalisation pour le développement du cerveau et des membres, En-1 semble jouer un rôle en modelant l'axe embryonnaire (Sadler *et al.*, 1995).

4.4.3. Localisation extra-nucléaire

De par leurs fonctions transcriptionnelles, les protéines à homéodomaine sont majoritairement localisées dans le noyau des cellules, cependant une localisation extra-nucléaire de certaines de ces protéines a été rapportée. C'est le cas pour la protéine EN retrouvée associée, *in vitro* et *in vivo*, à une fraction membranaire présentant une composition particulière en lipides et glycolipides. Dans cette fraction, EN est protégée de la dégradation par les protéases (localisation intra-cisternale). Le pourcentage d'EN intracisternal est inférieur à 5 % du pool total présent dans la cellule et on peut s'interroger sur la signification de cette localisation, inhabituelle pour un facteur de transcription. Parmi les hypothèses envisageables, celle d'une sécrétion d'EN a été vérifiée, au moins *in vitro* (et étendue à d'autres protéines à homéodomaine), elle se fait grâce à une séquence de 11 aa localisée dans l'homéodomaine (Maizel *et al.*, 1999). Cette même séquence, conservée

dans de nombreuses autres protéines à homéodomaine, est nécessaire et suffisante à la sortie de la protéine hors du noyau et se comporte donc comme une séquence d'export nucléaire. Ces données, prises dans leur ensemble, permettent d'introduire une fonction de trafic intracellulaire dans l'activité biologique des protéines à homéodomaine. On peut ainsi proposer que la protéine néo-synthétisée soit d'abord importée dans le noyau pour y jouer son rôle de régulateur transcriptionnel, puis activement transportée hors du noyau, étape nécessaire -et limitante- pour son accès à un compartiment de sécrétion. La signification physiologique de ces processus n'est pas encore connue, néanmoins une hypothèse explorée est que cette sécrétion limitée de protéines à homéodomaine correspondrait à un échange d'information positionnelle pouvant induire des modifications transcriptionnelles dans la ou les cellules réceptrices. Les situations dans lesquelles un tel mécanisme de signalisation de "noyau à noyau" pourrait intervenir sont multiples, depuis - pour ce qui est du SN- les phénomènes d'induction jusqu'à l'établissement des cartographies synaptiques.

4.4.4. Engrailed et Pax-6

Plusieurs travaux ont montré que les gènes En-1 et En-2 sont exprimés dans la zone d'exclusion de Pax-6, à peu près au même stade. Ces domaines d'expression étant limités par plusieurs rangées de cellules n'exprimant aucun de ces deux gènes (Püschel *et al.*, 1992). Les régulations croisées entre ces deux gènes sont complexes. L'expression de Pax-6 est réprimé par En-1 et En-2 (Plaza *et al.*, 1997), la répression est confirmée par l'expression ectopique d'Engrailed (Araki et Nakamura, 1999). L'expression ectopique d'Engrailed conduit à un déplacement rostral de la limite entre le diencéphale et mésencéphale. L'expression ectopique de Pax-6 dans le mésencéphale conduit à un déplacement caudal de la limite entre le diencéphale et mésencéphale, concomitant d'une répression de l'expression d'Engrailed (Matsunaga *et al.*, 2000). Ces résultats suggèrent que le résultat des interactions entre ces facteurs est très dépendant de la nature des cellules dans lesquelles elles se déroulent.

4.4.5. Engrailed et les cellules de Purkinje

Les membres de la famille des gènes En et Wnt (Wingless) semblent jouer un rôle clé dans la spécification précoce de la jonction mésencéphale/rhombencéphale, le futur cervelet. Afin d'analyser la possible continuité du rôle du patron d'expression d'En et de Wnt dans la future localisation et fonction cérébelleuse, une expérience a consisté à exprimer En-2 de façon ectopique dans les cellules de Purkinje au cours du développement cérébelleux embryonnaire et post-natal tardif. Le résultat de cette expression est une

importante réduction de la taille du cervelet et du nombre de cellules de Purkinje dans tout le cervelet, ce dernier est réduit de plus d'un tiers comparé à des animaux normaux. L'analyse détaillée du cervelet en développement et adulte révèle un patron de sélectivité par la perte des cellules de Purkinje et autres neurones cérébelleux. La surexpression d'En-2 affectant sélectivement des cellules de Purkinje dans la zone de transition entre les lobules est démontrée par l'observation directe de la perte sélective de cellules de Purkinje dans certaines fissures, et par l'observation de la croissance et du transfert de la couche germinale externe qui est sélectivement retardé dans les fissures profondes pendant le développement post-natal précoce. Ainsi, en plus de démontrer le rôle critique des cellules de Purkinje dans la génération et la migration des cellules granulaires, la distribution hétérogène des effets cellulaires induits par l'expression ectopique d'En suggère un rôle morphogénétique relativement tardif (Baader *et al.*, 1998).

Dans les mutants murins En-2, la configuration temporelle normale de l'expression est préservée, bien que la taille et l'emplacement spatial de diverses bandes diffèrent de ceux du type sauvage. A la différence des anomalies de foliation, les perturbations de configuration médio-latérale qui sont trouvées se produisent dans presque toutes les régions cérébelleuses. Les comptes de cellules indiquent que tous les types principaux de cellules des circuits olivocérébelleux sont réduits de 30-40 % (Kuemerle *et al.*, 1997).

Cette différenciation due à la régulation de l'expression des gènes au cours du développement est parfois contrôlée par des protéines particulières qui ne seront plus exprimées après la naissance ou à l'âge adulte, mais pourront s'exprimer de nouveau au cours de processus pathologique.

V. LES TUMEURS EMBRYONNAIRES DU SNC HUMAIN

Les tumeurs embryonnaires du SNC de l'enfant et de l'adulte ont des comportements biologiques variés, différents des tumeurs du SNC de l'adulte. Morphologiquement, elles ressemblent aux précurseurs embryonnaires, elles sont très invasives et métastasent rapidement, mais également sont souvent sensibles aux différentes chimiothérapies. Les tumeurs primitives du SNC représentent la deuxième cause de cancer chez l'enfant après les leucémies aiguës, et donc la première localisation de tumeurs solides malignes en pédiatrie (Doz, 1993).

5.1. Historique, histogenèse, classification historique

Rudolph Virchow est le pionnier de la classification histologique des tumeurs cérébrales. Entre 1835 et 1846, il décrit la névroglie et lui rattacha la plupart des tumeurs cérébrales : il établit une classification phénotypique. Il isola les gliomes de l'ensemble des "sarcomes cérébraux", décrit les gliomes de l'épendyme et jeta ainsi les bases d'une classification anatomopathologique des tumeurs du système nerveux qui est restée inchangée pendant plus de 50 ans (Virchow, 1863).

Tooth fut le premier, en 1912, à établir des corrélations entre les données histologiques et l'évolution clinique dans son étude des 500 tumeurs cérébrales opérées au National Hospital de Londres entre 1902 et 1911 (Tooth, 1912).

En 1926, Percival Bailey (neuropathologiste) et Harvey Cushing (neurochirurgien) publièrent un ouvrage qui marqua l'origine de la plupart des conceptions et classifications en usage actuellement. Dans ce livre intitulé "Une classification des tumeurs du groupe des gliomes sur une base histogénétique avec une étude corrélée du pronostic", ils élaborèrent un schéma de l'histogenèse des gliomes. La classification de Bailey et Cushing repose sur le principe que le développement des tumeurs se fait à partir de cellules embryonnaires arrêtées à différents stades de leur développement, ce qui conduit à superposer aux différentes étapes de l'arbre généalogique des cellules cérébrales une classification histogénétique des tumeurs du SNC (Bailey et Cushing, 1926).

Une voie différente fut ouverte par Kernohan en 1949. Le principe de base de sa classification est celui de la théorie de l'anaplasie : les cellules tumorales ne naîtraient pas à partir de restes embryonnaires mais par différenciation des cellules normales. Il établit ainsi des grades de malignité croissante : 1 pour la tumeur la mieux différenciée à 4 pour la tumeur la moins différenciée (Kernohan *et al.*, 1949).

5.2. Classification mondiale

En 1979, la classification de l'organisation mondiale de la santé (OMS) voyait le jour. L'objectif de cette entreprise était la création d'une "classification internationale des tumeurs également satisfaisante pour les omnipraticiens, les chirurgiens, les radiologues, les anatomopathologistes et les statisticiens" (Zulch, 1979). Ceci dans le but de permettre aux médecins du monde entier de comparer leurs observations et donc de faciliter leur travail en collaboration. Cette classification amalgama les trois principales classifications précédentes (phénotypique, histogénétique et pronostique).

D'un point de vue histologique, les signes de croissance rapide sont la forte densité cellulaire, le degré d'anomalies nucléaires et cytoplasmiques, l'anaplasie (moindre différenciation cellulaire), l'index mitotique élevé et la prolifération vasculaire.

5.3. Epidémiologie

Les tumeurs du SNC représentent 20 % de toutes les tumeurs de l'enfant et 15 à 20 % de toutes les tumeurs intra-cérébrales survenant chez l'enfant (Russel et Rubinstein, 1989). Le médulloblastome est la tumeur intracrânienne la plus fréquente de l'enfant, représentant 20 à 25 % des tumeurs cérébrales pédiatriques et 30 % des tumeurs crâniennes de la fosse postérieure (Rutka, 1997). Chez l'adulte, la fréquence de cette tumeur est inférieure à 1 % de l'ensemble des tumeurs intracrâniennes et 6 % des tumeurs crâniennes de la fosse postérieure (Giordana *et al.*, 1999 ; Russel et Rubinstein, 1989).

Comme les lymphomes, les tumeurs du SNC montrent de grandes variantes, par exemple selon la situation géographique avec une incidence élevée au Japon, faible en Colombie et à Cuba (De La Torre Mondragon *et al.*, 1993). La répartition selon le sexe montre une légère prédominance masculine avec un sex-ratio M/F allant de 1.2/1 (De La Torre Mondragon *et al.*, 1993) à 1.3/1 (Stevens *et al.*, 1991).

La survenue de tumeurs cérébrales chez plusieurs membres d'une même famille est connue. Une détermination génétique est établie pour les tumeurs survenant au cours de phacomatoses qui associent des anomalies complexes congénitales du développement d'un ou de plusieurs feuillet embryonnaires et une prédisposition à certaines tumeurs : Neurofibromatose de Von Recklinghausen, Sclérose Tubéreuse de Bourneville, maladie de Von Hippel-Lindau. Certains cas de médulloblastomes sont associés à des maladies familiales ou héréditaires : syndrome de Gorlin, syndrome de Turcot (affection héréditaire autosomale dominante caractérisée par l'association de tumeurs colo-rectales et d'un glioblastome ou d'un médulloblastome).

5.4. Les tumeurs embryonnaires

Ce groupe de tumeur est à l'origine de nombreuses controverses en ce qui concerne leur nomenclature et leur histogénèse.

5.4.1. Historique

En 1925, Bailey et Cushing ont décrit un groupe de tumeurs cérébelleuses constituées de cellules d'apparence primitive et lui donnèrent le nom de "médulloblastome cérébelleux"; ils émirent l'hypothèse que cette tumeur se développait à partir d'une cellule

multipotente du cervelet, le médulloblaste. Ce médulloblaste serait à l'origine des 5 types différents de cellules, à savoir : la cellule épendymaire, choroïdienne, l'oligodendrocyte, l'astrocyte et le neurone qui vont constituer le parenchyme cérébral (Bailey et Cushing, 1926). Cependant, dans les années qui suivirent, Bailey et Cushing notèrent que le médulloblastome était plus fréquent dans le cervelet et que des tumeurs identiques histologiquement survenaient également dans le cerveau, la moelle et la rétine.

En 1973, Hart et Earle ont décrit un groupe de 23 tumeurs cérébrales composées de cellules neuro-épithéliales peu différenciées, survenant chez l'enfant et l'adulte jeune, qu'ils désignèrent "Tumeurs Primitives Neuro-Ectodermiques" (PNETs). Ils définirent ces tumeurs comme des tumeurs formées à plus de 90 % par des cellules indifférenciées, ce qui les distingue des médulloépithéliomes, des neuroblastomes et des épendymoblastomes. Le nom de tumeur neuroectodermique fut choisi car il implique une capacité des cellules primitives à se différencier dans le sens glial ou neuronal (Hart et Earle, 1973).

En 1983, Rorke étendit le concept de PNETs à toutes les tumeurs embryonnaires et proposa 5 sous-types : 1) PNET totalement indifférenciée, 2) PNET avec différenciation gliale, 3) PNET avec différenciation épendymaire, 4) PNET avec différenciation neuronale, 5) PNET avec au moins 2 types de différenciation. Elle regroupa ainsi toutes les entités distinctes -médulloépithéliome, neuroblastome, épendymoblastome- sous le même terme de PNETs. Cet auteur formula également le concept que le médulloblastome est une PNET survenant dans le cervelet. Cette nomenclature est basée sur l'hypothèse que les PNETs avaient une population de cellules souches communes (la souche sous-épendymaire) et que leur transformation maligne à différents niveaux du SNC engendrait des tumeurs avec une biologie et une morphologie similaires (Rorke, 1983).

Cette classification a été reprise par l'OMS en incluant les formes à différenciation oligodendrogliale, mélanique, musculaire (médullomyoblastome) et mésenchymateuses (formes tératoïdes) (Becker, 1985 ; Rorke *et al.*, 1985)

La dernière classification de l'OMS (Tableau 5) se rapproche des idées de Hart et Earle puisqu'elle reconnaît quatre entités bien définies, à savoir le médulloépithéliome, le neuroblastome et l'épendymoblastome ainsi que le groupe des PNETs. Ce groupe comprend le médulloblastome cérébelleux et les tumeurs histologiquement identiques mais localisées en dehors du cervelet. Cependant, dans la plupart des articles récents, le terme de PNET est équivalent à celui de tumeur embryonnaire du SNC.

Le rétinoblastome reste classé dans les PNETs puisque c'est une tumeur primitive neuroectodermique. Par contre, le rétinoblastome n'apparaît plus dans le livre de l'OMS

2000 consacré aux tumeurs cérébrales pour être classé dans les tumeurs de l'œil en tant que PNET.

Médulloépithéliome
 Ependymoblastome
 Médulloblastome
 Variantes :
 Médulloblastome desmoplasique
 Médulloblastome à larges cellules
 Médullomyoblastome
 Médulloblastome Mélanotique
 Supratentorial primitive neuroectodermal tumor (PNET)
 Variantes :
 Neuroblastome
 Ganglioneuroblastome
 Tumeur Atypique térétoïde / rhabdoïde

Tableau 5 : Classification de l'OMS des tumeurs embryonnaires du SNC (Kleihues et Cavenee, 2000).

Les cellules tumorales expriment le plus souvent des caractères phénotypiques rappelant des cellules normales du tissu dont elles sont issues. Ces caractères phénotypiques peuvent être morphologiques, immunohistochimiques ou enzymatiques.

5.4.2. Les marqueurs des tumeurs

Les filaments intermédiaires et les filaments contractiles sont des constituants du cytosquelette que l'on peut utiliser comme marqueur de certains types tumoraux. Ils regroupent 5 classes de protéines : la vimentine (Vim) est exprimée par les cellules mésenchymateuses et sanguines ainsi que certaines cellules gliales et les cellules immatures avant leur différenciation gliale ou neuronale ; l'alpha-actine marque des cellules musculaires lisses, la desmine caractérise les cellules musculaires striées ; les kératines (CytoK) caractérisent les cellules épithéliales ; les neurofilaments (NF) caractérisent les cellules neuronales comme la neurone éolase spécifique (NSE) ; les gliofilaments (GFAP) caractérisent les cellules gliales et certaines cellules épendymaires. Les cellules mélanocytaires sont caractérisées par l'anticorps HMB45, les cellules neuroendocrines par la chromogranine (Chromo). Les cellules photoréceptrices sont mises en évidence par l'antigène S (Ag S). L'utilisation d'un anticorps reconnaissant une protéine du cycle cellulaire (Ki-67, MIB-1, PCNA) permet de préciser la proportion de cellules tumorales sortie de la phase quiescente du cycle cellulaire et ainsi de mieux quantifier la prolifération cellulaire.

Toutefois, plus qu'une seule molécule, c'est plutôt l'ensemble des molécules exprimées qui permet l'identification du type cellulaire tumoral.

5.4.3. Immunohistochimie et Histogenèse

Dans l'étude de Molenaar en 1989, 1/3 des tumeurs présentait une différenciation neuronale et gliale, 1/3 des tumeurs ne présentait aucun marquage, les autres présentant des différenciations neuronales ou astrocytaires (Molenaar *et al.*, 1989).

L'équipe de Gould en 1990 a noté des similarités importantes entre les caractères immunohistochimiques des PNETs et des tumeurs neuro-endocrines tels que : l'expression fréquente de la synaptophysine, l'expression dans la moitié des cas de neuropeptides comme la somatostatine, la substance P et la vasoactive intestinal peptide (VIP). Les autres anticorps les plus souvent exprimés étaient la vimentine, la GFAP (Glial Filament Antigen protein), le neurofilament (NF) (Gould *et al.*, 1990).

L'étude de Zelter en 1990 a montré que les médulloblastomes et les tumeurs embryonnaires supra-tentorielles avaient des profils immunohistochimiques similaires (NF+, GFAP+) mais étaient très hétérogènes vis-à-vis de 16 anticorps différents. Ils proposèrent de qualifier les tumeurs embryonnaires selon les résultats immunohistochimiques (comme les lymphomes) et d'étudier l'évolution dans les différents groupes (Zelter *et al.*, 1990).

Dans l'étude de Harris, toujours en 1990, plus de 50 % des tumeurs embryonnaires exprimaient la NSE (Neuronal Specific Enolase), la protéine S 100 et la synaptophysine. 25 à 50 % exprimaient la vimentine et la GFAP (Harris *et al.*, 1990).

Trojanowski, en 1992, a mis en évidence que les cellules tumorales des PNETs récapitulaient partiellement les stades de maturation des neurones (Trojanowski *et al.*, 1992).

5.5. Médulloblastome

5.5.1. Histogenèse

Katsetos et Burger en 1994 ont réalisé une approche de l'histogenèse du médulloblastome, en utilisant deux marqueurs immunohistochimiques dont l'un est exprimé par les cellules de la zone ventriculaire et l'autre par la couche granulaire externe. Les résultats observés aboutissent à l'hypothèse selon laquelle le médulloblastome desmoplasique (hémisphères cérébelleux, adulte) proviendrait d'une transformation néoplasique des neuroblastes de la couche granulaire externe donc à un stade de différenciation ultérieur tandis que le médulloblastome classique se développerait à partir

de cellules de la zone germinative ventriculaire, à un stade plus précoce de l'organisation cérébelleuse (Katsetos et Burger, 1994).

Compte tenu du plus grand nombre de médulloblastomes que de tumeurs embryonnaires supra-tentorielles, de l'expérience à présent importante en ce qui concerne son traitement, et de sa probable origine à partir de populations cellulaires locales, le médulloblastome constitue une entité anato-mo-clinique particulière.

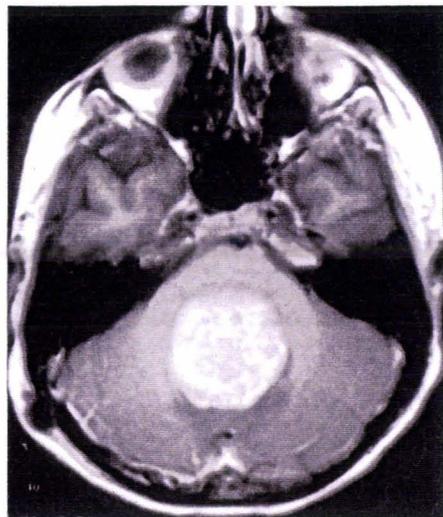
5.5.2. Clinique

Le médulloblastome se développe le plus souvent en position médiane et aux dépens du vermis, parfois des hémisphères cérébelleux.

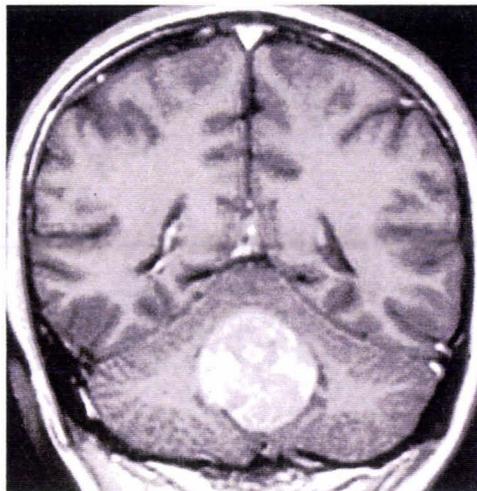
L'âge moyen au moment du diagnostic est de 6 ans. Cette tumeur a un fort potentiel métastatique dans le SNC (dans le liquide céphalorachidien : LCR et le tissu cérébral) et parfois en dehors du SNC. Cette tumeur croît rapidement et la symptomatologie est dominée par l'hypertension intra-crânienne (HITC) et le syndrome cérébelleux (Farwell *et al.*, 1984). Les signes d'hypertension intra-cranienne c'est-à-dire des céphalées (60 % des cas), des vomissements dits "en jet", des troubles visuels peuvent être isolés ou associés et leur installation peut être insidieuse sur une longue période. Les signes déficitaires focaux sont les troubles de l'équilibre et/ou de la marche, la maladresse gestuelle, la surdité et la paralysie.

Radiologiquement, il s'agit d'une masse prenant le contraste, localisée le plus souvent au vermis chez l'enfant avec extension fréquente dans la lumière du IV^e ventricule. Une extension sous-arachnoïdienne est possible sous forme d'une prise de contraste dans l'espace sous-arachnoïdien (Burger et Scheithauer, 1994) (Figure 9). Le bilan préopératoire comprend un fond d'œil et une IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) cérébrale sans, puis avec injection de gadolinium. La réalisation de l'IRM de l'axe spinal en préopératoire est recommandée. Dans ce cas, elle peut être effectuée directement avec injection de gadolinium. Après traitement de l'HITC, l'exérèse chirurgicale (à visée thérapeutique, diagnostique et décompressive) doit obtenir des prélèvements tumoraux en quantité suffisante pour le diagnostic et tendre à enlever la tumeur dans sa totalité en étant la moins traumatisante possible. Une éventuelle infiltration du plancher du IV^e ventricule doit être décrite. Le bilan post-opératoire sous forme d'une IRM cranio-spinale doit être réalisé immédiatement en période post-opératoire, au mieux dans les 24 heures et au plus tard dans les 48 heures suivant l'intervention chirurgicale. Une ponction lombaire doit être réalisée entre le 7^e et le 15^e jour après l'intervention chirurgicale car une dissémination

dans le LCR est parfois observée (méningite carcinomateuse). La figure 10 récapitule les différentes étapes de la prise en charge du patient.



A : Coupe Horizontale.



B : Coupe Coronale.



C : Coupe Sagittale.

Figure 9 : IRM d'un médulloblastome. Images prises dans les trois plans, horizontale, coronale et sagittale (T1 avec injection de produit de contraste, le gadolinium) fournies par le Dr G. Soto-Ares.

5.5.3. Histologie

Au niveau histologique, c'est une tumeur à forte cellularité constituée d'une purée de petites cellules. Ces petites cellules ont un noyau dense, des cytoplasmes pauvres dont les prolongements s'enchevêtrent par endroits pour former de petites rosettes. Ils peuvent être dépourvus de stroma apparent, nodulaire ou desmoplasique. Il existe une grande hétérogénéité entre des tumeurs différentes et au sein d'une même tumeur, quant à l'abondance du stroma, les caractères cytologiques, l'activité mitotique. La nécrose est d'abondance variable, l'apoptose est fréquente. Des pseudo-palissades péri-nécrotiques peuvent être observées. Une différenciation neuronale peut être observée sous forme de

rosettes de Homer Wright, de cellules ganglionnaires. Une composante gliale est présente dans certains médulloblastomes, bien mise en évidence par l'immunomarquage anti-GFAP. Néanmoins son interprétation est délicate car il est difficile de dire si les éléments marqués sont tumoraux ou représentent des astrocytes réactionnels. Cette différence d'interprétation explique que certains auteurs décrivent une différenciation gliale dans la plupart des médulloblastomes, alors que d'autres l'observent rarement. Une prolifération vasculaire, des calcifications et des remaniements sont observés dans une minorité de cas.

Le médulloblastome desmoplasique est une variante histologique caractérisée par la présence d'un réseau abondant de réticuline qui isole des îlots plus clairs dépourvus de réticuline et de collagène. Les plages foncées sont riches en fibres collagènes et en petites cellules tumorales. La production de collagène est généralement considérée comme étant réactionnelle à partir de la leptoméninge fréquemment envahie par le médulloblastome. Cependant, cette entité fut longtemps considérée comme un "sarcome circonscrit de l'arachnoïde du cervelet". Des caractères de différenciation neuronale ou gliale peuvent être observés dans ces îlots clairs.

Une variante rare du médulloblastome appelée médulloblastome à larges cellules (ou à différenciation neuronale) est composée entièrement ou partiellement de cellules avec un noyau large et rond, et un nucléole proéminent. De larges plages de nécrose sont observées.

Cette variante ressemble aux tumeurs tératoïdes/rhabdoïdes atypiques des régions cérébelleuses mais leurs cytoplasmes ne présentent pas d'inclusions globulaires hyalines, ils présentent une réactivité diffuse avec la synaptophysine, la protéine neurofilamentaire et la vimentine, et une négativité vis-à-vis de l'antigène épithélial membranaire (EMA), la cytokératine et l'actine. Habituellement, ce sont les enfants en dessous de 2 ans qui sont affectés par des médulloblastomes de type tératoïdes/rhabdoïdes (Bhattacharjee *et al.*, 1997 ; Hauser *et al.*, 2000).

Le médulloblastome neuroblastique ou neuroblastome cérébelleux se compose d'îlots de cellules tumorales formant non seulement des rosettes typiques, mais aussi de longs faisceaux fibrillaires, qui traduisent la différenciation neuroblastique.

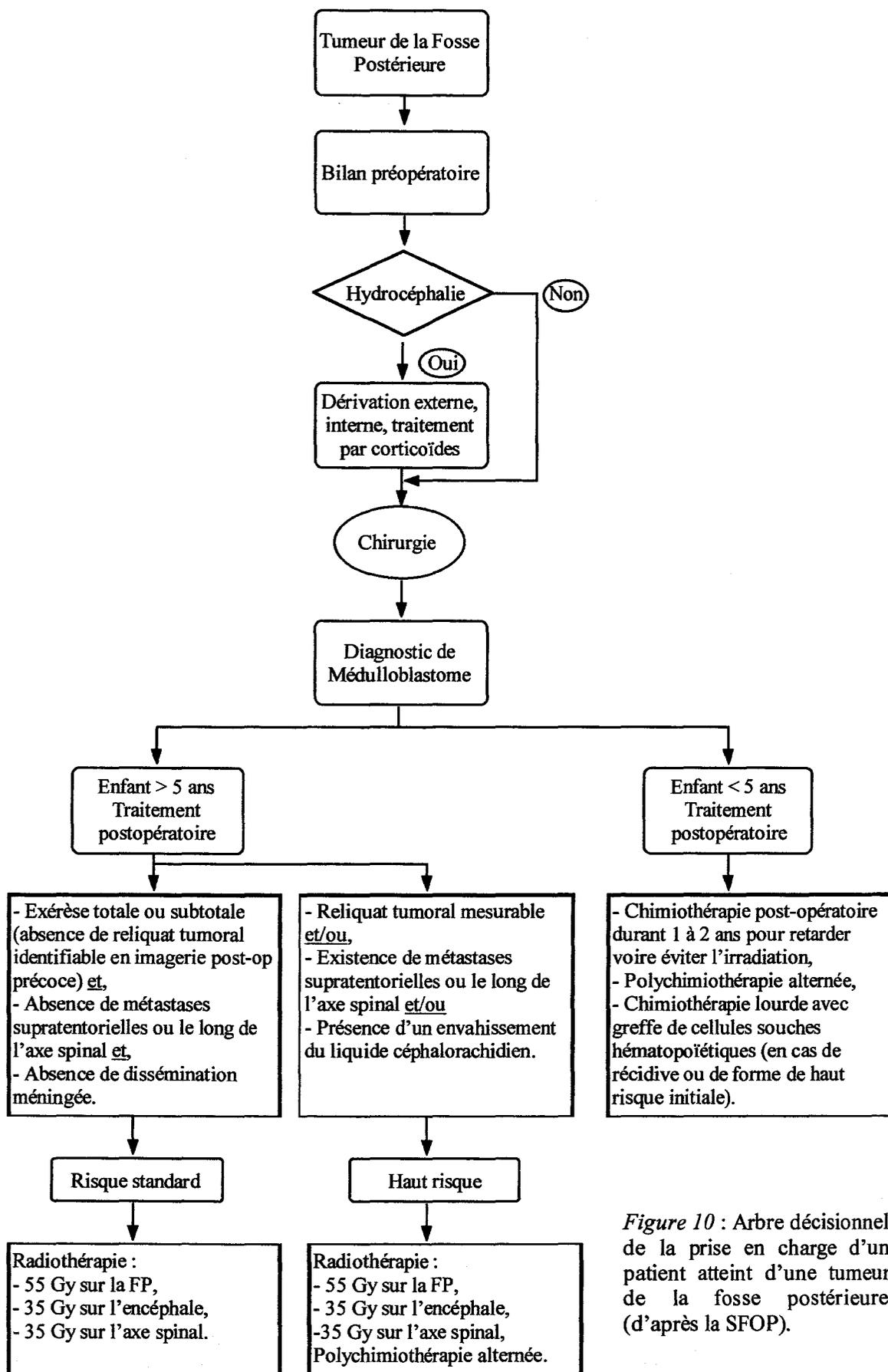


Figure 10 : Arbre décisionnel de la prise en charge d'un patient atteint d'une tumeur de la fosse postérieure (d'après la SFOP).

5.5.4. Critères de pronostic

De nombreuses études ont tenté de mettre en évidence des critères pronostiques, afin d'adapter le traitement vis-à-vis de l'agressivité de la tumeur. Ainsi différents facteurs ont été étudiés et proposés comme étant de meilleur pronostic :

- le sexe féminin (Farwell *et al.*, 1984),
- la localisation hémisphérique (Farwell *et al.*, 1984),
- l'âge inférieur à 36 mois (Maire *et al.*, 1992),
- le caractère complet de la résection chirurgicale (Schofield *et al.*, 1992),
- le bon état clinique post-opératoire (Maire *et al.*, 1992),
- l'absence de dissémination tumorale (Schofield *et al.*, 1992),
- le type desmoplasique (Farwell *et al.*, 1984),
- la présence d'une différenciation (Caputy *et al.*, 1987), comme la positivité par la GFAP des cellules tumorales (Goldberg-Stern *et al.*, 1991),
- l'absence de nécrose (Caputy *et al.*, 1987 ; Maire *et al.*, 1992),
- un index mitotique bas (Gilbertson *et al.*, 1992 ; Maire *et al.*, 1992 ; Schofield *et al.*, 1992),
- l'absence d'hyperplasie endothéliale (Maire *et al.*, 1992),
- l'aneuploïdie (Schofield *et al.*, 1992).

5.5.5. Evolution

Le traitement comprend une exérèse chirurgicale aussi complète que possible. Différents protocoles thérapeutiques sont mis en place en fonction de l'âge du patient mais également de son histoire clinique. Il est recommandé de ne pas débiter l'irradiation au-delà de 3 mois après l'opération. La chimiothérapie peut être administrée avant, pendant et/ou après l'irradiation. Le protocole de la SFOP (Société Française d'Oncologie Pédiatrique) comporte dans un premier temps une chimiothérapie suivie d'une irradiation de l'axe cérébro-spinal (35 Gray (Gy) sur l'encéphale et sur l'axe spinal, 55 Gy sur la fosse postérieure), la première cure de chimiothérapie associe 8 drogues en 1 jour ("8 en 1") avec l'oncovin, le bicnu, le solumedrol, le natulan, l'hydrea, le cisplatine, l'aracytine et l'endoxan. Pour les enfants de moins de 3 ans, le protocole BBSFOP privilégie la part de la chimiothérapie durant 1 à 2 ans afin de retarder ou d'éviter l'irradiation du SNC et ne réserve une place à l'irradiation qu'en cas de récurrence sous chimiothérapie. Pour les adultes, le traitement comprend une chimiothérapie et/ou une radiothérapie, différents protocoles sont réalisés. Une radiothérapie à la fois locale et sur l'ensemble du névraxe

induit des séquelles à long terme, surtout endocriniennes et cognitives, en particulier pour les enfants traités à un jeune âge.

Après le traitement, une surveillance multidisciplinaire concernant le développement intellectuel, la croissance rachidienne, le fonctionnement hypothalamo-hypophysaire ainsi que les fonctions auditives et rénales est indispensable afin de permettre une prise en charge précoce des séquelles de la maladie. Les bilans neuropsychologiques permettent d'évaluer les séquelles et de définir les orientations scolaires, la rééducation et les mesures nécessaires pour une réinsertion.

Avec les protocoles actuels, la survie du patient est à présent d'environ 60 % à 5 ans (Caputy *et al.*, 1987 ; Kadota *et al.*, 1989 ; Stevens *et al.*, 1991). La fréquence des séquelles (liées à la tumeur et/ou au traitement) est importante, notamment chez l'enfant jeune (stratégies thérapeutiques adaptées limitant et/ou différant l'irradiation). De ce fait, on distingue le médulloblastome à "risque standard" (exérèse complète, absence de métastases, LCR négatif) et les médulloblastomes à "haut risque" (résidu tumoral et/ou existence de métastases dans le SNC, et/ou LCR positif). Des récives locales peuvent survenir, souvent dans les deux premières années. L'évolution terminale se fait vers des métastases cérébrales, une dissémination au névraxe. Dans quelques cas, sont observées des métastases osseuses, ganglionnaires, pulmonaires (Burger et Scheithauer, 1994).

5.5.6. Génétique

5.5.6.1. L'isochromosome 17q

L'analyse cytogénétique des tumeurs primitives neuroectodermes du système nerveux central (PNETs et médulloblastomes), révèle des altérations du chromosome 17, en particulier l'isochromosome 17q [iso(17q)]. Cette altération chromosomique représente l'anomalie la plus fréquente impliquant la présence probable d'un gène suppresseur de tumeur, elle est retrouvée dans approximativement 50 % des cas (Bigner *et al.*, 1988 ; Griffin *et al.*, 1988) et dans 35 à 45 % dans les médulloblastomes (Kleihues et Cavenee, 2000). Cette anomalie entraînerait une inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs localisés à cet endroit (Biegel *et al.*, 1997 ; Cogen et McDonald, 1996) et serait corrélée à une évolution défavorable par croissance rapide de la tumeur, un pouvoir métastatique accru et une réponse faible aux traitements, y compris dans les médulloblastomes de bas risque (Cogen et McDonald, 1996). Dans la majorité des cas, le point de cassure est dans la portion proximale du bras p, ainsi la structure résultante est dicentrique. L'isochromosome 17q a été démontré dans des noyaux en interphase en utilisant la fluorescence en hybridation *in situ* (FISH) (Biegel *et al.*, 1995 ; Vagner-Capodano *et al.*, 1994). Quoique

l'i(17q) est le mécanisme le plus commun par la perte de 17p dans les médulloblastomes, dans un petit nombre de cas, la perte de 17p partielle ou complète arrive par délétion interstitielle, non équilibrée par une translocation ou une monosomie 17 (Biegel *et al.*, 1992). Le fait qu'on ne le retrouve pas n'implique pas que la tumeur ne soit pas un médulloblastome.

5.5.6.2. Chromosome 1

Ce chromosome est aussi impliqué dans les médulloblastomes, mais les types d'anomalies sont variables, incluant des translocations non équilibrées, des délétions et des duplications (Bigner *et al.*, 1988 ; Griffin *et al.*, 1988). En contraste avec la déficience du chromosome 17, les réarrangements du chromosome 1 résultent souvent d'une trisomie 1q sans perte du bras p.

5.5.6.3. Les autres chromosomes

Les changements chromosomiques les moins communs regroupent les délétions 6q, 9q, 10q, 11q, 16q et la monosomie 22 (Bigner *et al.*, 1997). L'étude de 18 médulloblastomes, utilisant l'hybridation génomique comparative (CGH) confirme la perte de 17p avec un gain de 17q comme la plus fréquemment retrouvée (Schutz *et al.*, 1996). Quoique des exemples isolés de 6q, 9q, 11q et 16q délétions sont observées, les gains de régions chromosomiques sont, surtout, plus prévalents que ne le sont les pertes (Michiels *et al.*, 2002). Approximativement, 2/3 des médulloblastomes de lignées cellulaires et de xéno greffes contiennent des doubles minutes. En comparaison, ces structures sont vues seulement occasionnellement dans du matériel biopsique (inférieure à 5 % des échantillons) (Bigner *et al.*, 1988 et 1990).

Le chromosome 22 est plus particulièrement retrouvé dans les médulloblastomes de type térétoïde/rhabdoïde. La plupart d'entre eux ont une monosomie 22, des délétions ou des mutations en 22q11.23 avec des altérations du gène suppresseur de tumeur hSNF5/INI1 (Biegel *et al.*, 2002 ; Packer *et al.*, 2002). Des réarrangements affectant les chromosomes 6 et 11 ont également été trouvés (Lopez-Gines *et al.*, 2000).

5.5.7. Divers mécanismes d'oncogenèse proposés

Les progrès récents de la biologie tumorale moléculaire et cellulaire ont permis d'éclairer un peu les mécanismes de l'oncogenèse du médulloblastome (Provias et Becker, 1996 ; Reddy et Packer, 1999) :

- le degré d'apoptose des cellules au moment du diagnostic : un index élevé d'apoptose a été corrélé avec un pronostic favorable (Haslam *et al.*, 1998),

- l'expression par la tumeur des récepteurs à la neurotrophine 3 (Trk C) : l'expression des Trk C dans le médulloblastome, qui entraînerait une apoptose spontanée et empêcherait la prolifération des cellules tumorales, a été corrélée avec un pronostic favorable (Goumnerova, 1996 ; Reddy et Packer, 1999 ; Grotzer *et al.*, 2000),
- l'expression des récepteurs à la tyrosine kinase (RTK) régulerait l'embryogenèse des tissus neuronal et épithélial (Reddy et Packer, 1999),
- l'expression des neuropeptides : l'expression de la somatostatine et de ses récepteurs a été impliquée dans la prolifération et la différenciation des médulloblastomes, tandis que la VIP inhiberait la prolifération tumorale (Reddy et Packer, 1999),
- l'expression de certaines molécules sont associées à l'agressivité de la tumeur telles que l'immunoréactivité de ErbB2/HER 2 avec un taux inférieur à 30 % (Gilbertson *et al.*, 2001) ; la surexpression (inférieure à 50 %) de MYC (Herms *et al.*, 2000),
- la mutation de PTCH dans moins de 20 % des médulloblastomes est associée à la variante desmoplastique (Pietsch *et al.*, 1997 ; Raffel *et al.*, 1997),
- la dérégulation de l'expression de Pax-5 (70 %) dans les médulloblastomes est associée à la prolifération et au manque de différenciation neuronale (Kozmik *et al.*, 1995).

5.6. Le rétinoblastome

Le rétinoblastome est une tumeur neuroectodermique décrite autrefois sous le nom de gliome de la rétine (Virchow, 1864). Le rétinoblastome est la tumeur maligne la plus fréquente chez l'enfant et est responsable d'approximativement 1 % des décès par cancer dans la tranche d'âge de 0 à 15 ans. Sa fréquence est d'environ 1 pour 17 000 naissances sans prédominance raciale. C'est une tumeur de la petite enfance (pouvant débuter *in utero*) et de l'enfance, en général avant l'âge de 5 ans (et fréquemment avant 2 ans), les cas congénitaux ne sont pas exceptionnels. L'âge moyen au moment du diagnostic est de 5 mois. Le risque de rétinoblastome diminue avec l'âge, 90 % des cas sont diagnostiqués chez les enfants de moins 7 ans. Il se rencontre dans les deux sexes avec la même fréquence (Kivela *et al.*, 1999).

5.6.1. Clinique

La tumeur peut affecter seulement un œil ou les deux. En l'absence de traitement, la tumeur provoque un décollement de la rétine et détruit progressivement la vision. Elle est bilatérale dans 25 % des cas, et elle revêt un caractère familial. On relève en effet dans 4 % des cas, l'existence d'un ou plusieurs rétinoblastomes dans la famille (Connolly *et al.*, 1983). Les études génétiques ont montré qu'il s'agit d'une affection à transmission

autosomique dominante avec une pénétrance de 80 %. On note que 20 % des porteurs hétérozygotes ne manifestent pas l'affection pour une raison inconnue. Une partie des cas sporadiques et la quasi-totalité des cas bilatéraux sont dus à une mutation nouvelle héréditaire. Des cas de régression spontanée ont pu être observés (Gallie *et al.*, 1982). Diverses caractéristiques faciales ont été notées telles que des sourcils proéminents, une extrémité nasale volumineuse, une grande bouche avec une mince lèvre supérieure (Motegi *et al.*, 1983 ; Fukushima *et al.*, 1987 ; Laquis *et al.*, 2002).

5.6.2. Histologie

Le rétinoblastome répond aux critères d'une tumeur de blastème par sa morphologie et ses zones de différenciation. On pense que le rétinoblastome dérive d'une cellule d'origine neuroépithéliale rétinienne. La tumeur forme une masse nodulaire souvent avec des nodules satellites. En microscopie optique, les zones indifférenciées de la tumeur sont constituées de petites cellules rondes à noyaux hyperchromatiques et à cytoplasme peu abondant. Dans de nombreux foyers, on peut trouver des structures différenciées, les plus caractéristiques sont les rosettes décrites par Flexner et Wintergreen. Ces structures correspondent à des amas de cellules cuboïdes ou cylindriques disposées autour d'une lumière centrale. Les noyaux sont situés loin de la lumière. La lumière, en microscopie optique, semble être bordée par une membrane. Des éléments ressemblant aux photorécepteurs traversent la membrane, certains ressemblent à de fins filaments. Plus rarement, on retrouve des rosettes décrites par Wright, elles sont caractérisées par un arrangement radiaire des cellules autour d'un enchevêtrement de fibrilles (rosettes d'Homer Wright). D'autres structures sont plus différenciées : les fleurettes sont présentes dans quelques cas. Elles représentent une tentative de différenciation photoréceptrice par les cellules tumorales. Selon des critères morphologiques, Bogenmann *et al.* (1988) considèrent également le rétinoblastome comme une tumeur provenant de la lignée des cellules photoréceptrices. En effet, les cellules du rétinoblastome ressemblant aux cellules photoréceptrices primitives expriment parfois les protéines qui leur sont associées telles que la rhodopsine et l'antigène S (Zucker *et al.*, 1998).

5.6.3. Génétique moléculaire

Etiologiquement, le rétinoblastome est particulier car il semble être la conséquence d'un seul gène défectueux, le gène du rétinoblastome, situé sur le chromosome 13 (Gey, 1970 ; Taylor, 1970 ; Lemieux *et al.*, 1989). Si un allèle mutant apparaît dans une lignée, il peut se transmettre selon le mode dominant et les porteurs ont un risque élevé (supérieur à 90% de risque pour de nombreuses mutations) de développer un rétinoblastome dans

l'enfance et d'autres cancers (par exemple un ostéosarcome) plus tardivement. La plupart de ces cas de rétinoblastome héréditaire affectent les deux yeux (rétinoblastome bilatéral). Dans les rétinoblastomes sporadiques ou non héréditaires (environ 60 à 70 % des patients) la mutation initiale affectant une copie du gène Rb, concerne une cellule rétinienne différenciée ou une cellule souche de la rétine. Presque tous les patients ayant un rétinoblastome sporadique ont une tumeur unilatérale et n'ont pas d'augmentation du risque de développer un autre cancer. L'expression du gène dépend de l'état des allèles hérités de chacun des parents.

Dans les deux types de rétinoblastomes, héréditaire et sporadique, il s'agit de la prolifération clonale de cellules sensorielles de la rétine qui, sur un allèle Rb, ont la mutation germinale ou somatique et qui, sur l'allèle Rb restant, ont aussi perdu la fonction de type sauvage. La perte du deuxième allèle Rb peut correspondre à la survenue d'une mutation somatique indépendante (Sakai *et al.*, 1991 ; Otterson *et al.*, 1997) soit en raison d'une non-disjonction ou d'une recombinaison chromosomique durant la mitose (Dryja *et al.*, 1984), soit en raison d'une modification épi-génétique (comme une méthylation dans la région du promoteur).

Le gène Rb est un prototype de gène suppresseur de tumeur. La perte de deux copies sauvages alléliques du gène suppresseur de tumeur apparaît être la clé de la transformation maligne (Murphree et Benedict, 1984).

5.6.4. Evolution

Les cellules tumorales peuvent se disséminer par les vaisseaux choroïdiens ou peuvent se propager au-delà de l'œil par le nerf optique ou l'espace sous-arachnoïdien. Le myélogramme (étude cytologique d'un frottis sanguin) et l'examen du LCR permettent l'évaluation de la propagation tumorale lors de rétinoblastome métastatique. Dans les cas très évolués, la tumeur peut perforer la sclère et envahir l'orbite. Les métastases dans les ganglions lymphatiques pré-auriculaires et cervicaux sont habituelles après extension extra-oculaire. Les plus fréquentes métastases à distance sont le système nerveux central, l'os, notamment du crâne, les viscères et les ganglions lymphatiques, ce qui en font des tumeurs hautement malignes.

Les méthodes thérapeutiques varient selon le nombre, la taille et l'emplacement des tumeurs (radiothérapie, chimiothérapie, chirurgie). Dans les pays développés, la majorité des cas est diagnostiquée avant l'extension extra-oculaire. S'il persiste une acuité visuelle, le rétinoblastome peut être traité par radiothérapie, photocoagulation au laser et cryothérapie, si la tumeur est volumineuse l'énucléation reste le traitement de choix.

Lorsque la tumeur est bilatérale, ils associent l'énucléation d'un côté et la radiothérapie de l'autre, associée à des injections intra-artérielles. Traité suffisamment tôt, le pronostic est en général favorable.

Le travail effectué au cours de ma thèse a tenté d'apporter de nouveaux outils pour appréhender les PNETs et leur pronostic. Ainsi, l'étude des facteurs de transcription tels que Pax-6 et En-2, qui jouent un rôle essentiel au cours du développement embryonnaire comme nous venons de le décrire, pourraient être exprimés dans les tumeurs de blastème du SNC. Nous avons par conséquent corrélié les résultats de leurs expressions en immunohistochimie avec les données cliniques et en particulier la survie et avec les expressions de nombreux anticorps permettant actuellement de révéler les diverses différenciations que l'on peut observer dans ce type de tumeur. Nous avons également testé ces deux facteurs de transcription au sein d'un autre type de tumeurs embryonnaires, à savoir le rétinoblastome.

MATERIEL ET METHODE

I. PATIENTS

1.1. Dossiers analysés

Notre étude est rétrospective et introspective. Les dossiers de toutes les tumeurs neuroectodermiques primitives recensées au sein du laboratoire allant d'octobre 1992 jusqu'en décembre 1998 ont été étudiés, soit 80 tumeurs. Les tumeurs ont été opérées soit au CHRU de Lille par le professeur Dhellemmes, les docteurs Hladky et Sleiman pour les enfants et les professeurs Christians, Lejeune, Assaker, Fawaz et le docteur Louis pour les adultes. Parmi toutes les tumeurs, 7 proviennent d'autres centres hospitaliers tels que Yopougon en Côte d'Ivoire (n° 93-35, 93-286, 94-28, 94-235, 94-345 et 96-222) et Bastia en Corse (n° 94-247). Selon la localisation de la tumeur au sein du SNC et son degré de différenciation, le terme de médulloblastome ou de PNET sera attribué à ces tumeurs dites de blastème selon la classification histopronostique internationale.

Nous avons étudié 67 médulloblastomes et 13 PNETs qui se répartissent en 42 médulloblastomes et 11 PNETs de l'enfant ou de l'adulte jeune (inférieur à 15 ans), 25 médulloblastomes et 2 PNETs de l'adulte.

Parmi ces tumeurs, certaines sont à distinguer soit par leur caractère récidivant soit parce qu'elles correspondent déjà à une récurrence :

- quatre tumeurs ont récidivé une ou plusieurs fois et leurs récurrences ont été analysées :

le n° 13908 a récidivé en 94-399,

le n° 94-28 en 94-235,

le n° 95-196 en 96-140,

le n° 96-17 en 96-614 et en 97-59.

Il s'ensuit que ces 80 tumeurs étudiées n'appartiennent qu'à 75 patients.

- trois tumeurs nous sont parvenues et étaient des récurrences de médulloblastomes. Pour diverses raisons (le matériel étant trop ancien, non homogène ou bien la tumeur initiale n'avait pas été opérée à Lille) nous avons alors travaillé sur les prélèvements correspondant à la récurrence tumorale :

le 95-19 (médulloblastome en 1989),

le 95-130 (médulloblastome en 1990),

le 97-496 (médulloblastome en 1985).

- trois patients avaient déjà présenté une tumeur cérébrale différente :
 - le n° 94-247 (méningiome),
 - le 94-601 (oligo-astrocytome en 1986 et 1992),
 - le 94-420 (glioblastome en 1994).

1.2. Dossiers cliniques

Les dossiers cliniques des patients sont détaillés et répertoriés dans le tableau récapitulatif 8 à la fin de ce chapitre, il indique :

- l'âge et le sexe du patient au moment de l'opération,
- la localisation de la tumeur (Figure 4, Schéma B),
- les antécédents cliniques éventuels du patient voire de la fratrie,
- les premiers signes cliniques de la maladie et leur durée,
- l'exérèse (complète ou incomplète),
- le diagnostic anatomo-pathologique précisant la nature de la tumeur (si elle est diffuse, desmoplasique, de haut ou de bas risque),
- le protocole thérapeutique suivi comprenant soit une radiothérapie soit une chimiothérapie voire les deux,
- le délai (en mois) entre l'intervention chirurgicale et la rechute ou une récurrence,
 - la survie représente (en mois) le délai entre l'exérèse et soit la date du décès, soit jusqu'au 1^{er} septembre 2001.

1.3. Rétinoblastomes

Nous avons pu tester 20 rétinoblastomes fournis par les Docteur Olivier Coué et François Doz de l'Institut Curie. Toutes les lames comportent en plus de la tumeur, une partie ou la totalité de la rétine. Parmi eux, 3 rétinoblastomes (n° 382718, 382942 et 385409) sont bilatéraux. En plus de l'Ag S qui servait de témoin au niveau de la rétine, nous avons testé les anticorps PAX-6, EN-2 et MITF.

II. PRELEVEMENT, FIXATION

2.1. Prélèvement

Lors de la mise en place de l'étude sur les gènes Pax-6 et Engrailed-2, un protocole a été élaboré conjointement avec les neurochirurgiens et les généticiens. Dans la mesure du

possible et selon la taille de la tumeur, une partie du prélèvement arrive frais au laboratoire où :

- un fragment est congelé afin de disposer d'une réserve en vue d'études ultérieures comme le Western Blot,

- un fragment est mis dans du fixateur : l'AFA (Acide acétique Formol Alcool (éthanol)) pour l'étude immunohistochimique réalisée au sein du laboratoire,

- un fragment est mis dans un "liquide nutritif" pour l'étude du caryotype et lorsque la taille du prélèvement le permet, un fragment est mis dans un tube sec pour l'étude de la ploïdie effectuée au Centre Oscar Lambret par Mme le Docteur Adenis. Dix tumeurs ont pu en bénéficier.

2.2. Fixation

Les prélèvements sont placés dans l'AFA (400 ml de formol, 1 l d'acide acétique, 4 l d'alcool absolue complété q.s.p. 10 l). Le temps de pénétration de ce fixateur dépend de la taille de la pièce opératoire. Lorsque le prélèvement contient de l'os ou des calcifications, il est préalablement placé dans un bain d'acide nitrique à 5 ou 10 %, le temps d'incubation variant selon la dureté de la pièce.

III. DIFFERENTS TRAITEMENTS DES BLOCS

3.1. Inclusion, coupe, étalement

3.1.1. Inclusion

Les prélèvements suivent les procédures d'inclusion et de coupes habituelles du laboratoire. Ces techniques de préparation des tissus fixés se font de nuit à l'aide d'un automate, l'Histokinette (Reichert-Jung) comportant différents bains : fixation par l'AFA (1 bain de 3 heures), rinçage dans l'eau du robinet (1 bain d'1 heure), déshydratation par l'éthanol (2 bains d'1 heure à 95 %, 3 bains d'1 heure à 100 %), clarification par le xylène (3 bains d'1 heure), imbibition par la paraffine Tissue-Tek® (Bayer Diagnostics) à 56 °C (2 bains d'1 heure).

Les pièces sont ensuite placées à l'aide d'une pince chauffée entre des barres de Leuckart où de la paraffine chaude y est préalablement versée. Les blocs ainsi obtenus, refroidis sous l'eau du robinet sont démoulés puis placés sur de la glace quelques minutes afin d'obtenir de meilleures coupes. La pénétration des pièces par la paraffine permet l'obtention d'une imprégnation aussi complète que possible des pièces, le refroidissement

au moment du coulage du bloc transforme le tissu, hétérogène du point de vue de la consistance et de l'élasticité, en une masse homogène dont les différentes parties se comportent de façon sensiblement égale lors de la confection des coupes.

3.1.2. Coupe et étalement

Ces blocs sont coupés à 5 μm au microtome manuel (Leika). Les coupes sont étalées sur des lames dégraissées avec de la glycérine albuminée (0,5 % pour les colorations et 2 % pour l'immunohistochimie). Les coupes devant passer à la cocotte minute sont étalées sur des lames silanées : un bain de métacryloxypropyl-triméthoxysilane (Merck, dilution 1 % dans l'acétone), deux rinçages en acétone, deux rinçages en eau distillée (ED). Toutes les lames sont séchées au micro-ondes 3 min à 200 watts.

