

CHAPITRE III

**BASES FONDAMENTALES DE LA
CARCINOGENÈSE UROTHÉLIALE**

D. CHOPIN - D. CAPPELLEN - F. FRADVANYI - B. GATTEGNO

PLAN

**I. LE CANCER COMME UNE
MALADIE GENETIQUE**

**II. GENETIQUE DES CARCINOMES
DE LA VESSIE**

**III. MODELE DE PROGRESSION
TUMORALE DANS LES CARCINOMES
DE VESSIE**

**IV. MECANISMES DES ALTERATIONS
GENETIQUES IMPLIQUEES DANS LA
CARCINOGENESE UROTHELIALE.
FACTEURS DE SUSCEPTIBILITE
GENETIQUE ET
ENVIRONNEMENTALE**

**V. SYNTHESE : LES DIFFERENTES
ETAPES DE LA CANCEROGENESE**

REFERENCES

CHAPITRE III

Bases fondamentales de la carcinogenèse urothéliale

D. CHOPIN D. CAPPELLEN - F. RADVANYI - B. GATTEGNO

I. LE CANCER COMME UNE MALADIE GENETIQUE

Le cancer est actuellement considéré comme une maladie génétique, qui entraîne une croissance cellulaire excessive et non contrôlée. Actuellement, à côté des altérations génétiques, comme les mutations, de nombreux arguments expérimentaux soulignent l'importance des modifications épigénétiques. Au cours de son évolution, ces altérations génétiques et épigénétiques sont impliquées dans la progression tumorale, le phénomène métastatique et la résistance aux thérapeutiques. Grâce au progrès de la biologie cellulaire (y compris l'immunologie) et de la génétique, il est possible d'identifier les anomalies moléculaires clés, impliquées dans ces phénomènes. C'est leur identification qui sera à la base de la pathologie moléculaire, des marqueurs diagnostiques, pronostiques et thérapeutiques.

Très schématiquement deux types de gènes interviennent dans la formation d'un cancer : les proto-oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur. En effet, il existe un équilibre dynamique entre un contrôle positif, exercé par les proto-oncogènes, et un contrôle négatif, dépendant des gènes suppresseurs de tumeur. Dans la cellule normale, ces deux types de gènes régulent la prolifération et la différenciation. La transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse est le résultat de la rupture de l'équilibre entre les deux types de gènes.

Parmi les altérations épigénétiques, nous envisageons les conséquences de la méthylation de l'ADN.

1. PROTO-ONCOGENES, ONCOGENES

Les proto-oncogènes, gènes normalement présents dans la cellule, jouent un rôle dans la croissance et la différenciation cellulaire et participent également à

la transduction du signal entre l'environnement cellulaire et le noyau par des mécanismes variés. Ces gènes codent ainsi pour des familles de protéines aussi diverses que les facteurs de croissance (gènes *sis*), leurs récepteurs (gènes *HER-1*, *HER-2*, *fms*, *kit*), les protéines liant le GTP (guanosine triphosphate) (gènes *ras*), ou encore les protéines nucléaires (gènes *jun*, *erb-A*, *myc*, *fos*). Ces différents proto-oncogènes sont des gènes dominants. Leur activation en oncogènes correspond à un gain de fonction ; ils sont alors dotés de propriétés transformantes. Cette activation peut être liée à un virus ou non. En effet, des virus à ARN (rétrovirus) contenant un oncogène *v-onc* provenant d'un proto-oncogène cellulaire *c-onc* peuvent induire la transformation de la cellule normale en cellule maligne. Le mécanisme prédominant d'activation des proto-oncogènes est dans la plupart des cas non viral : il peut s'agir ainsi d'amplifications géniques, de mutations ponctuelles, de délétions ou de translocations chromosomiques avec translocation d'un proto-oncogène à proximité d'une zone transcriptionnellement active, ou encore de modification du promoteur du gène [1]. L'oncogène acquiert généralement une hyperactivité, par le biais d'une protéine normale présente en grande quantité, ou d'une protéine de structure anormale, favorisant la croissance et la prolifération des cellules tumorales [2].

Ces modifications affectant le plus souvent des gènes situés dans les cellules somatiques, les mutations ne sont pas transmises à la descendance. Par ailleurs, il arrive souvent que plusieurs oncogènes soient impliqués, simultanément ou non, dans une même voie de carcinogenèse. Cette activation peut résulter d'une exposition à des agents carcinogènes : exemple mutations du gène *P53* induites par le tabac. Les conséquences de cette activation se voient surtout dans les premières étapes du processus de

carcinogénèse : initiation, promotion.

De nombreux proto-oncogènes de même que certains gènes suppresseurs de tumeur interviennent dans la régulation du cycle cellulaire. Le contrôle positif du cycle cellulaire est effectué par les kinases dépendant des cyclines (Cdk), enzymes intracellulaires spécifiques des différentes phases cellulaires (G1, S, G2 et M), constituées d'une kinase liée à une cycline (unité activatrice). Parallèlement, une famille de protéines inhibitrices des Cdk (par exemple, les p15, p16, p18, p19 et p21) régule négativement le cycle cellulaire. Certaines cyclines sont des proto-oncogènes ; c'est le cas de la cycline D1 participant à la régulation de la phase G1 du cycle cellulaire.

a) Le récepteur 3 des facteurs de croissance des fibroblastes (FGFR3) : un oncogène majeur des tumeurs de la vessie

Le FGFR3 ("fibroblast growth factor receptor 3") appartient à une famille de récepteurs à activité tyrosine kinase codés par 4 gènes différents (FGFR1-4). Ces récepteurs sont des glycoprotéines transmembranaires comportant dans leur région extracellulaire deux à trois domaines de type immunoglobuline et dans leur région intracellulaire un domaine tyrosine kinase. Les FGFR sous forme de monomère sont inactifs. L'interaction avec le ligand conduit à la dimérisation du récepteur et à la transphosphorylation des domaines kinases. Le récepteur activé devient alors capable de lier et de phosphoryler des protéines effectrices déclenchant ainsi dans la cellule différentes cascades de signalisation [3]. La voie FGF-FGFR est impliquée dans de nombreux processus biologiques au cours du développement embryonnaire et dans le tissu différencié.

Des mutations ponctuelles dans différents domaines des récepteurs FGFR1-3 sont responsables de syndromes autosomiques dominants affectant particulièrement la croissance osseuse (cranosynostoses et nanismes). Ces mutations conduisent à une activation constitutive du récepteur soit par une stabilisation de la forme dimérique soit par un changement de conformation dans le domaine tyrosine kinase. Les récepteurs FGFR1-3 sont impliqués dans les syndromes de cranosynostose. FGFR3 est le seul récepteur impliqué dans différents syndromes de nanisme : hypochondroplasie, achondroplasie (forme la plus courante de nanisme), SADDAN (achondroplasie sévère avec retard du développe-

ment et *acanthosis nigricans*) et nanisme thanatophore (forme la plus sévère, létale à la naissance). Le ciblage au niveau du cartilage de croissance d'un récepteur FGFR3 activé ainsi que l'introduction dans le gène *FGFR3* murin de mutations activatrices en utilisant une approche "knock-in" conduisent à un nanisme chez la souris. L'invalidation du gène *FGFR3* murin entraîne à l'opposé une croissance exagérée des os longs. Ces différentes observations montrent que FGFR3 est un régulateur négatif de la croissance osseuse [4, 5].

De façon tout à fait surprenante, il a été montré récemment que parallèlement à son rôle inhibiteur dans le développement, *FGFR3* est impliqué dans le cancer comme protooncogène. Le rôle oncogénique de *FGFR3* a été proposé pour la première fois dans le myélome multiple. Une translocation t(4;14)(16.3;32.3) avec des points de cassure en 4p16.3 situés à 50-120 kb de *FGFR3*, associée à une surexpression de ce récepteur, est en effet observée dans 20% de ces tumeurs. Dans de rares cas (trois lignées cellulaires et une tumeur primitive) des mutations activatrices de *FGFR3* toujours associées à la translocation ont été identifiées [6-8]. La contribution réelle de *FGFR3* dans le myélome multiple n'est cependant pas clairement établie. En effet les points de cassure en 4p16.3 se produisent dans le gène *WHSCI/MMSET* conduisant à des transcrits de fusion entre ce gène et le locus IgH ("immunoglobulin heavy chain") situé en 14q32.3 [9, 10]. Il a été récemment apporté l'évidence que *FGFR3* joue un rôle majeur dans un carcinome, le carcinome de la vessie [11, 12].

L'incidence des mutations de *FGFR3* a été déterminée dans une série de 132 tumeurs de vessie de différents stades et grades [12]. Parmi les 132 tumeurs examinées, 48 présentaient une mutation de *FGFR3*. Les 5 mutations différentes identifiées étaient des mutations non sens identiques aux mutations germinales trouvés dans le nanisme thanatophore (Figure 1). La plupart de ces mutations en faisant apparaître une cystéine permettaient, par la création d'un pont disulfure, une dimérisation du récepteur indépendante du ligand. La mutation S249C localisée dans le domaine extracellulaire entre la 2ème et la 3ème boucle immunoglobuline était de loin la plus fréquente (elle représentait 70% des mutations). La raison de l'existence de ce point chaud de mutation n'est pas connue. La fréquence des mutations était

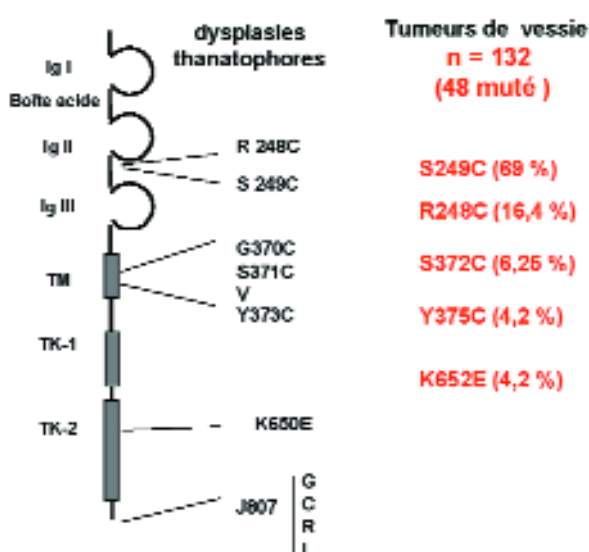


Figure 1 : mutations du *FGFR3* dans les dysplasies thanatophores et les carcinomes urothéliaux [11] [12].

très élevée dans les tumeurs pTa (74%) et beaucoup plus faible dans les tumeurs pT1 (21%) ou pT2-4 (16%), aucune mutation n'était détectée dans les 20 carcinomes *in situ* analysés. Il existait une corrélation inverse entre le grade et la fréquence des mutations de *FGFR3* puisque 84% des tumeurs G1, 55% des tumeurs G2 et seulement 7% des tumeurs G3 étaient mutées. *FGFR3* est à ce jour le premier gène trouvé préférentiellement muté dans les tumeurs de vessie de bon pronostic (tumeurs pTa G1 et pTaG2). La fréquence élevée de mutations de *FGFR3* dans les tumeurs pTa, leur absence dans les carcinomes *in situ* et leur faible fréquence dans les tumeurs pT1 et pT2-4 apparaît en accord avec le modèle de progression des cancers de vessie dans lequel la majorité des tumeurs invasives seraient issues des carcinomes *in situ* et non des tumeurs pTa. La fréquence élevée des mutations de *FGFR3* dans les tumeurs pTa qui représentent la forme la plus fréquente des tumeurs de vessie ouvre des perspectives pour les protocoles de surveillance et de prise en charge thérapeutique. Les tumeurs Ta bien qu'ayant une faible tendance à progresser vers des tumeurs invasives récidivent avec une très haute fréquence ce qui implique une surveillance régulière et prolongée par cystoscopie. Une étude préliminaire indique que les tumeurs pTa avec des mutations de *FGFR3* récidivent beaucoup moins fréquemment que les tumeurs non mutées [13]. Si cette étude était confirmée sur un plus grand nombre de cas, le protocole de suivi par cystoscopie pourrait être allégé chez les patients ayant des

tumeurs présentant des mutations de *FGFR3*. De plus chez ces patients, le suivi pourrait être en partie réalisé par une méthode non invasive, la détection de mutations de *FGFR3* dans les cellules du sédiment urinaire. En raison du rôle important joué par les récepteurs tyrosine kinase dans la carcinogénèse, des traitements ciblant certains de ces récepteurs (Neu/ErbB2/HER-2, c-kit, récepteur du VEGF et de l'EGF) se mettent actuellement en place.

b) Etude du locus *c-ha-ras-1* dans les tumeurs de vessie humaine

Les données concernant mutations du gène C-HA-RAS-1 dans la littérature sont controversées, H. Bittard n'a pas retrouvé de mutation [14], Fujita et Knowles ont mis en évidence 10% de mutations [15, 16], par contre d'autres auteurs ont retrouvés une fréquence plus élevée de mutations ainsi qu'une sur-expression du produit de ce gène dans le carcinome *in situ* et les tumeurs G3 [17], ce qui est en faveur d'une altération des gènes du chromosome 11 comme événement secondaire dans la progression tumorale urothéliale. La place de l'analyse des altérations génétiques et/ d'expression de ce gène reste largement à explorer [18].

Une étude portant sur 126 patients porteurs de cancer de vessie (tous stades) et 84 patients indemnes [19] a étudié le polymorphisme allélique du gène Ha-ras dans les tumeurs vésicale. Dans cette étude sont définis les allèles fréquents intitulé (a1, a2, a3) et des allèles rares (a4, a5, a6, a7) et les génotypes correspondant (a1-a1, a1-a2, etc...). Les allèles et les génotypes rares ont été retrouvés préférentiellement dans les tumeurs évoluées et agressives (T2-T4, aneuploïdes, grade 3, invasion vasculaire). Il en est de même de la perte d'hétérozygotie (discordance entre le génotype des leucocytes et le génotype de la tumeur), qui a été retrouvée dans 13 cas sur 126, soit 10 % et là encore dans les tumeurs les plus agressives. Ces allèles rares associés aux formes graves sont caractérisés par un allongement anormal de la séquence VTR par répétition de triplets, ceci peut éventuellement faire évoquer une modification stéréotaxique de l'ADN et une instabilité.

c) Surexpression des ligands et des récepteurs de la famille du facteur de croissance épidermique (EGF: epidermal growth factor)

L'importance de l'EGF dans la carcinogénèse vésicale a été suggérée par Messing [20, 21]. Depuis de

nombreuses études ont souligné le rôle de la surexpression du récepteur à l'EGR comme marqueur de la progression tumorale [22] ou de la surexpression du récepteur associé à un de ces ligands le TGF α [23].

Des études chez l'animal [24] et sur les tumeurs humaines [25] ont démontré la surexpression au cours de la progression tumorale des ligands suivants : TGF α , amphiréguline, HB-EGF (Heparin Binding EGF), épireguline et de deux récepteurs HER1 ou EGFR et HER2 ou Neu (Epidermal Growth Factor Receptor 1 et 2).

