

UNIVERSITE DE LIMOGES

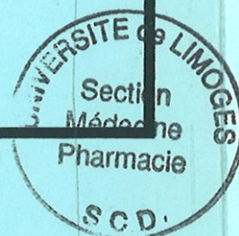
FACULTE DE MEDECINE

ANNEE 2001

Thèse n°

113/11

PROTEINE RB ET MELANOME



THESE

Pour le diplôme d'état de Docteur en Médecine
Présentée et soutenue publiquement le :

9 AVRIL 2001

par

Agnès SPARSA

née le 20 Août 1971 à Nogent sur Marne (94)

SCD UNIV.LIMOGES



D 035 100851 7

EXAMINATEURS DE LA THESE

M. Le Professeur Bonnetblanc.....	Président
M. Le Professeur Bédane.....	Juge
M. Le Professeur Rigaud.....	Juge
Mme Le Professeur Vidal.....	Juge
M. Le Docteur Boulinguez.....	Membre invité
Mme Le Docteur Loustaud-Ratti.....	Membre invité

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE MEDECINE

DOYEN DE LA FACULTE: Monsieur le Professeur PIVA Claude

ASSESEURS: Monsieur le Professeur VANDROUX Jean-Claude
Monsieur le Professeur DENIS François
Monsieur le Professeur GASTINNE Hervé

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS:

ACHARD Jean-Michel	PHYSIOLOGIE
ADENIS Jean-Paul * (C.S)	OPHTALMOLOGIE
ALAIN Luc (C.S)	CHIRURGIE INFANTILE
ALDIGIER Jean-Claude	NEPHROLOGIE
ARCHAMBEAUD-MOUVEROUX Françoise (C.S)	MEDECINE INTERNE
ARNAUD Jean-Paul (C.S)	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
BARTHE Dominique (C.S)	HISTOLOGIE EMBRYOLOGIE CYTOGENETIQUE
BEDANE Christophe	CLINIQUE OBSTETRICALE ET GYNECOLOGIE
BENSAID Julien	DERMATOLOGIE
BERTIN Philippe	CLINIQUE MEDICALE CARDIOLOGIQUE
BESSEDE Jean-Pierre	THERAPEUTIQUE
BONNAUD François (C.S)	OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
BONNETBLANC Jean-Marie (C.S)	PNEUMOLOGIE
BORDESSOULE Dominique (C.S)	DERMATOLOGIE
BOULESTEIX Jean (C.S)	HEMATOLOGIE ET TRANSFUSION
BOUTROS-TONI Fernand	PEDIATRIE
CATANZANO Gilbert	BIostatistique ET Informatique Médicale
CHARISSOUX Jean-Louis	ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUE
CLAVERE Pierre	ORTHOPEDIE
COGNE Michel	RADIOTHERAPIE
COLOMBEAU Pierre (C.S)	IMMUNOLOGIE
CORNU Elisabeth	UROLOGIE
CUBERTAFOND Pierre (C.S)	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
DARDE Marie-Laure (C.S)	CLINIQUE DE CHIRURGIE DIGESTIVE
DE LUMLEY WOODYEAR Lionel (C.S)	PARASITOLOGIE
DENIS François (C.S)	PEDIATRIE
DESCOTTES Bernard (C.S)	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
DUDOGNON Pierre (C.S)	ANATOMIE
DUMAS Jean-Philippe	REEDUCATION FONCTIONNELLE
DUMAS Michel (C.S)	UROLOGIE
DUMONT Daniel	NEUROLOGIE
DUPUY Jean-Paul (C.S)	MEDECINE DU TRAVAIL
FEISS Pierre (C.S)	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
GAINANT Alain	ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE
GAROUX Roger (C.S)	CHIRURGIE DIGESTIVE
GASTINNE Hervé (C.S)	PEDOPSYCHIATRIE
	REANIMATION MEDICALE

LABROUSSE Claude
LABROUSSE François (C.S)
LASKAR Marc (C.S)
LEGER Jean-Marie (C.S)
LEROUX-ROBERT Claude (C.S)
MABIT Christian
MAUBON Antoine
MELLONI Boris
MENIER Robert (C.S)
MERLE Louis
MOREAU Jean-Jacques (C.S)
MOULIES Dominique
NATHAN-DENIZOT Nathalie
PERDRISOT Rémy
PILLEGAND Bernard (C.S)
PIVA Claude (C.S)
PRALORAN Vincent (C.S)
RIGAUD Michel (C.S)
ROUSSEAU Jacques
SALLE Jean-Yves
SAUTEREAU Denis
SAUVAGE Jean-Pierre (C.S)
TREVES Richard (C.S)
TUBIANA-MATHIEU Nicole (C.S)
VALLAT Jean-Michel
VALLEIX Denis
VANDROUX Jean-Claude (C.S)
VERGNENEGRE Alain
VIDAL Elisabeth (C.S)
VIGNON Philippe
VIROT Patrice (C.S)
WEINBRECK Pierre (C.S)

REEDUCATION FONCTIONNELLE
ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES
CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
PSYCHIATRIE D'ADULTES
NEPHROLOGIE
ANATOMIE-CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
RADIOLOGIE
PNEUMOLOGIE
PHYSIOLOGIE
PHARMACOLOGIE
NEUROCHIRURGIE
CHIRURGIE INFANTILE
ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE
BIOPHYSIQUE ET TRAITEMENT DE L'IMAGE
HEPATO-GASTRO-ENTEROLOGIE
MEDECINE LEGALE
HEMATOLOGIE ET TRANSFUSION
BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
MEDECINE PHYSIQUE ET READAPTATION
HEPATO-GASTRO-ENTEROLOGIE
OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
RHUMATOLOGIE
CANCEROLOGIE
NEUROLOGIE
ANATOMIE
BIOPHYSIQUE ET TRAITEMENT DE L'IMAGE
EPIDEMIOLOGIE- ECONOMIE DE LA SANTE PREVENTION
MEDECINE INTERNE
REANIMATION MEDICALE
CARDIOLOGIE
MALADIES INFECTIEUSES

MAITRE DE CONFERENCE ASSOCIE A MI-TEMPS

BUCHON Daniel

MEDECINE GENERALE

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

POMMARET Maryse

* C.S = Chef de Service

REMERCIEMENTS

A mon père,

A ma mère,

«Vous m'avez beaucoup donné et appris. Vous avez toujours fait passer le bien être de vos enfants avant le vôtre. Vous êtes un exemple pour moi. Je vous dédie cette thèse en témoignage de tout le respect, la reconnaissance et l'amour que j'ai pour vous. »

A mes deux petites soeurs, Céline et Laëtitia,

« C'est aujourd'hui l'aboutissement de nombreuses années d'efforts
que vous m'avez aidé à traverser »

A mémé et Papy,

« Deux disparus qui auraient été heureux et fiers d'être parmi nous
en ce jour »

A Mamy,

« Pour avoir toujours cru en moi »

A ma Marraine et Olivier,

« Pour avoir participer à tous les grands moments de ma vie passée et
à venir, je vous dédie cette journée »

A toute ma famille,

« en témoignage de mon affection »

A Laurent, Michel, Marie-laure et Pascale

« « mes » chefs de clinique qui m'ont appris chacun dans leur discipline les ficelles d'une merveilleuse profession »

A tous mes collègues et ami(e)s Internes

« en témoignage de mon amitié »

A Hélène, Jeanne, Annick, Ghislaine, Karine, Aurélie et Barbara

« pour m'avoir appris les prémices de la biologie moléculaire dans une excellente ambiance »

A Nicole, Philippe, Claire, Marie-Christine, Jean-Pierre, Phuong-Mai, Fabienne Cardinaud, et Feu Philippe Jenoc

« pour m'avoir accordé leur confiance, confié leur cabinet et leurs patients et permis ainsi de réaliser mes premières armes de dermatologue de ville. »

A toutes les équipes d'infirmières, surveillantes, aides soignantes, agents et secrétaires des Services de Médecine interne A, Rhumatologie, Dermatologie et Gériatrie pour leur collaboration, leur disponibilité, leurs compétences et leur gentillesse.

A nos maîtres d'internat :

Monsieur le professeur Bonnetblanc

Monsieur le professeur Bédane

Monsieur le professeur Rigaud

Madame le professeur Vidal

Madame le Docteur Loustaud-Ratti

Monsieur le Docteur Boulinguez

A notre Maître et Président de Thèse,
Monsieur le Professeur Bonnetblanc,
Professeur des Universités de Dermatologie,
médecin des Hôpitaux,
Chef de Service de Dermatologie

« Vos grandes connaissances, votre modestie et votre gentillesse imposent l'admiration et resterons pour nous un modèle. Nous tenons à vous remercier de votre disponibilité et de nous avoir fait l'honneur de présider cette thèse. »

A notre directeur de thèse,

Monsieur le Professeur Bédane,

Professeur des Universités de Dermatologie,

médecin des Hôpitaux

« Vous nous avez fait l'honneur d'inspirer et de diriger cette thèse. Nous avons apprécié la qualité de votre enseignement et de vos conseils tout au long de notre internat. Nous admirons l'étendue de vos connaissances et votre disponibilité. »

A nos juges,

Monsieur le Professeur Rigaud,

Professeur des Universités de Biochimie et Biologie moléculaire,

Biologiste des Hôpitaux,

Chef de Service de Biochimie et Génétique moléculaire,

« Vous nous faites l'honneur de siéger à notre jury de thèse.
Merci de nous avoir chaleureusement accueillis dans votre laboratoire et
permis de réaliser nos premiers pas en biologie moléculaire. »

A nos juges,

Madame le Professeur Vidal,

Professeur des Universités de Médecine Interne,

Chef de Service de Médecine Interne A,

« Ce fut un plaisir de découvrir la médecine interne à vos côtés. Nous avons été sensibles à l'accueil chaleureux que vous nous avez réservé à l'arrivée dans votre service. Vos connaissances, votre gentillesse et dynamisme imposent le respect. Nous vous remercions de l'honneur que vous nous faites d'être présente dans ce jury et trouvez ici, le témoignage de notre profond respect. »

A Madame le Docteur Loustaud-Ratti,

Praticien hospitalier,

Véronique,

« Ta présence dans ce jury est pour moi à la fois un grand honneur et un grand plaisir. Au cours de mes années d'internat, tu as su me transmettre ta passion de la médecine interne. Tu as su grâce à tes précieux conseils, ta grande disponibilité et ta rigueur me faire progresser. »

A Monsieur le Docteur Boulinguez,

Praticien hospitalier,

Serge,

« En remerciement pour ta gentillesse, ta patience et ta bonne humeur. Tu as toujours été disponible pour m'apporter ton aide et tes compétences scientifiques. »

SOMMAIRE

PLAN

A. INTRODUCTION

I. MELANOME ET GENETIQUE

- 1) Historique
- 2) Généralités
- 3) Mélanome et anomalies génétiques

II. RETINOBLASTOME

- 1) Généralités
- 2) Gène du rétinoblastome (gène RB)
- 3) Mutations du gène RB dans les rétinoblastomes
- 4) Protéine RB (pRB)
 - a) Structure
 - b) Rôle
 - c) Mode de fonctionnement
- 5) Autres membres de la famille p107, p130

III. GENE RB ET MALIGNITE

- 1) Gène onco-suppresseur
- 2) Gène RB et autres tumeurs malignes

3) Gène RB et mélanome

B .MATERIELS ET METHODES

I. MATERIELS

- 1) Lignées de mélanocytes tumoraux humains
- 2) Cellules MOLT-4
- 3) Amorces de l'ADN complémentaire (ADNc) du gène RB
- 4) Enzymes de restriction
- 5) Anticorps monoclonal anti-pRB
 - a) Anticorps monoclonal G3-245
 - b) Anticorps monoclonal G99-2005
- 6) Anticorps de chèvre anti-IgG1 de souris couplé HRP

II. METHODES

- 1) Cultures cellulaires
 - a) Milieu et conditions de culture
 - b) Trypsinisation
 - c) Congélation
 - d) Comptage des cellules

2) Méthodes générales de biologie moléculaire

- a) Extraction des ARN totaux
- b) Transcription inverse (RT)
- c) Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)
- d) Migration sur gel d'agarose à 1%
- e) Vérification des produits PCR par digestion enzymatique

3) Immunotransfert

- a) Préparation des extraits
- b) Quantification des protéines totales
- c) Préparation des gels de migration et de concentration
- d) Migration
- e) Transfert
- f) Blocage
- g) Révélation

4) Quantification de la protéine RB par mesure de la densité optique

C. RESULTATS

- I. Présence de l'ARN m du gène RB dans nos 3 lignées de mélanocytes tumoraux humains.
- II. Présence de la protéine RB dans les 3 lignées de mélanocytes tumoraux humains
- III. Quantification de la protéine RB dans les 3 lignées

D. DISCUSSION

E. CONCLUSION

F. BIBLIOGRAPHIE

G. ANNEXES

H. GLOSSAIRE

I. TABLE DES MATIERES

J. SERMENT D'HIPPOCRATE

INTRODUCTION

Le **mélanome** est une **tumeur maligne à fort potentiel métastatique** dont l'incidence est en constante augmentation (10% par an) depuis une dizaine d'années avec 6000 nouveaux cas par an en France. Un des principaux facteurs de risque est l'exposition solaire. Cependant, les progrès de la génétique ont permis d'émettre des hypothèses sur les mécanismes de la cancérogénèse et ouvrant de nouvelles pistes thérapeutiques à l'échelle moléculaire.

Le déficit d'expression des gènes onco-suppresseurs est responsable de l'apparition de tumeurs malignes.

Les patients guéris d'un rétinoblastome développent d'autres tumeurs malignes dans des proportions non négligeables, le plus souvent des sarcomes et en particulier des ostéosarcomes et mais aussi des mélanomes. A partir de ces constatations cliniques et épidémiologiques, le rôle du gène du rétinoblastome dans les mécanismes de développement, de prolifération et de progression des mélanomes est évoqué. Nous avons étudié l'expression du gène du rétinoblastome dans trois lignées de mélanocytes tumoraux humains. Nous avons utilisé comme témoins positifs de nos expériences des cellules lymphoblastiques leucémiques, les cellules Molt-4.

Les 3 lignées de mélanocytes tumoraux humains ont été cultivées, trypsinées lorsqu'elles étaient à confluence et congelées dans des cryotubes par culot de 5 à 10 millions de cellules.

Nous avons utilisé les techniques récentes de biologie moléculaire (transcription inverse, polymérisation en chaîne) pour mettre en évidence la présence ou l'absence de l'ARNm du gène du rétinoblastome. Nous avons réalisé un immunotransfert pour rechercher la présence ou l'absence de la protéine du rétinoblastome. Nous avons quantifié nos résultats d'immunotransfert par mesure de la densité optique des bandes de nitrocellulose.

I. MELANOME ET GENETIQUE

1) Historique

Le mélanome a été observé et décrit pour la **première fois au V^{ème} siècle avant Jésus-Christ (JC) par Hippocrate** et au I^{er} siècle après JC par Rufus d'Ephèse. Il faut ensuite attendre le XVIII^{ème} siècle pour que cette tumeur dont l'histoire est reprise par Davis et Mac Leod, fasse sa réapparition dans la littérature médicale. John Hunter, en 1787, rapporte l'observation d'un homme de 35 ans décédé d'un mélanome de la mâchoire inférieure dénommé par l'auteur « cancerous excroissance infection ». Peu après, en 1812, Laennec décrit sous le terme « melanosis », un cas de mélanome généralisé avec envahissement ganglionnaire, hépatique, pulmonaire et de la paroi de l'estomac. En 1820, à l'occasion d'une observation détaillée, William Norris, médecin anglais introduit deux notions nouvelles : **l'importance du phototype** et une **prédisposition génétique** en rapportant la première histoire familiale de mélanome [1]. En rassemblant 8 cas de mélanome, Norris conclut que:

- cette tumeur a des relations avec les « grains de beauté »,
- cette tumeur est plus fréquente dans les villes qu'à la campagne,
- elle survient chez des patients ayant la peau pâle et les cheveux peu colorés,
- une histoire familiale existe dans certains cas
- les traumatismes accélèrent la croissance de cette tumeur

La description donnée en 1854 par Davis Williams correspond aux croissances radiales et verticales du mélanome. Le 1^{er} cas américain est décrit par Isaac Parish en 1837. C'est en 1838 qu'apparaît pour la première fois le terme de mélanome grâce à Carswell [2]. James Paget

rapporte en 1853 ce qui sera décrit ultérieurement comme la forme de mélanome à extension superficielle (superficial spreading melanoma : SSM). C'est à Jonathan Hutchinson, en 1857, que revient la description du mélanome unguéal.

Olivier Pemberton, en 1858, rapporte 60 cas de mélanomes cutanés et oculaires observés chez 33 hommes et 27 femmes avec parmi eux, le premier cas chez un patient de race noire au niveau du pied. Pour le traitement de ces mélanomes, il conseille une exérèse large avec excision de l'aponévrose, cette intervention devant s'accompagner d'un curage ganglionnaire. Dubreuilh et Hutchinson, en 1894, individualisent le mélanome du sujet âgé qui se développe sur la lésion brunâtre qui porte leurs noms. En 1906, Fox signale que le mélanome peut se développer sur un naevus préexistant mais aussi sur une peau normale. Au point de vue thérapeutique, en cette fin du XIX^{ème} siècle, l'excision large allant parfois jusqu'à l'amputation est unanimement admise.

2) Généralités

Le mélanome est une tumeur maligne rare (puisqu'il représente 1 % de toutes les tumeurs malignes) développée à partir des mélanocytes et dont l'**incidence est en forte augmentation dans les pays industrialisés** (doublement de l'incidence en une quinzaine d'années). En France, son incidence actuelle est estimée entre 5000 et 6000 nouveaux cas par an.

Aux Etats-Unis, en Australie, en Europe du nord et au Canada, l'incidence du mélanome est en augmentation et cette augmentation d'incidence apparaît plus élevée que pour les autres cancers exception faite du cancer pulmonaire chez la femme.

Le mélanome est une tumeur touchant tous les âges avec un pic de fréquence situé entre 30 et 50 ans. Il reste exceptionnel chez l'enfant. La mortalité annuelle est comprise entre 2 et 2,3 cas / 100000 habitants.

Parmi les facteurs exogènes, le rayonnement ultraviolet (UV) occupe une place prépondérante bien que son rôle reste controversé. La prédisposition familiale et les facteurs génétiques sont au moins aussi importants que le soleil.

Le traitement du mélanome repose avant tout sur la chirurgie parfois délabrante et inesthétique avec des marges d'excision comprises entre 1 et 3 cm autour de la lésion initiale. Les traitements entrepris lors des récurrences métastatiques ganglionnaires et/ou viscérales (chimiothérapie, immunothérapie, radiothérapie...) apparaissent souvent décevants.

De grandes avancées scientifiques ont été faites en biologie moléculaire et immunologie du mélanome. La compréhension des mécanismes moléculaires intervenant dans la cancérogénèse permettra certainement d'espérer d'autres orientations thérapeutiques comme la thérapie génique.

3) Mélanome et anomalies génétiques

Les mélanomes cutanés liés à une mutation génétique représentent 5 à 10 % de l'ensemble des mélanomes. La transmission est autosomique dominante à pénétrance incomplète et les patients porteurs d'une mutation ont un risque deux fois plus important de développer un mélanome que les patients non mutés. Les progrès de la cytogénétique et des études fonctionnelles ont permis d'identifier au moins 10 régions chromosomiques (mutations concernant les chromosomes 1p, 3,

délétions 6q, 7q, 8, 9p, 10q, 11q, 14 et 15) présentant des mutations importantes et qui seraient impliquées dans le développement et/ou la progression du mélanome [3-8].

Les mélanomes humains comportent de nombreuses anomalies chromosomiques incluant des délétions partielles ou totales ou des translocations. Ces différentes modifications ont été étudiées par l'intermédiaire d'anomalies caryotypiques et cytogénétiques. On les retrouve au niveau des chromosomes 9p et 10q à un stade précoce du mélanome et des chromosomes 1, 6, 7 et 11 dans le cas de métastases.

Les plus fréquentes altérations du chromosome 6 dans les cellules de mélanome sont une délétion simple du bras long 6q ou une translocation dans le chromosome 1 [9]. Il a aussi été démontré une perte d'hétérozygotie de certaines régions du chromosome 6 avec une fréquence de 60% dans les mélanocytes tumoraux. [10].

De nombreux auteurs se sont intéressés à l'action de gènes onco-suppresseurs dans le développement et la diffusion métastatique du mélanome [11]. Cependant, les mutations génétiques actuellement connues n'expliquent pas tous les cas de mélanomes familiaux. Au sein d'une même famille, les patients atteints d'un mélanome ne sont pas tous porteurs de la mutation.

Deux gènes sont actuellement impliqués préférentiellement :

- **p16/CDKN2A** est un gène suppresseur de tumeur situé sur le chromosome 9 (9p21) qui code pour une protéine dont le rôle est d'inhiber le cycle cellulaire. Il serait impliqué dans 50 % des mélanomes familiaux et 10 % des mélanomes multiples familiaux.

- **CDK4** est un oncogène situé sur le chromosome 12 (12q13) retrouvé dans 3 familles dans le monde dont une en France.

L'apparition de mélanomes chez des patients guéris de rétinoblastomes suggère le rôle du gène du rétinoblastome. Cet anti-oncogène pourrait être un des gènes candidats pour expliquer les mécanismes de la cancérogénèse dans le mélanome.

II. RETINOBLASTOME

1) Généralités

Le rétinoblastome est une tumeur maligne des rétinoblastes, cellules précurseurs de la rétine, qui se manifeste dès l'enfance. Ce sont des enfants nés avec un allèle défectueux du gène du rétinoblastome (gène RB) dans toutes les cellules et chez lesquels se produit une mutation du deuxième allèle au niveau des chromosomes des rétinoblastes. Le rétinoblastome touche à peu près un enfant sur 20000 avant l'âge de 4 ans [12]. Malgré sa rareté, il s'agit de la plus fréquente des néoplasies intra-oculaires de l'enfant (3% des cancers de l'enfant). L'âge moyen du début de la maladie est 15 mois.

Il existe 2 formes cliniques de rétinoblastome : **la forme familiale** (ou héréditaire) dans 40% des cas, transmise sur le mode autosomique dominant avec une forte pénétrance (environ 90% des individus ayant hérité du gène de prédisposition développent un ou plusieurs rétinoblastomes) et **la forme sporadique** dans 60 % des cas, où la tumeur est souvent unilatérale et l'âge du diagnostic plus tardif (3^{ème} - 4^{ème} décennie).

On parle de rétinoblastome familial si la tumeur est bilatérale et/ou s'il existe des cas de rétinoblastomes dans la famille.

Le principal signe clinique de rétinoblastome est une pupille blanche (cat's eyes reflexe). Moins fréquemment, les enfants peuvent présenter un strabisme, un glaucome ou des signes inflammatoires oculaires. Le diagnostic est basé sur l'examen ophtalmologique, complété par un scanner des globes oculaires ou une imagerie par résonance magnétique afin d'apprécier l'extension loco-régionale de la tumeur (humeur vitrée, sclérotique, nerf optique, les structures péri-orbitaires...). On peut observer des métastases de rétinoblastome dans le foie, le cerveau, les poumons et la moelle.

Le traitement a été longtemps l'énucléation. Ces dernières années, l'approche thérapeutique des rétinoblastomes a changé pour une attitude plus conservatrice. Cette pratique est basée sur la sensibilité particulière du rétinoblastome aux radiations, à la cryothérapie et à la photocoagulation. Dans les rétinoblastomes localisés, on tente de préserver la vision et on adopte une attitude conservatrice. A l'inverse, une invasion locale et une tumeur de grande taille nécessitent encore de nos jours l'énucléation. Chez les patients avec des métastases viscérales, une chimiothérapie peut être proposée. Quoi qu'il en soit, une surveillance rapprochée des patients considérés en rémission après traitement d'un rétinoblastome est nécessaire compte tenu du risque de développer une tumeur controlatérale.

Knudson et coll. suggèrent que le rétinoblastome est lié à des mutations affectant les gènes homologues de chaque paire de chromosomes [13]. Le gène onco-suppresseur du rétinoblastome est inactivé dans les rétinoblastomes et dans de nombreuses autres tumeurs. Les 2 allèles du gène RB sont défectueux ; cette perte d'hétérozygotie est responsable du développement de tumeurs [14-16].

2) Gène du rétinoblastome (gène RB)

Le promoteur du gène RB contient un site de reconnaissance du facteur de transcription E2F-1 riche en résidus G et C où les motifs CCAAT ou TATA sont absents [17]. Le gène RB est situé sur le locus 14.2 du bras long du chromosome 13 (13q14.2) et a été le premier gène onco-suppresseur isolé et cloné [18-22]. Il mesure 200 kilobases (kb) [17, 23]. Il code pour une phosphoprotéine de 105 à 116 kiloDaltons (kDa) intervenant dans la régulation transcriptionnelle [24-26].