3.2. Déparaffinage et réhydratation

Les lames sont déparaffinées : xylène (2 bains de 5 min), éthanol à 100 % (2 bains de 5 min), éthanol à 95 % (2 bains de 5 min), ED (1 bain de 10 min) avant tout immunomarquage. Pour les colorations, un passage dans chaque alcool et un rinçage à l'eau courante sont suffisants.

3.3. Coloration

L'Hématoxyline-Eosine (HE) est la coloration de base permettant l'observation de la chromatine en bleu violet très foncé et les cytoplasmes en rose, elle s'effectue comme suit. Les coupes réhydratées sont colorées par l'hématoxyline de Carazzi (Fluka, 0,5 g dissous dans 100 ml de glycérol + alun de potassium 25 g dissous dans 400 ml d'ED + iodate de potassium 0,1 g dissous à chaud dans un peu d'ED) 10 min sans différenciation. Elles sont rincées à l'eau courante puis colorées 10 min par l'Eosine 1,25 %, rincées à l'eau courante, déshydratées et montées en résine Eukitt.

IV. IMMUNOHISTOCHIMIE

Le passage à la cocotte minute permet la détection des marquages nucléaires mais également une meilleure présentation de certains épitopes. Les lames sont placées dans un bac thermorésistant et mises dans la cocotte minute préalablement chauffée contenant du tampon (Tp) citrate 10 mM (10 min à ébullition) puis la cocotte minute est refroidie sous l'eau froide pendant 15 min. Les lames sont cerclées au crayon (Dako pen) afin d'obtenir

une répartition homogène sur toute la surface du tissu de l'anticorps considéré puis elles sont rincées dans le Tp PBS (pH 7.2, 150 mmol/l).

Pendant 5 min, un sérum bloquant est déposé sur les coupes afin de saturer les sites de fixation aspécifiques des immunoglobulines et pour permettre une fixation par compétition de l'anticorps primaire (1 % de sérum albumine bovine dans du Tp PBS avec 15 mM de sodium azide). Après avoir retiré l'excès de sérum bloquant, l'anticorps primaire est déposé à raison de 50 µl par lame.

4.1. Anticorps primaires de routine

Les spécificités et les conditions d'utilisation des anticorps primaires utilisés sont indiquées dans les tableaux 6 et 7. Chaque anticorps est à sa dilution de concentration optimale de marquage, l'incubation (1 heure) se fait à température ambiante en chambre humide.

4.2. Anticorps primaires de recherche

Différents sérums faits chez le lapin nous ont été fournis par le Docteur Simon Saule. Quatre sérums : 11, 12, 13 et 14 reconnaissant différentes protéines se fixant au gène Pax-6 :

- le sérum 11 reconnaît les protéines p 48, p 46, p 43,
- le sérum 12 reconnaît les protéines p 48, p 46, p 43, p 33/32, ce sérum n'a pas été retenu puisqu'il présentait systématiquement un marquage aspécifique au niveau des vaisseaux probablement dû à une réaction du lapin immunisé.
- le sérum 13 reconnaît les protéines p 48, p 46, p 43, p 33/32,
- le sérum 14 reconnaît les protéines p 48, p 46, p 43, p 33/32.

Ces anticorps sont utilisés au 100° et incubent pendant 2 h 30.

Deux sérums, A et B reconnaissant la protéine Engrailed-2 (EN-2), seul le sérum A a été retenu puisque l'autre présentait toujours un marquage beaucoup plus faible ainsi que du bruit de fond qui n'a pu être diminué. Cet anticorps est utilisé au 100° et incube pendant 2 h 30.

4.3. Révélation et montage

Après l'incubation en présence de l'anticorps primaire, rinçage 10 min en Tp PBS. La révélation se fait avec le coffret Vectastain® universal (ABC Kit n° PK 6200) et se réalise comme suit :

- incubation avec l'anticorps secondaire anti-souris et anti-lapin biotinylé 30 min et rinçage 10 min en Tp PBS,
- incubation de 30 min avec l'avidine-biotine-peroxydase (préparé 30 min avant), et rinçage 10 min en Tp PBS,
- révélation, 10 min par le 3-amino-9-éthylcarbazole (AEC) prêt à l'emploi (Dako, n° K3464), donnant une coloration rouge et rinçage à l'ED,
- contre-coloration de 2 min par l'hémalum de Mayer (Merck), rinçage à l'ED, différenciation avec de l'eau ammoniacuée à 0,25 %, rinçage à l'ED puis montage à l'Aquamount (Gurr®).

Les systèmes utilisant la phosphatase alcaline ont un moins bon ratio signal/bruit de fond, dans les mêmes conditions de manipulation puisque le cerveau possède beaucoup de phosphatase endogène.

4.4. Témoins

Certains anticorps sont utilisés systématiquement dans la pratique quotidienne du laboratoire. Les témoins positifs ne sont, par conséquent, pas répétés à chaque technique, excepté lors de la mise au point de l'anticorps et lors du passage à la cocotte minute où un marquage par le Ki-67 est systématiquement réalisé. Dans pratiquement toutes les tumeurs cérébrales, la périphérie des prélèvements concerne du parenchyme cérébral qui sert de témoin positif ou négatif pour les sites antigéniques normaux présents dans le cerveau. Pour l'anticorps Ag S, une lame d'œil humain est systématiquement utilisée comme témoin. Pour l'anticorps anti-Pax 6, des témoins négatifs utilisant l'immunosérum déplété de l'anticorps anti-Pax 6 se sont bien avérés négatifs pour chaque nouvelle tumeur testée.

V. COTATION DES RESULTATS

5.1. Anticorps de routine

Les témoins internes permettent de nous indiquer si la révélation donc la technique a fonctionné. Par exemple pour l'anticorps GFAP, on le retrouve au niveau des cellules gliales réactives dans le cerveau sain et au niveau des pieds astrocytaires autour des vaisseaux, l'exérèse intéresse fréquemment un lambeau de tissu cérébral périphérique qui sert de témoin interne. Toutes les études immunohistochimiques de routine sont faites en même temps que les techniques de recherche, ce qui permet d'avoir des témoins externes.

Seules les positivités tumorales ou pour certaines cellules une réaction anormale sont signalées dans le tableau 13 de résultats immunohistochimiques.

5.2. Ki-67

L'index de prolifération est calculé de la même manière pour toutes les tumeurs étudiées. Toutes les lames sont comptées de deux façons différentes afin de mieux se rendre compte de l'hétérogénéité ou de l'homogénéité de la prolifération tumorale. Premièrement, toutes les cellules, sur 10 champs, si possible dans des localisations homogènes ou représentatives du prélèvement, sont comptées ainsi que les noyaux présentant un signal au sein de ces cellules. Une moyenne est effectuée donnant le pourcentage de prolifération. Deuxièmement, le "Hot Spot" est également calculé à partir de la zone présentant le plus grand nombre de noyaux marqués.

5.3. PAX-6 et EN-2

Pour ces deux anticorps, plusieurs évaluations sont effectuées afin de mieux se rendre compte des différents types de marquage observés.

Pour PAX-6, en plus d'une évaluation du pourcentage de positivité observée au sein de la tumeur, la répartition des noyaux positifs est indiquée comme suit :

- pas de signal : (-),
- marquage intéressant de petits nodules cellulaires : SN (pour Small Nodule),
- marquage intéressant de larges nodules ou de plages cellulaires : LN (pour Large Nodule),
- marquage diffus : D.

Pour EN-2, le type de cellules marquées ainsi que l'intensité de celui-ci sont indiqués comme suit :

- strong nucleus signal in granular cells : S-NS (fort signal nucléaire dans les cellules granulaires),
- weak nucleus signal in tumor cells : W-NS (faible signal nucléaire dans les cellules tumorales),
- strong cytoplasmic signal : S-CS (fort signal cytoplasmique),
- noyaux oligo-like ou noyaux neuron-like : (*).

5.4. Etude statistique

Tous les résultats immunohistochimiques incluant les données sur la survie ont bénéficié d'une étude statistique réalisée par Valérie Deken du CERIM. Malheureusement, aucun résultat statistiquement significatif attendu n'a pu être observé et ce malgré les différents types de tests, univariable ou multivariable, utilisés. En fonction du nombre d'échantillon, des divers regroupements effectués, l'analyse de la survie selon la méthode de Kaplan-Meier, le test du Log-Rank, le test du χ^2 , le test de Wilcoxon (la comparaison de 2 groupes selon une variable numérique), le test de Student (lorsque n est supérieur ou égal à 30), le coefficient de corrélation de Pearson lorsque l'on utilise deux variables ont été effectués.

Tableau 6 : Origine des anticorps primaires de routine.

Spécificité	Dénomination	Origine	Immunogène
GFAP		Dako Z 334	chorde spinal bovine
NF	2 F 11	Dako M 762	cerveau humain
NSE		Dako A 589	cerveau humain
S 100		Dako Z 311	cerveau de bœuf
Antigène S	S2D2	U 186 Paris	Arrestine
Synaptophysine	SY 38	Dako M 776	vésicules présynaptiques de cerveau bovin
Chromogranine		Dako A 430	urine de patient ayant un syndrome carcinoïde
Cytokératine	Gp 56 Kd	Immunotech 128	kératinocytes d'épiderme
Ki-67	Mib-1	Immunotech 0505	peptide recombinant humain d'un fragment cDNA Ki-67 de 1002 pb
α -actine	1A4	Immunotech 1144	décapeptide NH2 terminal synthétique de cell. muscul. lisse
Myosine	WB-MHCf	Novocastra	myosine native du muscle psoas de lapin
Desmine	D 33	Dako M 0760	muscle humain
Vimentine	V 9	Dako M 0725	lens d'œil porcin
Rhodopsine		U 186 Paris	

Tableau 7 : Conditions d'usage des anticorps primaires de routine.

Anticorps	Dilution	Type	Anticorps	Dilution	Type
GFAP	500 ^e	polyclonal, lapin	Cytokératine	200 ^e	monoclonal, souris
NF	100 ^e	monoclonal, souris	Ki-67	200 ^e	monoclonal, souris
NSE	200 ^e	polyclonal, lapin	α -Actine	Prêt à l'emploi	monoclonal, souris
S 100	300 ^e	polyclonal, lapin	Myosine	40 ^e	monoclonal, souris
Antigène S	1000 ^e	monoclonal, souris	Desmine	100 ^e	monoclonal, souris
Synaptophysine	20 ^e	monoclonal, souris	Vimentine	50 ^e	monoclonal, souris
Chromogranine	500 ^e	polyclonal, lapin	Rhodopsine	100 ^e	monoclonal, souris

Tableau 8 : Dossiers cliniques des patients.

N°	Age	Sexe	Localisation	Tumeur	Antécédents	Tableau clinique	Durée	Chirurgie	Protocole thérapeutique	Récidive Rechute	Survie	Suivi	Remarques
13908	5	M	V4	MB	aucun	vomissements céphalées	3 M	partielle	chimio	20 M 94-399	31 M	DCD	
13943	11	F	pariétal droit	PNET	épilepsie leucémie	monoplégie gauche	1 M	complète	chimio radio	3 sem.	8 M	DCD	crise convulsive chronique
13981	9	F	V4	PNET desmo	débilité légère	HITC	2 M	sub-totale adhérence	chimio radio	aucune	105 M	VB	
14022	18	M	vermis	MB desmo	aucun	HITC, SC vestibulaire	2 M	sub-totale infiltration	chimio radio	ND	12 M	DCD	IRM, LCR -
93-28	7	M	sous-tentorial	MB hr	aucun	HITC, SC torticolis	2 M	sub-totale	"8 en 1" cérébro-spinal	34 M dorsale	38 M	DCD	LCR -, pas de reliquat
93-35	7	M	vermis	MB	ND	HITC, SC	2 M	ND	ND	ND	ND	DCD	envoi extérieur
93-92	10	M	V4	MB	aucun	céphalées diplopie	3 sem.	incomplète	"8 en 1"	18 M	30 M	DCD	LCR postop -
93-207	7	F	vermis	MB hr	appendicec.	HITC céphal. vomissements	3 M	sub-totale infiltration	"8 en 1"	14 M métastases	15 M	DCD	LCR postop +
93-286	6	F	cérébelleux	MB	ND	troubles marche équilibre, SC	2 M	biopsie	ND	ND	ND	DCD	envoi extérieur
93-308	6	M	V4	MB hr desmo	douleurs abdominales	HITC céphal. vomissements	1 M	complète adhérence	"8 en 1"	9 M méningite	17 M	DCD	LCR postop +
93-357	12	F	V4	MB br	appendicec.	vomissements douleurs abdo.	3 M	complète adhérence	"8 en 1"	9 M méningite	15 M	DCD	greffes tumorales
93-609	6	M	vermis	MB hr	ND	HITC vomissements	4 M	sub-totale infiltration	"8 en 1"	15 M métastases	22 M	DCD	arrivé dans le coma
93-706	8	M	FP	MB	aucun	HITC	15 jours	complète adhérence	chimio	32 M métastases	77 M	DCD	

N°	Age	Sexe	Localisation	Tumeur	Antécédents	Tableau clinique	Durée	Chirurgie	Protocole thérapeutique	Récidive Rechute	Survie	Suivi	Remarques
94-28	40	F	FP	MB	aucun	HITC, SC	2 ans	ND	ND	5 M 94-235	ND	DCD	envoi extérieur
94-165	22	M	vermis	MB	troubles comportement	céph., nausées trouble marche	2 M	sub-totale infiltration	radio crano- spinal	4 M	8 M	DCD	IRM -
94-194	5	M	V4	MB hr	aucun	HITC latérocolis	15 jours	incomplète	"8 en 1"	10 M métastases	11 M	DCD	métastases LCR +
94-198	22	F	cérébelleux gauche	MB br	aucun	SC statique cinétique	8 jours	complète	"8 en 1"	aucune	89 M	VB	
94-235	40	F	FP	MB	MB 94-28	HITC, SC	ND	ND	ND	5 M	ND	DCD	envoi extérieur
94-247	14	F	FP	MB	méningiome	HITC, SC	1 an	ND	ND	ND	ND	DCD	envoi extérieur
94-262	5	F	vermis	MB br	aucun	HITC, céphal vomissements	3 sem.	complète	"8 en 1"	22 M métastases	74 M	DCD	
94-345	6	M	FP	MB	ND	HITC, SC, HTA	3 M	ND	ND	ND	ND	DCD	envoi extérieur
94-399	7	M	V3	MB	MB en 92	IRM contrôle	ND	biopsie	aucune	aucune	31 M	DCD	
94-420	53	M	frontal gauche	PNET	glioblastome en 94	contrôle neuroradio	12 jours	complète	chimio	aucune	ND	DCD	lobectomie
94-601	31	M	frontal D pariétal	PNET	oligo-astro en 86 et 92	crise convulsive	ND	incomplète reliquat	chimio PCV	10 M	14 M	DCD	
94-669	6	M	vermis	MB br	varicelle phimosi	HITC, SC	1 M	complète	SFOP	aucune	81 M	VB	
94-670	11	M	vermis	MB hr	ND	céphalées nausées SC	qq jours	complète infiltration	chimio radio	aucune	81 M	VB	IRM postop -
94-671	4	M	vermis	MB	ND	HITC troubles équilibre	qq jours	complète	chimio radio	aucune	17 M	DCD	LCR + postop

N°	Age	Sexe	Localisation	Tumeur	Antécédents	Tableau clinique	Durée	Chirurgie	Protocole thérapeutique	Récidive Rechute	Survie	Suivi	Remarques
94-674	8	M	FP	MB hr diffus	méningite en mars 94	HITC vom. ataxie céphal.	qq sem.	complète métastases	"8 en 1"	aucune	81 M	VB	IRM postop -
94-721	13	F	cérébelleux hémisph.	MB diffus	aucun	HITC, SC cinétique G.	ND	complète	"8 en 1"	8 M	12 M	DCD	LCR postop -
94-735	28	F	vermis, V4	MB hr	spasmophilie eczéma	diplopie, céph. vomissements	3 M	sub-totale infiltration	chimio radio	aucune	80 M	VB	IRM, LCR -
95-19	15	M	métastase frontale	MB hr	MB en 89	céphalées vomissements	3 M	complète	"8 en 1"	14 M métastases	80 M	VB	grabataire
95-64	9	F	FP V4	MB diffus	varicelle	HITC nystagmus	2 M	incomplète	SFOP	6 M métastases	13 M	DCD	LCR -, IRM postop +
95-75	54	F	vermis, V4	MB diffus	aucun	HITC, SC	ND	sub-totale infiltration	radio	aucune	59 M	VB	envoi extérieur
95-130	21	F	FP	MB hr desmo	MB opéré le 10.12.90	RMN de contrôle	2 M	complète	"8 en 1"	3 M méta spinal	8 M	DCD	IRM, LCR -
95-196	13	F	cérébelleux hémisph. D.	MB diffus	aucun	céphalées nausées	1 M	complète infiltration	chimio radio	11 M 96-140	15 M	DCD	IRM postop -
95-284	12	F	vermis	MB br diffus	ND	HITC, céphalées	15 jours	complète	"8 en 1"	6 M méningite	8 M	DCD	LCR postop -
95-310	1	M	frontal droit	PNET	grossesse 39 sem.	absence, retard psychomoteur	1 M	complète	chimio	5 M 95-642	10 M	DCD	
95-343	2	M	vermis, V4	MB desmo	aucun	ataxie, troubles de la marche	ND	sub-totale reliquat	"8 en 1"	15 M métastases	36 M	DCD	septicémie
95-380	33	F	vermis	MB hr	aucun	HITC céphal. vomissements	1 M	complète	chimio radio	aucune	74 M	VB	enceinte de 22 semaines
95-388	24	M	cérébelleux hémisph. D.	MB	aucun	céphal. fronto-occipitales	1 sem.	complète	irradiation cérébro-spinal	aucune	74 M	VB	LCR postop - métastase -
95-678	13	M	V4	MB	aucun	vomissements	4 M	sub-totale métastases	chimio radio	aucune	69 M	VB	

N°	Age	Sexe	Localisation	Tumeur	Antécédents	Tableau clinique	Durée	Chirurgie	Protocole thérapeutique	Récidive Rechute	Survie	Suivi	Remarques
95-714	7	F	pariéto-frontal droit	PNET	ND	céphalées épisodiques	1 an	complète	chimio radio cérébro-spinal	aucune	68 M	VB	LCR postop -
95-720	2	M	vermis haut	MB	ND	HITC chutes	3 sem.	complète	"8 en 1" irradi. compl.	5 M métastases	7 M	DCD	métastases spinales diffuses
95-721	35	F	cérébelleux gauche	MB	aucun	céph., vom. vertige	4 M	complète	chimio radio	29 M métastases	46 M	DCD	IRM, LCR -
96-17	5	F	frontal droit	PNET	aucun	paralysie, céph. oedème papill.	10 jours	complète	chimio radio cérébro-spinal	9 M 96-614	17 M	DCD	
96-94	32	M	cérébelleux droit	MB desmo	aucun	céph., vom. vertige	1 M	complète	irradiation cérébro-spinal	aucune	67 M	VB	
96-140	14	F	FP vermis	MB	récidive du 95-196	céphalées nausées	15 jours	complète	chimio	aucune	15 M	DCD	
96-222	5	F	cérébelleux	MB	ND	HITC, SC troubles consci.	ND	nécropsie	ND	ND	ND	DCD	envoi extérieur
96-233	19	F	para-ventri. bi-focale	MB	aucun	céph., vom. diplopie	2 M	incomplète infiltration	radio	10 M métastases	11 M	DCD	LCR -
96-287	4	M	vermis, V4	PNET hr	aucun	HITC ataxie	15 jours	sub-totale	"8 en 1"	6 M	9 M	DCD	LCR +
96-314	10	F	vermis	MB	aucun	douleurs abdo. céph. torticolis	4 jours	complète infiltration	chimio radio	aucune	63 M	VB	LCR -, pas de reliquat
96-344	9	F	V4	MB hr	appendicec.	HITC	15 jours	sub-totale	chimio radio	aucune	10 M	DCD	
96-375	23	M	vermis	MB br	frère DCD lymphome	céphalées d'effort	6 M	totale infiltration	"8 en 1"	55 M métastases	62 M	VB	IRM postop -, LCR -
96-379	9	F	vermis + méta céréb.	MB hr	aucun	HITC décompensation	15 jours	incomplète	"8 en 1"	9 M	35 M	DCD	
96-538	22	F	cérébelleux	MB br	kyste ovarien	HITC, nausées céph., vision	7 M	complète	cérébro-spinal surdosage FP	aucune	59 M	VB	

N°	Age	Sexe	Localisation	Tumeur	Antécédents	Tableau clinique	Durée	Chirurgie	Protocole thérapeutique	Récidive Rechute	Survie	Suivi	Remarques
96-614	5	F	temporo-sylvienne D	PNET hr	récidive du 96-17	ND	ND	complète	"8 en 1"	3 M 97-59	17 M	DCD	
96-640	33	M	cérébelleux gauche	MB hr	pneumopathie	vomissements par jet, céphal.	3 sem.	complète	"8 en 1" surdosage G.	aucune	58 M	VB	IRM postop -, LCR envahi
96-666	5	M	frontal gauche	PNET	aucun	céphalées vomissements	1 M	complète	"8 en 1"	aucune	57 M	VB	LCR postop +
96-714	25	M	vermis	MB hr	aucun	céphal., diplopie bourdonnement	3 M	complète	"8 en 1"	aucune	56 M	VB	méningite blastique
97-59	6	F	temporo-sylvienne D	PNET hr	récidive du 96-614	ND	ND	partielle	chimio	aucune	17 M	DCD	
97-66	38	M	cérébelleux droit	MB hr	exogénose pancréatite	céphalées violentes	5 M	biopsie cérébrale	"8 en 1"	aucune	55 M	VB	lésions encéphaliques
97-174	1	F	vermis	MB hr	aucun	macrocéphalie retard marche	ND	complète	BBSFOP	aucune	53 M	VB	résidu local LCR envahi
97-213	9	F	vermis	MB hr desmo	asthme appendicéc.	céphalées vomissements	15 jours	complète	"8 en 1"	42 M métastases	52 M	VB	
97-399	16	M	vermis	MB hr	aucun	HITC, céphal. vomissements	1 M	incomplète	"8 en 1"	11 M métastases	12 M	DCD	métastases spinales
97-410	2	M	V4	MB	frère DCD mort subite	HITC, troubles équilibre	3 M	sub-totale infiltration	BBSFOP	ND	25 M	DCD	T. molle hémorragique
97-449	42	M	V4	MB br	poliomyélite Bouveret	diplopie, vertiges	1 an	sub-totale	cérébro-spinal surdosage FP	37 M métastases	48 M	VB	IRM postop -
97-472	19	M	vermis	MB br	allergies 2 fractures	HITC, troubles équilibre	6 M	complète	cérébro-spinal surdosage FP	aucune	48 M	VB	IRM postop -
97-484	4	M	V4	MB	varicelle eczéma	vomissements par jet	2 M	totale adhérence	BBSFOP	8 M	20 M	DCD	promoteur PO du gène pax-6
97-496	18	F	FP	MB	MB en 85	hémiparésie D. pb déglutition	15 jours	complète	chimio autogreffe	aucune	31 M	DCD	IRM postop -, LCR -

N°	Age	Sexe	Localisation	Tumeur	Antécédents	Tableau clinique	Durée	Chirurgie	Protocole thérapeutique	Récidive Rechute	Survie	Suivi	Remarques
97-505	37	M	V4	MB hr	lithiase rénale hernie discale	vomissements vertiges	4 M	sub-totale	irradiation cranio-spinal	aucune	3 M	DCD	coma aéractif
97-527	8	M	cérébelleux hémisph. D	MB br	aucun	HITC, nausées torticolis	10 jours	complète	"8 en 1"	aucune	47 M	VB	
97-567	25	F	cérébelleux gauche	MB br	aucun	troubles marche et équilibre	1 M	complète	"8 en 1"	aucune	46 M	VB	IRM, LCR -
97-580	7	M	cérébelleux	MB desmo	aucun	HITC	15 jours	partielle	chimio	24 M métastases	37 M	DCD	image résiduelle
97-606	14	M	vermis	MB	aucun	céphalées diplopie	1 M	partielle	chimio	aucune	46 M	VB	rémission
97-652	6	M	FP	MB	macrocéphalie	vomissements	3 ans	sub-totale adhérence	chimio	aucune	45 M	VB	reliquat T. calcifiée
98-65	22	M	cérébelleux	MB hr desmo	aucun	céph., troubles digestif	6 M	sub-totale	aucune	aucune	6 jours	DCD	embolie gazeuse
98-149	1	M	queue de cheval	PNET	aucun	paraplégie flasque	1 M	sub-totale	chimio	1 M	6 M	DCD	
98-208	4 M	F	vermis	MB	aucun	HITC	3 sem.	complète	chimio greffe	8 M	11 M	DCD	T. qui a saignée
98-541	13	F	sus-tentorial gauche	PNET	aucun	troubles de la lecture	ND	biopsie large	irradié chimio	33 M métastases	34 M	VB	
98-707	8	F	vermis	MB	aucun	céphalées	qq M	complète adhérence	chimio radio	aucune	33 M	VB	

Légende : F : Féminin, M : Masculin, FP : Fosse Postérieure, MB : médulloblastome, PNET : primitive neuro-ectodermal tumor, desmo : desmoplasique, br : bas risque, hr : haut risque, HITC : hypertension intracrânienne, céph. : céphalés, vom. : vomissements, SC : syndrome cérébelleux, ND : non déterminé, chimio : chimiothérapie, radio : radiothérapie, VB : va bien, DCD : décédé, LCR : liquide céphalorachidien, T : tumeur.

RESULTATS

I. RESULTATS HISTOLOGIQUES

1.1. Les dossiers cliniques

Il existe une prédominance masculine, 42 patients masculins pour 33 patients féminins. Les enfants représentent environ les deux tiers de l'effectif, soit 52 enfants (65 %) et 28 adultes (35 %). La répartition du nombre des tumeurs, selon le sexe et l'âge, est résumée dans la pyramide des âges ci-dessous.

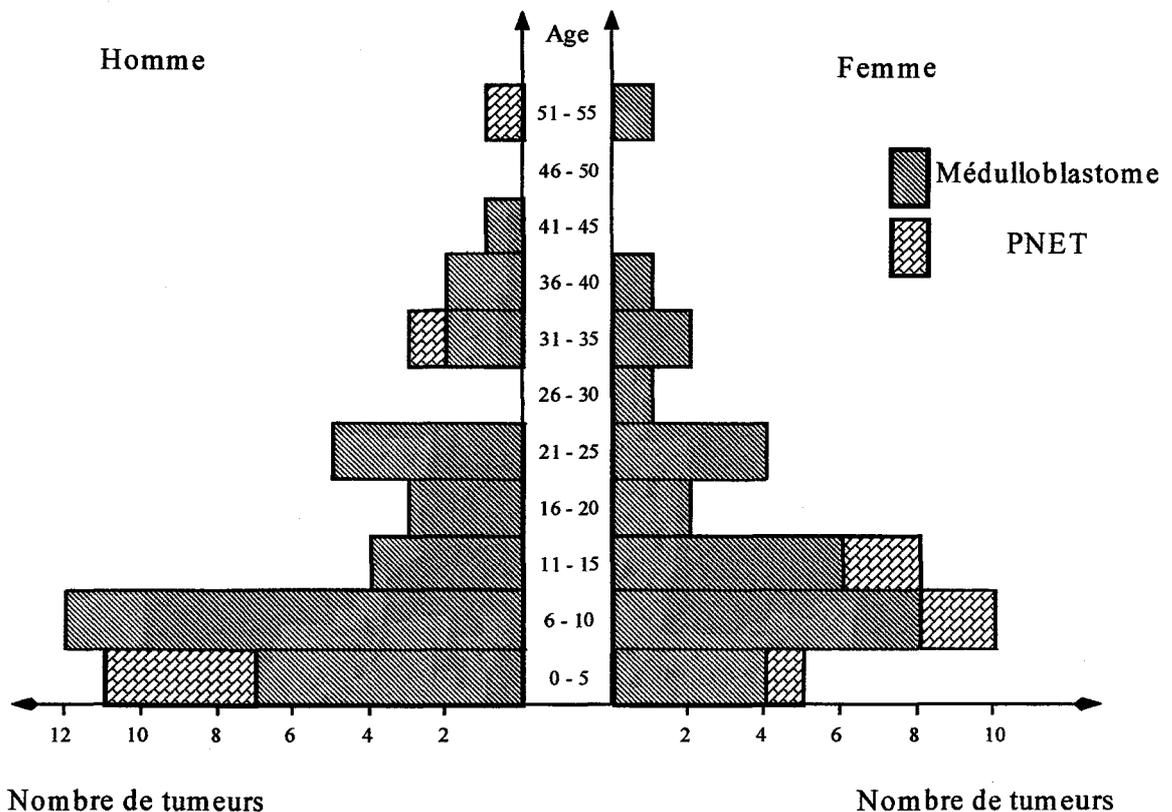


Figure 11 : Répartition des tumeurs en fonction de l'âge et du sexe.

1.2. Premières constatations

L'intervalle entre les signes cliniques et l'intervention reste relativement long (trois mois en moyenne). Le tableau clinique est essentiellement dominé par des signes d'hypertension intra-crânienne, des céphalées et des vomissements. Trois enfants ont été opérés de l'appendicite.

La survie reste très faible, 45 patients sur les 75 étudiés sont décédés (soit 60 %) avant la fin de l'étude (fin août 2001). Parmi eux 14 sont décédés avant un an (9 enfants et 5 adultes) et 2 adultes sont décédés avant six mois. La survie à un an est de 80,5 %, elle passe à 58 % à deux ans et à 44 % à cinq ans, 7 cas sont non déterminés.

La répartition et la survie des patients en fonction du type de tumeur sont résumées dans le tableau 9 ci-dessous.

Type de tumeur	Médulloblastomes		PNETs	
	Enfants < 15 ans	Adultes	Enfants < 15 ans	Adultes
Nombre de tumeurs (75)	39	25	9	2
Nombre de décès	28	10	5	2
Pourcentage	72	40	55	100

Tableau 9 : Survie des patients en fonction de l'âge et de la tumeur.

Notre étude a débuté en octobre 1992 et se termine fin août 2001. La survie la plus longue est de 105 mois (\approx 9 ans), le recul varie de 33 mois (\approx 3 ans) à 106 mois.

Parmi les 8 enfants de moins de trois ans comportant 2 filles (2 médulloblastomes) et 6 garçons (3 médulloblastomes et 3 PNETs), 5 sont décédés avant un an (parmi eux les 3 PNETs). La survie n'excède pas 48 mois (4 ans), elle est observée chez un seul enfant.

En ce qui concerne la rechute ou la récurrence, elle n'a pas entraîné de décès dans 5 cas (6,7 %). La survie sans aucune rechute ou récurrence est constatée chez 27 patients (36 %).

II. RESULTATS IMMUNOHISTOCHIMIQUES

Une partie des résultats présentée ci-dessous fait partie de l'Article I. Huit anticorps "de routine" ont été testés de façon systématique. A la fin de ce chapitre, se trouve le tableau 13 récapitulatif de tous les résultats immunohistochimiques ainsi que le suivi des patients. Certaines tumeurs, dont la morphologie est particulière, ont bénéficié d'une étude plus approfondie et seront détaillées ultérieurement.

2.1. Marqueurs de différenciation

Le tableau 10 ci-dessous résume les résultats obtenus, selon les anticorps utilisés, sur l'ensemble des tumeurs étudiées en fonction de l'âge.

Anticorps	GFAP	NF	NSE	S 100	Ag S	Synapto	Chromo	Total
Adultes et enfants	21	4	62	30	9	28	27	80
Adultes	6	0	24	7	0	8	9	28
Enfants	15	4	38	23	9	20	18	52

Tableau 10 : Marqueurs de différenciation en fonction de l'âge.

Le médulloblastome, comme son nom l'indique, est une tumeur de blastème et le plus souvent peu différenciée. Mais comme toute tumeur de blastème, le médulloblastome peut également présenter les différenciations observées habituellement dans le tissu que ces cellules doivent normalement former.

L'expression de NSE est retrouvée dans 62 tumeurs (77,5 %) dont 15 montrent un fort pourcentage de cellules marquées suggérant une différenciation neuronale plus nette de ces tumeurs. La NSE est statistiquement plus présente avec l'âge. Cependant cet anticorps montre peu de spécificité.

2.1.1. Marqueurs de différenciation gliale

L'expression de GFAP, marqueur d'une différenciation gliale est détectée dans 21 tumeurs (26 %) dont deux de façon plus étendue, les astrocytes réactionnels ou les astrocytes périvasculaires n'ont pas été pris en compte, ils sont indiqués par un A.

La protéine S100 est détectée dans 30 tumeurs (37,5 %) dont une de façon diffuse (n° 94-420). Le marquage est retrouvé dans des cellules isolées au sein de lobule avec une représentation d'environ 30 à 40 %.

2.1.2. Marqueurs de différenciation neuronale

La synaptophysine est observée dans 28 tumeurs (35 %) dont 4 avec une proportion importante indiquant une différenciation neuronale plus spécialisée. L'expression de la synaptophysine pose des difficultés puisque certaines cellules de la couche granulaire du cervelet peuvent persister dans la tumeur et être marquées.

La chromogranine est observée dans 27 tumeurs (34 %) correspondant à une différenciation neurosécrétoire. Quatre d'entre elles présentent une positivité plus diffuse.

Des cellules marquées par l'anticorps anti-NF ne sont détectées que chez les enfants, dans 4 tumeurs (5 %) dont 2 avec un fort pourcentage de cellules marquées. Ces cellules tumorales présentent une différenciation neuronale très spécialisée.

L'antigène S est exprimé dans 9 tumeurs (11 %) soit par quelques cellules isolées ou par de rares groupes de cellules. Ce marquage est toujours vérifié par un marquage des photorécepteurs sur une coupe témoin d'œil. Il est à signaler que les marquages avec l'anticorps anti-Ag S, marqueur de différenciation neuronale, ne sont retrouvés que chez les enfants, et ce, de manière significative avec un test du Chi².

La rhodopsine a également été testée avec une coupe témoin d'œil. Dans ces 9 cas, elle est exprimée, exceptée pour la tumeur n° 95-284 qui sera détaillée ultérieurement.

2.1.3. Marqueurs de mémoire épithéliale

La cytokératine n'est retrouvée qu'au sein d'une tumeur, cet anticorps est un marqueur épithélial qui suggère généralement, dans cette localisation, le diagnostic de carcinome des plexus choroïdes, ou bien le diagnostic de tumeur de type térétoïde-rhabdoïde.

2.2. Index de prolifération

Vingt six tumeurs ont un index de prolifération inférieur à 10 %. Néanmoins, en général, il est assez élevé, il est de 20 % en moyenne avec un maximum de 80 %. Dans les zones de "Hot Spot", 5 tumeurs ont un index de prolifération inférieur à 10 %. Pour les autres tumeurs, on a une moyenne de 36 % avec un maximum de 96 %, témoignant de l'agressivité de ce type de tumeur. Une corrélation entre la valeur de l'index de prolifération par rapport à la survie n'a pas été retrouvée de manière statistique.

2.3. PAX-6 et EN-2

2.3.1. PAX-6

PAX-6 est inexprimé dans 31 tumeurs (38,75 %), 23 médulloblastomes et 8 PNETs. Ces 31 tumeurs présentent une différenciation neuroblastique avec des rosettes d'Homer Wright et des plages claires différenciées sans réticuline ou des nodules de différenciation neuronale entourés de réticuline.

L'expression de PAX-6 est nucléaire et est détectée dans 49 tumeurs (61,25 %), 44 médulloblastomes et 5 PNETs. Sept d'entre elles présentent un marquage n'intéressant que peu de cellules, avec un taux inférieur à 5 %, les autres présentent un marquage qui peut être diffus ou nodulaire (de 5 à 85 %). PAX-6 est toujours détecté dans les aires indifférenciées ou dans les tumeurs indifférenciées de façon diffuse. Dans quelques tumeurs hétérogènes, seuls quelques nodules montrent un signal nucléaire avec PAX-6.

PAX-6 est systématiquement retrouvé dans les médulloblastomes présentant un phénotype particulier dit "en files indiennes". Notre étude comporte six tumeurs (Tableau 11) présentant ce phénotype, elles montrent une expression de PAX-6 dans 15 à 85 % des noyaux avec une moyenne de 60 %. Une seule de ces tumeurs, d'un patient adulte, a récidivé au bout de 4 mois suivie d'un décès au bout de 8 mois. Quatre autres comprenant 2 enfants et 2 adultes n'ont présenté aucune récurrence et vont bien avec un recul allant d'environ 4 ans à 6 ans. La dernière tumeur concerne un patient décédé six jours après

l'opération à la suite d'une embolie gazeuse. Il est à noter que ces tumeurs présentent entre 1 à 4 différenciations avec les anticorps usuels, voire aucune pour un des cas.

N°	Age	Sexe	PAX-6 (%)	EN-2	Rechute (mois)	Survie (mois)	Suivi	Nombre de différenciation
94-165	22	M	85	-	4	8	DCD	2
95-380	33	F	75	+	aucune	74	VB	1
96-538	22	F	70	+	aucune	59	VB	0
97-174	1	F	15	+	aucune	53	VB	4
97-527	8	M	85	++	aucune	47	VB	3
98-65	22	M	30	+	aucune	6 jours	DCD	3

Tableau 11 : Les tumeurs en file indienne.

Les tumeurs présentant plus de 50 % de marquage avec PAX-6 sont toutes des médulloblastomes, excepté pour la PNET n° 96-614 qui est la récurrence d'une PNET (n° 96-17) et qui présente une morphologie particulière faisant évoquer un médulloépithéliome (ME) qui sera détaillé ultérieurement. Sur les 49 tumeurs exprimant PAX-6, 14 médulloblastomes (5 enfants et 9 adultes) ont un taux supérieur à 50 %, parmi celles-ci 7 ont conduit au décès. Chez les enfants, parmi les 4 enfants décédés, 3 tumeurs ont récidivé. Un enfant va bien sans rechute avec un recul de presque 4 ans. Chez les adultes, les 3 adultes qui sont décédés ont tous présenté une rechute. Parmi les 6 adultes qui vont bien, une tumeur a récidivé avec un recul de plus de 6 ans, pour les autres il n'y a aucune rechute avec un recul allant de 4 à 7 ans.

Parmi les 7 tumeurs concernant les enfants de moins de 3 ans, dont les résultats sont dans le tableau 12 ci-dessous, un seul va bien.

N°	Age (Ans)	Tumeur	Localisation	PAX-6 (%)
95-310	1	PNET	Frontal	40
95-343	2	MB	vermis, V4	8
95-720	2	MB	vermis	7
97-174	1	MB	vermis	15
97-410	2	MB	V4	1
98-149	1	PNET	Queue de cheval	0
98-208	4 Mois	MB	vermis	16

Tableau 12 : Tumeurs de l'enfant ayant moins de 3 ans.

Dans les médulloblastomes, comme dans les PNETs, les plages de différenciation gliale n'expriment jamais PAX-6. Ceci correspond à l'absence d'expression de PAX-6 déjà notée dans les astrocytomes, les astrocytomes anaplasiques, les épendymomes, les

carcinomes des plexus choroïdes et les métastases. De même aucune expression de PAX-6 n'a été observée dans les tissus contrôles ou dans le tissu envahi au niveau sustentorien comme au niveau cérébelleux.

De façon intéressante lorsque le tissu cérébelleux est envahi, les lobules ou manchons cellulaires entourant les axes vasculaires sont marqués de façon similaire par le Ki-67 et par Pax-6 (Article I). Ces zones d'infiltration sont caractérisées par un haut pourcentage (40 à 60 %) de noyaux positifs avec le Ki-67.

En dernier lieu, les résultats obtenus pour les tumeurs de blastème ayant récidivé, résumés dans le tableau 13 ci-dessous, apportent quelques informations quant à la présence ou non de PAX-6 et de son maintien ou non au sein des récidives (la colonne EN-2 indique une localisation dans les cellules tumorales).

N°	Tumeur	Localisation	PAX-6	EN-2	Différenciation observée
13908 récidive	MB	V4	-	-	GFA-NSE-S100-Synapto-Chromo
94-399	MB	V3	42 %	-	GFA-NSE-S100-Synapto-Chromo
94-28 récidive	MB	FP	-	+	GFA-NSE-S100
94-235	MB	FP	-	+	NSE-S100-Chromo
95-196 récidive	MB	cérébelleux	65 %	+	NSE
96-140	MB	vermis	-	-	NSE-Synapto-Chromo
95-310 récidive	PNET	frontal	40 %	-	NSE
95-642	ME	frontal	60 %	-	Aucune
96-17 récidive	PNET	frontal	20 %	+	Aucune
96-614 récidive	PNET	temporo-syl.	60 %	+	Aucune
97-59	PNET	temporo-syl.	3 %	+	Aucune

Tableau 13 : Tumeurs initiales et leurs récidives.

En particulier, la tumeur n° 96-17 exprimant PAX-6, l'exprime également lors de ses récidives avec des taux différents, même si ces dernières se situent à distance de la première localisation, c'est-à-dire au niveau frontal pour les médulloblastomes primitifs de la fosse postérieure. De plus, cette tumeur présente une morphologie particulière puisque l'on peut observer des ébauches de formation de tube laissant évoquer un médulloblastome. La première récidive montre des tubes beaucoup plus nombreux et mieux formés, le taux d'expression de PAX-6 est plus élevé. Dans la deuxième récidive, on observe essentiellement un marquage cytoplasmique de PAX-6 sous forme de grain au

niveau de ces formations tubulaires. Dans les trois tumeurs, aucune différenciation avec les anticorps usuels n'a pu être observée. Toutes ces tumeurs ont conduit au décès.

Concernant les trois récidives de médulloblastomes (n° 95-19, 95-130 et 97-496) dont nous n'avons pas pu étudier la première tumeur, elles présentent toutes les trois une positivité avec PAX-6 de 55, 70 et 15 % respectivement. Pour les trois tumeurs, 1 médulloblastome (n° 94-247) et 2 PNETs (n° 94-420 et 94-601) dont la première tumeur était cérébrale mais non de blastème, PAX-6 est négatif.

2.3.2. EN-2

EN-2 est exprimé dans la plupart des tumeurs. Néanmoins des expressions différentes sont détectées :

- Certaines présentent un fort signal nucléaire (S-NS pour strong nucleus signal) détecté dans les cellules granulaires du tissu cérébelleux envahi, dans 44 médulloblastomes et 1 PNET. Ce fort signal nucléaire est également observé très intensément dans les infiltrations. Par contre, il n'est pas retrouvé à distance de la tumeur ou dans les tissus cérébelleux de contrôle. Ce signal est également détecté dans la couche granulaire localisée proche des métastases mais pas à distance.

Dans les médulloblastomes, les noyaux isolés exprimant EN-2 peuvent être détectés dans de larges aires exprimant également PAX-6. Grâce aux coupes sériées, on peut noter l'existence d'une correspondance avec les grains, dont les noyaux sont bien reconnaissables par leur chromatine fine centrée par un petit nucléole entouré par un fin marquage, avec la synaptophysine. Le même signal nucléaire intense est retrouvé dans l'album cérébelleux ou dans la substance blanche cérébrale envahie par les tumeurs du compartiment supratentorial. Ces noyaux correspondent à des astrocytes réactionnels (4 tumeurs) ou à des oligodendrocytes (14 tumeurs).

- Un fort signal cytoplasmique (S-CS pour strong cytoplasmic signal) est également observé dans 23 tumeurs au sein de différentes cellules ou formation cellulaire. On peut observer ce signal dans les cellules de Purkinje (24 tumeurs) lorsque celles-ci sont situées à proximité du processus tumoral. Par contre ce signal n'est jamais noté à distance des tumeurs. On peut également observer ce même signal dans les astrocytes réactionnels (4 tumeurs), et dans le centre fibrillaire des rosettes d'Homer Wright.

- Le dernier signal EN-2 est un signal nucléaire très faible (W-NS pour weak nucleus signal). Ce faible signal est détecté dans les cellules tumorales de 30 médulloblastomes et 8 PNETs, et s'avère d'une analyse difficile en comparaison avec le

signal nucléaire intense observé dans les noyaux des grains. On peut l'observer dans les plages claires différenciées, de manière diffuse.

Comme précédemment pour PAX-6, l'expression d'EN-2 n'est pas retrouvée dans le tissu sain situé à distance de la tumeur.

2.3.3. Relation entre PAX-6 et EN-2

2.3.3.1. PAX-6 et EN-2 positifs

Vingt sept tumeurs (dont 3 PNETs) présentent un marquage de PAX-6 et de EN-2 (33,75 %). Parmi celles-ci, 13 patients vont bien avec un recul allant de presque 4 ans à presque 7 ans, 2 ont présenté une rechute. En ce qui concerne les 14 ayant conduit au décès (51,85 %), 9 ont récidivés, 2 sont non déterminées, pour les 3 dernières un patient est décédé au bout de 6 jours, un autre au bout de 3 mois à la suite d'un coma aréactif et le dernier est la deuxième récurrence d'un médulloblastome (n° 97-59). Dix sept tumeurs appartiennent à des enfants dont 11 sont décédés (64,70 %) et 10 appartiennent à des adultes dont 3 sont décédés (30 %).

Une expression de plus de 50 % de PAX-6 est observée dans 8 tumeurs, 4 enfants et 4 adultes présentent également un marquage avec Engrailed-2 dans la tumeur dont 3 avec un grand nombre de noyaux marqués (n° 95-19, 97-527 et 97-721). A l'opposé, 7 tumeurs montrent un marquage de moins de 5 %.

De façon intéressante, l'expression de EN-2 et de PAX-6 ne semble jamais être observée dans les mêmes noyaux, seuls quelques noyaux exprimant PAX-6 ont montré une expression nucléaire tumorale de EN-2 dans les mêmes plages. Dans ces 6 tumeurs, l'expression de PAX-6 a été observée dans les mêmes aires que EN-2, néanmoins une forte co-expression de PAX-6 et EN-2 (de type S-NS) n'a jamais été trouvée sur des coupes sériées, seuls des noyaux entremêlés avec un faible signal EN-2 (W-NS) ont pu être observés. Habituellement PAX-6 est retrouvé à distance de EN-2.

La moitié de ces tumeurs, exprimant PAX-6 et EN-2, ne présentent pas de différenciations annexes si l'on excepte la NSE qui ne semble pas très spécifique, 3 montrent un marquage avec l'antigène S.

2.3.3.2. PAX-6 et EN-2 négatifs

Vingt et une tumeurs (dont 4 PNETs) ne présentent aucun marquage ni avec PAX-6 ni avec EN-2 (26,25 %). Parmi celles-ci, 7 patients vont bien avec un recul de 4 à plus de 6 ans, une seule tumeur a récidivé. Pour les 14 patients qui sont décédés (66,7 %), ces tumeurs correspondent à 17 enfants dont 12 sont décédés (70,6 %) et 4 adultes dont 2 sont décédés. Parmi ces tumeurs, on constate que 8 d'entre elles présentent un marquage

comportant entre autres l'anticorps anti-GFAP et l'anticorps anti-S100, 4 présentent un marquage avec l'antigène S (dont 2 sans la GFAP). Les autres présentent peu ou pas de différenciation décelable avec la batterie d'anticorps employés.

En résumé, PAX-6 a toujours été détecté dans les noyaux de cellules totalement indifférenciées et n'a jamais été observé dans les noyaux des cellules présentant une différenciation. EN-2 marque préférentiellement des cellules en voie de différenciation ou des cellules différenciées activées ou stimulées comme les grains, les astrocytes réactionnels ou les cellules de Purkinje situées au contact du processus tumoral.

III. WESTERN BLOT

Les différents sérums détectant les protéines PAX-6 ont été étudiés dans 6 tumeurs, 2 négatives (n° 94-669 et 95-284) et 4 positives (n° 94-670, 94-671, 94-674 et 95-196). Cette expérimentation s'est réalisée en aveugle. Une confrontation des résultats entre les deux techniques a montré que les tumeurs présentant une positivité avec les différentes protéines PAX-6 en immunohistochimie ont également montré la présence des différentes protéines PAX-6 en western blot (Article I). Il en est de même pour les tumeurs négatives en immunohistochimie, aucune bande n'a été observée en western blot. En western blot, les protéines p46 et p48, qui sont les protéines les plus abondantes retrouvées chez la souris ainsi que la protéine p43 qui est mineure, ont été observées, de même que la protéine p33/32 qui a une localisation plus cytoplasmique. Une de nos tumeurs a montré la présence du promoteur P0 de PAX-6 chez l'homme (n° 97-484).

IV. CORRELATIONS ENTRE LES DIFFERENTS RESULTATS

Après ces premières constatations, les données entre tous les anticorps et la survie peuvent être analysées. Tous les résultats nous apparaissant apporter des données dans la compréhension de ces tumeurs seront décrits. Malheureusement peu de résultats statistiquement significatifs ont pu être obtenu, et ce malgré les différents recouplements effectués.

4.1. PAX-6, EN-2 comparés aux différenciations dans la tumeur

Les histogrammes (Figures 16 et 17) représentent l'expression des anticorps de routine en fonction de l'expression ou non de PAX-6 et EN-2 pour l'ensemble des tumeurs, puis les tumeurs des adultes et les tumeurs des enfants.

4.1.1. PAX-6

On note une association entre l'absence de PAX-6 et la présence de GFAP, signature de cellules gliales. Chez les enfants, 11 tumeurs sur 15 positives avec la GFAP sont négatives pour PAX-6, soit 26 % seulement de tumeurs positives pour la GFAP et PAX-6. Par contre, lorsque la tumeur est positive pour l'énolase spécifique des neurones (NSE), PAX-6 est nettement plus représenté (47 %). Chez les adultes, 50 % des tumeurs GFAP positives sont PAX-6 positives, mais 66 % des tumeurs positives pour la NSE sont également positives pour PAX-6. Ces résultats sont en accord avec les observations de Heins *et al.* (2002) montrant que PAX-6 est important pour la différenciation neuronale et que ce gène est capable de reprogrammer des astrocytes vers la voie neuronale. Il n'a pas été mis en évidence de différence notable avec les autres anticorps, le nombre de tumeurs marquées est quasiment identique que PAX-6 soit positif ou négatif.

De façon intéressante, chez les adultes, il n'a pas été noté de marquage avec les anticorps NF et Ag S, par contre les associations entre les anticorps de différenciation avec PAX-6 positif ou négatif correspondent à celles observées chez les enfants.

4.1.2. EN-2

Dans l'ensemble de toutes les tumeurs, le marquage nucléaire des cellules tumorales observé avec EN-2 est légèrement plus positif dans les tumeurs négatives avec la synaptophysine (17 pour 11) et avec la chromogranine (16 pour 11).

Chez les enfants, on ne constate pas de différences notables entre la répartition du nombre des tumeurs avec EN-2 positif ou négatif dans les noyaux des cellules tumorales.

Pour les adultes, on note un léger écart pour la synaptophysine lorsque EN-2 est négatif (6 pour 2).

4.2. Survie, PAX-6, EN-2

4.2.1. Survie

Les différents tests statistiques effectués en fonction de la survie n'ont pas donné de résultats significatifs, la raison se situe dans le taux élevé de décès observés au cours des deux premières années après l'intervention. Néanmoins quelques constatations peuvent être notées, ainsi :

- plus le patient est jeune et plus le pronostic vital est mauvais, cette tendance devient significative après la deuxième année d'intervention comme le montre la figure 12.

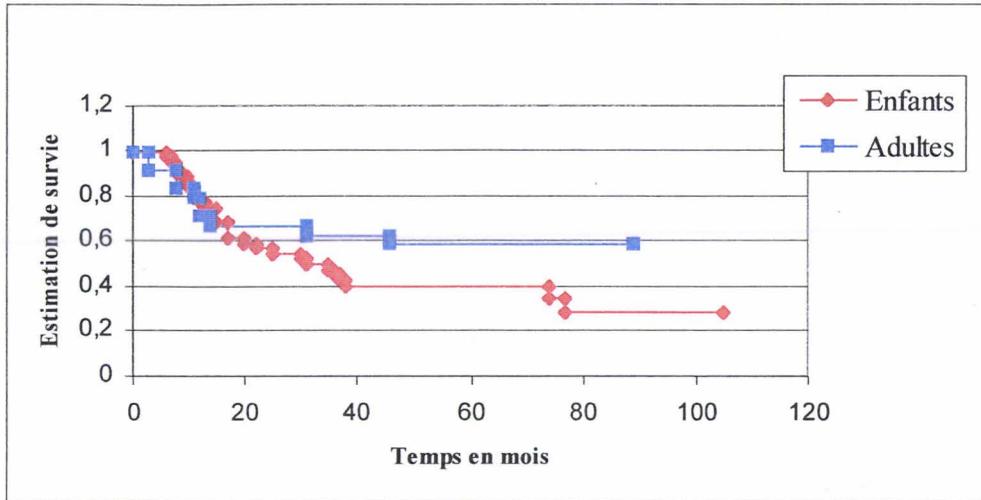


Figure 12 : Survie des patients en fonction de l'âge.

- on ne note pas de différence entre les enfants et les adultes au cours de la première année.

- la survie de l'ensemble des tumeurs n'est pas affectée par l'expression de EN-2.

- par contre, il semble que la survie est meilleure lorsque PAX-6 est exprimé (Figure 13).

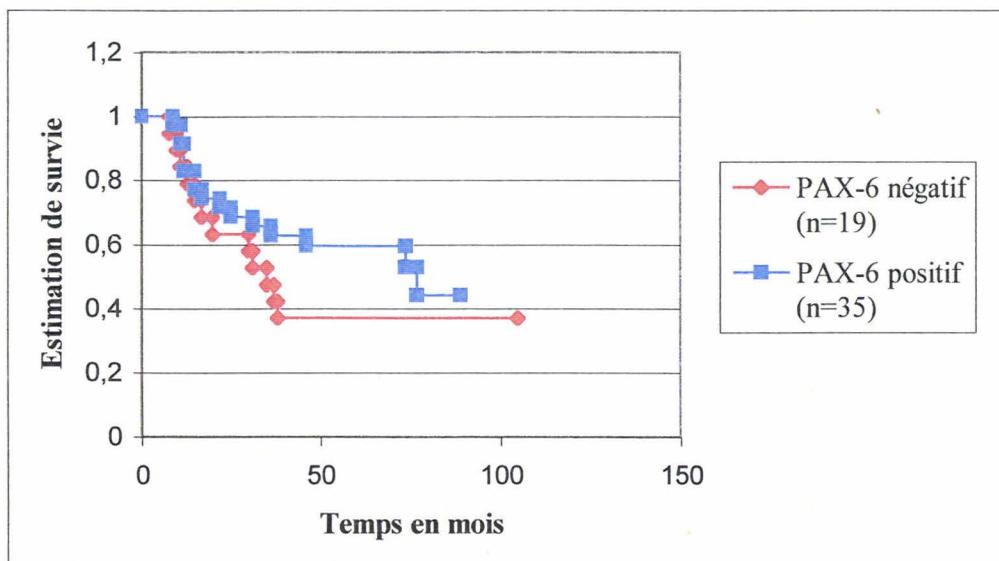


Figure 13 : Survie des patients en fonction de l'expression de PAX-6 (n=54).