En pratique cette surexpression n'a pas démontré sa supériorité sur les critères clinico-pathologiques, mais offre des possibilités thérapeutiques d'interaction avec cette voie de signalisation.

d) Les proto-oncogènes

Les proto-oncogènes peuvent être regroupés en plusieurs familles (Tableau 1) :

2. LES GENES SUPPRESSEURS DE TUMEURS

a) Mise en évidence et définition

Le concept originel de régulateurs négatifs du développement tumoral remonte au début du siècle, époque à laquelle le biologiste Allemand Theodor Boveri en 1929, proposait que le cancer résultait d'un déséquilibre entre régulateurs négatifs et positifs de la croissance cellulaire. Un premier argument expérimental en faveur de l'existence de suppresseurs de tumeurs émergeât des expériences de fusion cellulaire qui montrèrent que des hybrides somatiques issus de cellules cancéreuses et de cellules non transformées perdaient au moins en partie leur phénotype malin [26]. Ces observations suggéraient que certaines informations portées par le génome de cellules normales étaient inexistantes dans les cel-

lules tumorales et qu'elles contribuaient à maintenir les cellules dans leur état physiologique.

Les premiers arguments génétiques vinrent des travaux de Knudson sur le rétinoblastome, une tumeur oculaire de l'enfant, qui prédisait que deux événements génétiques limitants devaient avoir lieu dans la même cellule pour que la tumeur se développe [27]. Cette hypothèse pouvait facilement être mise en adéquation avec les deux formes de rétinoblastome, familiale et sporadique, en considérant que les individus génétiquement prédisposés étaient porteurs d'une mutation germinale et que, dans leur cas, une seule mutation, somatique cette fois, suffisait au déclenchement du processus tumoral. La présence de cette mutation germinale dans toutes les cellules somatiques expliquait la fréquence accrue de cancer dans les familles porteuses par rapport à la population générale chez laquelle les deux mutations somatiques devraient apparaître dans un même clone cellulaire. Comings proposa, alors que les deux mutations incriminées pourraient toucher les deux copies d'un même gène, autosomique étant donnée l'indépendance vis à vis du sexe dans cette affection [28]. La notion de récessivité de ces deux mutations, venant de l'observation du fait qu'une copie normale ("sauvage") du gène considéré semblait interférer avec le processus oncogénique, tant dans la forme familiale que sporadique, fit penser que l'allèle normal pouvait avoir un effet anti-oncogénique [29]. Le terme anti-oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs fût dès lors rapidement proposé. Les travaux de Cavenee et collaborateurs, montrant, à l'aide de marqueurs génétiques polymorphes, l'apparition de pertes d'hétérozygotie dans l'ADN tumoral, apportèrent la première preuve expérimentale quant aux événements responsables de l'inactivation de cette classe de gènes [30]. L'analyse quantitative de ces résultats permit de définir trois classes d'événements

Tableau 1 : Les familles de proto-oncogènes (d'après [1]).

Catégorie	Gènes classés
Récepteurs membranaires	<i>HER-1, HER-2, FGFR3, Fms, Kit, Ret, Met TGF-b-RII</i>
Ligands des récepteurs tyrosine-kinases (facteurs de croissance)	<i>EGF, PDGF, GM-CSF, FGF3, FGF5, FGF6, VEGF, HGF</i>
Protéines membranaires G (liant le GTP)	<i>H-ras, Ki-ras, et N-ras</i>
Protéines de transduction du signal	<i>Akt (voie de l'inositol triphosphate-kinase) et Raf1, Mos (voie des MAP-kinases)</i>
Protéines nucléaires	<i>Erb-A, Fos, Jun, C-myc, N-myc, L-myc, cycline-D1</i>

ments conduisant à une perte d'hétérozygotie: une délétion somatique, une non-disjonction des chromatides soeurs lors d'une mitose, ou enfin une recombinaison mitotique (Figure 1). Outre la compréhension des mécanismes chromosomiques mis en jeu et leur contribution au clonage positionnel du gène *RBI* ("*Retinoblastoma*") [31, 32], ces travaux ouvrirent également le chemin de la première approche systématique permettant, en premier lieu dans le cancer du côlon, la recherche de chromosomes renfermant potentiellement des gènes suppresseurs de tumeurs [33].

Dès lors, de nombreux anti-oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs furent isolés et caractérisés, certains d'entre-eux étant, tout comme le gène *RBI*, mutés à la fois dans des cancers familiaux et sporadiques. Compte-tenu de la diversité des mécanismes d'action, avérés ou présumés, des protéines codées par ces gènes, la seule caractéristique permettant d'attribuer à un gène l'appellation de "suppresseur de tumeurs" est la présence de mutations inactivatrices contribuant à la genèse d'un cancer [34, 35].

b) Classification des gènes suppresseurs de tumeurs

Une classification, proposée par Kinzler et Vogelstein [36, 37], sépare les gènes suppresseurs de tumeurs en trois catégories en fonction de l'étape à laquelle le gène est inactivé, de sa fonction, et donc des conséquences de son inactivation, et du compartiment cellulaire dans lequel il est affecté.

Ainsi, les suppresseurs de tumeurs du type "*gate-keeper*", ou gardes-barrière, seraient des gènes codant des protéines inhibant la croissance ou promouvant la mort cellulaire. L'inactivation de ce type de gènes serait un facteur limitant pour l'initiation du processus oncogénique, éclairant le fait que les mutations germinales occasionnent un risque de cancer relatif extrêmement élevé, plus de 1000, par rapport à la population générale.

Les "*caretakers*", encore appelés gardiens du génome, coderaient des protéines assurant le maintien de l'intégrité du génome, en particulier la fidélité de la réplication ou la réparation de l'ADN. Leur inactivation serait indirectement responsable de la genèse de cancers, ne faisant qu'accroître le taux de mutations pouvant éventuellement affecter un membre de la catégorie décrite ci-avant. Cela explique le fait que

les mutations germinales occasionnent ici un risque relatif de cancer plus modeste, entre 5 et 50, et que la restauration de leur fonction n'abolit pas le phénotype tumoral dû à des mutations ultérieures à la perte de la fonction réparatrice et touchant d'autres classes de gènes.

Enfin, les suppresseurs de tumeurs de la catégorie "*landscapers*", ou de "façonnement du terrain", seraient impliqués dans des interactions épithélium-mésenchyme. Dans cette situation, les mutations initiales affecteraient le compartiment stromal d'un tissu, créant ainsi, de part l'altération de signaux paracrines, des conditions favorables au développement ultérieur d'une tumeur épithéliale.

Il est parfois difficile d'utiliser la classification décrite ci-avant dans la mesure où, en fonction des situations, un gène peut être répertorié dans une famille plutôt qu'une autre [37]. Nous proposerons, en suivant l'ordre chronologique de leur découverte, hormis pour les gènes présentant des similitudes qui seront regroupés, un bref descriptif des gènes suppresseurs de tumeurs connus et de la fonction principale ou présumée de leurs produits, illustrant la diversité des voies de contrôle participant au maintien de l'homéostasie tissulaire (Tableau 2, Figure 2).

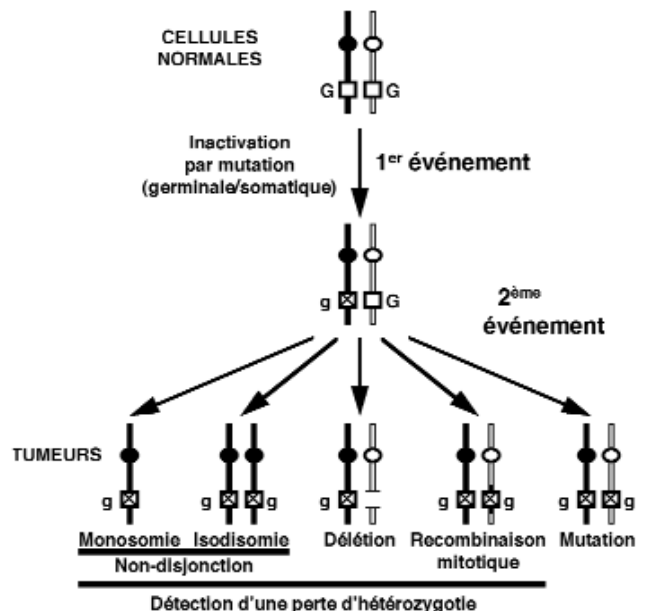


Figure 2 : Mécanismes chromosomiques et génétiques associés à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs : 2 événements sont nécessaires à l'inactivation d'un gène suppresseur d'après Cavenee et al.,[30].

Tableau 2 : Gènes suppresseurs de tumeurs, locus et fonction de la protéine codée

Gène	Locus	Protéine (localisation, fonction)
<i>hMSH6</i>	2p13	Réparation des mésappariements
<i>hMSH2</i>	2p21-p22	Réparation des mésappariements
<i>hPMS1</i>	2q31-q33	Réparation des mésappariements
<i>TGF-βRII</i>	3p21-p22	Récepteur sérine/thréonine kinase
<i>hMLH1</i>	3p21.3-p23	Réparation des mésappariements
<i>VHL</i>	3p25	Cytopl., dégradation des ARNm?
<i>APC</i>	5q21	Cytopl., dégradation de la b-catÈnine
<i>M6P/IGF2R</i>	6q26-q27	Récepteur, trafic intracell.
<i>hPMS2</i>	7p22	Réparation des mésappariements
<i>EXT1</i>	8q24	Enzyme biosynthèse GAGs, rét. endopl.
<i>p15/MTS2/CDKN2B</i>	9p21	Inhibiteur de kinase, CDK
<i>p16/MTS1/CDKN2A</i>	9p21	Inhibiteur de kinase, CDK
<i>Patched/PTCH</i>	9q22	Membrane plasmique, récepteur
<i>PTEN/MMAC1</i>	10q23.3	Cytoplasmique, Phosphatase
<i>EXT2</i>	11p11-p13	Enzyme?
<i>WT1</i>	11p13	Facteur de transcription
<i>MEN1</i>	11q13	?
<i>BRCA2</i>	13q12	Nucléaire, réparation de l'ADN
<i>RB1</i>	13q14	Modulateur de transcription
<i>E-Cadhérine/CDH1</i>	16q22	Membr. plasm., molécule d'adhérence
<i>TP53</i>	17p13.1	Facteur de transcription
<i>NF1</i>	17q11	Cytopl., activateur Ras GTPase
<i>BRCA1</i>	17q21	Nucléaire, couplage transcription/ réparation de l'ADN
<i>MADR2/SMAD2</i>	18q21	Transactivateur, signalisation TGF-b
<i>DPC4/SMAD4</i>	18q21.1	Transactivateur, signalisation TGF-b
<i>LKB1/STK11</i>	19p13	Cytopl.?, sérine/thréonine kinase
<i>hSNF5/INI1</i>	22q11	Remodelage de la chromatine
<i>NF2 2</i>	2q12	Interaction membrane-cytosquelette

c) Les différents suppresseurs connus de tumeurs connus

d) Le gène p53

Découvert en 1979 par Lane et Crawford, ce gène est le gardien du génome.

Le gène p53 est localisé sur le bras court (p) du chromosome 17, au locus 17p13.1, une région sujette à des pertes alléliques et code pour la protéine p53 ou TP53 (Tumeur Protein of 53 kilodaltons), une phosphoprotéine nucléaire de 393 acides aminés, qui est un facteur de transcription aux propriétés anti-oncogènes. Celle-ci a été identifiée du fait de son interac-

tion avec des oncoprotéines virales (dont l'antigène du virus SV40, dont les propriétés oncogènes ont été découvertes secondairement).

Le gène p53 est un gène suppresseur de tumeurs : ce rôle transformant a été confirmé par l'inhibition de la croissance *in vitro* de cellules tumorales par le type sauvage du gène p53.

La protéine p53 issue du gène sauvage est le pivot régulateur central du cycle cellulaire. Lorsque des mutations de l'ADN (acide désoxyribonucléique) sont présentes en grand nombre dans une cellule, le type sauvage de p53 arrête momentanément le cycle cellulaire, en empêchant le franchissement du point



Figure 3 : Localisation chromosomique des principaux des gènes suppresseurs de tumeurs.

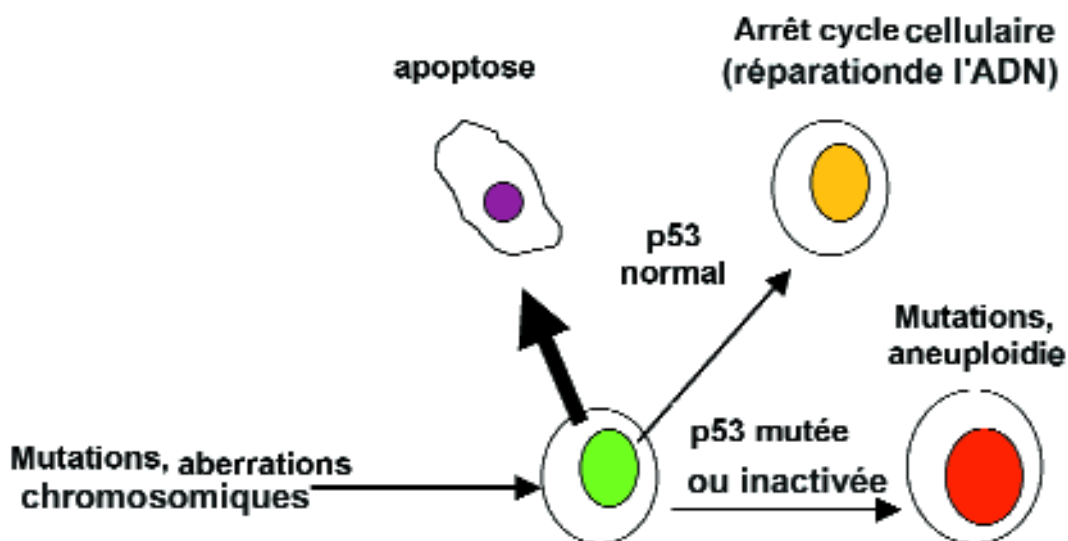


Figure 4 : la voie du contrôle des lésions de l'ADN (d'après Carson, 1995, [39]).

de restriction R (passage de G₁ à S), afin de permettre à la cellule de réparer les erreurs [38]. Cette action est médiée par la protéine du rétinoblastome pRb et la protéine p21^{WAF/CIP1}, qui inhibent l'activité des enzymes cyclines kinases dépendantes (cdk, pour cyclin dependent kinase). Lorsque les mutations sont trop nombreuses pour être réparées, p53 oriente la cellule vers l'apoptose, par l'intermédiaire du gène Bax [39].

La protéine p53 issue du gène muté ou inactif (suite à une délétion des gènes de régulation) n'a pas de propriétés anti-oncogènes suite à une altération du site de liaison de l'ADN, la cellule continue à se diviser, même avant la séparation chromatiniennne, en accumulant des mutations (instabilité chromosomique et aneuploïdie). Cette instabilité génomique est à l'origine de l'augmentation de l'agressivité tumorale [40]. Le gène p53 est le gène le plus fréquemment muté dans les cancers humains. Paradoxalement, dans les cellules tumorales, il existe souvent une surexpression du gène p53, avec, dans de nombreux cas une accumulation de la protéine p53 anormale qui forme des complexes inactifs avec la protéine p53 normale [41].

La durée de vie cellulaire est également affectée par l'état de p53. A chacune des divisions cellulaires, la longueur génomique diminue de 50 à 60 nucléotides environ. Les cellules ayant perdu le contrôle de p53 ont une activité répliquative intense mais ne sont pas

immortelles. Ces cellules atteignent plus volontiers la crise télomérique (ré-expression de l'activité de la télomérase qui prévient le raccourcissement chromosomique et permet la croissance cellulaire à l'infini) avant leur sénescence ou apoptose [39].