Le gène du rétinoblastome est constitué de 27 exons et 26 introns d'une taille variant de 80 paires de bases (pb) (entre les exons 15 et 16) à 7050 pb (entre les exons 17 et 18). Les exons les plus courts sont les 15 et 24 contenant respectivement 31 et 30 pb [27]. L'exon 27, mesurant 1873 pb, est le plus grand et code pour la région C-terminale de la protéine RB. L'exon 1 code pour la région N-terminale de la protéine RB. Les mutations les plus fréquentes sur le gène RB sont situées sur les exons 13 et 17 [17].

Le gène RB est inactivé dans la plupart des rétinoblastomes qu'ils soient héréditaires ou sporadiques [28-32]. La perte de la fonction du gène RB a été impliquée dans l'apparition de cancers comme les ostéosarcomes, des cancers du sein, des cancers pulmonaires à petites cellules, des cancers de vessie, des carcinomes parathyroïdiens... [28, 31,33-36]

L'ARNm RB mesure 4,727 kb (soit 4727 nucléotides) et est localisé à proximité de l'estérase D [18, 22, 37].

Figure -1- Séquence en bases de l'ARNm du gène RB

tccggtttt ctcaggggac gtgaaatta ttttgtaac gggagtcggg agaggacggg gcgtgccccg cgtgcgcgcg
cgtcgtctc cccggcgctc ctccacagct cgctggctcc cgccgcggaa aggcgtcatg ccgccccaaa cccccgaaa
aacggccgcc accgcccgcg ctgccgccgc ggaacccccg gcaccgccgc cgccgcccc tcctgaggag gaccagagc
aggacagcgg cccggaggac ctgcctctcg tcaggcttga gttgaagaa acagaagaac ctgattttac tgcattatgt
cagaaattaa cagaaattaa agataccaga tcatgtcaga gagagagctt ggtaacttg ggagaaagt tcatctgtgg
atggagtatt gggaggttat attcaaaaga aaaaggaatc tgtatcttta ttgcagcagt tgacctagat gagatgctgt tcactttac
tgagctacag aaaaacatag aatcagtggt ccataaattc ttaacttac taaaagaaat tgataccagt accaaagttg ataatgctat
gtcaagactg ttgaagaagt atgatgtatt gttgcactc ttcagcaaat tggaaaggac atgtgaactt atatattga cacaaccag
cagttcgata tctactgaaa taaattctgc attggtgcta aaagtttctt ggtacacatt tttattagct aaaggggaag tattacaat
ggaagatgat ctggtgattt catttcagtt aatgctatgt gtccttgact atttattaa actctcacct cccatgttgc tcaaagaacc
atataaaca gctgttatac ccattaatgg ttcacctcga acaccaggc gaggtcagaa caggagtgc cggatagcaa
aacaactaga aatgaaca agaattattg aagtctctg taaagaacat gaatgtaata tagatgaggt gaaaaatgtt tattcaaaa
atttatacc tttatgaat tctctggac ttgtaacatc taatggactt ccagaggttg aaaatcttc taaacgatac gaagaaatt
atcttaaaaa taaagatcta gatgcaagat ttttttga tcatgataaa actcttcaga ctgattctat agacagttt gaaacacaga
gaacaccag aaaaagtaac ctgatgaag aggtgaatgt aattcctcca cactccag ttaggactgt tatgaacct
atccaacaat taatgatgat tttaaattca gcaagtgatc aacctcaga aatctgatt tctatttta acaactgcac agtgaatcca
aaagaaagta tactgaaaag agtgaaggat ataggataca tcttaaga gaaattgct aaagctgtgg gacagggttg
tgtcgaatt ggatcacagc gatacaaact tggagtgcg ttgtattacc gagtaatgga atccatgctt aatcagaag
aagaacgatt atccattcaa aatttagca aactctgaa tgacaacatt tttcatatgt cttattggc gtgcgctctt gaggtttaa
tggccacata tagcagaagt acatctcaga atcttgatc tggaaacagat ttgtcttcc catggattct gaatgtgctt aatttaaaag
ccttgattt ttacaagtg atcgaaagt ttatcaaagc agaaggcaac ttgacaagag aatgataaa acatttagaa catgtgaac

atcgaatcat ggaatccctt gcatggctct cagattcacc ttatttggat ctattaaac aatcaaagga ccgagaagga ccaactgatc
accttgaatc tgcttgcct cttaatcttc ctctccagaa taatcacact gcagcagata tgtatcttfc tcttgaaga tctccaaaga
aaaaaggctc aactacgcgt gtaaattcta ctgcaaatgc agagacacaa gcaacctcag cctccagac ccagaagcca
ttgaaatcta cctctcttfc actgttttat aaaaaagtgt atcggctagc ctatctccgg ctaaatacac ttttgaacg ccttctgtct
gagcaccag aattagaaca tatcatctgg accctttcc agcacacct gcagaatgag tatgaaactca tgagagacag
gcatttggac caaattatga tgtgttccat gtatggcata tgcaaagtga agaatataga ccttaaattc aaaatcattg taacagcata
caaggatctt cctcatgctg ttcaggagac attcaaactg gttttgatca aagaagagga gtatgattct attatagat tctataactc
ggtcttcatg cagagactga aaacaaatat tttgcagtat gcttccacca ggccccctac ctgttcacca atacctcaca
ttctcgaag cccttacaag tttctagtt cacccttacc gattcctgga gggaacatct atatttcacc cctgaagagt ccatataaaa
ttcagaagg tctgccaaca ccaacaaaaa tgactccaag atcaagaate ttagtatcaa ttggatgaatc attcgggact
tctgagaagt tccagaaaat aatcagatg gtatgtaaca ggcaccgtgt gctcaaaaga agtgctgaag gaagcaacc
tctaaacca ctgaaaaaac tacgcttga tattgaagga tcagatgaag cagatggaag taaacatctc ccaggagagt
ccaaattca gcagaaactg gcagaaatga ctctactcg aacacgaatg caaaagcaga aatgaatga tagcatggat
acctcaaaca aggaagagaa atgaggatct caggacctg gtggacactg tgtacacctc tggattcatt gtctctcaca
gatgtgactg tataacttfc ccaggttctg tttatggcca catttaatat cttcagctct ttttgggat ataaaatgtg cagatgcaat
tgtttgggtg attcctaagc cacttgaat gttagtcatt gttattata caagattgaa aatcttgtgt aaatcctgcc atttaaaaag
ttgtagcaga ttgttctc ttccaaagta aaattgctgt gctttatgga tagtaagaat ggccctagag tgggagtctc gataaccag
gcctgtctga ctactttgcc ttcttttga gcatataggt gatgtttgct cttgtttta ttaattata tgtatattt ttaatttaa
catgaacacc cttagaaaat gtgtcctatc tatcttcaa atgcaattg attgactgcc cattaccaaa aattatcctg aactctctg
caaaaatgga tattattaga aattagaaaa aaattactaa ttttacacat tagattttat tttactattg gaatctgata tactgtgtc
ttgtttata aaattttgct ttaattaaa taaaagctgg aagcaaagta taaccatag atactatcat actactgaaa cagatttcat
acctcagaat gtaaaagaac ttactgatta tttcttcat ccaactatg ttttaaatg aggattattg atagtactct tggttttat
accattcaga tcaactgaatt tataaagtac ccatctagta ctgaaaaag taaagtgttc tgccagatct taggtataga ggaccctaac

acagtatc ccaagtgcac tttctaagt tctgggtcc tgaagaatta agatacaaat taatttact ccataaacag actgtaatt
ataggagcct taatttttt tcatagaga tttgtcta tgcactcaa aattattctg cctccttaa ttgggaagg tttgtttt
cctggaatg gtacatgtct tccatgtatc tttgaactg gcaattgtct atttacttt tatttttta agtcagtatg gtctaacact
ggcatgtca aagccacatt atttctagtc caaaattaca agtaatcaag ggtcattatg ggtaggcat taatgtttct atctgattt
gtgcaaagc ttcaaattaa aacagctgca ttagaaaag aggcgcttct ccctcccct acacctaaag gtgtattaa actatctgt
gtgattaact tattagaga tgctgtaact taaaatagg gatatttaag gtagctcag ctactttta ggaaatcac tttgtctaac
tcagaattat tttaaaaag aatctggtc ttgtagaaa acaaaattt atttgtgct catttaagt tcaacttac tatttgaca
gtttttga taacaatgac actagaaac ttgactccat tcatcattg tttctgatg aatcctac aatcagttg gtttttagt
caaggctta ctattctgg gtctttgct actaagtca cattagaatt agtgccagaa ttttagaac ttcagagatc gtgtattgag
atttctaaa taatgctca gatattatg cttattgct tttgtatt ggtaaaact gtacattaa aatgctatg ttactattt
ctacaattaa tagttgtct attttaa ataatgttg ttaagagtct taatggtctg atgtgtgtt cttgtatta agtacactaa
tgttcttt tctgtctagg agaagataga tagaagataa ctctctagt atctcatc

Lee et coll. présumant que les anomalies d'expression de l'ARNm et de sa taille proviendraient de petites délétions de l'ADN génomique du gène RB [18].

3) Mutations du gène RB dans les rétinoblastomes (Tab.1)

Les points chauds (hot spots), sites où la fréquence des recombinaisons ou des mutations est anormalement élevée, sont essentiellement situés dans 5 exons (13, 14, 15, 16 et 17). Hogg et coll., en étudiant, exon par exon, le gène RB par « single-strand conformation polymorphism » (SSCP) de 12 rétinoblastomes constatent 16 mutations ponctuelles et délétions courtes qui sont les plus fréquemment retrouvées [38]. Ils rapportent également, en utilisant les techniques de polymérisation en chaîne (PCR) et SSCP, l'insertion d'une paire de base T dans l'exon 20 et une mutation G → A dans l'exon 14 [39]. Des duplications et des translocations ont aussi été rapportées [40, 41]. Onadim et coll. identifient des mutations dans les exons 3, 13, et 17 par la technique de SSCP et dans l'exon 20 [42, 43].

Tableau -1- Taille, localisation et principales mutations des 27 exons sur la séquence en base de l'ARNm de cellules de rétinoblastome (d'après GenBank)

EXONS	LOCALISATION DE L'EXON	TAILLE DE L'EXON	NOMBRE DE MUTATIONS	LOCALISATION DE LA MUTATION	TYPE DE MUTATION
1	1...274 bases (b)	274 b	1	179	C → T
2	275...401 b	126 b	0	0	0
3	402...517 b	115 b	1	506...509	codon stop
4	518...637 b	119 b	2	537...542 621...622	délétion TT → C
5	638...676 b	38 b	1	638	délétion
6	677...744 b	67 b	0	0	0
7	745...855 b	110 b	0	0	0
8	856...998 b	142 b	0	0	0
9	999...1076 b	77 b	0	0	0
10	1077...1186 b	109 b	2	1095 1104	C → T G → T
11	1187...1264 b	77 b	1	1209	C → T
12	1265...1352 b	87 b	2	1320 1352...1375	codon stop codon stop
13	1353...1469 b	116 b	2	1353 1400...1401	délétion codon stop
14	1470...1526 b	56 b	2	1500 1507	C → T T → G
15	1527...1558 b	31 b	0	0	0
16	1559...1635 b	76 b	1	1575...1576	insertion 1b
17	1636...1832 b	196 b	3	1766...1768 1791 1803	codon stop codon stop C → T
18	1833...1951 b	118 b	0	0	0
19	1952...2097 b	145 b	1	2072...2075	délétion
20	2098...2243 b	145 b	3	2118 2149...2150 2160	insertion T
21	2244...2348 b	104 b	0	0	0
22	2349...2462 b	113 b	0	0	0
23	2463...2626 b	163 b	0	0	0
24	2627...2657 b	30 b	0	0	0
25	2658...2800 b	142 b	1	2658	délétion
26	2801...2850 b	49 b	0	0	0
27	2851...4839 b	1988 b	0	0	0

4) Protéine RB (pRB)

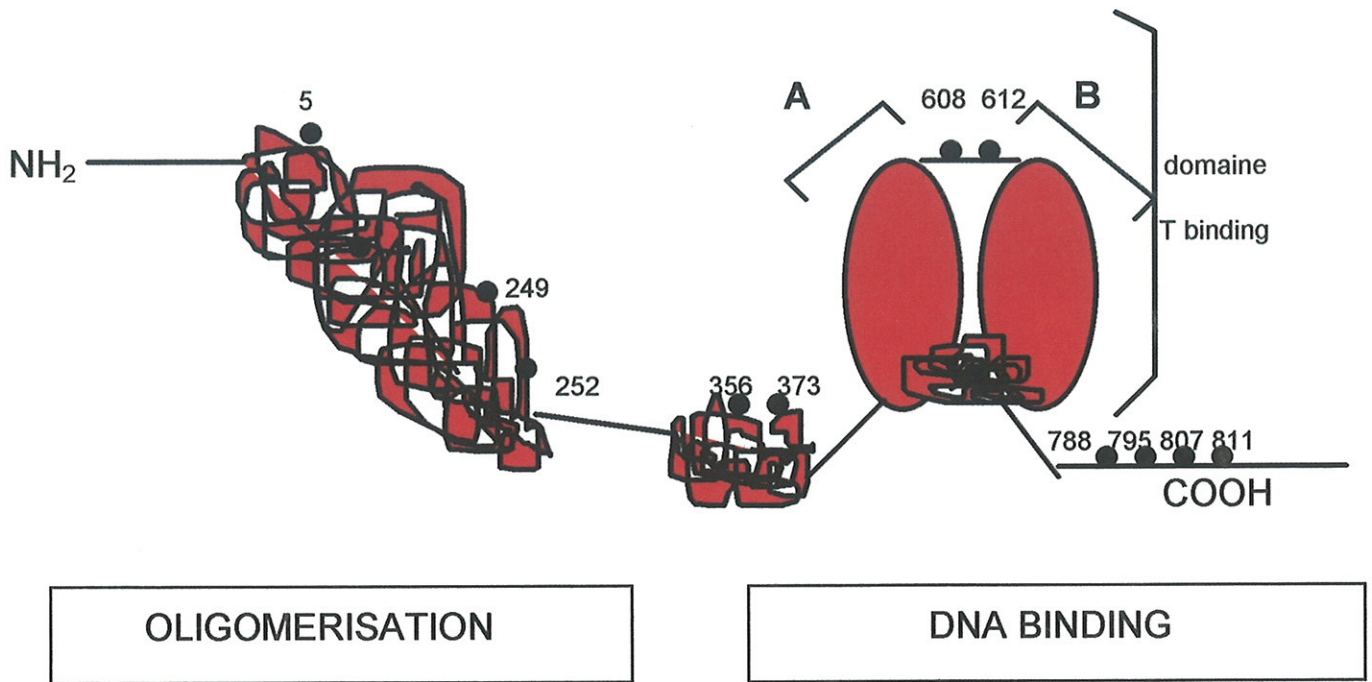
La prolifération cellulaire anormale observée dans les cancers est considérée comme la conséquence d'une dysrégulation dans la progression du cycle cellulaire en des points clés (encore appelés checkpoints). Ces checkpoints sont situés au moment des phases de croissance, de synthèse d'ADN ou de division cellulaire. L'inactivation de protéines aux points clés ou leur activation inappropriée entraîne des perturbations du cycle cellulaire. La surexpression de la protéine RB au début de la phase G1, par exemple, entraîne un arrêt de la phase G1.

a) Structure (Fig.2)

La protéine RB a été identifiée pour la première fois par des anticorps dirigés contre une protéine de fusion TrypE-RB dans E. Coli.

Le produit de l'anti-oncogène du rétinoblastome est une phosphoprotéine nucléaire : la protéine RB (pRB ou p110^{RB}) de 105 à 116 kDa correspondant à 928 acides aminés [44, 38]. Cette protéine est localisée dans le noyau et a la propriété de se fixer à l'ADN double brin. Elle est absente des lignées cellulaires issues de rétinoblastome [18]. La protéine RB est exprimée dans des mélanocytes normaux et d'autres cellules et tissus normaux dans des proportions variables [45]. Grâce aux techniques d'immunohistochimie, on a pu constater que la protéine RB est plus exprimée dans les couches basales de l'épiderme [45].

Figure -2- Représentation schématique de la structure de pRB (d'après Lee et Riley [46, 47])



résidus serine ou thréonine P = ●

Elle est constituée de 3 domaines importants et d'un domaine non spécifique : le domaine C-terminal. Le domaine N-terminal est essentiel pour l'oligomérisation *in vitro* [50].

Les domaines A et B sont fréquemment altérés dans les tumeurs malignes et sont nécessaires à la fixation du facteur de transcription E₂F et des oncoprotéines virales (comme l'antigène SV 40 T).

Les 11 résidus sérine et thréonine sont les résidus phosphorylés sur lesquels agissent les cyclines dépendantes des kinases (CdK).

La protéine RB contient des séquences homologues avec les filaments intermédiaires du cytosquelette [49].

On remarque 5 bandes électrophorétiques migrant de 110 à 116 kDa et correspondant à différentes formes phosphorylées de la protéine RB [51]. Les formes hypophosphorylées prédominent en phase G₀ et début de G₁. Les formes hyperphosphorylées sont présentes en phase S, G₂ et M.

b) Rôle

La protéine RB a une action inhibitrice sur la division cellulaire en inhibant la progression du cycle cellulaire. Elle régule la croissance cellulaire par un phénomène de phosphorylation [52]. La protéine RB est, en effet, capable de bloquer la progression du cycle cellulaire en G₁ et régule l'entrée dans la phase S ou en un point de contrôle situé juste après la mitose [53]. Une mutation sur les 2 allèles du gène provoque une perte de l'expression de la protéine RB et le développement de néoplasies [29]. Pour Cryns et coll., la perte d'un seul allèle suffit pour perdre l'expression de la protéine RB [54]. Tout déficit d'expression ou de synthèse de la protéine RB est donc susceptible de stimuler la croissance, la multiplication de cellules tumorales, l'initiation d'un cancer et l'augmentation de la malignité d'un cancer préexistant.

Des mutations ponctuelles virales, interférant avec le site de liaison de la protéine RB, abolissent sa capacité de transformation [55]. Cela signifie que la forme hypophosphorylée de la protéine RB possède une activité onco-suppressive et que les oncoprotéines virales se lient sur les domaines A/B de la protéine RB sur lesquelles ne peuvent plus se fixer E₂F, ou les cyclines D [56].

La liaison de la forme hypophosphorylée de la protéine RB à E₂F prévient la transcription des gènes contrôlés par le promoteur E₂.

E2F régule normalement les gènes intervenant dans le cycle cellulaire comme c-myc, c-myb, ADN polymérase α . La protéine RB peut se lier à l'ADN et réguler la transcription d'un nombre indéterminé de gènes, certains jouant un rôle dans la prolifération cellulaire [57-59]. La protéine RB est impliquée dans la régulation de nombreux gènes affectant le cycle cellulaire comme c-myc, TGF β et c-fos.

Les conséquences de l'inactivation de la protéine RB sont la prolifération incontrôlée du cycle cellulaire, l'altération de la différenciation cellulaire et l'apparition de rétinoblastome et autres tumeurs. La perte de l'expression de la protéine dans quelques types cellulaires que ce soient représente une étape vers le phénotype malin.

La protéine RB est capable de se lier avec les molécules de β tubuline [60].

c) Mode de fonctionnement (Fig. 3- 4)

La phosphorylation et la déphosphorylation de protéines cellulaires sont des mécanismes importants qui contrôlent des événements cellulaires variés [61].

Le degré de phosphorylation de la protéine RB varie au cours du cycle cellulaire : la protéine RB est hypophosphorylée en G0 et au début de la phase G1, puis phosphorylée sous l'action de kinases activées par les cyclines depuis la jonction G1-S jusqu'à la fin de la mitose [53, 62-64].

Les cellules au repos et en culture contiennent préférentiellement la protéine RB hypophosphorylée au contraire des cellules en phase proliférative qui contiennent la forme hyperphosphorylée [63].

La phosphorylation paraît être un important moyen de contrôle post-transcriptionnel médié par les cyclines D et E et les CdK avec surtout CdK4 [24, 66, 67].

La protéine RB est phosphorylée sur les résidus sérine et thréonine dans au moins 3 étapes différentes : en milieu de G1, phase S et proche de la phase de transition G2/M [63, 64, 68, 69].

La protéine RB est inhibée par phosphorylation provoquée par la cycline D1. Les cyclines D sont les principales cyclines impliquées dans la phosphorylation de la protéine RB [70]. Elles servent de régulateurs de CdK4 et CdK6. La sous-unité régulatrice des CdK sont les cyclines et sont responsables de la phosphorylation de la protéine RB [49]. Les cyclines A et E sont impliquées dans la phosphorylation de la protéine RB [66, 67, 71, 72].

La protéine RB peut être phosphorylée et inactivée par les complexes CdK/cycline des cellules permettant la progression du cycle cellulaire.

L'hyperphosphorylation provoque un changement de conformation d'une forme active à une forme inactive de la protéine RB et donc une stimulation de la croissance. Durant l'anaphase, la protéine RB est déphosphorylée par la protéine phosphatase de type 1 (PP1) [73, 74].

Cette action freinatrice semble aussi pouvoir être expliquée par des liaisons établies par la protéine RB et d'autres protéines qui sont directement impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (Fig.4)[75]. La forme hypophosphorylée se lie à E2F et empêche son action.

Lorsque des oncoprotéines virales (Simian Virus 40 large T antigène (SV 40) , adénovirus E1A, human papilloma virus E7 protéine) se lient avec les formes hypophosphorylées de la protéine RB, Weinberg et coll. notent une perte de fonctionnalité de la protéine RB [57].

Cryns et coll. rapportent la perte de l'expression de la protéine RB dans les carcinomes et non dans les adénomes parathyroïdiens par surexpression de la cycline D1 [56].

Selon Saenz-Santamaria et coll., il y aurait une surexpression de la protéine RB dans les mélanomes primitifs et métastatiques avec une hyperphosphorylation de la protéine la rendant inactive [76]. Pedley et coll. rapportent la perte d'expression de la protéine RB dans des mélanocytes après irradiation UVB [77].