4.2.2. Les enfants

Vingt huit tumeurs (53,84 %) sont négatives avec EN-2. Dans ces tumeurs, un fort pourcentage (75 %) de décès est observé (soit 21) avec une survie allant de 7 à 77 mois (moyenne de 24 mois). Vingt quatre tumeurs sont positives avec EN-2. On y note 16 décès (66,6 %) avec une survie allant de 6 à 74 mois (moyenne de 20 mois).

Concernant le marquage avec PAX-6, 25 tumeurs sont négatives. Parmi elles 18 ont entraîné un décès (soit 72 %) avec une survie de 6 à 38 mois (moyenne de 20 mois). Vingt sept tumeurs sont positives. Dix neuf décès sont notés (72 %) avec une survie allant de 6 à 38 mois (moyenne de 20 mois).

4.2.3. Les adultes

Concernant le marquage avec EN-2, 14 tumeurs sont négatives (50 %). Parmi elles, on observe 7 décès (soit 50 %) avec une survie allant de 8 à 31 mois (moyenne de 14 mois). Quatorze sont positives avec EN-2. Six décès (42,85 %) sont notés avec une survie moyenne de 24 mois.

Concernant le marquage avec PAX-6, 8 tumeurs sont négatives. Parmi elles, on observe 5 décès (soit 62,5 %) avec une survie moyenne de 12 mois. Vingt tumeurs sont positives, parmi elles on observe 8 décès (40 %) avec une survie allant de 6 jours à 46 mois (moyenne de 17 mois).

V. QUELQUES MEDULLOBLASTOMES PARTICULIERS

5.1. Médulloblastome à grandes cellules

Ce cas concerne une jeune fille de 12 ans (n° 95-284) admise à l'hôpital pour des symptômes d'hypertension intracrânienne ainsi que des maux de tête apparus depuis 15 jours, avec des vomissements depuis 48 heures. L'IRM a révélé une lésion de 3,5 cm occupant le quatrième ventricule et le vermis. Une résection totale est réalisée, confirmée par l'IRM. Le LCR comportait des cellules anormales. Au cours de la chimiothérapie, deux mois après l'intervention une radiothérapie du névraxe a été décidée étant donné l'existence d'une dissémination dans le LCR. Malgré ce, le décès est survenu 6 mois après l'intervention chirurgicale.

En histologie, cette tumeur présente un aspect diphasique. La composante majoritaire consiste en de larges cellules avec des noyaux vésiculaires larges et ronds, les cytoplasmes sont éosinophiles et peuvent contenir des inclusions hyalines. La deuxième composante cellulaire est formée de plages denses de petites cellules très anaplasiques rondes ou ovales

à noyaux hyperchromatiques. De larges foyers de nécrose sont observés. La morphologie des cellules pouvait faire évoquer les diagnostics de tumeur tératoïde-rhabdoïde ou de médulloblastome à grandes cellules et ce malgré l'âge de la patiente.

En immunohistochimie, la synaptophysine et la chromogranine ont été détectées dans 98 % des petites cellules comme des grandes cellules possédant un volumineux cytoplasme. La vimentine n'a été observée que dans les vaisseaux. L'EMA (antigène épithélial membranaire) n'a jamais été observée infirmant le diagnostic d'une tumeur de type tératoïde-rhabdoïde. EN-2 est très largement exprimé dans les noyaux des cellules tumorales. PAX-6 n'a jamais été détecté. De façon surprenante 25 % des cellules expriment l'antigène S correspondant à une arrestine. Sur des coupes adjacentes, le marquage par le neurofilament se retrouve au même niveau que le marquage avec l'antigène S. Contrairement à notre attente, la rhodopsine n'a jamais été retrouvée ni en immunohistochimie ni en western blot, alors que celle-ci est habituellement détectée dans les cellules Ag S positives au niveau de la rétine. L'arrestine est une protéine clé de l'interruption de la signalisation par les protéines G. La phosphorylation d'une protéine G couplée au récepteur (la Rhodopsine dans le cas de la rétine) conduit à son interaction avec l'arrestine visuelle et empêche ainsi son interaction activatrice avec la transducine (Molday, 1998). Les vertébrés possèdent deux types d'arrestines, l'arrestine visuelle, exclusivement présente dans les photorécepteurs de la rétine et un certain nombre d'arrestine- β d'expression ubiquistes. Ces deux types d'arrestines dériveraient d'un ancêtre commun (Nakagawa *et al.*, 2002). Une étude RT-PCR a été réalisée afin d'identifier le type d'arrestine exprimé par cette tumeur. Pour cela, quatre primers sont utilisés, β -actine, β 1 et β 2 et l'arrestine visuelle. La RT-PCR confirme la présence du mRNA de la β 1-arrestine et β 2-arrestine, et l'absence du mRNA de l'arrestine visuelle. La β -arrestine joue un rôle dans la désensibilisation du récepteur β 2-adrénergique.

Le caryotype a confirmé la présence d'un isochromosome 17q, marqueur retrouvé dans une grande partie des médulloblastomes (Article II).

En conclusion, cette tumeur est une nouvelle entité de médulloblastome à grandes cellules exprimant une arrestine non visuelle. Cette tumeur observée chez une enfant de 12 ans, âge très inhabituel pour ce type de tumeur, partage néanmoins l'agressivité du médulloblastome à grandes cellules du tout petit.

5.2. PNET multidifférenciée

Ce cas concerne un jeune garçon de 4 ans (n° 96-287) atteint d'une PNET à haut risque localisée dans le vermis et le quatrième ventricule. Il ne présente pas d'antécédent particulier, il est admis à l'hôpital suite à une hypertension intra-cranienne et une ataxie évoluant depuis 15 jours. L'exérèse est sub-totale puisqu'il persiste un reliquat tumoral, sans métastase à distance. Une chimiothérapie "8 en 1" et une radiothérapie de l'axe cérébro-spinal sont réalisées. Au bout de 6 mois, une rechute est constatée avec une dissémination cellulaire dans le LCR confirmée par l'IRM, le décès surviendra 9 mois après l'intervention.

L'histologie montre une tumeur extrêmement polymorphe. Sur certaines aires, elle présente des plages très compactes de petites cellules bleues à noyaux extrêmement irréguliers et hyperchromatiques où l'activité mitotique est marquée (de l'ordre de 30 %). Ces plages sont dissociées par des zones de nécrose et une très nette vascularisation présentant des aspects de prolifération endothéliale relativement marquée et inhabituelle dans un médulloblastome. Elle montre également des zones formées de nodules entourés par une vascularisation abondante, ainsi que des plages beaucoup plus matures avec des noyaux clairs et des cytoplasmes non visibles. En plus, cette tumeur présente des zones formées de groupes de cellules éosinophiles souvent centrées par une structure vasculaire et entourées par des plages claires où l'on peut observer des cellules musculaires allongées à cytoplasmes éosinophiles pouvant présenter également des images de striation. Ces zones peuvent être coalescentes ou au contraire séparées par une prolifération de type médulloblastome.

En immunohistochimie, certains groupes de cellules présentent une positivité avec la NSE. Les zones claires sont parfois nettement marquées par la GFAP et la protéine S100, impliquant une différenciation gliale. Au niveau des cellules claires à noyaux clairs, il existe une légère synaptophysine positive et la chromogranine est retrouvée dans certaines plages, indiquant une différenciation neurosécrétoire. L'antigène S a été noté dans certaines cellules qui réalisent des bandes entravées au sein de cette prolifération tumorale. L'actine (marquant les zones de contraction), la myosine et la desmine sont très nettement observées dans les zones myoblastiques de type squelettique. Des neurones avec leurs projections neurofilamentaires et synaptiques se projetant sur les fibres musculaires ont pu être observés grâce aux neurofilaments. Quelques cellules pouvant former de petits lobules montrent une positivité avec la coloration de Fontana, signant la présence de mélanine. D'autres montrent un marquage avec la cytokératine posant le problème d'une

tumeur rhabdoïde. Les zones totalement indifférenciées présentent une positivité avec PAX-6.

En conclusion, cette tumeur présente des différenciations variées : gliale, musculaire, photoréceptrice, neurosécrétoire et mélanique de grade IV et entre dans le cadre d'une tumeur de type tératoïde-rhabdoïde décrite par le Professeur Lucy Rorke.

5.3. Médulloépithéliome ayant une longue survie

Ce cas concerne un jeune garçon de trois mois (n° 93-457) admis à l'hôpital à la suite de vomissements ayant débutés vingt-quatre heures auparavant. Les fontanelles se sont distendues rapidement et le bébé est entré dans un état sub-comateux. L'IRM a montré une masse lobulée de 6 centimètres au niveau de l'atrium du ventricule latéral droit. Cette masse était fixée sur les plexus choroïdes. La chirurgie a révélé une large tumeur hémorragique sans adhérence épendymaire évoquant un papillome typique en chou-fleur. Malgré la volumineuse taille de la tumeur, une résection complète a été effectuée avec succès. Il est constaté une absence de reliquat tumorale au scanner. Aucune cellule anormale n'a été retrouvée dans le LCR durant les premières quarante huit heures. Aucun traitement complémentaire n'a pu être envisagé du fait du jeune âge de l'enfant et de la nature de la tumeur. L'enfant se porte bien avec un recul de sept ans.

L'histologie montre une tumeur présentant des formations papillaires associées à un épithélium pseudo-stratifié primitif "arrangé" en tubes. Le revêtement des papilles et des tubes est formé par des cellules cylindriques hautes ou cubiques dont les noyaux sont allongés occupant la plus grande partie de la hauteur cytoplasmique. Ces noyaux possèdent une chromatine très fine, légèrement nucléolée. L'activité mitotique est très marquée, les mitoses sont toujours retrouvées au niveau apical de la cellule, c'est-à-dire près des lumières et jamais au niveau de la basale. Ces aspects sont tout à fait inhabituels pour une tumeur papillaire des plexus choroïdes, qu'elle soit bénigne ou maligne, ou d'une tumeur papillaire épendymaire.

La GFAP est présente en foyers au niveau du revêtement de certaines papilles et au niveau de certains nodules entre les cellules. La chromogranine est exclusivement retrouvée au niveau des cellules formant les nodules "neurogliaux" toujours situées sous le revêtement épithélial. Ces cellules chromogranine positive sont relativement nombreuses et témoignent d'une différenciation neuronale. La présence de grains neurosécrétoires n'est pratiquement retrouvée qu'à l'état primitif (embryonnaire) au niveau du parenchyme

cérébral ou dans des tumeurs présentant une neurosécrétion. La cytokératine et l'EMA montrent un marquage apical extrêmement fin du revêtement d'un certain nombre de papilles et de quelques tubes. Elle est également retrouvée au niveau de tout le contour cytoplasmique dans des zones nettement mieux différenciées déjà marquées par la GFAP. Malgré plusieurs essais, PAX-6 et EN-2 n'ont jamais pu être montrés (Article III).

En conclusion il s'agit d'un médulloépithéliome, une tumeur maligne très primitive avec des différenciations neuronales et gliales et vraisemblablement épendymaires et plexuelles.

5.4. Médulloblastomes et Calbindin-D_{28k}

Les protéines fixant le calcium sont impliquées dans la régulation de la prolifération cellulaire, la mort cellulaire programmée et la mobilité. L'expression de la calbindin-D_{28k}, la calretinine, les parvalbumines et différentes protéines S 100 ont été analysée dans une série de nos médulloblastomes. Un groupe de 39 médulloblastomes diffus (numéros en gras dans le tableau 13), tous localisés dans la fosse postérieure, a été testée avec ces diverses protéines. Les médulloblastomes nodulaires, les médulloblastomes à larges cellules et les tumeurs de type térétoïde-rhabdoïde ont été écartés afin de conserver une homogénéité dans le groupe des tumeurs sélectionnées. L'expression de ces protéines a été étudiée dans les cellules tumorales rondes et bleues (caractéristiques du médulloblastome) afin d'évaluer des corrélations éventuelles entre leur niveau d'expression et la présentation clinique ainsi que des marqueurs biologiques en relation avec l'expression des gènes de prolifération, de différenciation et du développement cérébral. Il en résulte que seule la calbindin-D_{28k} a révélée des renseignements intéressants, ce qui fait de cette protéine un nouveau marqueur pour le médulloblastome (Article IV).

En conclusion, les résultats montrent que la positivité de la calbindin-D_{28k}, exclusivement retrouvée chez les patients jeunes (inférieur à 15 ans), est associée avec un mauvais pronostic et un haut risque de récurrence, indépendamment des autres données cliniques et biologiques. De même, le pronostic est meilleur pour les cas présentant une négativité avec la calbindin-D_{28k} lorsque celle-ci est associée à une résection totale. Dans les cas de métastases tumorales, l'absence de l'expression de calbindin-D_{28k} serait corrélée avec un bon pronostic.

Si l'on regarde la survie des patients de la même série que celle étudiée avec la calbindin-D_{28k}, on s'aperçoit que celle-ci est supérieure lorsque PAX-6 est exprimée dans la tumeur (Figure 14). Dans cette série, 19 tumeurs présentent un marquage positif avec PAX-6 et négatif avec la calbindin-D_{28k}, dont 10 ont eu une résection totale. Lorsque la calbindin-D_{28k} est positive, 5 tumeurs ont exprimé PAX-6 et 7 se sont révélées négatives.

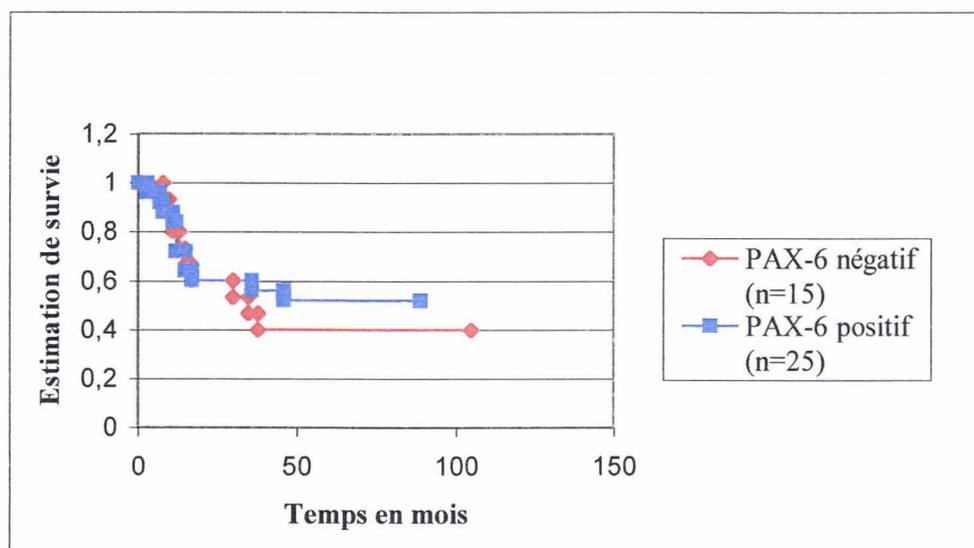


Figure 14 : Survie des patients en fonction de l'expression de PAX-6 (n=40).

VI. RETINOBLASTOMES

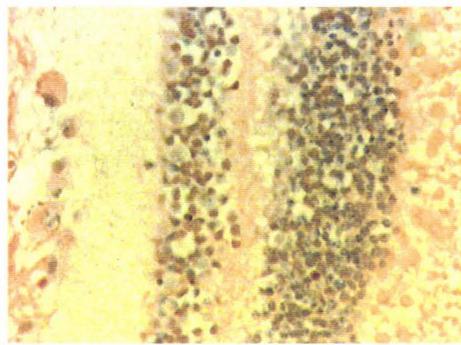
Les différents immunomarquages obtenus sur les 20 rétinoblastomes sont résumés dans le tableau 14. Un marquage différent est détecté en fonction de l'anticorps testé. L'Ag S est toujours observé dans les photorécepteurs de la rétine, il est également retrouvé dans 8 tumeurs (40 %).

Nous avons pu observer dans la rétine résiduelle au contact de certains rétinoblastomes que PAX-6 est exprimé dans la couche granulaire externe au niveau nucléaire, dans la couche granulaire interne au niveau nucléaire et dans le cytoplasme des cellules amacrines. Dans certains rétinoblastomes, ce marquage se situe plutôt proche de la CCG. PAX-6 est également exprimé dans les cellules ganglionnaires au niveau nucléaire et cytoplasmique. EN-2 a une forte positivité au niveau de la CGEr, il est moindre dans la CGIr et on le retrouve surtout au niveau des prolongements cellulaires dans la CCG. MITF est détecté à peu près de la même manière dans la CGEr et la CGIr. Dans la CCG, le cytoplasme des cellules ganglionnaires et quelques noyaux sont observés (Figure 15). Il est à signaler que

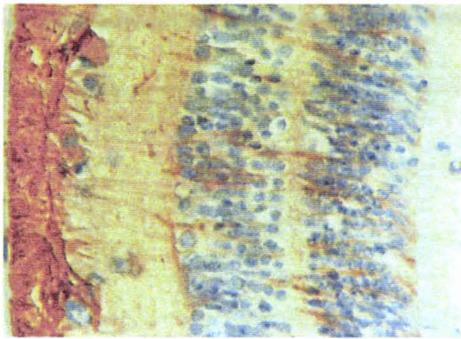
parfois l'interprétation du marquage était délicate du fait de l'envahissement de la rétine par la tumeur mais également de l'altération plus ou moins importante de la rétine.

Au niveau de la tumeur, dans les noyaux, PAX-6, EN-2 sont retrouvés dans 8 rétinoblastomes (40 %) et MITF est présent dans 13 tumeurs (65 %). Les résultats concernant le marquage cytoplasmique et le centre des rosettes, même s'il n'est pas majoritaire, restent difficiles à interpréter.

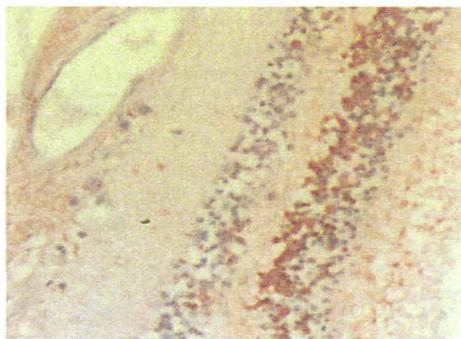
En conclusion, on observe une expression et une localisation différentes dans la rétine résiduelle en fonction de l'anticorps testé. On détecte PAX-6 au niveau de la CGEr et de la CCG, EN-2 surtout au niveau de la CGEr mais aussi de la CGIr et MITF dans la CGEr et la CGIr dans des proportions à peu près équivalentes.



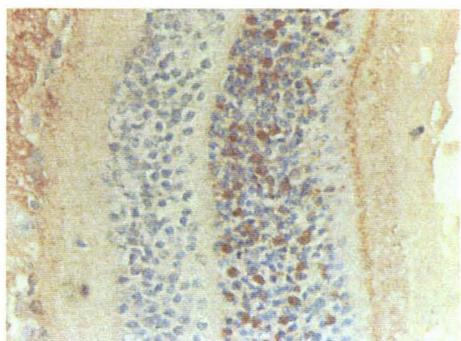
Mitf



GFAP



En-2



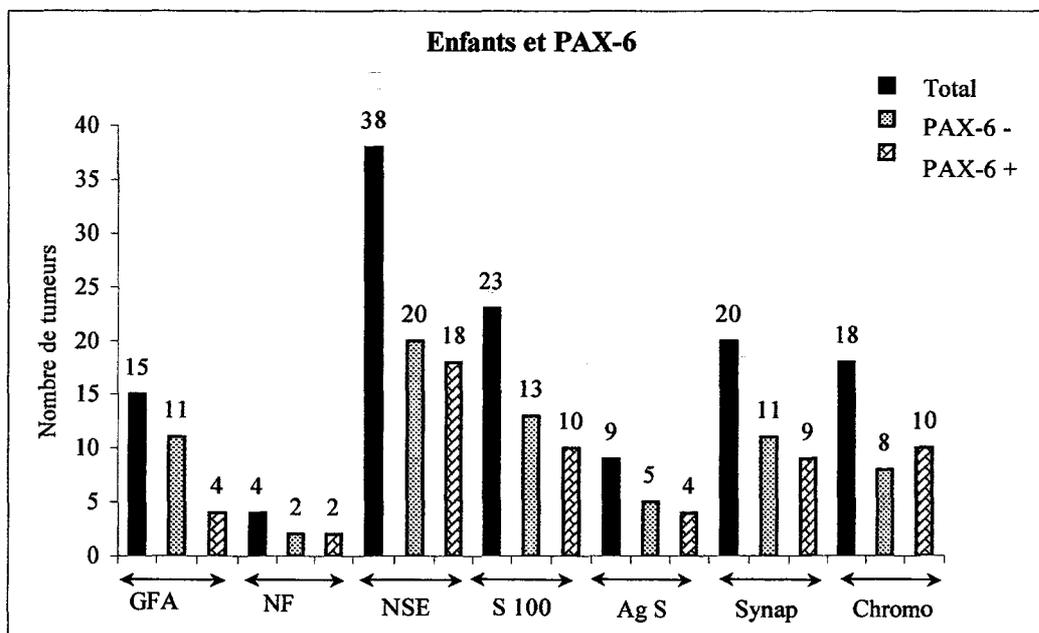
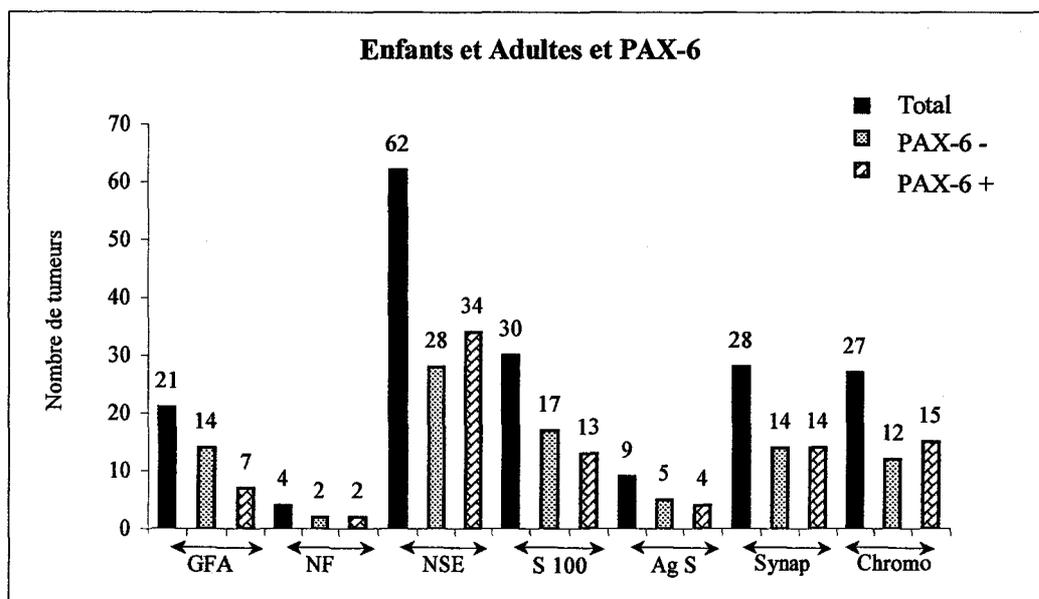
Pax-6

CCG
Pli
CGIr
Ple
CGER
Si
Se

Figure 15 : Expression de PAX-6, EN-2 et MITF dans la rétine des rétinoblastomes (CCG : couche des cellules ganglionnaires, Pli : plexiforme interne, CGIr : couche granulaire interne, Ple : plexiforme externe, CGEr : couche granulaire externe, Si : segment interne, Se : segment externe).

Figure 16 : Différenciations observées dans les tumeurs et PAX-6.

Le total (colonne noire) correspond au nombre de tumeurs marquées par l'anticorps indiqué en ordonné. PAX-6 négatif (-) ou positif (+) dans la tumeur.



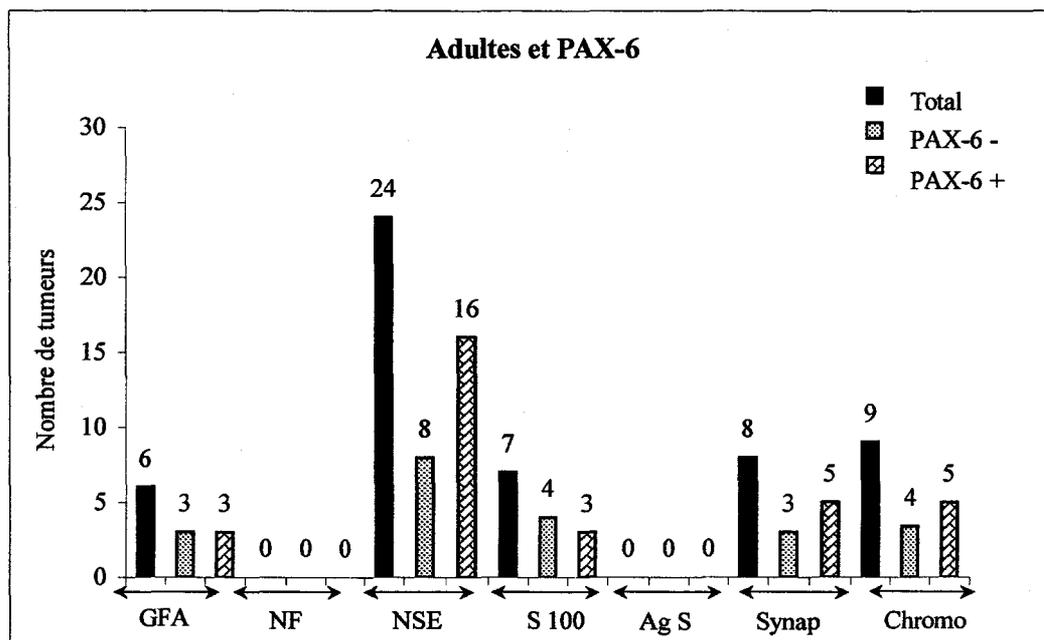
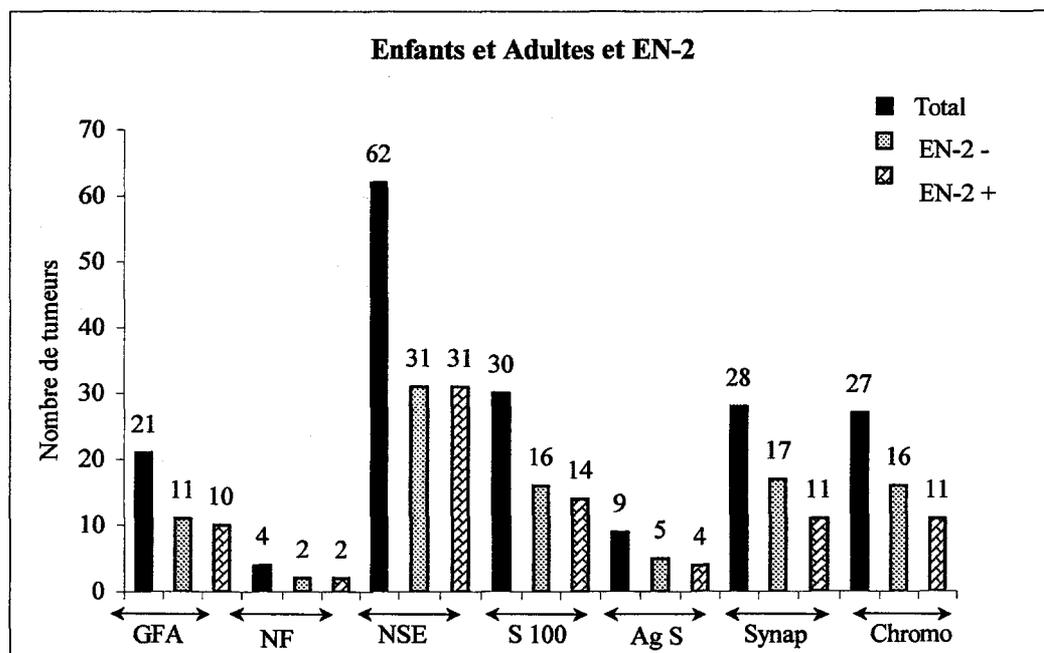


Figure 17 : Différenciations observées dans les tumeurs et EN-2.

Le total (colonne noire) correspond au nombre de tumeurs marquées par l'anticorps indiqué en ordonné. EN-2 négatif (-) ou positif (+) dans la tumeur.



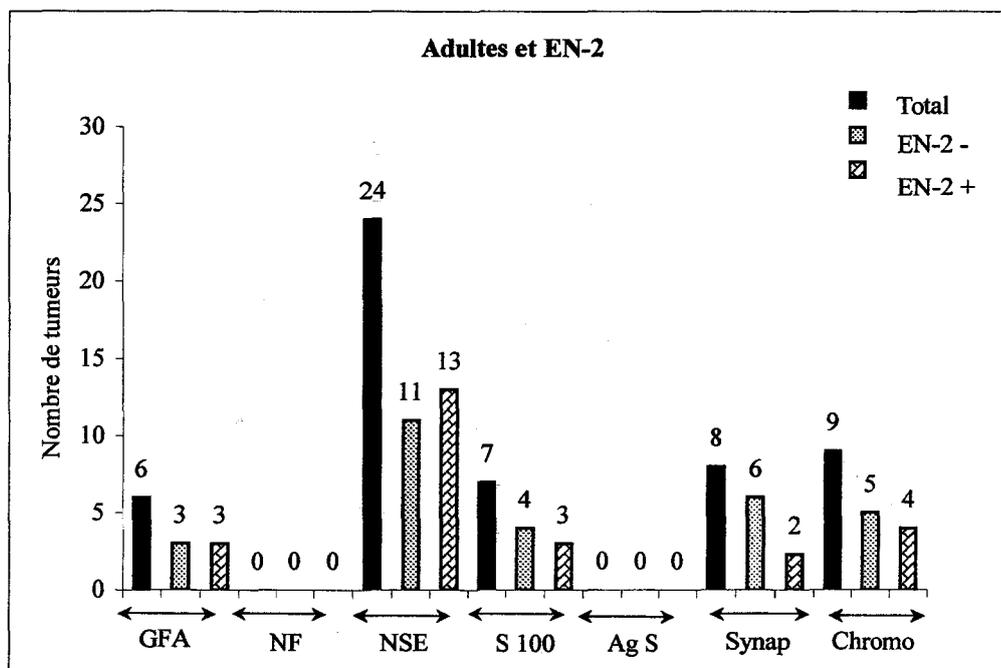
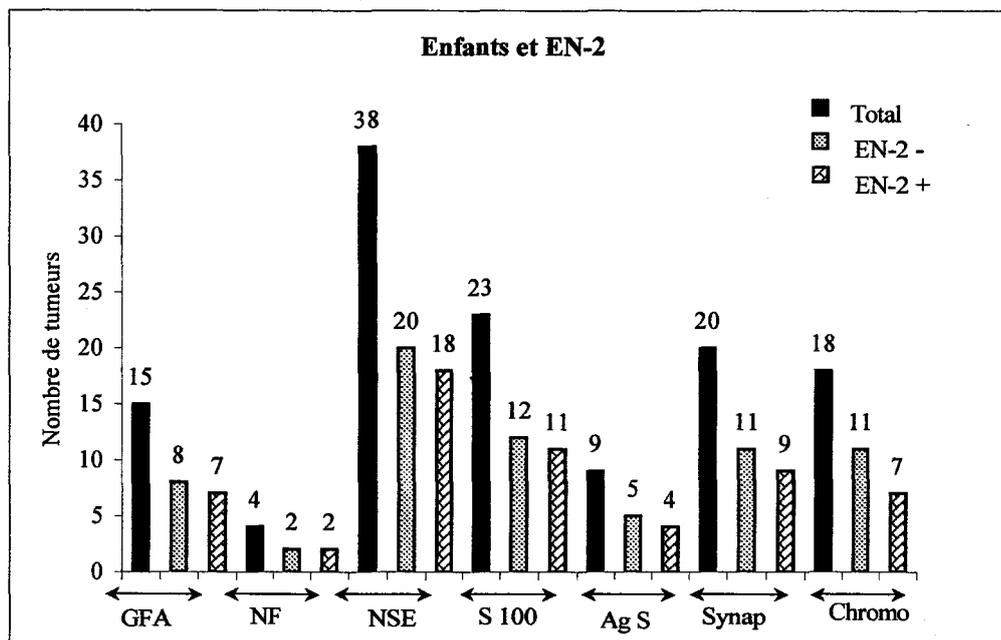


Tableau 14 : Résultats immunohistochimiques des anticorps testés.

N°	Tumeur	Age	Sexe	PAX-6		Mib		EN-2			GFA	NF	NSE	S 100	Ag S	Synap	Chromo	Cyto K	Récidive Rechute	Survie	Suivi			
					%	%	HP	SNS	WNS	CS														
13908	MB	5	M	-	0	15	32	+	*	-	+	-	+	+ A	-	+	+	-	20 M 94-399	31 M	DCD			
13943	PNET	11	F	-	0	12	25	-	*	-	-	+	-	+ A	-	+	-	-	3 sem.	8 M	DCD			
13981	PNET desmo	9	F	-	0	3	6	+	+	+ p	- A	-	+	+	+	+	-	-	aucune	105 M	VB			
14022	MB desmo	18	M	D	7	5	16	+	-	+	+ A	-	+	- A	-	-	-	-	ND	12 M	DCD			
93-28	MB hr	7	M	-	0	2	4	+	-	+	+ A	- N	+	+ AN	+	+	+	-	34 M dorsale	38 M	DCD			
93-35	MB	7	M	-	0	20	30	-	-	-	+ A	- N	+	+ AN	-	-	-	-	ND	ND	DCD			
93-92	MB	10	M	-	0	5	36	-	*	+	-	+	-	+ A	- N	++	+ AN	-	+	-	-	18 M	30 M	DCD
93-207	MB hr	7	F	-	0	12	48	-	-	-	+ A	- N	-	+ A	+	-	+	-	14 M métastases	15 M	DCD			
93-286	MB	6	F	SN	5	4	8	-	-	-	- A	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	DCD			
93-308	MB hr desmo	6	M	-	0	30	42	+	+	+	- A	- N	+	- AN	-	-	-	-	9 M méningite	17 M	DCD			
93-357	MB br	12	F	SN	13	12	34	+	-	+	- A	-	-	+ A	-	-	+	-	9 M méningite	15 M	DCD			
93-609	MB hr	6	M	D	45	5	28	-	+	-	- A	-	+	- A	-	-	-	-	15 M métastases	22 M	DCD			
93-706	MB	8	M	SN	5	20	22	-	-	+	- A	-	+	- A	-	-	-	- pc	32 M métastases	77 M	DCD			

N°	Tumeur	Age	Sexe	PAX-6		Mib		EN-2			GFA	NF	NSE	S 100	Ag S	Synap	Chromo	Cyto K	Récidive Rechute	Survie	Suivi
					%	%	HP	SNS	WNS	CS											
94-28	MB	40	F	-	0	2	2	-	+	+	+ A	- N	+	+ AN	-	-	-	-	5 M 94-235	ND	DCD
94-165	MB f	22	M	D	85	40	52	-	-	-	- A	-	+	+ A	-	-	-	-	4 M	8 M	DCD
94-194	MB hr	5	M	LN	5	23	38	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	10 M métastases	11 M	DCD
94-198	MB br	22	F	LN	65	25	82	-	-	-	-	-	+	-	-	+	++	-	aucune	89 M	VB
94-235	MB	40	F	-	0	28	78	+	+	+	- A	-	+ A	++	-	-	+	-	5 M	ND	DCD
94-247	MB	14	F	-	0	3	10	- *	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	ND	ND	DCD
94-262	MB br	5	F	D	55	32	36	+	+	-	- A	-	-	- A	-	-	-	-	22 M métastases	74 M	DCD
94-345	MB	6	M	D	18	15	22	+	-	+	- A	-	+	- A	-	-	-	-	ND	ND	DCD
94-399	MB	7	M	D	42	40	48	-	-	+ A	+ A	- N	++	+ AN	-	+	+	-	aucune	31 M	DCD
94-420	PNET	53	M	-	0	20	48	- *	+	+	+ A	- N	++	+ A	-	-	-	-	aucune	ND	DCD
94-601	PNET	31	M	-	0	27	29	- *	-	+	+ A	- N	+	+ A	-	+	+	-	10 M	14 M	DCD
94-669	MB br	6	M	-	0	55	72	+	-	+ p	+ A	- N	+	+ AN	-	-	-	-	aucune	81 M	VB
94-670	MB hr	11	M	LN	37	15	26	+	+	-	- A	-	+	- A	-	-	-	- pc	aucune	81 M	VB
94-671	MB	4	M	SN	80	10	38	+	-	+	- A	-	+	- A	++	+	-	-	aucune	17 M	DCD

N°	Tumeur	Age	Sexe	PAX-6		Mib		EN-2			GFA	NF	NSE	S 100	Ag S	Synap	Chromo	Cyto K	Récidive Rechute	Survie	Suivi
					%	%	HP	SNS	WNS	CS											
94-674	MB hr diffus	8	M	SN	5	50	58	+	+	+p	-A	-N	+	+AN	-	-	-	-	aucune	81 M	VB
94-721	MB diffus	13	F	LN	65	20	46	+	+	+p	+A	-	+	+A	-	-	+	-	8 M	12 M	DCD
94-735	MB hr	28	F	D	48	4	21	+	-	+p	+A	-	+	+A	-	+	-	-	aucune	80 M	VB
95-19	MB hr	15	M	LN	55	30	50	-*	++	-	-	-	+	-	-	-	-	-	14 M métastases	80 M	VB
95-64	MB diffus	9	F	-	0	15	18	+	+	+p	+A	-	+	+A	-	-	-	-	6 M métastases	13 M	DCD
95-75	MB diffus	54	F	D	60	10	16	+	-	+p	-A	-N	+	+AN	-	-	-	-	aucune	79 M	VB
95-130	MB hr desmo	21	F	LN	70	5	32	+	-	+p	-A	-N	-	-AN	-	-	-	-	3 M méta spinal	8 M	DCD
95-196	MB diffus	13	F	LN	65	43	70	+	+	+p	-A	-N	+	-AN	-	-	-	-	11 M 96-140	15 M	DCD
95-284	MB br diffus	12	F	-	0	7	28	+	-	+p	-A	++N	+	-A	++	+	+	-	6 M méningite	8 M	DCD
95-310	PNET	1	M	SN	40	25	42	-	-	-	-A	-N	+	-A	-	-	-	-	5 M 95-642	10 M	DCD
95-343	MB desmo	2	M	SN	8	22	34	+	+	+	-A	-	++	-A	+	+	+	-pc	15 M métastases	36 M	DCD
95-380	MB f hr	33	F	D	75	35	47	-	+	+	-A	-	++	-A	-	-	-	-	aucune	74 M	VB
95-388	MB	24	M	SN	42	23	39	+	+	+p	-A	-N	++	-AN	-	-	-	-	aucune	74 M	VB
95-678	MB	13	M	D	42	15	43	+	++	+p	-A	-N	+	+AN	+	-	-	-	aucune	69 M	VB

N°	Tumeur	Age	Sexe	PAX-6		Mib		EN-2			GFA	NF	NSE	S 100	Ag S	Synap	Chromo	Cyto K	Récidive Rechute	Survie	Suivi
					%	%	HP	SNS	WNS	CS											
95-714	PNET	7	F	-	0	5	28	-*	-	-	-A	-N	+	-AN	-	-	-	-	aucune	68 M	VB
95-720	MB	2	M	LN	7	41	86	+	-	-	-A	-N	-	-	-	-	-	-	5 M métastases	7 M	DCD
95-721	MB	35	F	LN	77	58	62	+	++	+	-A	-	+	-A	-	-	-	-	29 M métastases	46 M	DCD
96-17	PNET	5	F	D	20	5	24	-*	+	-	-A	-N	-	-AN	-	-	-	-	9 M 96-614	17 M	DCD
96-94	MB desmo	32	M	-	0	10	38	+	-	-	-A	-	+	-A	-	-	-	-	aucune	67 M	VB
96-140	MB	14	F	-	0	28	48	+	-	+p	-A	-N	+	-AN	-	+	+	-	aucune	15 M	DCD
96-222	MB	5	F	D	2	2	10	+	+	+p	-A	-	-	-A	-	-	-	-	ND	ND	DCD
96-233	MB	19	F	-	0	2	10	+	-	+p	-A	-N	+	-AN	-	+	+	-pc	10 M métastases	11 M	DCD
96-287	PNET hr	4	M	D	4	5	52	-*	++	-	-A	++N	++	+AN	++	++	++	++	6 M	9 M	DCD
96-314	MB	10	F	D	2	18	44	+	-	+	-A	+N	++	-A	-	+	+	-	aucune	63 M	VB
96-344	MB hr	9	F	-	0	9	28	+	-	-	-A	-N	+	+A	-	++	++	-pc	aucune	10 M	DCD
96-375	MB br	23	M	LN	25	10	25	+	++	-	+A	-	+	-A	-	-	-	-	55 M métastases	62 M	VB
96-379	MB hr	9	F	-	0	12	38	-*	-	+	-A	-N	+	-AN	+	-	-	-	9 M	35 M	DCD
96-538	MB f br	22	F	LN	70	25	30	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	aucune	59 M	VB

N°	Tumeur	Age	Sexe	PAX-6		Mib		EN-2			GFA	NF	NSE	S 100	Ag S	Synap	Chromo	Cyto K	Récidive Rechute	Survie	Suivi
					%	%	HP	SNS	WNS	CS											
96-614	PNET hr	5	F	SN	60	75	90	-	+	+	-A	-	-	-A	-	-	-	-	3 M 97-59	17 M	DCD
96-640	MB hr	33	M	D	1	18	29	-	+ peu	-	-A	-	+	-A	-	-	-	-	aucune	58 M	VB
96-666	PNET	5	M	-	0	2	14	-*	-	+	-A	-N	-	-AN	-	-	-	-	aucune	57 M	VB
96-714	MB hr	25	M	-	0	14	27	-*	-	-	-A	-	+	-A	-	-	-	-	aucune	56 M	VB
97-59	PNET hr	6	F	D	3	65	96	-	+	+	-A	-N	-	-AN	-	-	-	-	aucune	17 M	DCD
97-66	MB hr	38	M	SN	65	36	40	+	-	+p	-A	-N	-	-AN	-	-	+	-	aucune	55 M	VB
97-174	MB f hr	1	F	D	15	20	22	+	+	-	-A	-	+	+	-	+	+	-	aucune	53 M	VB
97-213	MB hr desmo	9	F	-	0	8	16	++	-	+	+A	-	++	+A	-	+	+	-	42 M métastases	52 M	VB
97-399	MB hr	16	M	D	16	15	32	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11 M métastases	12 M	DCD
97-410	MB	2	M	D	1	6	20	+	+	+p	-A	-N	-	+A	-	-	+	-	ND	25 M	DCD
97-449	MB br	42	M	D	8	4	23	+	-	+p	-A	-N	+	-AN	-	+	+	-	37 M métastases	48 M	VB
97-472	MB br	19	M	-	0	13	26	+	+	+p	-A	-N	++	-AN	-	++	+	-pc	aucune	48 M	VB
97-484	MB	4	M	-	0	2	5	-	-	-	-A	-	-	-A	-	-	-	-	8 M	20 M	DCD
97-496	MB	18	F	D	15	24	48	+	-	+p	-A	-N	+	-AN	-	+	-	-	aucune	31 M	DCD

N°	Tumeur	Age	Sexe	PAX-6		Mib		EN-2			GFA	NF	NSE	S 100	Ag S	Synap	Chromo	Cyto K	Récidive Rechute	Survie	Suivi
					%	%	HP	SNS	WNS	CS											
97-505	MB hr	37	M	D	38	16	33	+	++	+ p	- A	- N	++	- AN	-	-	-	-	aucune	3 M	DCD
97-527	MB f br	8	M	LN	85	10	18	-	++	-	++ A	-	+	- A	-	+	-	-	aucune	47 M	VB
97-567	MB br	25	F	D	12	30	47	-	++	-	- A	- N	++	- A	-	-	++	-	aucune	46 M	VB
97-580	MB desmo	7	M	-	0	3	18	+	-	-	- A	- N	+	- A	-	-	-	-	24 M métastases	37 M	DCD
97-606	MB	14	M	-	0	6	10	+	-	+ p	- A	- N	++	-	-	-	-	-	aucune	46 M	VB
97-652	MB	6	M	D	42	2	25	-	++	+ A	++ A	- N	++	+ A	-	-	+	-	aucune	45 M	VB
98-65	MB hr de, f	22	M	D	30	25	52	+	+	+ p	- A	- N	+	- A	-	++	+	-	aucune	6 jours	DCD
98-149	PNET	1	M	-	0	80	82	-	+	+	+ A	+ N	+	+ A	-	+	+	-	1 M	6 M	DCD
98-208	MB	4 M	F	D	16	25	70	-	-	+ A	- A	-	+	+ A	-	+	+	-	8 M	11 M	DCD
98-541	PNET	13	F	-	0	5	12	-	+	+ A	+ A	- N	-	- A	-	+	-	-	33 M métastases	34 M	VB
98-707	MB	8	F	D	4	80	83	+	-	+ p	- A	- N	-	- A	-	-	-	-	aucune	33 M	VB

Légende : Tumeur : MB (médulloblastome), PNET (primitive neuro-ectodermal tumor), de (desmoplasique), f (file indienne), di (diffus), n (nodule), br (bas risque), hr (haut risque) ; PAX-6 : - (pas de signal), SN (petits nodules), LN (larges nodules ou aires), D (signal diffus) ; EN-2 : * (noyaux oligo-like ou noyaux neuron-like), SNS (strong = fort signal nucléaire dans les cellules granulaires), WNS (weak = faible signal nucléaire dans les cellules tumorales), SCS (strong = fort signal cytoplasmique), p (cellules de Purkinje) ; A (astrocytes réactionnels), N (neurones), VB (va bien), DCD (décédé).

Tableau 15 : Résultats immunohistochimiques de 20 rétinoblastomes.

N°	AgS		PAX-6						EN-2						MITF				
	Rétine	Tumeur	Rétine			Tumeur			Rétine			Tumeur			Rétine			Tumeur	
	PhotoR	cyto	CGEr	CGIr	CCG	nx	cr	cyto	CGEr	CGIr	CCG	nx	cr	cyto	CGEr	CGIr	CCG	nx	cr
381094	1	0	2	qq, cyto a	nx, g	1	1	0	2	qq	p	1	1	0	2	2	g	1	1
381174	1	0	2	qq	g	2	1	0	2	1	g	1	1	0	1	0	0	1	1
382318	1	0	qq	qq, cyto a	g	0	0	0	2	1	p	0	1	0	qq	1	0	0	0
382718	1	0	qq	cyto a	g	2	0	0	2	qq	p	1	0	0	1	qq	g	1	0
382768	1	1	1	0	g	1	1	0	1	qq	0	0	0	1	qq	0	g	0	0
382797	1	0	qq	0	0	0	0	0	2	1	g	0	1	0	1	1	0	2	0
382942	1	2	1	1	0	1	0	0	2	1	0	0	0	1	2	1	0	2	0
383277	1	2	1	qq	g	0	0	0	1	qq	0	0	0	0	1	1	g	1	1
383566	1	1	1	1	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	1	1	g	1	1
383689	1	0	qq	qq	g	0	0	0	1	0	p	0	0	0	1	1	g	0	0
384179	1	0	2	2, cyto a	nx, g	1	0	0	2	1	p	0	1	0	1	1	g	0	0
384798	1	0	qq	1	nx, g	0	0	0	2	1	p	1	0	0	1	1	nx, g	1	0
385187	1	0	1	qq	g	0	0	0	1	0	p	0	1	0	qq	qq	g	0	1
385409	1	0	0	qq	nx, g	0	0	0	2	0	p	1	0	0	1	1	g	1	1
385539	1	1	1	qq	nx	1	0	0	1	qq	p	1	1	0	1	1	nx, g	1	1
386189	1	1	2	1, cyto a	g	0	0	0	2	1	p	0	0	0	1	1	g	0	0
386853	1	0	1	qq, cyto a	g	0	0	0	2	1	p	0	0	0	1	1	g	1	0
387428	1	1	1	1	0	0	0	0	2	qq	p	1	1	0	qq	qq	g	0	0
387467	1	0	1	1, cyto a	g	0	0	0	2	qq	p	0	0	0	qq	qq	g	1	0
387961	1	2	1	qq, cyto a	g	1	0	0	1	0	p	1	0	0	1	1	g	1	0

Légende : PhotoR : photorécepteur, CGEr : couche granulaire externe, CGIr : couche granulaire interne, CCG : couche ganglionnaire, nx : noyaux, cr : centre des rosettes, cyto : cytoplasme, a : cellules amacrines, qq : quelques noyaux, g : marquage granulaire dans le cytoplasme, p : marquage des prolongements, o : aucun marquage, 1 : marquage entre 5 et 50 % des noyaux, 2 : marquage des noyaux supérieur à 50 %.

ARTICLES

Article I :

Differential expression between PAX-6 and EN proteins in medulloblastoma.

Vincent S, Turque N, Plaza S, Dhellemmes P, Hladky JP, Assaker R, Ruchoux MM and Saule S.

Article II :

Large-cell medulloblastoma with arrestin-like protein expression.

Vincent S, Mirshari M, Nicolas C, Adenis C, Dhellemmes P, Soto-Ares G, Maurage CA, Baranzelli MC, Giangaspero F and Ruchoux MM.

Article III :

Intracerebral medulloepithelioma with a long survival.

Vincent S, Dhellemmes P, Maurage CA, Soto-Ares G, Hassoun J and Ruchoux MM.

Article IV :

Calbindin-D_{28k} A marker of recurrence for medulloblastomas.

Pelc K, Vincent S, Ruchoux MM, Kiss R, Pochet R, Sariban E, Decaestecker C and Heizmann CW.

Differential expression between PAX-6 and EN proteins in medulloblastoma

SYLVIE VINCENT¹, NATHALIE TURQUE², SERGE PLAZA², PATRICK DHELLEMMES³,
JEAN PIERRE HLADKY³, RICHARD ASSAKER³, MARIE MAGDELEINE RUCHOUX¹ and SIMON SAULE²

Departments of ¹Neuropathology and ³Neurosurgery, CHRU, Bd J. Leclercq, 59037 Lille Cedex;

²Laboratoire de Différenciation Cellulaire et Moléculaire, CNRS EP56, Institut Pasteur de Lille,

1 Rue Calmette, 59019 Lille Cedex, France

Received February 27, 1996; Accepted March 12, 1996

Abstract. A collection of 28 medulloblastomas was analyzed for expression of the developmental control genes PAX-6 and EN by immunohistochemical staining. Sixteen medulloblastomas expressed both EN and PAX-6 but, when differentiation could be assessed in the positive areas, PAX-6 is expressed in the less differentiated cells. Since *Drosophila en* encodes a negative regulator, we overexpressed the chicken *en-1* in retinal pigmented epithelium cells. This resulted in *Pax-6* down regulation. These results suggest a regulatory loop between PAX-6 and EN, two molecular markers of medulloblastoma.

Introduction

Transcriptional regulation by the homeobox proteins is thought to coordinate the precise spatial and temporal sequence of growth and differentiation (1). Through homology of the paired-box, nine paired-box containing genes belonging to the *Pax* gene family have been isolated in vertebrates (2,3). The paired-box encodes two distinct DNA-binding domains each with a helix-turn-helix motif (4). Mutations in the *Pax-6* gene have been associated with the mouse mutant *small eye* (5) and the corresponding human gene (*AN*) has been found deleted or mutated in aniridia (6). The quail homologue of *Pax-6* termed *Pax-QNR* (7), encodes five proteins (8). Three proteins of 48, 46 and 43 kDa contained the paired domain, but two proteins of 33 and 32 kDa are devoid of this DNA-binding domain. All these proteins contain another DNA-binding motif, the homeodomain. The homeobox encodes the homeodomain, a conserved DNA-binding domain with a helix-turn-helix motif (9). The p46 encodes a transcription factor able to positively regulate the *Pax-6* promoters (10-12). The *Pax-6* gene is expressed in the developing central nervous system, the optic

cup, lens, overlaying epithelium, in the neuronal layers of the retina and the endocrine pancreas (7,13,14). In the developing brain, *Pax-6* is expressed in the ventricular zone and the external granular layer of the developing cerebellum (13,15). In the adult cerebellum *Pax-6* is expressed in the granule neurons of the internal granular layer (15).

Primitive neuro-ectodermal tumors (PNETs) correspond to small cell tumors exhibiting divergent differentiation including medulloblastoma and morphologically similar tumors in the supratentorial compartment (16) designated here as SCTs. Medulloblastoma is a highly malignant tumor of the cerebellum representing the most common pediatric brain tumor. Medulloblastoma is thought to arise by neoplastic transformation of undifferentiated precursor cells present in the external granular layer of the embryonic cerebellum (17). These precursor cells normally migrate inward to give rise to the differentiated granule neurons of the internal granular layer (18). In contrast to the results obtained with primary external granular layer cells, these cells, infected with a retrovirus expressing the SV40 large T oncogene, did not retain the granule neuron specification (18), suggesting that a defect in an endogenous regulatory gene may be involved in medulloblastoma formation. PAX-6 is an interesting gene to study, since it codes a transcription factor implicated in the control of cell fate specification, proliferation and migration of neuroectodermal precursor cells during development (15,19,20). Overexpression of *Pax-6* appears to elicit transformation of rat fibroblasts *in vitro* (19) and PAX-3 and PAX-7 are activated in alveolar rhabdomyoma by specific chromosomal translocations (21) identifying the PAX genes as potential oncogenes.