Après exposition des cellules à des agents génotoxiques tels que les radiations ionisantes, il se produit une augmentation transitoire du taux de p53 par la voie de l'oncoprotéine mdm-2 (*murine double minute-2*), régulateur négatif de p53. Cette surexpression de p53 peut avoir deux conséquences : l'arrêt du cycle cellulaire en phase G₁ ou l'apoptose. Dans le premier cas, les cellules rentrent dans le cycle cellulaire après réparation de leur ADN endommagé ; dans le second, les cellules contenant des altérations sont éliminées. Lorsque p53 n'est pas fonctionnel, les cellules contenant un matériel génétique endommagé peuvent continuer à se multiplier en accumulant des altérations génomiques.

Le gène p53 comporte 20303 paires de bases réparties en 11 exons. La protéine p53 est codée par les exons 2 à 11 du gène p53. La majeure partie codante du gène est concentrée au sein d'une zone de 3066 paires de bases (Figure 5 et Tableau 3).

La protéine p53 comporte plusieurs domaines ayant chacun un rôle différent (Figure 5). La région N-terminale (codons 1 à 42) confère à p53 l'activité de facteur de transcription (I : domaine de transactivation). Le domaine central (codons 120 à 290) recon-

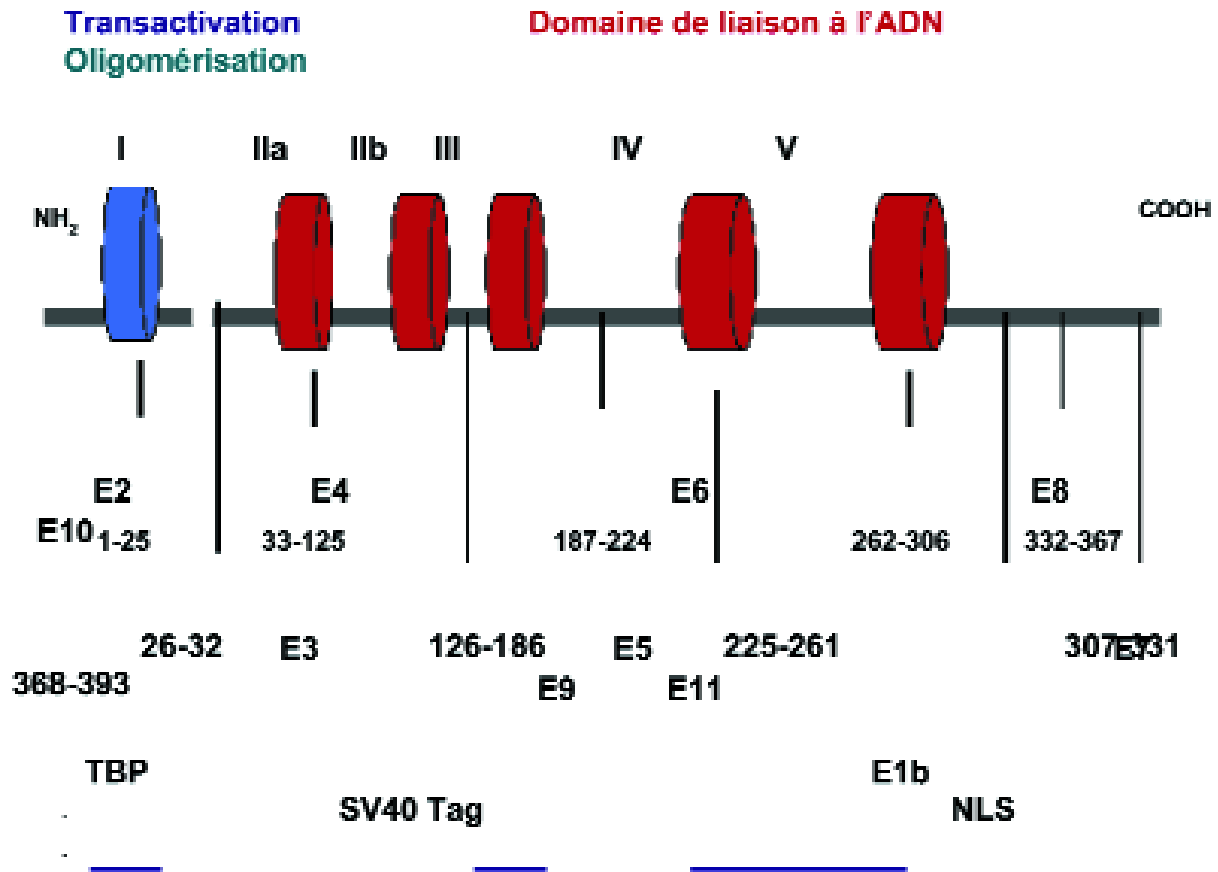


Figure 5 : Représentation schématique de l'organisation fonctionnelle de la protéine p53.

Abréviations : E : Exon ; en chiffres romains, les différents domaines de la protéine p53 ; les chiffres arabes correspondent aux numéros des codons. L'exon 1 et la partie initiale du codon 2 ne sont pas codants. Sous la protéine, sont représentés les sites de reconnaissance et d'interaction (—) ainsi, TBP : TATA binding protein ; mdm-2 : murine double minute-2 ; E1b : protéine E1b de l'adénovirus 5 ; E6 : protéine E6 du Papillomavirus ; SV40 Tag : antigène T du virus SV40 ; NLS : Signal de localisation nucléaire.

Tableau 3 : Structure du gène p53 (les positions des bases font référence au séquençage complet de PM. Chumakov (GenBank accession n° X54156, [42]).

Exons	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Taille	107	102	22	279	184	113	110	137	74	107	278
Base début	843	11689	11906	12021	13055	13320	14000	14452	14681	17572	18599
Base fin	949	11790	11927	12299	13238	13432	14109	14588	14754	17678	19876

naît et lie des séquences cibles spécifiques d'ADN grâce à une séquence palindromique de 10 paires de bases. L'extrémité C-terminale (codons 310 à 390) reconnaît des séquences monocaténares d'ADN endommagé, avec lesquelles elle forme des complexes stables. L'oligomérisation de p53 (p53 est un tétramère) est également régulée par ce même domaine (codons 310 à 350).

Le gène p53 est un bon outil d'étude pour plusieurs raisons :

- les mutations de p53 dans les tumeurs de la vessie sont un événement fréquent (40% à 61%, selon les auteurs : [43, 44];
- l'analyse des bases de données : IARC (International Agency for Research on Cancer)(Figure 6), UMD Necker (Figure 7), indique qu'un nombre important de codons est la cible de mutations inactivant la fonction de la protéine ; il ne s'agit donc pas de polymorphismes génétiques.
- cette distribution reconnaît des cibles préférentielles, localisées à la partie centrale de la protéine (domaine de fixation à l'ADN), les codons 175, 248 et 273. De plus, ces codons peuvent faire l'objet d'événements mutationnels différents, ce qui est d'un grand intérêt épidémiologique.
- étant donné que 90% des altérations sont des mutations ponctuelles, qui, pour des raisons encore peu claires, permettent le maintien d'une protéine p53 entière mais inactive, cette fréquence accrue nous permet de mieux évaluer le résultat produit par des adduits (radicaux greffés sur la molécule d'ADN) générés par une exposition à des agents cancérogènes.
- enfin, 90% des mutations identifiées sont regroupées dans 5 exons, à une petite partie de la molécule.

Les méthodes d'étude du gène et de la protéine p53 sont variées.

La méthode directe correspond à l'analyse de la séquence du gène après extraction de matériel génétique (ADN ou ARN) et amplification par PCR (ou par Reverse Transcriptase-PCR, pour l'ARN). Cette approche utilise habituellement une méthode de screening : S.S.C.P. (*Single Strand Conformation Polymorphism*) ou D.G.G.E. (*Denaturing Gel Gradient Electrophoresis*).

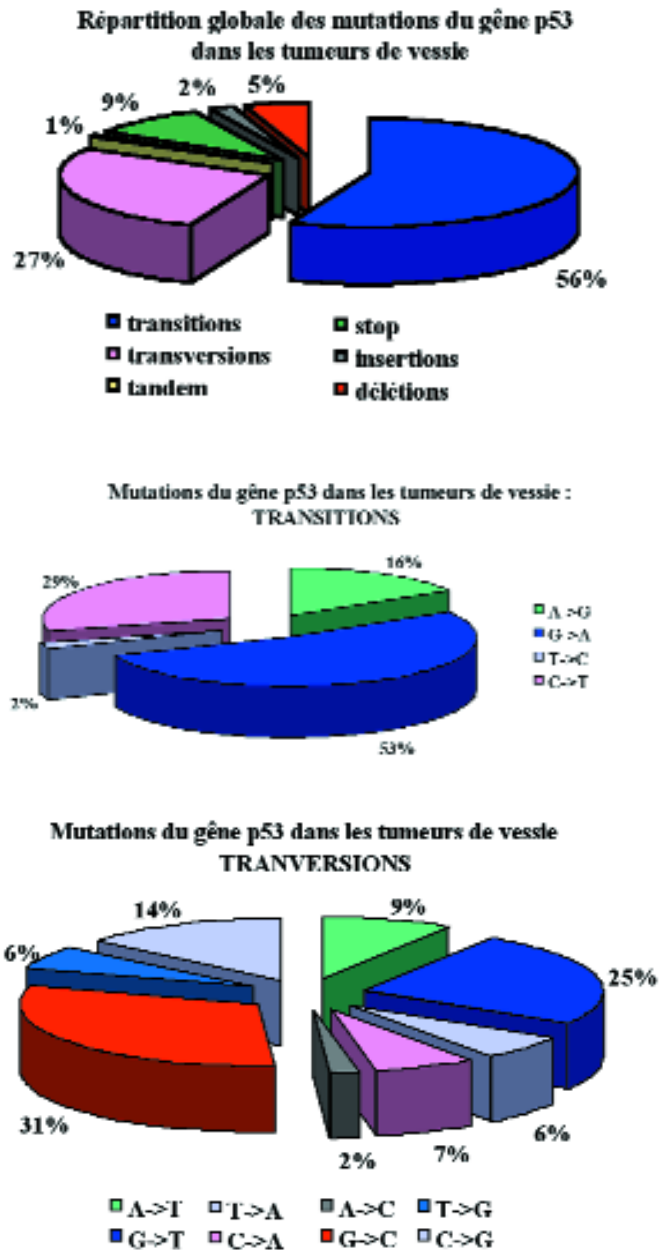


Figure 6 : Répartition des mutations du gène p53 dans les tumeurs de la vessie : par type de mutation (d'après la banque de données du CIRC).

Compte tenu de la lourdeur et du coût de la technique directe, des méthodes indirectes ont été développées. Ainsi, l'immunohistochimie recherche *in situ* (sur le tissu) la surexpression de la protéine p53. En effet, la protéine p53 issue du gène muté adopte une conformation qui lui confère une demi-vie beaucoup plus longue que la protéine issue du type sauvage de p53 (3 à 6 heures versus 20 mn pour la protéine normale). On peut toutefois observer une sur-

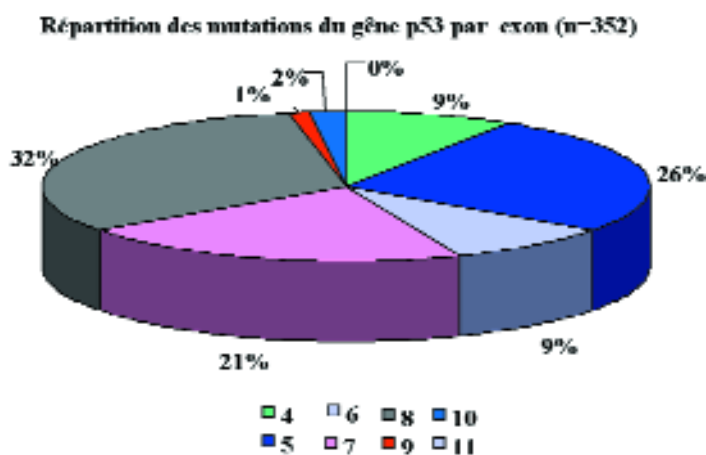


Figure 7 : Répartition des mutations du gène p53 dans les tumeurs de vessie par exon et par type (d'après la banque de données UMD Necker, 1998)

expression sans mutation (par exemple, par la surexpression de la protéine de liaison mdm-2) ou, à l'inverse, l'absence de surexpression en cas de mutation (par exemple, si celle-ci intéresse le domaine de liaison à l'ADN [45, 46]. Toutefois, on peut estimer que dans plus d'un cas sur deux (70%) une surexpression de p53 est associée à une mutation du gène p53.

Dans le cas de mutation de p53, il est également possible de mettre en évidence dans le sérum des auto-anticorps anti-p53 en utilisant un test immuno-enzymatique (ELISA, pour *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

Par ailleurs, le test fonctionnel à la levure réalise une approche indirecte tout à fait intéressante : ce test utilise une levure (*Saccharomyces Cerevisiae*) mutante car déficiente pour le métabolisme de l'adénine (ade-), ce qui lui confère une coloration rouge par accumulation d'un métabolite. L'introduction de la protéine p53 native restaure le phénotype ade+ et conduit à la coloration blanche, indiquant ainsi que la p53 introduite est fonctionnelle. L'introduction d'une p53 issue du gène p53 muté ne permettant pas l'activation du gène ade, la levure restera rouge.

• ANOMALIES DE P53 ET CANCER DE LA VESSIE

Les premières études concernant p53 ont montré la fréquence des anomalies de ce gène dans le cadre du cancer vésical [47].

Les anomalies du gène p53 ont été abordées par des techniques de biologie moléculaire, d'immunohistochimie et de sérologie. Ces anomalies génétiques ont été étudiées principalement par SSCP et analyse de

séquence. Dans le cas du cancer de la vessie comme dans d'autres tumeurs solides, les mutations sont surtout observées dans les exons 5 à 8 [48]. Schématiquement, il existe deux grands types de tumeurs vésicales quant à leur contexte étiologique : les tumeurs urothéliales ou carcinomes à cellules transitionnelles qui peuvent être induites par le tabac et les carcinogènes, de l'environnement d'une part, et les tumeurs épidermoïdes liées à l'infection de la paroi vésicale par le schistosome.

En ce qui concerne les tumeurs urothéliales où l'agression du matériel génétique est exogène, la prévalence des mutations est de 34%. Les substitutions de base (transversion ou transition) se répartissent de la façon suivante : G : C → A : T 37%, G : C → T : A 4%, G : C → C : G 21%, A : T → G : C 0%, A : T → T : A 3%, A : T → C : G 2%, délétion/insertion 14%, transition aux nucléotides CpG 16%. Le codon 280 est particulièrement siège de mutations. A l'opposé, les tumeurs vésicales épidermoïdes induites par le schistosome se caractérisent par une fréquence des transitions sur les dinucléotides CpG probablement du fait de l'action délétère du NO lié à l'inflammation produite par les oeufs de schistosomes [49].