Figure -3- Modèle général de fonctionnement de la protéine RB (d'après Sellers et Kaelin [70])

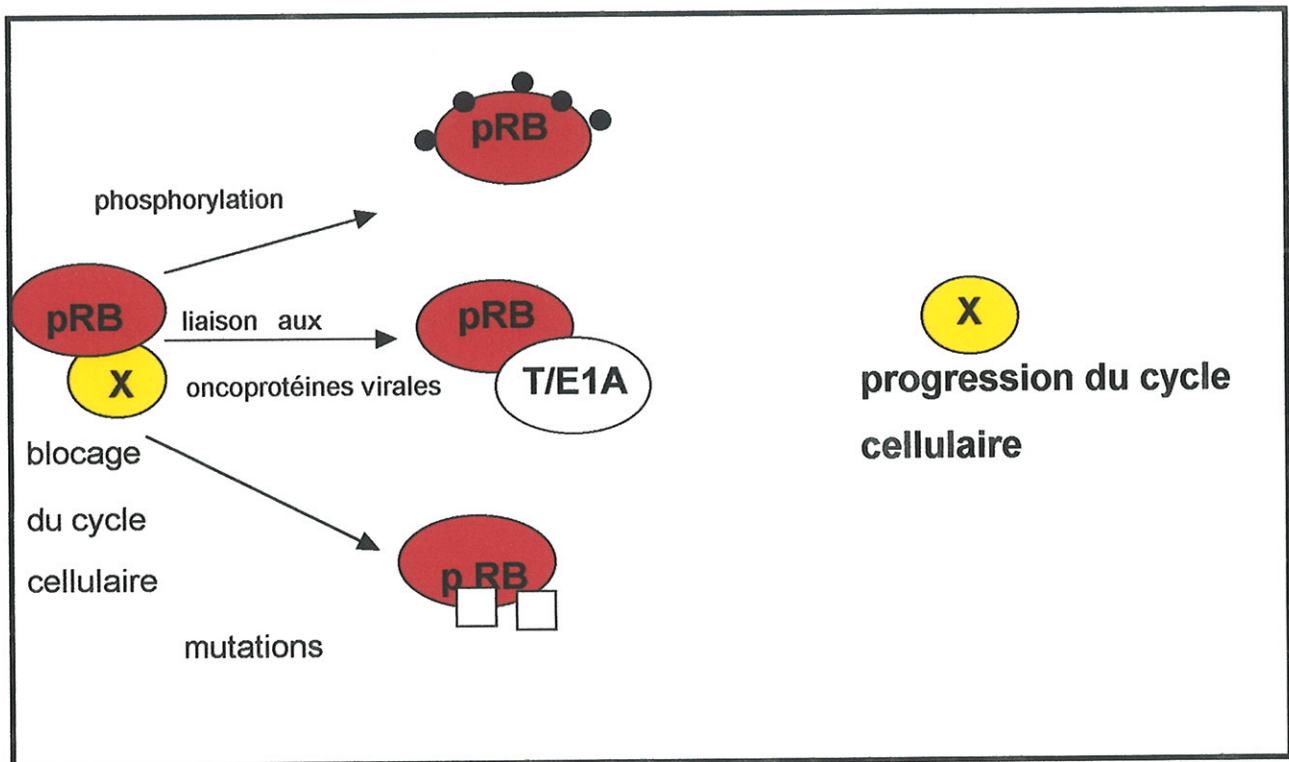
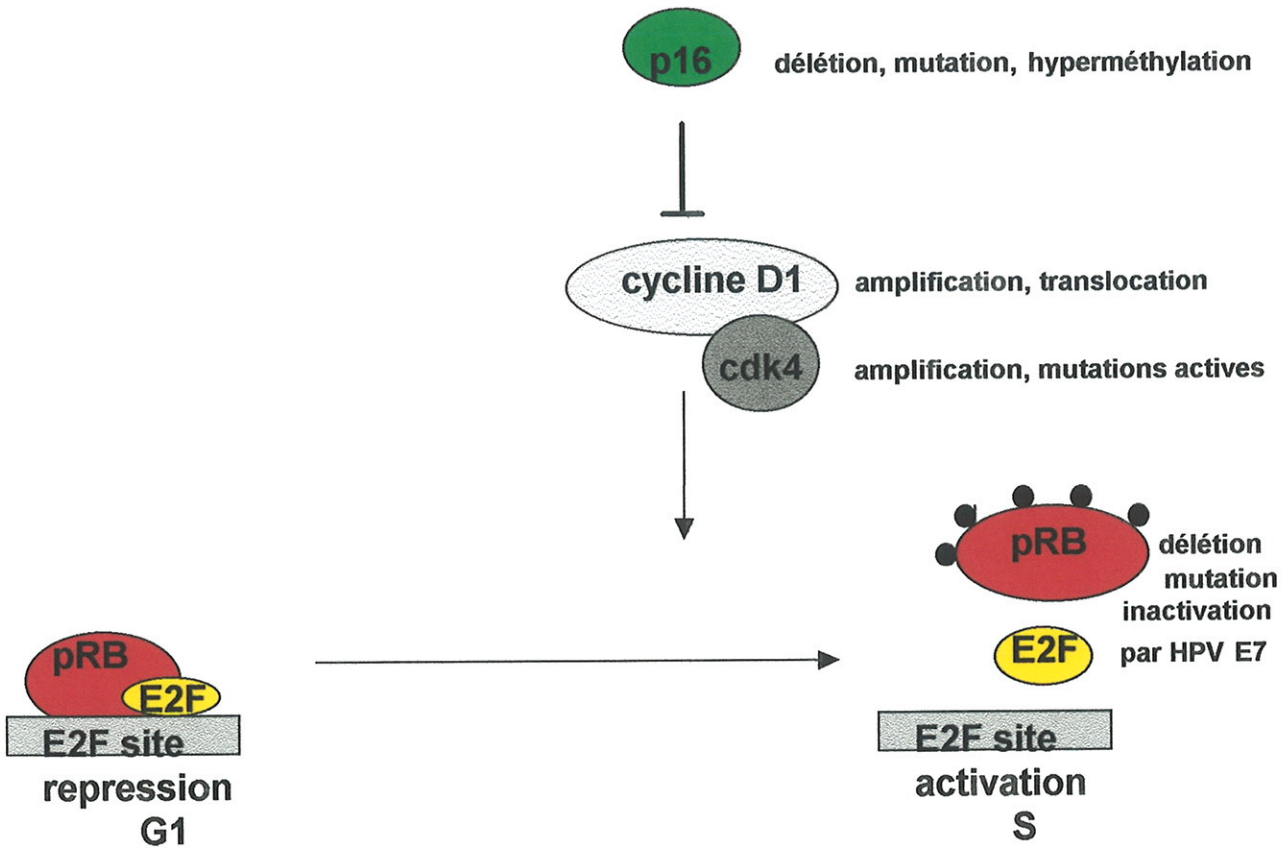


Figure -4- Complexe pRB-E2F (d'après Sellers et Kaelin [70])



5) Autres membres de la famille : p107, p130

Il existe 3 protéines appartenant à la famille du gène RB : pRB, pRB2/p130 et p107. L'activité onco-suppressive de la protéine RB a été la mieux étudiée. Les protéines p130 et p107 sont fonctionnellement et structurellement similaires à la protéine RB [78, 79].

Les trois membres de la famille rétinoblastome possèdent des propriétés de suppression de tumeurs à des degrés variables [78-83].

Massaro-Giordano et coll. montrent, en utilisant des techniques d'immunohistochimie sur coupes histologiques paraffinées, que, contrairement à p130, l'expression de pRB et p107 n'est pas corrélée à une amélioration du taux de survie à 5 ans comme p53 [80].

III. GENE RB ET MALIGNITE

1) Gène onco-suppresseur

La transformation d'une cellule normale en une population de cellules tumorales passe par une accumulation d'altérations dans le fonctionnement de gènes cellulaires normaux. Certaines de ces anomalies jouent un rôle moteur dans la cancérogénèse. Il s'agit de cellules entraînant un gain de fonction d'un oncogène ou une perte de fonction d'un anti-oncogène.

L'existence de gènes onco-suppresseurs a été suggérée, il y a plusieurs années, lors d'expériences consistant à fusionner des cellules normales et tumorales ; il en résultait alors une suppression des propriétés néoplasiques [84].

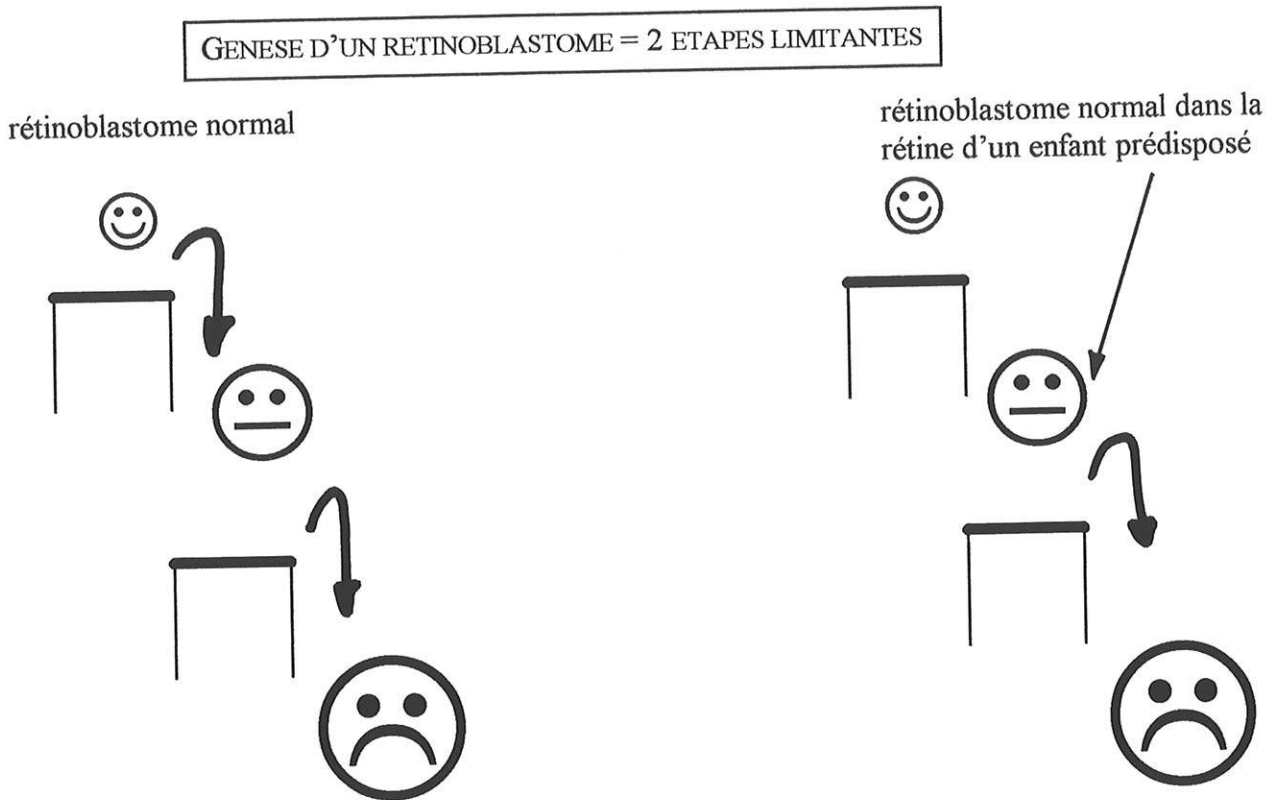
Les anti-oncogènes ou onco-suppresseurs, sont des gènes qui absents ou déficients, sont à l'origine de certains cancers [15, 85-88]. A ce jour, 9 gènes onco-suppresseurs ont été découverts pRB, p53, gène WT-1 (tumeur de Wilms), gènes NF1 et NF2 (neurofibromatose de type 1 et 2), gène VHL (syndrome de Von Hippel-Lindau), gène APC (Polypose colique) et gène DCC (cancer colique). Deux gènes onco-suppresseurs p53 et pRB ont fait l'objet de nombreuses études parce qu'ils semblent jouer un rôle important et central dans la régulation de la croissance cellulaire normale [24].

La génétique de la plupart des syndromes de prédisposition héréditaire au cancer est calquée sur le modèle de Knudson du rétinoblastome [89].

Ces gènes codant pour des protéines ayant un effet répresseur sur des oncogènes et inhibant la croissance cellulaire, permettent l'expression de ces oncogènes lorsqu'ils sont déficients. Ces tumeurs ont parfois un caractère dit héréditaire. Un seul gène normal suffit au bon fonctionnement de la cellule. Les tumeurs ne s'expriment que si la délétion est homozygote. Selon Knudson, la première délétion est d'origine héréditaire c'est-à-dire que sur les deux allèles d'un anti-oncogène transmis par les parents, un est défectueux (fig. 5) [90]. L'anomalie reste alors muette tant que l'autre allèle suffit aux besoins de la cellule.

La réintroduction du gène RB dans des cellules déficientes provoque une perte de la tumorigénicité et la réexpression de la protéine RB [30, 91-96].

Figure -5- L'hypothèse de Knudson [89]



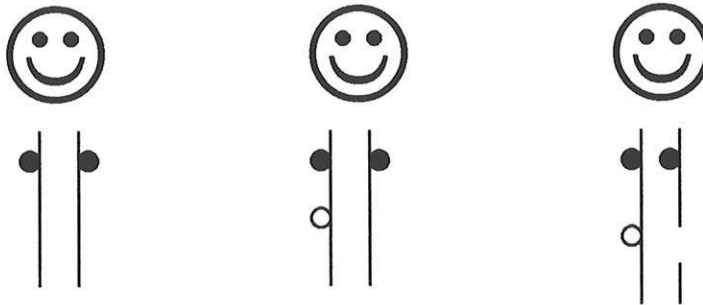
Prédisposition = cancérogénèse raccourcie d'une étape constitutionnelle

Comings propose, en 1973, un cadre conceptuel à la théorie de Knudson en imaginant que les 2 mutations nécessaires et suffisantes à la genèse d'un rétinoblastome correspondent à l'inactivation des deux allèles d'un gène dont la fonction doit freiner la prolifération cellulaire (Fig. 7) [86]. Ce gène a un comportement récessif à l'échelle de la cellule. C'est sur ce modèle théorique qu'ont été basées les stratégies ayant abouti au clonage du gène RB, le prototype de l'anti-oncogène.

Figure -6- L'hypothèse de Comings [86]

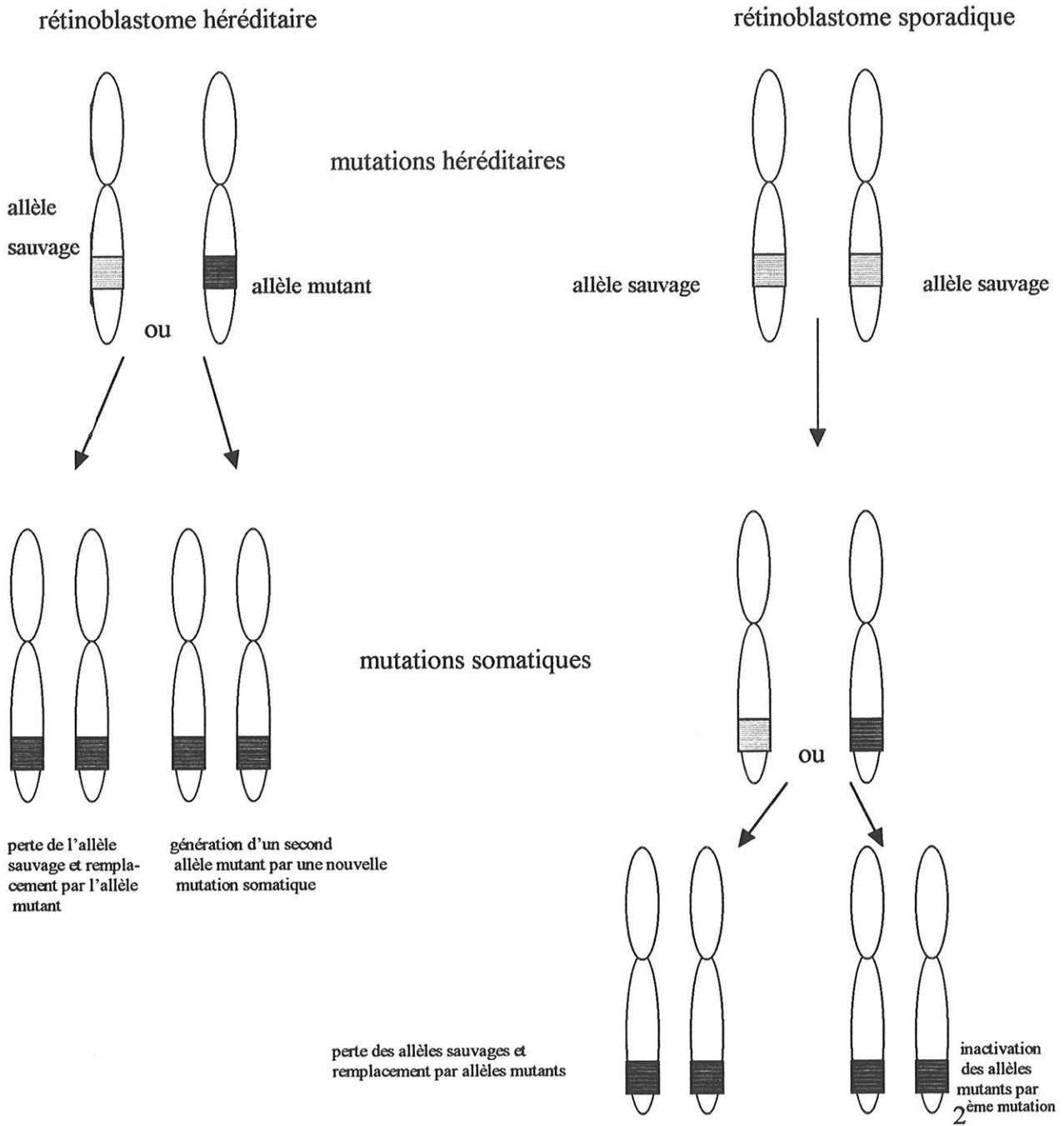
UN CADRE CONCEPTUEL POUR L'HYPOTHESE DE KNUDSON :

- 1°) les deux mutations inactivent les deux allèles d'un même gène
- 2°) la fonction du gène est de contrôler des gènes de croissance



NB : Les mutations sont récessives à l'échelon cellulaire (inactivation du second allèle nécessaire).

Figure -7- Mécanisme de la perte de fonction du gène RB (d'après Friend [95])



La production du gène RB peut être aussi inactivée par phosphorylation, liaison avec des protéines virales et cela suggère que les mutations ne sont pas seules responsables de la perte de fonction de la protéine RB.

D'autre part, l'inactivation de p16^{INK4a}, p15^{INK4b} et la surexpression de CDK4 ont été rapportée dans des mélanomes primitifs sporadiques, des mélanomes métastatiques et des lignées de mélanocytes tumoraux [98-102]. Ces molécules interviennent dans le mécanisme de fonctionnement de la protéine RB.

2) Gène RB et autres tumeurs malignes

L'incidence d'une seconde tumeur maligne chez ces patients ayant une mutation germinale est de 15 à 20% dans les 20 années suivant le diagnostic de rétinoblastome et la mortalité cumulative d'approximativement 26% après 40 ans [103, 104].

La recherche d'une perte de fonction de la protéine RB ou perte d'expression du gène RB, dans des tumeurs malignes, s'est appuyée sur des constatations cliniques. Le suivi d'enfants guéris d'une forme héréditaire de rétinoblastome a permis de constater qu'ils sont également très fortement prédisposés à d'autres tumeurs malignes comme les ostéosarcomes, les sarcomes, les cancers pulmonaires à petites cellules, de la prostate, de la vessie, du sein, les carcinomes parathyroïdiens, les mélanomes [20, 29, 54, 91, 93, 94, 103, 105-128]. L'absence d'expression de la protéine RB a été observée dans des formes plus agressives de leucémie aiguë myéloblastique et de cancer gastrique [129]. Cette perte d'expression de la protéine RB a également été notée dans des leucémies myéloïdes chroniques [130].

La protéine RB est inactive dans 60% des tumeurs humaines malignes. Elle peut être inactivée par des mécanismes très divers : mutation, liaison à des oncoprotéines virales, phosphorylation [fig.3]. Yokota et coll. ont constaté des mutations du gène RB dans 90 % des cancers pulmonaires à petites cellules, dans 2/3 des ostéosarcomes et 1/3 des cancers du sein et des cancers de vessie [34]. Cependant, l'action de la protéine RB peut être inhibée par d'autres molécules interagissant avec elle. Ceci a été constaté dans les adénocarcinomes du col utérin avec l'intervention de HPV E7 (papilloma virus humain E7), l'amplification du gène cycline D dans les cancers de l'oesophage, du sein et des carcinomes basocellulaires [131-134]. Motokura a constaté une surexpression de la cycline D1 dans les lymphomes B. Une dysrégulation de cycline D1 contribue à la cancérogénèse [134]. Les ostéosarcomes et chondrosarcomes demeurent les tumeurs malignes les plus fréquentes chez les patients aux antécédents de rétinoblastome : 37/95 pour Abramson, 7/9 pour Lennox, 20/52 pour Meadow, 9/25 pour Sagerman [105, 121, 136-137]

3) Gène RB et mélanome

Tucker et coll. rapportent 3 cas de mélanomes chez 45 patients aux antécédents de rétinoblastome. L'apparition d'une deuxième tumeur maligne a souvent été attribuée à la radiothérapie mais plusieurs tumeurs sont apparues hors du champ d'irradiation et chez des patients n'ayant jamais reçu de radiothérapie [118, 119]. En 1986, Draper et coll. suggèrent l'existence d'une forte association entre rétinoblastome et mélanome lorsqu'ils constatent en étudiant 882 patients atteints de rétinoblastome 30 deuxièmes tumeurs malignes dont 2 mélanomes [120]. Le premier cas est un mélanome développé dans le champ d'irradiation 17 ans après le traitement du rétinoblastome par radiothérapie. Le deuxième est apparu en dehors du champs 30 ans après. Der Kinderer, en 1987,

rapporte une incidence de 19% de mélanome ou de secondes tumeurs 25 ans après le traitement d'un rétinoblastome en analysant 8 registres nationaux des Pays Bas [136].

Trabousli et coll., 2 ans après, constatent une incidence de 7% avec l'apparition de 6 mélanomes chez des patients aux antécédents de rétinoblastomes bilatéraux dont 3 sont survenus dans les territoires d'irradiation [120].

C'est avec le développement des techniques de biologie moléculaire et de la génétique que certains auteurs émettent l'hypothèse de l'existence de mutations du gène RB dans les mélanomes ou des altérations d'autres molécules comme p16^{INK4a}, entrant dans les mécanismes d'action de la protéine RB [98, 139, 140]. Lee et coll., en rapportant un cas de développement de 2 mélanomes chez un jeune homme de 27 ans aux antécédents de rétinoblastome bilatéral traité par énucléation, radiothérapie orbitaire et chimiothérapie, continuent de suggérer une relation entre ces deux tumeurs [141].

Lewis et coll. notent que des réarrangements du gène RB sont présents dans 4,5 % des mélanomes ce qui représente un faible pourcentage [142]. Sanders et coll. signalent des mutations du gène RB dans des mélanomes [35].

Tableau -2- Incidence du mélanome chez des survivants de rétinoblastome dans 5 séries majeures

SERIES	TOTAL DE SURVIVANTS DE RETINOBLASTOME	TOTAL DE SECONDE NEOPLASIES	NOMBRE TOTAL DE MELANOMES	COMMENTAIRES
Abramson 1984 [105]	711	95	4(4,2%)	3 en champs d'irradiation
Meadow 1985 [121]	52	5(9,6%)	pas d'irradiation
Draper 1986 [120]	882	30	2(6,7%)	
Lueder 1986 [103]	132	7	1(14,3%)	pas d'irradiation
Der Kinderer 1988 [124]	122	17	2(11,8%)	

MATERIELS ET METHODES

I. MATERIELS

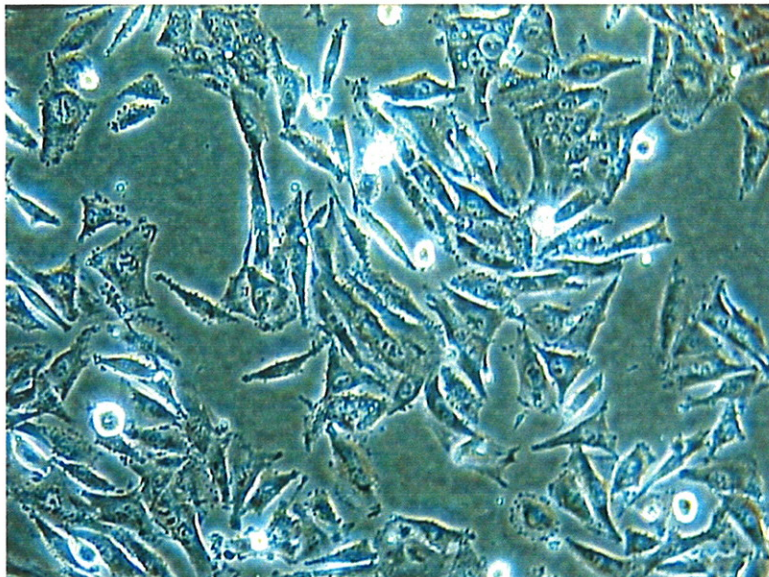
1) Lignées de mélanocytes tumoraux humains

Pour réaliser notre étude concernant l'expression du gène du rétinoblastome, nous avons utilisé **3 lignées de mélanocytes tumoraux humains** (origine : Dr O. Berthier-Vergnes, INSERM U346, Hôpital Edouard Herriot, Lyon). Ces lignées sont capables d'engendrer des tumeurs lorsqu'elles sont injectées à des souris Nude. Elles possèdent des degrés de tumorigénicité et des vitesses de croissance variables [143-146].

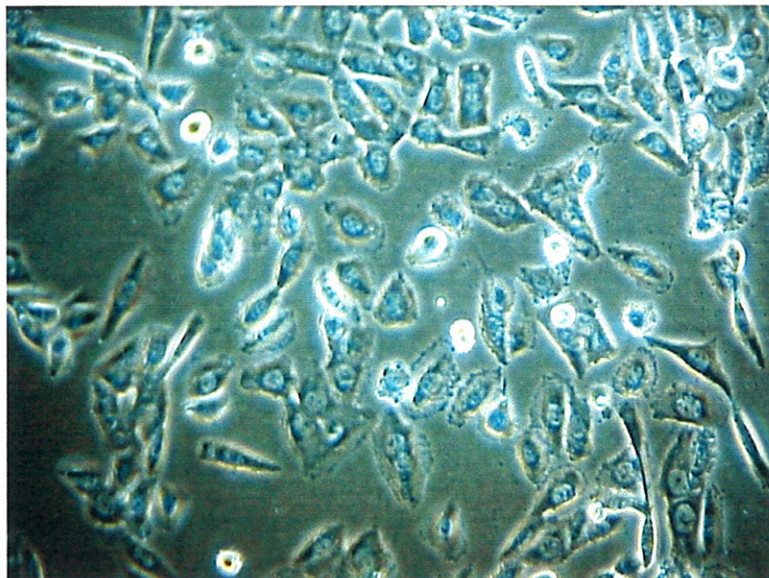
C'est, en 1979, que Jacobovich et Doré établissaient ces 3 lignées : **M1Dor**, **M3Dau**, et **M4Beu** [147]. Ces mélanocytes tumoraux proviennent de métastases ganglionnaires ou cutanées de patients. Les trois lignées ont été caractérisées en microscopie électronique, et leur croissance chez la souris Nude et le raton nouveau-né a été étudiée.