The restricted expression pattern of *Pax-6* suggests a transcriptional regulation of expression by tissue-specific factors. Active repression is often used to control gene expression and several homeobox proteins are known as active repressors (22). *En* is a homeodomain-containing protein that can repress the transcription activated by different activators and this repression requires a protein sequence outside the homeodomain (23,24). In vertebrates, two genes, *en-1* and *en-2*, have been identified (25), both expressed in a band of the early neural plate around the mid/hindbrain junction, and continue to be expressed in this region throughout development. Both *en-1* (26) and *en-2* (27) mouse mutants showed abnormal mid/

Correspondence to: Dr Simon Saule, Laboratoire de Différenciation Cellulaire et Moléculaire, CNRS EP56, Institut Pasteur de Lille, 1 Rue Calmette, 59019 Lille Cedex, France

Key words: PAX-6, engrailed, medulloblastoma, primitive neuroectodermal tumor

hindbrain development, and the rescue of the *en-1* mutant phenotype by replacement of *en-1* with *en-2* suggests similar biochemical properties for the two proteins (28). When grafted ectopically into the diencephalon of a chick host embryo, portions of the quail mid/hindbrain domain are able to induce the ectopic expression of *en-2* in the contacted host tissue and consequently to the *en-2* expression in the diencephalic host tissue, *Pax-6* becomes undetectable (29).

In this study, we set out to analyze the expression of EN and PAX-6 in a large collection of medulloblastomas and SCTs by immunohistochemical analysis. PAX-6, EN-1 and EN-2 RNAs have previously been shown to be expressed at high frequency in different medulloblastomas (30). We found a similar number of positive medulloblastomas with *en* and *Pax-6* antisera, but these proteins are most frequently expressed in a mutually exclusive way, PAX-6 being expressed in rather undifferentiated tumor areas. In addition, we showed that infection of retinal pigmented epithelium cells (expressing *Pax-6*) with a virus encoding the chicken *en-1*, in contrast to the vector control, strongly reduced the amount of endogenous *Pax-6*. These findings confirm the interest of PAX-6 and EN as medulloblastoma markers and suggest a negative regulatory loop between these two genes.

Material and methods

Cloning, DNA sequencing, and vectors used. The cDNAs *en* were isolated from a chicken embryo cDNA library (kindly supplied by Dr Y. Sap) using a fragment of the chicken *en-2* cDNA as a probe (kindly provided by Dr D. Darnell). The *en* cDNAs were ligated into M13 vectors mp18 and Puc19. Partial nucleotide sequence were determined by the dideoxy sequencing method using an Applied Biosystem 370A automatic sequencer.

Cell culture, virus and transfection. Quail retinal pigmented epithelium (RPE) cells, prepared from 7-day-old embryos were seeded at 10^5 cells per 6-well plate in DMEM 10% FCS, 24 h prior to transfection. Transfections were performed by the calcium phosphate method. The SFCV-LE *en-1*^s virus was created by the insertion of the 1.1 kb EcoRI fragment of the *en-1* cDNA into the avian retroviral vector SFCV-LE (31), (kindly provided by Dr B. Venstrom) digested by EcoRI. For stable transfection experiments, cells were transfected with 20 μ g of the molecular clone DNA and the transfected cells selected in medium containing geneticin (400 μ g/ml) were passaged twice on gelatin-coated dishes before testing.

Expression of *en-2* homeodomain peptides in bacteria and obtention of rabbit sera. The appropriate fragment was obtained from *en-2* plasmid as a template in PCR experiments using oligonucleotides corresponding to sequences containing 5' the BamHI restriction site (ATCGCATTGGATCCAGATA GCTCCCAGGCCGGCTCCAAC) and 3' the HindIII site (TGCATCTAAAGCTTACTACTTGCCGTCTTTCGCCGT GGT). The expected band sub-cloned in the pCRII (invitrogen) vector was sequenced, subjected to BamHI-HindIII restriction enzyme digestion and inserted between the BamHI-HindIII sites of a pLC24 derived vector. The sub-cloning results in the in-frame fusion of the desired sequence to the first 99

amino acids of the polymerase of phage MS2. For expression, plasmids grown in LE392 (λ) were transferred into an *E. coli* host (SG4044) which has a temperature-sensitive repressor of the PL promoter. Cultures of exponentially-growing bacteria carrying the desired vector were induced at 42°C for 3 h. Bacterial pellets were washed twice, boiled in sample buffer and electrophoresed in a 15% SDS-PAGE. Proteins were visualized by staining with Coomassie brilliant blue and cut from the gel. Rabbit antiserum (*aen*) was prepared as described (8).

Tissue procurement and processing. Forty-three human tumors including 32 PNETs (28 medulloblastomas, 4 SCTs), 3 malignant astrocytomas, 2 anaplastic ependymomas, 2 choroid plexus carcinomas and 4 metastases were obtained from surgical cases. Samples of the tumors were immediately frozen and stored at -80°C. The other part was fixed for classical histological study either in formalin-acetic acid-ethanol or Bouin's fixative, embedded in paraffin, and stained with hematoxylin-eosin (H&E) and Gomori for reticulin. Histological type was determined on paraffin sections according to the international classification (32). During the course of the study, 1 patient suffered from a local recurrent lesion. Tumor tissues from both surgical procedures were available and were analyzed. Two medulloblastomas were diagnosed with a desmoplastic component synthesizing abundant reticulin.

Antibodies. A polyclonal rabbit anti-bovine glial fibrillary acidic protein (GFAP) antibody, a rabbit anti-human neuron specific enolase (NSE) antibody, a rabbit anti-human synaptophysin antibody (Dako) and a monoclonal antibody MIB-1 detecting the Ki-67 antigen (Immunotech) were used.

To study PAX-6 and EN expression at the protein level in medulloblastoma, we used rabbit antibodies prepared from the paired (serum 11) the homeodomain (serum 13) and the carboxyl terminus (serum 14) of the quail *Pax-6* protein (8). The homologies among the vertebrate species are extremely high, allowing the use of antibodies against the avian products to detect the human proteins. We isolated *en* cDNAs from a chick embryo cDNA library (Fig. 1). Nucleotide sequencing of part of these cDNAs revealed that they corresponded to the chicken *en-1* and *en-2* respectively (33). These cDNAs were able to direct the synthesis of the 44,000 and 39,000-dalton proteins previously described (25). From bacterially expressed *en-2* carboxyl-terminus peptide (amino acids 154 to 285), we prepared rabbit antiserum able to specifically recognize both the *en-1* and *en-2* proteins (Fig. 1), but unable to cross-react with the *Pax-6* products (Fig. 1).

Immunohistochemical staining. Serial sections of 5- μ thickness were prepared. Following deparaffinization, endogenous peroxidase was blocked with 0.3% H₂O₂ in water for 5 min. The streptavidin-biotin-peroxidase complex technique was performed according to an established protocol (Dako LSAB Kit Peroxidase K680) and the sections were lightly counter stained with Mayer hematoxylin. Normal adult cerebellum was used as the positive control tissues for neuronal and glial antibodies. Excellent internal controls for the neuronal markers were available in brain sections from tumors containing

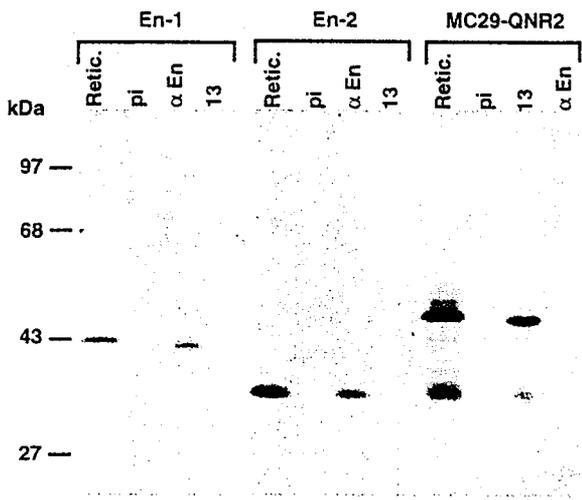


Figure 1. The chicken *en* cDNAs were transcribed *in vitro* in a sense orientation and translated in a rabbit reticulocyte lysate (lanes Retic.). Translated proteins were immunoprecipitated with *aen* rabbit antiserum prepared against bacterially expressed peptides (lane *aen*), the cognate preimmune serum (pi) or α Pax-6 serum 13 recognizing the homeodomain (lane 13). The reverse experiment was also performed, using translated Pax-6 proteins from MC29-QNR2 vector in order to confirm the serum specificity by the lack of cross reaction. Molecular weight markers are indicated on the side of the figure in kDa.

fragments of brainstem and cerebellum. Pax-6 depleted serum was substituted for the primary antibody as the negative control and two different engrailed or three different Pax-6 antibodies were used in a given run to serve as controls for each other.

Fixation and microwave antigen enhancement. Retrieval of polypeptide immunoreactivity from formalin-acetic acid-ethanol fixed specimens and enhancement of antigen reactivity in Bouin's-fixed specimens was accomplished by a modification of the method previously described (34). Briefly, after quenching with H_2O_2 , tissue sections were immersed in 10 mM pH 6.0 citrate buffer and boiled in a microwave three times for 5 min. Microwave settings were adjusted to insure gentle boiling, thus maintaining the fluid level. Slides were cooled for 20 min and rinsed in 50 mM, pH 7.6 TBS (tris phosphate-buffered saline) for 5 min. Immunohistochemistry was then performed as described above. The immunoreactivities of PAX-6 and EN could be significantly enhanced using this method while those of the other antibodies were unaffected.

Calculation of labeling index of MIB-1, PAX-6 and EN. On adjacent sections, MIB-1 and PAX-6 nuclear positivity was calculated dividing the number of nucleus positivity by the total number of cells. Ten areas measuring 1,000x715 microns in each section were observed. The areas showing the highest concentration of positive nuclei by visual analysis were chosen for counting but were not chosen in the case of diffuse staining. The labeling index of each staining for each specimen was given by averaging the percentage of each staining-positive nuclei in the ten areas. Given the heterogeneity of most of the tumors, no reasonable statistical study could be done. Instead of performing statistics we summarized the results according to three types of tumor staining: diffuse staining (D), few and

small stained nodules (SN), frequent nodules or large stained areas (LN) with PAX-6.

Western blotting and cell labeling. Transfected RPE cells were incubated for 45 min in the presence of $100 \mu Ci ml^{-1}$ of $L\text{-}^{35}S$ -methionine (Amersham, specific activity of $1,000 Ci mmol^{-1}$), lysed in RIPA-buffer and immunoprecipitated with rabbit anti-En-2 HD serum (α En) or rabbit anti-Pax-6 serum 13. Immunoprecipitated proteins were analyzed by SDS-PAGE followed by fluorography.

Western blots were performed with 10^6 cells boiled in loading buffer, subjected to SDS-PAGE and electrophoretically transferred to Immobilon membranes (Millipore). Filters were treated for 60 min in blocking buffer (5% non-fat dry milk in PBS). Filters were then treated overnight in blocking buffer containing rabbit serum diluted 1:200, followed by 30 min washing in blocking buffer, 0.1% Tween 20. Bound antibodies were revealed with an ECL detection kit (Amersham).

In vitro transcription. To characterize the chicken *en* products, a fragment of either cDNA *en-1* (1.1 Kbp EcoRI) or *en-2* (1.0 Kb EcoRI) were cloned into the EcoRI site of the pSG5 vector. The sense RNA probe was transcribed *in vitro* from the plasmid using T7 polymerase according to the manufacturer's specifications (Promega). Pax-6 encoding vector MC29-QNR2 (8) was used similarly.

Results

Immunohistochemical analysis revealed expression of NSE in 26 PNETs suggesting a neuronal differentiation in these tumors. In addition to NSE, synaptophysin was observed in 8 PNETs indicating a more pronounced neuronal differentiation. We undoubtedly over-counted the synaptophysin expression given the difficulty in recognizing the remaining isolated granular cells or islets of granular cells. Expression of GFAP, a marker of astrocytes differentiation was detectable in 11 PNETs. We did not take reactive astrocytes or astrocytes surrounding the vessels into account. Four of them also showed evidence of neuronal differentiation (Table I).

PAX-6 nucleus signal expression was detected in 19 tumors (59.3%). All of them were medulloblastomas. PAX-6 was even detected in undifferentiated areas or diffuse undifferentiated tumors (Fig. 2) in 5 to 85% of the nuclei. In some heterogeneous tumors, only few nodules displayed a PAX-6 nuclei signal (Fig. 2 panel c). PAX-6 was not expressed in 13 tumors. Most of them displayed a diffuse neuroblastic pattern with coalescent Homer-Wright rosettes and differentiated clear areas without reticulin or differentiated nodules with reticulin. In SCTs no PAX-6 expression was detected and neuronal and glial differentiation were often revealed by immunohistochemistry. In medulloblastomas, areas of glial differentiation were found and they never expressed PAX-6 neither did astocytomas, anaplastic astrocytomas, ependymomas, choroid plexus carcinomas nor metastases. No expression of PAX-6 was detected either in the control tissues or in the invaded cerebellar tissues (Fig. 3 panel a). Invasion of the normal cerebellum tissue occurred either by diffuse infiltration of tumor cells or with formation of circumscribed areas of very high cell density. Both

Table I. Summary of patients and immunohistochemistry.

Bank	Type	Age	Sex	PAX-6	PAX %	MIB %	S-NS	EN W-NS	S-CS	Location	GFA	NSE	Synap
13908	MB	5	M	-	0	15	+	-	+	V4	+	+	+
13943	SCT	11	F	-	0	5	+	-	-	Frontal	+	+	+
14022	MB	18	M	D	7	5	+	-	+	Vermis	+	+	-
93-28	MB	7	M	-	0	0	+	-	+	PF	+	+	+
93-207	MB	7	F	-	0	12	-	-	-	PF	+	-	-
93-286	MB	6	F	SN	5	0	-	-	-	PF	-	-	-
93-308	MB	6	M	-	0	10	+	+	+	V4	-	+	-
93-357	MB	12	F	SN	13	12	+	-	+	PF	+	-	-
93-706	MB	8	M	SN	5	20	-	-	+	PF	-	+	-
94-28	MB	40	F	-	0	0	-	-	+	PF	+	+	-
94-165	MB	22	M	D	85	40	-	-	-	Vermis	-	+	-
94-194	MB	5	M	LN	5	20-25	-	+	-	V4	-	+	+
94-235	MB	40	F	-	0	0	+	+	+	PF	-	+	-
94-262	MB	5	F	D	55	32	+	+	-	PF	-	-	-
94-420	SCT	53	M	-	0	20	+	+	+	Frontal	+	+	-
94-601	SCT	31	M	-	0	27	+	+	+	Fr-Pariet.	+	+	+
94-669	MB	6	M	-	0	55	+	-	+	PF	-	+	-
94-670	MB	11	M	LN	37	15	+	+	-	Vermis	-	+	-
94-671	MB	4	M	SN	80	10	+	-	+	PF	-	+	+
94-674	MB	8	M	SN	5	50	+	+	+	PF	-	+	-
94-721	MB	13	F	LN	65	20	+	+	+	PF	+	+	-
95-64	MB	9	F	-	0	15	-	-	-	PF	+	+	-
95-130	MB	21	F	LN	70	5	+	-	+	PF	-	-	-
95-196	MB	13	F	LN	65	43	+	+	+	PF	-	+	-
95-284	MB	12	F	-	0	7	+	-	+	PF	-	+	+
95-310	SCT	1	M	-	0	25	+	+	-	Frontal D	-	+	-
95-343	MB	2	M	SN	8	22	+	+	+	Vermis, V4	-	+	+
95-380	MB	33	F	D	75	35	-	+	+	PF	-	+	-
95-388	MB	24	M	SN	42	23	+	+	+	PF	-	+	-
95-678	MB	13	M	D	42	15	+	+	+	V4	-	+	-
95-720	MB	2	M	LN	7	41	+	-	-	Vermis	-	-	-
95-721	MB	35	F	LN	77	58	+	+	+	PF	-	+	-

Age of each patient at the time of operation is indicated (in years). All tumors arose in the cerebellum except for tumor 13943, 94-420, 94-601 and 95-310 originating in the forebrain. Recurrent tumor is shown in bold. MB, medulloblastoma; SCT, primitive neuroectodermal tumor from the supratentorial compartment; V4, fourth ventricle; PF, posterior fossa. Histochemical staining were performed with antibodies against NSE, synaptophysin (Synap), and glial fibrillary acidic protein (GFAP), MIB-1 recognizing the proliferation marker Ki-67, *Pax-6* and MIB% indicates the labelling index of the tumors for PAX-6 and MIB, as indicated in the Material and methods. To better analyze the different staining with *Pax-6* and *en* sera depending on tumor architecture we summarized our results as follows:

PAX-6	EN
-	Strong nucleus signal in granular cells
SN	Weak nucleus signal in tumor cells
LN	Strong cytoplasmic signal
D	Oligo-like nucleus or neuron-like nucleus

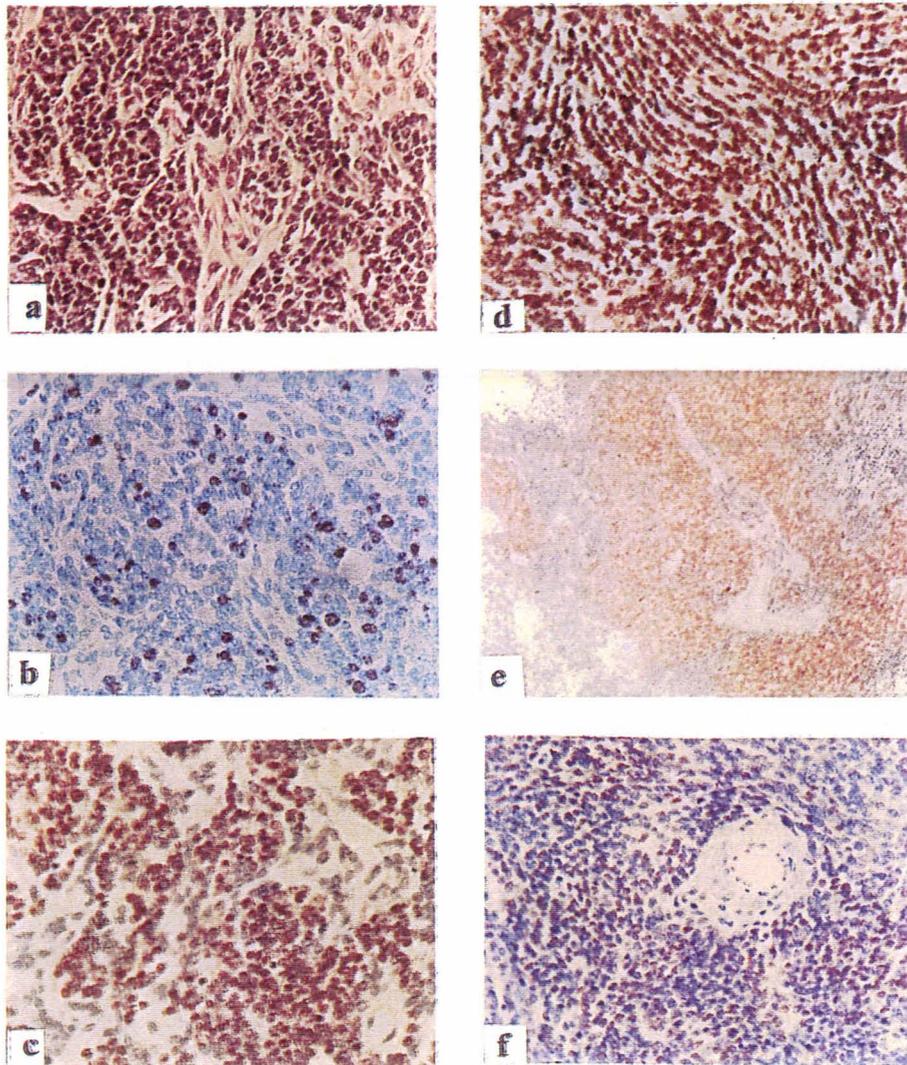


Figure 2. Expression of PAX-6 in different types of medulloblastomas. a,b,c, Diffuse type (94-262) with marked mesenchymal component. a, H&E (X250); b, Staining with the monoclonal antibody MIB-1 recognizing the proliferation marker Ki-67 (X250); c, PAX-6 expression only found in small cell nuclei and not in the mesenchyma with the anti-paired serum 11 (X250); d, Diffuse medulloblastoma (94-165). 85% of the nuclei showed a PAX-6 signal (X250); e, Heterogeneous tumor (94-671). The only large area expressing PAX-6 in a voluminous tumor which showed several differentiation (X100); f, Diffuse tumor (95-678). Heterogeneous *Pax-6* antiserum staining, most likely corresponding to different tumor components surrounding a vessel. The mesenchyma was not stained (X250).

invasion types were characterized by a high number (15-35%) of MIB-1 positive nuclei (Fig. 3 panel b). PAX-6 positive nuclei (20-70%) were observed in the same high density areas with a stronger staining than in the adjacent massive tumors. Follicles and pale islands were mostly negative with PAX-6 and showed positive nuclei only in peripheral borders as did MIB-1 (Fig. 4 panel d). Tumor tissues from both surgical procedures of the patient suffering from a local recurrent lesion showed similar lack of PAX-6 staining.

EN was expressed in most of the tumors. Three different expressions were detected: i) One as strong nucleus signal (S-NS, Table I) detected in the granular cells localized in the invaded cerebellum tissue (Figs. 3-5). This strong nucleus signal was also observed very close to the infiltration (Fig. 3 panel e and f). On the other hand, this strong signal was not detectable further away from the tumor or in control cerebellar tissues (Fig. 3 panel d). This strong nucleus signal was also detected in the granular layer localized close to metastases but not further away. In medulloblastomas,

isolated nuclei expressing EN could be detected in the large areas expressing mostly PAX-6. They could be rare and/or in islets (Fig. 4 panel a). In adjacent slides we noted that they corresponded to remaining granular cell nuclei with their typical nuclei with a small nucleolus and a remaining extra cellular synaptophysin staining (Fig. 4 panel b). The same strong nucleus signal was found in the white matter cerebellar tissue or in the cerebral white matter invaded by SCT. These nuclei corresponded either to neurocytes or oligodendrocytes (data not shown). ii) A strong cytoplasmic signal (S-CS, Table I) was also observed in the Purkinje cells and their modified and enlarged processes close to the tumor localized in the external layer (Figs. 3 and 4). iii) The last EN signal was a very weak nucleus signal (W-NS, Table I). This weak signal was detected in 15 tumor cells and difficult to analyze when compared to the strong nucleus signal observed in granular cell nuclei. In 10 tumors, we observed intermingled expression of PAX-6 nucleus signal and a weak EN nucleus signal. Follicles and pale islands were weakly

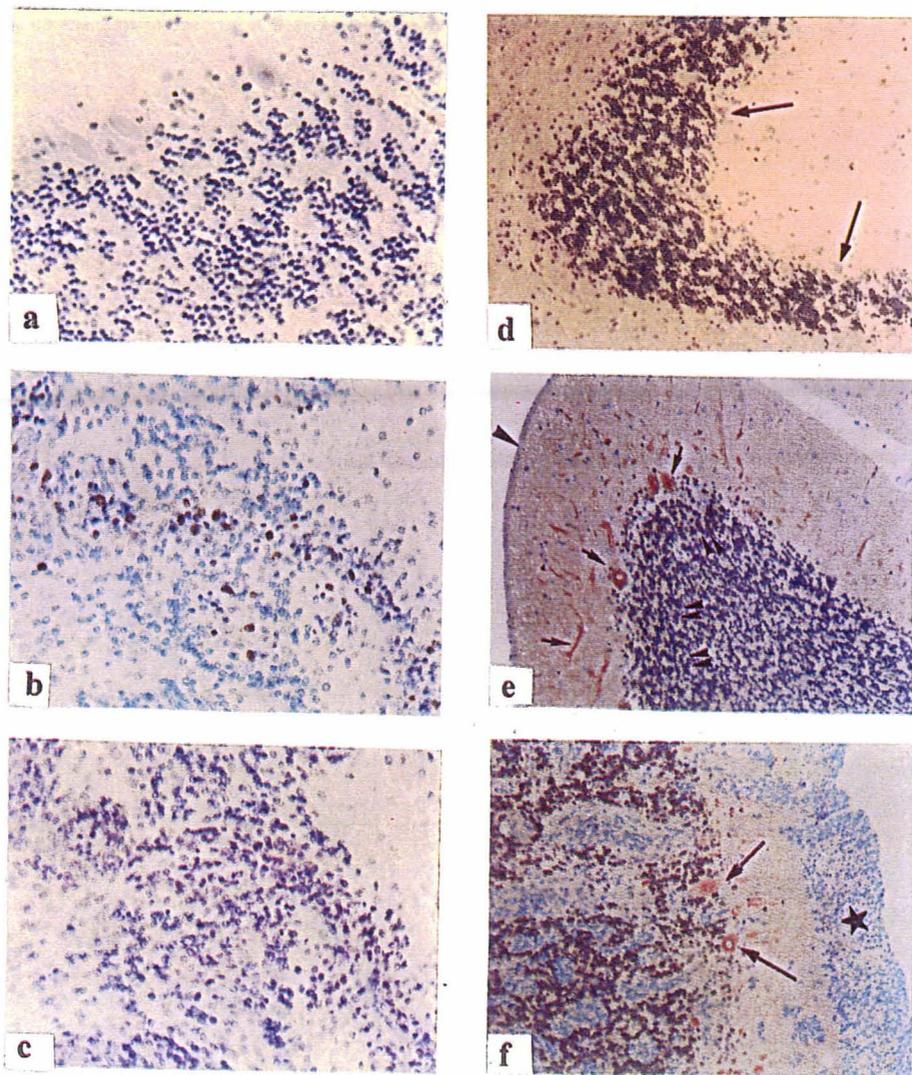


Figure 3. Left column: a, Control cerebellum staining with *Pax-6* serum 11 (X250); b, MIB-1 staining following a vessel in a invaded cerebellar lamella (95-196); (X250); c, Wider PAX-6 signal following the same vessel in adjacent slide (95-196); (X250). Right column: d, Control cerebellar lamina stained with *aen* serum; arrows, Purkinje cells (X250); e, Cerebellar lamina localized not close to a tumor (95-720). Left side (large arrowhead) showed molecular spongiosis and Purkinje cell changes. Their cytoplasm and processes were stained with *aen* serum (arrow). A granular cell nucleus strongly stained (double arrowheads) was also observed on this side and gradually disappeared on the other side localized further from the tumor (X100); f, Cerebellar lamella invaded by a sub-pial tumor (star) (95-720). The *aen* serum staining was strikingly expressed in the granular cell nuclei but not in the tumor cell nuclei. Staining was observed in the modified Purkinje cell cytoplasm and processes (arrowhead) (X100).

positive with EN so were the adjacent areas (Fig. 5 panel a). Only rare and isolated PAX-6 nuclei could be found in these areas (Fig. 5 panel d). The expression of PAX-6 and EN were never detected in connective tissue and endothelia (Figs. 1-4). We never found a strong co-expression of PAX-6 and EN on adjacent tumor sections, only intermingled nuclei with a weak EN signal.

To confirm that the detected signal with sera 11, 13 and 14 is indeed the result of PAX-6 expression, we performed a Western blot experiment in order to characterize the proteins expressed. As shown in Fig. 6, tumors positive in the immunohistochemical analysis exhibited set of proteins characterized for the quail *Pax-6* (8). The p46 and p48 are the more abundant proteins, as found in mice (14). We also observed the minor p43 (Fig. 6, arrowhead) and the paired-less p33/32 products previously described in quails (8). Using the *en-2* antiserum, it was not possible to define the nature of the EN protein expressed, because of very high background of this serum in

the Western blot experiment with the tumor extracts (data not shown). However, as shown (30) using RNase protection experiments both EN-1 and EN-2 were expressed in medulloblastomas.

En-1 expression resulted in the *Pax-6* down regulation *in vivo*. Since EN and PAX-6 seemed to be not expressed in the same tumor cells or with only a very weak EN signal, we studied the possibility that *en* was able to down regulate *Pax-6* expression. For that purpose, we introduced the chicken *en-1* coding sequence into a retroviral vector, pSFCV-LE (31). Transfection of RPE expressing *Pax-6*, followed by a G418 treatment in order to select cells expressing the virus resulted in cells expressing *Pax-6* only when the control SFCV-LE virus was used. As shown in Fig. 7, immunoprecipitation experiments performed on these RPE cell lysates showed that the p44^{en-1} was detected in cells expressing the SFCV-LE *en-1*^s but not SFCV-LE control viruses and the cells expressing *en-1* showed

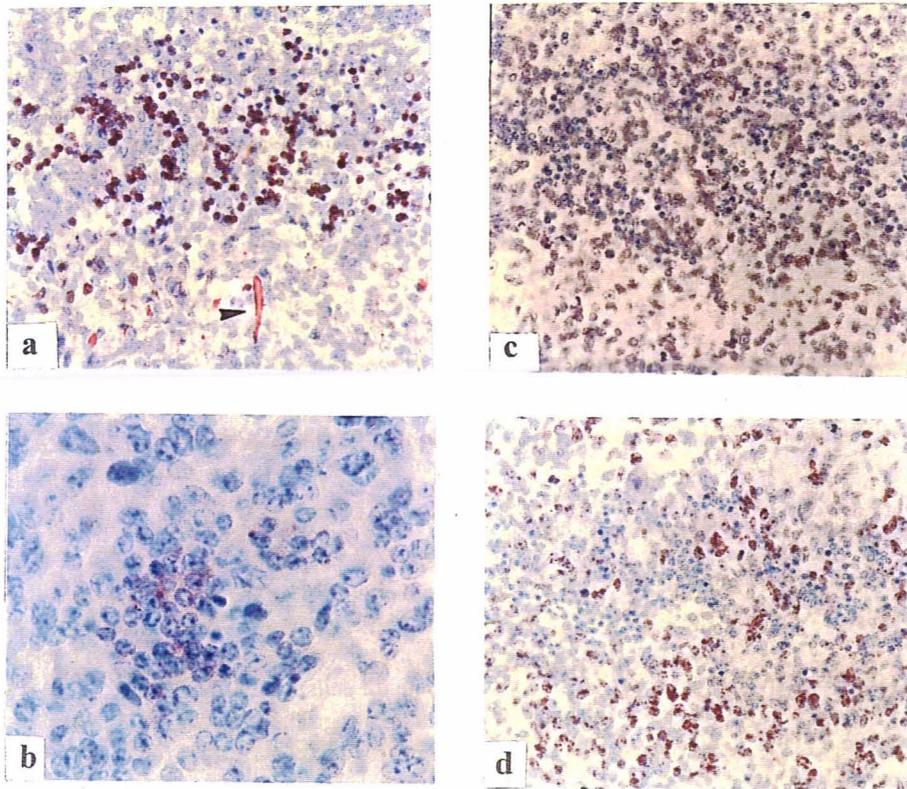


Figure 4. a, Diffuse tumor (95-678) including a granular cell layer well distinguished with *aen* serum staining; as well as Purkinje cell cytoplasm and their modified processes (large arrowhead) (X250); b, Synaptophysine staining confirmed the granular cell nucleus identity already well observed with *aen* serum staining (X400); c, Same area in adjacent slide stained with *Pax-6* serum 11. The tumor nuclei were weakly stained and no signals were found in the remaining granular cell nuclei (X250); d, Same area in adjacent slide stained with MIB-1. This staining was stronger than the PAX-6 staining but was observed in similar but fewer nuclei (X250).

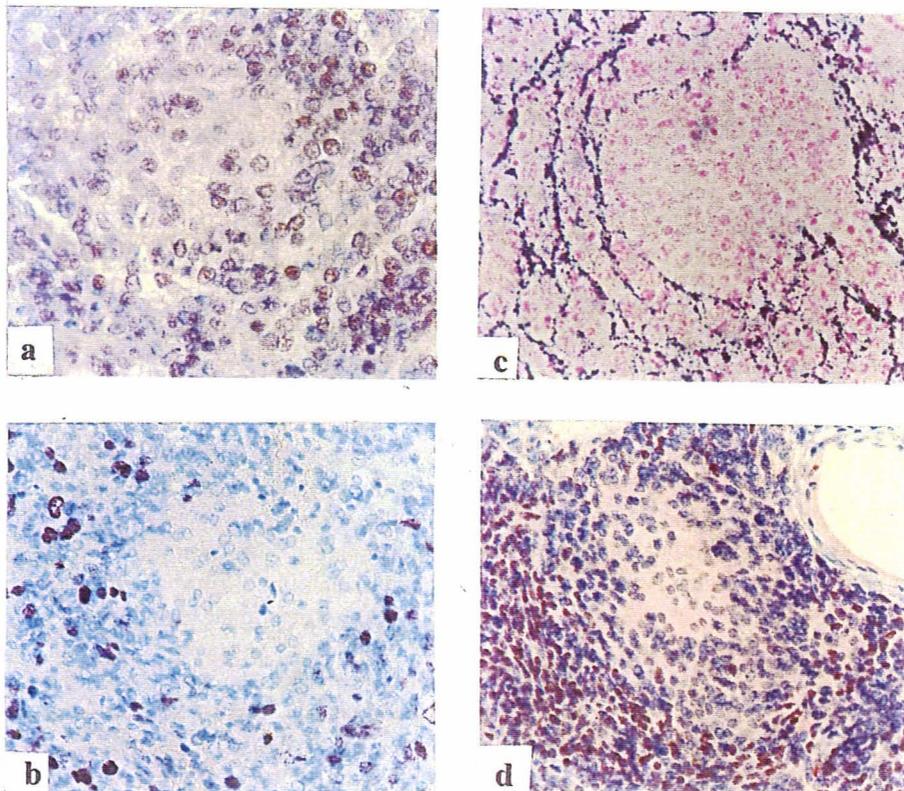


Figure 5. Desmoplastic variant of medulloblastomas (94-670). a, EN weak nuclei staining. The signal was diffusely observed in the nodule and its surround (X400); b, MIB-1 staining observed surrounding the nodule in an adjacent slide (X400); c, Reticulin staining lining the nodule in an adjacent slide (X400); d, Strong PAX-6 staining surrounding a pale nodule close to a vessel (X250).

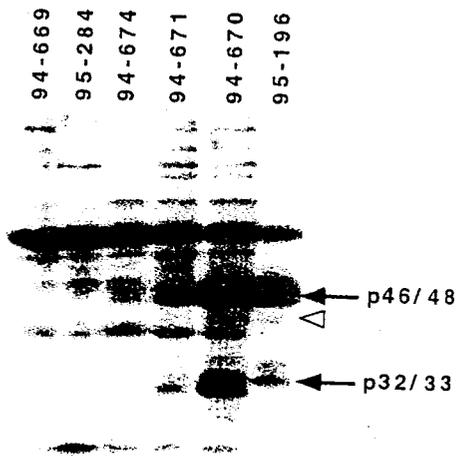


Figure 6. Characterization of PAX-6 proteins in medulloblastomas. Western blot was performed on medulloblastoma extracts (as indicated on the top of the figure) with Pax-6 serum 13. Bound antibodies were detected with an ECL detection kit. The faint p43 protein is indicated with an arrowhead.

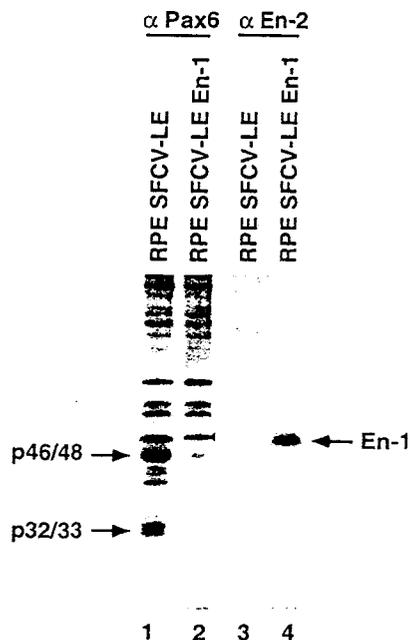


Figure 7. Characterization of Pax-6 and en-1 proteins in transfected RPE cells after G418 selection, L-³⁵S-methionine labeled. Immunoprecipitation were performed on RPE-cell extracts with Pax-6 serum 13 and *en* serum. The Pax-6 and en-1 proteins are indicated by an arrow.

a strongly reduced amount of Pax-6 proteins when compared to the control cells (Fig. 7). These results indicate that an over-expression of the p44^{en-1} negatively regulates Pax-6 expression *in vivo*.

Discussion

In this report we have investigated the expression of developmental control genes PAX-6 and EN at the protein level. They were expressed respectively in 59.4% and 75% of the PNETs analyzed. Fifty percent of them expressed EN in the tumor cells. Thirty-four percent of these tumors expressed

both PAX-6 and EN proteins, but on serial tumor sections we observed a regionalized localization of these proteins. PAX-6 being expressed in the less differentiated tumor areas and sometimes intermingled with nuclei displaying a peculiarly low EN signal. No SCTs showed PAX-6 expression. However, three of them expressed EN as weak nuclear staining of the tumor cells. Interestingly, MIB-1 expression and PAX-6 signals coincided. This was mostly observed in the invaded tissues. Previously, Schiffer *et al*, (35) noted a higher number of MIB-1 positive nuclei in the sleeves of cells penetrating the normal cerebellar parenchyma than in the subpial proliferation itself suggesting these infiltrating cells could represent a selected tumor cell population. In the present work, this higher index proliferation was correlated with a higher percentage level of PAX-6 expression than in the subpial proliferation. These new data pointed out the purpose of Schiffer suggesting these infiltrating cells could represent a selected tumor cell population and could correlate with an oncogenic role for PAX-6.

In this work we observed different levels and sub-cellular localization of EN signals. A weak nuclear signal corresponded to tumor cells, often intermingled with PAX-6 signal. A strong nuclear signal was seen in the granular cells invaded by tumors or localized close to a tumor. Purkinje cell cytoplasmic signal was found in the same place but was difficult to interpret given that En is a nuclear protein. However, these signals could be interpreted as the re-expression of EN, since the normal cells far from the tumor were not labeled. Thus, it is possible that diffusible signals, secreted by the tumors induced the cells which expressed EN during the embryonic life, to re-express EN. The fact that the Purkinje cell showed a cytoplasmic signal may be due to a lack of the concomitant expression in these cells of the proteins required for the proper nuclear localization of EN, the sub-cellular localization observed in these cells during embryonic development (36,37).

The expression patterns of *en* and Pax-6 in the central nervous system have been studied in detail in the mouse. En-1 is first detected at the 1 somite stage (38) whereas Pax-6 is detected few hours later, at 4 somite stages, like *en-2* (13,38). Later in embryogenesis, transcription of *en-1* is gradually reduced in the developing cerebellum in contrast to *en-2*, but the two genes share similar functions as shown by mutant rescue experiments (28). The Pax-6 gene, like *en-2*, is expressed in the ventricular zone and external granular layer of the developing cerebellum (13,15,39), a layer of cells expected to give rise to medulloblastoma (17,30) and PAX-6 and EN are still expressed in the adult cerebellum in the cells of the internal granular layer as is *en-2* (15,30,36). However, we were unable to detect any PAX-6 or EN by immunohistochemical staining of cerebellum.

The transcriptional regulation of Pax-6 is complex and a fine tuning of its expression seems to be required for a correct embryo development, since Pax-6 dosage is critical for normal eye and central nervous system development (40). Since we never observed strong EN and PAX-6 signal simultaneously in the same tumor areas, we tested the possibility that quail Pax-6 was down regulated by the chicken *en-1* product. Indeed, Pax-6 is repressed in the diencephalon of host chick embryos grafted with quail mesencephalic vesicle and *en-2* is expressed

in the host diencephalon surrounding the graft (29). The pigmented retina expresses *Pax-6* (12), and infection of these cells with a retroviral vector encoding the p44^{en-1} resulted in a marked down regulation of *Pax-6*. Thus, these results may provide a molecular explanation for the separate expression of PAX-6 and EN in the medulloblastomas. The mechanisms that promote repression are multiple. If some factors repress transcription of specific genes by sequestering site-specific DNA-binding activators, other repressors affect transcription by directly recognizing the general transcription machinery. The chicken *en-1* contains a glycine, proline and alanine rich amino-terminal region, which resembles repressor domains of the *Drosophila en* (24). In addition, the amphipathic α helix located at the C-terminus of Dr1, a TBP-associated protein and inhibitor of class II gene transcription, is rich in glutamine and alanine residues and share some homology with *en* repressor domains (41). This suggests that these regions may provide several unique surfaces for multiple protein-protein contact with the basal transcription machinery and may then negatively modulate the transcription of target genes.

PAX genes can be considered proto-oncogenes, as their overexpression results in transformation of rat fibroblasts (19) and PAX-3 and PAX-7 are involved in chromosomal translocations consistently found in alveolar rhabdomyosarcoma (21,42). Recent data show that homeodomain proteins of the paired class have the ability to recruit serum responsive factor (SRF) to DNA sequences, and may then increase the cellular response to peptide growth factors (43). An overexpression due to a failure in PAX gene regulation may be instrumental in the occurrence of medulloblastomas. These new data, associating differential PAX-6 and EN expressions in a same tumor confirmed the histological heterogeneity of medulloblastomas, and it seems not only possible, but likely, that more than one tumor is included in the term medulloblastoma. PAX genes and especially PAX-6 are expected to be useful markers to characterize these poorly defined tumors.

Acknowledgements

We are grateful to Mrs Monique Henneron, Sylvie Limol and Régine Delpierre for technical assistance. We thank Patrick Martin and Nigel Mitchell for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique, Institut Pasteur de Lille, Association pour la Recherche contre le Cancer and la Ligue Départementale du Nord de lutte contre le cancer.

References

- Duboule D: Guidebook to the Homeobox Genes. Sambrook & Tooze publication at Oxford University Press, 1994.
- Walther C, Guenet JL, Simon D, Deutch U, Jostes B, Goulding MD, Plachov D, Balling R and Gruss P: *Pax*: a murine gene family of paired box containing genes. *Genomics* 11: 424-434, 1991.
- Tremblay P and Gruss P: *Pax*: Genes for mice and men. *Pharmac Ther* 61: 205-226, 1994.
- Xu W, Rould MA, Jun S, Desplan C and Pabo CO: Crystal structure of a paired domain-DNA complex at 2.5 Å resolution reveals structural basis for *pax* developmental mutations. *Cell* 80: 639-650, 1995.
- Hill RE, Favor J, Hogan B, Ton CC, Saunders G, Hanson J, Prosser J, Jordan T, Hastie N and Heyning VV: Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene. *Nature* 354: 522-525, 1991.
- Glaser T, Waldon D and Maas RL: Genomic structure, evolutionary conservation and aniridia mutations in the human *pax-6* gene. *Nature Genet* 2: 231-239, 1992.
- Martin P, Carrière C, Dozier C, Quatannens B, Mirabel M, Vandebunder B, Stéhelin D and Saule S: Characterization of a pairedbox- and homeobox-containing quail gene (*pax-QNR*) expressed in the neuroretina. *Oncogene* 7: 1721-1728, 1992.
- Carrière C, Plaza S, Martin P, Quatannens B, Bailly M, Stéhelin D and Saule S: Characterization of quail *pax-6* (*Pax-QNR*) proteins expressed in the neuroretina. *Mol Cell Biol* 13: 7257-7266, 1993.
- Kissinger C, Liu B, Martin-Blanco B, Kornberg T and Pabo C: Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution: a framework for understanding homeodomain-DNA interactions. *Cell* 63: 579-590, 1990.
- Carrière C, Plaza S, Caboche J, Dozier C, Bailly M, Martin P and Saule S: Nuclear localization signals, DNA binding and transactivation properties of quail *pax-6* (*Pax-QNR*) isoforms. *Cell Growth Differ* 6: 1531-1540, 1995.
- Plaza S, Dozier C and Saule S: Quail *Pax-6* (*Pax-QNR*) encodes a transcription factor able to bind and transactivate its own promoter. *Cell Growth Differ* 4: 1041-1050, 1993.
- Plaza S, Dozier C, Turque N and Saule S: The quail *Pax-6* (*Pax-QNR*) mRNAs are expressed from two promoters used differentially during retina development and neuronal differentiation. *Mol Cell Biol* 15: 3344-3353, 1995.
- Walther C and Gruss P: *Pax-6*, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* 113: 1435-1449, 1991.
- Turque N, Plaza S, Radvanyi F, Carrière C and Saule S: *Pax-QNR/Pax-6*, a paired box-and homeobox-containing gene expressed in neurons is also expressed in pancreatic endocrine cells. *Mol Endocrinol* 8: 929-938, 1994.
- Stoykova A and Gruss P: Roles of *Pax*-genes in developing and adult brain as suggested by expression patterns. *J Neurosci* 14: 1395-1412, 1994.
- Burger PC, Grahmann FC, Bliedle A and Kleihues P: Differentiation in the medulloblastoma. A histological and immunohistochemical study. *Acta Neuropathol* 73: 115-123, 1987.
- Kadin ME, Rubinstein LJ and Nelson JS: Neonatal cerebellar medulloblastoma originating from the fetal external granular layer. *J Neuropathol Exp Neurol* 29: 583-600, 1970.
- Gao W-Q and Hatten ME: Immortalizing oncogenes subvert the establishment of granule cell identity in developing cerebellum. *Development* 120: 1059-1070, 1994.
- Maulbecker CC and Gruss P: The oncogenic potential of *Pax* genes. *EMBO J* 12: 2361-2367, 1993.
- Schmal W, Knoedlseder M, Favor J and Davidson D: Defects of a neuronal migration and pathogenesis of cortical malformations are associated with small eye (*sey*) in the mouse, a point mutation at the *pax-6* locus. *Acta Neuropathol* 86: 126-135, 1993.
- Galili N, Davis RJ, Fredericks WJ, Mukhopadhyay S, Rauscher FJ III, Emanuel BS, Rovera G and Barr FG: Fusion of a fork head domain gene to PAX-3 in the solid tumor alveolar rhabdomyosarcoma. *Nature Genet* 5: 230-235, 1993.
- Um M, Li C and Manley J: The transcriptional repressor Even-skipped interacts directly with TATA-binding protein. *Mol Cell Biol* 15: 5007-5016, 1995.
- Jaynes J and O'Farrell P: Active repression of transcription by engrailed homeodomain protein. *EMBO J* 10: 1427-1433, 1991.
- Han K and Manley J: Functional domains of the *Drosophila* engrailed protein. *EMBO J* 12: 2723-2733, 1993.
- Davis C, Holmyard D, Millen K and Joyner A: Examining pattern formation in mouse, chicken and frog embryos with an EN-specific antiserum. *Development* 111: 287-298, 1991.
- Wurst W, Auerbach AB and Joyner A: Multiple developmental defects in engrailed-1 mutant mice: an early mid-hindbrain deletion and patterning defects in forelimbs and sternum. *Development* 120: 2065-2075, 1994.
- Millen JK, Wurst W, Herrup K and Joyner A: Abnormal embryonic cerebellar development and patterning of postnatal foliation in two mouse engrailed-2 mutants. *Development* 120: 695-706, 1994.

28. Hanks M, Wurst W, Anson-Cartwright L, Auerbach AB and Joyner A: Rescue of the EN-1 mutant phenotype by replacement of EN-1 with EN-2. *Science* 269: 679-682, 1995.
29. Bally-Cuif L and Wassef M: Ectopic induction and reorganization of Wnt-1 expression in quail/chick chimeras. *Development* 120: 3379-3394, 1994.
30. Kozmik Z, Sure U, Rüedi D, Busslinger M and Aguzzi A: Deregulated expression of PAX-5 in medulloblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 5709-5713, 1995.
31. Fuerstenberg S, Beug H, Introna M, Khazaie K, Munoz A, Ness S, Nordström K, Sap I, Stanley I, Zenke M and Vennström B: Ectopic expression of the erythrocyte band 3 anion exchange protein, using a new avian retrovirus vector. *J Virol* 64: 5891-5902, 1990.
32. Burger PC and Scheithauer BW: Tumors of the central nervous system. *Atlas of Tumor Pathology*. Armed Forces Institute of Pathology, Washington DC, 10, 1994.
33. Logan C, Hanks MC, Noble-Topham S, Nallainathan D, Provart NJ and Joyner AL: Cloning and sequence comparison of the mouse, human, and chicken engrailed genes reveal potential functional domains and regulatory regions. *Dev Genetics* 13: 345-358, 1992.
34. Shi RS, Key ME and Kalra KL: Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 39: 741-748, 1991.
35. Schiffer D, Cavalla P, Chio A, Giordano MT and Marino S: Tumor cell proliferation and apoptosis in medulloblastoma. *Acta Neuropathol* 87: 362-370, 1994.
36. Millet S and Alvarado-Mallart R-M: Expression of the homeobox-containing gene *En-2* during the development of the chick central nervous system. *Eur J Neurosci* 7: 777-791, 1995.
37. Wassef M, Bally-Cuif L and Alvarado-Mallart R-M: Regional specification during cerebellar development. *Development* 119: 127-132, 1993.
38. McMahon AP, Joyner AL, Bradley A and McMahon A: The midbrain-hindbrain phenotype of *Wnt-1/Wnt-1* mice results from stepwise deletion of engrailed-expressing cells by 9.5 days postcoitum. *Cell* 69: 581-595, 1992.
39. Davis CA and Joyner AL: Expression patterns of the homeobox-containing genes *EN-1* and *EN-2* and the proto-oncogene *Int-1* diverge during mouse development. *Gene* 127: 1736-1744, 1988.
40. Glaser T, Jepeal L, Edwards JG, Young R, Favor J and Maas RL: *Pax-6* gene dosage effect in a family with congenital cataracts, aniridia, anophthalmia and central nervous system defects. *Nature Genet* 7: 463-471, 1994.
41. Inostroza JA, Mermelstein FH, Ha I, Lane WS and Reinberg D: DR1 a TATA-binding protein-associated phosphoprotein and inhibitor of class II gene transcription. *Cell* 70: 477-489, 1992.
42. Davis RJ, D'Cruz CM, Lovell MA, Biegel JA and Barr FG: Fusion of *PAX-7* to *FKHR* by the variant t(1;13)(p36;q14) translocation in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res* 54: 2869-2872, 1994.
43. Grueneberg D, Simon KJ, Brennan K and Gilman M: Sequence-specific targeting of a nuclear signal transduction pathway by homeodomain proteins. *Mol Cell Biol* 15: 3318-3326, 1995.

Large-cell medulloblastoma with arrestin-like protein expression

S. Vincent¹, M. Mirshahi⁵, C. Nicolas⁵, C. Adenis⁴, P. Dhellemmes², G. Soto Ares³, C.-A. Maurage¹, M.-C. Baranzelli⁴, F. Giangaspero⁶ and M.-M. Ruchoux¹

¹Neuropathology Department, ²Neurosurgery Department, ³Neuroradiology Department CHRU Lille, ⁴Cancer Institute of Lille, ⁵INSERM E9912, Faculté de Médecine Paris VI, France and ⁶Institute of Anatomical Pathology, Bufalini Hospital, Cesena, Italy

Key words

large-cell medulloblastoma – cytogenetic – neuronal differentiation – β arrestin

Abstract. We report a case of a cerebellar large-cell medulloblastoma in a 12-year-old patient. Despite a gross-total resection followed by a radiation therapy and then a chemotherapy, the death occurred 6 months later. The cytogenetic analysis showed an isochromosome 17q. Immunoreactivity for synaptophysin, neurofilaments, chromogranin and arrestin-like proteins was detected, whereas rhodopsin, vimentin, EMA and PAX-6 were negative. In this study, we demonstrate that large-cell medulloblastoma with translocation in chromosome 17q is a neuronal differentiated medulloblastoma with non-photoreceptor characterization. By reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) method, using primers for β_1 , β_2 and visual arrestin, we demonstrate corresponding mRNA for β_1 , β_2 arrestin but not for visual arrestin. These results suggest that arrestin immunoreactivity in this tumor corresponds to non-visual arrestin. This case corresponds to a new entity of large-cell medulloblastoma. The potential role of a new marker linked to a β_2 adrenergic receptor needs further molecular characterization to be useful.