Les études immunohistochimiques (IHC) sont basées sur le fait que la protéine mutante adopte une conformation qui la rend détectable car sa demi-vie est augmentée. Il existe d'autres mécanismes qui expliquent que la protéine p53 puisse être altérée sans modification génétique, en particulier la liaison avec d'autres protéines. L'intérêt de l'IHC est une indication rapide de l'état de la protéine p53 [50]. Il est actuellement clairement établi que 25% des tumeurs vésicales présentent une surexpression de la protéine p53 sans qu'une mutation n'ait été mise en évidence, dans 10% des cas, il existe des mutations sans anomalie immunohistochimique.

Malgré l'absence de concordance exacte entre les mutations et l'immunohistochimie (IHC), cette dernière technique a été utilisée comme outil du pronostic en complément des critères clinicopathologiques. L'IHC permet de mettre en évidence une surexpression nucléaire liée à une augmentation de la demi-vie. Plusieurs anticorps sont disponibles reconnaissant des immunodominants sur l'extrémité N ou C terminale de la protéine. Il est possible d'apprécier un seuil de positivité correspondant au nombre de noyaux marqués. Seul ce marquage est habituelle-

ment considéré comme ayant une signification dans les études anatomocliniques.

Utilisant cette méthode, les premières études (tableau 4) ont fourni des renseignements controversés. Dans ces études, le marquage de p53 était principalement confronté à la progression et les analyses multivariées n'ont pas montré d'intérêt de ce paramètre par rapport au stade. Une limite de ces études négatives, était certainement le nombre de patient ou les caractéristiques rétrospectives de la cohorte (recrutement sur plusieurs années avec des modifications dans l'évaluation du stade et les thérapeutiques. Dans une deuxième vague de travaux, sur un plus grand nombre de patients, émerge un groupe de travaux qui suggère un intérêt pronostique pour les anomalies de p53 (tableau 5). Ces études en effet, démontrent non seulement l'intérêt en ce qui concerne la progression, mais aussi la survie spécifique, dans le cadre d'analyses multivariées.

Ces travaux avec un plus grand recul confirment les données des études initiales pour les groupes ayant décrit une corrélation positive. Ces données sont suffisamment importantes pour envisager l'analyse prospective de ces marqueurs. Certains auteurs ont montré que l'analyse de p53 était un élément prédictif de la réponse au BCG [51].

Les anomalies de p53 ont été décrites sur les cellules exfoliées vésicales [52, 53]. Il est possible de détecter les mutations du gène p53 sur les cellules obtenues après lavage vésical avec une assez bonne corrélation avec l'analyse faite sur la tumeur. Les anomalies ainsi détectées pouvaient précéder la récurrence d'un délai d'environ 6 mois. Le développement de techniques non invasives est certainement un point important si l'utilité de ce marqueur est confirmé [54].

• p53 DU LABORATOIRE À LA CLINIQUE

A l'évidence p53 est un marqueur ayant un intérêt clinique, de par son rôle fonctionnel et par la relation entre les anomalies de ce gène et la progression tumorale. Sur le plan pratique, les études histo-chimiques et l'analyse des cellules vésicales exfoliées sont réalisables dans des laboratoires cliniques sans geste invasif complémentaire chez ces patients. Une étape à la diffusion de ces analyses est la validation de leur reproductibilité sur le plan méthodologique en particulier la façon d'apprécier la positivité du marquage et la définition du seuil de positivité. L'influence des méthodes de recueil et de fixation des tissus doivent être standardisées [55].

Sans la standardisation de la détection des anomalies de p53, aucune recommandation d'utilisation ne pourra être envisagée. Parallèlement, le rôle de p53 par rapport aux autres marqueurs des tumeurs vésicales doit être mené afin de ne retenir que les marqueurs les plus indicatifs du pronostic.

e) Le gène *RBI* (rétinoblastome)

Le prototype de cette famille de gènes est *RBI* ("*Retinoblastoma*"), cloné à partir de l'étude des délétions affectant le chromosome 13, dans la bande q14, dans les rétinoblastomes familiaux et sporadiques [31, 32, 57], qui s'est ensuite avéré muté dans de nombreux types de cancers. Les souris présentant une mutation germinale du gène *Rb1* ne sont pas viables à l'état homozygote, suggérant une importance fondamentale de cette protéine au cours du développement [58-60]. Les souris hétérozygotes développent des tumeurs, confirmant la fonction de

Tableau 4 : Valeur pronostique de l'analyse de p53 dans les tumeurs urothéliales vésicales : études négatives d'après Chopin [56].

Auteurs	Réf	N	Type de tumeurs	Méthode	Progression	Survie Spécifique	Analyses Multi variées
Sarkis	25	41	pT1	IHC	p<0.01	/	/
Lipponen	19	212	All TCC	IHC	p=0.01	/	NS/grade
Thomas	33	25	pT1	IHC	p=0.007	/	NS/stage
Gardiner	8	28	pT1	IHC	NS	/	/
Vet	34	45	All TCC	IHC/mut	/	p<0.001	NS/stage

Tableau 5 : Valeur pronostique de l'analyse p53 dans les tumeurs urothéliales vésicales : Etudes positives d'après Chopin[56].

Auteurs	Réf	N	Type de tumeurs	Méthode	Progression	Survie Spécifique	Analyses Multi variées
Esrig	6	243	Invasive TCC	IHC/mut	p<0.01	p<0.001	p<0.001
Sarkis	26	33	CIS	IHC	p<0.001	p=0.01	p=0.004
Popov	23	114	All TCC	IHC	p<0.001	p<0.001	p=0.03
Sarkis	24	114	Invasive TCC	IHC	/	p=0.004	p=0.001
Glick	11	69	Superficial TCC	IHC	p=0.003	/	p=0.002

suppresseur, mais dont le spectre est différent de celles observées chez l'homme, indiquant une spécificité d'espèce [59, 61]. La fonction normale de la protéine pRb semble être la régulation de l'entrée dans la phase S du cycle cellulaire en modulant l'expression de différents gènes, en titrant les facteurs de transcription de la famille E2F et en recrutant une histone désacétylase, probablement en modifiant la structure de la chromatine [62-64]. La phosphorylation de la protéine pRb par les complexes Cyclines D-CDK4 ("cyclin dependent kinases"), en réponse à des stimuli de prolifération, dont l'activation de Ras [65], conduit à la relaxation du facteur de transcription E2F, et probablement à des modifications de la structure chromatinienne, aboutissant à l'induction de gènes précoces, tel *c-Myc*, dont les produits contrôlent l'entrée dans le cycle cellulaire. Les altérations du gène *Rb* ont été décrites comme des mutations ou des anomalies d'expression de la protéine non fonctionnelle (non-expression ou surexpression) [66]. Deux équipes [67, 68] ont montré que ces altérations avaient un effet coopératif avec les anomalies de p53. Les altérations de ces deux gènes étant fortement liés à la progression tumorale.

f) Le gène *CDH1/E-cadhérine*

Le gène *CDH1* codant la E-cadhérine a été cartographié en 16q22.1. Cette molécule d'adhérence épithéliale présente des similitudes de séquence avec le produit du gène suppresseur de tumeurs *fat* identifié chez la mouche *Drosophila melanogaster* [69] et possède des propriétés inhibitrices sur l'invasion tumorale *in vitro* et la progression tumorale *in vivo* [70-72]. La démonstration de son rôle de suppresseur de tumeurs, pressenti depuis de nombreuses années, a été apportée par la mise en évidence de mutations inactivatrices du gène associées à des

pertes d'hétérozygotie. Des mutations somatiques et germinales ont été décrites dans les cancers gastriques [73-76], de même que des mutations somatiques dans les carcinomes lobulaires invasifs mammaires et les cancers de l'ovaire et de l'endomètre [77, 78]. Le gène serait également inactivé au niveau transcriptionnel dans la plupart des carcinomes [79-84], indiquant un rôle majeur dans la progression des tumeurs d'origine épithéliale. Le produit de ce gène est essentiel au maintien de l'état compacté des cellules de la masse interne. Les embryons de souris génétiquement déficients en E-cadhérine meurent au stade pré-implantatoire [85].

Dans le cancer de la vessie les altérations de l'expression E-Cadhérine qui est diminuée au cours de la progression tumorale [79, 86-88]. Ces altérations se situent au niveau transcriptionnel [89]. En pratique cette altération de l'expression est évaluée par des méthodes immunohistochimiques qui nécessitent du matériel congelé pour obtenir des résultats reproductibles.

g) Les gènes *p15/MTS2/CDKN2B/INK4B* et *p16/MTS1/CDKN2A/INK4A*

Ces gènes ont été isolés par clonage positionnel dans la bande 9p21, affectée par des pertes d'hétérozygotie dans de nombreux types de cancers, sur la base de la mise en évidence de délétions homozygotes dans cette région [90]. Ces deux gènes voisins, présentant une forte identité de séquence, codent des inhibiteurs de kinases cyclines-dépendantes. L'importance de ces kinases dans la progression au cours du cycle cellulaire avait été bien documentée, ce qui suggérait un rôle potentiel de suppresseur de tumeurs des gènes *p15/MTS2/CDKN2B/INK4B* et *p16/MTS1/CDKN2A/INK4A* [90]. Des mutations ponctuelles

inactivatrices du gène *p16/MTS1/CDKN2A/INK4A* ont été observées dans des lignées cellulaires dérivées de mélanomes [90], confortant cette hypothèse qui a été démontrée par la mise en évidence de mutations germinales et somatiques dans les mélanomes et les adénocarcinomes pancréatiques [91, 92], de même que par la mise en évidence de la fonction anti-oncogénique de la protéine p16 normale [93, 94]. Cette fonction anti-oncogénique est dépendante de la présence de la protéine Rb [93], démontrant que ces deux protéines fonctionnent dans la même voie et expliquant le fait que les mutations des gènes *p16* et *RB1* sont généralement mutuellement exclusives dans les cancers.

Le mécanisme d'inactivation préférentiel du gène *p16* semble être les délétions homozygotes [95, 96, 90, 97, 98]. Les mutations nulles du gène *p16* sont viables à l'état homozygote chez la souris et les animaux sont susceptibles de développer des tumeurs, essentiellement des sarcomes et des lymphomes, mais pas de mélanomes ni d'adénocarcinomes pancréatiques [99]. Cette différence de spectre tumoral pourrait être due au fait que la mutation, touchant l'exon 2, affecte un autre transcrite initié à partir d'un exon découvert en amont de l'exon 1 du gène *p16*, nommé exon 1 β . Ce transcrite *p19ARF* ("alternative reading frame") code une protéine ayant un cadre de lecture alternatif possédant néanmoins une fonction d'inhibiteur de croissance [100-102] et une fonction suppresseur de tumeurs génétiquement liée à p53 chez la souris [103]. La fonction anti-oncogénique de cette protéine p19Arf serait liée à son aptitude à neutraliser l'oncoprotéine MDM2 en prévenant son interaction avec la protéine p53 [104]. Son rôle dans l'oncogénèse est cependant incertain dans la mesure ou aucune mutation ou délétion spécifique de l'exon 1 β n'a été mise en évidence à l'heure actuelle dans les cancers. L'inactivation spécifique de la protéine p16 par introduction de mutations au niveau de l'exon 1 α du locus *Ink4a* murin se comporte comme un gène suppresseur de tumeur [105], les souris déficientes du locus *Ink4a* et hétérozygote pour p19 développent des tumeurs [105].

Le gène *p15* adjacent au gène *p16* est parfois codé-lété mais semble être une cible minoritaire dans la plupart des cancers [90, 98, 106]. Il est en revanche spécifiquement altéré dans certains glioblastomes et de nombreuses tumeurs hématopoïétiques [107-109]. La protéine p15 semble être un effecteur des

effets inhibiteurs du TGF- β , fournissant un support à son rôle de suppresseur de tumeurs potentiel [110]. L'inactivation du gène *Ink4b* par recombinaison homologue chez la souris est également en cours et devrait fournir un modèle pour étudier le rôle de p15 dans l'oncogénèse.

Dans le cancer de la vessie les altérations de Locus *INK4A* participent à l'inactivation des points de contrôle du cycle cellulaire p53 et Rb par divers mécanismes génétiques ou épigénétiques [111] (Figure 8). Le locus *INK4B* est également altéré dans les tumeurs superficielles de la vessie.

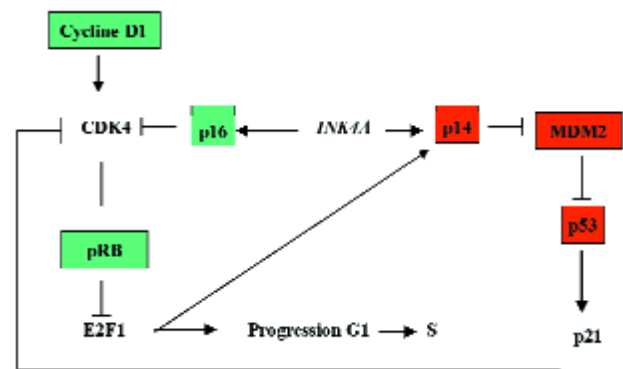


Figure 8 : Altérations des points de contrôles p53 et pRB dans la transition G1/S observées dans les carcinomes urothéliaux. Le locus *INK4A* situé en 9p21, code pour 2 protéines p16 et p14 qui interagissent avec les locis de pRB et p53. CDK4 : kinase dépendante des cyclines. Les gènes impliqués dans le cancer de la vessie sont encadrés d'après M. Knowles [111].

3. MODIFICATIONS EPIGENETIQUES DU GENOME ET LEUR ROLE DANS L'ONCOGENESE

a) L'empreinte génomique parentale

Des observations portant sur des embryons parthénogéniques ont suggéré l'existence d'une non-équivalence fonctionnelle du génome paternel et maternel. En effet, seule la reconstitution de ces embryons avec un pronucleus mâle permettait d'accomplir un développement à terme, indiquant ainsi la présence d'une empreinte génomique dans les gamètes. De nombreux cancers étant caractérisés par des altérations d'expression génique, il était logique de considérer l'implication de l'empreinte génomique dans leur étiologie. Le rôle de plusieurs gènes a été suggéré. Le meilleur exemple en est le couple de gènes *H19* et *IGF2* (insulin like growth factor 2) : dans le syndrome de Beckwith-Wiedemann, la levée consti-

tutionnelle de l’empreinte du gène *IGF2* est associée à une hyperméthylation bi-allélique du gène *H19*, présent dans les cellules du néphroblastome de Wilms [112-114]. Le mécanisme actuellement proposé est qu’il existe un régulateur transcriptionnel commun aux deux gènes *H19* et *IGF2*, un enhancer fonctionnant par défaut : normalement actif pour le gène *H19*, cet enhancer active la transcription de *IGF2* dans le cas de délétion ou d’inactivation épigénétique de l’allèle maternel de *H19* [115]. Des anomalies de la méthylation sont associées à ce mécanisme [116]. Par ailleurs, dans le cas du rétinoblastome, l’allèle paternel du gène *RB1* semble plus vulnérable à l’apparition de mutations, aussi bien somatiques que germinales [117, 118]. Des altérations de l’empreinte génomique ont essentiellement été mises en évidence dans les tumeurs pédiatriques, mais leur rôle semble également fréquent dans les tumeurs de l’adulte.

b) Méthylation de l’ADN et cancer

Comme cela a été récapitulé [119], les altérations de la méthylation de l’ADN dans les cellules tumorales ont été abondamment documentées depuis le début des années 1980. Ainsi, deux types de modifications ont été observés, à savoir la diminution globale du niveau de 5-méthyl-cytosines et l’hyperméthylation locale de certaines régions du génome [119]. L’importance relative de ces déséquilibres de la méthylation dans le processus oncogénique a également fait l’objet de nombreuses études.

c) L’hypométhylation

Une des premières altérations du statut de méthylation de l’ADN mise en évidence dans les cellules tumorales a été la diminution globale du contenu en 5-méthyl-cytosines dans le génome des cellules tumorales [120] dont l’importance fonctionnelle était confortée par les effets carcinogéniques d’un traitement à la 5-azacytidine [121], un inhibiteur de l’ADN méthyltransférase [122]. Un des effets proposés de cette hypométhylation globale a été la facilitation de l’activation de proto-oncogènes, tels *c-Myc*, *BCL2* et *Ras* [123]. L’hypométhylation des régions régulatrices de gènes ne présentant pas d’îlots CpG, ces derniers étant constitutivement non méthylés, n’est toutefois pas suffisante, dans la majeure partie des cas, pour permettre l’hyperexpression de gènes normalement inactifs, l’explication la plus probable étant, comme cela a été proposé, l’absence des facteurs de transcription nécessaires [119].