Tableau -3- Caractéristiques des 3 lignées de mélanocytes tumoraux (d'après Jacobovich et Doré)

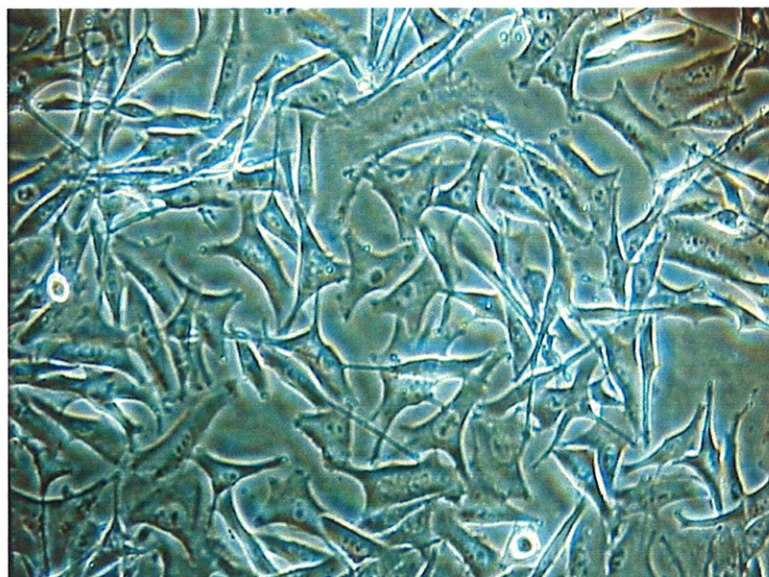
	ORIGINE	CARACTERISTIQUES PRINCIPALES	HETEROTRANS-PLANTATION CHEZ LA SOURIS NUDE 2.10⁶ CEL.	% DE PRISE DE TUMEUR CHEZ LA SOURIS NUDE
M3Dau	métastase cutanée achromique	pseudoépithélioïdes non pigmentées	+	100
M4Beu	métastase ganglionnaire	pseudofusiformes pigmentées	+	84
M1Dor	métastase ganglionnaire	pseudofusiformes polymorphes non pigmentées	+	26



M1 Dor. p. 165



M3 Dau. p. 159

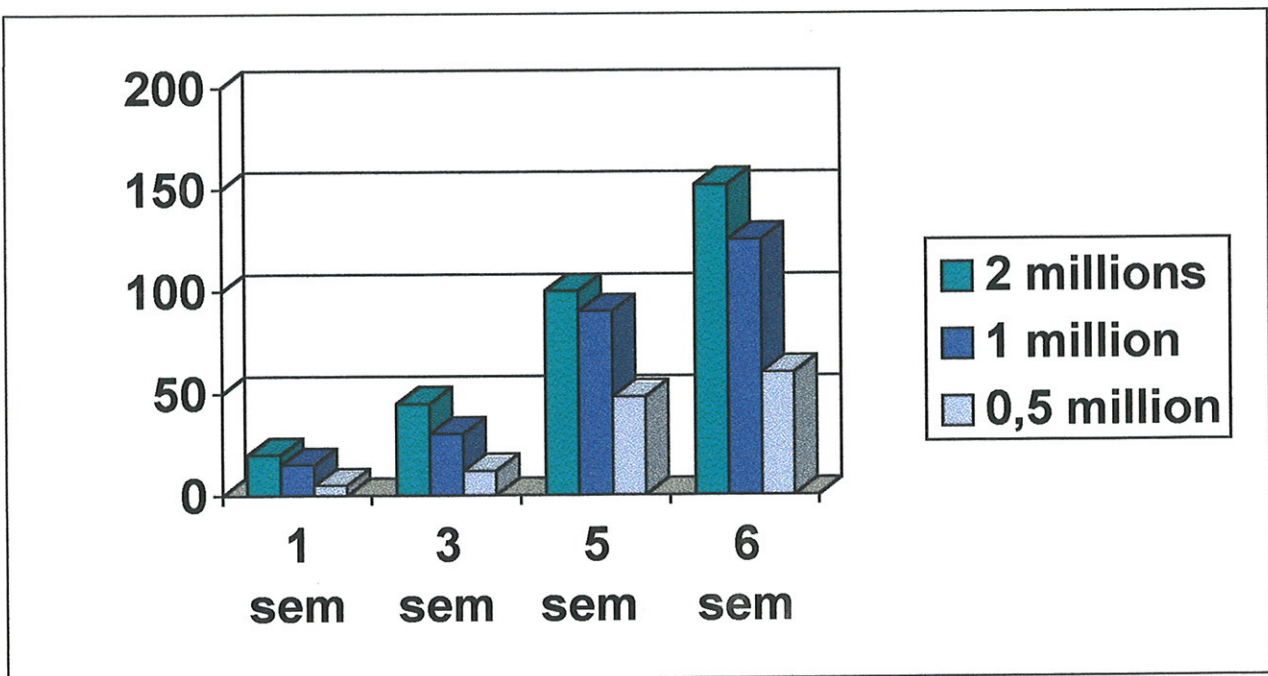


M4 Beu. p. 112

Figure 9 : Aspects morphologiques des trois lignées de mélanocytes tumoraux humains en microscopie optique. (objectif x 20)

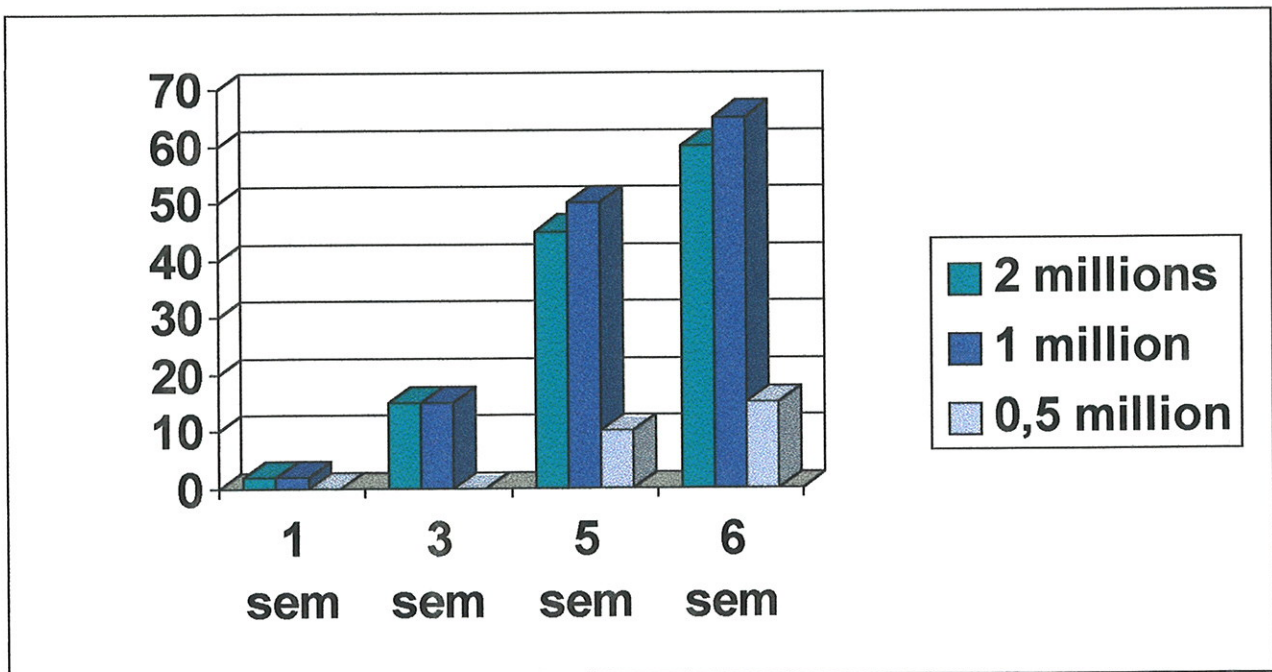
Graphique -1- Cinétique de la croissance tumorale M3Dau

La taille de la tumeur a été mesurée (en mm²) toutes les semaines pendant 6 semaines après inoculation de 2 millions, 1 million et 0,5 million de cellules tumorales de M3 Dau



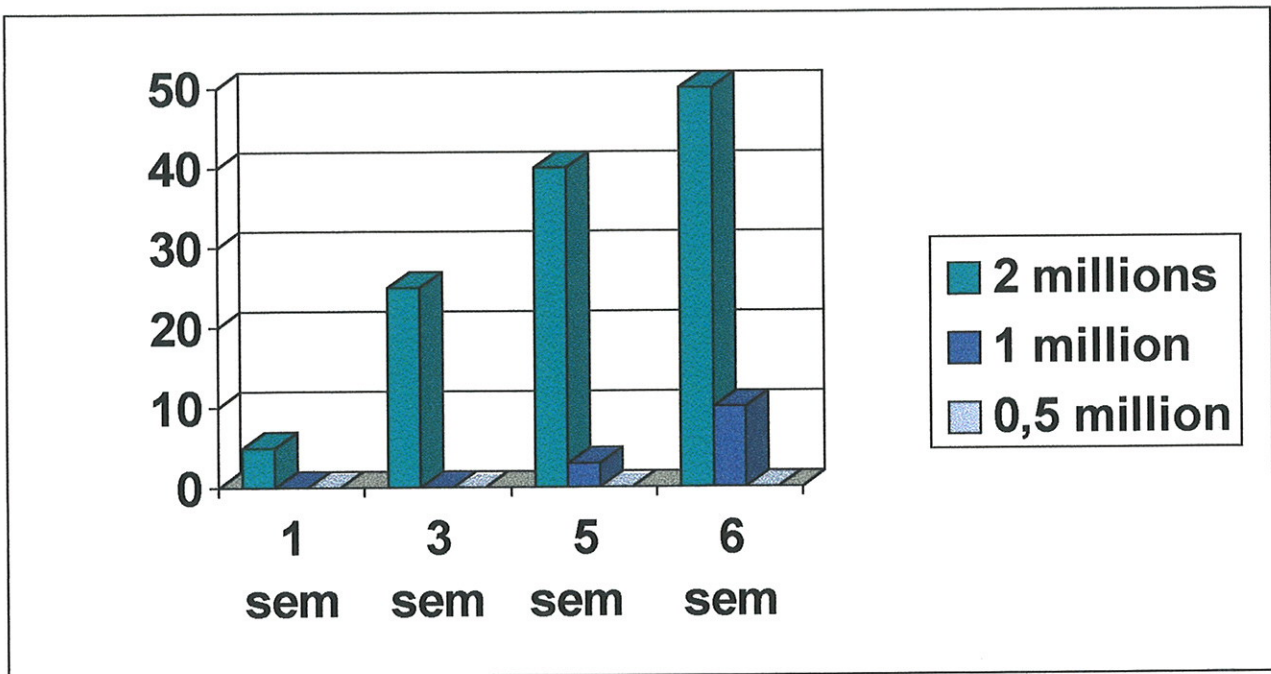
Graphique -2- Cinétique de la croissance tumorale M4Beu

La taille de la tumeur (en mm²) a été mesurée toutes les semaines pendant 6 semaines après inoculation de 2 millions, 1 million et 0,5 million de cellules tumorales M4Beu



Graphique -3- Cinétique de la croissance tumorale de M1Dor

La taille de la tumeur (mm²) a été mesurée toutes les semaines pendant 6 semaines après inoculation de 2 millions, 1 million et 0,5 million de cellules tumorales M1Dor.



Le modèle de la souris Nude , intéressant pour l'étude de tumorigénicité, ne permet cependant pas d'observer la formation de métastases. En effet, les souris Nude présentent très rarement des métastases spontanées lorsqu'elles sont transplantées par des cellules humaines cancéreuses. C'est pourquoi Bailly et Doré en 1987 et Bailly et coll., en 1989 ont choisi le rat nouveau-né pour étudier la tumorigénicité et le potentiel métastatique de cellules tumorales humaines. Ce modèle semble plus sensible que celui de la souris Nude (fig 14).

Tableau -4- Potentiel tumorigène et métastatique des 3 lignées chez le raton nouveau-né immunodéprimé

	% DE PRISE DE TUMEUR CHEZ LA SOURIS NUDE	NBRE DE RATONS NN PRESENTANT UNE TUMEUR	TYPE DE TUMEUR	NBRE DE RATONS PRESENTANT UNE META
M3Dau	100	18/18	invasive, pigmentée	17/18
M4Beu	84	14/14	plate, diffuse, nodule +/-, pigmentée	8/14
M1Dor	26	11/11	plate, diffuse, pigmentée	10/11

2) Cellules MOLT-4

Les cellules **Molt-4** sont des lignées de cellules lymphoblastiques humaines dont le numéro d'ATCC est 1582. Elles ont été créées par Minowada et coll. en 1972. Les cellules MOLT-4 ne produisent pas d'immunoglobuline. Il existe une mutation G→A sur le codon 248 du gène p53. Elles n'expriment pas p53. La lignée a été contaminée par le mycoplasme et traitée par antibiothérapie anti-mycoplasme. Les cellules proviennent d'un patient atteint de leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) en rémission ayant reçu une chimiothérapie. Elles expriment la protéine RB et ont été nos témoins positifs [148].

3) Amorces de l'ADNc du gène RB

Les amorces doivent présenter une température de fusion (melting temperature = Tm) 5°C au dessus de la température utilisée pour l'hybridation. Plus sa valeur sera élevée, plus l'amplification sera spécifique. Des valeurs comprises entre 55 et 70°C donnent les meilleurs résultats.

Le choix des amorces est une étape importante lors de la mise au point d'une polymérisation en chaîne. Plusieurs critères doivent être pris en compte :

- la séquence ne doit pas permettre la formation d'épingle à cheveux ou d'hybrides entre les amorces
- la composition en base doit être équilibrée en évitant les longues répétitions de CG
- la Tm entre les deux amorces ne doit pas être trop différente

Le choix des amorces optimales est complexe et difficilement réalisable à la main. De nos jours, il existe des logiciels comme « OLIGOCALCULATOR » simplifiant le travail.

Nous avons choisi, compte tenu de l'importante longueur de l'ARNm (4839 kb), d'amplifier les exons 2, 3, 4, et 5 en totalité. Les amorces spécifiques de l'ADNc de rétinoblastome ont été sélectionnées à partir du logiciel « Gene Work Program, Intelligenetics » par comparaison à la séquence d'ADNc du gène du rétinoblastome publiée par Pedley et coll. [75]. L'amorce sens est **RB 2: CCTCTCGTCAGGCTTGAGTTT**. L'amorce anti-sens est **RB 5: CCCAGCAGTTCGATATCTACTG**. La taille de la séquence amplifiée attendue est de 424 pb (264^{ème} à 687^{ème} nucléotides sur ADNc). On peut ensuite comparer la séquence que l'on désire amplifier avec celles connues et contenues dans les banques de données afin d'éliminer des amplifications parasites dues aux homologies de séquences. La spécificité des amorces a été vérifiée sur INFOBIOGEN (score de 42).

Figure - 8 - Séquence en base amplifiée avec les deux amorces

RB2 CCTCTCGTCA GGCTTGAGTT TGAAGAAACA GAAGAACCTG ATTTTACTGC
ATTATGTCAG AAATTAAGA TACCAGATCA TGTCAGAGAG AGAGCTTGGT
TAACTTGGGA GAAAGTTTCA TCTGTGGATG GAGTATTGGG AGGTTATATT
CAAAGAAAA AGGAACTGTG GGAATCTGT ATCTTTATTG CAGCAGTTGA
CCTAGATGAG ATGTCGTTCA CTTTACTGA GCTACAGAAA AACATAGAAA
TCAGTGTCCA TAAATTCTTT AACTTACTAA AAGAAATTGA TACCAGTACC
AAAGTTGATA ATGCTATGTC AAGACTGTTG AAGAAGTATG ATGTATTGTT
TGCACTCTTC AGCAAATTGG AAAGGACATG TGAACCTATA TATTTGACAC
AACCCAGCAG TTCGATATCT ACTG RB5

4) Enzymes de restriction

Les enzymes de restriction sont des endonucléases coupant de manière définie et reproductible

l'ADN double-brin quelle que soit son origine. On note 3 types d'enzymes :

- type I : une fois la séquence reconnue l'enzyme se déplace sur l'ADN, s'arrête de manière aléatoire 1000 à 5000 pb plus loin et libère quelque dizaines de nucléotides
- type II : une fois la séquence reconnue, l'enzyme coupe l'ADN au niveau de cette séquence
- type III : l'enzyme reconnaît une séquence et coupe une vingtaine de nucléotides plus loin.

Seules les endonucléases de restriction utilisées en laboratoire sont de type II. Elles clivent spécifiquement les 2 brins d'ADNc au niveau d'une liaison phosphodiester d'une séquence, en général palindromique, parfaitement définie, (de 4 à 8 nucléotides) appelée **site de restriction**.

Afin de confirmer l'identité des produits amplifiés à partir de l'ADNc des 3 lignées de mélanocytes tumoraux, nous réalisons une digestion par une endonucléase de restriction de type II : **Hpa I** (Oncor-Appligen). Cette enzyme coupe la séquence amplifiée et **donne deux fragments de 98 et 326 pb**.

5) Anticorps anti-pRB monoclonaux

a) Anticorps monoclonal G3-245

Pour réaliser l'immunotransfert, afin de mettre en évidence la protéine RB dans les 3 lignées de mélanocytes tumoraux humains, nous avons utilisé l'**anticorps monoclonal de souris anti-protéine RB humaine G3-245** (PharMingen, Becton Dickinson Company), d'isotype IgG1, comme d'autres auteurs auparavant [79, 111, 149-151]. Cet anticorps reconnaît un épitope de la protéine RB de 332 à 344 acides aminés. La séquence en acides aminés est **DARLFLDHDKTLQ**. Cet anticorps peut-être utilisé pour réaliser des immunotransferts (1-2µg/ml), des immunoprécipitations (1-2 µg/ million de cellules), de la cytométrie de flux, des immunofluorescences (1-5 µg/ml), des études en immunohistochimie sur coupe congelée, fixée par formaldéhyde ou déparaffinée (0,1-1 µg/ml). En immunotransfert, la protéine RB est révélée par plusieurs bandes situées entre 110 et 116 kD. Elles correspondent aux différents états de phosphorylation de la protéine qui varient au cours du cycle cellulaire. Les conditions d'obtention

du gel de polyacrylamide influencent le nombre de bandes. Pour une séparation optimale des bandes, il est conseillé un gel de 7-10 % d'acrylamide.

b) Anticorps monoclonal G99-2005

Nous avons également réalisé un immunotransfert en utilisant un autre anticorps monoclonal jusqu'alors jamais utilisé par d'autres auteurs. Il s'agit de l'anticorps monoclonal de souris anti-protéine RB humaine (Research Diagnostics Inc), de sous-type IgG1 : G99-2005.

Cet anticorps reconnaît la fraction N-terminale de la protéine RB c'est-à-dire les 240 premiers acides aminés. Les conditions d'immunotransfert sont similaires à celles utilisées avec l'anticorps G3-245.

c) Anticorps de chèvre anti-IgG1 de souris couplé à HRP

Nous avons choisi un anticorps de chèvre anti- IgG1 de souris marqué à la peroxidase pour révéler en sous-classe et obtenir une bande électrophorétique étroite.

II. METHODES

1) Cultures cellulaires

a) Milieu et conditions de culture

Les 3 lignées de mélanocytes tumoraux humains sont cultivées en milieu « McCoy 5A modified medium » (Gibco-BRL) contenant 1% de L-glutamine auquel est ajouté 10% de serum de veau foetal décomplémenté (SVF) (BioWhittaker) [annexe 1] et de la gentamycine (5µg / µl, Gibco-BRL) [annexe 2].

Les cellules des trois lignées sont incubées dans une étuve en atmosphère humide avec 5% de CO₂ et à 37°C.

b) Trypsinisation

Les cellules à confluence sont trypsinées 2 fois par semaine. Préalablement lavées par une solution saline de phosphate (PBS) à pH 7,4 [annexe 3], les cellules mélanocytaires tumorales sont incubées pendant 5 minutes à 37°C dans de la trypsine-EDTA (Gibco-BRL). Afin d'inhiber l'action de la trypsine par le serum de veau foetal, les cellules sont reprises par du milieu McCoy 5A complet et centrifugées pendant 6 minutes à 20°C à 1200 rotation par minute (rpm). Après centrifugation, le culot cellulaire est repris dans du milieu de culture McCoy 5A complet puis divisé en deux et réensemencé.

c) Congélation

Quand cela est nécessaire, les cellules sont congelées à - 80°C à une concentration de $2 \cdot 10^6$ cellules / ml (1 ml / cryotube) dans du milieu de congélation de McCoy 5A sans gentamycine, contenant 10% de diméthyl sulfoxyde (DMSO) et 20% de SVF [annexe 4].

Des culots de 5 à 10 millions de cellules de chacune des trois lignées de mélanocytes tumoraux humains sont congelés sans milieu de congélation après deux lavages au PBS afin de réaliser l'étude.

d) Comptage des cellules

La numération des cellules s'effectue en mélangeant 20 µl de cellules trypsinées à 80 µl de bleu trypan dans un eppendorf. On dépose 20 µl de ce mélange sur cellule de Mallassez par capillarité.

Les cellules vivantes (blanches) excluent le colorant qui pénètre seulement dans les cellules mortes (apparaissant bleues). Les cellules blanches sont ensuite comptées.

Nombre de cellule / ml = (nombre de cellules blanches / 5) x 10 x 1000 x 5 x volume de reprise
nombre de ligne sur cellule de Mallassez

2) Méthodes générales de biologie moléculaire

a) Extraction des ARN totaux

Les cellules utilisées pour l'extraction des ARN sont lavées 2 fois par du PBS.

L'extraction des ARN totaux est réalisée à l'aide du kit « Tripure Isolation Reagent » (Roche) selon la méthode de Chomczynski et Sacchi [152]. Le culot cellulaire est homogénéisé à raison d'un volume (V) de la solution Tripure et 0,2 V de chloroforme pour $5 \cdot 10^6$ cellules, agité 15 secondes, laissé 5 min dans la glace et centrifugé (15 min, 12000 g, 4°C). Les ARN se trouvent dans la phase aqueuse supérieure tandis que l'ADN et les protéines sont au niveau de l'interface et dans la phase organique inférieure. Les ARN sont précipités en mélangeant la phase aqueuse à 0,5 V d'isopropanol. Après incubation (à température ambiante 10 minutes) le culot est récupéré par centrifugation (15 min, 12000 g, 4°C), lavé avec de l'éthanol à 75 % pour éliminer les sels et centrifugé 5 min, à 7500 g et à 4°C. Il est ensuite séché sous vide 20 min et repris par 20 µl d'eau traitée à 0,001 % de diéthyl pyrocarbonate (DEPC). Le dosage des ARN est réalisé par spectrophotométrie : mesure des densités optiques (DO) à 2 longueurs d'onde ($\lambda = 260$ nm (détection des acides nucléiques) et $\lambda = 280$ nm (détection des protéines)). La pureté des ARN est contrôlée par le calcul du rapport DO_{260} / DO_{280} qui doit être compris entre 1,6 et 2. Les ARN sont quantifiés en sachant qu'une unité de DO correspond à 40 µg/ml d'ARN. La concentration d'ARN est calculée selon la formule suivante : $C = DO_{260} \times 40 \times 250$ et est exprimée en µg/µl. La qualité des ARN est vérifiée sur gel d'agarose à 0,8 % [annexe 5] contenant un agent intercalant, le bromure d'éthidium (BET), par électrophorèse [annexe 6]. Le BET s'intercale entre les bases de la double hélice d'ADN et fluoresce sous UV permettant ainsi de visualiser les bandes.

	DO 260	DO 280	[ARN] µg/µl
M1 Dor	0,4876	0,2512	4,7876
M3 Dau	0,3587	0,1881	3,587
M4 Beu	0,8587	0,4710	8,587
Molt-4 (témoin +)	0,6974	0,4296	6,974

b) Transcription inverse (RT)

La transcription inverse permet la transcription d'ARN en ADN complémentaire (ADNc) grâce à la transcriptase inverse. Cette enzyme synthétise le brin complémentaire d'ADN à partir d'une amorce polydT hybridée sur la queue polyA (matrice) des ARNm eucaryotes.

La technique a été réalisée à l'aide du « Superscript Preamplification System » (Gibco-BRL) et du thermocycleur Crocodile II (Oncor-Appligène).

Deux variétés d'ARN ont été utilisées :

- les ARN totaux des 3 lignées de mélanocytes tumoraux humains
- l'ARN contrôle du kit codant la chloramphénicol acétyltransférase qui a servi de témoin du bon fonctionnement de l'expérience.

Tableau - 5 - Conditions utilisées pour la rétro-transcription des ARNm

	échantillons	contrôle	H₂O DEPC	Oligo DT
M1 Dor	0,3 µl		10,7 µl	1 µl
M3 Dau	0,6µl		10,4 µl	1 µl
M4 Beu	1 µl		10 µl	1 µl
Molt-4	0,5 µl		10,5 µl	1 µl
Contrôle		1 µl	10 µl	1 µl

L'hybridation de l'oligo dT avec la queue polyA des ARNm est obtenue en incubant ce mélange 10 minutes à 70°C. Il est ensuite refroidi dans la glace.