Introduction

Medulloblastoma (MB) is a malignant embryonal childhood tumor located in the cerebellum and composed of densely packed cells with either round to oval or carrot-shaped nuclei and scanty cytoplasm. In 1992, Giangaspero and colleagues described a distinct variant of medulloblastomas with highly aggressive behavior [Giangaspero et al. 1992]. They reported 4 cases of infantile

cerebellar neoplasms that were composed of cells with large vesicular nuclei and prominent nucleoli showing evidence of neuronal differentiation. The cytogenetic study of 1 tumor revealed an isochromosome 17q [i(17q)], which is the most frequent chromosomal abnormality in MB. The proteins of arrestin (Arr) family contribute to the regulation of G-protein-mediated signal transduction in a number of tissues, possibly by a desensitization of the appropriate receptor(s). The role of Arrs in mediating receptor desensitization has been most extensively studied in the visual Arr or retinal S-antigen. At one time, it was believed to be restricted to the photoreceptor cells in the vertebrate and invertebrate eye [Mirshahi et al. 1985, Van Veen et al. 1986] and cells of the pineal gland [Mirshahi et al. 1984]. However, a protein-exhibiting immunoreactivity and molecular mass identical to that of retinal Arr was subsequently demonstrated in cytosolic extracts of trout and turkey erythrocytes [Mirshahi et al. 1989], human platelets [Mirshahi et al. 1991] as well as bovine and rat kidney [Mirshahi et al. 1992]. The presence of Arr-like proteins in non-photosensitive cells has been confirmed by several independent observations. Thus, the gene coding for β Arr was cloned from a bovine brain cDNA library. The recombinant protein exhibited 59% amino acid sequence identity with retinal Arr and regulated β adrenergic transduction [Lohse et al. 1990]. Since then, several members of the Arr gene family have been cloned from vertebrate and invertebrate cells [Jahns et al. 1996, Smith et

Received
August 3, 2002;
accepted in revised form
September 26, 2002

Correspondence to
Dr. M.M. Ruchoux
Laboratoire de
Neuropathologie,
Hôpital Roger Salengro,
CHRU, Bd du
Professeur J. Leclerc,
F-59037 Lille, France
mmruchoux@chru-lille.fr

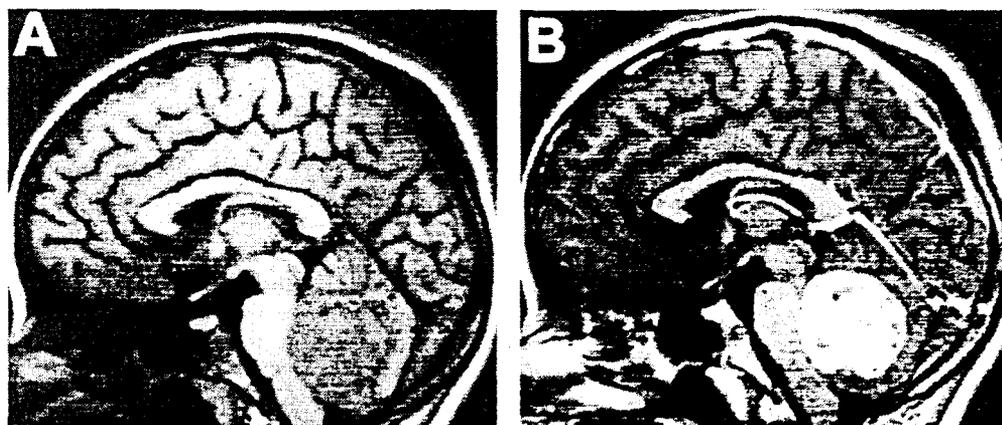


Figure 1. T₁-weighted image shows a voluminous mass that originates from the vermis and bulges anteriorly into the fourth ventricle. The mass is homogeneously isointense to gray matter (a) and strongly enhanced after gadolinium (b).

al. 1995]. Furthermore, immunoreactive proteins analogous to the retinal Arr have also been identified in the plant kingdom [Mirshahi et al. 1991]. The presence of S-antigen in neoplastic tissues was first reported in retinoblastoma [Donoso and Felberg 1985, Mirshahi et al. 1986] and then in 27–50% of MBs [Czerwionka et al. 1989, Jahns et al. 1996, Korf et al. 1992, Maraziotis et al. 1992]. Immunoreactivity was found in morphologically undifferentiated cells as well as in neuroblastic rosettes [Bonnin and Perentes 1988]. In this study, we show a case of large-cell medulloblastoma (LCMB) with an *i*(17q) and a neuronal and Arr-like differentiation.

Case report

A 12-year-old girl was admitted to hospital owing to symptoms of raised intracranial pressure such as headache that had been going on for 15 days, then vomiting for the last 48 hours and a cerebellar syndrome associated with nystagmus and exhaustion. MRI examination revealed a 3.5 cm space-occupying lesion localized within the fourth ventricle and the vermis (Figure 1). A gross-total resection was realized and confirmed with MRI examination 10 days later. CSF contained abnormal cells. She was treated with alternative chemotherapy (carboplatin VP16) and radiotherapy. Despite a spinal surveillance during the chemotherapy and a neuroaxis radiotherapy, an early CSF dissemination was ob-

served. Death occurred 6 months after surgery.

Material and methods

Histology and immunohistochemistry

Samples of tumor were fixed in AFA (alcohol-formaldehyde-acetic acid), embedded in paraffin. For histological study, 5 μ m thick sections were stained routinely with hematoxylin and eosin (HE). For immunohistochemistry, the slides were treated with a panel of antisera as summarized in Table 1, and stained with the streptavidin-biotin-peroxydase complex technique according to an established protocol (Dako LSAB Kit Peroxidase K680). The immunoreactivity study of PAX-6 and MIB-1 was done using microwave antigen enhancement [Shi et al. 1991]. As positive controls we used for Arr and rhodopsin: a normal retina; for the other antisera: the adjacent cerebellar and meningeal areas surrounding the tumor, and for PAX-6: a positive MB.

Chromosome analysis

Sterile tumor tissue was obtained and mechanically disaggregated to yield a single cell suspension. After the short-term culture (48 h) the cells were subjected to 0.4 g/ml colchicine (Sigma) treatment for the last 2 h

Table 1. Type, dilution and source of the antibodies used for immunohistochemistry.

Antibody (type)	Dilution	Source	Tumor localization		
			Small cells	Large cells	Vessels
GFAP (p)	1/500	Dako	-	-	-
Protein S100 (p)	1/400	Dako	-	-	-
EMA (m)	1/100	Dako	-	-	+
Cytokeratin (m)	1/50	Immunotech	-	-	-
Vimentin (m)	1/100	Dako	-	-	++
Desmin (m)	1/20	Sigma	-	-	+
α -Actin (m)	1	Immunotech	-	-	++
Myosin (p)	1/20	Sigma	-	-	-
NSE (p)	1/200	Dako	+	+	-
Neurofilament human (m)	1/100	Dako	+	++	-
Neurofilament 68 (m)	1/40	Sigma	-	-	-
Neurofilament 160 (m)	1/40	Sigma	-	-	-
Neurofilament 200 (m)	1/40	Sigma	-	-	-
Synaptophysin (m)	1/100	Dako	+++	+++	-
Synaptophysin (p)	1/100	Dako	+++	+++	-
Chromogranin (p)	1/500	Dako	+	++	-
Ag S (m)	1/1000	U86 Paris	+	+++	-
Rhodopsin (m)	1/10	U86 Paris	-	-	-
Pax-6 (p)	1/100	Pasteur Lille	-	-	-

m = monoclonal, p = polyclonal; the degrees of immunodetection in the tumor localization are indicated by: + scattered positive tumor cells, ++ groups of positive tumor cells, +++ strong staining of many tumor cells, - no detection.

of culture. A hypotonic solution (0.075 M KCl) was followed by fixation in methanol and glacial acetic acid 3 : 1 (v/v). Giemsa trypsin G (GTG) and quinacrine fluorescein Q (QFQ) banding was used to evaluate the centromeric heterochromatin. Karyotype was determined by arranging all chromosomes photographed in metaphase that were technically satisfactory according to the international system for cytogenetic nomenclature (ISCN) (ISCN 1985).

RNA preparation

Tissue RNA was prepared according to the protocol of trizol reagent (BRL) which is an improvement over the single-step RNA isolation method [Chomczynski and Sacchi 1987]. Briefly, tissues were lysed directly with 1 ml of trizol and the cell lysates were passed several times through a pipette. After addition of 200 μ l of chloroform the mixture was shaken and centrifuged at 12,000 g for 15 min at 4 °C. The aqueous phase was transferred into a fresh tube with 500 μ l of iso-

propylalcohol and the mixture was centrifuged at 12,000 g for 10 min at 4 °C. The RNA precipitate in the pellet was washed with 1 ml of 75% ethanol, mixed and centrifuged at 7,500 g for 5 min at 4 °C. Total RNA was dissolved in 30 μ l RNase-free water and quantified by UV absorption where the ratio OD_{260nm} : OD_{280nm} was 1.6 - 2.0 in all cases. The amount of RNA varied between 4 and 8 μ g.

Reverse transcription

One μ g of total RNA was used for reverse transcription into complementary DNA (cDNA). RNA was denatured for 3 min at 65 °C and incubated for 60 min at 43 °C in a final volume of 20 μ l in the presence of 0.5 mM dNTP (Pharmacia), 0.01 M dithiothreitol, 0.5 oligo (d) 15 (Promega), 200 units superscript RNase H-reverse transcriptase (BRL) and 1 unit RNAsin (Promega) in 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 74 mM KCl and 3 mM MgCl₂. Finally, the mixture was heated to 95 °C for 5 min.

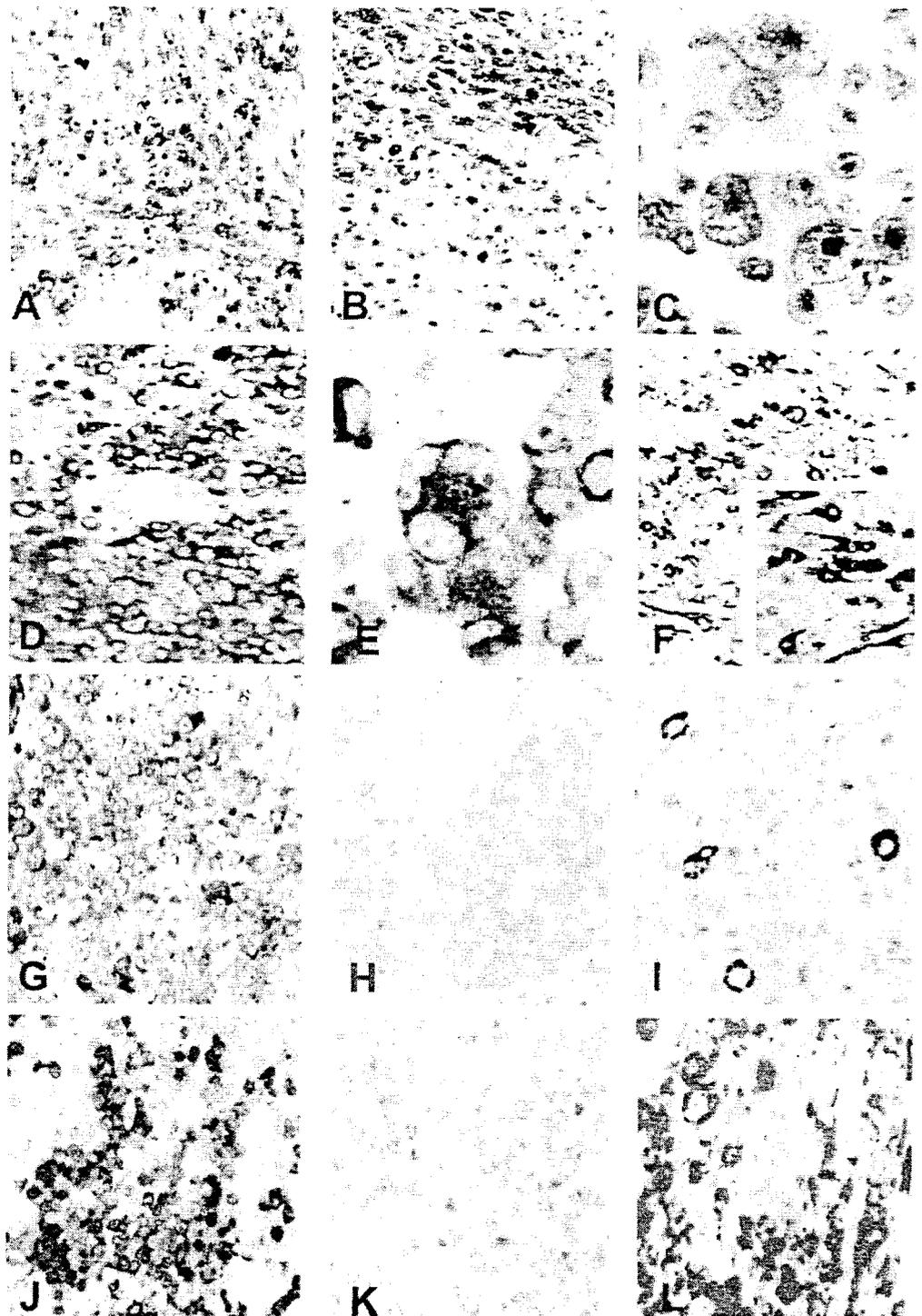


Figure 2. A: An area of small cells adjacent to large and globular cells with vesicular nuclei bearing prominent nucleolus; HE original magnification $\times 250$. B: Large-cell areas surrounding a nodule of small cells; HE original magnification $\times 250$. C: Higher magnification of large-cells and multinucleated giant cell with a prominent nucleolus; HE, original magnification $\times 1,000$. D: All the cells exhibit a strong paranuclear immunoreactivity for synaptophysin; original magnification $\times 250$. E: Large multinucleated cell with a diffuse intracytoplasmic immunoreactivity for synaptophysin; original magnification $\times 1,000$. F: Strong immunoreactivity for neurofilament within numerous large cells; original magnification $\times 250$, inset: higher magnification of this strong reactivity filling the cytoplasm and the processes; original magnification $\times 400$. G: A weak chromogranin immunoreactivity is found in nearly all the cells; original magnification $\times 250$. H: No immunoreactivity for Pax-6 in the small cells as well as in the large cells; original magnification $\times 250$. I: Immunoreactivity for vimentin strictly observed at the level vessel; original magnification $\times 250$. J: Immunohistochemical studies show that the large cells and few small cells are strongly reactive with arrestin; original magnification $\times 250$. K: Lack of immunoreactivity for rhodopsin in both components. L: In adjacent slides, a strong immunoreactivity for neurofilament is observed in large-cell cytoplasm and in their processes while same cells are immunoreactive for arrestin (Figure 2j); original magnification $\times 400$.

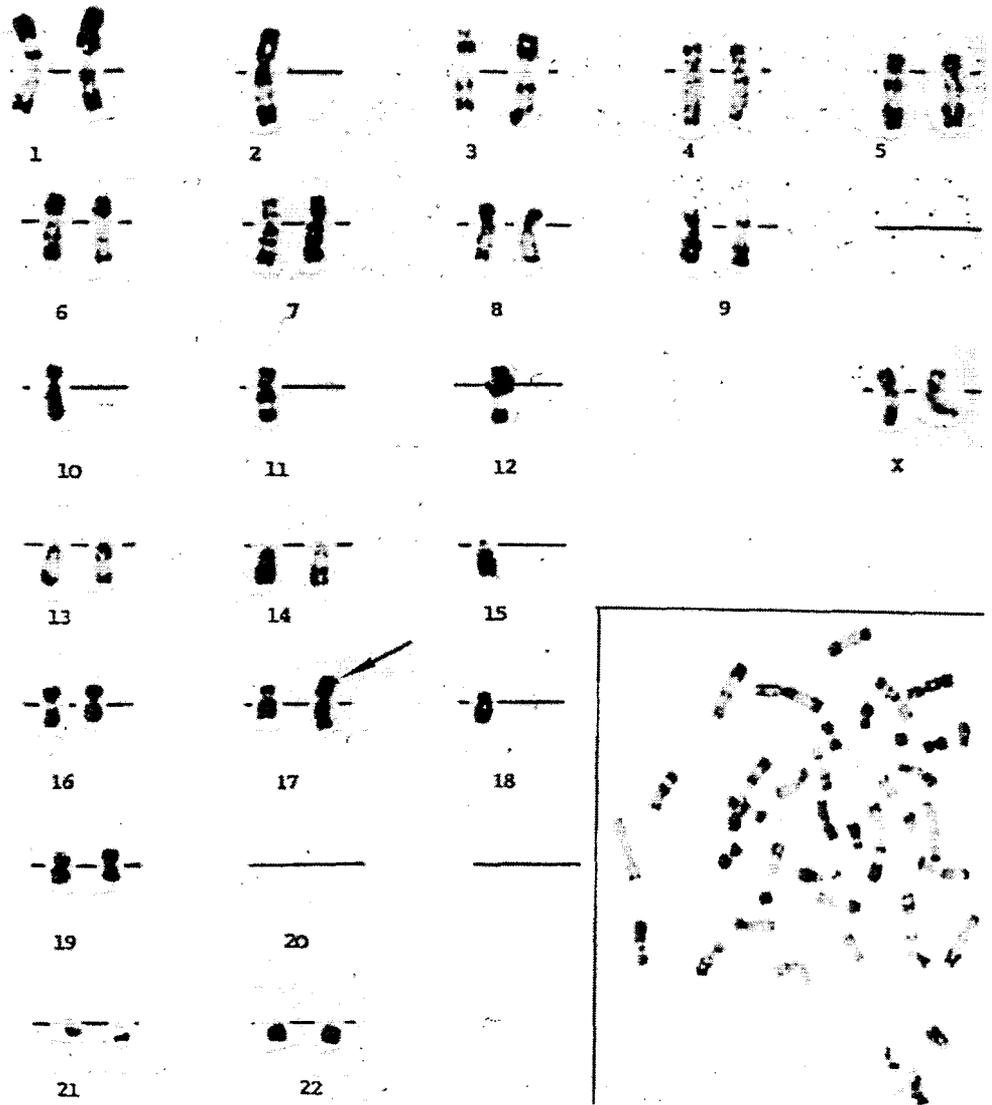


Figure 3. The karyotype analysis of tumor cells (8 cells) shows an isochromosome 17q.

Polymerase chain reaction (PCR)

Sense and anti-sense oligonucleotide primer pairs were synthesized to match the sequences of Arr and β -actin as listed in Table 2. PCR was performed with 6 μ l of cDNA. The assay mixture contained 2.5 units Taq DNA polymerase (BRL), 200 μ M respective oligonucleotide primers, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl and 1.5 mM $MgCl_2$ in a volume of 50 μ l. The mixture was overlaid with mineral oil (Sigma) and amplified in a thermal cycler (Crocodile III-Appligene). Denaturation was carried out at 93 $^{\circ}C$ for 1 min (3 min in the first cycle) followed by an annealing step at 55 $^{\circ}C$ or 61 $^{\circ}C$ (depending on primers) for 1 min and an extension step at

72 $^{\circ}C$ for 1 min (10 min in the last cycle) to a total of 25 cycles for β -actin and 35 for Arr; 101 of PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose (BRL) gels containing ethidium bromide in 45 mM Tris borate and 1 mM EDTA (TBE buffer) [Sambrook et al. 1989]. A negative H_2O control was amplified to check the PCR [Ungerer et al. 1994].

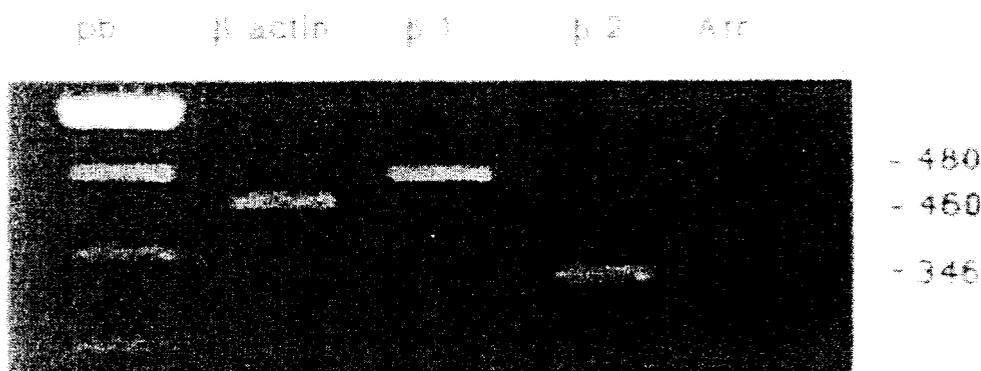
Results

Histology

The tumor exhibited a biphasic pattern (Figure 2). The main component consisted of large cells with large and round vesicular nu-

Table 2. Amino acid sequence of epitope from monoclonal antibody S2D2 to retinal arrestin in arrestin and arrestin-like proteins.

Arr	S2D2										
	40										50
Bovine retina	P	V	D	G	V	V	L	V	D	P	E
Human retina	P	V	D	G	V	V	L	V	D	P	E
Mouse retina	P	V	D	G	V	V	L	V	D	P	E
Rat pineal and retina	P	V	D	G	V	V	L	V	D	P	E
β Arr 1											
Bovine β-arrestin 1	P	V	D	G	V	V	L	V	D	P	E
Rat β-arrestin 1	P	V	D	G	V	V	L	V	D	P	E
β Arr 2											
Bovine arrestin 3	P	V	D	G	V	V	L	V	D	P	D
Human arrestin 3	P	V	D	G	V	V	L	V	D	P	D
Rat β-arrestin 2	P	V	D	G	V	V	L	V	D	P	D
X-Arr											
Human X-arrestin	P	I	D	G	V	V	L	V	D	P	E

Figure 4. Agarose gel analysis of PCR products of medulloblastoma tumor cells by visual arrestin, β_1 , β_2 arrestins and β actin-specific primers. The size of PCR products corresponded to the predicted length of 460 bp for β -actin, 480 and 346 for β_1 , β_2 arrestins, respectively, neither was observed for visual arrestin.

clei with bright red nucleoli mimicking an intranuclear inclusion. Their cytoplasm was eosinophilic but lacking hyalin inclusion (Figure 2B,C). Extensive lack of necrosis and was common in the large-cell fields. Intermingled with the first component, often with abrupt transitions, sheets of dense small cells displayed round regular nuclei (Figure 2A). Few scattered Homer-Wright rosettes were present. Some transitional cells might be seen between the 2 components. Mitoses were frequent in both cell types.

Immunohistochemistry

The results of immunohistochemical study are summarized in Table 1. Synapto-

physin and NSE expression was found in 90% of the cells either as a rim close to the nucleus in the small cell component or as a large inclusion occupying the cytoplasm of the large-cell component (Figure 2D,E).

A weaker expression for chromogranin was found (Figure 2G). Cells corresponded to reactive cells. The large and small cells remained consistently negative to smooth muscle actin (α -actin), desmin, epithelial membrane antigen (EMA), myosin, protein S100 (PS100) and keratin. A strong perinuclear and cytoplasmic expression of neurofilament protein (NFP) and Arr was observed in 55% of the large cells (Figure 2F,J,L). On consecutive sections, neurofilament and Arr positivities were found in the same cells. On the other hand, a lack of rhodopsin immunoreactivity

was always observed despite several trials with positive retina controls (Figure 2K). Neither immunoreactivity with developmental neurofilaments nor PAX-6 nuclear reactivity was found in the 2 components (Figure 2H). They both displayed the same rate of Mib-1 reactivity (27%).

Cytogenetic analysis

Cytogenetic analysis was obtained from karyotype directly after a 3-hour collagenase treatment. Chromosomal analysis was performed by routine cytogenetic technique; R banding technique was used for chromosomal identification. It showed the following karyotype: 38 - 45, x, -x, inv(1)(p21; q23), -10, -14, i(17)(g10) or dup(17)(g12; g25)cp[8] (Figure 3).

PCR analysis

To determine the levels of for visual Arr, β_1 Arr, β_2 Arr and β -actin, PCR was carried out with RNA prepared from tumor cells. Figure 4 shows the PCR products analyzed on agarose gels. β_1 Arr, β_2 Arr and β -actin primers were used. The size of the PCR products corresponded to the predicted lengths as presented in Table 2. PCR analysis confirmed the presence of mRNA for β_1 Arr and β_2 Arr but not visual Arr in MB tumor cells.

Discussion

The present case fulfills the histological, immunophenotypical and cytogenetic criteria for LCMB. Moreover, the very aggressive behavior despite radio- and chemotherapy supports the original concept of the poor prognosis associated with this variant. Immunophenotypes observed in this neoplasm were similar to those observed in some classic MB for synaptophysin [Burger et al. 1987], neurofilament [Gould et al. 1990, Tremblay et al. 1985] and Arr [Korf et al. 1987]. Thus, the presence of such differentiation in the posterior fossa confirmed the multipotentiality and the memory of germinative cells. Nevertheless, numerous cells (~ 55%) were clearly immunoreactive with Arr, which actu-

ally is unusual. Furthermore, these cells lack rhodopsin immunoreactivity in opposition to other MBs tested in our laboratory and in previous reports [Czerwionka et al. 1989, Korf et al. 1987]. Interestingly, this immunoreactive profile was never found in 4 kindly committed LCMBs and 2 committed anaplastic MBs (personal data). On the other hand, the expression of vimentin was never noticed in our case but observed as well in LCMBs as in anaplastic MBs.

The monoclonal antibodies used for this study recognized all Arr-like proteins (Figure 4). Recent studies suggest a significant diversity in the Arr gene family with 4 mammalian Arrs having been identified to date [Craft et al. 1994, Lohse et al. 1990, Shinohara et al. 1987]. The mammalian Arrs included visual Arr, which is predominantly localized in rods and appears to play a primary role in quenching phototransduction [Kuhn and Wilden 1987, Kuhn et al. 1984]; β -Arr which may play a role in desensitization of β_2 -adrenergic receptor [Lohse et al. 1990, 1992]; Arr 3 (also termed β -Arr 2) may interact with the β_2 -adrenergic receptor and may be with odorant receptor [Dawson et al. 1993, Rapoport et al. 1992, Sterne-Marx et al. 1993] and a retinal-specific Arr termed X-Arr [Murakami et al. 1993] or C-Arr [Craft et al. 1994]. By RT and RT-PCR method using primers for β_1 , β_2 and visual Arr, we demonstrate a corresponding mRNA for β_1 , β_2 Arrs but not for the visual Arr. These results are in agreement with absence of rhodopsin (photopigment) and PAX-6 (neuroretina-specific enhancer) [Plaza et al. 1995] immunoreactivity in these tumor cells although PAX-6 immunoreactivity has never been observed in differentiated cell nuclei in our personal experience [Vincent et al. 1996]. Finally, our data suggest that this LCMB has no photoreceptor characterization.

In MBs cells, several G-protein-coupled receptors have been described in particular somatostatin and substance P [Gould et al. 1990]. Here, the amplification of a stimulus-mediated signal is achieved by the agonist-mediated receptor activation of several G-proteins as well as by the enzymatic conversion of the effector molecules modulated by G-proteins. Deactivation of these receptors involves G-protein-coupled receptor kinases [Freedman et al. 1995] and Arr [Fergu-

son et al. 1996]. Similarly, β -Arr but not visual Arr acts as clathrin adaptor in the endocytosis of β_2 -adrenergic receptor [Goodman et al. 1996]. Thus, tumor cell Arr could be implicated in receptor desensitization and receptor internalization.

Cytogenetic determination of the karyotypic profile of this tumor showed an i(17q). Approximately 50% of MB show this change [Griffin et al. 1988]. The recent characterization of p53 as an important tumor suppressor gene and its localization to chromosome 17p has made it a possible candidate as a tumor suppressor gene in MBs.

In summary, this case report corresponds to a new LCMB subtype which presents a new immunophenotype (β -arrestin). It emphasizes the interest of systematic immunohistochemical studies of synaptophysin, arrestin and rhodopsin. The lack of rhodopsin in cells dramatically reactive with arrestin could be a significant finding about the presence of another type of arrestin, unfortunately associated with a poor prognosis despite the patient's age. The study of β_2 -adrenergic receptor machinery deserves further study of its pathogenetic role and possible therapeutic implications.

Acknowledgments

The authors thank Pr. P. Burger for providing tumor samples. They are grateful to Pr. L. Rorke and Pr. P. Burger for helpful discussion. They thank M. Henneron for technical assistance. This work was supported by grants from the Ligue Française Départementale du Nord de lutte contre le cancer.

This work was presented in part to the Société Française de Neuropathologie in May 2001.

References

- Bonnin JM, Perentes E 1988 Retinal S-antigen immunoreactivity in medulloblastomas. *Acta Neuropathol (Berl)* 76: 204-207
- Burger PC, Grahmann FC, Blietle A, Kleihues P 1987 Differentiation in the medulloblastoma. A histological and immunohistochemical study. *Acta Neuropathol (Berl)* 73: 115-123
- Chomczynsky P, Sacchi N 1987 Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159
- Craft CM, Whitmore DH, Wiechmann AF 1994 Cone arrestin identified by targeting expression of a functional family. *J Biol Chem* 269: 4613-4619
- Czerwionka M, Korf HW, Hoffmann O, Busch H, Schachenmayr W 1989 Differentiation in medulloblastomas: correlation between the immunocytochemical demonstration of photoreceptor markers (S-antigen, rodopsin) and the survival rate in 66 patients. *Acta Neuropathol (Berl)* 78: 629-636
- Dawson TM, Arriza JL, Jaworsky DE, Borisy FF, Attramadal H, Lefkowitz RJ, Ronnett GV 1993 Beta-adrenergic receptor kinase-2 and beta-arrestin-2 as mediators of odorant-induced desensitization. *Science* 259: 825-829
- Donoso LA, Felberg NT 1985 Retinal S-antigen and retinoblastoma: a monoclonal antibody and flow cytometric study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 568-571
- Ferguson SS, Barak LS, Zhang J, Caron MG 1996 G-protein-coupled receptor regulation: role of G-protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Can J Physiol Pharmacol* 74: 1095-1110
- Freedman NJ, Liggett SB, Drachman DE, Pei G, Caron MG, Lefkowitz RJ 1995 Phosphorylation and desensitization of the human beta₁-adrenergic receptor. Involvement of G-protein-coupled receptor kinases and cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 270: 17953-17961
- Giangaspero F, Rigobello L, Badiali M, Loda M, Andreini L, Basso G, Zorzi F, Montaldi A 1992 Large-cell medulloblastomas. A distinct variant with highly aggressive behavior. *Am J Surg Pathol* 16: 687-693
- Goodman OB, Krupnick JG, Santini F, Gurevich VV, Penn B, Gagnon A W, Keen JH, Benovic JL 1996 Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta₂-adrenergic receptor. *Nature* 383: 447-450
- Gould VE, Jansson DS, Molenaar WM, Rorke LB, Trojanowski JQ, Lee VM, Packer RJ, Franke WW 1990 Primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. Patterns of expressions of neuroendocrine markers and all classes of intermediate filament proteins. *Lab Invest* 62: 498-509
- Griffin CA, Hawkins AL, Packer RJ, Rorke LB, Emanuel BS 1988 Chromosome abnormalities in pediatric brain tumors. *Cancer Res* 48: 175-180
- Jahns R, Borgese F, Lindenthal S, Straub A, Motais R, Fievet B 1996 Trout red blood cell arrestin (TRCarr), a novel member of the arrestin family: cloning, immunoprecipitation and expression of recombinant TRCarr. *Biochem J* 316: 497-506
- Korf HW, Czerwionka M, Reiner J, Schachenmayr W, Schalken JJ, de Grip W, Gery I 1987 Immunohistochemical evidence of molecular photoreceptor

- markers in cerebellar medulloblastomas. *Cancer* 60: 1763-1766
- Korf HW, Schachenmayr M, Chader GJ, Wiggert B 1992 Immunocytochemical demonstration of interphotoreceptor retinoid-binding protein in cerebellar medulloblastoma. *Acta Neuropathol (Berl)* 83: 482-487
- Kuhn H, Hall SW, Wilden U 1984 Light-induced binding of 48 kDa protein to photoreceptor membranes is highly enhanced by phosphorylation of rhodopsin. *FEBS Lett* 176: 473-478
- Kuhn H, Wilden U 1987 Deactivation of photoactivated rhodopsin by rhodopsin-kinase and arrestin. *J Recept Res* 7: 283-298
- Lohse MJ, Andexinger S, Pitcher J, Trukawinski S, Codina J, Faure JP, Caron MG, Lefkowitz RJ 1992 Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence and receptor specificity of beta-arrestin and arrestin in the beta₂-adrenergic receptor and rhodopsin systems. *J Biol Chem* 267: 8558-8564
- Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ 1990 Beta-arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* 248: 1547-1550
- Maraziotis T, Perentes E, Karamitopoulou E, Nakagawa Y, Gessaga EC, Probst A, Frankfurter A 1992 Neuron-associated class III beta-tubulin isotype, retinal S-antigen, synaptophysin and glial fibrillary acidic protein in human medulloblastomas: a clinicopathological analysis of 36 cases. *Acta Neuropathol (Berl)* 84: 355-363
- Mirshahi M, Faure JP, Brisson P, Falcon J, Guerlotte J, Collin J 1984 S-antigen immunoreactivity in retinal rods and cones and pineal photosensitive cells. *Biol Cell* 52: 195-198
- Mirshahi M, Boucheix C, Collenot G, Thillaye B, Faure JP 1985 Retinal S-antigen epitopes in vertebrate and invertebrate photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 1016-1021
- Mirshahi M, Boucheix C, Dhermy P, Haye C, Faure JP 1986 Expression of the photoreceptor-specific S-antigen in human retinoblastoma. *Cancer* 57: 1497-1500
- Mirshahi M, Borgese F, Razaghi A, Scheuring U, Garcia RF, Faure JP, Motais R 1989 Immunological detection of arrestin, a phototransduction regulatory protein, in the cytosol of nucleated erythrocytes. *FEBS Lett* 258: 240-243
- Mirshahi M, Razaghi A, Mirshahi SS, Van TV, Faure JP 1991 Immunopurification of an S-antigen-like protein from human platelets. *Thromb Res* 64: 551-558
- Mirshahi M, Razaghi A, Vandewalle A, Cluzeaud F, Tarraf M, Faure JP 1992 Immunodetection and localization of protein(s) related to retinal S-antigen (arrestin) in kidney. *Biol Cell* 76: 175-184
- Murakami A, Yajima T, Sakuma H, McLaren MJ, Inana G 1993 X-arrestin: a new arrestin mapping to the X chromosome. *FEBS Lett* 15: 334
- Plaza S, Dozier C, Turque N, Saule S 1995 The quail Pax-6 (Pax-QNR) mRNAs are expressed from two promoters used differentially during retina development and neuronal differentiation. *Mol Cell Biol* 15: 3344-3353
- Rapoport B, Kaufman KD, Chazenbalk GD 1992 Cloning of a member of the arrestin family from a human thyroid cDNA library. *Mol Cell Endocrinol* 84: 39-43
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T 1989 Molecular cloning, a laboratory manual. In: *Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (eds)* (2nd ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Shi RS, Key ME, Kalra KL 1991 Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 39: 741-748
- Shinohara T, Dietzschold B, Craft CM, Wistow G, Early JJ, Donoso LA, Horwitz J, Tao R 1987 Primary and secondary structure of bovine retinal S antigen (48 kDa protein). *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 6975-6979
- Smith WC, Greenberg RM, Calman BG, Hendrix MM, Hutchinson L, Donoso LA, Batelle BA 1995 Isolation and expression of an arrestin cDNA from the horseshoe crab lateral eye. *J Neurochem* 64: 1-13
- Sterne-Marx R, Gurevich VV, Goldsmith P, Bodine RC, Sanders C, Donoso LA, Benovic JL 1993 Polypeptide variants of beta-arrestin and arrestin 3. *J Biol Chem* 268: 15640-15648
- Tremblay GF, Lee VM, Trojanowski JQ 1985 Expression of vimentin, glial filament, and neurofilament proteins in primitive childhood brain tumors. A comparative immunoblot and immunoperoxidase study. *Acta Neuropathol (Berl)* 68: 239-244
- Ungerer M, Parruti G, Bohm M, Puzicha M, DeBlasi A, Erdmann E, Lohse MJ 1994 Expression of beta-arrestin and Beta-adrenergic receptor kinases in the failing human heart. *Circ Res* 74: 206-213
- Van Veen T, Elofsson R, Hartwig HG, Gery I, Mochizuki M, Cena V, Klein DC 1986 Retinal S-antigen: immunocytochemical and immunochemical studies on distribution in animal photoreceptors and pineal organs. *Exp Biol* 45: 15-25
- Vincent S, Turque N, Plaza S, Dhellemmes P, Hladky JP, Assaker R, Ruchoux MM, Saule S 1996 Differential expression between PAX-6 and EN proteins in medulloblastomas. *J Oncol* 8: 901-910

Intracerebral medulloepithelioma with a long survival

S. Vincent¹, P. Dhellemmes², C.-A. Maurage¹, G. Soto-Ares³, J. Hassoun⁴ and M.-M. Ruchoux¹

¹Neuropathology Department, ²Neurosurgery Department, ³Neuroradiology Department CHRU Lille, and ⁴Pathology Institute, Centre Paoli-Calmette, Marseille, France

Key words

embryonic tumor – fine structure – intraventricular tumor – medulloepithelioma – neural tube-like structures – primitive neuroectodermal tumor

Abstract. This report concerns a 3-month-old boy where neuroimaging examination showed a large, well-circumscribed, mildly heterogeneous tumor arising in the left ventricle. Pathological findings were compatible with a medulloepithelioma. A survey of published cases of medulloepitheliomas showed this tumor to be highly malignant, possibly displaying the entire range of differentiation from embryonal primitive neuroepithelium to mature cells and usually involving the cerebral hemispheres with a very poor prognosis in this location. On the other hand, medulloepitheliomas occurring in the eye or the orbit generally benefit from a gross-total resection and may present a good prognosis. Curiously, the patient reported here is doing well 7 years after the resection without any postoperative treatment. The exclusive intraventricular location of the tumor and its gross-total resection clearly seems to have contributed to this unusual recovery.

Introduction

Medulloepitheliomas are generally considered to be the most malignant cerebral tumors. The overall published survival time was dismal with a median duration of 5 months [Molloy et al. 1996]. Medulloepitheliomas are rare tumors of the primitive medullary epithelium. The histopathological characteristics mainly consist of a net-like pattern of pseudostratified primitive-like epithelium, associated with focal areas displaying multiple lines of differentiation including neuronal, glial and mesenchymal elements [Auer and Becker 1983, Bonnin et al. 1984, Caccamo et al. 1989, Cruz-Sanchez et al. 1988, Jellinger 1972, Karch and Ulrich 1972, Molloy et al. 1996, Scheithauer and Rubinstein 1979]. The fine structure of the medulloepithelioma is similar

to that of a fetal neural tube with the association of cells with different developmental features. In the present paper, the immunohistochemical and ultrastructural characteristics of medulloepithelioma are reviewed and a new case is added, which is of interest for its unusual location and the remarkable prognosis.

Case report

A 3-month-old boy was admitted to the hospital with vomiting that had started 24 hours before. Rapidly the fontanelles were distended and the baby became subcomatous. A derivation improved the baby's state and MRI examinations showed a 6 cm lobulated mass in the body and atrium of the right lateral ventricle. This mass was fixed on the choroid plexus (Figure 1a,b,c).

Surgery revealed a large hemorrhagic tumor presenting a cauliflower aspect.

Despite the voluminous size of the tumor, a complete resection was attempted with success. The subsequent course was uneventful. Secondly, a hydrocephaly appeared, confirmed through computerized tomography which revealed no evidence of any tumor. Retroperitoneal derivation was placed followed by the baby's improvement. No abnormal cells were ever found through CSF examinations during the following 48 months.

Methods

Some surgical fragments were fixed in acetic acid formaldehyde-ethanol and embedded in paraffin for light microscopy. The paraffin sections were stained by hematoxy-

Received
December 21, 2000;
accepted in revised form
February 5, 2002

Correspondence to
Dr. M.-M. Ruchoux
Neuropathology Department,
Hospital Roger Salengro, CHRU,
F-59037 Lille, France
mmruchoux@chru-lille.fr

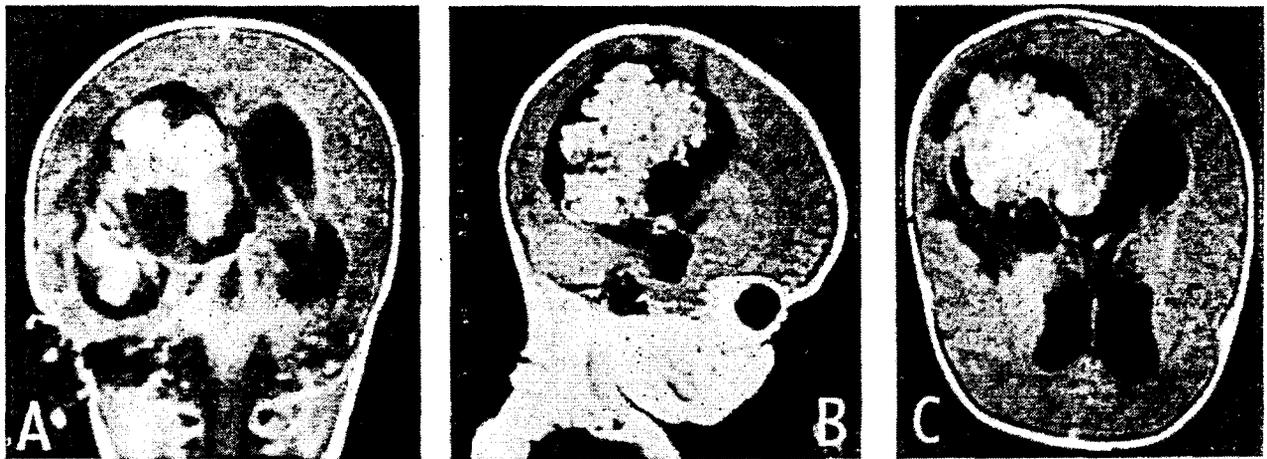


Figure 1a,c. Coronal post-contrast T₁-weighted MR scan shows lobulated mass in the body and atrium of the right lateral ventricle. Lateral ventricle are enlarged. Note the intense enhancement of the mass when compared with Figure b; b: sagittal post-contrast T₁-weighted image shows an homogeneously enhancing mass in the atrium of the right lateral ventricle. Some slight surface lobulation is apparent. Ventricular wall is well-defined and hypointensity of adjacent brain parenchyma suggests edema.

Table 1. Summary of results obtained with immunohistochemistry.

Antibody (Type)	Dilution	Source	Tumor localization NTL	Patternless areas	Differentiated papillary lining	Vessels
GFAP (p)	1/500	Dako	-	+	++	-
Protein S100 (p)	1/400	Dako	-	+	++	-
EMA (m)	1/100	Dako	a+	+	+	+
Cytokeratin (m)	1/50	Immunotech	a+++	-	+	-
Vimentin (m)	1/50	Dako	b+++	+	b+	++
Actin (m)	1	Amersham	-	-	-	+
Desmin (m)	1/20	Sigma	-	-	-	+
α-actin (m)	1	Immunotech	-	-	-	++
Myosin (p)	1/20	Sigma	-	-	-	-
β-tubulin (m)	1/100	Amersham	d++	d+	-	-
NSE (p)	1/200	Dako	d++	d++	d++	-
NFP (m)	1/100	Dako	-	-	-	-
NFP 68 (m)	1/40	Sigma	-	-	-	-
NFP 120 (m)	1/40	Sigma	-	-	-	-
NFP 200 (m)	1/40	Sigma	-	-	-	-
SYN (p)	1/100	Dako	-	++	-	-
Chromogranin (p)	1/500	Dako	-	++	-	-
AgS (p)	1/1000	U86 Paris	-	-	-	-
Pax-6 (p) (30)	1/100	Pasteur	-	-	-	-
Engrailed (30) (EN)	1/100	Pasteur	-	-	-	-
Gastrin	1/100	Dako	-	-	-	-
VIP	1/100	Menarini	-	-	-	-

a = apical surface, b = basal surface, d = diffuse in the cytoplasm, m = monoclonal, p = polyclonal, + = scattered positive cells, ++ = groups of positive cells, +++ = strong staining of many tumor cells.

lin-eosin (HE), periodic acid-Schiff (PAS), Alcian blue and Wilder for reticulin. Other fragments of 1 mm thickness were fixed in 2.5 glutaraldehyde and cacodylate buffer, post-fixed in 1% osmic acid solution in 0.4 mol/l cacodylate buffer and embedded in epoxy resin. Ultrathin sections were cut and con-

trasted with uranyl acetate and lead citrate. For immunohistochemical study of cellular antigens, 5 μm thick paraffin slides of surgical material were treated with corresponding antisera summarized in Table 1 and stained with the avidin-biotin complex (ABC) method from Dakopatts.

The immunoreactivities of Pax-6, Engrailed-2 (EN) and MIB-1 detecting the Ki-67 antigen were enhanced using fixation and microwave enhancement. Percent MIB-1 labeling was quantified by counting stained and unstained nuclei in 10 high-power fields (approximately 1,600 cells).

Results

Gross examination revealed a cauliflower-shaped tumor showing the characteristic pattern of a papilloma. However, some unusual gray-tan solid portions were noticed.

The histological examination again showed the papillary pattern associated with a net-like pattern of pseudostratified primitive-like epithelium arranged in well-defined gland-like structures and tubes called neural tube-like (NTL) by Molloy et al. [1996] (Figure 2a,b). These tall pseudostratified columnar cells covering papillary, tube or trabecular structures presented hyperchromatic long cigar-shaped nuclei. Mitotic figures were frequent and somewhat more frequent in the luminal cell of the tubular and papillary spaces (Figure 2b). This pseudostratified epithelium was outlined by apparent internal and external PAS limitant membranes. Merging with the dominant cell pattern, several other arrangements were scattered throughout the tumor. At a few points, randomly dense cellular, patternless areas containing undifferentiated cells with irregular hyperchromatic nuclei could be seen to lie in direct continuity with the columnar pseudostratified epithelium (Figure 2a).

The NTL and undifferentiated areas rested upon a stroma which was predominantly vascular consisting of scant fibrous material and numerous capillaries never showing the endothelial capillary proliferation, characteristic of malignant gliomas.

The differentiation markers used in this study are summarized in Table 1. Only vimentin was found overlining the internal membrane or in scattered cytoplasm of the NTL cells (Figure 2d). EMA and cytokeratin were randomly observed as regular dotted lines localized either at the luminal surface of the NTL or at the luminal surface of the dense cellular, patternless areas (Figure 2h). In the small clumps or clusters of round cells and in the patternless areas, scattered delicate im-

munoreactivities for GFAP, synaptophysin (SYN) or chromogranin were observed (Figure 2e,f,g). Neither immunoreactivities with different neurofilaments were found nor for α -actin, actin, myosin, S antigen (arrestin), VIP and gastrin components. Numerous cells in the NTL and patternless areas were immunoreactive for the β -tubulin as well as for NSE.

Several attempts did not show positive findings neither with Pax-6 nor with EN. Proliferative activity studied with MIB-1 showed a higher number of positive nuclei in the NTL than in the patternless areas (respectively 32% and 23%) (Figure 2c).

Electron microscopic examination disclosed a very primitive undifferentiated epithelium. The major component displayed poorly differentiated cells containing a large long-shaped nucleus with a high nucleocytoplasmic ratio. The cytoplasm contained a few organelles including mitochondria, Golgi apparatus, ribosomes and scattered endoplasmic reticulum (Figure 3a,b). No filamentous material or microtubules could be identified. The nuclei were large with an irregular distribution of a fine chromatin with a small nucleolus. The luminal surface of the epithelium surface was mostly smooth without any surface differentiations such as microvilli, cilia or centrosomes (Figures 3a, 4a). Extensive cell junction complexes consisting of long segments of thickened plasma membranes without filamentous material were found at the lateral surface of the cells near the surface of the epithelium (gap junction) (Figures 3b, 4a,b). The basal surface of the epithelial layer rested on a distinct, continuous, often folded basal membrane. In the patternless areas, the cells were quite isomorphic and polygonal with a nucleus displaying a coarsely-granular chromatin forming small aggregates at the nuclear membrane. A few scattered cells showed a denser cytoplasm with more or less irregularly-shaped nuclei. Their cytoplasm were more abundant and contained many organelles including Golgi apparatus, large mitochondria, developed rough endoplasmic reticulum and polysomes (Figure 4b). Some secretory vesicles with a central dense core were identified in some processes. These processes were observed close to the dense differentiated cells. In some papillary areas or tubes, desmosome complexes and a few basal complexes associated with rare cilia project-

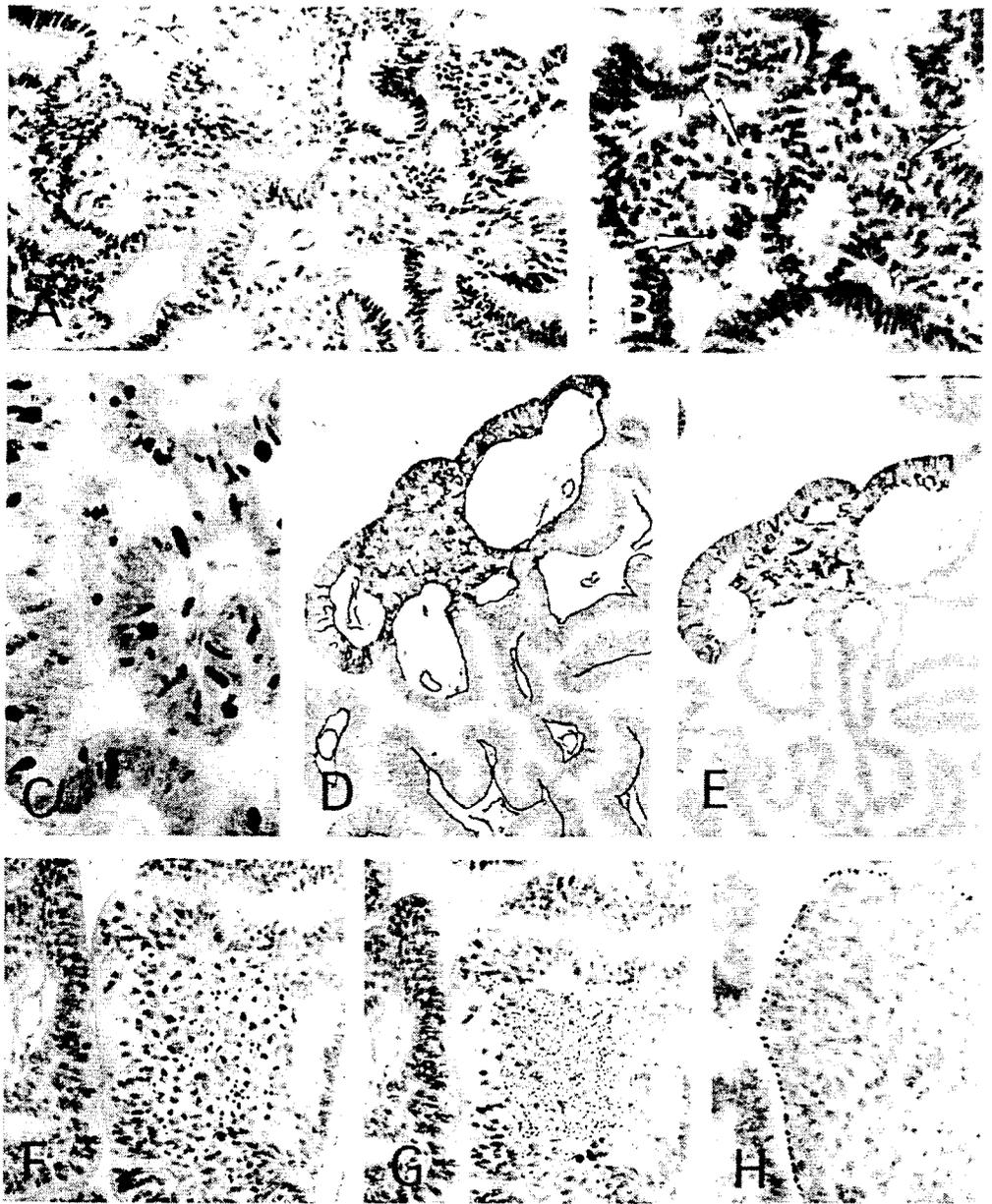


Figure 2a,b. Tubular and papillary structures forming the major component of the tumor merged into dense patternless areas. Papillary, tubular or ribbon-like formations are formed of pseudostratified cells of variable height. Mitotic figures were frequent near the luminal surface (arrows). HE original magnification $\times 400$; c: MIB-1 expression in papillary formations with a high MIB-1 index, original magnification $\times 400$; d, e: vimentin (d) and GFA protein (e) immunostainings on consecutive slides. GFA protein immunostaining is observed in the patternless areas and not in the papillary or tubular formations. Vimentin immunostaining is shown in the same areas as well as in the papillary, tubular formations and vascular basal membrane, original magnification $\times 250$; f,g,h: consecutive slides of the patternless area observed in a and respectively immunostained with chromogranin, synaptophysin and cyokeratin, original magnification $\times 250$; f: only the patternless area cells show a cytoplasmic chromogranin immunostaining while no immunostaining was observed within the columnar cells; g: synaptophysin immunostaining is more delicate and found around the cells in the same location as chromogranin immunostaining; h: dotted line: cyokeratin immunostaining only observed at the luminal surface of the patternless area.

ing into the lumina or microvilli at the luminal surface were also found. These findings were rare and probably were reminiscent of occasional ependymal (cilia) or choroidal (desmosomes, microvilli) differentiation.

More frequently, the cells were densely arranged and only separated by small gaps (Figure 4a,b). Mitoses were frequent and tended to abound near the luminal surface of the columnar epithelium.

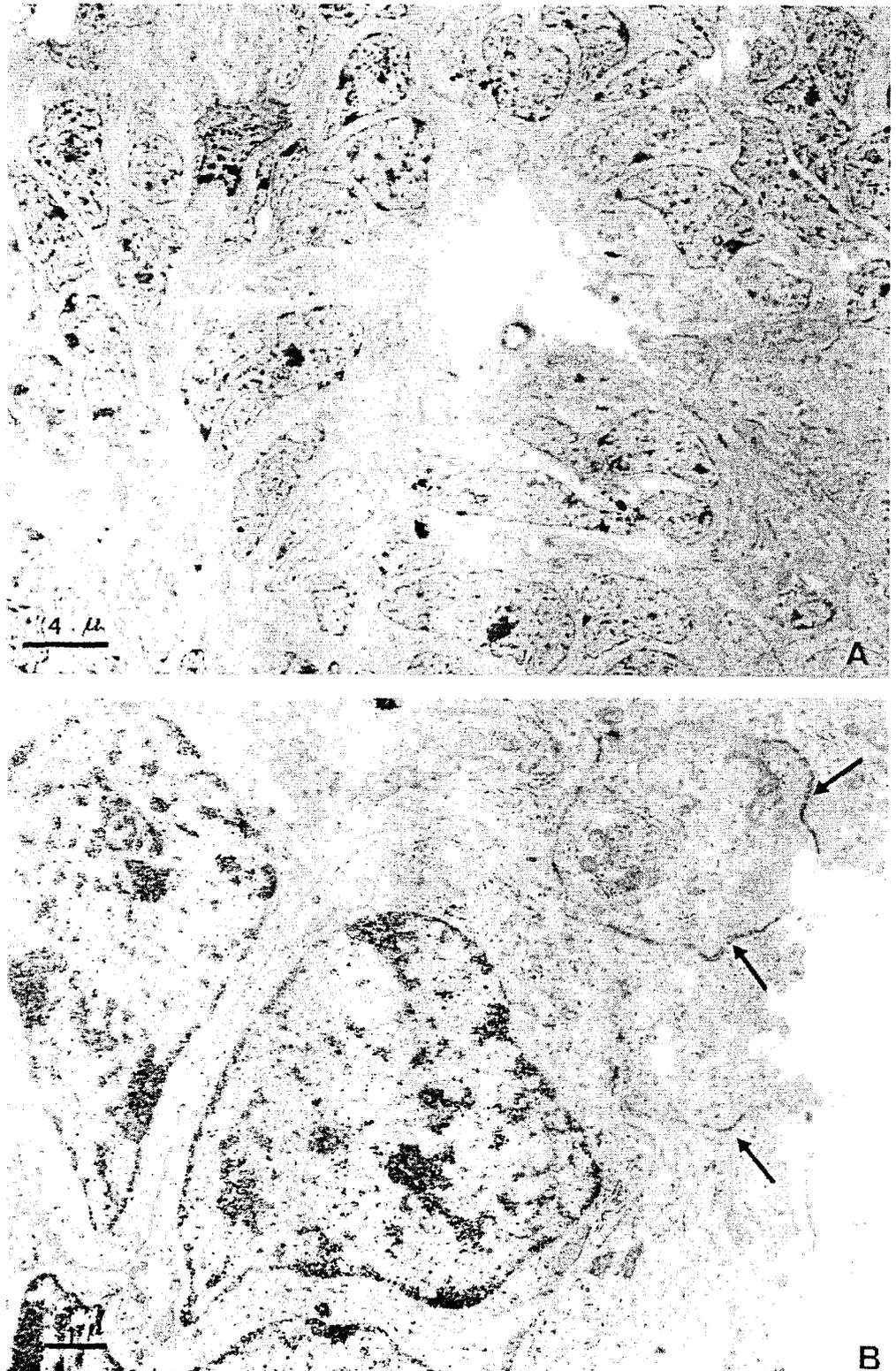


Figure 3a,b. Tube formation. The luminal surface shows amorphous material. Rare lobulated microvilli are better seen with a higher magnification (b) as well as the long-shaped junction complexes near the lumen (arrow). Apical cell surface lacks cilia; a \times 2,600, b \times 10,550.