Quel est donc le rôle de l’hypométhylation dans la genèse des cancers? Un des postulats, basé sur le fait que l’ADN est globalement fortement méthylé, îlots CpG mis à part, est que la méthylation pourrait avoir une importance dans le maintien de l’intégrité du génome. Le fait qu’une instabilité chromosomique globale, extrêmement bien documentée dans les cellules cancéreuses, soit également observée dans les cellules traitées avec l’agent déméthylant 5-aza-2’-désoxycytidine [124], était particulièrement favorable à cette hypothèse. La preuve de l’implication de la méthylation dans l’instabilité génétique a été récemment apportée de manière très élégante par Chen et collaborateurs [125]. Dans ces travaux, les auteurs ont montré que l’inaction du gène *Dnmt1*, codant l’ADN méthyltransférase principale, dans les cellules souches embryonnaires murines aboutit à l’élévation du taux de réarrangements chromosomiques [125], essentiellement des recombinaisons mitotiques et des non-disjonctions, aboutissant à la détection de pertes d’hétérozygotie qui sont une des caractéristiques principales des cellules cancéreuses et ont permis la découverte des gènes suppresseurs de tumeurs [30]. Ces travaux fournissent donc une explication possible quant au mécanisme par lequel l’hypométhylation exerce ses effets oncogéniques. Il existe cependant une apparente contradiction entre ces résultats et le fait que l’inactivation génétique ou pharmacologique de l’ADN méthyltransférase ne promeut pas mais au contraire inhibe la formation de polypes intestinaux chez les souris hétérozygotes pour la mutation *Apc^{Min}* [126]. La 5-méthylcytosine présente une capacité mutagène intrinsèque dont le rôle a déjà été évoqué dans la suppression des dinucléotides CpG et semble également important dans la genèse de mutations oncogéniques [127, 128]. Ces propriétés ne semblent pas mises en cause dans ce modèle de cancérogénèse intestinale dans la mesure où la diminution du nombre de polypes liée à l’inactivation de l’ADN méthyltransférase n’est pas associée à la diminution du taux de mutations. Le taux de mutations est même nettement supérieur chez les souris traitées à la 5-aza-2’-désoxycytidine [127, 128, 123, 129]. Il est toutefois important de noter que, dans les tumeurs, l’hypométhylation observée n’est pas due à une diminution de l’activité ADN méthyltransférase qui, en règle générale, augmente plutôt [119]. Des résultats récents démontrent l’existence d’une “déméthylase” dont l’activité semble augmenter dans les tumeurs. Cette enzyme

pourrait ainsi conduire à l'hypométhylation globale du génome des cellules tumorales tout en autorisant la possibilité d'une hyperméthylation locale dont le rôle dans la cancérogénèse semble également important [119], hypothèse qui permettrait de réconcilier ces résultats apparemment contradictoires obtenus par Laird, Chen et collaborateurs [126, 125].

d) L'hyperméthylation des îlots CpG: un mécanisme alternatif pour inactiver les gènes suppresseurs de tumeurs

L'augmentation de l'activité méthyltransférase a été décrite dans de nombreuses lignées de cellules transformées [130] et était difficile à mettre en adéquation avec l'hypométhylation globale du génome de ces mêmes cellules. Les auteurs ont ainsi postulé l'existence de sites d'hyperméthylation spécifiques non détectables dans les mesures globales du contenu en 5-méthylcytosines. De tels sites d'hyperméthylation ont été mis en évidence à la même période [131-133]. Sur la base de travaux suggérant son implication dans l'inactivation transcriptionnelle de gènes [134], et compte-tenu du locus affecté, le bras court du chromosome 11, une région présentant des pertes d'hétérozygotie dans de nombreux cancers [135-141], les auteurs ont proposé que l'hyperméthylation était associée ou responsable de l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs [133] (Figure 9). Cette association entre la présence de pertes d'hétérozygotie et l'hyperméthylation a part la suite été

décrite pour le bras court du chromosome 3 (3p) et du chromosome 17 (17p), renforçant les présomptions initiales [142]. Pour conforter cette hypothèse, les propriétés carcinogéniques d'un dérivé du nickel semblent liées à ses effets sur l'extinction de gènes par méthylation de l'ADN [143].

II. GENETIQUE DES CARCINOMES DE LA VESSIE

Contrairement à d'autres types de cancers comme, par exemple, les tumeurs hématopoïétiques et les sarcomes dont la pathogénie moléculaire met en jeu l'activation de proto-oncogènes par translocations chromosomiques [144], la caractéristique génétique des carcinomes, tumeurs résultant de la transformation maligne de cellules épithéliales, semble être la prépondérance de délétions et de pertes d'hétérozygotie, suggérant que l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs serait le point commun dans la genèse de ces tumeurs [145]. Les carcinomes de vessie ne dérogent pas à cette règle et de nombreuses régions chromosomiques affectées par des pertes d'hétérozygotie ou délétions ont été mises en évidence, comme l'indique la Figure 10 qui regroupe les données de cytogénétique, d'hybridation génomique comparative, et de génétique moléculaire, l'épaisseur des barres indiquant la fréquence des événements (délétions ou amplifications).

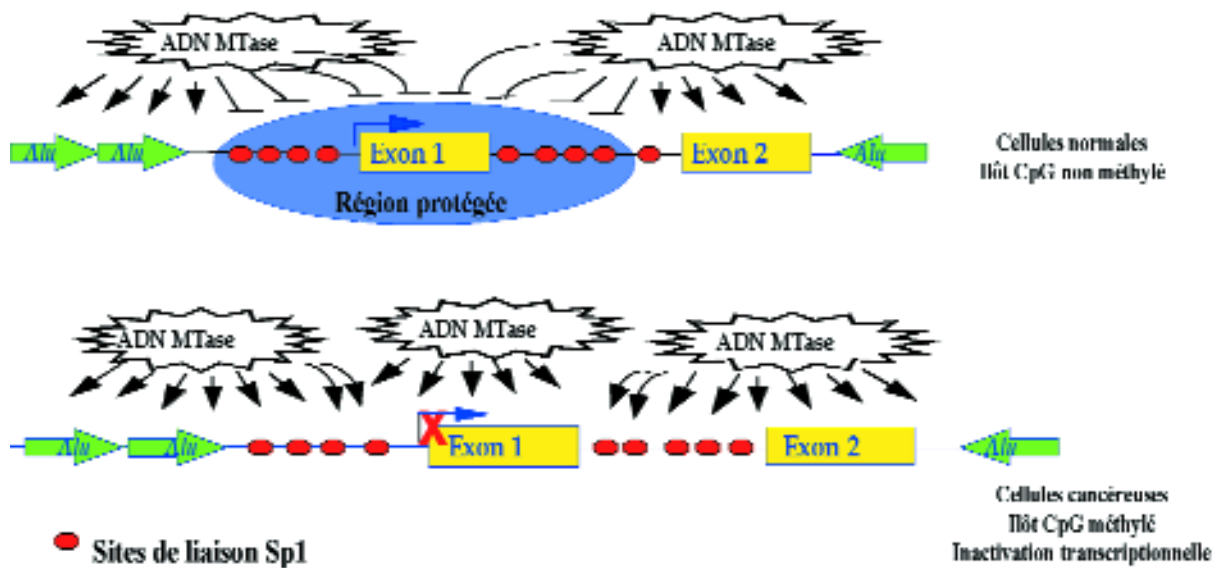


Figure 9 : Statut de méthylation d'un îlot 5'CpG dans les cellules normales et néoplasiques. La méthylation de novo, un mécanisme alternatif d'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs [119]

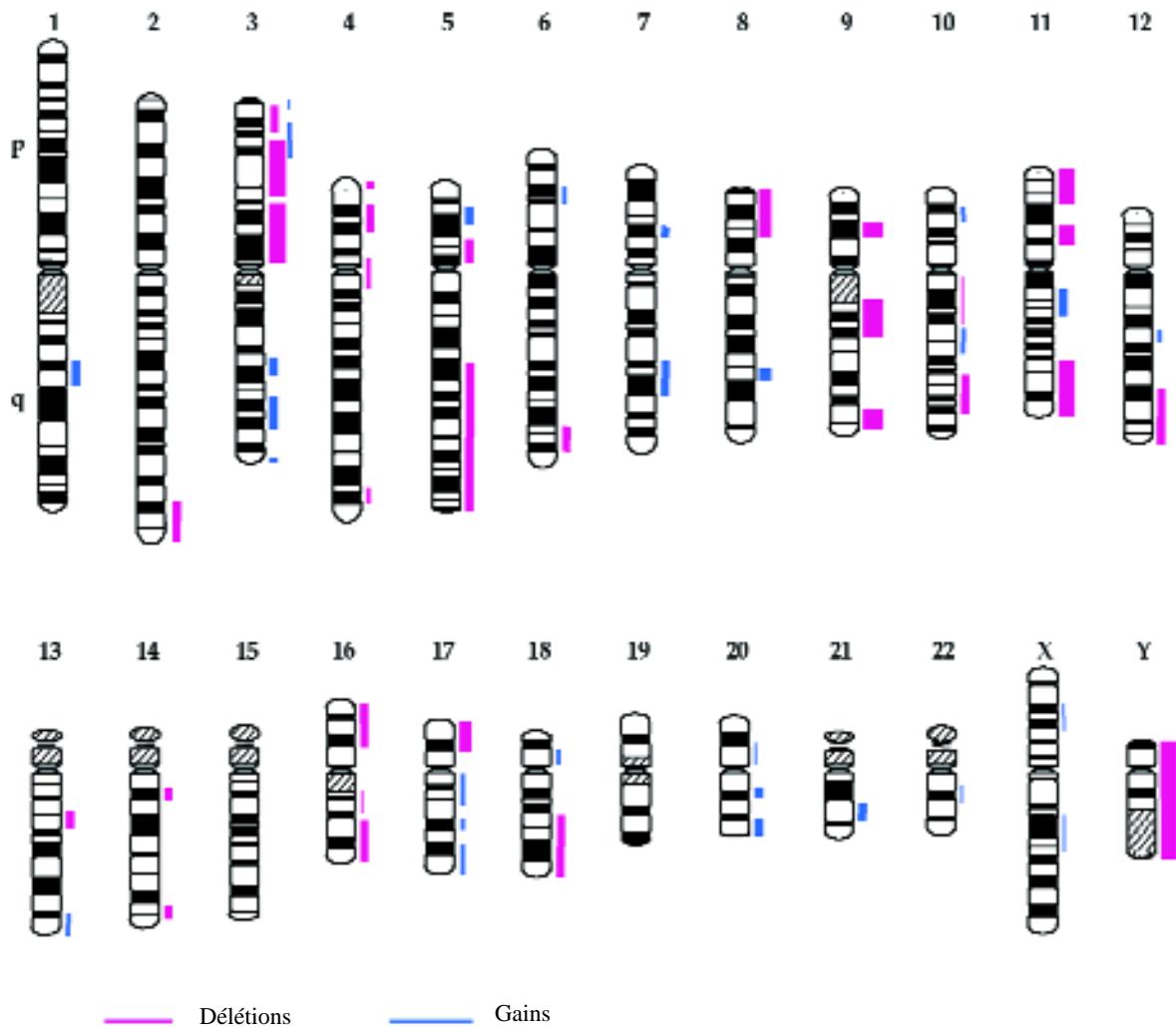


Figure 10 : Récapitulatif des anomalies chromosomiques dans les carcinomes de vessie.

1. LES PERTES DE MATERIEL GENETIQUE

a) Chromosome 2

Les monosomies et des anomalies structurales du chromosome 2, telles que la formation d'isochromosomes i(2p) et la présence de délétions terminales 2q-, entraînant la perte de matériel génétique sur le bras long du chromosome 2 (2q), avec une région commune de délétion dans la partie distale (2q14-qter), sont des altérations chromosomiques qui, sans être les principales, ont été décrites dans de nombreuses études cytogénétiques portant sur les carcinomes de vessie. Lorsqu'elles sont observées, ces altérations numériques ou structurales du chromosome 2 le sont préférentiellement dans les tumeurs de stade et/ou de grade élevés [146-150]. L'analyse de

polymorphismes de restriction a mis en évidence une incidence plus importante de pertes d'hétérozygotie sur le bras long (2q) par rapport au bras court (2p) du chromosome 2 et a confirmé la tendance à l'augmentation de la fréquence de ces altérations dans les tumeurs de stade et de grade élevés [151, 152]. La cytogénétique moléculaire, et plus particulièrement l'hybridation génomique comparative qui permet de donner, pour un type de cancer donné, une bonne approximation des régions chromosomiques affectées aussi bien par des gains que des pertes [153], a été récemment appliquée à l'étude des carcinomes de vessie [154-158]. Quatre laboratoires indépendants ont ainsi observé, sur un total de 147 échantillons tumoraux analysés, des pertes du chromosome 2q atteignant une fréquence de l'ordre de 20%,

avec une région minimale de délétion située en 2q36-qter [154, 156-158], région délétée dans de nombreux cancers dont les cancers de l'ovaire et les tumeurs germinales testiculaires [159]. Des événements de non-disjonction pouvant aboutir à une isodisomie pour une paire de chromosomes, tout comme des recombinaisons mitotiques conduisant à l'homozygotie d'un fragment chromosomique, ont été décrits dans les cancers et sont, de même que les délétions, suspectés être associés à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs [30, 135-138, 140]. Ces anomalies qualitatives du génome, tout comme les délétions interstitielles, ne peuvent être détectées que par une analyse moléculaire détaillée en ayant recours à l'utilisation de marqueurs génétiques polymorphes couvrant la région d'intérêt. Une telle analyse devrait permettre de préciser la fréquence des altérations du chromosome 2 dans les carcinomes de vessie et, compte-tenu de l'absence de gène candidat dans la région 2qter, de définir à l'échelle génétique, et non plus cytogénétique, une région minimale de délétion permettant une approche de clonage positionnel.