Dans chaque tube, nous ajoutons au 6 µl du mélange suivant :

- 2 x 6 µl de tampon PCR 10X, soit 12 µl

- 2 x 6 µl de MgCl₂ (25 mM), soit 12 µl

- 1 x 6 µl de dNTP (10 mM), soit 6 µl

- 2 x 6 µl de DTT (0,1 M), soit 12 µl

Les tubes sont incubés 5 min à 42°C. On ajoute ensuite 1 µl de transcriptase inverse (RT) (200UI) pour un temps réactionnel de 50 min à 42°C. Le mélange est placé 15 min à 70°C afin de détruire la transcriptase inverse puis refroidi dans la glace. La matrice d'ARN est à son tour détruite en incubant le mélange 20 min à 37°C avec 1 µl de Rnase H (2 UI) (fig. 16). A la fin de la réaction, on obtient 20 µl de solution ne contenant que des ADN complémentaires permettant ainsi de réaliser 2 PCR par tube de RT.

c) Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) permet l'amplification exponentielle d'un fragment d'ADN déterminé. L'ADN peut provenir soit d'une extraction d'ADN génomique soit d'une transcription inverse à partir d'une extraction d'ARN.

Elle est réalisée à l'aide du « Superscript Preamplification System (Gibco- BRL) » et de 0,5 U de Taq polymérase (Oncor-Appligène). Elle se compose de 20 à 30 cycles. Chaque cycle comporte 3 étapes :

- une dénaturation par la chaleur des brins d'ADN
- une hybridation spécifique des amorces RB2 et RB5 sur l'ADN à amplifier
- une synthèse des brins d'ADN complémentaires par la Taq polymérase.

Les amorces spécifiques du gène RB ont été sélectionnées à partir d'un programme informatique (Gene Works Program, IntelliGenetics) par comparaison à la séquence d'ADNc du gène RB humain publiée par Pedley [75].

Amorce sens RB2 : 5'-CCTCTCGTCAGGCTTGAGTTT 3'

Amorce anti-sens RB5 : 3'-CCCAGCAGTTCGATATCTACTG 5'

La taille de la séquence amplifiée attendue est de 424 pb.

Trois contrôles sont réalisés lors de la PCR :

- un **contrôle positif (C+)** avec les amorces de l'ADNc contrôle et l'ADNc contrôle obtenu par RT de l'ARN contrôle.
- un **contrôle négatif (C-)** avec les amorces spécifiques RB2, RB5 et ADNc contrôle.
- un témoin positif, l'ADNc obtenu par RT des ARN de MOLT-4 avec les amorces RB2 et RB5.

On prépare le mélange **Mix 1** suivant pour nombre d'échantillon + 1 (soit 6+1=7) :

- Tampon PCR 10X : 5 μ l x 7, soit 35 μ l
- dNTP (10 mM) : 1 μ l x 7, soit 7 μ l
- H₂O distillée stérile : 30 μ l x 7, soit 210 μ l
- Taq Polymérase (5 U / μ l) : 0,1 μ l x 7, soit 0,7 μ l.

Dans l'éppendorf appelé C+, on ajoute 36 μ l de Mix 1, 1 μ l de l'amorce A et 1 μ l de l'amorce B.

On prépare le mélange Mix 2 comme suit :

- Mix 1
- nombre d'échantillon - (C+) + 1 (soit 5 + 1 = 6) x 2 μ l de chacune des amorces spécifiques de RB, soit 2 μ l x 6 de RB2 et 2 μ l x 6 de RB5.

On dépose 40 μ l de Mix 2 dans C-, M1 Dor, M3 Dau, M4 Beu, et Molt-4. On ajoute 50 μ l d'huile dans tous les eppendorfs puis les tubes sont placés dans le thermocycleur et l'amplification a lieu selon les conditions suivantes:

<u>dénaturation</u> 2 min à 94°C	1 cycle
<u>dénaturation</u> 1 min à 94°C	35 cycles
<u>hybridation</u> 1 min à 55°C	
<u>élongation</u> 2 min à 72°C	
<u>élongation</u> 5 min à 72°C	1 cycle
<u>terminaison</u> 30 min à 25°C	

d) Migration sur gel d'agarose à 1%

Les produits de PCR sont ensuite révélés par une électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % [annexe 7]. Chaque échantillon est déposé dans un puits différent avec du bleu de charge. Le marqueur de poids moléculaire utilisé est « 100bp DNA ladder » (Promega) dont la bande en hyperbrillance correspond à un poids moléculaire de 500pb.

e) Vérification des produits PCR par digestion

enzymatique

Afin de confirmer l'identité des produits de PCR obtenus à partir de l'ADNc des 3 lignées de mélanocytes tumoraux humains (M1 Dor, M3 Dau, M4 Beu), et les cellules Molt-4, nous avons réalisé une digestion par une enzyme de restriction de la séquence nucléotidique : Hpa I.

Deux fragments de 98 pb et 326 pb (= 424 pb) sont obtenus.

Nous avons incubé 10 µl de produits PCR de chaque lignée avec 1,5 µl de Tampon 10 X V, 1 µl d'enzyme Hpa I et 2,5 µl d'eau distillée pendant 2 heures à 37°C. L'incubation s'effectue à la température où l'activité de l'enzyme choisie est optimale en générale 37°C.

Nous avons ensuite réalisé une migration sur gel d'agarose à 1,8 % en mettant dans chaque puits 15 µl de la préparation sus jascente avec 3 µl de tampon de charge. Cette électrophorèse permet de faire migrer des molécules chargées en solution sous l'effet d'un champ électrique. Leur vitesse de migration dépend en grande partie de leur taille et de leur charge qui vont permettre de séparer les molécules.

3) Immunotransfert ou western blot

a) Préparation des extraits

Les cellules des 3 lignées de mélanocytes tumoraux humains (5×10^6) et les Molt-4 (témoin positif) sont lysées en ajoutant 250 μ l d'un tampon de lyse [annexe 8]. Les eppendorfs sont placées 25 min dans la glace puis centrifugés 12000 g à 4°C pendant 15 min. Le surnageant est alicoté par 200 μ l pour chaque échantillon. Chaque échantillon est dissout avec le tampon bleu avec dithiotréitol (DTT) [annexe 9] comme suit :

témoin + : 200 μ l d'extraits (soit 600 μ g) + 100 μ l de DTT

M1 Dor : 100 μ l d'extraits (soit 600 μ g) + 200 μ l de DTT

M3 Dau : 100 μ l d'extraits (soit 600 μ g) + 200 μ l de DTT

M4 Beu : 70 μ l d'extraits (soit 600 μ g) + 230 μ l de DTT

Chaque aliquot est chauffé pendant 2 min à 90°C.

Les échantillons sont déposés dans les puits à raison de 100 μ l par puits ainsi que les témoins de poids moléculaires (standard, 200, 116, 97...).

b) Quantification des protéines totales

La concentration en protéine totale de chaque échantillon a été déterminée en μ g / μ l par la technique de Folin [annexe 10].

c) Préparation des gels de migration et de concentration

Un gel de polyacrylamide (SDS-Page) à 7,5 % ou separating gel est réalisé avec Tris HCl 1 M à pH 8,8, SDS 10 %, Acrylamide 45 %, Temed, de l'eau distillée et de l'ammonium persulfate à 10 % [annexe 11]. Au bout d'une heure trente (temps de polymérisation du gel de séparation), le gel de concentration ou stacking gel à 3 % [annexe 12], est coulé après mise en place des peignes.

d) Migration

Les échantillons des extraits M1Dor, M3Dau, M4Beu et MOLT-4 sont déposés dans les puits à raison de 100 µl / puits.

La migration s'effectue pendant environ 4 heures à ampérage constant (30 mA).

e) Transfert

Les protéines sont alors transférées sur feuille de nitrocellulose grâce à un électrotransfert pendant une nuit à voltage constant (30 V) dans du tampon de transfert [annexe13].

La feuille de nitrocellulose est placée successivement dans une cuve contenant du rouge ponceau pour mettre en évidence les protéines puis rincée deux fois dans de l'eau distillée.

f) Blocage

Les bandes sont ensuite découpées puis mises dans une cuve contenant du tampon de blocage [annexe 14] pendant 2h30. Chaque bande est ensuite incubée dans 3 ml de tampon d'incubation [annexe 15] avec 6 µl d'anticorps de souris anti-protéine RB humaine (G3-245), soit une dilution au 1/500^{ème} pendant une heure. Un rinçage des bandes est effectué 5 fois avec un tampon de lavage [annexe 16]. Chaque bande est incubée dans 3 ml de tampon de lavage avec 10 µl d'anticorps de chèvre anti-souris IgG1 (dilution au 1/1500^{ème}) marqués à la peroxidase pendant 1 heure suivi de 5 lavages avec le tampon de lavage puis 2 lavages de 5 minutes au Tris 100mM à pH 7,4.

g) Révélation

Les peroxidases sont ensuite révélées dans un milieu contenant 100 ml de Tris 100 mM à pH 7,4 et 50 mg de diaminobenzidine (DAB). Les bandes sont placées dans la solution contenant le DAB et à laquelle on rajoute 100 µl de H₂O₂, puis dans l'acide acétique à 3 % et enfin 10 minutes dans de l'eau distillée. Le poids moléculaire des protéines qui ont fixé l'anticorps anti-protéine RB est calculé par comparaison avec des protéines de poids moléculaire connues qui ont été séparées par électrophorèse et transférées simultanément.

4) Quantification de la protéine RB par mesure de la densité optique

Nous avons utilisé la mesure de la densité optique des bandes de nitrocellulose pour quantifier la protéine RB. Les bandes ont pour cela été scannées puis analysées par un logiciel de spectrophotométrie. Un pourcentage de la protéine RB était obtenu par rapport à la quantité de protéines totales.

RESULTATS

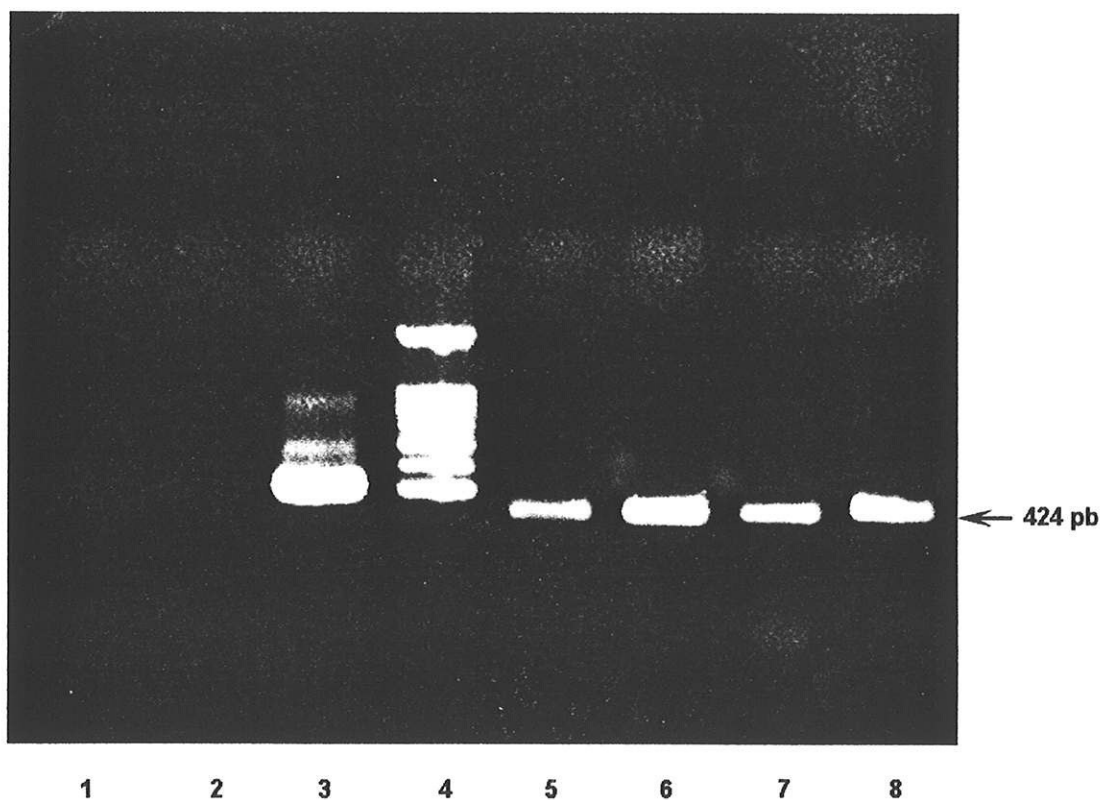
I. Présence de l'ARNm du gène du rétinoblastome dans nos 3 lignées de mélanocytes tumoraux humains.

Nous avons recherché l'ARNm du gène RB par transcription inverse suivie d'une polymérisation en chaîne (RT-PCR) dans nos trois lignées de mélanocytes tumoraux humains M1 Dor, M3 Dau, M4 Beu et les Molt-4 (témoin +).

La séquence de 424 pb correspondant aux exons 2, 3, 4 et 5 de l'ARNm du gène RB a été amplifiée dans nos 3 lignées ainsi que celle du témoin positif. Nous avons visualisé après migration des produits RT-PCR sur gel d'agarose à 1,8%, la bande à 424 pb (fig.10).

Figure -10- Analyse de l'ARNm du gène RB par RT-PCR

piste 1 : marqueur de poids moléculaire 100 pb (Promega) ; **piste 2** : contrôle + contenant le contrôle de RT avec les amorces A et B (chloramphénicol acétyl transférase) ; **piste 3** : contrôle - contenant le contrôle de RT avec les amorces RB2 et RB5 ; **piste 4** : 0 contenant de l'eau avec les amorces spécifiques RB2 et RB5 ; **pistes 5, 6, 7** : lignées M1 Dor, M3 Dau, et M4 Beu respectivement ; **piste 8** : Témoin positif Molt-4

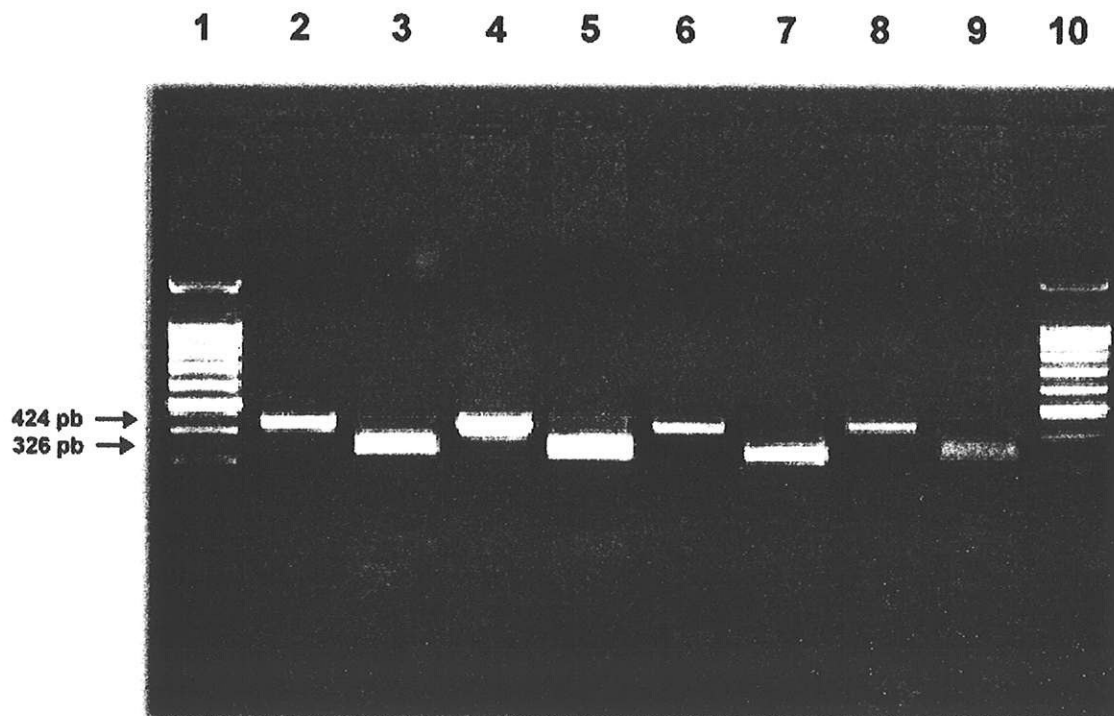


Nous avons vérifié par digestion enzymatique la présence de deux bandes à 99 et 326 pb attendues (Fig.11). Il s'agissait d'une technique non quantitative ne permettant pas de déterminer les taux de transcription de l'ADNc au sein des 3 lignées.

Nos 3 lignées de mélanocytes tumoraux expriment un ARNm du gène RB.

Figure - 11 - Vérification par digestion enzymatique

pistes 1 et 10 : marqueur de poids moléculaire 100 pb (Promega) ; **piste 2** : M1 Dor non digérée ; **piste 3** : M1 Dor digérée ; **piste 4** : M3 Dau non digérée ; **piste 5** : M3 Dau digérée ; **piste 6** : M4 beu non digérée ; **piste 7** : M4 Beu digérée ; **piste 8** : molt 4 non digérée ; **piste 9** : molt 4 digérée.



II. Présence de la protéine RB dans les trois lignées de mélanocytes tumoraux humains

Nous nous sommes intéressés à l'expression protéique du gène du rétinoblastome dans nos 3 lignées de mélanocytes tumoraux humains. Pour cela, nous avons utilisé la technique d'immunotransfert puisqu'il existe un anticorps monoclonal de souris anti-protéine RB humaine qui fonctionne en immunotransfert (G3-245, Pharmingen) et utilisé avec succès par de nombreuses équipes. Cet anticorps reconnaît spécifiquement un fragment de la protéine entre les acides aminés 332 à 344.

La figure 12 montre que **les trois lignées de mélanocytes tumoraux M1 Dor, M3 Dau et M4 Beu expriment la protéine RB.**

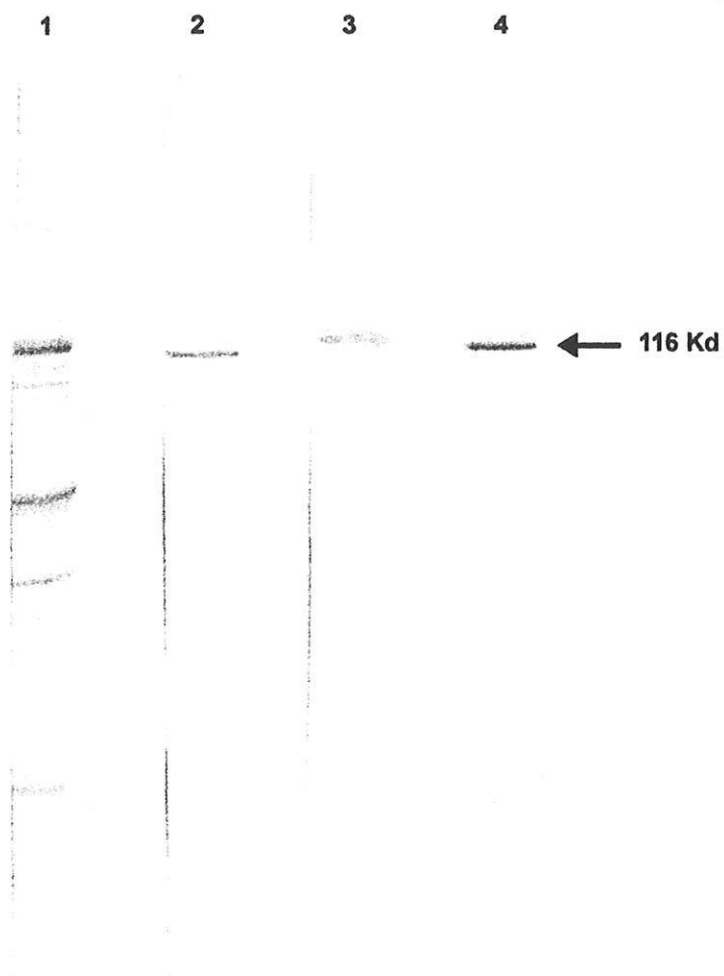
Les cellules Molt-4, cellules leucémiques, expriment la protéine RB et ont été nos témoins positifs. La bande correspond à une protéine de poids moléculaire de 116 kD, poids moléculaire de la protéine RB sous forme hyperphosphorylée.

Un immunotransfert réalisé avec l'anticorps G99-2005 (correspondant à l'épitope 1 à 240 acides aminés codé par l'ARNm que nous avons amplifié) dans les mêmes conditions techniques est négatif pour les trois lignées et le témoin positif Molt-4.

L'immunotransfert a été réalisé à plusieurs reprises en faisant varier les concentrations des anticorps sans succès.

Figure - 12- Immunotransfert sur gel de polyacrylamide à 7,5% (SDS page 7,5%)

piste 1 : témoin positif ; piste 2 : M1 Dor ; piste 3 : M3 Dau ; piste 4 : M4 Beu. La bande « témoin positif » est située à 116 kD. Cette bande existe sur les lignes 2, 3 et 4.



III. Quantification de la protéine RB dans les 3 lignées et le témoin +

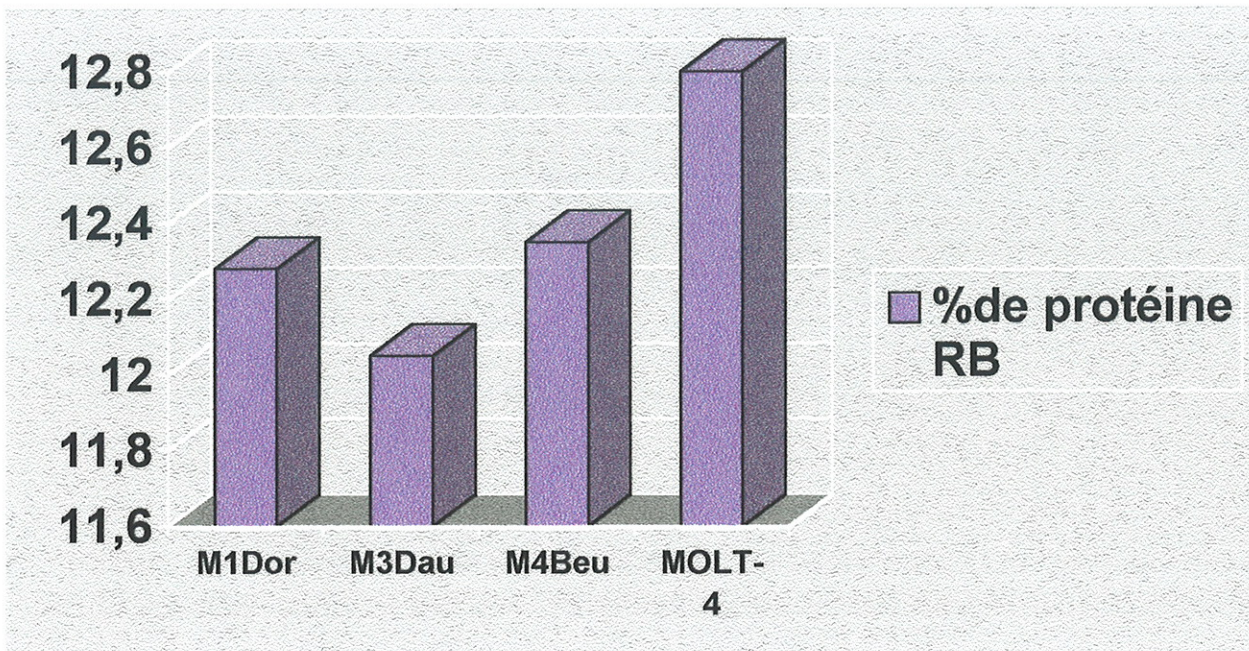
En réalisant les immunotransferts, et bien que cette technique ne soit pas quantitative, nous avons constaté des bandes moins intenses, nous amenant ainsi à quantifier la protéine RB.

Nous avons voulu mesurer la quantité de protéine RB pour chacune des 3 lignées et la corréler à l'importance de la tumorigénicité.

Tableau - 6 - Quantification de l'immunotransfert par mesure de la densité optique

	M1Dor	M3Dau	M4Beu	MOLT-4
western blot 1 %	8,98	9,01	10,33	12,1
western blot 2	16,69	12,44	12,63	14,33
western blot 3	11,18	14,7	14,1	11,86
moyenne	12,28	12,05	12,35	12,76

Graphique - 4 - Expression en pourcentage de la quantité de protéine RB



Dans des conditions rigoureusement identiques, nous avons effectué 3 immunotransferts avec les 3 lignées de mélanocytes tumoraux humains et les cellules MOLT-4. Grâce à un logiciel informatique, nous avons mesuré par densité optique la quantité de protéine RB pour les lignées M1Dor, M3Dau et M4Beu. Nous avons obtenu 3 mesures pour chaque lignée cellulaire, exprimées en %, qui nous ont permis de réaliser une moyenne. On ne constate pas de différence significative entre les lignées de mélanocytes tumoraux humains et les cellules MOLT-4. La quantité de protéine RB contenue dans la lignée M3Dau semble moins importante que dans les autres lignées.

DISCUSSION

Le suivi des patients considérés en rémission complète d'une forme héréditaire de rétinoblastome a permis de constater qu'ils sont très fortement prédisposés à d'autres tumeurs malignes. Ces néoplasies sont par ordre de fréquence décroissante les ostéosarcomes, des sarcomes des parties molles, des cancers pulmonaires à petites cellules, de la vessie, des mélanomes...