Discussion

The medulloepithelioma is a rare primitive neuroectodermal tumor whose main

histological feature is the presence of primitive pseudostratified epithelium. Molloy et al. [1996] in a report of 8 cases with a review of literature gave the histological and immuno-

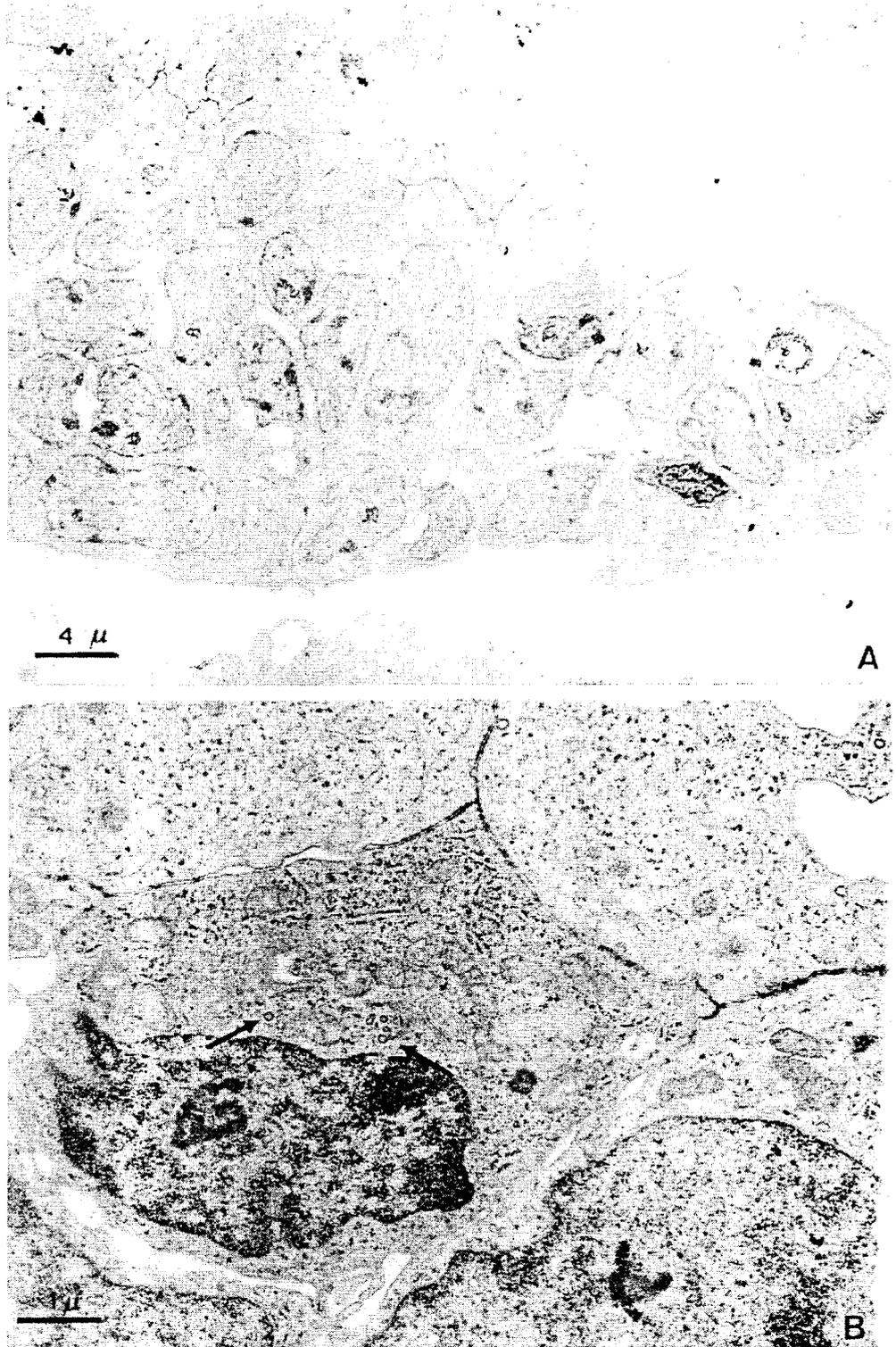


Figure 4a,b. Papillary structure displaying uniformity of nuclei and scarcity of cytoplasm which contains few organelles. Gap junctions are observed between the cells except those located near the luminal part which are joined with junction complexes. One cell exhibits a denser cytoplasm with numerous mitochondria, polyosomes and clear vesicles (arrow) better seen with the Figure b magnification; a \times 2,600, b \times 13,800.

histological characteristics. The present case appeared to fulfill most of their criteria as well as the histological criteria originally laid down by Bailey and Cushing [1926]. The re-

ported case displayed extensive papillary and tubular formations and some highly-cellular patternless areas of cells, the latter presenting divergent differentiation into glial and neuro-

nal cell lines. Altogether, these features correspond to the previous descriptions of medulloepithelioma reported by Molloy et al. [1996]. However, in the present tumor, there are some features of ependymal and choroidal differentiations, but the luminal cell surfaces were smooth without microvilli or cilia ruling out the possible diagnoses of carcinoma of choroid plexus, malignant papillary ependymoma or even diagnosis of a benign tubular adenoma of the choroid plexus [Varga et al. 1996]. Moreover, the previous diagnoses did not fit in with the presence of neuronal cells identified with synaptophysin and chromogranin mixed with GFAP cells in an intraventricular tumor without infiltration of the adjacent parenchyma. Interestingly, the presence of these components, immunohistologically well identified in these patternless areas, confirmed the statement of Jellinger [1972] who ascertained that these cells were adequate to primitive cells of the germinal matrix next to the lumen of the original neural tube and that the presence of glial cell differentiation is adequate to the third stage of cytogenesis. Even though ependymal differentiation was rarely found, this differentiation is suggested by the presence of a dotted line cytokeratin reactivity at the luminal surface and could represent the maturation of residual germinative cells that have remained situated next to the lumen of the original neural tube, also occurring in the third stage of cytogenesis [Jellinger 1972]. In our case, immunohistochemical studies showed reactivity for vimentin and β -tubulin as in some previous reports [Caccamo et al. 1989, Figarella-Branger et al. 1992, Molloy et al. 1996]. Vimentin is the first intermediate filament protein demonstrated in the early stage of the developing mammalian neural tube [Sasaki et al. 1988]. The β -tubulin appears to be expressed selectively in neurons of the central and peripheral nervous systems and in Sertoli cells of the testis [Frankfurter et al. 1986] and according to Caccamo et al. [1989], it appears to be one of the earliest and most specific markers indicative of differentiation along a neuronal lineage. On the other hand, the dotted line luminal reactivity for cytokeratin and, to a lesser degree, for EMA seems difficult to elucidate and were previously reported in an ectopic intrapelvic medulloepithelioma [Figarella-Branger et al.

1992]. This peculiar dotted line reactivity was found in 2 different laboratories using different methods. Thus, this reactivity seems to be significant. It might correspond to foci of ependymal or choroid differentiation since some tumor areas showed ependymal and choroid features and since immunoreactivity for cytokeratin was demonstrated in some ependymomas and choroid plexus papillomas [Mannoji and Becker 1988]. However, the cytokeratin reactivity is exclusively observed at the luminal side of the columnar epithelial cells even though columnar cells overlined the patternless areas where synaptophysin and GFAP reactivities were always found. These areas definitely correspond to germinative matrix and not to an infiltration of a choroid plexus carcinoma since the tumor was exclusively intraventricular. It was demonstrated that the cytokeratin antibodies did not stain some epithelia, including the neural plate and the neural tube [Erickson et al. 1978]. During formation of germ cell layers, cytokeratin expression is associated with the appearance of an integral epithelium (ectoderm), whereas vimentin expression is associated with cells that detach and migrate from this epithelium [Pollak and Friede 1977]. The central nervous system (CNS) arises from the neural plate, a cytologically-homogeneous sheet of epithelial cells that form the dorsal surface of the gastrula-stage embryo. The neural plate subsequently rolls up on its anteroposterior axis to form a tube. These early morphological features of the neuraxis are accompanied by position-specific expression of developmental control genes. Neural fate is imparted to competent ectoderm by signals. According to Scheithauer and Rubinstein [1979], medulloepitheliomas may express all the stages of central neurogenic maturation from the most embryonal to the most differentiated cell types in a single tumor. In the normal course of events, some genes and/or factors antagonize the signal mediated by the transforming growth factor- β (TGF- β)-like protein and the bone morphogenic protein 4 (BMP4), which represses neural and promotes epidermal cell fate [Troost et al. 1990]. These genes could be impaired somewhere in the multiple NTL. The probable production of partial loss-of-function as well as gain-of-function mutations in medulloepithelioma could explain

the retaining of some intermediate-filament types like cytokeratin observed at the luminal part of some dense cellular patternless areas in this tumor.

The studies carried out with pax-6 and EN did not reveal any reactivity in any of medulloepitheliomas analyzed ($n = 4$) (personal data unpublished) unlike our previous results obtained with medulloblastomas [Vincent et al. 1996]. Pax-6 and EN correspond to 2 homeobox proteins involved in the transcriptional regulation coordinating the CNS development [Davis et al. 1991, Hanks et al. 1995, Martin et al. 1992, Turque et al. 1994, Walther and Gruss 1991]. These results could be of some interest since both genes became involved in the embryogenesis later than the neural induction. They are involved in the regionalization and patterning stage [Joyner and Guillemot 1994]. EN-1 is first detected at the 1 somite stage [McMahon et al. 1992] whereas pax-6 is detected a few hours later, at the 4 somite stage, like EN-2 [McMahon et al. 1992, Walther and Gruss 1991]. Moreover, pax-6 is mostly expressed in the optic cup, in the ventricular zone and the external granular layer of the developing cerebellum and we did not find pax-6 expression in supratentorial PNET [Vincent et al. 1996]. EN-1 and EN-2 have been identified, both expressed in a band in the early neural plate around the mid/hindbrain junction [McMahon et al. 1992] and we only found EN in 2 supratentorial PNET out of 3 [Vincent et al. 1996]. These results suggest that sometimes the affected supratentorial regions do not correspond with the domain of expression of these homeobox-containing genes and finally confirmed that medulloepitheliomas derived from the very first stage of the induction of the neuroepithelium before EN and pax-6 involvement.

The precise relationship of medulloepithelioma to teratoma has been the subject of debate [Scheithauer and Rubinstein 1979], since both share the dual features of being embryonal and multipotential. However, the major distinction of course lies in the more restricted differentiating potential of the medulloepithelioma. On the other hand, ependymoblastoma and medulloepithelioma could be a subject of debate. At the histological level, ependymoblastoma features were usually found along with the ependymal differentia-

tion in medulloepitheliomas [Caccamo et al. 1989, Deck 1969, Molloy et al. 1996, Scheithauer and Rubinstein 1979]. Immunohistological studies showed positive Vim and S-100 in ependymoblastomas [Cruz-Sanchez et al. 1988, 1991] and in medulloepitheliomas with ependymal differentiation [Auer and Becker 1983] as in the present case. By electron microscopy, ependymoblastomas share the same features [Cruz-Sanchez et al. 1988] as medulloepitheliomas [Figarella-Branger et al. 1992, Page 1989, Troost et al. 1990] as we have seen in this present report. Ependymoblastomas and medulloepitheliomas share the same poor prognosis [Cervoni et al. 1995]. Given these similarities between both tumors, one could propose that ependymoblastoma was a predominant histological component among a medulloepithelioma which usually displays other neural and glial components. Moreover, 2 tumors previously diagnosed ependymoblastomas have presented an obvious pattern of medulloepithelioma in their respective recurrences (personal data). Altogether, this data about ependymoblastoma and medulloblastoma suggest that we are observing different stages of neural cell fate of the early development events.

As Molloy et al. [1996] have said earlier, the prognosis of medulloepithelioma is very poor with a median duration of 5 months, and only long-term medulloepithelioma survivors were observed after gross-total resections at diagnosis (respectively alive > 161 and > 44 months). The patients with intra-orbital medulloepithelioma exhibit a much less malignant course and are mostly and only treated with enucleation and they do not show any recurrence [Monchy et al. 1993, Shields et al. 1996]. Our present case of medulloepithelioma was intraventricular without infiltration of the neighboring cerebral tissue. No other treatment except surgery could be proposed at 3 months of age. Seven years (89 months) later, the child has a perfect long-term survival without recurrence. According to Molloy et al. [1996], the best treatment of medulloepithelioma seems to be a gross-total resection which is perfectly feasible and in fact done in the intraorbital location. The absence of infiltration and the possible gross resection could basically explain the good recovery of the patients and the present intraventricular case seems to confirm this fact.

Acknowledgments

The authors wish to thank Mrs. R. Delpierre, N. Goetinck, M. Henneron and S. Limol for their skillful technical assistance. We gratefully acknowledge the assistance of Nigel Mitchell in the manuscript preparation.

References

- Auer RN, Becker LE 1983 Cerebral medulloepithelioma with bone, cartilage, and striated muscle. Light microscopic and immunohistochemical study. *J Neuropathol Exp Neurol* 42: 256-267
- Bailey P, Cushing H 1926 A classification of tumors of the glioma group on a histogenetic basis with a correlated study of progress. Lippincott, Philadelphia, pp 54-56
- Bonnin JM, Rubinstein LJ, Palmer NF, Beckwith JB 1984 The association of embryonal tumors originating in the kidney and the brain. A report of seven cases. *Cancer* 54: 2137-2146
- Caccamo DV, Herman MM, Rubinstein LJ 1989 An immunohistochemical study of the primitive and maturing elements of human cerebral medulloepitheliomas. *Acta Neuropathol* 79: 248-254
- Cervoni L, Celli P, Trillo G, Caruso R 1995 Ependymoblastoma: a clinical review. *Neurosurg Rev* 18: 189-192
- Cruz-Sanchez FF, Haustein J, Rossi ML, Cervos-Navarro J, Hughes JT 1988 Ependymoblastoma: a histological, immunohistological and ultrastructural study of five cases. *Histopathology* 12: 17-27
- Cruz-Sanchez FF, Rossi ML, Hughes JT, Moss TH 1991 Differentiation in embryonal neuroepithelial tumors of the central nervous system. *Cancer* 67: 965-976
- Davis C, Holmyard D, Millen K, Joyner A 1991 Examining pattern formation in mouse, chicken and frog embryos with an EN-specific antiserum. *Development* 111: 287-298
- Deck JHN 1969 Cerebral medulloepithelioma with maturation into ependymal cells and ganglion cells. *J Neuropathol Exp Neurol* 28: 442-454
- Erickson CA, Tucker RP, Edwards BF 1978 Changes in the distribution of intermediate-filament types in Japanese quail embryos during morphogenesis. *Differentiation* 34: 88-97
- Figarella-Branger D, Gambarelli D, Perez-Castillo M, Genet JC, Grisoli F, Pellissier JF 1992 Ectopic intrapelvic medulloepithelioma: a case report. *Neuropathol Appl Neurobiol* 18: 408-414
- Frankfurter A, Binder LI, Rebhun LI 1986 Limited tissue distribution of a novel beta-tubulin isoform. *J Cell Biol* 103: 273a
- Hanks M, Wurst W, Anson-Cartwright L, Auerbach AB, Joyner A 1995 Rescue of the EN-1 mutant phenotype by replacement of EN-1 with EN-2. *Science* 269: 679-682
- Jellinger K 1972 Cerebral medulloepithelioma. *Acta Neuropathol (Berl)* 22: 95-101
- Joyner AL, Guillemot F 1994 Gene targeting and development of the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 4: 37-42
- Karch SB, Urich H 1972 Medulloepithelioma: definition of an entity. *J Neuropathol Exp Neurol* 31: 27-53
- McMahon AP, Joyner AL, Bradley A, McMahon A 1992 The midbrain-hindbrain phenotype of Wnt-1/Wnt-1-mice results from stepwise deletion of engrailed-expressing cells by 9.5 days postcoitum. *Cell* 69: 581-595
- Munnoji H, Becker LE 1988 Ependymal and choroid plexus tumor cyokeratin and GFAP expression. *Cancer* 61: 1377-1385
- Martin P, Carriere C, Dozier C, Quatannens B, Mirabel M, Vandebunder B, Stehelin D, Saule S 1992 Characterization of a paired box- and homeobox-containing quail gene (pax-QNR) expressed in the neuroretina. *Oncogene* 7: 1721-1728
- Molloy P, Yachnis AT, Rorke LB, Dattilo JJ, Needle MN, Millar WS, Goldwein JW, Sutton LN, Phillips P 1996 Central nervous system medulloepithelioma: a series of eight cases including two arising in the pons. *J Neurosurg* 84: 430-436
- Monchy D, Jacquot P, Dubourdiou D, Huerre M 1993 Malignant teratoid medulloepithelioma of the ciliary body. Apropos of a case and review of the literature. *Arch Anat Cytol Pathol* 41: 107-112
- Page M 1989 Changing patterns of cyokeratins and vimentin in the early chick embryo. *Development* 105: 97-107
- Pollak A, Friede RL 1977 Fine structure of medulloepithelioma. *J Neuropathol Exp Neurol* 36: 712-725
- Sasaki A, Hirato J, Nakazato Y, Ishida Y 1988 Immunohistochemical study of the early human fetal brain. *Acta Neuropathol* 76: 128-134
- Scheithauer BW, Rubinstein LJ 1979 Cerebral medulloepithelioma. Report of a case with multiple divergent neuroepithelial differentiation. *Child's Brain* 5: 62-71
- Shields JA, Eagle RC, Shields CL, Potter PD 1996 Congenital neoplasms of the nonpigmented ciliary epithelium (medulloepithelioma). *Ophthalmology* 103: 1998-2006
- Troost D, Jansen GH, Dingemans KP 1990 Cerebral medulloepithelioma - electron microscopy and immunohistochemistry. *Acta Neuropathol* 80: 103-107
- Turque N, Plaza S, Radvanyi F, Carriere C, Saule S 1994 Pax-QNR/Pax-6, a paired box- and homeobox-containing gene expressed in neurons is also expressed in pancreatic endocrine cells. *Mol Endocrinol* 8: 929-938
- Varga Z, Vajtai I, Marino S, Schauble B, Yonekawa Y, Aguzzi A 1996 Tubular adenoma of the choroid plexus: evidence for glandular differentiation of the neuroepithelium. *Pathol Res Pract* 192: 840-844
- Vincent S, Turque N, Plaza S, Dhellemmes P, Hladky JP, Assaker R, Ruchoux MM, Saule S 1996 Differential expression between PAX-6 and EN proteins in medulloblastoma. *Int J Oncol* 8: 901-910
- Walther C, Gruss P 1991 Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* 113: 1435-1449

Calbindin-D_{28k}

A Marker of Recurrence for Medulloblastomas

Karine Pelc, M.D.¹

Sylvie Vincent, M.Sc.²

Marie-Magdeleine Ruchoux, M.D.²

Robert Kiss, Ph.D.^{3,4}

Roland Pochet, Ph.D.³

Eric Sariban, M.D.⁵

Christine Decaestecker, Ph.D.^{3,4}

Claus W. Heizmann, Ph.D.⁶

¹ Department of Pediatrics, Hôpital des Enfants, Brussels, Belgium.

² Department of Neuropathology, Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille, Hôpital Roger Salengro, Lille, France.

³ Laboratory of Histopathology, Faculty of Medicine, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium.

⁴ Fonds National de la Recherche Scientifique, Brussels, Belgium.

⁵ Department of Oncology, Hôpital des Enfants, Brussels, Belgium.

⁶ Division of Clinical Chemistry and Biochemistry, Department of Pediatrics, University of Zürich, Zürich, Switzerland.

Supported by the Jubiläumsspende für die Universität Zürich.

The authors thanks Drs. Patrick Dhellemmes, M.D. (Clinique de Neurochirurgie Neuropédiatrique, Hôpital Roger Salengro, Lille, France), Paul Hectors, M.D. (Department of Neurosurgery, Hôpital Saint-Pierre, Brussels, Belgium), Benoît Pirotte, M.D. (Department of Neurosurgery, Erasmus Hospital, Brussels, Belgium) and Isabelle Salmon, M.D. (Department of Pathology, Erasmus Hospital, Brussels, Belgium) for supplying tumor specimens. The authors thank M. Killen for critical reading of the article.

Address for reprints: Claus W. Heizmann, Ph.D., Division of Clinical Chemistry and Biochemistry, Department of Pediatrics, University of Zürich, Steinwiesstr. 75, CH-8032 Zürich, Switzerland; Fax: 011 +4112667169; E-mail: heizmann@kispi.unizh.ch

Received October 30, 2000; revision received February 12, 2002; accepted February 19, 2002.

BACKGROUND. The expression of the Ca²⁺-binding protein calbindin-D_{28k} was analyzed in medulloblastomas in relation to clinical features and other biologic markers related to cell proliferation, differentiation, p53, and cerebellar developmental regulated gene expression.

METHODS. Immunohistochemistry was carried out on histologic slides from a first retrospective series of 29 nonmetastatic and 10 metastatic medulloblastoma formalin-fixed, paraffin-embedded tissues, using specific antibodies against calbindin-D_{28k}, calretinin, α -parvalbumin and β -parvalbumin, and S100 proteins. Informed consent was obtained from the subjects and/or guardians. Other biologic markers for differentiation, cell proliferation, the expression of the p53 tumor suppressor gene protein, and cerebellar developmental regulated genes were similarly investigated. A second series of 16 medulloblastomas from young patients (younger than 15 years) was added in order to validate the results obtained in the first series.

RESULTS. Of all the markers investigated, only calbindin-D_{28k} was significantly associated with prognosis. Survival and remission (i.e. recurrence free) time analysis performed on all the cases (n = 55) confirmed a high risk of death (P = 0.004) and recurrence (P = 0.003) associated with calbindin-positivity. As calbindin-positivity was predominantly observed in tumors from young patients, the authors confirmed its prognostic value in the subgroup of patients younger than 15 years (n = 37). Cox regression analysis showed a significant and independent prognostic value for calbindin expression and, to a lesser extent, the type of surgery (total or subtotal). Three risk groups were thus identified, distinguishing among the cases characterized by a total resection and calbindin-negativity (good prognosis), by a subtotal resection and calbindin-negativity (intermediary), and by calbindin-positivity (bad prognosis).

CONCLUSIONS. The current study suggests that calbindin-positive medulloblastomas represent a subclass of aggressive tumors more frequently seen in younger patients. *Cancer* 2002;95:410-9. © 2002 American Cancer Society.

DOI 10.1002/cncr.10666

KEYWORDS: brain medulloblastoma, calbindin-D_{28k}, Ca²⁺-binding protein, recurrence, prognosis.

The brain is the organ most frequently involved in pediatric cancer. Twenty five percent of all pediatric tumors are located in this organ. Medulloblastoma, an embryonal tumor of the cerebellum, accounts for 20% of all brain tumors. This highly aggressive tumor is prone to metastasize within the central nervous system. At the time of presentation, 5-30% are typically reported with metastasis.¹ The survival of patients with medulloblastomas treated with modern therapy ranges from 50 to 70% at 5 years, and from 30 to 50% at 10 years.^{2,3} Despite aggressive surgery and chemotherapy combined with whole brain irradiation and cranio-spinal radiation, the outcome of children

with medulloblastomas has not significantly improved over the last 20 years. In contrast to other childhood tumors, there are no well-recognized pathologic, cytogenetic, or genetic markers for medulloblastomas able to discriminate between good and poor prognosis.⁴

Since Ca²⁺-binding proteins are involved in the regulation of cell proliferation, programmed cell death, and motility,⁵ we investigated the expression of calbindin-D_{28k}, calretinin, parvalbumins, and different S100 proteins in a group of patients suffering from medulloblastomas. We studied these proteins in the blue round tumor cell population (characteristic of medulloblastomas) to evaluate if any correlation exists between their expression levels and clinical presentation, outcome, and other biologic markers for cell proliferation, p53 protein expression, cerebellar development, and differentiation.

The current data show that the expression of calbindin-D_{28k} in tumor cells was highly associated with a poor prognosis and a high risk of tumor recurrence.

MATERIALS AND METHODS

Clinical Data

Two series of medulloblastomas were taken into account in the current study. All the diagnoses were established according to World Health Organization classification.⁶ For homogeneity, the two series focused on diffuse medulloblastomas only and did not include nodular medulloblastomas, large cell medulloblastomas, or rhabdoid teratoid tumors. All the tumors were localized in the posterior fossa.

The first series of 39 cases was obtained from the Roger Salengro University Hospital, Lille, France. A second series of 16 cases, from the Children's University Hospital, Brussels, Belgium, was added to confirm the results observed within the young patient population of the first series. The clinical characteristics of these two series are detailed in Table 1. All patients underwent initial surgery and craniospinal radiotherapy with a boost in the posterior fossa. Except for nine patients without metastasis at the time of diagnosis, all patients also underwent sandwich chemotherapy. From 1993 chemotherapy was administered according to the Société Française d'Oncologie Pédiatrique protocols for medulloblastomas. In these protocols chemotherapy consists of two courses of eight drugs in one day,⁷ followed by two courses of VP-16/carboplatin given before radiation. For high-risk patients (subtotal resection, metastatic disease), these four courses of chemotherapy were also given after radiation.

Three patients of this series who were treated before 1993 received chemotherapy according to the International Society of Pediatric Oncology protocol.⁸

TABLE 1
Clinical Data

Characteristic	Series 1	Series 2
Number of patients	39	16
Study period	12/1992—09/1997	08/1987—06/2001
Male/female ratio	23:16	13:3
Ages (years): range (median) ^a	2-54 (12)	1-14 (8)
Complete/subtotal removal	21/18	11/4
Presence of metastases ^b	10	5
Number of patients who died (mean survival time)	20 (18 months)	8 (17 months)
Number of patients who survived (mean survival time)	19 (49 months)	8 (90 months)
Recurrence (mean time)	20 (12 months)	7 (14 months)

^a At the time of diagnosis (i.e., a few days before surgery).

^b Detected by magnetic resonance imaging or cerebrospinal fluid analysis at the time of diagnosis.

Immunophenotypic Analysis

The tissue specimens were fixed in AFA (acetic acid [5 vol], formaldehyde [20 vol], and alcohol [75 vol]) and embedded in paraffin. Five μ m-thick sections taken from each specimen were subjected to processing with the various antibodies under study and kit reagents.

Six antibodies were routinely applied. They involved glial fibrillary acidic protein (DAKO, Glostrup, DK), neurofilaments (DAKO), neuron-specific enolase (DAKO), chromogranin A (DAKO), synaptophysin (DAKO), and cytokeratins (Immunotech, Marseille, France). Furthermore, Dr. S. Simon, M.D. from the Pasteur Institute, Lille, provided us with sera directed against the PAX-6 gene and the Engrailed protein (EN), two cerebellar developmental regulated genes which might play a role in cerebellar tumors⁹⁻¹² and which have been shown to be expressed at a high frequency in medulloblastomas.^{13,14} An antibody against the retinal S-antigen (S-Ag), a marker for cells differentiating along the photoreceptor lineage, was provided by Dr. M. Mirshahi, M.D.¹⁵ Incubations with these antibodies were carried out at 25 °C \pm 1 °C for 2.5 hours (PAX-6 and EN) or 1 hour (S-Ag) at dilutions of 1/100 for PAX-6 and EN and 1/1000 for S-Ag.

p53, PCNA, and MIB-1 Immunohistochemistry

For p53 immunostaining the immunoglobulin G1 anti-human p53 monoclonal antibody labeled PAB 1801 (dilution 1/50; Biogenex, San Ramon, CA) was used as described previously.¹⁶ The methodology to determine the growth fraction by means of the monoclonal MIB-1 antibody (code no. 0505, dilution 1/50; Immunotech SA, Marseille, France) was used as described previously.¹⁷ The proliferating cell nuclear antigen (PCNA) monoclonal antibody (clone PC10, ref. H7116; dilution 1/50; DAKO) was used to determine the percentage of the

tumor cells in the S-phase of the cell cycle, as described by McKeever et al.¹⁸

The percentages of the p53 immunopositive tumor cells and DNA duplicating cells (i.e., PCNA immunopositive cells) were assessed in 20 distinct fields ($\times 400$) randomly selected in the tumor sections. Similarly to Grotzer et al.,¹⁹ proliferation indices were determined by counting MIB-1 immunopositive tumor cells either in the highest staining region (hot spot MIB-1, labeled HS-MIB1), or in 20 randomly chosen fields (random MIB-1, labeled R-MIB1).

Calcium-binding Protein Immunohistochemistry

As previously detailed,²⁰ incubation with specific antibodies was carried out at 25 °C \pm 1 °C for 60 minutes at the dilutions described below for each probe. The extent of the specifically bound antibodies was shown by avidin-biotin-peroxidase complex kit reagents (Vector Labs, Burlingame, CA), with diaminobenzidine/ H_2O_2 as the chromogenic substrates. The control reactions for each of the different markers under study included the omission of the incubation step for the primary antibody. Counterstaining with Toluidine Blue concluded the processing.

The antibodies against calcium-binding proteins under study concerned calbindin- D_{28k} , calretinin, α -, and β -parvalbumin, and six S100 proteins.

A monoclonal anti-calbindin- D_{28k} antibody and a goat antibody to calretinin were purchased from SWant (Bellinzona, Switzerland). The anti-human recombinant parvalbumin sera were raised in rabbit as detailed previously.²¹ The antibody dilutions were 1/6000 for calbindin- D_{28k} , 1/2000 for calretinin, and 1/1000 for α - and β -parvalbumin.

The anti-human recombinant S100 sera were raised in rabbits (S100A3, S100A5, S100B) and goats (S100A1, S100A4, S100A6) as detailed previously.²²⁻²⁵ The dilutions used for the S100 antibodies were 1/2000 for S100A1, 1/2000 for S100A3, 1/2000 for S100A4, 1/500 for S100A5, 1/10,000 for S100A6, and 1/10,000 for S100B.

Evaluation of Immunohistochemic Staining Relating to Ca^{2+} -binding Proteins

The analysis was carried out according to the methodology adapted from Gamallo et al.²⁶ This methodology was successfully used for evaluating expression of different S100 proteins in colon tumors²⁷ and validated for various tumor types, including medulloblastomas.²⁸ For each calcium-binding protein we estimated the abundance of immunoreactive cells (labeling index [LI] variable) and the staining intensity (staining intensity [SI] variable) in the blue round tumor cells, as illustrated in Fig. 1. The LI variable was

graded from 0 to 2 by counting the percentage of positive cells in at least 20 fields ($\times 400$) per specimen. The LI scores were 0 in the absence of staining (or staining equivalent to background staining in the negative control), 1 when 1-30% of cells were reactive, and 2 when more than 30% of cells were reactive. The SI variable was graded 0 in the absence of staining, 1 where staining was weak to moderate, and 2 where staining was intense. The final LI/S scores for a tissue specimen corresponded to the most frequent of the 20 LI/S scores assessed for each specimen. In the current data, we particularly investigated the distinction between negative (LI = SI = 0) and positive (LI and SI > 0) immunostaining.

Statistical Analysis

Associations between categorical variables were tested by means of chi-square tests. Correlations involving ordinal variables were tested by means of the non-parametric Kendal tests. Mann-Whitney and Student *t* tests were also used to compare two groups of numerical data (depending on the data characteristics).

Survival and remission time analyses were performed using Kaplan-Meier curves and the log-rank test. Remission analysis was performed similarly to a conventional survival analysis, where patients with recurrence were considered to be complete data, and patients without observed recurrences to be censored data.

Standard Cox regression analysis was also used to test the possible simultaneous influence of several variables on the remission/survival time.

All the statistical analyses were carried out with Statistica software (StatSoft, Tulsa, OK).

RESULTS

Expression of Ca^{2+} -binding Proteins in the Medulloblastoma Specimens

Figure 1 illustrates representative staining patterns observed in the current series of medulloblastomas for: A) calbindin- D_{28k} , B) calretinin, C) α -parvalbumin, D) β -parvalbumin, E) S100B, and F) S100A6. Figure 1A illustrates the expression of calbindin in a relatively small percentage of cells (less than 30%). In contrast, as shown in Figure 1B-D, calretinin, α -parvalbumin, and β -parvalbumin exhibited a higher LI (more than 50%, and even more than 75% for β -parvalbumin). Interestingly, neither S100B (Fig. 1E) nor S100A6 (Fig. 1F) were expressed in the blue round tumor cells, as was also the case for S100A3 (see Table 2). However, S100B was expressed in cells presenting astrocytic-like cytoplasmic extensions (Fig. 1E). In the current study, we focused our analysis on the expression of the Ca^{2+} -binding proteins in the small blue round cell population only.

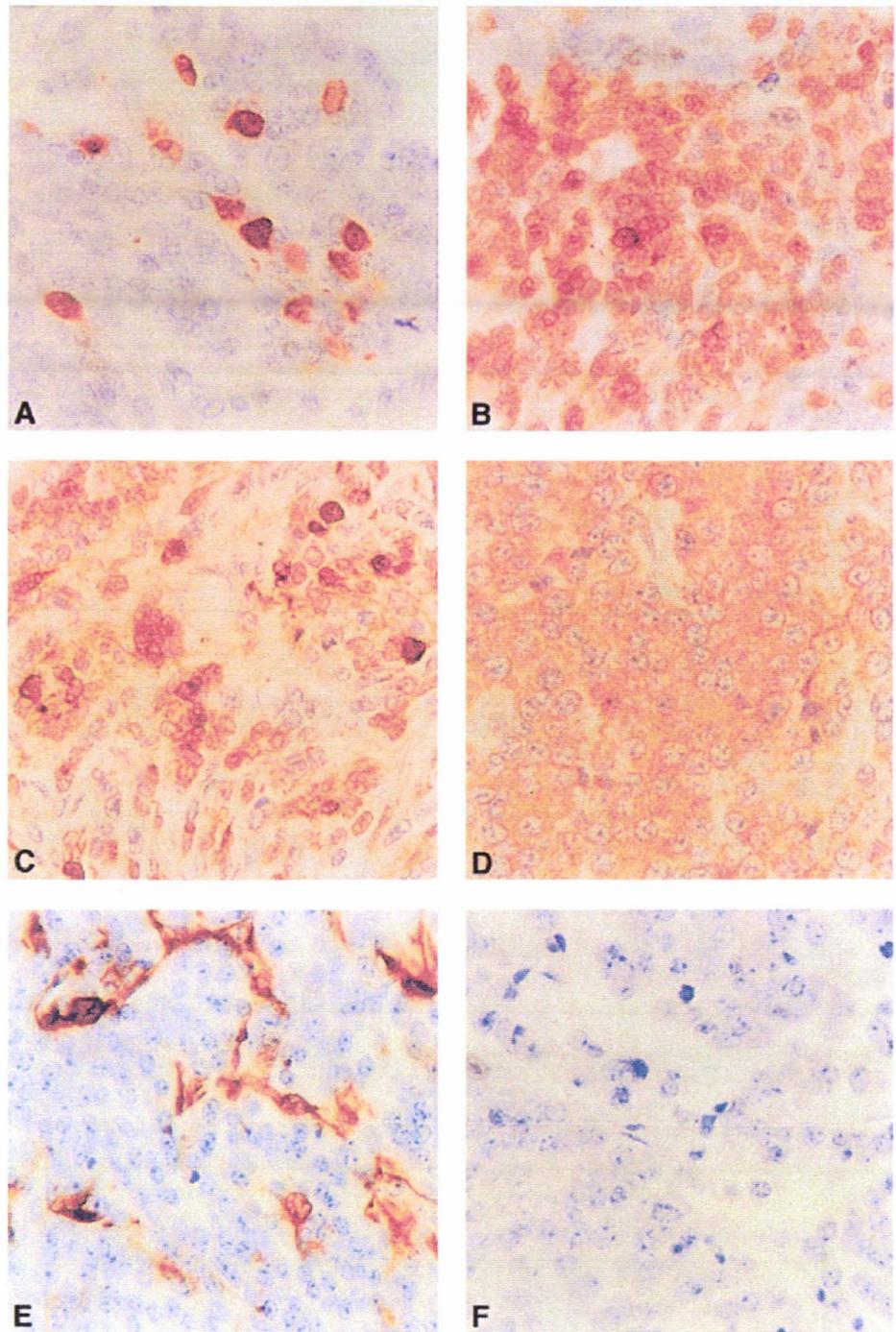


FIGURE 1. Microphotographs ($\times 400$) of representative staining patterns observed in the blue round cell populations of medulloblastomas for six Ca²⁺-binding proteins. A-D show immunopositivity in blue round cells for A) calbindin-D_{28k}, B) calretinin, C) α -parvalbumin, and D) β -parvalbumin, as well as E) immunonegativity (in blue round cells) for S100B and F) lack of staining for S100A6. E) S100B expression in cells presenting astrocytic-like cytoplasmic extensions.

Table 2 reports the number of positive cases for the 10 Ca²⁺-binding proteins investigated in the 39 cases of the first series. The table shows that five of the six different S100 proteins investigated were not expressed in the blue round tumor cells of the 39 medulloblastomas analyzed (S100A3 was expressed in 18% of cases only). In contrast, the other four Ca²⁺-binding proteins (calbindin-D_{28k}, calretinin, α -parval-

bumin, and β -parvalbumin) exhibited different patterns of expression.

Relations between Ca²⁺-binding Protein Expression and the Other Biologic Markers

Table 3 shows the results obtained in the 39 cases of the first series for each of the nine additional markers and the indices for p53 expression and cell prolifera-

TABLE 2
Calcium-binding Protein Expression in the Blue Round Cells of Medulloblastomas from Series 1

Protein	No. of Positive cases		Prognostic value (P value)
	Living patients (n = 19)	Dead patients (n = 20)	
Calbindin-D _{28k}	1	8	0.01
Calretinin	14	17	NS
α-parvalbumin	6	9	NS
β-parvalbumin	14	18	NS
S100A1, A4, A5, A7, B	0	0	-
S100A3	3	4	NS

The statistical significance levels were computed by means of the χ -square test (association between immunopositivity and patient status).
NS: not significant.

TABLE 3
Other Biologic Markers (Cases of Series 1)

Marker (no. of cases analyzed)	No. of positive cases		Prognostic value (P value)
	Surviving patients	Dead patients	
Cytokeratins (39)	0	0	-
Neurofilaments (39)	1 out of 19	0 out of 20	NS
GFAP (39)	3 out of 19	5 out of 20	NS
Chromogranin (39)	6 out of 19	7 out of 20	NS
S antigen (38)	3 out of 18	6 out of 20	NS
Synaptophysin (39)	7 out of 19	7 out of 20	NS
Engrailed prot. (39)	11 out of 19	10 out of 20	NS
PAX-6 (32)	7 out of 14	9 out of 18	NS
NSE (39)	17 out of 19	16 out of 20	NS

Labeling index	Mean (%) ± SE		
P53 (33)	0 ± 0	7 ± 5	NS
PCNA (37)	17 ± 4	21 ± 4	NS
R-MIB1 (39)	20 ± 3	19 ± 3	NS
HS-MIB1 (39)	36 ± 4	37 ± 4	NS

NS: not significant; GFAP: glial fibrillary acidic protein; NSE: neuron-specific enolase; SE: standard error; R: random; HS: hot spot.

The statistical significance levels were computed by means of the χ -square test (association between immunopositivity and patient status) and the Mann-Whitney test (variations in labeling indices).

tion (PCNA, R-MIB1, and HS-MIB1). Those indices are expressed in terms of mean ± standard error (SE), while the number (and percentage) of positive cases are reported for the other markers.

Statistical analyses identified no significant correlations between the expression of Ca²⁺-binding proteins and the other biologic markers, except between HS-MIB1 and β-parvalbumin expression. While immunonegativity for β-parvalbumin (n = 7) was associated with low HS-MIB1 values (median = 26, lower/upper quartiles: 18 out of 29), β-parvalbumin

positivity (n = 32) was related to significantly higher HS-MIB1 values (median = 38, lower/upper quartiles: 28 out of 48; Mann-Whitney test: P = 0.02). In contrast, R-MIB1 values remained similar in these two groups.

Prognostic Values of the Markers Investigated

Tables 2 and 3 detail the results obtained for each marker with respect to patient status. These data show that of all the markers investigated, only calbindin-D_{28k} was significantly associated with prognosis. Indeed, 9 of the 39 tumors of the first series presented calbindin-positive tumor cells (Table 2). The patient status shows that: 1) of these 9 cases only 1 was still alive; and 2) of the 30 other patients (with calbindin-negative tumor cells), 18 (66%) were still alive (P = 0.01, chi square test).

Kaplan-Meier analyses on the patients' survival and recurrence free times were carried out in order to confirm the prognostic value of calbindin-D_{28k} expression in medulloblastomas and to compare it with those of other clinical factors (i.e., presence of metastasis, resection type, patients' ages, and treatment). These analyses were performed on the 54 followups available after merging the first and second series. This merging enabled us to also investigate smaller groups of young patients, i.e., younger than 15 years (n = 37). In addition, we investigated a possible prognostic value for the HS-MIB1 index as suggested by the literature. However, we did not identify any prognostic value for this index, which showed very similar values between living (mean ± SE = 38 ± 4 %) and dead patients (40 ± 4%) in the complete series, as well as in the 37 patients younger than 15 (living: 39 ± 6 %, dead: 42 ± 5 %). Furthermore, correlation analyses did not exhibit any significant relation between the HS-MIB index and patient survival time (data not shown).

Table 4 summarizes the results obtained by means of Kaplan-Meier analyses. This includes the P values (log-rank tests) characterizing the differences between the two risk groups determined by each factor, i.e., calbindin-positivity (calb⁺) or negativity (calb⁻), presence/absence of metastasis (at the time of the diagnosis), subtotal/total surgery, submission or not to chemotherapy, and groups defined by patients' ages (in the total series of 54 cases). Table 4 shows that calbindin expression provided the most significant results in the complete series and in the groups of young patients. Similar results were obtained between survival and recurrence-related analyses. As observed above in the first series alone, calbindin-positivity was very closely associated with a high risk of death as well as of tumor recurrence (Fig. 2). Of the other factors analyzed, only the type of surgery and age appeared to

TABLE 4
Survival and Remission Analysis

Risk factor	Survival analysis (P value)		Remission analysis (P value)	
	All cases (n = 54)	Age < 15 years (n = 37)	All cases (n = 54)	Age < 15 years (n = 37)
Calb ^{+/-}	0.004	0.02	0.003	0.02
Metastasis	0.6	0.7	0.2	0.2
Surgery (total/subtotal)	0.05	0.5	0.03	0.3
Chemotherapy (non-metastatic cases)	0.2 (n = 38)	^a	0.4 (n = 38)	^a
Age < or ≥ 10 years	0.06	-	0.2	-
Age < or ≥ 12 years	0.02	-	0.05	-
Age < or ≥ 15 years	0.2	-	0.10	-

Calb: calbindin-D_{28k}.
^a Too little uncensored (complete) data in one group to be analyzed.

provide a prognostic value for the complete series (but to a lesser extent than calbindin). Subtotal surgery and young age were associated with a higher risk of death and tumor recurrence. This is why we submitted these two factors together with the presence/absence of calbindin-D_{28k} expression to a Cox regression analysis to test their simultaneous influence on the remission and survival time. The results showed that only the presence/absence of calbindin-D_{28k} expression and, to a lesser extent, the type of surgery predicted recurrence or death events (data not shown).

In view of the above results, we combined calbindin expression and the resection type to define three risk groups in the current data, as illustrated by the Kaplan-Meier curves shown in Figure 2. The first group included the cases characterized by a total resection and calbindin-negativity, the second by a subtotal resection and calbindin-negativity, and the third by calbindin-positivity. While Figures 2A and B, respectively, report survival and remission analyses performed on all the data (54 follow-ups), Figures 2C and D show the same analyses performed on the young patients (< 15 years of age) only (n = 37). Considering all the cases, the results show that the first group (total resection and calb⁻, n = 25) is clearly associated with a favorable prognosis in comparison to the third group (calb⁺ with or without total resection, n = 13), which is associated with a poor prognosis. The prognosis for the second group (subtotal resection and calb⁻, n = 16) appears to be between those for the other two groups. The curves are similar for the young patient subset but their separation is less significant. This would be due to the smaller number of patients in each of the three risk groups (first group: n = 16; second group: n = 9; third group: n = 12).

These data also show an association between calbindin-D_{28k} expression and age, since calbindin-pos-

itivity was observed for 13 of 37 children younger than 15 years of age and for only 1 of 17 patients older than 14 years (P = 0.02). However, the prognostic value of calbindin-D_{28k} expression is maintained if considering the patients younger than 15 years only (see Table 4 and Figures 2C-D). Furthermore, inside the group of patients younger than 15 years, the patients' ages did not significantly differ between the calb⁺ (n = 13) and calb⁻ (n = 25) cases (mean ± standard deviation: 6 ± 4 and 9 ± 4, respectively; t test: P > 0.05).

Finally, we analyzed the prognostic value of calbindin-negativity/positivity in the particular case of metastatic tumors. Figure 3 shows the Kaplan-Meier curves obtained for this particular subgroup of patients (n = 15) and confirms the better prognostic value associated with calbindin-negativity. Studies on larger series would allow definite validation of these results.

DISCUSSION

Medulloblastomas are derived from undifferentiated pluripotent precursor cells able to differentiate along the glial, neuronal, and ependymal pathways. In some tumors, a marked mesenchymal response is observed that is responsible for the desmoplastic variant. It has been proposed that this variant is associated with a better prognosis, but this observation has not been confirmed. Thus, in contrast to other pediatric solid tumors, there are no well-defined pathologic criteria to subclassify medulloblastomas with respect to prognosis. Consequently, several studies have searched for potential immunohistochemical markers²⁹ as well as genetic markers associated with good or poor prognosis.³⁰ Coexpression of HER2 and HER4, two members of the epidermal growth factor receptor family, showed independent prognostic significance in a series of 70 patients with childhood medulloblastoma.³¹

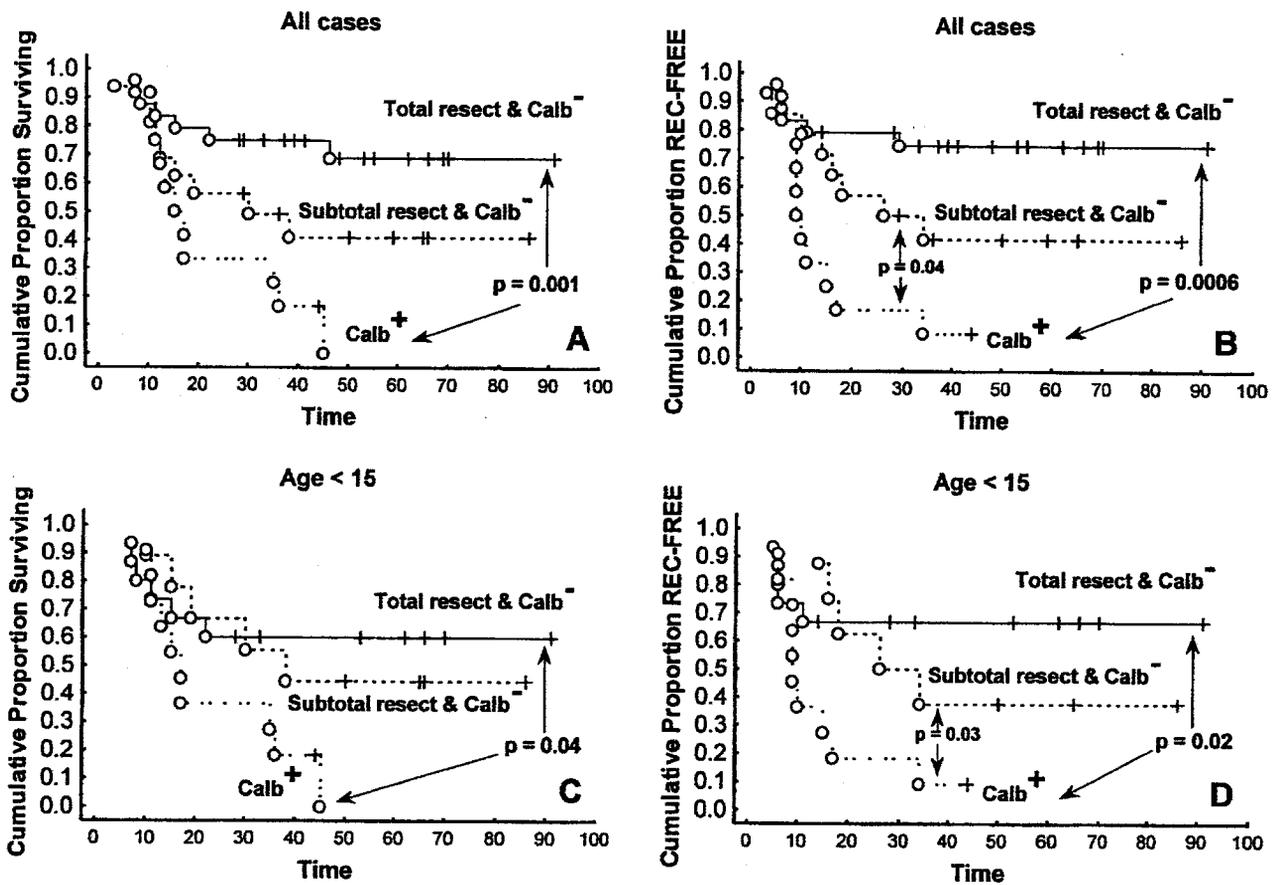


FIGURE 2. A and C) Survival and B and D) remission curves according to Kaplan-Meier analysis comparing three risk groups of patients. These groups are defined by the type of resection (total or subtotal) and the calbindin-negativity (Calb⁻) or positivity (Calb⁺). A and C) The dots represent the patients who died and the crosses (+) those did not. All cases (n = 54) were analyzed in frames A and B. Patients with recurrence (dots) and those without (+). These frames could include only patients younger than 15 years of age (n = 37). Significant P values between pairs of curves are reported.