b) Chromosome 3

Le chromosome 3, et plus spécifiquement le bras court (3p), présente des délétions dans de nombreux types de cancers dont les cancers des voies aérodigestives supérieures (ORL), les cancers du rein, du poumon, du pancréas et du sein. Des anomalies conduisant à la perte de régions de ce chromosome ont été occasionnellement décrites dans des études cytogénétiques portant sur les carcinomes de la vessie [147, 149, 150]. Plus récemment, des études moléculaires rapportaient une fréquence de pertes d'hétérozygotie de 45% pour le bras long de chromosome (3q), observées préférentiellement dans les tumeurs de vessie invasives et de haut grade [160, 161]. Trois régions cibles ont été grossièrement définies en analysant 7 microsatellites polymorphes dans une série de carcinomes de vessie, affectant les loci 3p12-p14, 3p21-p23 et, plus rarement, 3p 24.2-p25 [162]. La délétion d'une de ces régions, en 3p21-p22, a été confirmée par des études d'hybridation génomique comparative [154, 157]. Ces pertes correspondent aux régions délétées dans les autres types tumoraux et plusieurs gènes candidats sont localisés dans ces régions. Le gène *FHIT* est localisé en 3p14.2, dans la région *FRA3B*, site fragile du génome au niveau du point de cassure d'une translocation

t(3;8)(p14.2;q24) associée à une forme familiale de cancer rénal et suspectée inactiver un gène suppresseur de tumeurs [163]. Son implication dans l'oncogénèse est toutefois controversée du fait de l'absence d'arguments génétiques prouvant clairement l'inactivation ce gène dans les cancers et de la variabilité des effets de sa ré-expression dans les cellules tumorales [164-166]. Le gène *hMLH1*, codant une des protéines du complexe de réparation des mésappariements de l'ADN, et dont les mutations germinales prédisposent à une forme héréditaire non-polyposée de carcinome colorectal, est situé dans la région 3p21-p23 [167, 168]. Son implication éventuelle dans les carcinomes de vessie a été suggérée [162], bien que, dans ce type de tumeurs, la rareté du phénotype mutateur caractéristique de l'inactivation de cette famille de gènes [169, 170], et surtout l'absence de corrélation entre l'instabilité des séquences répétées et les pertes d'hétérozygotie dans la région 3p21-p23 [162] ne favorise pas cette hypothèse. Le gène *TGF- β RII*, codant le récepteur de type II du TGF- β , est un autre gène suppresseur de tumeurs candidat dans la région 3p21-p22. Son inactivation dans les cancers colorectaux, conséquence du phénotype mutateur évoqué ci-avant, est favorable à cette hypothèse [171]. Jusqu'à présent, en plus des cancers du côlon, les mutations de ce gène ont été répertoriées dans un faible nombre de types tumoraux, dont les cancers gastriques [172]. Le gène suppresseur de tumeurs *VHL*, localisé en 3p24-p26, ne présente pas de mutations dans les cancers de la vessie et son implication semble limitée aux carcinomes rénaux [173]. Des travaux montrant que la méthylation de la région 5' du gène *VHL* aboutit à l'absence d'expression dans certaines tumeurs rénales suggèrent que l'inactivation de *VHL* ne requiert pas nécessairement une mutation [174]. Ce mécanisme n'a, à notre connaissance, pas été examiné dans les tumeurs de vessie.

c) Chromosome 4

Des anomalies du chromosome 4 ont été décrites dans une minorité de carcinomes de vessie par des études de cytogénétique conventionnelle [147-150]. Un allélotypage récent portant sur 83 cas de carcinomes de vessie mettait en évidence des pertes d'hétérozygotie sur le chromosome 4, en particulier sur le bras court (4p), dans 22% des tumeurs de vessie informatives pour les 4 polymorphismes de restriction analysés [152]. L'implication d'un ou plusieurs

gènes suppresseur de tumeurs localisés sur le chromosome 4 est par ailleurs fortement suggérée par la fréquence des pertes d'hétérozygotie affectant ce chromosome dans les cancers colorectaux, ovariens, cervicaux, les cancers des voies aéro-digestives supérieures et les carcinomes hépatocellulaires [175, 33, 176-179]. L'induction d'une réversion de la tumorigénicité de cellules tumorales après introduction d'un chromosome 4 normal constitue un argument fonctionnel quant à la présence sur ce chromosome d'un ou plusieurs gènes à potentiel suppresseur de tumeurs [180]. Deux études successives, analysant un grand nombre de microsatellites polymorphes sur un total cumulé de 460 carcinomes de vessie, ont confirmé la fréquence, comprise entre 20 et 30%, des pertes d'hétérozygotie affectant le bras court du chromosome 4 (4p) [181, 182] et montré que 24% des tumeurs présentaient des pertes d'hétérozygotie affectant le bras long (4q) [182]. La présence de pertes d'hétérozygotie sur le chromosome 4 est associée à la progression plutôt qu'à l'initiation des carcinomes de vessie [182]. Ces travaux visaient également à cartographier les pertes d'hétérozygotie sur le chromosome 4, ce qui n'avait jusqu'alors été fait dans aucun cancer, et donc de commencer à définir les régions susceptibles de renfermer des gènes suppresseurs de tumeurs. Quatre régions candidates ont été mises en évidence: deux sur le bras court au niveau des bandes cytogénétiques 4p15.1-p15.3 [182] et 4p16.3 [181, 183], une péri-centromérique entre les bandes 4p12 et 4q12 [181, 182], et une dernière sur le bras long, au niveau des bandes 4q33-q34 [182]. D'autres études portant sur les cancers du col de l'utérus suggèrent que, dans ce cancer également, les deux bras du chromosome 4 renferment des gènes suppresseurs [178, 184]. Dans les cancers de la sphère ORL et les carcinomes hépatocellulaires, en revanche, il semble que les gènes cibles soient localisés sur le bras long (4q) [175, 179].

d) Chromosome 5

Les altérations du chromosome 5 ont été en général sous-estimées lors de l'allélotypage et des études cytogénétiques conventionnelles et d'hybridation génomique comparative, malgré la description d'anomalies caryotypiques telles les isochromosomes i(5p) entraînant l'absence du bras long du chromosome 5 (5q) [146-150, 152, 154-158]. Une autre étude moléculaire a montré que les pertes d'hétérozygotie du bras long du chromosome 5 (5q) sont

en fait observées dans 28% des tumeurs analysées et semblent associées au franchissement de la membrane basale [161]. La fréquence des pertes alléliques sur le bras de chromosome 5q, comparable à celle observée dans les tumeurs colorectales (37%) [185, 33] dont l'étude a permis la localisation, dans la bande 5q21 [186], puis le clonage du gène *MCC* muté ou délété dans quelques cancers colorectaux [187] et du gène suppresseur de tumeurs *APC* muté dans les formes sporadique et familiale de carcinome colorectal [188, 189], suggère qu'un de ces gènes pourrait être altéré également dans les tumeurs de vessie. Cependant, l'absence d'étude cartographiant avec précision la région cible des altérations dans les cancers de vessie ne permet pas d'exclure, comme cela a été suggéré récemment, la présence d'un autre gène suppresseur de tumeurs sur le bras long du chromosome 5 [190]. Plus récemment, des pertes d'hétérozygotie affectant le locus *del-27*, proche d'un gène suppresseur de tumeurs potentiel délété dans les cancers bronchiques et cartographié sur le bras court du chromosome 5 (5p), dans la région 5p12-p13 [191, 192], ont été décrites dans 26% des carcinomes de vessie et sont spécifiquement associées à l'agressivité tumorale (invasion loco-régionale, dissémination métastatique ou survie), suggérant que ce locus pourrait être une cible également dans les tumeurs de vessie [193].

e) Chromosome 6

Observées occasionnellement lors d'analyses cytogénétiques [146, 147, 194, 148-150] et confirmées par l'hybridation génomique comparative [154, 157], les délétions du bras long du chromosome 6 (6q) affectent 25% des tumeurs de vessie et semblent spécifiques des tumeurs de haut grade envahissant le muscle [161]. Là encore, aucune cartographie précise des délétions n'a été réalisée, bien que l'examen des données de cytogénétique [146]; caryotype du chromosome 6 et d'hybridation génomique comparative [154, 158] suggère que la région télomérique 6q25-q26 soit la région minimale de délétion. Le gène *M6P/IGF2R* ("mannose 6-phosphate *IGF2* receptor"), localisé en 6q26-q27, est un gène candidat dans cette région [195-197].

f) Chromosome 8

Des monosomies du chromosome 8 et des pertes de matériel génétique sur le bras court (8p) ont été mises en évidence dans les carcinomes de vessie par

la cytogénétique conventionnelle [146, 147, 194, 148-150]. Des études moléculaires détaillées et l'hybridation génomique comparative ont pu établir la fréquence de ces anomalies, qui affectent 26% des tumeurs [198, 154, 156-158], tous stades et grades confondus, et sont particulièrement fréquentes dans les tumeurs invasives de haut grade (53%) [198]. Ces études ont également confirmé que la région cible était bien localisée sur le bras court, avec une région commune probable en 8p21-pter [198, 154, 199, 157], mais, du fait de la fréquence des pertes d'hétérozygotie affectant l'intégralité du bras court, n'ont pas pu affiner de façon irréfutable la région commune de délétion, l'examen attentif des résultats d'une étude ayant cet objectif laissant supposer une interprétation erronée pour certains marqueurs cruciaux définissant les points de cassures chromosomiques [199]. L'analyse d'autres types de carcinomes, tels les cancers du côlon, de la prostate, du poumon, du foie, du sein et des voies aéro-digestives supérieures, suggère qu'il y a plusieurs régions cibles sur le bras court du chromosome 8, en 8p12-p21, 8p21.3-p22, 8p23 [200-206]. La présence de gènes suppresseurs de tumeurs sur le bras court du chromosome 8 a été, en plus de ces approches de cartographie génétique, confirmée par les effets de transferts de fragments de chromosome 8 humain dans des lignées cellulaires de carcinomes colorectaux humains et de carcinomes prostatiques murins. Ces approches fonctionnelles ont démontré le potentiel suppresseur de tumorigénicité ou l'abolition des capacités métastatiques de fragments chromosomiques correspondants aux régions 8p12-p21 et 8p22-p23 [207-209]. Le gène *EXTL3* ("Exostose like 3 gene") [210], membre d'une famille de gènes suppresseurs de tumeurs potentiels [211-214], est un candidat dans la région 8p12-p22. Le gène *WRN* codant une hélicase et dont les mutations germinales sont responsables du syndrome de Werner, caractérisé par un vieillissement accéléré et la prédisposition à de nombreux cancers, est un autre candidat possible dans la région 8p11.1-p21.1 [215]. Le gène *PRLTS* ("*PDGF receptor beta like tumour suppressor*") est un candidat dans la région 8p21.3-p22 [216].

g) Chromosome 9

L'anomalie la plus fréquente et, semble-t-il, une des plus précoces identifiées dans les tumeurs urothéliales de vessie est la perte de matériel génétique sur

le chromosome 9. Elle concerne 52-54% des cas, et se manifeste soit par une monosomie (32-41% des cas), soit par des pertes interstitielles de la bande 9p21 (8-11% des cas) et/ou des régions 9q12-q21 et 9q34.1-q34.2 (5-15% des cas) [146, 147, 194, 148-150, 217-220, 152, 221, 154, 155, 222, 156-158]. En ce qui concerne la bande 9p21, les gènes suppresseurs de tumeurs *p16/MTS1/CDKN2A* et *p15/MTS2/CDKN2B* pourraient être les gènes cibles [95, 223, 96, 90, 97, 98, 106]. Les mutations de ces gènes sont rares mais des délétions homozygotes, affectant préférentiellement le gène *p16*, ont été rapportées dans plusieurs carcinomes, y compris ceux de la vessie, apportant un argument en faveur de l'implication de ce gène dans ces cancers. Le gène suppresseur de tumeurs *PTCH*, de même que le gène suppresseur de tumeur potentiel *GAS1*, tous deux cartographiés au locus 9q21-q22, ont été examinés dans des carcinomes de vessie présentant des pertes d'hétérozygotie intéressant le bras long du chromosome 9. Aucune mutation de ces gènes n'a été observée dans cette série, suggérant la présence, en 9q, d'au moins un autre gène inactivé au cours de la cancérogenèse urothéliale [222].

h) Chromosome 10

La cytogénétique conventionnelle [146, 147, 194, 148-150] et l'hybridation *in situ* fluorescente sur des noyaux interphasiques [224] ont mis en évidence dans les carcinomes de vessie des pertes complètes ou partielles du chromosome 10, affectant dans le second cas le bras long (10q). Ces anomalies sont passées pratiquement inaperçues dans deux études analysant 7 polymorphismes de restriction couvrant 2 loci sur le bras court (10p) et 4 loci sur le bras long (10q) [225, 152]. L'hybridation génomique comparative a néanmoins confirmé les résultats initiaux de la cytogénétique conventionnelle et interphasique en rapportant une fréquence des pertes de matériel sur le chromosome 10 de l'ordre de 20% [154, 156-158]. Cette approche a également permis une définition préliminaire de deux régions communes de délétion sur le bras long du chromosome 10, en 10q11-q21 [154, 155, 157] et en 10q24-q25 [154, 157]. Le chromosome 10, en particulier le bras long (10q), est sujet à des pertes dans de nombreux autres cancers dont les chondrosarcomes, les lymphomes non-Hodgkiniens, les tumeurs neurogliales, les mélanomes, les carcinomes de la prostate, du côlon et du rectum, du poumon, de l'endomètre, de l'ovai-

re, de la glande thyroïde, du sein, du rein et des voies aéro-digestives supérieures, et l'existence de plusieurs régions cibles indique la présence de plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs [226-229, 145, 230-237, 159]. L'inactivation très probable dans de nombreux cancers, y compris ceux de la vessie, d'un ou plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs localisées sur le chromosome 10 a conduit à étudier de façon systématique la fréquence des pertes affectant ce chromosome dans les tumeurs de la vessie et à préciser à l'échelle génétique les régions cibles des délétions dans le cancer de vessie [238].

i) Chromosome 11

Du point de vue cytogénétique, les anomalies numériques et structurales du chromosome 11 sont des événements rares dans les carcinomes de vessie, mais l'implication de ce chromosome a été toutefois soulignée dans la plupart des études [146, 147, 194, 148-150]. Guidés par la présence très vraisemblable d'un gène suppresseur de tumeurs sur le bras court du chromosome 11 (11p) [135-138, 140], Fearon et collaborateurs, ont mis en évidence des pertes d'hétérozygotie dans cette région dans 42% des cancers de vessie analysés [139]. Ces pertes ont été confirmées par d'autres études qui ont également, pour certaines, fait le lien entre la présence de ces altérations génétiques et des paramètres histopathologiques d'agressivité tumorale [239, 47, 160, 161, 152]. Les régions minimales de délétion ont été précisées, suggérant l'implication de 2 loci, l'un proximal, dans la bande 11p13 et l'autre distal, dans la bande 11p15.5 [240, 225, 241]. Plusieurs études récentes d'hybridation génomique comparative ont montré que non seulement le bras court, avec deux régions minimales en 11p12-p13 et 11p15-pter, mais aussi le bras long du chromosome 11, avec une région minimale en 11q23-qter, étaient affectés par des délétions [154-158].

Plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs potentiels sont localisés sur ce chromosome. Le niveau de transcrite du gène *KAI1*, localisé en 11p11.2, codant une protéine présentant des propriétés suppressives de métastases [242, 243], est fortement diminué dans les tumeurs de vessie, principalement celles de grade et de stade élevé [244]. Il serait donc intéressant de déterminer s'il existe une corrélation entre les pertes du bras chromosomique 11p et l'expression de *KAI1*. Les gènes *EXT2*, en 11p11-p12 [212] et *WT1*, en 11p13 [245-247] ont été évoqués précédemment. Le

gène *TSG101*, en 11p15.1-p15.2, n'est pas un candidat très robuste car, après l'enthousiasme lié à sa fonction potentielle de suppresseur de tumeurs [248], son implication proposée dans les cancers du sein [249] n'a pas été confirmée [250-252]. L'observation d'une mutation somatique du gène *TSSC5* associée à une perte d'hétérozygotie dans un cancer du poumon en fait un candidat dans la bande 11p15.5 [253]. De même, des mutations inactivatrices du gène *p57KIP2*, également localisé en 11p15.5 et codant un inhibiteur de kinases cyclines-dépendantes [254, 255], ont été observées dans le syndrome de Beckwith-Wiedemann, prédisposant à certaines tumeurs embryonnaires [256]. Enfin, le gène *ATM*, dont la fonction semble importante pour le maintien de la stabilité du génome [257], a été proposé comme candidat en 11q23 dans certains cancers, bien qu'une étude propose la présence d'un autre gène dans cette région [258].

j) Chromosome 12

La cytogénétique n'a mis en évidence que de rares cas d'anomalies structurales ou numériques du chromosome 12 qui ne sont pas retenues comme événements récurrents [146, 147, 194, 148-150]. Cependant, une étude d'hybridation génomique comparative portant sur une série de 26 tumeurs de vessie a mis en évidence des délétions de la région distale du bras long de ce chromosome, en 12q23-qter, dans 20% des cas [154] en accord avec ce qui avait rapporté dans des proportions moindres lors d'une étude systématique examinant un polymorphisme de restriction localisé en 12q24-qter pour 47 tumeurs de vessie [152] et compatible avec ce qui a été décrit pour les carcinomes colorectaux, bronchiques, mammaires, ovariens et les cancers des voies aéro-digestives supérieures [159]. Il pourrait donc exister, sur le bras long du chromosome 12, une région susceptible de renfermer un gène suppresseur de tumeurs inactivé dans les carcinomes de vessie, en 12q23-qter, qu'il faudrait préciser à l'échelle moléculaire.

k) Chromosome 13

Des délétions interstitielles du bras long du chromosome 13, dans la bande 13q14 où le gène de susceptibilité au rétinoblastome familial a été isolé [31, 32, 57], avaient été mises en évidence dans les carcinomes de vessie par la cytogénétique conventionnelle [146]. Des études épidémiologiques ont démontré

qu'en plus du risque élevé de développer des ostéosarcomes et des sarcomes des tissus mous, les patients ayant survécu à une forme familiale de rétinoblastome, ainsi que les membres de leur famille, avaient une incidence accrue et un âge d'apparition inférieur à ceux de la population générale pour les cancers de la vessie [259, 260]. Ces études suggéraient qu'une mutation germinale du gène *RB1* occasionnait également une prédisposition génétique aux carcinomes de la vessie. L'absence d'expression ou l'observation d'anomalies qualitatives de la protéine RB, associées à des délétions et des mutations ponctuelles du gène suppresseur de tumeurs *RB1* dans de nombreuses lignées cellulaires dérivées de carcinomes de vessie suggérait que ce gène pouvait être également altéré dans les cancers de vessie sporadiques [57, 261]. L'analyse de l'implication du gène *RB1* a été réalisée dans une grande série de tumeurs primaires de la vessie au moyen de sondes intragéniques, certaines révélant des polymorphismes de restriction. Ces travaux ont montré de fréquentes pertes d'hétérozygotie au niveau de la bande 13q14, limitées, au moins dans un certain nombre de cas, à la proximité du gène *RB1* et associées à l'absence de protéine RB, expliquée, dans deux cas, par des délétions homozygotes dans la région 5' du gène [262, 263]. Des mutations ponctuelles du gène *RB1* ont été par la suite mise en évidence dans les carcinomes de vessie [264]. Les anomalies du gène *RB1* et de son produit se sont révélées, sans y être restreintes, plus fréquentes dans les tumeurs de grade et de stade élevés, suggérant que l'inactivation fonctionnelle de RB faciliterait la progression tumorale [262, 160, 263]. Cette hypothèse a d'ailleurs été confirmée par des études montrant la valeur pronostique de l'évaluation du niveau d'expression de RB [265, 266]. Cet ensemble de résultats suggère fortement que le gène *RB1* est une cible majeure des délétions affectant le bras long du chromosome 13 dans les carcinomes de la vessie. Toutefois, l'absence d'étude systématique analysant les pertes d'hétérozygotie sur l'intégralité du bras de chromosome 13q dans les tumeurs de vessie ne permet pas d'exclure l'implication d'autres gènes dans cette région. Un locus candidat télomérique au gène *RB1* semble notamment mis en cause dans les lymphomes B [267]. Le gène *BRCA2*, cartographié en 13q12, pourrait également être examiné, bien qu'il ne semble que rarement muté dans les tumeurs sporadiques, y compris celles du sein auxquelles les mutations germinales de ce gène prédisposent [37].

l) Chromosome 14

L'examen de caryotypes de carcinomes de vessie a révélé la présence de monosomies du chromosome 14 et d'un cas de délétion du bras long, plus particulièrement de la région 14q22-qter [146, 147, 194, 148-150]. Une étude moléculaire analysant un polymorphisme de restriction sur le bras long du chromosome 14 (14q) et portant sur une vingtaine de tumeurs primaires de la vessie a mis en évidence des pertes d'hétérozygotie dans 21% des tumeurs [47]. L'analyse d'une série représentative de 285 carcinomes de la vessie au moyen de 4 microsatellites polymorphes couvrant le bras de chromosome 14q a confirmé cette estimation, rapportant des pertes d'hétérozygotie dans 25% des prélèvements, leur fréquence s'avérant associée à l'augmentation du stade des tumeurs [268]. L'utilisation de 13 microsatellites polymorphes supplémentaires a permis la définition de deux régions cibles, dans les bandes 14q12 et 14q32.1-q32.2 [268]. Des délétions complètes ou partielles du bras de chromosome 14q, avec une zone minimale commune en 14q31-q32, ont été également observées par l'hybridation génomique comparative pour les carcinomes de vessie [154, 155, 157]. La monosomie du chromosome 14 et la perte de matériel génétique dans la région 14q22-qter, parfois causée par des translocations non-équilibrées, est fréquente dans les carcinomes rénaux sporadiques [194, 269]. Des études systématiques ont également révélé des pertes du bras de chromosome 14q dans les cancers colorectaux, les carcinomes ovariens, les carcinomes de l'endomètre, des voies aéro-digestives supérieures, les méningiomes et les neuroblastomes, définissant, lorsque l'étude le permettait, des régions de délétions compatibles avec celles rapportées dans les carcinomes de vessie, en particulier dans la bande 14q32 [33, 176, 270-272, 179, 273, 268, 233]. Ces études suggèrent la présence sur le bras de chromosome 14q d'au moins un gène suppresseur de tumeurs impliqué dans la pathogénèse de cancers affectant de nombreux tissus d'origines embryologiques différentes.

m) Chromosome 16

Des monosomies du chromosome 16 et la présence de délétions terminales sur le bras long du chromosome 16 (16q), avec une région commune de délétion dans la partie distale (16q22-qter), ont été décrites dans les carcinomes de vessie par la cytogénétique conventionnelle, leur fréquence variant de

20 à 60% [147, 148]. D'autres études cytogénétiques n'ont révélé aucune anomalie de ce chromosome dans les carcinomes de vessie [146, 274, 149, 150] et l'analyse d'une soixantaine de tumeurs informatives pour 2 marqueurs polymorphes, localisés en 16p et 16q24, n'a mis en évidence qu'un nombre insignifiant de pertes d'hétérozygotie sur ce chromosome [152]. L'hybridation génomique comparative appliquée à l'étude des carcinomes de vessie a mis en évidence des délétions du chromosome 16 dans environ 15% des tumeurs [154-158]. Trois régions de délétion ont été mises en évidence, situées en 16q12-q13 [158], 16q22-qter [154-157] dont la perte semble associée avec l'invasion tumorale [157], et 16p12-pter [154], et pourraient être altérées dans de nombreux cancers [159]. L'allélotypage a donc totalement occulté l'implication du chromosome 16 dans les carcinomes de vessie [152], d'autant plus que la cytogénétique et l'hybridation génomique comparative, qui ont révélé des anomalies de ce chromosome, ne détectent que des délétions macroscopiques. A cet égard, l'étude détaillée des pertes d'hétérozygotie a révélé trois régions indépendantes, en 16q22.1, 16q23.1-q23.2 et 16q24.2-q24.3, susceptibles de renfermer des gènes suppresseurs impliqués dans l'initiation et la progression des adénocarcinomes mammaires et prostatiques [275-277].

La présence d'un gène suppresseur de tumeurs restant à identifier en 16q12-q13 est fortement suggérée par la liaison de marqueurs génétiques avec le locus *cyld1*, responsable de la cylindromatose familiale, et la présence dans les tumeurs de pertes d'hétérozygotie portant systématiquement sur l'allèle du parent non-affecté [278]. Deux gènes candidats sont localisés dans la région 16q22-qter. Le gène *CDH1*, codant la E-cadhérine, en 16q22.1, dont la diminution d'expression a été décrite dans les cancers de vessie et est corrélée avec l'agressivité clinique et biologique des cellules tumorales [70, 79]. Le mode d'inactivation de ce gène demeure obscur dans les carcinomes de vessie, bien qu'une étude portant sur un nombre limité de lignées cellulaires suggère que des changements de la structure chromatinienne et l'absence de facteurs de transcription pourraient être mis en cause [81, 83]. Le gène codant la H-cadhérine a été cartographié en 16q24.3 [279]. Cette autre molécule d'adhérence, dont l'expression est abrogée dans les carcinomes mammaires, inhibe la croissance *in vitro* de cellules issues de ces tumeurs et surtout abolit la clonogénicité en milieu semi-solide [279].

L'absence de gène candidat dans la région 16p12-pter suggère, là encore, la nécessité d'une approche de génétique moléculaire systématique.

n) *Chromosome 17*

La cytogénétique conventionnelle n'a révélé qu'un faible nombre de monosomies et d'anomalies structurales du chromosome 17 [146, 147, 194, 148-150]. Cependant, la fréquence des pertes d'hétérozygotie affectant le bras court de ce chromosome (17p) dans d'autres cancers, dont les cancers colorectaux, les cancers bronchiques à petites cellules et les cancers du sein, et surtout la mise en évidence de mutations du gène *p53*, localisé dans la bande 17p13.1, dans les cancers colorectaux [280] a conduit à l'étude des altérations de ce chromosome dans les carcinomes de vessie. De nombreuses pertes d'hétérozygotie du bras de chromosome 17p ont été mises en évidence [239, 47, 160] et sont, tout comme dans les cancers colorectaux, fréquemment associées à des mutations du gène *p53* [52, 177]. Les pertes d'hétérozygotie du bras de chromosome 17p et les mutations du gène *p53* sont corrélées avec l'augmentation du grade et du stade des tumeurs, suggérant que l'inactivation de *p53* est associée à la progression plutôt qu'à l'initiation des tumeurs de vessie [239, 160, 52, 281, 161]. Les altérations du chromosome 17 observées dans les carcinomes de vessie semblent limitées au bras court (17p), et en particulier à la région 17p12-pter, comme l'indiquent l'allélotypage et trois études d'hybridation génomique comparative portant sur ces tumeurs [152, 154, 157, 158]. L'absence d'étude moléculaire détaillée visant à définir la ou les régions communes de délétions sur le chromosome 17 ne permet donc pas d'exclure, malgré la fréquence des mutations du gène *p53*, l'implication d'un autre gène sur ce chromosome, en particulier sur le bras court, comme cela a été suggéré pour d'autres cancers. Le gène *HIC-1*, cartographié dans la bande 17p13.3, est un candidat [282].

o) *Chromosome 18*

La cytogénétique morphologique n'a, hormis quelques très rares cas de monosomies, décrit aucune autre anomalie du chromosome 18 dans les carcinomes de vessie [146-148]. La présence du gène *DCC*, un gène suppresseur de tumeurs potentiel dans les cancers colorectaux, sur le bras long de ce chromosome, en 18q21.3 [283] a conduit à l'étude des altérations du chromosome 18q dans les carcinomes

de vessie. Des pertes d'hétérozygotie du bras chromosomique 18q ont ainsi été mises en évidence dans 20% des tumeurs et sont presque exclusivement observées dans les tumeurs envahissant le muscle ($\geq T2$) [160, 151, 161]. Une étude plus récente, analysant 7 polymorphismes de restriction couvrant 5 loci sur le bras de chromosome 18q, a permis une localisation préliminaire de la région commune de délétion en 18q21-qter [284], région qui s'est également révélée délétée par l'hybridation génomique comparative [154, 156-158]. D'autres gènes candidats, *SMAD4/DPC4* et *SMAD2/MADR2/hMAD-2/JV18-1*, localisés en 18q21, codent des molécules de la voie de signalisation du récepteur du TGF- β [285-288]. L'importance de cette voie de signalisation dans la régulation du cycle cellulaire, déjà soulignée par l'inactivation de plusieurs composants de cette cascade dans les cancers, tels le récepteur TGF β -RII, l'inhibiteur de kinases cyclines-dépendantes P15/MTS2/CDKN2B et RB, protéines codées par des gènes qui sont tous situés dans des régions présentant de fréquentes pertes d'hétérozygotie dans les carcinomes de la vessie, suggère que l'implication des gènes *Mad* dans ces derniers n'est pas illusoire et a d'ailleurs été proposée pour *SMAD4/DPC4* après la mise en évidence d'une délétion homozygote dans une tumeur primaire vésicale [286] et mériterait une étude approfondie.

Enfin, la plupart des études d'hybridation génomique comparative montrent que, chez les patients de sexe masculin, la perte du chromosome Y est un événement fréquent [154, 156-158].

2. LES AMPLIFICATIONS GENIQUES

Contrairement aux tumeurs hématopoïétiques et aux sarcomes, les translocations chromosomiques récurrentes sont des événements relativement rares dans les carcinomes, aucune n'ayant été décrite dans les carcinomes de vessie [146, 147, 194, 148-150, 144, 145]. L'absence de translocations spécifiques dans les carcinomes, et en particulier les carcinomes de vessie, est en faveur de l'hypothèse de l'existence de mécanismes moléculaires de l'oncogenèse spécifiques du lignage cellulaire considéré [289]. Ajoutée à cette observation, la faible fréquence d'observation de chromosomes "double minutes" et de "HSR" ("*homogeneously staining regions*") [146, 194, 149, 150], anomalies cytogénétiques associées à l'amplification génique, suggère que, globalement, l'activa-

tion de proto-oncogènes, en tous cas par des remaniements chromosomiques macroscopiques, est rare dans les carcinomes de vessie. Toutefois, l'analyse caryotypique nécessite la mise en culture du matériel tumoral immédiatement après l'exérèse chirurgicale, étape délicate dans le cas des carcinomes de vessie [149, 150], entraînant de ce fait probablement un biais en faveur des cellules tumorales ayant un index mitotique élevé et limitant les possibilités d'étude à un nombre de cas relativement restreint. D'autre part, la difficulté d'obtention de préparations chromosomiques métaphasiques de qualité [149, 150], associée à la complexité des caryotypes [146, 147, 194, 148-150], rend difficile la description des anomalies numériques et structurales des chromosomes dans ces tumeurs. Le développement récent de techniques de cytogénétique moléculaires telles que l'hybridation génomique comparative, permettant une évaluation globale des altérations quantitatives du génome et en particulier donnant la localisation chromosomique de matériel amplifié [153], et le caryotype spectral, particulièrement adapté à l'identification de remaniements chromosomiques complexes [290, 291], laisse présumer la mise en évidence d'anomalies jusqu'alors cryptiques [291].