En 1987, le gène du rétinoblastome est isolé sur le bras long du chromosome 13 sur le locus 14.2. Le produit du gène RB est une phosphoprotéine RB de 110 à 116 kd selon son degré de phosphorylation.

Le rôle de la protéine RB, protéine onco-suppressive, dans l'apparition, la progression et la dissémination du mélanome, demeure controversé dans la littérature. Certains signalent une diminution de la croissance cellulaire tumorale lors de l'apport d'une protéine RB fonctionnelle dans des lignées cellulaires déficientes (cellules tumorales de vessie, sein, poumon, ostéosarcome) en protéine RB et cela de manière dose dépendante [153].

Lewis et coll. semblent plus réservés et rapportent une incidence de 4,5% de réarrangement du gène RB dans 10 lignées de mélanocytes tumoraux humains [142]. Gope et coll. signalent des taux élevés de protéines RB dans des cellules tumorales non mélaniques. Peu d'auteurs ont étudié la protéine RB et ses effets sur le cycle cellulaire, la propagation tumorale dans des lignées de mélanocytes tumoraux humains en raison de la longueur du gène, du fait qu'il ne s'agisse que d'un maillon de la chaîne de réaction, de l'importance croissante de p16, autre onco-suppresseur. Seuls Khan et Lewis ont mené des études sur des mélanocytes tumoraux humains. Khan et coll. s'orientent vers une perte de fonctionnalité de la protéine RB par atteinte de p16 et des CdK [154].

Dans notre étude, nous avons voulu vérifier l'expression du gène RB dans trois lignées de mélanocytes tumoraux humains M1Dor, M3Dau et M4Beu. Les patients dont sont issues ces lignées étaient non porteurs de rétinoblastome.

Grâce à une RT-PCR avec l'ARN total de chacune des 3 lignées et du témoin positif MOLT-4, nous avons montré que les 3 lignées possèdent l'ARNm du gène RB. Notre étude est purement qualitative et non quantitative ; nous ne pouvons pas déterminer le nombre de copies d'ARNm émises par cellule.

Comme d'autres auteurs, nous signalons la présence d'ARNm dans nos 3 lignées de mélanocytes tumoraux humains [77,142]. A l'inverse Valente tente de surexprimer la protéine RB par transfection du gène RB dans des lignées de mélanocytes tumoraux murins déficients en gène RB (RB⁻) et démontre une diminution de 50% de la croissance cellulaire. Il reste cependant prudent dans ses conclusions en insistant sur le fait que la protéine RB ne pourrait être qu'une molécule intermédiaire interagissant avec d'autres protéines. En effet, la surexpression de la protéine ne stoppe pas complètement la croissance et la progression et suggère des mécanismes hautement complexes intervenant dans l'initiation et la dissémination du mélanome [151].

Lefebvre et coll. constatent le même phénomène en transfectant par électroporation un plasmide pZipNeo (rétrovirus) contenant de l'ADNc du gène RB dans des lignées de cellules lymphoblastiques humaines [96]. Les amorces qu'ils utilisent permettent d'amplifier les exons de 20 à 22. Donc, il conclue que la protéine RB, protéine onco-suppressive ne suffit pas à réverser complètement et à elle seule le phénotype malin.

Kornblau démontre qu'un faible taux de protéine RB au moment du diagnostic de leucémie aiguë myeloblastique, est associé à un faible taux de survie parce que les patients répondent moins bien aux thérapeutiques conventionnelles [155].

Takahashi et coll., en 1991, démontrent que la restauration de la protéine RB fonctionnelle dans des cellules carcinomateuses humaines de vessie provoque une diminution de la tumorigénicité [114].

Antelman et coll. signalent une diminution de la croissance uniquement en apportant la protéine RB dans des lignées cellulaires d'adénocarcinome pulmonaire RB⁻ en mesurant la diminution d'incorporation de thymidine tritiée et propose une protéinothérapie [153].

Après avoir recherché l'ARNm du gène RB, nous avons mis en évidence la présence de la protéine RB sous sa forme hyperphosphorylée donc inactive. La phosphorylation de la protéine varie au cours du cycle cellulaire. Le fait que nous n'ayons pas stoppé la croissance à des phases précises du cycle, ne nous permet donc pas de conclure quant à l'aspect fonctionnel de la protéine. Pour cela, nous aurions dû utiliser l'affinité du segment T large de SV 40 pour la protéine RB et révéler par un anticorps anti-segment T large comme l'avait fait auparavant Khan [154].

D'autre part, nous avons voulu affiner notre recherche de la protéine par immunotransfert en utilisant un anticorps permettant de mettre en évidence un épitope de la protéine RB codé exactement par le fragment d'ARNm que nous avons amplifié c'est-à-dire l'extrémité N-terminale. Tous les immunotransferts sont restés négatifs y compris les Molt-4 (rappelons le : témoins positifs) et ce malgré l'augmentation des concentrations de cet anticorps G99-2005.

Comme nous l'avons précédemment dit, seuls deux auteurs ont étudié l'expression du gène RB du rétinoblastome dans des lignées de mélanocytes tumoraux humains. Le premier a s'y être intéressé est Lewis. Pour cela, il extrait l'ADN de 20 mélanomes primitifs (10 Superficial spreading melanoma, et 10 mélanomes nodulaires), de 13 métastases de mélanomes (7 adénopathies métastatiques inguinales, 4 axillaires et 2 nodules sous-cutanés) et de 10 lignées de mélanocytes

blot et conclut que l'incidence des réarrangements dans le gène RB n'atteint que 4,5%. Il ne précise pas l'origine de ses lignées de mélanocytes tumoraux : sont-elles humaines ou murines ?

D'autre part, il ne réalise ni RT-PCR ni immunotransfert pour rechercher la protéine RB.

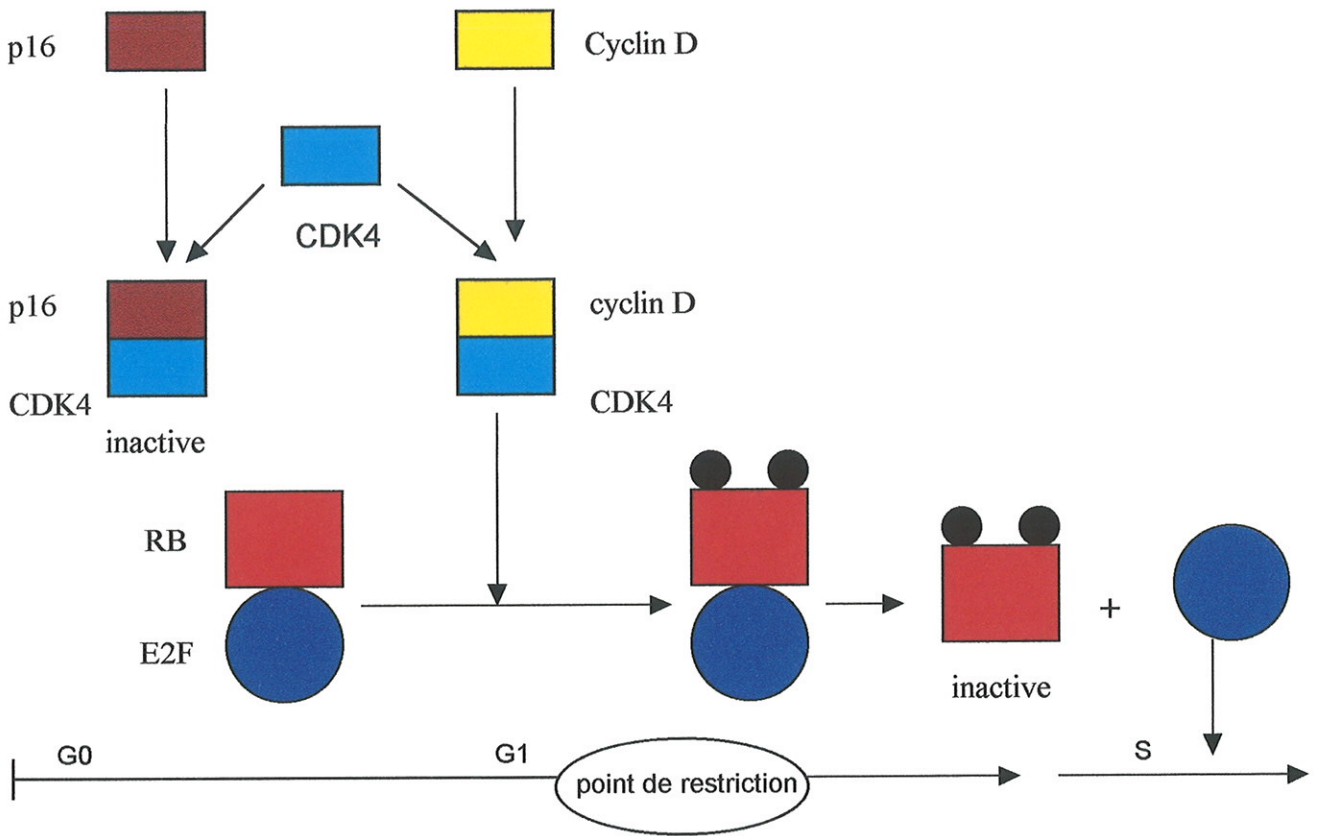
Trois années plus tard, Khan et son équipe étudient à nouveau l'expression du gène RB dans une lignée de mélanocytes tumoraux humains MM96L. Un immunotransfert montre que la lignée MM96L exprime la protéine RB et met en évidence une protéine RB fonctionnelle par liaison avec la SV 40 large T, elle-même révélée par un anticorps anti-SV 40 large T. Dans son étude, il démontre que la protéine RB est exprimée dans la lignée MM96L et qu'elle est fonctionnelle. Il signale l'absence d'expression de p16 en immunotransfert et le rôle de cette protéine dans les interactions avec la protéine RB.

Comme Khan et coll. nous émettons l'hypothèse que d'autres molécules ou gènes (CDKN2A / p16...) entrant dans la cascade de réactions aboutissant à une protéine RB fonctionnelle, seraient respectivement non fonctionnelles ou mutés.

Lorsque l'on considère les autres molécules interagissant avec la protéine RB et influençant sa fonctionnalité, on observe que la protéine p16 joue un rôle majeur. De nombreux auteurs signalent des mutations du gène CDKN2A (Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A), situé sur le bras court du chromosome 9 sur le locus 21, dans des lignées de mélanocytes tumoraux.

Les mutations ponctuelles sont plus fréquentes dans les mélanomes familiaux et les délétions plutôt que dans les mélanomes sporadiques [98,100]. La protéine p16, possédant 156 acides aminés inhibe les CDK4/6.

Figure - 13 - Place de la protéine RB et p16 dans la progression du cycle cellulaire [156]



En remarquant des différences de densité entre les bandes obtenues en immunotransfert avec les 3 lignées de mélanocytes tumoraux humains, nous avons tenté une quantification. Le taux de protéine RB est sensiblement similaire entre les lignées et le témoin positif et est de 13 %. On note une différence minime entre le taux de protéine dans la lignée M3Dau et les lignées M1Dor et M4Beu mais qui n'est pas significative.

La technique de quantification que nous avons utilisée n'est probablement pas assez fiable et il sera nécessaire de quantifier par cytométrie de flux ou réaliser une PCR quantitative. Ceci nous permettra de corréliser les taux avec le degré de tumorigénicité.

Dans la littérature, on s'aperçoit que de nombreux auteurs se sont intéressés aux effets des ultraviolets sur l'expression de la protéine RB et de p16 [27, 157]. Les UV diminuent l'expression des protéines onco-suppressives de manière significative et confortent l'idée de leur rôle dans l'initiation, la progression et dissémination des tumeurs mélaniques. Le premier à s'y être intéressé est Pedley en 1996. Il étudie l'expression de la protéine RB dans la lignée de mélanocytes tumoraux humains MM96L après irradiation UV. Il constate une diminution de l'expression de 55 à 70 % par rapport au contrôle 9 à 12H après l'irradiation UVB ($75\text{J} / \text{m}^2$) et 2 à 14% 48h après $300\text{J} / \text{m}^2$ d'UVB.

CONCLUSION

Notre étude a permis de révéler **la présence de la protéine RB** et de **l'ARNm du gène RB** pour la première fois dans les 3 lignées de mélanocytes tumoraux humains M1Dor, M3Dau, et M4Beu.

Après avoir mis en évidence la présence de la protéine RB ainsi que l'ARNm du gène RB, nous avons réalisé un immunotransfert quantitatif en mesurant la densité optique des bandes de nitrocellulose obtenues. Elle ne nous a pas permis d'apprécier le taux d'expression de la protéine RB. Un nouveau dosage sera réalisé par cytométrie de flux. Une RT-PCR quantitative sur les ARN totaux des 3 lignées permettra de confirmer les résultats.

L'immunotransfert avec l'anticorps dirigé contre l'épitope de la région N-terminale est resté négatif, alors que la séquence amplifiée est présente. On peut s'interroger sur l'existence de mutations ponctuelles qui, lors de la traduction en protéines, donnent un épitope non reconnu par l'anticorps G99-2005. Pour répondre à cette question, nous réaliserons un séquençage.

Par la suite, les 3 lignées seront irradiées afin d'évaluer si l'expression de la protéine RB est UV-dépendante. Les cellules cultivées en boîte de Pétri seront exposées à des radiations UVA, UVB (280-315 nm) et TL01 (312 nm) et des immunotransferts et RT-PCR quantitatifs seront réalisés.

Certains auteurs comme Pedley et coll., se sont intéressés aux effets des UVB sur une lignée de mélanocytes tumoraux humains MM96L et des mélanocytes normaux et ont montré une baisse de l'expression de l'ARNm et de la quantité de protéine RB [27]. Notre travail tentera de confirmer les constatations de Pedley avec 3 nouvelles lignées de mélanocytes tumoraux humaines et décrira les effets des UVA et de l'expression de la protéine RB. D'autre part, il serait intéressant de rechercher l'expression de p16 dans ces mêmes lignées puisque cette protéine est fréquemment mutée dans les mélanomes et intervient dans le fonctionnement de la protéine RB.

BIBLIOGRAPHIE

1. MM Delaunay. Historique. In : Mélanome cutané et des muqueuses superficielles. Masson, 1992 :1-2
2. Carswell R. Melanoma. In : Pathological anatomy, Longman, London, 1838 1 vol. Part 9
3. Herlyn M, Clark WH, Rodeck U, Mancianti ML, Jambrosic J, Koprowski H. Biology of tumor progression in human melanocytes. *Lab Invest* 1987 ; 56 : 461-74
4. Guan XY, Zhang H, Yang JM, Wang J, Taetle R, Meltzer PS, Trent JM. Detection of chromosome 6 abnormalities in melanoma cell lines by chromosome arm painting probes. *Cancer Genet Cytogenet* 1998 ; 107 : 89-92
5. Hasle H, Olsen JH, Hansen J, Friedrich U, Tommerup N. Occurrence of cancer in a cohort of 183 persons with constitutional chromosome 7 abnormalities. *Cancer Genet Cytogenet* 1998 ; 105 : 39-42
6. White VA, Chambers JD, Courtright PD, Chang WY, Horsman DE. Correlation of cytogenetic abnormalities with the outcome of patients with uveal melanoma. *Cancer* 1998 ; 83 : 354-9

7. Sisley K, Rennie IG, Cottam DW, Potter AM, Potter CW, Rees RC. Cytogenetic findings in six posterior uveal melanomas: involvement of chromosomes 3, 6, and 8. *Genes Chromosomes Cancer* 1990 ; 2 : 205-9
8. Magauran RG, Gray B, Small KW. Chromosome 9 abnormality in choroidal melanoma. *Am J Ophthalmol* 1994 ; 117 : 109-11
9. Trent JM. Cytogenetics of human malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 1991 ; 10 : 103-13
10. Millikin O, Meese E, Vogelstein B. Loss of heterozygosity for loci of the long arm of chromosome 6 in human malignant melanoma. *Cancer Res* 1991 ; 51 : 5449-53
11. Dooley TP. Recent advances in cutaneous melanoma oncogenesis research. *Oncol Res* 1994 ; 6 : 1-9
12. Vogel F. The genetics of retinoblastoma. *Hum Genet* 1979 ; 52 : 1-54
13. Knudson AG. Retinoblastoma : a prototypic hereditary neoplasm. *Seminars Oncol* 1978 ; 5 : 57

14. Hogg A, Bia B, Onadim Z, Cowell JK. Molecular mechanisms of oncogenic mutations in tumors from patients with bilateral and unilateral retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 7351-5
15. Cavenee WK, Dryja TP, Phillips RA, Benedict WF, Godbout R, Gallié BL, Murphree AL, Strong LC, White R. Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* 1983 ; 305 : 779-84
16. Zhu X, Dunn JM, Goddard AD, Squire JA, Becker A, Phillips RA, Gallié BL. Mechanism of loss of heterozygosity in retinoblastoma. *Cytogenet Cell Genet* 1992 ; 59 : 248-52
17. T'Ang A, Wu KJ, Hashimoto T, Liu WY, Takahashi R, Shi XH, Mihara K, Zhang FH, Chen YY, Du C, Qian J, Lin YG, Murphree AL, Qiu WR, Thompson T, Benedict WF, Fung YKT. Genomic organisation of the human retinoblastoma gene. *Oncogene* 1989 ; 4 : 401-40
18. Lee WH, Bookstein R, Hong F, Young LJ, Shew JY, Lee EYH. Human retinoblastoma susceptibility gene : cloning, identification, and sequence. *Science* 1987 ; 235 : 1394-9
19. Dryja TP, Rapaport JM, Joyce JM, Petersen RA. Molecular detection of deletions involving band q14 of chromosome 13 in retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986 ; 83 : 7391-4
20. Friends SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rappaport JM, Albert DM, Dryja TP. A human DNA segment with properties of the gene that predispose to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 1986 ; 323 : 643-6

21. Hong FD, Huang HJS, To H, Young LJS, Oro A, Bookstein R, Lee EY-HP, Lee WH. Structure of the human retinoblastoma gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989 ; 86 : 5502-6
22. Fung YKT, Murphree AL, T'Ang A, Qian J, Hinrichs SH, Benedict WF. Structural evidence for the authenticity of the human retinoblastoma gene. *Science* 1987 ; 236 : 1657-61
23. McGee TL, Yandell DW, Dryja TP. Structure and partial genomic sequence of the human retinoblastoma susceptibility gene. *Gene* 1989 ; 80 : 119-28
24. Goodrich DW, Lee WH. Molecular characterization of the retinoblastoma susceptibility gene. *Biochim Biophys Acta* 1993 ; 1151 : 43-61
25. Helin K, Harlow E. The retinoblastoma protein as a transcriptional repressor. *Trends Cell Biol* 1993 ; 3 : 43-5
26. Kouzarides T. Transcriptional regulation by the retinoblastoma protein. *Trends Cell Biol* 1993 ; 3 : 211-3
27. Onadim Z, Hungerford J, Cowell JK. Follow-up of retinoblastoma patients having prenatal and perinatal predictions for mutant gene carrier status using intragenic polymorphic probes from the RB1 gene. *Br J Cancer* 1992 ; 65 : 711-6

28. Lee EYH, To H, Schew JY. Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in human breast cancers. *Science* 1988 ; 241 : 218-21
29. Horowitz JM, Park SH, Bogenmann E, Cheng JC, Yandell DW, Kaye FJ, Minna DJ, Dryja TP, Weinberg RA. Frequent inactivation of the retinoblastoma antioncogene is restricted to a subset of human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 2775-9
30. Bookstein R, Shew J, Chen P, Scully P, Lee W. Suppression of tumorigenicity of human prostate carcinoma cells by replacing a mutated RB gene. *Science* 1990 ; 247 : 712-5
31. Harbour JW, Lai S, Whang-Peng J, Gazdar AF, Minna JD, Kaye FJ. Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC. *Science* 1988 ; 241 : 353
32. Furukawa Y, De Caprio J, Belvin M, Griffin JD. Heterogenous expression of the product of the retinoblastoma susceptibility gene in primary human leukemia cells. *Oncogene* 1991 ; 6 : 1343-6
33. T'Ang A, Varley JM, Chakraborty S, Murphree AL, Fung YKT. Structural rearrangement of the retinoblastoma gene in human breast carcinoma. *Science* 1988 ; 242 : 263-6
34. Yokota J, Akiyama T, Fung YKT, Benedict WF, Namba Y, Hanaoka M, Wada M, Terasaki T, Shimosato Y, Sugimura T, Terada M. Altered expression of the retinoblastoma (RB) gene in small-cell carcinoma of the lung. *Oncogene* 1988 ; 3 : 471

35. Sanders BM, Jay M, Draper GJ, Roberts EM. Non-ocular cancer in relatives of retinoblastoma patients. *Br J Cancer* 1989 ; 60 : 358-65
36. Gallié BL, Squire JA, Goddard A, Dunn Jm, Canton M, Hinton D, Zhu XP, Phillips RA. Mechanism of oncogenesis in retinoblastoma. *Lab Invest* 1990 ; 62 : 394-408
37. Friends SH, Horowitz HM, Gerber MR, Wang XF, Bogenmann E, Li FP, weinberg RA. Deletions of a DNA sequence in retinoblastomas and mesenchymal tumors : organization of the sequence and its encoded protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987 ; 84 : 9059-63
38. Hogg A, Bia B, Onadim Z, Cowell JK. Molecular mechanisms of oncogenic mutations in tumors from patients with bilateral and unilateral retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 7351-5
39. Hogg A, Onadim Z, Baird PN, Cowell JK. Detection of heterozygous mutation in the RB1 gene in retinoblastoma patients using single-strand conformation polymorphism analysis and polymerase chain reaction sequencing. *Oncogene* 1992 ; 7 : 1445-51
40. Dunn JM, Phillips RA, Zhu X, Becker A, Gallie BL. Mutations in the RB1 gene and their effects on transcription. *Mol Cell Biol* 1989 ; 9 : 4596-604
41. Mitchell CD, Cowell JK. Predisposition to retinoblastoma due to a translocation with the 4,7R locus. *Oncogene* 1989 ; 4 : 253-7

42. Onadim Z, Hogg A, Cowell JK. Mechanism of oncogenesis in patients with familial retinoblastoma. *Br J Cancer* 1993 ; 68 : 958-64
43. Onadim Z, Hogg A, Baird PN, Cowell JK. Oncogenic point mutations in exon 20 of the RB1 gene in families showing incomplete penetrance and mild expression of the retinoblastoma phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 6177-81
44. Lee WH, Shew JY, Hong FD, Sery TW, Donoso LA, Young LJ, Bookstein R, Lee EY-HP. The retinoblastoma susceptibility gene encodes a nuclear phosphoprotein associated with DNA binding activity. *Nature* 1987 ; 329 : 642-5
45. Cordon-Cardo C, Richon VM. Expression of the retinoblastoma protein is regulated in normal human tissues. *Am J Pathol* 1994 ; 144 : 500-10
46. Lee WH, Chen PL, Riley DJ. Regulatory networks of the retinoblastoma protein. *Ann N Y Acad Sci* 1994 ; 752 : 432-45
47. Riley DJ, Lee EYHP, Lee WH. The retinoblastoma protein : more than a tumor suppressor. *Annu Rev Cell Biol* 1994 ; 10 : 1-29
48. Hensey CE, Hong F, Durfee T, Qian YW, Lee EY-HP, Lee WH. Identification of discrete structural domains in the retinoblastoma protein : amino-terminal domain is required for its oligomerization. *J Biol Chem* 1994 ; 269 : 1380-7

49. Lee WH, Hollingsworth RE, Qian YW, Chen PL, Hong F, Lee EYHP. RB protein as a cellular 'corral' for growth-promoting proteins. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1991 ; 56 : 211-7
50. Wang J, Chenivesse X, Henglein B, Brechot C. Hepatitis B virus integration in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma. *Nature* 1990 ; 343 : 555-7
51. Ludlow JW, Shon J, Pipas JM, Livingston D, De Caprio JA. The retinoblastoma susceptibility gene product undergoes cell cycle-dependent dephosphorylation and binding to and release from SV40 large T. *Cell* 1990 ; 60 : 387-96
52. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995 ; 81 : 323-30
53. Goodrich DW, Wang NP, Qian YW, Lee EY-HP, Lee WH. The retinoblastoma gene product regulates progression through the G1 phase of the cell cycle. *Cell* 1991 ; 67 : 293-302
54. Cryns VL, Thor A, Xu HJ, Hu JX, Wierman ME, Vickery AL Jr, Benedict WF, Arnold A. Loss of the retinoblastoma tumor suppressor gene in parathyroid carcinoma. *N Engl J Med* 1994 ; 330 : 757-61
55. Nevins JR. E2F : a link between the RB tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* 1992 ; 258 : 424-9