Low mRNA expression of the oncogene c-MYC^{32,33} and elevated expression of the neurotrophin-3 receptor TrkC³⁴ (which promotes apoptosis in medulloblastoma) have recently been reported to be associated with a favorable clinical outcome. In addition, aberrant expression of Erb-2, a tyrosine kinase 1 receptor, could also be involved in the pathogenesis of human medulloblastomas through the formation of a neu-regulin/Erb-2 autocrine loop.³⁵

Besides the studies investigating potential immunohistochemical markers in medulloblastoma, it seemed of great interest to evaluate another family of molecules related to Ca²⁺-binding proteins. The prognostic significance of a number of these proteins, such as S100 proteins^{20,36-38} and calbindin-D_{28k},³⁹ was recently reported. Calbindin-D_{28k} and other proteins (such as calretinin and parvalbumins) with calcium buffering capacities are reported to protect cells against calcium overload, and thereby from apoptosis.⁴⁰ For example, calbindin-D_{28k} expression interferes with the apoptotic pathway in lym-

phocytes,⁴¹ osteoblastic cells,⁴² neural cells,⁴³ pheochromocytoma PC-12 cells exposed to neurotoxin,⁴⁴ and C6 rat astrocytoma cells exposed to calcium ionophore⁴⁵ (for a review see Christakos et al.⁴⁰). Calbindin-D_{28k} expression was also found in a subset of medulloblastomas presenting poorly differentiated cells but was absent in medulloblastomas with desmoplastic characteristics.⁴⁶ Measurement of calbindin-D_{28k} and S100 proteins has also been proposed to be useful for evaluating the prognosis of children suffering from neuroblastoma, a neuroectodermal derived peripheral tumor,⁴⁷ and recently calbindin-D_{28k} was found to be a prognostic factor in lung carcinoma.³⁹

In the current study, four Ca²⁺-binding proteins (calbindin-D_{28k}, calretinin, α-parvalbumin, and β-parvalbumin) exhibited different patterns of expression in the blue round cells of the 39 medulloblastomas analyzed (see Table 2). In contrast, the six different S100 proteins investigated were found to have low or no expression. This could be related to the broad

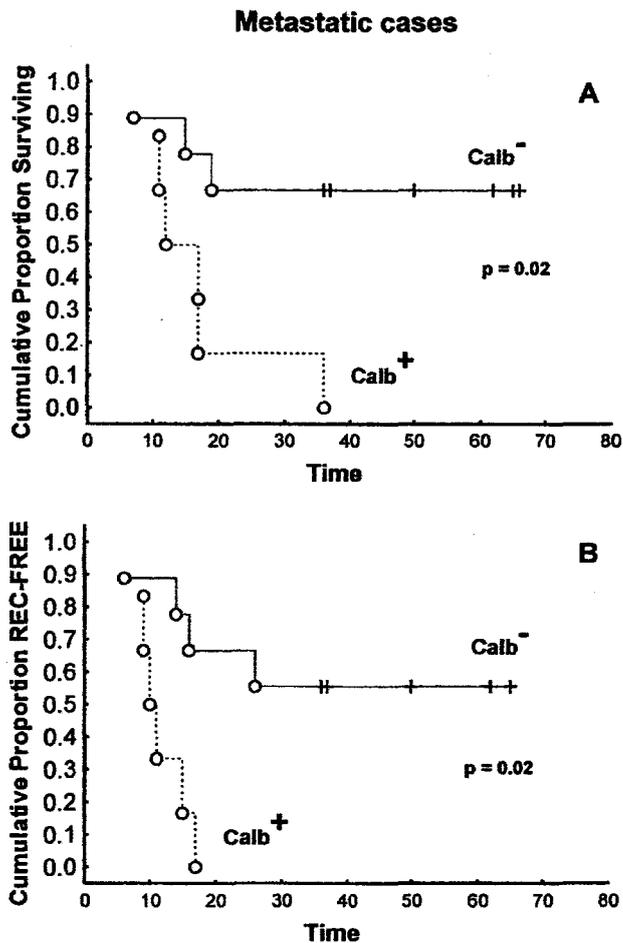


FIGURE 3. A) Survival and B) remission curves for patients with metastatic tumors ($n = 15$) distributed among two risk groups (Calb⁻ and Calb⁺). The dots represent the patients who died and the crosses (+) those did not.

range of differentiating potential exhibited by medulloblastomas, as suggested by previously reported data about protein expression during developmental stages. As reported by Yew et al.,⁴⁸ calbindin-D_{28k} is observed early in human cerebellar development at 14 weeks of gestation. Positive cells are found in Purkinje, basket, stellate, and granule cells of the cerebellar cortex. The number of positive cells and the staining intensity decrease at more advanced developmental stages. At 21-31 weeks of gestation, positive staining is restricted to Purkinje and basket cells. α -parvalbumin is also observed early in development at 14 weeks of gestation in Purkinje, basket, and stellate cells of the cerebellar cortex.⁴⁸ As with calbindin-D_{28k}, a decrease in both the intensity and number of positive cells occurs with parvalbumin. Calretinin-positive cells are not seen until 21 weeks of gestation, and the immunoreactivity increases as the cerebellum becomes more mature.⁴⁸ β -parvalbumin, also known as onco-

modulin, is expressed during early development at the morula stage in rat, in the fetal placenta, and in a variety of tumor cells.^{49,50} Another point of discussion concerns the different patterns of expression of calbindin-D_{28k} and calretinin, two proteins that share 58% amino acid identity. These two proteins are known to be expressed mainly in separate subpopulations of interneurons (i.e. smooth nonpyramidal neurons), which display different chemical characteristics for a variety of neurotransmitters, cell surface markers, and receptors.^{51,52} In contrast, β -parvalbumin is only expressed in preterm placenta.⁵⁰ The latter data at least partly explain why calbindin-D_{28k}, calretinin, α -parvalbumin, and β -parvalbumin may be differently expressed in medulloblastomas.

Calretinin, α -parvalbumin, and β -parvalbumin were not found to be significantly associated with age, clinical presentation, or patient outcome, except for an association between β -parvalbumin-positivity and an increase in the HS-MIB index. In contrast, calbindin-D_{28k} expression was highly significantly associated with remission and survival. The current results suggest that a specific relationship might exist between calbindin-D_{28k} expression and the biologic behavior of malignant cerebellar cells with respect to the pathogenesis of medulloblastomas. Thus, the expression of calbindin-D_{28k} in these cells might confer anti-apoptotic properties against both chemotherapeutic drugs and irradiation, resulting in highly malignant cells resistant to conventional treatments. In the current study, we focused our analysis on the expression of Ca²⁺-binding proteins in the blue round cell population only. However, a first analysis similarly performed on cells presenting a first stage of differentiation did not provide supplementary prognostic information (data not shown).

A significant and independent prognostic value has been recently reported for the hot spot MIB-1 index evaluated in a series of 78 primitive neuroectodermal tumors (PNET), including medulloblastomas.¹⁹ However, we did not reproduce this result in the current study. This was likely due to the different series analyzed. While the current series was made up exclusively of medulloblastomas, the series analyzed by Grotzer et al.¹⁹ was composed of different types of PNETs, including medulloblastomas. In one study, an apoptotic index derived from in situ end-labeling was reported to be an independent prognostic factor associated with survival.⁵³ We also tried to establish such an index. However, the use of archive materials did not yield reproducible results; thus, in the current series, we were not able to evaluate the significance of the apoptotic index on prognosis.

In conclusion, the current results show that calbi-

ndin-positivity, almost exclusively found in young patients (younger than 15 years), was closely associated with a poor prognosis and a high risk of tumor recurrence, independently of other clinical and biologic features. In contrast, the prognostic value is much better for cases where calbindin-negativity is associated with total resection. They also suggest that in the case of metastatic tumors, the absence of calbindin-D_{28k} expression correlates with a good prognosis.

REFERENCES

- Habrand JL, De Crevoisier R. Radiation therapy in the management of childhood brain tumors. *Childs Nerv Syst.* 2001; 17:121-133.
- Giordana MT, Schiffer P, Schiffer D. Prognostic factors in medulloblastoma. *Childs Nerv Syst.* 1998;14:256-262.
- Whelan HT, Krouwer HG, Schmidt MH, Reichert KW, Kovnar EH. Current therapy and new perspectives in the treatment of medulloblastoma. *Pediatr Neurol.* 1998;18:103-115.
- Reddy AT, Packer RJ. Medulloblastoma. *Curr Opin Neurol.* 1999;12:681-685.
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000; 1:11-21.
- Kleihues P, Cavenee WK, editors. World Health Organisation classification of tumors. Pathology and genetics of tumours of the nervous system. Lyon: IARC Press, 2000.
- Pendergrass TW, Milstein JM, Geyer JR, et al. Eight drugs in one day chemotherapy for brain tumors: experience in 107 children and rationale for preradiation chemotherapy. *J Clin Oncol.* 1987;5:1221-1231.
- Bailey CC, Gnekow A, Wellek S, et al. Prospective randomised trial of chemotherapy given before radiotherapy in childhood medulloblastoma. International Society of Paediatric Oncology (SIOP) and the (German) Society of Paediatric Oncology (GPO): SIOP II. *Med Pediatr Oncol.* 1995;25: 166-178.
- Davis JA, Reed RR. Role of Olf-1 and Pax-6 transcription factors in neurodevelopment. *J Neurosci.* 1996;16:5082-5094.
- Gruss P, Walther C. Pax in development. *Cell.* 1992;69:719-722.
- Hidalgo A. The roles of engrailed protein. *Trends Genet.* 1996;12:1-4.
- Joyner AL. Engrailed, Wnt and Pax genes regulate midbrain-hindbrain development. *Trends Genet.* 1996;12:15-20.
- Kozmik Z, Sure U, Rüedi D, Busslinger M, Aguzzi A. Deregulated expression of PAX-5 in medulloblastomas. *Proc Natl Acad Sci.* 1995;92:5709-5713.
- Vincent S, Turque N, Plaza S, et al. Differential expression between PAX-6 and EN proteins in medulloblastoma. *Int J Oncol.* 1996;901-910.
- Mirshahi M, Boucheix C, Dhermy P, Haye C, Faure JP. Expression of the photoreceptor-specific S-antigen in human retinoblastoma. *Cancer.* 1986;57:1497-1500.
- Decaestecker C, Camby I, Gordower L, et al. Characterization of the astroglial versus the oligodendroglial origin of glioblastomas by means of quantitative morphonuclear variables generated by computer-assisted microscopy. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1998;57:791-802.
- Kiss R, DeWitte O, Decaestecker C, et al. The combined determination of proliferative activity and cell density to identify short- as opposed to long-surviving adult patients with supratentorial high-grade astrocytic tumors. *Am J Clin Pathol.* 1997;107:321-331.
- McKeever PE, Ross DA, Strawderman MS, Brunberg JA, Greenberg HS, Junck L. A comparison of the predictive power for survival in gliomas provided by MIB-1, bromodeoxyuridine and proliferating cell nuclear antigen with histopathologic and clinical parameters. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1997;56:798-805.
- Grotzer MA, Geoerger B, Janss AJ, Zhao H, Rorke LB, Phillips PC. Prognostic significance of Ki-67 (MIB-1) proliferation index in childhood primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Med Pediatr Oncol.* 2001;36:268-273.
- Camby I, Nagy N, Lopes MB, et al. Supratentorial pilocytic astrocytomas, astrocytomas, anaplastic astrocytomas and glioblastomas are characterized by a differential expression of S100 proteins. *Brain Pathol.* 1999;9:825-843.
- Rhyner JA, Durussel I, Cox JA, Ilg EC, Schäfer BW, Heizman CW. Human recombinant alpha-parvalbumin and nine mutants with individually inactivated calcium- and magnesium-binding sites: biochemical and immunological properties. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1313:179-186.
- Föhr UG, Heizmann CW, Engelkamp D, Schäfer BW, Cox JA. Purification and cation binding properties of the recombinant human S100 calcium-binding protein A3, an EF-hand motif protein with high affinity for zinc. *J Biol Chem.* 1995; 270:21056-21061.
- Ilg EC, Schäfer BW, Heizmann CW. Expression pattern of S100 calcium-binding proteins in human tumors. *Int J Cancer.* 1996;68:325-332.
- Huang JW, Ming Z, Shrestha P, et al. Immunohistochemical evaluation of the Ca²⁺-binding S-100 proteins S-100A1, S-100A2, S-100A4, S-100A6 and S-100B in salivary gland tumors. *J Oral Pathol Med.* 1996;25:547-555.
- Schäfer BW, Fritschy JM, Murmann P, et al. Brain S100A5 is a novel calcium-, zinc-, and copper ion-binding protein of the EF-hand superfamily. *J Biol Chem.* 2000;275:30623-30630.
- Gamallo C, Palacios J, Suarez A, et al. Correlation of E-cadherin expression with differentiation grade and histological type in breast carcinoma. *Am J Pathol.* 1993;142:987-993.
- Bronckart Y, Decaestecker C, Nagy N, et al. Development and progression of malignancy in human colon tissues are correlated with expression of specific Ca²⁺-binding S100 proteins. *Histol Histopathol.* 2001;16:707-712.
- Nagy N, Hoyaux D, Gielen I, et al. The Ca²⁺-binding S100A2 protein is differentially expressed in epithelial tissue of glandular or squamous origin. *Histol Histopathol.* 2002;17:123-130.
- Mc Lendon RE, Friedman HS, Fuchs HE, Kun LE, Bigner SH. Diagnostic markers in paediatric medulloblastoma: a Paediatric Oncology Group Study. *Histopathology.* 1999;34:154-162.
- Provias JP, Becker LE. Cellular and molecular pathology of medulloblastoma. *J Neurooncol.* 1996;29:35-43.
- Gilbertson RJ, Perry RH, Kelly PJ, Pearson AD, Lunec J. Prognostic significance of HER2 and HER4 coexpression in childhood medulloblastoma. *Cancer Res.* 1997;57:3272-3280.
- Herms J, Neidt I, Luscher B, et al. C-MYC expression in medulloblastoma and its prognostic value. *Int J Cancer.* 2000;89:395-402.

33. Grotzer MA, Hogarty MD, Janss AJ, et al. MYC messenger RNA expression predicts survival outcome in childhood primitive neuroectodermal tumor/medulloblastoma. *Clin Cancer Res.* 2001;7:2425-2433.
34. Kim JY, Sutton ME, Lu DJ, et al. Activation of neurotrophin-3 receptor TrkC induces apoptosis in medulloblastomas. *Cancer Res.* 1999;59:711-719.
35. Gilbertson RJ, Clifford SC, MacMeekin W, et al. Expression of the ErbB-neuregulin signaling network during human cerebellar development: implications for the biology of medulloblastoma. *Cancer Res.* 1998;58:3932-3941.
36. Schäfer BW, Heizmann CW. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem Sci.* 1996;21:134-140.
37. Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001;33:637-668.
38. Camby I, Lefranc F, Titeca G, et al. Differential expression of S100 calcium-binding proteins characterizes distinct clinical entities in both WHO grade II and III astrocytic tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2000;26:76-90.
39. Castro CY, Stephenson M, Gondo MM, Medeiros LJ, Cagle PT. Prognostic implications of calbindin-D28k expression in lung cancer: analysis of 452 cases. *Mod Pathol.* 2000;13:808-813.
40. Christakos S, Barletta F, Huening M, Kohut J, Raval-Pandya M. Activation of programmed cell death by calcium: protection against cell death by the calcium binding protein, calbindin-D28k. In: Pochet R, editor. Calcium. The molecular basis of calcium action in biology and medicine. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000.
41. Dowd DR, Mac Donald PN, Komm BS, Haussler MR, Miesfeld RL. Stable expression of the calbindin-D28k complementary DNA interferes with the apoptotic pathway in lymphocytes. *Mol Endocrinol.* 1992;6:1843-1848.
42. Bellido T, Huening M, Raval-Pandya M, Manolagas SC, Christakos S. Calbindin-D28k is expressed in osteoblastic cells and suppresses their apoptosis by inhibiting caspase-3 activity. *J Biol Chem.* 2000;275:26328-26332.
43. Guo Q, Christakos S, Robinson N, Mattson MP. Calbindin-D28k blocks the proapoptotic actions of mutant presenilin 1: reduced oxidative stress and preserved mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci.* 1998;95:3227-3232.
44. McMahon A, Wong BS, Iacopino AM, Ng MC, Chi S, German DC. Calbindin-D28k buffers intracellular calcium and promotes resistance to degeneration in PC12 cells. *Brain Res Mol Brain Res.* 1998;54:56-63.
45. Wernyj RP, Mattson MP, Christakos S. Expression of calbindin-D28k in C6 glial cells stabilizes intracellular calcium levels and protects against apoptosis induced by calcium ionophore and amyloid beta-peptide. *Brain Res Mol Brain Res.* 1999;64:69-79.
46. Katsetos CD, Herman MM, Krishna L, et al. Calbindin-D28k in subsets of medulloblastomas and in the human medulloblastoma cell line D283 Med. *Arch Pathol Lab Med.* 1995;119:734-743.
47. Ishiguro Y, Kato K, Akatsuka H, et al. Comparison of calbindin-D28k and S-100 protein B in neuroblastoma determined by enzyme immunoassay. *Jpn J Cancer Res.* 1996;87:62-67.
48. Yew DT, Luo CB, Heizmann CW, Chan WY. Differential expression of calretinin, calbindin-D28k and parvalbumin in the developing human cerebellum. *Brain Res Dev Brain Res.* 1997;103:37-45.
49. McManus JP, Brewer LM, Banville D. Oncomodulin in normal and transformed cells. In: Pochet R, Lawson E, Heizmann CW, editors. Calcium binding proteins in normal and transformed cells. New York: Plenum Press, 1990:107-110.
50. Föhr UG, Weber BR, Muntener M, et al. Human alpha and beta parvalbumins. Structure and tissue-specific expression. *Eur J Biochem.* 1993;215:719-727.
51. DeFelipe J. Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in the neocortex. *J Chem Neuroanat.* 1997;14:1-19.
52. Hof PR, Glezer II, Conde F, et al. Cellular distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin, and calretinin in the neocortex of mammals: phylogenetic and developmental patterns. *J Chem Neuroanat.* 1999;16:77-116.
53. Korshunov A, Golanov A, Ozerov S, Sycheva R. Prognostic value of tumor-associated antigens immunoreactivity and apoptosis in medulloblastomas. An analysis of 73 cases. *Brain Tumor Pathol.* 1999;16:37-44.

DISCUSSION

Comme nous le montre l'ensemble des études consacrées aux médulloblastomes et aux PNETs, ces tumeurs sont toujours de pronostic très sévère, même si le taux de survie à 5 ans des patients a doublé entre les années 70 et les années 90. Ce taux de survie était de 8 % en 1960-1964 (Agerlin *et al.*, 1999), de 30-35 % (Choux et Lena, 1982 ; Dhellemmes *et al.*, 1986 ; Giordana *et al.*, 1998 ; Agerlin *et al.*, 1999), puis de 50 % (David *et al.*, 1997 ; Zhang et Zhou, 1999), de 60-70 % (Cervoni et Cantore, 1995 ; Hoppe-Hirsch *et al.*, 1990 ; Jenkin *et al.*, 1990) et finalement de 85 % (Packer *et al.*, 1994). Pendant ces 30 dernières années, les progrès de la neuroimagerie, de la neurochirurgie permettant une meilleure résection, ajoutés aux méthodes modernes de traitement complémentaire par radiothérapie crano-spinale et par chimiothérapie ont, sans aucun doute, contribué à l'amélioration du pronostic des médulloblastomes. Malgré ces progrès, notre étude fait apparaître un taux de survie à 5 ans de 44 % (n = 72). Les différences de résultats sont dues aux critères de recrutement des patients, certaines études ne prennent pas en compte les enfants de moins de trois ans et/ou les patients ayant métastasés. Ainsi lorsque l'on exclue de notre étude les 4 récidives, ce taux de survie à 5 ans passe à 46 (n = 68). De même si l'on ne tient pas compte des patients ayant récidivés et ceux qui sont décédés avant 6 mois après l'intervention ainsi que les tumeurs ayant une localisation non cérébelleuse (n = 54), ce taux de survie à 5 ans passe à 51 %.

Ces études soulignent l'urgence d'une meilleure compréhension des mécanismes oncogéniques impliqués dans les médulloblastomes, ce qui permettrait d'appliquer des thérapeutiques plus adaptées et moins agressives. Mettre en évidence des marqueurs, trouver des mutations génétiques permettant d'évaluer le pronostic de ces médulloblastomes dont le comportement peut être différent d'une tumeur à l'autre demeurent des problèmes majeurs. Nous avons choisi volontairement une étude de l'expression de gènes intervenant vraisemblablement dans la genèse des cellules considérées à l'origine de ces tumeurs et de l'expression des différenciations communément observées dans les tumeurs de blastèmes du SNC. Précédemment de nombreux auteurs ont tenté de corréliser certaines différenciations en fonction de la survie. Dès 1984, Packer *et al.* ont montré l'importance d'une distinction entre les formes indifférenciées et les formes à différenciation unique ou multiple, les formes indifférenciées avaient une probabilité de survie significativement supérieure aux formes multi-différenciées. Les formes différenciées paraissaient plus extensives et plus disséminées au moment du diagnostic. Ces observations demeuraient significatives en fonction de l'âge des patients, du stade tumoral et de l'exérèse chirurgicale. Les auteurs se

sont interrogés aussi sur les raisons d'une telle différence : "les tumeurs indifférenciées sont-elles plus radiosensibles ?". En 1987, Caputy *et al.* concluaient le contraire dans une étude comparable, le taux de survie à 5 ans étaient significativement meilleur dans les cas de médulloblastomes différenciés. Notre étude n'apporte aucun élément supplémentaire sur ce point, puisque nous n'avons pas observé de différence statistique dans notre série entre les tumeurs différenciées et indifférenciées par rapport à la survie.

Notre étude avait comme premier objectif d'évaluer l'intérêt de la présence ou de l'absence de l'expression des facteurs de transcription Pax-6 et Engrailed-2, gènes de contrôle intervenant au cours du développement. L'origine vraisemblable de certains médulloblastomes à partir des grains, eux-même déterminés par Pax-6 pendant l'embryogenèse renforçait cet intérêt (Stoykova et Gruss, 1994).

Finalement, cette étude de l'expression de PAX-6, de EN-2 et de multiples marqueurs de différenciation a mis en valeur plusieurs points que nous allons souligner.

A- Informations apportées par PAX-6 :

1- L'expression de PAX-6 signe la nature blastémateuse d'une tumeur du SNC.

De façon évidente, PAX-6 est exprimé dans une proportion importante de médulloblastomes. L'expression des protéines du gène Pax-6 a été observée dans 44 médulloblastomes et 5 PNETs soit 61,25 % des cas étudiés. PAX-6 montre un marquage nucléaire uniquement dans des cellules ne présentant aucune différenciation, c'est-à-dire des cellules de blastème avant leur entrée dans un processus de différenciation. Parallèlement, l'équipe de Kozmik a trouvé par RNase protection et hybridation *in situ* l'expression de Pax-6 dans 78 % de ces 23 médulloblastomes (Kozmik *et al.*, 1995). La légère différence observée entre nos résultats peut s'expliquer par les différentes techniques utilisées. La stabilité des protéines dans les échantillons peut être différente de celle des ARNs et la production de protéines, à partir de ces derniers, n'est pas obligatoire dans tous les cas (Jaffredo *et al.*, 1989).

Ainsi l'expression de PAX-6 peut être une aide au diagnostic puisque PAX-6 n'a jamais été observé dans le parenchyme cérébral normal de l'enfant ou de l'adulte, ni dans des tumeurs présentant une différenciation. De même, il n'a jamais été observé dans d'autres tumeurs cérébrales testées telles que l'astrocytome (grade I, II, III et IV), l'oligodendrogliome, l'épendymome (de grade II et III), le carcinome des plexus choroïdes et une métastase anaplasique (observations personnelles). Comme l'expression de PAX-6 dans une tumeur signe sa nature blastémateuse, nous avons pu l'utiliser afin de différencier

des tumeurs anaplasiques de tumeurs de blastème. Autant l'absence de PAX-6 ne permet pas de trancher entre le diagnostic de PNET ou de tumeur anaplasique ; par contre, son expression est déterminante pour affirmer la présence d'un contingent blastémateux. En outre, PAX-6 a également été observé dans des neuroblastomes (observations personnelles) et des rétinoblastomes. Cela pose le problème d'une surexpression résultant d'un défaut dans la régulation des gènes Pax qui pourrait jouer un rôle dans l'avènement des médulloblastomes (Kozmik *et al.*, 1995).

Les gènes Pax et plus spécialement Pax-6 pourraient être un marqueur de routine pour caractériser plus précisément la nature de ces tumeurs.

2- L'expression de PAX-6 est préférentiellement retrouvée dans les tumeurs de la fosse postérieure.

Deux exceptions : L'une de ces tumeurs (n° 97-59) correspond à la métastase frontale d'un médulloblastome cérébelleux, opéré 8 ans auparavant, et l'autre correspond à une PNET (n° 96-17) et à ses récurrences (n° 96-614 et n° 97-59) qui, morphologiquement, montraient la formation de tubes neuraux et correspondaient à un médulloépithéliome. Cette localisation sous-tentorielle des tumeurs exprimant PAX-6 est-elle le fruit du hasard ou préférentielle ? Dans le cervelet, les grains expriment Pax-6, ainsi son expression dans les médulloblastomes est attendue, ce qui expliquerait que cette expression ne soit pas retrouvée dans les tumeurs à localisation sus-tentorielle. Bien que Pax-6 est précocement exprimé dans la partie ventrale du tube neural puis disparaît, son expression au cours du développement est restreinte et il est particulièrement difficile de suivre la migration des différentes cellules exprimant PAX-6 provenant de la partie antéro-ventrale du tube neural suite à l'enroulement télencéphalique. Le médulloépithéliome qui a présenté une expression de plus en plus marquée de PAX-6 au cours de ses récurrences pourrait provenir de précurseurs d'une de ces régions ventrales. Par contre un autre médulloépithéliome intra-ventriculaire supra-tentorial (cf. Article III) n'exprime pas PAX-6. Mais ce médulloépithéliome présentait de très nombreux foyers de différenciation, or comme nous l'avons vu précédemment, l'expression de PAX-6 n'a jamais été observée dans des zones différenciées. Les cellules à l'origine de cette tumeur pourraient provenir d'une région n'exprimant pas Pax-6 au cours du développement ou bien cette tumeur ne présente momentanément pas d'expression décelable.

3- Aspects morphologiques particuliers des tumeurs exprimant PAX-6.

Les 6 médulloblastomes dont l'architecture est en file indienne montrent toujours un fort pourcentage (en moyenne 60 %) de cellules exprimant PAX-6. De plus, ces médulloblastomes semblent être de meilleur pronostic puisque l'on ne constate qu'une seule récurrence suivie d'un décès. Ce type de médulloblastome morphologiquement particulier serait donc d'une nature plus primitive que les autres types de médulloblastomes tel que le type desmoplastique.

4- Expression de PAX-6 et oncologie.

De manière intéressante, l'expression de Ki-67 et PAX-6 coïncide. Ceci est principalement observé dans les zones d'invasion, dans les nodules de cellules tumorales infiltrant les lamelles cérébelleuses. Antérieurement, Schiffer *et al.* (1994) avaient noté un nombre élevé de noyaux positifs avec le Ki-67 au niveau des plages de cellules envahissant le parenchyme cérébelleux. Dans notre étude, l'index de prolifération est corrélé parallèlement au pourcentage de PAX-6. Ces nouveaux résultats appuient l'hypothèse de Schiffer suggérant que ces cellules pouvaient représenter une population particulière de cellules tumorales et finalement pourraient être corrélés avec le rôle oncogénique de PAX-6. Ces résultats sont à considérer à la lumière des observations de Estivill-Torres *et al.* (2002) qui suggèrent une implication de Pax-6 dans le déroulement du cycle cellulaire. Le fait que PAX-6 puisse interagir avec la protéine Rb (Cvekl *et al.*, 1999) dont le rôle dans le contrôle du cycle est bien connu, renforce cette possibilité. De même, la présence d'un gène Pax-6 fonctionnel semble requise pour que la mitose se déroule correctement (Crolla *et al.*, 2002). Il est possible que dans les tumeurs, une expression accrue de PAX-6 contribue à la transformation cellulaire.

5- Valeur pronostique de PAX-6.

Malheureusement, aucun des différents tests statistiques, réalisés par le CERIM n'a montré une corrélation significative avec la présence de PAX-6, que ce soit en fonction de la survie, de l'âge, du sexe, du type de tumeur ou encore des autres différenciations. Parfois du fait de trop petits échantillons testés ne permettant pas d'utiliser certains tests, les résultats ne faisaient qu'approcher le seuil statistique. Néanmoins, lorsque l'on regarde le taux de survie à 5 ans en fonction de la positivité ou de la négativité de l'expression de PAX-6, on remarque un écart de plus ou moins 10 % entre les deux résultats (toutes les tumeurs : 47,5 % de survie pour PAX-6 positif et 37,5 % pour PAX-6 négatif, sans les 5

récidives : 51 % de survie pour PAX-6 positif et 39 % pour PAX-6 négatif). Cette tendance suggère un meilleur pronostic des tumeurs exprimant PAX-6.

6- En fonction de la localisation.

Le marquage de PAX-6 est différent selon la localisation de la tumeur, son expression est beaucoup plus fréquemment observée dans les localisations vermienne, hémisphérique et cérébelleuse par rapport aux localisations supra-tentorielles. Dans la fosse postérieure, PAX-6 est plus détecté au niveau hémisphérique (13 tumeurs positives contre 2 tumeurs négatives, ces dernières sont de type desmoplasique), qu'au niveau du vermis (18 positives contre 10 négatives), du V4 (13 positives contre 10).

Alors qu'au niveau sus-tentorial, 5 tumeurs sont positives avec PAX-6 contre 8 négatives.

7- L'absence de l'expression de PAX-6 dans certaines tumeurs peut être interprétée de trois manières :

- soit PAX-6 n'a jamais été exprimé dans cette localisation. On peut supposer que les tumeurs qui dérivent de la partie dorsale du tube n'expriment pas PAX-6, seront négatives.

- soit la transformation cellulaire conduit à l'extinction de l'expression de PAX-6. Des expériences réalisées avec des cellules de la neurorétine d'oiseau, exprimant PAX-6, transformée par des rétrovirus aviaires exprimant des oncogènes définis montrent que selon la nature de celui-ci, l'expression de Pax-6 peut s'éteindre (ou pas) dans les cellules transformées. L'oncogène peut agir directement sur l'expression du gène (par exemple myb active l'expression de Pax-6, alors que fos le réprime (Plaza *et al.*, 1995 c) mais également la transformation cellulaire peut agir de façon indirecte en induisant un phénomène de différenciation du tissu tumoral conduisant éventuellement à l'extinction de l'expression de Pax-6.

- soit la tumeur présente une différenciation terminale, et PAX-6 devient indétectable. C'est probablement le cas de nombreux médulloblastomes, de PNETs.

8- La vimentine et PAX-6 ne sont normalement pas exprimés ensemble.

En effet, il est intéressant de noter que, dans notre série, la vimentine n'est pas exprimée au sein de la prolifération tumorale à l'exception des zones de différenciation gliale ou mésenchymateuse et des parois vasculaires. Or au cours de l'embryogenèse, la

vimentine est exprimée très précocement et de façon parfois éphémère dans toutes les cellules à destinées gliales ou neuronales, à l'exception des grains du cervelet où la vimentine n'apparaît jamais (Cambray-Deakin, 1991). Puisque PAX-6 n'est exprimé que dans des cellules indifférenciées, cette co-expression n'a donc pas été retrouvée. Par contre, l'un de nos médulloblastomes anaplasiques (n° 94-262) n'exprimant ni la synaptophysine ni les neurofilaments, présente une expression de PAX-6 dans 55 % des cellules et une expression de vimentine dans 90 % des cellules. Cette co-expression, tout à fait inhabituelle, pourrait faire évoquer une origine différente de ce médulloblastome.

B- L'expression de EN-2 semble signer une "activation" de certaines cellules au sein de la tumeur.

A l'état normal, le parenchyme cérébral ne montre aucun marquage à l'exception de certaines cellules épendymaires et des cellules plexuelles.

Dans notre étude, l'expression de EN-2 est retrouvée dans les cellules tumorales de 30 médulloblastomes et 8 PNETs soit 47,5 % des tumeurs. Différents niveaux et différentes localisations sub-cellulaires du signal EN-2 ont été détectés. Cette expression de EN-2 est toujours observée dans les noyaux ou les cytoplasmes de cellules situées au contact ou incluses dans la tumeur, citons par exemple les grains résiduels de la couche des grains envahie. Ainsi, lorsque des lamelles cérébelleuses sont envahies, les cellules de Purkinje incluses ou à proximité de la tumeur présentent un signal cytoplasmique. Cette expression est d'interprétation délicate mais semble témoigner d'une activité "accrue" puisque lorsque l'on regarde les lamelles cérébelleuses à distance de la tumeur, on ne retrouve pas ce marquage cytoplasmique des cellules de Purkinje, comme si les cellules "réagissaient" à la proximité de la tumeur. On peut se demander quelle est la valeur de ce marquage puisque EN-2 est une protéine nucléaire. Cependant, de façon intéressante, cette localisation sub-cellulaire de EN-2 a été observée dans des cellules au cours du développement embryonnaire (Millet *et al.*, 1995 ; Wassef *et al.*, 1993). De même, EN-1 et EN-2 ont été trouvés dans des compartiments sub-cellulaires non nucléaires comme des vésicules présentant des propriétés "caveolae-like" (Joliot *et al.*, 1997). Finalement, les différentes localisations cellulaires de EN-2 suggèrent un routage sub-cellulaire différent de EN-2 en réponse à différents stimuli (soit une réponse de stress secondaire à la présence agressive d'une prolifération tumorale, soit au cours d'un processus de différenciation de certaines cellules tumorales, soit au cours d'une activité intense au niveau des échanges cytoplasmiques (plexus choroïdes et épendyme)).

Contrairement à PAX-6, nous n'avons pas observé d'influence de EN-2 sur la survie des patients. Les pourcentages, que ce soit lorsque EN-2 est positif ou négatif, sont quasiment semblables.

C- L'expression conjointe de PAX-6 et EN-2.

1- Les différentes expressions des protéines PAX-6 et EN-2 sont souvent entremêlées au sein d'une tumeur. Ces expressions sont retrouvées dans 24 médulloblastomes et 4 PNETs soit 35 % des tumeurs. Néanmoins sur des coupes sériées, une régionalisation du marquage est observée pour ces protéines. PAX-6 est exprimé dans les zones tumorales non différenciées. Le fait qu'un signal simultané PAX-6 et EN-2 n'a jamais été observé au sein des mêmes aires tumorales semble confirmer l'hypothèse que Pax-6 soit régulé négativement par le produit EN-2 (Plaza *et al.*, 1997). Des expériences ont montré que Pax-6 est réprimé dans le diencéphale d'hôte d'embryon de poulet greffé avec des vésicules mésencéphaliques de caille et que En-2 est exprimé dans le diencéphale hôte autour du greffon (Bally-Cuif et Wassef, 1994).

2- Les gènes Pax-6 comme En-2 sont exprimés dans les zones ventriculaires et dans la couche granulaire externe au cours du développement cérébelleux (Walther et Gruss, 1991 ; Stoykova et Gruss, 1994 ; Davis et Joyner, 1988), une couche de cellules qui est à l'origine du médulloblastome (Kadin *et al.*, 1970 ; Kozmik *et al.*, 1995). PAX-6 et EN sont également exprimés dans le cervelet adulte au sein des cellules de la couche granulaire interne comme l'est EN-2 (Stoykova et Gruss, 1994 ; Kozmik *et al.*, 1995 ; Millet et Alvarado-Mallart, 1995). Cependant, PAX-6 n'a jamais été retrouvée par immunohistochimie au niveau du cervelet, et en ce qui concerne EN-2, il n'est jamais exprimé à distance de la tumeur, ce qui suggère que la quantité de protéine dans ces structures est très inférieure à celle de la tumeur et des cellules "activées" du parenchyme environnant la tumeur.

D- Synthèse des résultats obtenus avec des marqueurs de différenciation

1- L'antigène-S ou arrestine, marqueur des cellules photoréceptrices, et les neurofilaments intra-cytoplasmiques ne sont retrouvés que chez les enfants, de façon statistiquement significative.

2- La présence de multi-différenciations associées ou non à PAX-6 doit faire rechercher une tumeur de type rhabdoïde-tératoïde comportant une différenciation épithéliale (cytokératine et EMA), la présence d'inclusion cytoplasmique (vimentine positive) et l'expression d'alpha-actine intra-cytoplasmique dans les éléments tumoraux.

3- La GFAP, la protéine S 100, la NSE ne semblent pas apporter d'informations essentielles sinon la notion de différenciation gliale.

4- L'index de prolifération par le Ki-67 peut aider au diagnostic puisqu'il demeure très élevé avec une moyenne de 20 %.

5- La calbindin-D_{28k}, exclusivement retrouvée chez les patients jeunes, est associée à un mauvais pronostic et à un haut risque de récurrence. Par contre, le pronostic est meilleur pour les cas présentant une négativité avec la calbindin-D_{28k} lorsque celle-ci est associée à une résection totale. Dans les cas de métastases tumorales, l'absence de l'expression de calbindin-D_{28k} serait corrélée avec un bon pronostic.

6- La vimentine

Elle n'est jamais retrouvée dans les médulloblastomes excepté dans

- dans les médullomyoblastomes
- dans les tumeurs rhabdoïdes-tératoïdes
- dans les médulloblastomes anaplasiques et à grandes cellules (observation

personnelle sur les 2 cas de F. Giangaspero et les 4 cas de P. Burger). La vimentine, les neurofilaments et la synaptophysine sont exprimés conjointement dans 90 % des cellules. Par contre, ces tumeurs ne présentent pas de marquage avec l'Ag S. Ainsi l'association de la vimentine, de NF et de la synaptophysine dans plus de 80 % des cellules tumorales semblent être un marqueur diagnostique de médulloblastomes anaplasiques et à grandes cellules et pourrait faire évoquer une origine particulière de ces tumeurs. En effet, la vimentine est exprimée dans presque toutes les cellules embryonnaires à destinée neuronale pendant la période de division cellulaire pour disparaître ensuite définitivement. Par contre, elle n'est pas exprimée dans les cellules embryonnaires à destinée granulaire cérébelleuse (Cambray-Deakin, 1991). Cela suggérerait que les médulloblastomes à grandes cellules puissent avoir une autre origine que les grains cérébelleux.

Cette étude comprenant une analyse de nombreux marqueurs de différenciation a également permis d'identifier un nouveau type de médulloblastome : le médulloblastome à grandes cellules exprimant une arrestine non visuelle correspondant à un récepteur β 2-adrénérgique. Ce médulloblastome à grandes cellules (cf. Article II) montre une expression de neurofilament et de synaptophysine dans 90 % des cellules sans expression

de vimentine et une expression d'une arrestine non visuelle dans 35 % des cellules. Ce médulloblastome à grandes cellules présentent malheureusement le pronostic extrêmement sévère des autres médulloblastomes à grandes cellules.

E - Les rétinoblastomes

Au niveau de l'œil, on constate que les trois anticorps testés (anti-PAX-6, MITF et EN-2) reconnaissent leurs antigènes dans la rétine résiduelle au contact de presque tous les prélèvements de rétinoblastomes. Ces trois facteurs de transcription sont exprimés simultanément dans la couche granulaire externe des photorécepteurs et à des degrés variables dans la couche nucléaire interne, ainsi que dans la couche des cellules ganglionnaires (Figure 15 et Tableau 15). PAX-6 est détecté dans les cellules amacrines, horizontales et ganglionnaires (Marquardt *et al.*, 2002), mais pas dans les photorécepteurs de la rétine normale. Par contre, au cours de l'embryogenèse, les neuroblastes précurseurs des photorécepteurs expriment ce gène avant leur différenciation. Il s'agirait donc de la re-expression d'un gène déjà exprimé par les cellules avant leur différenciation, sous l'influence de "facteurs" produits par la tumeur adjacente.

De la même façon MITF s'exprime également dans les photorécepteurs, la couche nucléaire interne et les cellules ganglionnaires. Là encore, il s'agit de la re-expression d'un gène exprimé dans les cellules neuroépithéliales qui vont donner les différentes cellules de la rétine. Contrairement à PAX-6, la ségrégation des cellules exprimant MITF se fait très tôt, dès le stade de la cupule optique. A ce stade, seule la partie postérieure de la cupule qui fournira la future rétine pigmentaire exprime MITF (Nguyen et Arnheiter, 2000). Malgré cette disparition précoce de MITF des neuroblastes, bien avant qu'ils ne soient engagés dans une voie de différenciation neuronale, il se pourrait qu'une tumeur, comme le rétinoblastome, adjacente à la neurorétine soit capable de réactiver l'expression de MITF.

EN-2 est détecté dans les mêmes couches cellulaires que PAX-6 dans les cellules de la neurorétine à proximité de la tumeur, dans un tissu par ailleurs morphologiquement "normal" (Figure 15). L'expression de EN-2 dans la neurorétine normale n'a pas été rapportée. Par hybridation *in situ* l'ARN d'EN-2 peut être détecté dans les cellules ganglionnaires et la couche nucléaire interne de la rétine d'oiseau bien différenciée (Plaza *et al.*, 1997), mais la protéine, bien qu'impliquée dans la formation de la carte de projection rétinoectales (Retaux et Harris, 1996) n'est pas décrite dans la rétine.

Dans le but de définir si cette expression ectopique des facteurs de transcription était non spécifique et touchait tous les facteurs de transcription, nous avons entrepris la détection des protéines des gènes PAX-5 et MyoD, gènes qui ne sont pas exprimés dans ces tissus *in vivo*. Ces anticorps n'ont révélé aucun signal sur les coupes de rétine, suggérant que la remise en route des gènes codant les facteurs de transcription est limitée aux gènes préalablement exprimés par les cellules du neuroépithélium.

Ce phénomène n'est pas restreint au rétinoblastome, puisque nous avons pu le mettre en évidence dans le cas de mélanomes de la choroïde (Mouriaux *et al.*, 2003). Ces deux types de tumeurs étant d'origine différente, cela suggère que l'induction de cette réactivation par les tumeurs obéit à un mécanisme général. L'expression ou la re-expression des gènes est dépendante de la combinaison des facteurs de transcription présents dans la cellule, mais également de l'état de la chromatine de ces gènes. En effet, la chromatine est constituée d'un enchaînement de nucléosomes, consistant en 146 paires de base d'ADN entourant un octamère d'histones. L'état des modifications de ces histones est essentiel pour le degré de compaction de la chromatine. Les histones acétylées conduisent à une chromatine relâchée, transcriptionnellement active, alors qu'une histone hypo-acétylée conduit à une chromatine compacte, transcriptionnellement inactive et c'est ce type d'histone qui prévaut dans les cellules différenciées ou un certain nombre de facteurs de transcription doit rester silencieux (Roth *et al.*, 2001). Un effet synergique sur l'expression des gènes a été observé lors de l'action simultanée des enzymes modifiant les histones par acétylation et méthylation (Cameron *et al.*, 1999). Il est possible que des facteurs sécrétés par la tumeur conduisent les cellules de la rétine adjacente à modifier l'activité de ces complexes enzymatiques, de telle façon que la chromatine entourant les gènes transcriptionnellement inactifs suite à la différenciation cellulaire redevienne permissive et permette leur re-expression. L'activité de ces complexes enzymatiques est en effet contrôlée par les voies biochimiques convoyant le signal depuis la membrane externe jusqu'au noyau (Hauser *et al.*, 2002), et comme nous le savons, les tumeurs sécrètent de nombreuses molécules de signalisation autocrine et paracrine (Kventa *et al.*, 1996).

Au niveau des rétinoblastomes, 8 d'entre eux montrent un marquage nucléaire avec PAX-6 suggérant un aspect moins différencié dans ces cellules tumorales en accord avec leur aspect morphologique. EN-2 est détecté dans 8 tumeurs qui possèdent des zones de différenciation. Parfois au sein de la même tumeur, on observe les deux facteurs de transcription dans des localisations différentes, ce qui montre l'hétérogénéité de certains

rétinoblastomes. Pour MITF, il est exprimé dans 13 tumeurs. L'expression de MITF dans les rétinoblastomes pourrait expliquer l'observation effectuée par l'équipe de Takeda en 2003 montrant l'expression des gènes cibles de MITF impliqué dans la pigmentation (Tyrosinase Related Protein 2) dans les cellules Y79 de rétinoblastomes. L'expression des différents marqueurs que nous avons utilisés pourrait refléter l'engagement des cellules tumorales dans des voies de différenciation distinctes ; ainsi certaines lignées de rétinoblastomes expriment des marqueurs de photorécepteurs (Li *et al.*, 2003). L'expression des facteurs de transcription que nous avons retrouvée dans le noyau des cellules tumorales pourrait refléter l'engagement de ces cellules dans les multiples voies de différenciation que pourraient suivre ces cellules du neuroépithélium.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Notre travail, effectué sur les PNETs, a fait ressortir quelques points essentiels :

- i) l'expression de PAX-6 n'est observée que dans les cellules indifférenciées,
- ii) l'expression de EN-2 n'est pas détectée dans des cellules indifférenciées mais dans des cellules présentant une "activation", soit par différenciation au sein d'une tumeur, soit par réaction au sein ou au pourtour d'une tumeur.
- iii) PAX-6 semble avoir une relation avec la survie des patients, même si cette constatation n'a pu être confirmée statistiquement.

Dans un souci constant de mieux adapter des thérapeutiques si lourdes de conséquences, ces travaux nous encouragent à poursuivre nos recherches en biologie moléculaire puisque, déjà dans d'autres tumeurs du SNC, des résultats semblent apparaître.

De plus en plus, certaines mutations ou certains déséquilibres chromosomiques sont mis en évidence. Dorénavant, leur présence ou leur absence impliqueront une stratégie thérapeutique différente, permettant parfois d'éviter des effets secondaires dramatiques.

BIBLIOGRAPHIE

Aboitiz F, Montiel J and Lopez J (2002) An hypothesis on the early evolution of the development of the isocortex. *Brain Res. Bull.*, 57 : 481-3.

Adachi S, Okuno M, Matsushima-Nishiwaki R, Takano Y, Kojima S, Friedman SL, Moriwaki H and Okano Y (2002) Phosphorylation of retinoid X receptor suppresses its ubiquitination in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 35 : 332-40.

Adams JM and Cory S (1985) Myc oncogene activation in B and T lymphoid tumours. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 226 : 59-72.

Adams JM and Cory S (1998) The Bcl-2 protein family : arbiters of cell survival. *Science*, 281 : 1322-6.

Adams NC, Tomoda T, Cooper M, Dietz G and Hatten ME (2002) Mice that lack astrotactin have slowed neuronal migration. *Development*, 129 : 965-72.

Adamsbaum C, Gelot A, Andre C and Baron JM (2001) Atlas d'IRM du cerveau foetal. Chapitre 2, p 11, Masson.

Agerlin N, Gjerris F, Brincker H, Haase J, Laursen H, Moller KA, Ovesen N, Reske-Nielsen E and Schmidt K (1999) Childhood medulloblastoma in Denmark 1960-1984. A population-based retrospective study. *Childs Nerv. Syst.*, 15 : 29-37.

Anderson WF, Ohlendorf DH, Takeda Y, Matthews BW (1981) Structure of the cro repressor from bacteriophage lambda and its interaction with DNA. *Nature*, 290 : 754-8.

Angel P and Karin M (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1072 : 129-57.

Antonsson B (2001) Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family "killer-proteins" and their victim the mitochondrion. *Cell Tissue Res.*, 306 : 347-61.

Araki I and Nakamura H (1999) Engrailed defines the position of dorsal di-mesencephalic boundary by repressing diencephalic fate. *Development*, 126 : 5127-5135.

Arends MJ and Wyllie AH (1991) Apoptosis : mechanisms and roles in pathology. *Int. Rev. Exp. Pathol.*, 32 : 223-254.

Armstrong E, Schleicher A, Omran H, Curtis M and Zilles K (1995) The ontogeny of human gyrification. *Cereb. Cortex*, 5 : 56-63.

Asano M and Gruss P (1992) Pax-5 is expressed in the midbrain-hindbrain boundary during mouse development. *Mech. Dev.*, 33 : 27-38.

Ashery-Padan R, Marquardt T, Zhou X and Gruss P (2000) Pax6 activity in the lens primordium is required for lens formation and for correct placement of a single retina in the eye. *Genes Dev.*, 14 : 2701-11.

Attié-Bitach T, Lyonnet S, Vekemans M and Lacombe D (1998) Gènes Pax et anomalies du développement. *MT Pédiatrie*, 1 : 517-26.

- Baader SL, Sanlioglu S, Berrebi AS, Parker-Thornburg J and Oberdick J (1998) Ectopic overexpression of Engrailed-2 in cerebellar Purkinje cells causes restricted cell loss and retarded external germinal layer development at lobule junctions. *J. Neurosci.* 18 : 1763-1773.
- Babinet C (1993) Une famille de gènes du développement : les gènes Pax. *Médecine Sciences*, 9 : 87-91.
- Bagnard D, Choumlamountri N, Puschel AW and Bolz J (2001) Axonal surface molecules act in combination with semaphorin 3a during the establishment of corticothalamic projections. *Cereb. Cortex*, 11 : 278-285.
- Bailey P and Cushing H (1926) A classification of the tumors of the glioma group on a histogenetic basis with a correlated study of prognosis. Philadelphia, Lippincott.
- Ballerini P, Blaise A, Busson-Le Coniat M, Su XY, Zucman-Rossi J, Adam M, van den Akker J, Perot C, Pellegrino B, Landman-Parker J, Douay L, Berger R and Bernard OA (2002) HOX11L2 expression defines a clinical subtype of pediatric T-ALL associated with poor prognosis. *Blood*, 100 : 991-7.
- Bally-Cuif L and Wassef M (1994) Ectopic induction and reorganization of Wnt-1 expression in quail/chick chimeras. *Development*, 120 : 3379-3394.
- Bally-Cuif L and Wassef M (1995) Determination events in the nervous system of the vertebrate embryo. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 5 : 450-8.
- Barr FG (2001) Gene fusions involving PAX and FOX family members in alveolar rhabdomyosarcoma. *Oncogene*, 20 : 5736-46.
- Bar-Sagi D and Hall A (2000) Ras and Rho GTPases: a family reunion. *Cell*, 103 : 227-38.
- Bartek J, Bartkova J and Lukas J (1997) The retinoblastoma protein pathway in cell cycle control and cancer. *Exp. Cell Res.*, 237 : 1-6.
- Baulmann DC, Ohlmann A, Flugel-Koch C, Goswami S, Cvekl A and Tamm ER (2002) Pax6 heterozygous eyes show defects in chamber angle differentiation that are associated with a wide spectrum of other anterior eye segment abnormalities. *Mech. Dev.*, 118 : 3-17.
- Becker LE (1985) An appraisal of the World Health Organization classification of tumors of the central nervous system. *Cancer*, 56 : 1858-64.
- Belech-Adams T, Tomarey S, Li HS, Ploder L, McInnes RR, Sundin O and Adler R (1997) Pax-6, Prox 1, and Chx10 homeobox gene expression correlates with phenotypic fate of retinal precursor cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 38 : 1293-303.
- Bevelander G (1970) *Eléments d'Histologie*, 6^e édition, Maloine SA.
- Bhattacharjee M, Hicks J, Langford L, Dauser R, Strother D, Chintagumpala M, Horowitz M, Cooley L and Vogel H (1997) Central nervous system atypical teratoid/rhabdoid tumors of infancy and childhood. *Ultrastruct. Pathol.*, 21 : 369-78.

Biegel JA, Burk CD, Barr FG and Emanuel BS (1992) Evidence for a 17p tumor related locus distinct from p53 in pediatric primitive neuroectodermal tumors. *Cancer Res.*, 52 : 3391-3395.

Biegel JA, Rorke LB, Janss AJ, Sutton LN and Parmiter AH (1995) Isochromosome 17q demonstrated by interphase fluorescence in situ hybridization in primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Genes Chromosomes Cancer*, 14 : 85-96.

Biegel JA, Janss AJ, Raffel C, Sutton L, Rorke LB, Harper JM and Phillips PC (1997) Prognostic significance of chromosome 17p deletions in childhood primitive neuroectodermal tumors (medulloblastomas) of the central nervous system. *Clin. Cancer Res.*, 3 : 473-8.

Biegel JA, Tan L, Zhang F, Wainwright L, Russo P, Rorke LB (2002) Alterations of the hSNF5/INI1 gene in central nervous system atypical teratoid/rhabdoid tumors and renal and extrarenal rhabdoid tumors. *Clin. Cancer Res.*, 8 : 3461-7.

Bigner SH, Mark J, Friedman HS, Biegel JA and Bigner DD (1988) Structural chromosomal abnormalities in human medulloblastoma. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 30 : 91-101.

Bigner SH, Friedman HS, Vogelstein B, Oakes WJ and Bigner DD (1990) Amplification of the c-myc gene in human medulloblastoma cell lines and xenografts. *Cancer Res.*, 50 : 2347-2350.

Bigner SH, McLendon RE, Fuchs H, McKeever PE and Friedman HS (1997) Chromosomal characteristics of childhood brain tumors. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 97 : 125-34.

Bissonnette RP, Echeverri F, Mahboubi A and Green DR (1992) Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature*, 359 : 552-554.

Bogenmann E, Lochrie MA and Simon MI (1988) Cone cell-specific genes expressed in retinoblastoma. *Science*, 240 : 76-78.

Boje KM and Arora K (1992) Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain Res.*, 587 : 250-256.

Bopp D, Burri M, Baumgartner S, Frigerio G and Noll M (1986) Conservation of a large protein domain in the segmentation gene paired and in functionally related genes of *Drosophila*. *Cell*, 47 : 1033-1040.

Borges AS, Susanna R Jr, Carani JC, Betinjane AJ, Alward WL, Stone EM, Sheffield VC and Nishimura DY (2002) Genetic analysis of PITX2 and FOXC1 in Rieger Syndrome patients from Brazil. *J. Glaucoma*, 11 : 51-6.

Borgne A, Ostvold AC, Flament S and Meijer L (1999) Intra-M phase-promoting factor phosphorylation of cyclin B at the prophase/metaphase transition. *J. Biol. Chem.*, 274 : 11977-86.

- Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH and Yancopoulos GD (1991) ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell*, 65 : 663-75.
- Brunelli S, Faiella A, Capra V, Nigro V, Simeone A, Cama A and Boncinelli E (1996) Germline mutations in the homeobox gene EMX2 in patients with severe schizencephaly. *Nature Genetics*, 12 : 94-6.
- Burger PC and Scheithauer BW (1994) Tumours of the central nervous system. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, 452.
- Cahana A, Escamez T, Nowakowski RS, Hayes NL, Giacobini M, von Holst A, Shmueli O, Sapir T, McConnell SK, Wurst W, Martinez S and Reiner O (2001) Targeted mutagenesis of *Lis1* disrupts cortical development and *LIS1* homodimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98 : 6429-34.
- Cairns P, Mao L, Merlo A, Lee DJ, Schwab D, Eby Y, Tokino K, van der Riet P, Blaugrund JE and Sidransky D (1994) Rates of p16 (MTS1) mutations in primary tumors with 9p loss. *Science*, 265 : 415-7.
- Cambray-Deakin (1991) In chapter : Cytoskeleton of the growing axon p245. In : *The neuronal cytoskeleton*. Robert D Burgoyne, Ed. WILEY-LISS A John Wiley and Sons, INC.
- Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S, Herman JG and Baylin SB (1999) Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat. Genet.*, 21 : 103-107.
- Caputy AJ, Mc Cullough DC, Manz HJ, Patterson K, Hammock MK (1987) A review of the factors influencing the prognosis of medulloblastoma. The importance of cell differentiation. *J. Neurosurg.*, 66 : 80-87.
- Carriere C, Plaza S, Martin P, Quatannens B, Bailly M, Stehelin D, Saule S (1993) Characterization of Quail Pax-6 (Pax-QNR) proteins expressed in the Neuroretina. *Molecular and Cellular Biology*, 13 : 7257-7266.
- Cazzaniga G, Daniotti M, Tosi S, Giudici G, Aloisi A, Pogliani E, Kearney L and Biondi A (2001) The paired box domain gene PAX5 is fused to ETV6/TEL in an acute lymphoblastic leukemia case. *Cancer Res.*, 61 : 4666-70.
- Cecconi F (1999) Apaf1 and the apoptotic machinery. *Cell Death Differ.*, 6 : 1087-98.
- Cervoni L and Cantore G (1995) Medulloblastoma in pediatric age : a single-institution review of prognostic factors. *Childs Nerv. Syst.*, 11 : 80-5.
- Chi JG and Dooling EC (1976) Gyral development of the human brain. *Trans. Am. Neurol. Assoc.*, 101 : 89-90.
- Chiou SK, Rao L and White E (1994) Bcl-2 blocks p53-dependent apoptosis. *Mol. Cell Biol.*, 14 : 609-619.