56. Welch PJ, Wang JYJ. A C-terminal protein-binding domain in the retinoblastoma protein regulates nuclear c-Abl tyrosine kinase in the cell cycle. *Cell* 1993 ; 75 : 779-90
57. Weinberg RA. Tumor suppressor genes. *Science* 1991 ; 254 : 1138-46
58. Marshall CJ. Tumor suppressor genes. *Cell* 1991 ; 64 : 313-26
59. Horowitz JM. Regulation of transcription by the retinoblastoma protein. *Genes Chromo Cancer* 1993 ; 6 : 124-31
60. Edwards MJ, Thomas RC, Mower C, Marks R. Retinoblastoma gene product and β tubulin complexes within human mitotic keratinocytes and fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1994 ; 102 : 565
61. Hunter T. A thousand and one protein kinases. *Cell* 1987 ; 50 : 823-9
62. Buchkovich K, Duffy LA, Harlow E. The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell* 1989 ; 58 : 1097-1105
63. Chen PL, Scully P, Shew JY, Wang JY, Lee WH. Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell* 1989 ; 58 : 1193-8

64. De Caprio JA, Ludlow JW, Lynch D, Furukawa Y, Griffin J, Piwnica WH, Worms H, Huang Cm, Livingston DM . The product of the retinoblastoma susceptibility gene has properties of a cell cycle regulatory element. *Cell* 1989 ; 58 : 1085-95
65. Lee WH, Bookstein Re, Lee EY-HP. Molecular biology of the human retinoblastoma gene. *Tumor Suppressor Genes Marcel Dekker. New-York, Basel*, 1990 : 169-200
66. Kato J, Matsushime H, Hiebert SW, Ewen ME, Sherr CJ. Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRB) and pRB phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes Dev* 1993 ; 7 : 331-42
67. Ewen ME, Sluss HK, Sherr CJ, Matsuschime H, Kato J, Livingston DM. Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell* 1993 ; 73 : 487-97
68. De Caprio JA, Furukawa Y, Ajchenbaum F, Griffin JD, Livingston DM. The retinoblastoma-susceptibility gene product becomes phosphorylated in multiple stages during cell cycle entry and progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 1795-8

69. Furakawa Y, De Caprio JA, Freedman A, Kanakura Y, Nakamura M, Ernst TJ, Livingston DM, Griffin JD. Expression and state of phosphorylation of the retinoblastoma susceptibility gene product in cycling and non-cycling human hematopoietic cells. *Proc Natl Acad sci USA* 1990 ; 87 : 2770-4
70. Sellers WR, Kaelin WG. Role of the retinoblastoma protein in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol* 1997 ; 15: 3301-12
71. Hinds PW, Mittnacht S, Dulic V, Arnold A, Reed SI, Weinberg RA. Regulation of retinoblastoma functions by ectopic expression of human cyclins. *Cell* 1992 ; 70 : 993-1006
72. Dowdy SF, Hinds PW, Louie K, Reeds SI, Arnold A, Weinberg RA. Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. *Cell* 1993 ; 73 : 499-511
73. Ludlow JW, Glendening CL, Livingston DM, De Caprio JA. Specific enzymatic dephosphorylation of the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol* 1993 ; 13 : 367-72
74. Durfee T, Becherer K, Chen PL, Yeh SH, Yang Y , Kilburn AE, Lee WH, Elledge SJ. The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev* 1993 ; 7 : 55-69
75. Chellappan SP, Hiebert S, Mudryj M, Horowitz JM, Nevins JR. The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell* 1991 ; 65 : 1053-61

76. Saenz-Santamaria MC, Mc Nutt NS, Shea CR. Immunohistochemical expression of retinoblastoma protein in cutaneous melanomas. *Br J Dermatol* 1995 ; 133 : 890-5
77. Pedley J, Ablett EM, Pettit A, Meyer J, Dunn IS, Sturm RA, Parsons PG. Inhibition of retinoblastoma protein translation by UVB in human melanocytic cells and reduced cell cycle arrest following repeated irradiation. *Oncogene* 1996 ; 13 : 1335-42
78. Sidle A, Palaty C, Dirks P, Wiggan O, Kiess M, Gill MR, Wong AK, Hamel PA. Activity of the retinoblastoma family proteins, pRB, p107, and p130, during cellular proliferation and differentiation. *Critical Reviews in Biochem Mole Biol* 1996 ; 31 : 237-71
79. Grana X, Garriga J, Mayol X. Role of the retinoblastoma protein family, pRB, p107, and p130 in the negative control of cell growth. *Oncogene* 1998 ; 17 : 3365-83
80. Massaro-Giordano M, Baldi G, De Lucas A, Baldi A, Giordano A. Differential expression of the retinoblastoma gene family members in choroidal melanoma : prognostic significance. *Clin Cancer Res* 1999 ; 5 : 1455-8
81. Claudio PP, Howard CM, Baldi A, De Luca A, Fu Y, Condorelli G, Sun Y, Colburn N, Calabretta B, Giordano A. p130/pRB2 has growth suppressive properties similar to yet distinctive from those of retinoblastoma family members pRB and p107. *Cancer Res* 1994 ; 54 : 5556-60

82. Claudio PP, De Lucas A, Howard CM, Baldi A, Firpo EJ, Koff A, Paggi MG, Giordano A. Functional analysis of pRB2/p130 interaction with cyclins. *Cancer Res* 1996 ; 56 : 2003-8
83. Paggi MG, Baldi A, Bonetto F, Giordano A. Retinoblastoma protein family in cell cycle and cancer : a review. *J Cell Biochem* 1996 ; 62 : 418-30
84. Harris H, Klein G. Malignancy of somatic cell hybrids. *Nature* 1969 ; 224 : 1314-6
85. Benedict WF, Murphree AL, Banerjee A, Spina DA, Sparkes MC, Sparkes RS. Evidence from of retinoblastoma that the retinoblastoma gene is a recessive cancer gene. *Science* 1983 ; 219 : 973-5
86. Comings DE. A general theory of carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973 ; 70 : 3324-8
87. Godbout R, Dryja TP, Squire J, Gallié BL, Phillips RA. Somatic inactivation of genes on chromosome 13 is a common event in retinoblastoma. *Nature* 1983 ; 304 : 451-3
88. Sparkes RS, Murphree AL, Lingua RW, Sparkes MC, Field LL, Funderburk S, Benedict WF. Gene for hereditary retinoblastoma assigned to human chromosome 13 by linkage to esterase D. *Science* 1983 ; 219 : 971-3

89. Knudson AG Jr. Mutation and cancer : statistical study of cancer.
Proc Natl Acad Sci USA 1971 ; 68 : 820-3
90. Knudson AG Jr, Hethcote HW, Brown BW. Mutation and childhood cancer : a probabilistic model for the incidence of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975 ; 72 : 5116-20
91. Huang HJS, Yee JY, Shew JY, Chen PL, Bookstein R, Friedmann T, Lee EY-HP, Lee WH. Suppression of the neoplastic phenotype by replacement of the RB gene in human cancer cells. *Science* 1988 ; 242 : 1563-6
92. Casey G, Lo-Hsueh M, Lopez ME, Vogelstein B, Stanbridge EJ. Growth suppression of human breast cancer cells by the introduction of a wild-type p53 gene. *Oncogene* 1991 ; 6 : 1791-7
93. Goodrich DW, Chen Y , Scully P, Lee WH. Expression of the retinoblastoma gene product in bladder carcinoma cells associates with a low frequency of tumor formation. *Cancer Res* 1992 ; 52 : 1968-73
94. Kratzke RA, Otterson GA, Hogg A, Coxon AB, Geradts J, Cowell JK, Kaye FJ. Partial inactivation of the RB product in a family with incomplete penetrance of familial retinoblastoma and benign retinal tumors. *Oncogene* 1994 ; 9 : 1321-6

95. Madreperla S, Whittum-Hudson JA, Prendergast RA, Chen P, Lee W. Intraocular tumor suppression of retinoblastoma gene-reconstituted retinoblastoma cells. *Cancer Res* 1991 ; 51 : 6381-4
96. Lefebvre D, Gala JL, Heusterspreute M, Delhez H, Philippe M. Introduction of a normal retinoblastoma (RB) gene into RB-deficient lymphoblastoid cells delays tumorigenicity in immunodefective mice. *Leukemia Research* 1998 ; 22 : 905-12
97. Friends SH, Dryja TP, Weinberg RA. Oncogenes and tumor-suppressing genes. *N Engl J Med* 1988 ; 10 : 618-22
98. Flores JF, Walker GJ, Glendening JM, Haluska FG, Castresana JS, Rubio MP, Pastorfide GC, Boyer LA, Kao WH, BulikML, Barnhill RI, Hayward NK, Housman DE, Fountain JM. Loss of the p16^{INK4a} and p15^{INK4b} gene, as well as neighbouring 9p21 markers, in sporadic melanoma. *Cancer Res* 1996 ; 56 : 5023-32
99. Moealandsmo GM, Florenes VA, Hovig E, Oyjord T, Engebraaten O, Holm R, Borrensen AL, Fodstad O. Involvement of the pRB/p16/cdk4/cyclin D1 pathway in the tumorigenesis of sporadic malignant melanomas. *Br J Cancer* 1996 ; 73 : 909-16
100. Bartkova J, Lukas J, Strauss M, Bartek J. Cyclin D1 oncoprotein aberrantly accumulates in malignancies of diverse histogenesis. *Oncogene* 1995 ; 10 : 775-8

101. Liu Q, Neuhausen S, McClure M, Frye C, Weaver-Feldhaus J, Gruis NA, Eddington K, Allalunis-Tuurnst MJ, Skolnick MH, Fujimura FK, Kamb A. CDKN2 tumor suppressor gene mutations in human tumor cell lines. *Oncogene* 1995 ; 10 : 1061-7
102. Rizos H, Darmanian AP, Indsto JO, Shannon JA, Kefford RF, Mann GJ. Multiple abnormalities of the p16^{INK4a}-pRB regulatory pathway in cultured melanoma cells. *Melanoma Research* 1999 ; 9 : 10-9
103. Lueder GT, Judisch GF, O'Gorman TW. Second nonocular tumors in survivors of heritable retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 1986 ; 104 : 372-3
104. Roarty JD, McLean IW, Zimmerman LE. Incidence of second neoplasms in patients with bilateral retinoblastoma. *Ophthalmology* 1988 ; 95 : 1583-7
105. Abramson DH, Ellsworth RM, Kitchin FD, Tung G. Second monocular tumors in retinoblastoma survivors : are they radiation-induced ? *Ophthalmology* 1984 ; 91 : 1351-5
106. Tebbet RD, Vickery RD. Osteogenic sarcoma following irradiation for retinoblastomas. *Am J Ophthalmol* 1952 ; 35 : 811-8
107. Raivio I, Tarkkanen A. Sarcoma following radiation for retinoblastoma. *Acta Ophthalmol* 1965 ; 43 : 428-9

108. Shah IC, Arlen M, Miller T. Osteogenic sarcoma developing after radiotherapy for retinoblastoma. *Am Surg* 1974 ; 40 : 485-90
109. Abramson DH, Ellsworth RB, Kitchin FD. Osteogenic sarcoma of the humerus after cobalt treatment for retinoblastoma. *Am J Ophthalmol* 1980 ; 90 : 374-6
110. Dryja TP, Rappaport JM, Epstein J, Goorin AM, Weichselbaum R, Koufos A, Cavenee WK. Chromosome 13 homozygosity in osteosarcoma without retinoblastoma. *Am J Hum Genet* 1986 ; 38 : 59-66
111. Cance WG, Brennan MF, Dudas ME, Huang CM, Cordon-Cardo C. Altered expression of the retinoblastoma gene product in human sarcomas. *New Engl J Med* 1990 ; 3232 : 1457-62
112. Ookawa K, Shiseki M, Takahashi R, Yoshida Y, Terada M, Yokota J. Reconstitution of the RB gene suppresses the growth of small-cell lung carcinoma cells carrying multiple genetic alterations. *Oncogene* 1993 ; 8 : 2175-81
113. Bookstein R, Shew JY, Chen PL, Scully P, Lee WH. Suppression of tumorigenicity of human prostate carcinoma cells by replacing a mutated RB gene. *Science* 1990 ; 247 : 712-5
114. Takahashi R, Hahimoto T, Xu H, Hu S, Miki T, Matsui T, Bigo-Marshall H, Aaronson SA, Benedict WF. The retinoblastoma gene functions as a growth and tumor suppressor in human bladder carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 5257-61

115. Cordon-Cardo C, Wartinger D, Petrylak D, Dalbagni G, Reuter FW, Reuter VE. Altered expression of the retinoblastoma gene product : prognostic indicator in bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1992 ; 84 : 1251-6
116. Logothetis CJ, Xu HJ, Ro JY, Hu SX, Sahin A, Ordonez N, Benedict WF. Altered expression of retinoblastoma protein and known prognostic variables in locally advanced bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1992 ; 84 : 1256-61
117. Jensen RD, Miller RW. Retinoblastoma : epidemiologic characteristics. *N Engl J Med* 1971 ; 285 : 307-11
118. Abramson DH, Ellsworth RM, Zimmerman LE. Nonocular cancer in retinoblastoma survivors. *Ophthalmology* 1976 ; 81 : 454-7
119. Abramson DH, Ronner HJ, Ellsworth RM. Second tumors in non-irradiated bilateral retinoblastoma. *Am J Ophthalmol* 1979 ; 87 : 624-7
120. Draper GJ, Sanders BM, Kingston JE. Second primary neoplasm in patients with retinoblastoma. *Br J Cancer* 1986 ; 53 : 661-71

121. Meadow AT, Baum E, Fossati-Bellani F, Green D, Jenkin RDT, Marsden B, Nesbit M, Newton W, Oberlin O, Sallan SG, Siegel S, Strong LC, Voute PA. Second malignant neoplasms in children : an update from the late effects study group. *J Clin Oncol* 1985 ; 3 : 532-7
122. Traboulsi EI, Zimmerman LE, Manz HJ. Cutaneous malignant melanoma in survivors of heritable retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 1988 ; 106 : 1059-61
123. Ngo RS, Ronan SG, Manaligod JR. Cutaneous malignant melanoma and bilateral retinoblastomas: a case report and review of the literature. *Pediatr Pathol* 1986 ; 6 : 227-32
124. Der Kinderen DJ, Koten JW, Den Otter W, Tan F, Kew P, Beemer FA. Retinoblastoma, melanoma, and pancreatic cancer. *Lancet* 1986 ; 2 : 1335-6
125. Tefft EI, Vawter GF, Mitus A. Second primary neoplasms in children. *AJR* 1968 ; 103 : 800-22
126. Casson AG, Maroun FB, Arnold AM, Newman CE. Retinoblastoma, eosinophilic granuloma, and malignant melanoma : a case report. *Med Pediatr Onco* 1984 ; 12 : 347-8
127. Tucker MA, Strong LC, Li FP. Retinoblastoma (RB) and the dysplastic nevus syndrome (DNS): association with a second primary cancers (SC), including cutaneous malignant melanoma (CMM) [abstract]. *Am soc Clin Oncol Abs* 1981 ; 22 : 405

128. Der Kinderer DJ, Koten JW, Nagelkerke NJD, Tan KEWP, Beemer FA, Den Otter W. Non-ocular cancer in patients with hereditary retinoblastoma and their relatives. *Int J Cancer* 1988 ; 41 : 499
129. Kornblau SM, Xu HJ, Giglio A, Hu SX, Zhang W, Calvert L, Beran M, Estey E, Andreeff M, Trujillo J, Cork MA, Smith TL, Benedict WF, Deisseroth AB. Clinical implications of altered retinoblastoma protein expression in acute myelogenous leukemia. *Cancer Res* 1992 ; 52 : 4587-90
130. Kornblau SM, Chen N, Giglio A, O'Brien S, Deisseroth AB. Retinoblastoma protein expression is frequently altered in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res* 1994 ; 54 : 1
131. Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989 ; 243 : 934-7
132. Zur Hansen H. Viruses in human cancer. *Science* 1991 ; 254 : 1167-73
133. Jiang W, Kahan S, Tomita N, Zhang Y, Lu S, Weinstein B. Amplification and expression of the human cyclin D gene in esophageal cancer. *Cancer Res* 1992 ; 52 : 2980-3
134. Lammie G, Fanti V, Smith R, Schuurin E, Brookes S, Michalides R, Dickson C, Arnold A, Peters G. D11S287, a putative oncogene on chromosome 11q13, is amplified and expressed in squamous cell and mammary carcinomas linked to BCL-1. *Oncogene* 1991 ; 6 : 439-44

135. Motokura T, Bloom T, Kim G, Jüppner H, Ruderman JV, Kronenberg HM, Arnold A. A novel cyclin encoded by a BCL-1-linked candidate oncogene. *Nature* 1991 ; 350 : 512-8
136. Lennox EI, Draper GJ, Sanders BM. Retinoblastoma : a study of natural history and prognosis. *Br Med J* 1975 ; 3 : 731-4
137. Sagerman RH, Cassady JR, Tretter P, Ellsworth RM. Radiation induced neoplasm following external beam therapy for children with retinoblastoma. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 1969 ; 105 : 529-35
138. Der Kinderen DJ, Koten JW, Wolterbeek R. Nonocular cancer in hereditary retinoblastoma survivors and relatives. *Ophthalmic paediatr Genet* 1987 ; 8 : 23-5
139. Hussusian CJ, Struewing JP, Golgstein AM, Higgins PAT, Ally DS, Sheahan MD, Clark W Jr, Tucker MA, Dracopoli NC. Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nature Genet* 1994 ; 8 : 15-21
140. Kamb A, Shattuck-Eidens D, Eeles R, Liu Q, Gruis NA, Ding W, Hussey C, Tran T, Miki Y, Weaver-Feldhaus J, McClure M, Aitken JF, Anderson DE, Bergman W, Frant SR, Goldgar DE, Green A, MacLennan R, Marmin NG, Meyer LJ, Youl P, Zone JJ, Skolnick MH, Cannon-Albright LA. Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. *Nature Genet* 1994 ; 8 : 15-21

141. Lee SA, Sober AJ, Rhodes AR. Cutaneous melanoma and bilateral retinoblastoma. *J Am Acad Dermatol* 1990 ; 23 : 1001-4
142. Lewis DC, Warren N, Shukla VK, Grimshaw D, Laidler P, Padua RA. Gross rearrangements and deletions of the retinoblastoma gene are rare in malignant melanoma. *Acta Derm Venereol* 1993 ; 73 : 236
143. Jacubovich R, Cabrillat D, Gerlier M, Bailly M, Doré JF. Tumorigenic phenotypes of human melanoma cell lines in nude mice determined by an active antitumour mechanism. *Br J Cancer* 1985 ; 51 : 335-45
144. Bailly M, Bertrand S, Doré JF. Human tumor spontaneous metastasis in immunosuppressed newborn rats.. I. Characterization of the bioassay. *Int J Cancer* 1991 ; 49 : 457-66
145. Bailly M, Bertrand S, Doré JF. Increased spontaneous mutation rates and prevalence of karyotype abnormalities in highly metastatic human melanoma cell lines. *Melanoma Res* 1993 ; 3 : 51-61
146. Boukerche H, Benchaibi M, Berthier-Vergnes O, Lizard G, Bailly M, Mc Gregor JL. Two human melanoma cell-line variants with enhanced *in vivo* tumor growth and metastatic capacity do not express the β_3 integrin subunit. *Eur J Biochem* 1994 ; 220 : 485-91

147. Jacubovich R, Doré JF. Tumour-associated antigens in culture medium of malignant melanoma cell strains. *Cancer Immunol Immunother* 1979 ; 7 : 59-64
148. Drexler HG, Galdicke G, Minowada J. T-leukemia cell line CCRF-CEM, HPB-ALL, JM and MOLT-4 : changes in isoenzyme profiles during induction of differentiation. *Blut* 1987 ; 54 : 79-87
149. De Caprio JA, Ludlow JW, Figge J, Shew JY, Huang CM, Lee WH, Marsilio E, Paucha E, Livingston DM. SV 40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* 1988 ; 54 : 275-83
150. Haapajarvi T, Kivinen L, Pitkanen K, Laiho M. Cell cycle dependent effects of UV-radiation on p53 expression and retinoblastoma protein phosphorylation. *Oncogene* 1995 ; 11 : 151-9
151. Valente P, Melchiori A, Paggi MG, Masiello L, Ribatti D, Santi L, Takahashi R, Albini A, Noonan DM. RB1 oncosuppressor gene over-expression inhibits tumor progression and induces melanogenesis in metastatic melanoma cells. *Oncogene* 1996 ; 13 : 1169-78
152. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987 ; 162 : 156-9

153. Antelman D, Macheimer T, Huyghe BG, Shepard HM, Maneval D, Johnson DE. Inhibition of tumor cell proliferation in vitro and in vivo by exogenous p110^{RB}, the retinoblastoma tumor suppressor protein. *Oncogene* 1995 ; 10 : 697-704
154. Khan SM, Collins RJ, Dunn IS. A melanoma cell line sensitive to expression of a fusion protein binding the retinoblastoma protein family pocket domain. *Exp Cell Res* 1996 ; 223 : 171-182
155. Kornblau SM, Xu HJ, Zhang W, Hu SX, Beran M, Smith TL, Hester J, Estey E, Benedict WF, Deisseroth AB. Levels of retinoblastoma protein expression in newly diagnosed acute myelogenous leukemia. *Blood* 1994 ; 84 : 256-61
156. Piepkorn M. Melanoma genetics :an update with focus on the CDKN2A (p16) / ARF tumor suppressors. *J Am acad Dermatol* 2000 ; 42 : 705-22
157. Pavey S, Conroy S, Russell T, Gabrielli B. Ultraviolet radiation induces p16CDKN2A expression in human skin. *Cancer Res* 1999 ; 59 (17) : 4185-9

ANNEXES

ANNEXE 1

Préparation du sérum de veau (SVF) décomplémenté

- Décongélation d'un flacon de 500ml de SVF non décomplémenté au bain-marie à 37°C
- Placer le SVF décongelé 30 min à 56°C dans un bain-marie pour obtenir du SVF décomplémenté, qui sera alicoté dans 10 falcons de 50 ml
- Conservation à - 20°C

ANNEXE 2

Préparation du milieu MacCoy 5A complet

- Décongélation d'un falcon de 50 ml de SVF décomplémenté au bain-marie à 37°C
- Mettre à température ambiante le milieu **Mc Coy 5A avec L-Glutamate sans gentamycine**
(Gibco-BRL)
- Ajouter au milieu Mc Coy 5A medium les 50 ml de SVF décomplémenté
- Ajouter 250 µl de gentamycine (10mg / ml)
- Conservation à + 4°C

ANNEXE 3

Préparation du PBS

- Mélanger pour 1 litre :
 - 8 g de NaCl
 - 0,2 g de KCl
 - 1,15 g de sodium phosphate anhydre (Na_2HPO_4)
 - 0,2 g de $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$
 - 1 litre d'eau distillée
- Ajuster à pH 7,4
- Autoclaver
- Conservation à + 4°C

ANNEXE 4

Préparation du milieu de congélation des mélanocytes tumoraux humains

- Ajouter à 70 ml de milieu Mc Coy 5A medium, 20 ml de SVF décomplémenté décongelé au bain-marie à 37°C.
- Ajouter une ampoule de 10 ml de diméthyl sulfoxide (DMSO)
- Agiter soigneusement le flacon
- Alicoter le contenu du flacon dans 2 falcons de 50 ml
- Conservation à - 20°C

ANNEXE 5

Préparation du minigel d'agarose à 0,8% pour minicuve

- Dissoudre 0,16 g d'agarose dans 20 ml de TAE 0,5 X
- Marquer d'un trait la limite du tampon
- Mettre au four à micro-ondes
- Vérifier que l'agarose soit bien dissout
- Ajouter de l'eau distillée jusqu'au repère suite à l'évaporation
- Ajouter 1 µl de Bromure d'éthydiu(m) (BET) et mélanger
- Couler le gel dans le petit moule après avoir installé les peignes et vérifier que la température du gel soit inférieure à 70°C
- Laisser prendre le gel 20 minutes

Préparation du tampon TAE (tris-acide acétique glacial EDTA)0,5X = tampon

d'électrophorèse

- Mélanger :
 - 5 ml de TAE (conservation à + 4°C)
 - 500 ml d'eau distillée
- Boucher à la paraffine
- Conservation à température ambiante

ANNEXE 6

Electrophorèse sur gel d'agarose à 1 %

- Retirer les peignes délicatement
- Mettre le gel dans la cuve à électrophorèse
- Ajouter du tampon d'électrophorèse jusqu'à ce que le niveau soit au dessus du gel
- Faire le dépôt des échantillons : 6 μ l dans chaque puit
 - mettre 4 μ l d'eau distillée + 1 μ l d'extrait dans un eppendorf
 - ajouter 1 μ l de bleu de charge
 - homogénéiser
- Mettre le couvercle en faisant correspondre l'encoche avec les électrodes
- Vérifier le sens de migration (- vers +)
- Choisir le voltage 50 V ou 100V
- Faire migrer 15 min à 100 V ou 45 min à 50 V

ANNEXE 7

Révélation des produits PCR sur gel d'agarose à 1%

- Préparation d'un grand gel d'agarose à 1% (cf annexe 5-6)
 - 0,3 g d'agarose
 - 30 ml de tampon TAE 0,5X
- Préparation des marqueurs de poids moléculaire 100pb (conservation à - 20°C) Promega
 - 5 µl de marqueur
 - 1 µl de bleu de chargecentrifuger quelques secondes
et déposer 6 µl de marqueur dans le premier puit
- Préparation des échantillons
 - 10 µl de produits PCR
 - 2 µl de bleu de chargecentrifuger quelques secondes
et déposer 12µl d'échantillon dans chaque puit
- Migration à 50 V pendant 50 minutes

ANNEXE 8

Préparation des solutions mères pour tampon de lyse

- **Tris HCl 25 mM pH 8** : 100 ml d'eau distillée
0,394 g de Tris HCl
homogénéiser à l'aimant et ajuster le pH avec pHmètre en ajoutant de la soude ou HCl
- **Sodium fluoride (NaF)** : 1,67 g de NaF
100 ml d'eau distillée
homogénéiser à l'aimant
- **Sodium orthovanadate (Na₃VO₄)** : 1,8 g de Na₃VO₄
100 ml d'eau distillée
homogénéiser à l'aimant
- **Phénylméthylsulfonyl fluoride (PMSF)** : 0,348 g de PMSF
10 ml d'alcool absolue
homogénéiser au vortex 1 min et mettre dans un tube à essai en verre avec bouchon

Préparation du tampon de lyse

- Préparer la solution n°1 : **Tris HCl 25 mM pH 8 : 100 ml**
NaCl 120 mM : 0,7 g
Nonidet P-40 0,5 % : 0,5 ml
NaF 4 mM : 1 ml de NaF 400 mM
Na₃VO₄ 100 µM : 0,1 ml de 100 mM Na₃VO₄
PMSF 1 mM : 0,5 ml de 200 mM de PMSF
- Prendre 1 ml de la solution n°1
- Ajouter pour obtenir la solution n°2 : **aprotinine 100 KIU / ml** (si 10 TIU / ml) : **7,7 µl**
leupeptine 10 µg / ml : 10 µl

ANNEXE 9

Composition du tampon bleu avec DTT

- Tris HCl 1 M pH 6,8 : **3,5 ml**
- Dithiotréitol 0,1 M : **0,7715 g**
- SDS 10 % : **1 g**
- Glycérol 10 % : **5 ml**
- Bleu bromophénol : **0,01 g**
- Eau distillée : **50 ml**

ANNEXE 10

technique de Folin

Préparation de la solution tampon de sodium carbonate anhydre Na_2CO_3 :

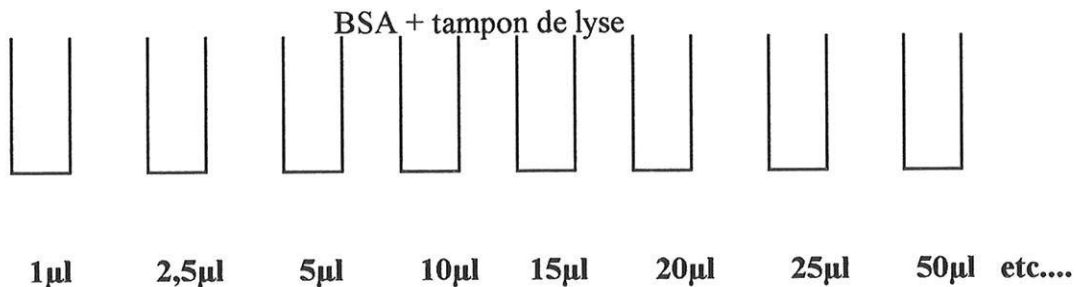
- 2g de Na_2CO_3
- 1ml de NaOH 10N
- 99ml d'eau stérile
- Ajouter au dernier moment : - 0,5ml de CuSO_4 (en solution 1g de CuSO_4 dans 100ml d'eau stérile)

- 0,5ml de tartrate NaP 1% (en solution 1g de NaP dans 100ml d'eau stérile)

Préparation de BSA avec le tampon de lyse (annexe 8):

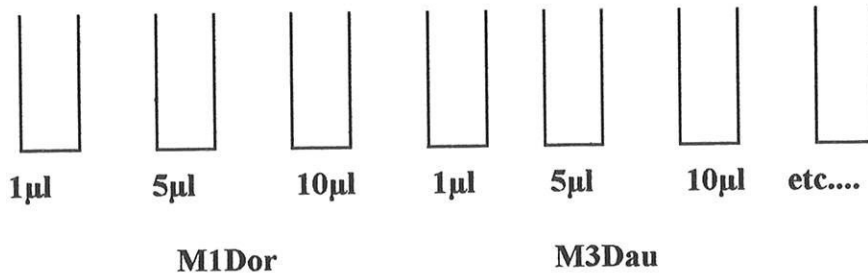
- 180 μl de tampon de lyse
- 20 μl de BSA

Préparation de la gamme étalon :



+ 2 tubes 0

extrait de chaque lignée



- Ajouter 2,5ml de la solution tampon dans tous les tubes y compris les tubes 0
- Ajouter 99µl de tampon dans le tube 1µl, 95µl dans le tube 5µl, etc....

Préparation du Folin :

- Dilution au ½ avec de l'eau distillée du réactif de Folin ciocalten phénolreagent (exemple :
2,5ml d'eau et 2,5ml de Folin pour 20 tubes)
- Ajouter dans tous les tubes 250µl de Folin et vortexer
- Incubation 30min à température ambiante
- Lecture de la densité optique à 692 nm
- Faire la moyenne des 3 concentrations obtenues

ANNEXE 11

Préparation du gel de migration

- Préparer: *Tris HCl 1 M pH 8,8* : **12,8 ml**
 - eau distillée* : **19,8 ml**
 - SDS 10 %* : **0,67 ml**
 - acrylamide 45 %* : **6,9 ml**
 - Temed* : **16 µl**
- Ajouter au dernier moment *l'ammonium persulfate 10 %* : **173 µl**
(conservation 2-3 semaines)
- Couler le gel avec pipette de 10 ml jusqu'un peu au dessus du repère
- Verser le n. Butanol avec pipette pasteur sur 5 à 7 mm
- Temps de polymérisation 1h à 1h30 (prêt quand on aperçoit le double niveau)

ANNEXE 12

Préparation du gel de concentration ou stacking gel

- Préparer: *Tris HCl 1 M pH 6,8* : **2,5 ml**
 - eau distillée* : **14,7 ml**
 - SDS 10 %* : **0,2 ml**
 - acrylamide 45 %* : **1,4 ml**
 - Temed* : **10µl**
 - ammonium persulfate 10 %* : **400 µl** (au dernier moment)
- Enlever le butanol
- Rincer à l'eau distillée 6 à 7 fois
- Séchage de l'intérieur avec du whatman sans toucher le gel
- Mettre les peignes
- Couler le gel avec une pipette pasteur jusqu'à débordement
- Laisser polymériser 2 heures.

ANNEXE 13

Préparation du tampon de transfert

- Préparer : *Tris HCl* : **6,05 g**
Glycine : **28,8 g**
méthanol : **400 ml**
eau distillée : **1600 ml** QSP 2 litres
- Le matin et conservation à 4°C
- Dissolution rapide 5 à 10 min

ANNEXE 14

Préparation du tampon de blocage

- Préparer : *BSA* 3 % : 7,5 g

Tris HCl 10 mM : 0,302 g

NaCl 0,5 M : 2,20 g

eau distillée : 250 ml

- Ajuster à pH 7,4
- Dissolution mauvaise

ANNEXE 15

Préparation du tampon d'incubation

- Préparer : *BSA* 3 % : **3 g**

Tris 10 mM : **0,121 g**

NaCl 0,5 M : **2,92 g**

Nonidet P-40 : **0,5 ml**

eau distillée : **100 ml**

- Ajuster au pH 7,4
- Mettre 3 ml de tampon d'incubation dans chaque puit
- Découper la nitrocellulose par bande

ANNEXE 16

Préparation du tampon de lavage

- Préparer : *BSA 0,5 %* : **0,5 g**

Tris 10 mM : **1,21 g**

NaCl 0,5 M : **29,2 g**

Nonidet P-40 : **5 ml**

eau distillée : **1 litre**

GLOSSAIRE

A

Allèle : version alternative d'un même gène différente par leur séquence nucléotidique.

Amorce (primer) : courte séquence de l'ADN ou de l'ARN complémentaire du début d'une matrice servant de point de départ à son recopiage par une polymérase.

Anti-oncogène : gène suppresseur de cancer s'exprimant à l'état normal de manière dominante. Ses mutations sont récessives, d'où l'appellation trompeuse parfois utilisée de « gène récessif de cancer ».

Anti-sens : séquence complémentaire et anti-parallèle à la séquence d'un ARN messager.

Apoptose : mort cellulaire programmée.

ATCC (american Type Culture Collection) : organisme américain à but non lucratif centralisant et distribuant des lignées cellulaires pathologiques ayant un intérêt en recherche biomédicale, ainsi que des sondes d'ADN (homme et souris).

C

CAAT (boîte) : séquence fréquemment retrouvée 70 à 80 pb en amont du site d'initiation de la transcription (région promotrice). Elle est reconnue par des protéines régulant la transcription.

Cadre de lecture : une des trois phrases possible de lecture de l'enchaînement des triplets sur un brin d'ADN. Lorsqu'il ne renferme pas de codon stop on dit qu'il est ouvert ; dans le cas contraire il est fermé.

Codon : triplets nucléotidiques d'ARNm représentant un acide aminé donné (codon signifiant) ou un signal de fin de traduction (codon non-sens). Sur les 64 combinaisons possibles entre A, U, C et G il y a 61 codons signifiants codant pour les 20 acides aminés précurseurs des protéines, et 3 codons non-sens. Plusieurs codons peuvent correspondre à un même acide aminé (dégénérescence du code génétique).

Complémentarité : règle universelle d'appariement des bases des acides nucléiques, selon laquelle A s'associe avec T (ou U) et G avec C.

D

Délétion : perte d'une ou plusieurs paires de bases consécutives sans rupture de continuité de la molécule d'ADN.

Dénaturation : passage de la forme double-brin d'un acide nucléique à sa forme simple-brin. Elle est obtenue le plus souvent par la chaleur ou la soude.

DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) : électrophorèse d'ADN double-brin dans un gradient d'agent dénaturant (chimique ou physique), permettant de discriminer des fragments de même taille différant par leur température de fusion (T_m).

ADNc : séquence d'ADN complémentaire d'un ARN messager obtenu par transcription inverse. Elle correspond à une version du gène débarrassé de ses introns.

DNase : classes d'enzymes digérant les séquences d'ADN.

Dominant : se dit d'un allèle ou d'une mutation qui, à l'état hétérozygote, conditionne le phénotype.

E

Endonucléases : Classes d'enzymes clivant la liaison phosphodiester entre deux nucléotides à l'intérieur d'un acide nucléique. Ces enzymes sont spécifiques d'un type d'acide nucléique : ARN, ADN simple-brin, ADN double-brin.

Enzymes de restriction : endonucléases bactériennes clivant spécifiquement les deux brins d'ADN au niveau d'une séquence, en général palindromique, parfaitement définie (de 4 à 8 nucléotides).

Exon : séquence de gène dont le transcript persiste dans l'ARN messager mûr après maturation du transcript primaire. Chaque exon représente une séquence codante et traduite continue, sauf aux extrémités qui ne sont pas traduites (en 5' : en amont de ATG initiateur de la traduction, en 3' : en aval du premier codon stop).

Extension d'amorces : élongation dans le sens 5' → 3' par une ADN polymérase d'une amorce d'ADN ou ARN permettant la copie d'un brin matrice.

F

Fusion : dénaturation d'une double hélice.

G

GDB (gene Data Base) : base interactive de données informatisées concernant la carte du génome humain. Basée à l'hôpital Johns Hopkins (Baltimore), elle gère en particulier les données validées par les comités spécialisés pour chaque chromosome.

GENATLAS : banque de données sur la carte des gènes humains (Paris).

GenBank : banque de données de séquences d'acides nucléiques basée à Cambridge (USA).

Gène : ensemble des séquences d'acides nucléiques contenant l'information pour la production régulée d'un ARN particulier (transcription) ou d'une chaîne polypeptidique particulière (transcription-traduction).

Génotype : constitution génétique d'un individu

H

Hétérozygotie : situation génotypique où deux locus homologues d'une même paire chromosomique portent chacun un allèle différent. Pour le chromosome X seules les femmes peuvent être hétérozygotes.

Homozygotie : présence du même allèle sur les deux chromosomes d'une même paire chromosomique. Par extension se dit du génotype des individus ayant hérité une double dose d'un allèle pathologique, que la version mutée soit la même ou qu'elle soit différente sur chaque chromosome (stricto sensu ce dernier cas est une hétérozygotie composite).

Hot-spot (point chaud) : site où la fréquence des recombinaisons ou des mutations est anormalement élevée.

Hybridation moléculaire : appariement par complémentarité des bases (G-C et A-T) de deux séquences nucléotidiques complémentaires. Le duplex formé peut être de type ADN /ADN, de type ADN / ARN ou de type ARN / ARN.

I

Intron : séquence d'ADN transcrite et secondairement éliminée par épissage au cours de la maturation des ARN.

K

Kilobase (kb) : pour l'ADN, 1000 paires de base ; pour l'ARN, 1000 bases

L

locus : emplacement d'un segment d'ADN sur un chromosome, défini par son contenu informationnel (gène), ou sa séquence qu'elle soit ou non polymorphe (segment anonyme).

Lod score : logarithme décimal du rapport de la vraisemblance de la liaison entre deux locus pour une distance génétique donnée et de la vraisemblance de la non-liaison.

LOH (loss of heterozygosity) : perte d'un allèle sur un chromosome au niveau d'un locus polymorphe.

M

Mutation : désigne n'importe quel changement intervenu dans la séquence de l'ADN. S'il ne concerne qu'une seule base on parle de mutation ponctuelle.

N

Non-sens ou stop (codon) : codons UAA (ocre), UAG (ambre), et UGA (opale) auquel ne correspond aucun ARNt normal. Ils agissent comme des signaux de terminaison de traduction.

Northern blot : terme consacré pour désigner l'analyse des ARN, principalement messagers, par électrophorèse suivie de transfert et d'hybridation sur filtre.

O

Ocre : mutation créant un codon non-sens UAA dans une séquence codante d'un gène.

L'interruption de traduction qui en résulte peut être levée par un ARNt suppresseur.

Oligosonde : sonde synthétique reproduisant une courte séquence d'ADN. Les plus utilisées comportent 20 à 50 nucléotides.

Oncogène : originellement, gène capable de conférer expérimentalement le phénotype cancéreux (transformation) à une cellule eucaryote, et une tumeur dans un organisme entier.

Oncoprotéine : protéine codée par un oncogène.

Opale : mutation créant un codon non-sens UGA dans une séquence codante d'un gène.

ORF (Open reading frame) : séquence à cadre de lecture ouvert.

P

Palindromique (séquence) : brins d'ADN dont la séquence complémentaire est identique lorsqu'elle est lue de gauche à droite sur un brin et de droite à gauche sur l'autre (dans les deux cas dans le sens 5' → 3'). Les séquences reconnues par les enzymes de restriction de classe II sont palindromiques.

PCR (Polymerase Chain Reaction) ou polymérisation en chaîne :

amplification élective d'une séquence d'ADN double-brin, effectué in vitro par extension itérative de deux amorces, situées de part et d'autre de la région considérée, grâce à une ADN polymérase. L'amplification est effectuée par la répétition de cycle de dénaturation / hybridation / extension qui assure une duplication exponentielle de chaque brin.

Pénétrance : pourcentage des sujets porteurs d'un gène dominant et exprimant la maladie. La pénétrance du rétinoblastome est de 80 %.

PFGE (pulse field Gel Electrophoresis) : électrophorèse en champ pulsé.

Phénotype : manifestation apparente de la constitution du génome sous la forme d'un trait morphologique, d'un syndrome clinique, d'une variation qualitative ou quantitative du produit final d'expression d'un gène (protéine).

Primer : cf amorces.

Promoteur : région d'ADN en amont des gènes comportant le site de fixation de l'ARN polymérase ainsi que les sites de fixation des protéines régulatrices de la transcription.

Proto-oncogène : cf oncogène

R

Réassociation (de l'ADN) : appariement des brins complémentaires d'un ADN préalablement dénaturé.

Récessif : se dit d'un allèle ou d'une mutation n'influençant pas le phénotype à l'état hétérozygote.

Renaturation : cf réassociation.

Réparation : processus de restauration de l'intégrité d'un brin d'ADN lésé, utilisant le brin intact comme modèle.

Réplication : processus de duplication à l'identique d'une molécule d'ADN en deux molécules filles.

Restriction : destruction enzymatique (par des endonucléases de restriction) de l'ADN des phages infectant une bactérie, s'objectivant par le fait que les bactéries infectées ne sont pas lysées.

Rétrotranscription : synthèse par la transcriptase inverse d'un ADN complémentaire (ADNc) à partir d'un ARN.

Rétrovirus : virus à ARN dont le cycle réplcatif comporte un passage obligé par un stade d'ADN double-brin intégré à l'ADN de la cellule hôte (forme provirale). La synthèse de l'ADN proviral est assuré par une transcriptase inverse codée par le virus lui-même, ou, s'il est défectif par un virus helper.

RFLP (Restriction fragment Length Polymorphism) : désigne les polymorphismes de restriction de l'ADN.

Ribonucléases (RNase) : enzymes clivant les ARN.

S

Site de restriction : séquence de l'ADN double-brin spécifiquement reconnue et clivée par une enzyme de restriction donnée.

Sonde : séquence d'acides nucléiques, d'au moins 15 nucléotides, homologues à une séquence de l'ADN ou de l'ARN, avec laquelle elle s'hybride de façon stable et spécifique par réassociation entre les bases complémentaires.

Souris nude : lignée de souris athymique immunotolérante.

Southern (méthode de) : méthode d'analyse de l'ADN imaginé par Southern en 1975 pour visualiser les gènes ou toutes séquences de l'ADN génomique, par hybridation d'une sonde, marquée et spécifique, avec des fragments de restriction de l'ADN, préalablement séparés par électrophorèse, dénaturés et transférés sur une membrane.

SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) : variation de conformation tri-dimensionnelle d'un brin de l'ADN induite par une variation de séquence nucléotidique. Cette propriété est mise à profit pour détecter les mutations ponctuelles.

Stop : cf non-sens.

Suppresseur de cancer : cf anti-oncogène

T

Taq polymerase : ADN polymérase thermorésistante extraite de la bactérie *Thermus aquaticus* et utilisée pour l'amplification élective de l'ADN in vitro (PCR) à température élevée (aux environ de 70 °C).

TATA box : séquence de 5 à 7 bases riche en AT retrouvée à environ 25 pb en amont du site d'initiation de la transcription de la plupart des gènes de classe II. Susceptible de fixer des protéines transrégulatrices. Semble impliquée dans le calage de l'ARN polymérase.

Température de fusion (T_m) : point d'inflexion de la courbe de fusion d'un segment de l'ADN, correspondant virtuellement à une dénaturation de la moitié de la séquence.

T_m (melting temperature) : température de fusion d'un ADN bicaténaire.

Transcriptase inverse : ADN polymérase ARN dépendante codée par un gène de rétrovirus (gène pol) assurant la rétrotranscription de l'ARN viral en ADN double-brin indispensable au cycle répliatif de ce type de virus. Cette enzyme est aussi indispensable au biologiste moléculaire pour la synthèse in vitro de ADNc.

Transcription : synthèse de l'ARN par une ARN polymérase à partir d'une matrice de l'ADN.

Transcrit : ARN produit par la transcription d'un gène sans préjuger de son degré de maturation.

Transfection : technique expérimentale consistant à faire pénétrer un fragment d'ADN dans une cellule eucaryote.

Transition : mutation ponctuelle entraînant la substitution d'une base purique par une autre base purique (A → G ou vice-versa), ou d'une base pyrimidique par une autre base pyrimidique (T → C ou vice-versa).

Translocation : cassure et déplacement d'un fragment de chromosome sur un autre chromosome.

Transversion : mutation ponctuelle entraînant la substitution d'une base purique par une base pyrimidique ou vice-versa.

W

Western blot ou immunotransfert : analyse des protéines par électrophorèse puis transfert sur membrane de nitrocellulose et révélation.

TABLE DES MATIERES

UNIVERSITE DE LIMOGES.....	1
REMERCIEMENTS.....	3
SOMMAIRE.....	16-19
INTRODUCTION.....	20-21
I. mélanome et génétique.....	22
1) Historique	22-23
2) Généralités.....	23-24
3) Mélanome et anomalies génétiques.....	24-26
II. Rétinoblastome.....	26
1) Généralités.....	26-27
2) Gène du rétinoblastome.....	28-32
3) Mutations du gène RB dans les rétinoblastomes.....	32-33
4) Protéine RB.....	34
a) Structure	34-36
b) Rôle.....	36-37
c) Mode de fonctionnement	37-40
5) Autres membres de la famille p107, p130.....	40-41
III. Gène RB et malignité.....	41
1) Gène onco-suppresseur.....	41-46
2) Gène RB et autres tumeurs malignes.....	46-47
3) Gène RB et mélanome.....	47-49
MATERIELS ET METHODES	50

I. Matériels.....	51
1) Lignées de mélanocytes tumoraux humains.....	51-55
2) Cellules MOLT-4.....	55
3) Amorce de l'ADN complémentaire du gène RB.....	55-57
4) Enzymes de restriction.....	57-58
5) Anticorps anti-pRB monoclonaux.....	58
a) Anticorps monoclonal G3-245.....	58-59
b) Anticorps monoclonal G99-2005.....	59
c) Anticorps de chèvre anti IgG1 de souris couplé à HRP.....	59
II. Méthodes.....	60
1) Cultures cellulaires.....	60
a) Milieu et conditions de culture.....	60
b) Trypsinisation.....	60
c) Congélation.....	61
d) Comptage des cellules.....	61
2) Méthodes générales de biologie moléculaire.....	61
a) Extraction de l'ARN total.....	61-63
b) Transcription inverse.....	63-64
c) Réaction de polymérisation en chaîne.....	65-66
d) Migration sur gel d'agarose à 1%.....	67
e) Vérification des produits PCR par digestion enzymatique.....	67
3) Immunotransfert ou western blot.....	68

a) Préparation des extraits.....	68
b) Quantification des protéines totales.....	68
c) Préparation des gels de migration et de concentration.....	69
e) Migration.....	69
f) Transfert.....	69
g) Blocage.....	70
h) Révélation.....	70
4) quantification de la protéine RB par mesure de la densité optique.....	71
RESULTATS.....	72
I. présence de l'ARNm du gène RB dans nos 3 lignées de mélanocytes tumoraux humains... 73-75	
II. Présence de la protéine RB dans les 3 lignées de mélanocytes tumoraux humains.	76-77
III. quantification de la protéine RB dans les 3 lignées.....	78-79
DISCUSSION.....	80-86
CONCLUSION.....	87-88
BIBLIOGRAPHIE.....	89-113
ANNEXES.....	114-131
GLOSSAIRE.....	132-150
TABLE DES MATIERES.....	151-154
SERMENT D'HIPPOCRATE.....	155-156

SERMENT D'HIPPOCRATE

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des maîtres de cette école, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je dispenserai mes soins sans distinction de race, de religion, d'idéologie ou de situation sociale.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser les crimes.

Je serai reconnaissant envers mes maîtres, et solidaire moralement de mes confrères. Conscient de mes responsabilités envers les patients, je continuerai à perfectionner mon savoir.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir de l'estime des hommes et de mes condisciples, si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

RESUME

L'incidence du mélanome augmentée (4-14 %) chez des patients atteints de rétinoblastome (RB) a conduit de nombreux auteurs à émettre l'hypothèse d'un rôle d'un gène onco-suppresseur (gène RB), dans la progression du mélanome. Nous avons étudié l'expression du gène RB dans 3 lignées de mélanocytes tumoraux humains. Nous avons cultivé les 3 lignées sur milieu « McCoy 5A » à 5% de CO₂. Nous avons extrait puis amplifié les ARN par RT-PCR. Nous avons révélé la présence de protéine RB par immunotransfert avec anticorps monoclonal anti-pRB humaine G3-245. La quantification protéique était réalisée par mesure de la densité optique. Nous avons mis en évidence l'expression d'un ARNm du gène RB et la présence de protéine RB dans 3 nouvelles lignées. Les taux d'expression de la protéine étaient identiques quelques soient les lignées et comparable à celui du témoin positif Molt-4. Nos 3 lignées expriment donc la protéine RB au niveau pré et post transcriptionnel de manière équivalente quelque soit leur caractère tumorigène. Une RT-PCR quantitative permettra d'affirmer avec certitude l'absence de différence significative entre le taux des 3 lignées et du témoin positif. Nous n'excluons pas la possibilité d'une protéine RB présente mais non fonctionnelle dans certaines lignées par mutations d'autres molécules ou gènes (CDKN2A/p16...).

MOTS CLES

- Protéine RB
- onco-suppresseur
- rétinoblastome
- mélanome

JURY

Président : Monsieur le Professeur Bonnetblanc
Juges : Monsieur le Professeur Bédane
Monsieur le Professeur Rigaud
Madame le Professeur Vidal
Membres invités : Madame le Docteur Loustaud-Ratti
Monsieur le Docteur Boulinguez