Choux M and Lena G (1982) Le médulloblastome. Neurochirurgie (suppl. 1), 28.

Chu Y, Hughes S and Chan-Ling T (2001) Differentiation and migration of astrocyte precursor cells and astrocytes in human fetal retina: relevance to optic nerve coloboma. *FASEB J.*, 15 : 2013-5.

Clarke S, Kraftik R, Van der Loos H and Innocenti G (1989) Forms and mesures of adult and developping human corpus callosum : is there sexual dysmorphism ? *J. Comp. Neurol.*, 280 : 213-230.

Cogen PH and McDonald JD (1996) Tumor suppressor genes and medulloblastoma. *J. Neurooncol.*, 29 : 103-112.

Connolly MJ, Payne RH, Johnson G, Gallie BL, Allderdice PW, Marshall WH and Lawton RD (1983) Familial, EsD-linked, retinoblastoma with reduced penetrance and variable expressivity. *Hum. Genet.*, 65 : 122-124.

Conradt B and Horvitz HR (1998) The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell*, 93 : 519-29.

Coquelle FM, Caspi M, Cordelieres FP, Dompierre JP, Dujardin DL, Koifman C, Martin P, Hoogenraad CC, Akhmanova A, Galjart N, De Mey JR and Reiner O (2002) LIS1, CLIP-170's key to the dynein/dynactin pathway. *Mol. Cell Biol.*, 22 : 3089-3102.

Craig C, Tropepe V, Morshead C, Reynolds BA, Weiss S and van Der kooy D (1996) In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell population in adult mouse brain. *J. Neurosci.*, 16 : 2649-2658.

Crolla JA and van Heyningen V (2002) Frequent chromosome aberrations revealed by molecular cytogenetic studies in patients with aniridia. *Am. J. Hum. Genet.*, 71 : 1138-49.

Cunliffe HE, McNoe LA, Ward TA, Devriendt K, Brunner HG and Eccles MR (1998) The prevalence of PAX2 mutations in patients with isolated colobomas or colobomas associated with urogenital anomalies. *J. Med. Genet.*, 35 : 806-12.

Cvekl A, Kashanchi F, Brady JN and Piatigorsky J (1999) Pax-6 interactions with TATA-box-binding protein and retinoblastoma protein. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 40 : 1343-50.

David KM, Casey AT, Hayward RD, Harkness WF, Phipps K and Wade AM (1997) Medulloblastoma : is the 5-year survival rate improving ? A review of 80 cases from a single institution. *J. Neurosurg.*, 86 : 13-21.

Davis CA and Joyner AL (1988) Expression patterns of the homeobox-containing genes En-1 and En-2 and the proto-oncogene Int-1 diverge during mouse development. *Gene Develop.*, 2 : 1736-1744.

Davis CA, Holmyard DP, Millen KJ and Joyner AL (1991) Examining pattern formation in mouse, chicken and frog embryos with an En-2 specific anti serum. *Dev.*, 111 : 287-298.

De La Torre Mondragon L, Ridaura Sang C, Reyes Mujica M and Rueda Franco F (1993) Central nervous system tumors in Mexican children. *Child's Nerv. Syst.*, 9 : 260-265.

Demir N and Demir R (2001) Effects of maternal bilateral adrenalectomy on fetal rat cerebral cortex. *Int. J. Neurosci.*, 111 : 21-38.

Dhellemmes P, Demaille MC, Lejeune JP, Baranzelli MC, Combelles G and Torrealba G (1986) Cerebellar medulloblastoma : results of multidisciplinary treatment. Report of 120 cases. *Surg. Neurol.*, 25 : 290-4.

Doz F (1993) Les tumeurs cérébrales malignes de l'enfant. *Revue Praticien*, 43 : 2187-2191.

Dozier C, Carriere C, Grevin D, Martin P, Quatannens B, Stehelin D and Saule S (1993) Structure and DNA-binding properties of Pax-QNR, a paired box -and homeobox-containing gene. *Cell Growth & Differentiation*, 4 : 281-289.

Dressler GR, Deutsch U, Chowdhury K, Nornes HO and Gruss P (1990) Pax-2, a new murine paired-box-containing gene and its expression in the developing excretory system. *Dev.*, 109 : 787-795.

Dryja TP, Rapaport JM, Weichselbaum R and Bruns GAP (1984) Chromosome 13 restriction fragment length polymorphisms. *Hum. Genet.*, 65 : 320-324.

Duboule D and Dolle P (1989) The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of Drosophila homeotic genes. *EMBO*, 8 : 1497-1505.

Duboule D and Morata G (1994) Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes. *Trends Genet.*, 10 : 358-64.

Englund U, Bjorklund A and Victorin K (2002) Migration patterns and phenotypic differentiation of long-term expanded human neural progenitor cells after transplantation into the adult rat brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 134 : 123-41.

Epstein JA, Glaser T, Cai J, Jepeal LW and Maas RL (1994 a) Two independent and interactive DNA-binding subdomains of the Pax-6 paired domain are regulated by alternative splicing. *Genes & Dev.*, 8 : 2022-2034.

Epstein JA, Cai J, Glaser T, Jepeal LW and Maas RL (1994 b) Identification of a Pax paired domain recognition sequence and evidence for DNA-dependent conformational changes. *J. Biol. Chem.*, 269 : 8355-8361.

Estivill-Torres G, Pearson H, van Heyningen V, Price DJ and Rashbass P (2002) Pax6 is required to regulate the cell cycle and the rate of progression from symmetrical to asymmetrical division in mammalian cortical progenitors. *Development*, 129 : 455-66.

Farwell JR, Dohrmann GJ and Flannery JF (1984) Medulloblastoma in childhood : an epidemiological study. *J. Neurosurg.*, 61 : 657-664.

Favor J, Peters H, Hermann T, Schmahl W, Chatterjee B, Neuhauser-Klaus A and Sandulache R (2001) Molecular characterization of Pax6(2Neu) through Pax6(10Neu): an

extension of the Pax6 allelic series and the identification of two possible hypomorph alleles in the mouse *Mus musculus*. *Genetics*, 159 : 1689-700.

Flomen RH, Vatcheva R, Gorman PA, Baptista PR, Groet J, Barisic I, Ligutic I and Nizetic D (1998) Construction and analysis of a sequence-ready map in 4q25: Rieger syndrome can be caused by haploinsufficiency of RIEG, but also by chromosome breaks approximately 90 kb upstream of this gene. *Genomics*, 47 : 409-13.

Forrester JV, Dick AD, McMenamin PG and Lee WR (2002) *The eye*, 2nd edition. London : Harcourt Publishers limited.

Fox JW, Lamperti ED, Eksioglu YZ, Hong SE, Feng Y, Graham DA, Scheffer IE, Dobyns WB, Hirsch BA, Radtke RA, Berkovic SF, Huttenlocher PR and Walsh CA (1998) Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia. *Neuron*, 21 : 1315-25.

Fukushima Y, Kuroki Y, Ito T, Kondo I and Nishigaki I (1987) Familial retinoblastoma (mother and son) with 13q14 deletion. *Hum. Genet.*, 77 : 104-107.

Furukawa T, Morrow EM, Li T, Davis FC and Cepko CL (1999) Retinopathy and attenuated circadian entrainment in *Crx*-deficient mice. *Nat. Genet.*, 23 : 466-70.

Galea MP and Darian-Smith I (1995) Post-natal maturation of the direct cortico-spinal projections in the macaque monkey. *Cereb. Cortex*, 5 : 518-540.

Gallie BL, Ellsworth RM, Abramson DM and Phillips RA (1982) Retinoma: spontaneous regression of retinoblastoma or benign manifestation of the mutation ? *Brit. J. Cancer*, 45 : 513-521.

Garda AL, Echevarria D and Martinez S (2001) Neuroepithelial co-expression of *Gbx2* and *Otx2* precedes *Fgf8* expression in the isthmic organizer. *Mech. Dev.*, 101 : 111-8.

Gehring WJ (1993) Exploring the homeobox. *Gene*, 135 : 215-21.

Gerard M, Abitbol M, Delezoide AL, Dufier JL, Mallet J and Vekemans M (1995) PAX-genes expression during human embryonic development, a preliminary report. *C. R. Acad. Sci. III*, 318 : 57-66.

Germot A, Spengler T, Harrison G and Mazan S (2003) Structural evolution in mammals of *Crx*, an orthodenticle homeobox gene involved in retinal diseases in humans. In press.

Germot A, Lecointre G, Plouhinec JL, Le Mentec C, Girardot F and Mazan S (2001) Structural evolution of *Otx* genes in craniates. *Mol. Biol. Evol.*, 18 : 1668-78.

Gey W (1970) Dq-, multiple Missbildungen und Retinoblastom. *Humangenetik*, 10 : 362-365.

Gilbertson RJ, Jaros EB, Perry RH and Pearson AD (1992) Prognostic factors in medulloblastoma. *The Lancet*, 340 : 480.

Gilbertson R, Wickramasinghe C, Hernan R, Balaji V, Hunt D, Jones-Wallace D, Crolla J, Perry R, Lunec J, Pearson A and Ellison D (2001) Clinical and molecular stratification of disease risk in medulloblastoma. *Br. J. Cancer*, 85 : 705-12.

Giordana MT, Schiffer P and Schiffer D (1998) Prognostic factors in medulloblastoma. *Childs Nerv. Syst.*, 14 : 256-62.

Giordana MT Giordana MT, Schiffer P P, Lanotte M, Girardi P and Chio A (1999) Epidemiology of adult medulloblastoma. *Int. J. Cancer*, 80 : 689-692.

Glaser T, Jepeal L, Edwards J, Young R, Favor J and Maas R (1994) PAX 6 gene dosage effect in a family with congenital cataracts, aniridia, anophthalmia and central nervous system defects. *Nature Genetics*, 7 : 463-471.

Goldberg-Stern H, Gadoth N, Stern S, Cohen IJ, Zaizov R and Sandbank U (1991) The prognostic significance of glial fibrillary acidic protein staining in medulloblastoma. *Cancer*, 68 : 568-73.

Gould VE, Jansson DS, Molenaar WM, Rorke LB, Trojanowski JQ, Lee VM, Packer RJ and Franke WW (1990) Primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. Patterns of expression of neuroendocrine markers, and all classes of intermediate filament proteins. *Laboratory Investigation*, 4 : 498-509.

Goulding M, Chalepakis G, Deutsch U, Erselius JR and Gruss P (1991) Pax-3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis. *EMBO J.*, 10 : 1135-1147.

Goumnerova LC (1996) Growth factor receptors and medulloblastoma. *J Neurooncol.*, 29 : 85-89.

Griffin CA, Hawkins AL, Packer RJ, Rorke LB and Emanuel BS (1988) Chromosome abnormalities in pediatric brain tumors. *Cancer Res.*, 48 : 175-180.

Griffin C, Kleinjan DA, Doe B and van Heyningen V (2002) New 3' elements control Pax6 expression in the developing pretectum, neural retina and olfactory region. *Mech. Dev.*, 112 : 89-100.

Gross A (2001) BCL-2 proteins: regulators of the mitochondrial apoptotic program. *IUBMB Life*, 52 : 231-6.

Grotzer MA, Janss AJ, Fung K, Biegel JA, Sutton LN, Rorke LB, Zhao H, Cnaan A, Phillips PC, Lee VM and Trojanowski (2000) TrkC expression predicts good clinical outcome in primitive neuroectodermal brain tumors. *J. Clin. Oncol.*, 18 : 1027-35.

Hanahan D and Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, 100 : 57-70.

Hanes SD and Brent R (1989) DNA specificity of the bicoid activator protein is determined by homeodomain recognition helix residue 9. *Cell*, 57 : 1275-83.

- Hanks MC, Loomis CA, Harris E, Tong CX, Anson-Cartwright L, Auerbach A and Joyner A (1998) *Drosophila* engrailed can substitute for mouse Engrailed1 function in mid-hindbrain, but not limb development. *Development*, 125 : 4521-30.
- Hanson IM, Fletcher JM, Jordan T, Brown AT, Adams RJ, Punnett HH and Van Heyningen V (1994) Mutations at the PAX6 locus are found in heterogeneous anterior segment malformations including Peter's anomaly. *Nature Genet.*, 6 : 168-173.
- Harris MD, Moore IE, Steart PV and Weller RO (1990) Protein gene product (PGD) 9,5 as a reliable marker in primitive neuroectodermal tumours -an immunohistochemical study of 21 childhood cases-. *Histopathol.*, 16 : 271-277.
- Hart MN and Earle KM (1973) Primitive neuroectodermal tumors of the brain in children. *Cancer*, 32 : 890-897.
- Hashemolhosseini S, Nagamine Y, Morley SJ, Desrivieres S, Mercep L and Ferrari S (1998) Rapamycin inhibition of the G1 to S transition is mediated by effects on cyclin D1 mRNA and protein stability. *J. Biol. Chem.*, 273 : 14424-9.
- Haslam RHA, Lamborn KR, Becker LE and Israel MA (1998) Tumor cell apoptosis present at diagnosis may predict treatment outcome for patients with medulloblastoma. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, 20 : 520-7.
- Hauck B, Gehring WJ and Walldorf U (1999) Functional analysis of an eye specific enhancer of the *eyeless* gene in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96 : 564-9.
- Hauser P, Slowik F, Babosa M, Bognar L, Fazekas I and Schuler D (2000) A case of central nervous system atypical teratoid / rhabdoid tumor. *Magy Onkol.*, 44 : 285-288.
- Hauser C, Schuettengruber B, Bartl S, Lagger G and Seiser C (2002) Activation of the mouse histone deacetylase 1 gene by cooperative histone phosphorylation and acetylation. *Mol. Cell Biol.*, 22 : 7820-7830.
- Hausmann G, O'Reilly LA, van Driel R, Beaumont JG, Strasser A, Adams JM and Huang DC (2000) Pro-apoptotic apoptosis protease-activating factor 1 (Apaf-1) has a cytoplasmic localization distinct from Bcl-2 or Bcl-x(L). *J. Cell Biol.*, 149 : 623-34.
- Haydon PG and Drapeau P (1995) From contact to connection : early events during synaptogenesis. *Trends Neurosci.*, 18 : 196-201.
- Heins N, Malatesta P, Cecconi F, Nakafuku M, Tucker KL, Hack MA, Chapouton P, Barde YA and Gotz M (2002) Glial cells generate neurons : the role of the transcription factor Pax6. *Nat. Neurosci.*, 5 : 308-15.
- Herms J, Neidt I, Luscher B, Sommer A, Schurmann P, Schroder T, Bergmann M, Wilken B, Probst-Cousin S, Hernaiz-Driever P, Behnke J, Hanefeld F, Pietsch T and Kretzschmar HA (2000) C-MYC expression in medulloblastoma and its prognostic value. *Int. J. Cancer*, 89 : 395-402.
- Hickman ES and Helin K (2002) The regulation of APAF1 expression during development and tumorigenesis. *Apoptosis*, 7 : 167-71.

Hidalgo A (1996) The roles of engrailed. *TIG*, 12 : 1-4.

Hill RE, Favor J, Hogan BL, Ton CC, Saunders GF, Hanson IM, Prosser J, Jordan T, Hastie ND and van Heyningen V (1991) Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene. *Nature*, 354 : 522-5.

Hill ME, Asa SL and Drucker DJ (1999) Essential requirement for Pax6 in control of enteroendocrine proglucagon gene transcription. *Mol. Endocrinol.*, 13 : 1474-86.

Hoppe-Hirsch E, Renier D, Lellouch-Tubiana A, Sainte-Rose C, Pierre-Kahn A and Hirsch JF (1990) Medulloblastoma in childhood : progressive intellectual deterioration. *Childs Nerv. Syst.*, 6 : 60-5.

Hunter T and Pines J (1994) Cyclins and cancer II : cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell*, 79 : 573-582.

Hunter T (2000) Signaling--2000 and beyond. *Cell*, 100 : 113-27.

Jaffredo T, Vandebunder B and Dieterlen-Lievre F (1989) In situ study of c-myc protein expression during avian development. *Development*, 105 : 679-95.

Jenkin D, Goddard K, Armstrong D, Becker L, Berry M, Chan H, Doherty M, Greenberg M, Hendrick B, Hoffman H, *et al.* (1990) Posterior fossa medulloblastoma in childhood: treatment results and a proposal for a new staging system. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 19 : 265-74.

Joliot A, Trembleau A, Raposo G, Calvet S, Volovitch M and Prochiantz A (1997) Association of Engrailed homeoproteins with vesicles presenting caveolae-like properties. *Development*, 124 : 1865-1875.

Jordan T, Hanson I, Zaletayev D, Hodgson S, Prosser J, Seawright A, Hastie N and van Heyningen V (1992) The human pax-6 gene is mutated in two patients with aniridia. *Nature Genet.*, 1 : 328-332.

Jostes B, Walther C and Gruss P (1991) The murine paired box gene, Pax7, is expressed specifically during the development of the nervous and muscular system. *Mech. Dev.*, 33 : 27-38.

Joyner AL and Martin GR (1987) En-1 and En-2, two mouse genes with sequence homology to the *Drosophila* engrailed gene : expression during embryogenesis. *Genes & Dev.*, 1 : 29-38.

Joyner AL, Herrup K, Auerbach BA, Davis CA and Rosssant J (1991) Subtle cerebellar phenotype in mice homozygous for a targeted deletion of the En-2 homeobox. *Science*, 251 : 1239-1243.

Kadin ME, Rubinstein LJ and Nelson JS (1970) Neonatal cerebellar medulloblastoma originating from the fetal external granular layer. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 29 : 583-600.

- Kadoka RP, Allen JB, Hartman GA and Spruce WE (1989) Brain tumors in children. *J. Pediatr.*, 114 : 511-519.
- Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavtigian SV, Stockert E, Day RS 3rd, Johnson BE and Skolnick MH (1994 a) A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science*, 264 : 436-40.
- Kamb A, Shattuck-Eidens D, Eeles R, Liu Q, Gruis NA, Ding W, Hussey C, Tran T, Miki Y, Weaver-Feldhaus J, et al. (1994 b) Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. *Nat. Genet.*, 8 : 23-6.
- Kammandel B, Chowdhury K, Stoykova A, Aparicio S, Brenner S and Gruss P (1999) Distinct cis-essential modules direct the time-space pattern of the Pax6 gene activity. *Dev. Biol.*, 205 : 79-97.
- Katsetos CD and Burger PC (1994) Medulloblastoma. *Semin. Diag. Pathol.*, 2 : 85-97.
- Kernohan DW, Mabon RF, Svien HJ and Adson AW (1949) A simplified classification of gliomas. *Proc. Staff Mayo Clin.*, 24 : 71-75.
- Kerr JF, Wyllie AH and Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26 : 239-57.
- Khleif SN, Abrams SI, Hamilton JM, Bergmann-Leitner E, Chen A, Bastian A, Bernstein S, Chung Y, Allegra CJ and Schlom J (1999) A phase I vaccine trial with peptides reflecting ras oncogene mutations of solid tumors. *J. Immunother.*, 22 : 155-65.
- Kissinger CR, Liu BS, Martin-Blanco E, Kornberg TB and Pabo CO (1990) Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Angstrom resolution: a framework for understanding homeodomain-DNA interactions. *Cell*, 63 : 579-90.
- Kivela T (1999) Trilateral rétinoblastome : a meta-analysis of hereditary retinoblastoma associated with primary ectopic intracranial retinoblastoma. *J. Clin. Oncol.*, 17 : 1829-1837.
- Kleihues P, Burger PC and Scheithauer BW (1993) Histological typing of tumours of the central nervous system. Second Edition, Geneva, Springer-Verlag.
- Kleihues P and Cavenee WK (2000) Pathology and genetics of tumours of the nervous system. IARC Press, Lyon.
- Kortylewski M, Heinrich PC, Kauffmann ME, Bohm M, MacKiewicz A and Behrmann I (2001) Mitogen-activated protein kinases control p27/Kip1 expression and growth of human melanoma cells. *Biochem. J.*, 357 : 297-303.
- Kozmik Z, Kurzbauer R, Dörfler P and Busslinger M (1993) Alternative splicing of Pax-8 gene transcripts is developmentally regulated and generated isoforms with different transactivation properties. *Mol. Cell. Biol.*, 13 : 6024-6035.
- Kozmik Z, Sure U, Ruedi D, Busslinger M and Aguzzi A (1995) Deregulated expression of PAX5 in medulloblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92 : 5709-13.

- Krauss S, Johansen T, Korzh V, Moens Y, Ericson JA and Fjose A (1991) Zebrafish Pax (zf-a) : a paired box-containing gene expressed in the neural tube. *EMBO J.*, 10 : 3609-3919.
- Kuemerle B, Zanjani H, Joyner A and Herrup K (1997) Pattern deformities and cell loss in engrailed-2 mutant mice suggest two separate patterning events during cerebellar development. *J. Neurosci.* 17 : 7881-7889.
- Kulak SC, Kozlowski K, Semina EV, Pearce WG and Walter MA (1998) Mutation in the RIEG1 gene in patients with iridogoniodysgenesis syndrome. *Hum. Mol. Genet.*, 7 : 1113-1117.
- Kumar JP and Moses K (2001) EGF receptor and Notch signaling act upstream of Eyeless/Pax6 to control eye specification. *Cell*, 104 : 687-97.
- Kvanta A, Steen B and Seregard S (1996) Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in retinoblastoma but not in posterior uveal melanoma. *Exp. Eye Res.*, 63 : 511-518.
- Langman J (1976) *Abrégé d'Embryologie médicale*, 3^e édition, Masson.
- Laquis SJ, Rodriguez-Galindo C, Wilson MW, Fleming JC and Haik BG (2002) Retinoblastoma in a patient with an X;13 translocation and facial abnormalities consistent with 13q-syndrome. *Am. J. Ophthalmol.*, 133 : 285-287.
- Lemieux N, Messier PE, Jacob JL, Milot J and Richer L (1989) Precise cytogenetic localization of the Rb locus at subband 13q14.11 by ultrastructural detection after immunochemical chromosome banding. *Am. J. Hum. Genet.*, 45 : A27.
- Lenormand P, Pages G, Sardet C, L'Allemain G, Meloche S and Pouyssegur J (1993) MAP kinases: activation, subcellular localization and role in the control of cell proliferation. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res.*, 28 : 237-44.
- Li A, Zhu X, Brown B and Craft CM (2003) Gene expression networks underlying retinoic acid-induced differentiation of human retinoblastoma cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 44 : 996-1007.
- Li Song D and Joyner AL (2000) Two Pax2/5/8-binding sites in Engrailed2 are required for proper initiation of endogenous mid-hindbrain expression. *Mech. Dev.*, 90 : 155-165.
- Logan C, Khoo W, Cado D and Joyner AL (1993) Two enhancer regions in the mouse En-2 locus direct expression to the mid-hindbrain region and mandibular myoblast. *Dev.*, 117 : 905-918.
- Lopez-Gines C, Cerda-Nicolas M, Kepes J, Donat J, Gil-Benso R and Llombart-Bosch A (2000) Complex rearrangement of chromosomes 6 and 11 as the sole anomaly in atypical teratoid/rhabdoid tumors of the central nervous system. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 122 : 149-52.
- Lumsden A and Krumlauf R (1996) Patterning the vertebrate neuraxis. *Science*, 274 : 1109-15.

- Madhani HD (2001) Accounting for specificity in receptor tyrosine kinase signaling. *Cell*, 106 : 9-11.
- Maire JP, Guerin J, Rivel J, San Galli F, Bernard C, Dautheribes M and Caudry M (1992) Le médulloblastome de l'enfant. Incidence pronostique de l'hyperplasie vasculaire, de la nécrose de coagulation et de l'état clinique post-opératoire sur la survie. *Neurochirurgie*, 38 : 80-88.
- Maizel A, Bensaude O, Prochiantz A and Joliot A (1999) A short region of its homeodomain is necessary for engrailed nuclear export and secretion. *Development*, 126 : 3183-90.
- Marquardt T, Ashery-Padan R, Andrejewski N, Scardigli R, Guillemot F and Gruss P (2001) Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells. *Cell*, 105 : 43-55.
- Martin P, Carriere C, Dozier C, Quatannens B, Mirabel MA, Vandenbunder B, Stehelin D and Saule S (1992) Characterization of a paired box -and homeobox- containing quail gene (Pax-QNR) expressed in the neuroretina. *Oncogene*, 7 : 1721-1728.
- Martha A, Ferrell RE, Mintz-Hittner H, Lyons LA and Saunders GF (1994 a) Paired box mutations in familial and sporadic aniridia predicts truncated aniridia proteins. *Am. J. Hum. Genet.*, 54 : 801-11.
- Martha AD, Ferrell RE and Saunders GF (1994 b) Nonsense mutation in the homeobox region of the aniridia gene. *Hum. Mutat.*, 3 : 297-300.
- Matsunaga E, Araki I and Nakamura H (2000) Pax6 defines the di-mesencephalic boundary by repressing En1 and Pax2. *Development*, 127 : 2357-65.
- Maulbecker C and Gruss P (1993 a) The oncogenic potential of deregulated homeobox genes. *Cell Growth Differ.*, 4 : 431-441.
- Maulbecker C and Gruss P (1993 b) The oncogenic potential of Pax genes. *EMBO J*, 12 : 2361-2367.
- McKay DB and Steitz TA (1981) Structure of catabolite gene activator protein at 2.9 Å resolution suggests binding of left-handed β -DNA. *Nature*, 290 : 744-749.
- McMahon AP, Joyner AL, Bradley A and McMahon JA (1992) The midbrain-hindbrain phenotype of Wnt-1/Wnt-1- mice results from stepwise deletion of engrailed-expressing cells by 9.5 days postcoitum. *Cell*, 69 : 581-95.
- Metzstein MM, Stanfield GM and Horvitz HR (1998) Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: past, present and future. *Trends Genet.*, 14 : 410-6.
- Meyer G and Wahle P (1999) The paleocortical ventricle is the origin of reelin-expressing neurons in the marginal zone of the foetal human neocortex. *Eur. J. Neurosci.*, 11 : 3937-3944.

- Michiels EM, Weiss MM, Hoovers JM, Baak JP, Voute PA, Baas F and Hermsen MA (2002) Genetic alterations in childhood medulloblastoma analyzed by comparative genomic hybridization. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, 24 : 205-10.
- Millet S and Alvarado-Mallart RM (1995) Expression of the homeobox-containing gene *En-2* during the development of the chick central nervous system. *Eur. J. Neurosci.*, 7 : 777-791.
- Mizuguchi M, Qin J, Yamada M, Ikeda K and Takashima S (1999) High expression of doublecortin and KIAA0369 protein in fetal brain suggests their specific role in neuronal migration. *Am. J. Pathol.*, 155 : 1713-21.
- Molday RS (1998) Photoreceptor membrane proteins, phototransduction, and retinal degenerative diseases. The Friedenwald Lecture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 39 : 2491-2513.
- Molenaar W, Jansson D, Gould V, Rorke L, Franke W, Lee V, Packer R and Trojanowski J (1989) Molecular markers of primitive neuroectodermal tumors and other pediatric central nervous system tumors. *Laboratory Investigation*, 6 : 635-643.
- Morgan DO (1995) Principles of CDK regulation. *Nature*, 374 : 131-4.
- Moroni MC, Hickman ES, Denchi EL, Caprara G, Colli E, Cecconi F, Muller H and Helin K (2001) Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. *Nat. Cell Biol.*, 3 : 552-8.
- Motegi T, Kaga M, Yanagawa Y, Kadowaki H, Watanabe K, Inoue A, Komatsu M and Minoda K (1983) A recognizable pattern of the midface of retinoblastoma patients with interstitial deletion of 13q. *Hum. Genet.*, 64 : 160-162.
- Mouriaux F, Vincent S, Kerrhouche Z, Maurage CA, Planque N, Monte D, Labalette P and Saule S (2003) Microphthalmia Transcription Factor expression in choroidal melanomas. *Exp. Eye Res.* In press.
- Murphree AL and Benedict WF (1984) Retinoblastoma : clues to human oncogenesis. *Science*, 223 : 1028-1033.
- Nacher J, Crespo C and McEwen BS (2001) Doublecortin expression in the adult rat telencephalon. *Eur. J. Neurosci.*, 14 : 629-44.
- Nadarajah B, Alifragis P, Wong RO and Parnavelas JG (2002) Ventricle-directed migration in the developing cerebral cortex. *Nat. Neurosci.*, 5 : 218-24.
- Nakagawa M, Orii H, Yoshida N, Jojima E, Horie T, Yoshida R, Haga T and Tsuda M (2002) Ascidian arrestin (Ci-arr), the origin of the visual and nonvisual arrestins of vertebrate. *Eur. J. Biochem.*, 269 : 5112-5118.
- Newman MP, Feron F and Mackay-Sim A (2000) Growth factor regulation of neurogenesis in adult olfactory epithelium. *Neuroscience*, 99 : 343-50.

- Nguyen M and Arnheiter H (2000) Signaling and transcriptional regulation in early mammalian eye development: a link between FGF and MITF. *Development*, 127 : 3581-3591.
- Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K and Carson DA (1994) Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature*, 368 : 753-756.
- Nornes H, Dressler G, Knapik E, Deutsch U and Gruss P (1990) Spatially and temporally restricted expression of Pax-2 during murine neurogenesis. *Dev.*, 109 : 797-809.
- Otterson GW, Chen W, Coxon AB, Khleif SN and Kaye FJ (1997) Incomplete penetrance of familial retinoblastoma linked to germ-line mutations that result in partial loss of RB function. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 94 : 12036-12040.
- Packer RJ, Sutton LN, Rorke LB, Littman PA, Sposto R, Rosenstock JG, Bruce DA, Schut L (1984) Prognostic importance of cellular differentiation in medulloblastoma of childhood. *J. Neurosurg.*, 61 : 296-301.
- Packer RJ, Sutton LN, Elterman R, Lange B, Goldwein J, Nicholson HS, Mulne L, Boyett J, D'Angio G, Wechsler-Jentzsch K, *et al.* (1994) Outcome for children with medulloblastoma treated with radiation and cisplatin, CCNU, and vincristine chemotherapy. *J. Neurosurg.*, 81 : 690-8.
- Packer RJ, Biegel JA, Blaney S, Finlay J, Geyer JR, Heideman R, Hilden J, Janss AJ, Kun L, Vezina G, Rorke LB and Smith M (2002) Atypical teratoid/rhabdoid tumor of the central nervous system: report on workshop. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, 24 : 337-42.
- Pasquier L, Dubourg C, Blayau M, Lazaro L, Le Marec B, David V and Odent S (2000) A new mutation in the six-domain of SIX3 gene causes holoprosencephaly. *Eur. J. Hum. Genet.*, 8 : 797-800.
- Percin EF, Ploder LA, Yu JJ, Arici K, Horsford DJ, Rutherford A, Bapat B, Cox DW, Duncan AMV, Kalnins VI, Kocak-Altintas A, Sowden JC, Traboulsi E, Sarfarazi M and McInnes RR (2000) Human microphthalmia associated with mutations in the retinal homeobox gene CHX10. *Nat. Gen.*, 25 : 397-401.
- Peter M and Herskowitz I (1994) Joining the complex: cyclin-dependent kinase inhibitory proteins and the cell cycle. *Cell*, 79 : 181-4.
- Pierani A, Brenner-Morton S, Chiang C and Jessell TM (1999) A sonic hedgehog-independent, retinoid-activated pathway of neurogenesis in the ventral spinal cord. *Cell*, 97 : 903-915.
- Pietsch T, Waha A, Koch A, Kraus J, Albrecht S, Tonn S, Sorensen N, Berthold F, Henk B, Schmandt N, Wolf HK, von Deimling A, Wainwright B, Chenvix-Trench G, Wiestler OD and Wicking C (1997) Medulloblastomas of the desmoplastic variant carry mutations of the human homologue of Drosophila patched. *Cancer Res.*, 57 : 2085-2088.
- Pines J (1995) Cyclins, CDKs and cancer. *Semin. Cancer Biol.*, 6 : 63-72.

Planque N, Leconte L, Coquelle FM, Martin P and Saule S (2001) Specific Pax-6/microphthalmia transcription factor interactions involve their DNA-binding domains and inhibit transcriptional properties of both proteins. *J. Biol. Chem.*, 276 : 29330-7.

Platchov D, Chowdhury K, Walther C, Simon D, Guénet JL and Gruss P (1990) Pax8, a murine paired box gene expressed in the developing excretory system and thyroid gland. *Dev.*, 110 : 643-651.

Plaza S, Dozier C and Saule S (1993) Quail Pax-6 (Pax-QNR) encodes a transcription factor able to bind and trans-activate its own promoter. *Cell Growth Differ.*, 4 : 1-10.

Plaza S, Dozier C, Turque N and Saule S (1995 a) Quail Pax-6 (Pax-QNR) mRNAs are expressed from two promoters used differentially during retina development and neuronal differentiation. *Mol. Cell Biol.*, 15 : 3344-53.

Plaza S, Dozier C, Langlois MC and Saule S (1995 b) Identification and characterization of a neuroretina-specific enhancer element in the quail Pax-6 (Pax-QNR) gene. *Mol. Cell Biol.*, 15 : 892-903.

Plaza S, Turque N, Dozier C, Bailly M and Saule S (1995 c) C-Myb acts as transcriptional activator of the quail PAX6 (PAX-QNR) promoter through two different mechanisms. *Oncogene*, 10 : 329-40.

Plaza S, Langlois MC, Turque N, LeCornet S, Bailly M, Begue A, Quatannens B, Dozier C and Saule S (1997) The homeobox-containing Engrailed (En-1) product down-regulates the expression of Pax-6 through a DNA binding-independent mechanism. *Cell Growth Differ.*, 8 : 1115-25.

Ponce-Castaneda MV, Lee MH, Latres E, Polyak K, Lacombe L, Montgomery K, Mathew S, Krauter K, Sheinfeld J, Massague J, et al. (1995) p27Kip1: chromosomal mapping to 12p12-12p13.1 and absence of mutations in human tumors. *Cancer Res.*, 55 : 1211-4.

Prigogina EL, Fleischman EW, Volkova MA and Frenkel MA (1978) Chromosome abnormalities and clinical and morphologic manifestations of chronic myeloid leukemia. *Hum. Genet.*, 41 : 143-56.

Provias JP and Becker LE (1996) Cellular and molecular pathology of medulloblastoma. *J. Neurooncol.*, 29 : 35-43.

Püschel AW, Gruss P and Westerfield M (1992) Sequence and expression pattern of Pax-6 are highly conserved between zebrafish and mice. *Dev.*, 114 : 643-651.

Qian YQ, Billeter M, Otting G, Muller M, Gehring WJ and Wuthrich K (1989) The structure of the Antennapedia homeodomain determined by NMR spectroscopy in solution: comparison with prokaryotic repressors. *Cell*, 59 : 573-80.

Quiring R, Walldorf U, Kloter U and Gehring WJ (1994) Homology of the eyeless gene of *Drosophila* to the Small eye gene in mice and Aniridia in humans. *Science*, 265 : 785-9.

Raffel C, Jenkins RB, Frederick L, Hebrink D, Alderete B, Fults DW and James CD (1997) Sporadic medulloblastomas contain PTCH mutations. *Cancer Res.*, 57 : 842-5.

- Rakic P and Sidman RL (1970) Histogenesis of cortical layers in human cerebellum, particularly the lamina dissecans. *J. Comp. Neur.*, 139 : 473-500.
- Rapp UR, Goldsborough MD, Mark GE, Bonner TI, Groffen J, Reynolds FH Jr and Stephenson JR (1983) Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80 : 4218-22.
- Reddien PW, Cameron S, Horvitz HR (2001) Phagocytosis promotes programmed cell death in *C. elegans*. *Nature*, 412 : 198-202, comment in 133-5.
- Reddy AT and Packer RJ (1999) Medulloblastoma. *Curr. Opin. Neurol.*, 12 : 681-5.
- Retaux S and Harris WA (1996) Engrailed and retinotectal topography. *Trends Neurosci.*, 19 : 542-546.
- Richman DP, Stewart RM, Hutchinson JW et al. (1975) Mechanical model of brain convolution development. *Science*, 189 : 18-21.
- Rizzino A, Ruff E and Rizzino H (1986) Induction and modulation of anchorage-independent growth by platelet-derived growth factor, fibroblast growth factor, and transforming growth factor-beta. *Cancer Res.*, 46 : 2816-20.
- Rorke LB (1983) The cerebellar medulloblastoma and its relationship to primitive neuroectodermal tumors. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 42 : 1-15.
- Rorke LB, Gilles FM, Davis RL and Becker LE (1985) Revision of the World Health Organization classification of brain tumors of childhood brain tumors. *Cancer*, 56 : 1869-86.
- Roth SY, Denu JM and Allis CD (2001) Histone acetyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.*, 70 : 81-120.
- Roussel M, Saule S, Lagrou C, Rommens C, Beug H, Graf T and Stehelin D (1979) Three new types of viral oncogene of cellular origin specific for haematopoietic cell transformation. *Nature*, 281 : 452-5.
- Royet J (1998) Organisation spatiale des disques imaginaux et des bourgeons de membres. *Med. Sci.*, 14 : 1167-1175.
- Russel DS and Rubinstein LJ (1989) Pathology of tumours of the nervous system. Fifth edition, London, Edward Arnold, 1012.
- Rutka JT (1997) Medulloblastoma. *Clin Neurosurg*, 44 : 471-85.
- Sadler TW, Liu ET and Augustine KA (1995) Antisense targeting of engrailed-1 causes abnormal axis formation in mouse embryos. *Teratology*, 51 : 292-299.
- Sakai T, Ohtani N, McGee TL, Robbins PD and Dryja TP (1991) Oncogenic germ-line mutations in Sp1 and ATF sites in the human retinoblastoma gene. *Nature*, 353 : 83-86.

- Sandhu C and Slingerland J (2000) Deregulation of the cell cycle in cancer. *Cancer Detect. Prev.*, 24 : 107-18.
- Santi MR and Golden JA (2001) Periventricular heterotopia may result from radial glial fiber disruption. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 60 : 856-62.
- Sarnat HB, Benjamin DR, Siebert JR, Kletter GB and Cheyette SR (2002) Agenesis of the mesencephalon and metencephalon with cerebellar hypoplasia : putative mutation in the EN2 gene-report of 2 cases in early infancy. *Pediatr. Dev. Pathol.*, 5 : 54-68.
- Schlesinger PH, Gross A, Yin XM, Yamamoto K, Saito M, Waksman G and Korsmeyer SJ (1997) Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94 : 11357-62.
- Schiffer D, Cavalla P, Chio A, Giordana MT, Marino S, Mauro A, and Migheli A (1994) Tumor cell proliferation and apoptosis in medulloblastoma. *Acta Neuropathol. (Berl)*, 87 : 362-370.
- Schmal W, Knoedlseder M, Favor J and Davidson D (1993) Defects of a neuronal migration and pathogenesis of cortical malformations are associated with Small eye (Sey) in the mouse, a point mutation at the Pax-6 locus. *Acta Neuropathol.*, 86 : 126-135.
- Schofield DE, Yunis EJ, Geyer JR, Albright AL, Berger MS and Taylor SR (1992) DNA content and other prognostic features in childhood medulloblastoma. *Cancer*, 69 : 1307-1314.
- Schutz BR, Scheurlen W, Krauss J, Du M, Joos S, Bentz M and Lichter P (1996) Mapping of chromosomal gains and losses in primitive neuroectodermal tumors by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*, 16 : 196-203.
- Schwarz M, Alvarez-Bolado G, Dressler G, Urbanek P, Busslinger M and Gruss P (1999) Pax2/5 and Pax6 subdivide the early neural tube into three domains. *Mech. Dev.*, 82 : 29-39.
- Schwarz M, Cecconi F, Bernier G, Andrejewski N, Kammandel B, Wagner M and Gruss P (2000) Spatial specification of mammalian eye territories by reciprocal transcriptional repression of Pax2 and Pax6. *Development*, 127 : 4325-34.
- Scolnik MP, Palacios MF, Acevedo SH, Castuma MV, Larripa IB, Palumbo A, Moiraghi EB, Sasot AM and Huberman AB (1998) Promyelocytic blast crisis of chronic myelogenous leukaemia with translocations (9;22) and (15;17). *Leuk. Lymphoma*, 31 : 231-236.
- Serrano M, Hannon GJ and Beach D (1993) A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*, 366 : 704-7.
- Shaulian E and Karin M (2002) AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat. Cell Biol.*, 4 : 131-136.
- Sherr CJ (1996) Cancer cell cycles. *Science*, 274 : 1672-7.

Sherr CJ and Roberts JM (1999) CDK inhibitors : positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.*, 13 : 1501-12.

Shibahara S, Yasumoto K, Amae S, Udono T, Watanabe K, Saito H and Takeda K (2000) Regulation of pigment cell-specific gene expression by MITF. *Pigment Cell Res.*, 13 Suppl 8 : 98-102.

Shmueli O, Gdalyahu A, Sorokina K, Nevo E, Avivi A and Reiner O (2001) DCX in PC12 cells: CREB-mediated transcription and neurite outgrowth. *Hum. Mol. Genet.*, 10 : 1061-70.

Sidman RL and Rakic P (1973) Neuronal migration, with special reference to developing human brain : a review. *Brain Research*, 62 : 1-35.

Simon MA (2000) Receptor tyrosine kinases : specific outcomes from general signals. *Cell.*, 103 : 13-5.

Skaper SD, Moore SE and Walsh FS (2001) Cell signaling cascades regulating neuronal growth-promoting and inhibitory cues. *Prog. Neurobiol.*, 65 : 593-608.

Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR and Martin SJ (1999) Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade : hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J. Cell Biol.*, 144 : 281-92.

Smith J (1994) Hedgehog, the floor plate, and the zone of polarizing activity. *Cell*, 76 : 193-196.

Soengas MS, Capodici P, Polsky D, Mora J, Esteller M, Opitz-Araya X, McCombie R, Herman JG, Gerald WL, Lazebnik YA, Cordon-Cardo C and Lowe SW (2001) Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature*, 409 : 207-11.

Song DL, Chalepakis G, Gruss P and Joyner AL (1996) Two Pax-binding sites are required for early embryonic brain expression of an Engrailed-2 transgene. *Development* 122 : 627-635.

Stehelin D, Varmus HE, Bishop JM and Vogt PK (1976) DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature*, 260 : 170-3.

Sterling P (1990) Retina. In *the Synaptic Organization of the brain*. Edited by Shepard GM. New York, NY : Oxford University Press, 170-213.

Stevens MCG, Cameron AH, Muir KR, Parkes SE, Rei DH and Whitwell H (1991) Descriptive epidemiology of primary central nervous system tumours in children : a population-based study. *Clin. Onc.*, 3 : 323-329.

Stoykova A and Gruss P (1994) Roles of Pax-genes in developing and adult brain as suggested by expression patterns. *Journal of neuroscience*, 14 : 1395-1412.

Strachan T and Read AP (1994) PAX genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 4 : 427-38.

Stuart E and Gruss P (1995) Pax genes : what's new in developmental biology and cancer ? *Human Molecular Genetics*, 4 : 1717-1720.

Stuart ET, Haffner R, Oren M and Gruss P (1995) Loss of p53 function through PAX-mediated transcriptional repression. *EMBO J.*, 14 : 5638-45.

Su B and Karin M (1996) Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. *Curr. Opin. Immunol.*, 8 : 402-11.

Super H, Del Rio JA, Martinez A, Perez-Sust P and Soriano E (2000) Disruption of neuronal migration and radial glia in the developing cerebral cortex following ablation of Cajal-Retzius cells. *Cereb. Cortex*, 10 : 602-13.

Tai CY, Dujardin DL, Faulkner NE and Vallee RB (2002) Role of dynein, dynactin, and CLIP-170 interactions in LIS1 kinetochore function. *J. Cell Biol.*, 156 : 959-68.

Tachibana M, Perez-Jurado LA, Nakayama A, Hodgkinson CA, Li X, Schneider M, Miki T, Fex J, Francke U and Amheiter H (1994) Cloning of MITF, the human homolog of the mouse microphthalmia gene and assignment to chromosome 3p14.1-p12.3. *Hum. Mol. Genet.*, 3 : 553-7.

Takeda K, Yokoyama S, Yasumoto K, Saito H, Udono T, Takahashi K and Shibahara S (2003) OTX2 regulates expression of DOPachrome tautomerase in human retinal pigment epithelium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 300 : 908-914.

Taketani T, Taki T, Shibuya N, Kikuchi A, Hanada R and Hayashi Y (2002) Novel NUP98-HOXC11 fusion gene resulted from a chromosomal break within exon 1 of HOXC11 in acute myeloid leukemia with t(11;12)(p15;q13). *Cancer Res.*, 62 : 4571-4.

Tarabybin V, Stoykova A, Usman N and Gruss P (2001) Cortical upper layer neurons derive from the subventricular zone as indicated by Svet1 gene expression. *Development*, 128 : 1983-93.

Tassabehji M, Newton VE and Read AP (1994) Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia (MITF) gene. *Nat. Genet.*, 8 : 251-5. Comment in: 209-10.

Taylor AI (1970) Dq-, Dr and retinoblastoma. *Humangenetik*, 10 : 209-217.

Terzic J and Saraga-Babic M (1999) Expression pattern of PAX3 and PAX6 genes during human embryogenesis. *Int. J. Dev. Biol.*, 43 : 501-8.

Tooth HH (1912) Some observations on the growth and survival period of intra cranial tumors. *Brain*, 35 : 61-108.

Treisman J, Göncsy P, Vashishtha M, Harris E and Desplan C (1989) A single amino acid can determine the DNA binding specificity of homeodomain proteins. *Cell*, 59 : 553-562.

Treisman R (1996) Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 8 : 205-15.

- Tremblay P and Gruss P (1994) Pax : genes for mice and men. *Pharmacol.*, 61 : 205-26.
- Trojanowski JQ, Tohyama T and Lee VM (1992) Medulloblastomas and related primitive neuroectodermal brain tumors of childhood recapitulate molecular milestones in the maturation of neuroblasts. *Molecular Chemical Neuropathol.*, 17 : 121-135.
- Turque N, Plaza S, Radvanyi F, Carrière C and Saule S (1994) Pax-QNR/Pax-6, a paired box-and homeobox-containing gene expressed in neurons is also expressed in pancreatic endocrine cells. *Molecular endocrinology*, 8 : 929-938.
- Urbanek P, Wang ZQ, Fetka I, Wagner EF and Busslinger M (1994) Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax-5/BSAP. *Cell*, 79 : 901-912.
- Vagner-Capodano AM, Zattara-Cannoni H, Gambarelli D, Gentet JC, Gentori L, Lena G, Graziani N, Raybaud C, Choux M and Grisoli F (1994) Detection of i(17q) chromosome by fluorescent in situ hybridization (FISH) with interphase nuclei in medulloblastoma. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 78 : 1-6.
- Valk P, Verbakel S, von Lindern M, Lowenberg B and Delwel R (2000) Enhancement of erythropoietin-stimulated cell proliferation by Anandamide correlates with increased activation of the mitogen-activated protein kinases ERK1 and ERK2. *Hematol. J.*, 1 : 254-63.
- Virchow R (1863) *Die krankhaften gesch welste*. Berlin, Hirnschwold.
- Vojtek AB, Hollenberg SM and Cooper JA (1993) Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell*, 74 : 205-14.
- Vousden KH (2000) p53: death star. *Cell*, 103 : 691-4.
- Walther C and Gruss P (1991) Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development*, 113 : 1435-49.
- Walther C, Guenet JL and Simon D (1991) Pax : a murine multigene family of paired box-containing genes. *Genomics*, 11 : 424-434.
- Wassef M, Bally-Cuif L and Alvarado-Mallart RM (1993) Regional specification during cerebellar development. *Persective Develop.*, 1 : 127-132.
- Wolberger C, Vershon AK, Liu B, Johnson AD and Pabo CO (1991) Crystal structure of a MAT alpha 2 homeodomain-operator complex suggests a general model for homeodomain-DNA interactions. *Cell*, 67 : 517-28.
- Wurst W, Auerbach AB and Joyner AL (1994) Multiple developmental defects in the Engrailed-1 mutant mice : an early mid-hindbrain deletion and patterning defects in the forelimb and the sternum. *Dev.*, 120 : 2065-2075.
- Wyllie AH, Kerr JFR and Currie AR (1980) Cell death : the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*, 68 : 251-306.

- Wyllie AH (1992) Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues : an overview. *Cancer Metast Rev*, 11 : 95-103.
- Xu HE, Rould MA, Xu W, Epstein JA, Maas RL and Pabo CO (1999) Crystal structure of the human Pax6 paired domain-DNA complex reveals specific roles for the linker region and carboxy-terminal subdomain in DNA binding. *Genes Dev.*, 13 : 1263-75.
- Yasumoto K, Amae S, Udono T, Fuse N, Takeda K and Shibahara S (1998) A big gene linked to small eyes encodes multiple Mitf isoforms: many promoters make light work. *Pigment Cell Res.*, 11 : 329-336.
- Yoshiura K, Noda Y, Kinoshita A and Niikawa N (2000) Colocalization of doublecortin with the microtubules : an ex vivo colocalization study of mutant doublecortin. *J. Neurobiol.*, 43 : 132-9.
- Zecevic N and Rakic P (2001) Development of layer I neurons in the primate cerebral cortex. *J. Neurosci.*, 21 : 5607-19.
- Zelter PM, Bodey B, Marlin A and Kemshead J (1990) Immunophenotype profile of childhood medulloblastomas and supratentorial primitive neuroectodermal tumors using 16 monoclonal antibodies. *Cancer*, 66 : 273-283.
- Zhang R and Zhou L (1999) Medulloblastoma. *Chin. Med. J. (Engl)*, 112 : 297-301.
- Zheng C, Heintz N and Hatten ME (1996) CNS gene encoding astrotactin, which supports neuronal migration along glial Fibers. *Science*, 272 : 417-9.
- Zimmermann KC and Green DR (2001) How cells die: apoptosis pathways. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 108 : 99-103.
- Zucker JM, Desjardins L and Doz F (1998) Retinoblastoma. *Eur. J. Cancer*, 34 : 1045-9.
- Zulch KJ (1979) Types histologiques des tumeurs du système nerveux central. Genève, OMS.

LISTE DES PUBLICATIONS

Ortega N, Jonca F, Vincent S, Favard C, Malavaud B, Bertrand N, Mazerolles C, Richmann P, Pouliquen Y, Sarrammon JP, Ruchoux MM and Plouët J (1996) Modulation de la progression tumorale par des anticorps anti-idiotypiques de facteurs angiogéniques. *C. R. Acad. Sci. III*, 319 : 411-415.

Vincent S, Turque N, Plaza S, Dhellemmes P, Hladky JP, Assaker R, Ruchoux MM, Saule S (1996) Differential expression between PAX-6 and EN proteins in medulloblastoma. *International Journal of Oncology*, 8 : 901-910.

Ortega N, Jonca F, Vincent S, Favard C, Ruchoux MM and Plouët J (1997) Systemic activation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR/flk-1 selectively triggers endothelial cells with an angiogenic phenotype. *Am. J. Pathol.*, 151 : 1215-1224.

Ruchoux MM, Vincent S, Maurage CA and Gelot A (1999) Angiogenesis and neuropathology. *Pathol. Biol. (Paris)*, 47 : 385-396.

Fillebeen C, Ruchoux MM, Mitchell V, Vincent S, Benaissa M and Pierce A (2001) Lactoferrin is synthesized by activated microglia in the human substantia nigra and its synthesis by the human microglial CHME cell line is upregulated by tumor necrosis factor alpha or 1-methyl-4-phenylpyridinium treatment. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 96 : 103-13.

Pelc K, Vincent S, Ruchoux MM, Kiss R, Pochet R, Sariban E, Decaestecker C and Heizmann CW (2002) Calbindin-D_{28k} A marker of recurrence for medulloblastomas. *Cancer*, 95 : 410-9.

Vincent S, Dhellemmes P, Maurage CA, Soto-Ares G, Hassoun J and Ruchoux MM (2002) Intracerebral medulloepithelioma with a long survival. *Clinical Neuropathology*, 21 : 197-205.

Vincent S, Mirshari M, Nicolas C, Adenis C, Dhellemmes P, Soto-Ares G, Maurage CA, Baranzelli MC, Giangaspero F and Ruchoux MM (2003) Large-cell medulloblastoma with arrestin-like protein expression. *Clinical Neuropathology*, 22 : 1-9.

Jouvet A, Fauchon F, Liberski P, Saint-Pierre G, Didier-Bazes M, Heitzmann A, Delisle MB, Biassette HA, Vincent S, Mikol J, Streichenberger N, Ahboucha S, Brisson C, Belin MF and Fevre-Montange M (2003) Papillary tumor of the pineal region. *Am. J. Surg. Pathol.*, 27 : 505-12.

Mouriaux F, Vincent S, Kerrhouche Z, Maurage CA, Planque N, Monte D, Labalette P and Saule S (2003) Microphthalmia Transcription Factor expression in choroidal melanomas. *Experimental Eye Research*. In press.

SUMMARY

A peculiar group of CNS tumors called "Primitive Neuro Ectodermal Tumor (PNET)" has been individualized. This group is the first cause of solid tumor in pediatric. Despite a five years survival progression for these 30 last years, the PNETs are the tumors with the worst prognosis in survival and in therapeutical side-effects.

Among the genes involved in CNS development, PAX-6 encodes a transcriptional factor expressed in the neural tube, the neuro-retina and the cerebellum; Engrailed-2 also encodes a transcriptional factor expressed in the CNS. Morphologically, PNETs look like blastema, suggesting that they originate from CNS germ cells. In order to improve our knowledge about these tumors, we sought after the presence of PAX-6 and ENGRAILED-2 proteins in 80 PNETs.

This study showed a different expression of these two genes. PAX-6 was only found in the undifferentiated part of the tumor and interestingly in these areas we found the most elevated proliferative index. On the other hand, ENGRAILED-2 was found in differentiated cells and reactive cells.

These transcription factor expressed in embryonic tumor points out the interest of molecular biology for the research of the molecular markers allowing the emergence and evolution of cerebral tumor. In this respect, PAX-6 has been demonstrated as an oncogene overexpressed in several cells.

TITLE :

INTEREST OF HOMEODOMAIN GENES PAX-6 AND ENGRAILED-2 IN PNETS DIAGNOSTIC AND PROGNOSIS.