Ainsi, l'hybridation génomique comparative, portant sur un total de 173 tumeurs de vessie, dont 104 pour lesquelles les corrélations avec les paramètres anatomo-pathologiques étaient communiquées, a révélé plusieurs sites d'amplification génique dans les carcinomes de vessie [154-158].

a) Chromosome 1

L'amplification de séquences sur le bras long du chromosome 1 a été observée dans 23% des tumeurs [154-157], avec une région commune en 1q24-q25 [154, 157, 158] qui semble amplifiée lors de la transition Ta-T1 et qui pourrait jouer un rôle également dans la pathogénèse des mélanomes, des neuroblastomes, des tumeurs germinales du testicule et des tumeurs de Wilms [159].

b) Chromosome 3

Le chromosome 3 est affecté, en plus des pertes affectant plusieurs loci sur le bras court [161, 162], par des gains touchant également plusieurs loci. On notera des amplifications spécifiques du bras court [154-157], avec deux régions, en 3p22-p24 [155] et 3p25-p26 [157], observées respectivement dans une minorité de cas et dans 10% des tumeurs. En ce qui

concerne le bras long, dont les gains affectent environ 20% des tumeurs, une région commune consensus entre les différents auteurs est difficile à définir, suggérant l'implication potentielle de plusieurs loci en 3q23-q24, 3q25-q26 ou 3qter [153, 155-158].

d) Chromosome 5

La trisomie partielle du bras court du chromosome 5, due à la formation d'isochromosomes i(5p) [146-150], est un événement chromosomique rare qui semble, au vu de la fréquence des délétions complètes ou partielles du bras long du chromosome 5 [161, 154, 155, 157], être associé à la perte du 5q. Toutefois, la mise en évidence de gains sur le bras court du chromosome 5 dans 50% des tumeurs de vessie envahissant le muscle [157], dépassant la fréquence des pertes du bras long dans des tumeurs de stade équivalent [161], et surtout l'amplification de séquences localisées dans une région commune en 5p14-p15 dans un quart des tumeurs présentant ces gains [157], suggère que l'activation d'un proto-oncogène localisé dans cette région pourrait jouer un rôle dans la progression des tumeurs de vessie. Des gains spécifiques du bras de chromosome 5p ont également été observés dans les cancers bronchiques pour lesquels la perte du bras long ne semble pas jouer un rôle prépondérant, et dans les cancers colorectaux perdant le bras long par délétion plutôt que par la formation de chromosomes i(5p) [145, 159].

e) Chromosome 6

L'existence de gains spécifiques du bras court du chromosome 6 dans 15% des tumeurs [154-158], l'association de cette anomalie avec l'invasion tumorale [156, 157] et l'amplification de la bande 6p22 dans quelques tumeurs [156, 157] suggère l'activation, dans un sous-groupe de tumeurs invasives, d'un proto-oncogène localisé dans cette bande.

f) Chromosome 7

Des anomalies structurales et surtout numériques du chromosome 7, en particulier la trisomie qui semble être un événement relativement fréquent, ont été mises en évidence par la cytogénétique dans les tumeurs de vessie [146, 147, 194, 148-150], mais aussi dans de nombreux autres cancers [159]. Des trisomies et aneusomies du chromosome 7 ont d'ailleurs été également révélés par l'hybridation *in situ* fluorescente et sont observées dans 53% et 69% des tumeurs de vessie diploïdes et aneuploïdes, respectivement [292]. Ces gains du chromosome 7,

observés par la suite grâce à l'hybridation génomique comparative, semblent, lorsqu'ils n'intéressent pas l'intégralité du chromosome, cibler deux régions, en 7p14-p21 et 7q31 [154-158], suggérant la présence de gènes codant des régulateurs positifs de la croissance cellulaire. Un candidat possible sur le bras court est le proto-oncogène *ERBB1/EGFR* codant le récepteur de l'EGF ("*epidermal growth factor*"). Ce récepteur est surexprimé dans les cancers de vessie [22, 274, 293], mais le gène n'est qu'exceptionnellement amplifié dans ces tumeurs [274]. Sur le bras long, le proto-oncogène *MET*, localisé en 7q31-q32 et codant un récepteur tyrosine-kinase dont le ligand est l'HGF/SF ("*hepatocyte growth factor/scatter factor*"), est amplifié ou surexprimé dans différents cancers [294, 295] et activé par des mutations dans les formes sporadiques et familiales de carcinomes rénaux papillaires [296]. Il faut noter ici que, tout comme dans les tumeurs de vessie, ces tumeurs rénales présentent des trisomies du chromosome 7, la duplication portant sur l'allèle muté de *MET* [296], comme cela a été observé pour d'autres oncogènes dans des modèles murins de cancers [297-299]. Il serait donc extrêmement intéressant d'étudier le rôle de *MET* dans les tumeurs de vessie. Le proto-oncogène *Smoothed*, codant un récepteur à 7 domaines transmembranaires mis en jeu dans la signalisation de Sonic hedgehog (SHH) et pour lequel des mutations activatrices ont été mises en évidence dans les carcinomes cutanés, est un autre candidat dans la région 7q31-q32 [300].

g) Chromosome 8

Les gains du bras long du chromosome 8, associés à la transition Ta-T1 et concernant jusqu'à 70% des tumeurs invasives [301, 157], semblent être les gains les plus fréquents dans les tumeurs de vessie avec une fréquence de 30%, tous stades confondus [154-158]. La fréquence des gains du bras de chromosome 8q dans plusieurs cancers, en particulier les carcinomes colorectaux et les mélanomes [159], de même que l'amplification d'une région commune en 8q22-q23, affectant 12% des tumeurs de vessie [154, 156, 157], renforce encore l'hypothèse de la présence d'un proto-oncogène dans cette région. La zone minimale d'amplification a été précisée au niveau moléculaire en quantifiant, par PCR multiplex semi-quantitative, les déséquilibres alléliques pour des microsatellites informatifs couvrant la région commune d'amplification définie à partir de 4 tumeurs

[157]. Cette analyse a permis de définir un intervalle minimum de 7 centimorgans (cM) dans la bande 8q22.3, entre les marqueurs *GAAT1A4* et *D8S1834*, avec, pour 2 tumeurs, un pic d'amplification supérieur à 10 copies au locus *D8S1762*, situé à la position 147 cM, excluant le gène *c-myc*, localisé en 8q24, comme épïcentre de l'amplification, comme cela avait déjà été suggéré [302, 157].

h) Chromosome 10

L'augmentation du nombre de copies du bras court du chromosome 10 est observée dans 12% des tumeurs de vessie [154, 155, 157] et est associée à l'invasion locale. L'amplification de la région 10p13-p14 dans 5 tumeurs suggère l'implication d'un proto-oncogène dans un nombre restreint de tumeurs de vessie [155, 156]. D'autre part, une seule étude a montré des amplifications sur le bras long, dans la bande 10q22 [158]. Le bras long du chromosome 10 étant affecté majoritairement par des délétions, et ce dans un grand nombre de cancers, ces amplifications devront être confirmées par d'autres études avant d'être considérées, *RET*, le seul proto-oncogène cartographié dans cette région chromosomique, en 10q11, étant centromérique au locus amplifié.

j) Chromosome 11

Hormis les pertes qui affectent potentiellement plusieurs régions sur le chromosome 11 [240, 225, 154-158], des gains de la partie médiane du bras long ont été observés par hybridation génomique comparative dans les carcinomes de vessie. La fréquence de ces anomalies varie de 0 à 15% en fonction des études [154-158], mais l'existence d'une région commune d'amplification en 11q13 [156-158], corroborant une étude moléculaire plus ancienne [303], suggère l'implication d'un oncogène localisé dans cette bande dans une fraction des tumeurs de vessie, un candidat étant le proto-oncogène *CCND1* dont le produit, une cycline, contrôle l'entrée dans le cycle cellulaire et est activé dans certains cancers. L'amplification de séquences localisées en 11q13 ne semble pas associé ni au stade ni au grade des tumeurs [303, 156], indiquant une implication probable du gène cible dans les étapes précoces de la cancérisation.

k) Chromosome 12

Le bras long du chromosome 12 présente, en plus des délétions de la région distale [154], des gains de

la partie médiane dans les carcinomes de vessie. Ces gains, observés dans 12% des tumeurs, semblent associés à l'invasion et une région commune d'amplification, en 12q15, a été définie à partir de 6 tumeurs, [154-158]. Des proto-oncogènes putatifs amplifiés dans un certain nombre de cancers, dont les gliomes et surtout les sarcomes des tissus mous, ont été cartographiés dans cette bande [304, 305]. L'un de ces gènes, *MDM2*, dont le produit interagit la protéine p53, masquant son site activateur de transcription et inactivant ainsi ses propriétés suppressives de tumeurs [305], est également amplifié et/ou surexprimé dans environ 40% des tumeurs de vessie [306, 307] et représente donc un probable candidat. Des transcrits anormaux du gène *MDM2* codant des protéines possédant des propriétés oncogéniques accrues ont d'ailleurs été mis en évidence dans les carcinomes de vessie de grade et de stade élevés, corroborant cette hypothèse [308]. La délétion de certains domaines fonctionnels et les défauts d'interaction avec p53 suggèrent que ces oncoprotéines pourraient exercer leur pouvoir transformant par des mécanismes autres que l'inactivation de p53 [308].

l) Chromosome 13

Bien que le gène suppresseur de tumeur *RBI* semble être la cible de fréquentes délétions observées dans la bande 13q14 dans le carcinome de vessie, des gains récurrents au niveau du bras long du chromosome 13 ont été décrits dans ce même cancer [154-158], pouvant résulter dans un certain nombre de cas de trisomies du chromosome 13, comme le suggère l'analyse de sondes polymorphes sur le bras de chromosome 13q [139], ainsi que l'analyse de la région synténique, située sur le chromosome 14, dans les tumeurs de vessie chimio-induites chez la souris. La zone la plus susceptible de renfermer un proto-oncogène est la région 13q33-q34 [154-158], occasionnellement amplifiée dans les tumeurs de vessie [156]. La fréquence des gains du bras long du chromosome 13 dans les cancers colorectaux [159] confirme la possible implication, dans certains cancers, d'un proto-oncogène localisé dans cette région.

m) Chromosome 17

Contrairement au bras court qui présente fréquemment des pertes, en particulier dans les tumeurs invasives [239, 47, 160, 161, 152, 154, 157, 158], des gains du bras long du chromosome 17 sont observés

dans les carcinomes de vessie dans des proportions radicalement différentes en fonction de l'étude considérée [154-158]. Ces gains semblent plus fréquents dans les tumeurs de stade élevé [156, 158], et la région candidate principale est localisée en 17q22 bien qu'occasionnellement les régions 17q11-q21 et 17q24-q25 soient spécifiquement amplifiées [154-158]. Un proto-oncogène codant un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase apparenté au récepteur de l'EGF ("epidermal growth factor"), *ERBB2*, localisé dans la bande 17q21 et amplifié et/ou surexprimé dans d'autres cancers [309-314], a été étudié dans les cancers de vessie. L'amplification du gène *ERBB2* a été rapportée dans 6 à 14% des tumeurs de vessie analysées [315, 316, 306, 302] et est associée à la surexpression de l'ARN messager et de la protéine, également observées dans 35 à 40% des tumeurs ne présentant pas d'amplification [315, 317]. L'implication du proto-oncogène *ERBB2* semble plus fréquente dans les tumeurs de vessie de stade et de grade élevé [315, 317] et, lorsque l'on étudie plusieurs biopsies d'un même patient obtenues au cours de l'évolution de la maladie, l'amplification semble être associée avec la progression tumorale [315]. Ces différents résultats suggèrent que le gène *ERBB2* est la cible des amplifications affectant la bande 17q21.

n) Chromosome 18

En plus des pertes affectant la partie distale du bras long (18q21-qter), le chromosome 18 présente des gains dans environ 10% des tumeurs [154-158]. Un locus renfermant un proto-oncogène potentiel est situé en 18p11 et est fortement amplifié dans quelques tumeurs [155, 157]. Une étude rapporte également deux cas d'amplifications de la région 18q11-q12 dans une série de 48 tumeurs [157].

o) Chromosome 20

L'hybridation génomique comparative a mis en évidence des gains au niveau du chromosome 20 dans les carcinomes de vessie [154-158]. Plusieurs régions semblent mises en cause et les gains, en particulier pour le bras long, sont plus fréquents dans les tumeurs de stade supérieur ou égal à T1 [156, 157].

L'une d'entre elles, en 20q11-q12, amplifiée dans quelques lignées cellulaires et tumeurs primaires de vessie est située dans une région altérée par une translocation germinale t(5;20)(p15;q11) dans une forme familiale de carcinome de vessie [318], suggérant que l'activation d'un proto-oncogène localisé dans cette région pourrait être un événement important. Toutefois, le bras court du chromosome 5 (5p14-p15), est également amplifié dans une fraction importante des tumeurs de vessie invasives [157] et l'on ne peut donc pas exclure que le gène cible de cette translocation oncogénique soit situé en 5p15. Un gène candidat en 20q11 est le proto-oncogène *SRC*, dont le produit joue un rôle important dans la transduction de signaux oncogéniques, y compris dans un modèle expérimental de carcinome urothélial, comme l'ont montré plusieurs travaux [319, 320]. La région 20q13-qter semble également ciblée, comme le suggère la présence de déséquilibres ou d'amplifications dans un nombre limité de tumeurs de vessie [155, 157] et l'amplification en 20q13.2 observée au cours de la progression tumorale *in vitro* de cellules uro-épithéliales transformées par l'oncogène E7 du papillomavirus HPV16 [321]. Enfin, l'amplification de séquences sur le bras court du chromosome 20, avec une région commune en 20p11-p12, a été également observée dans quelques tumeurs [155, 157]. Le proto-oncogène *STK15/BTAK*, codant une sérine/thréonine kinase dont les propriétés oncogéniques semblent liées à sa capacité à induire l'instabilité chromosomique, est un candidat dans la bande 20q13 [322].

p) Chromosome 21

Des gains du bras long du chromosome 21, avec une région commune en 21q22.1 [154-158], ont également été observés dans les carcinomes de vessie, suggérant une implication possible d'un proto-oncogène localisé dans cette bande.

q) Chromosome 22 et X

Enfin, quelques cas exceptionnels de gains ou d'amplifications en 22q11-q13 [155], Xp21 [157] et Xq21-q22.2 [156] ont également suggérés la présence de proto-oncogènes putatifs.

III. MODELE DE PROGRESSION TUMORALE DANS LES CARCINOMES DE VESSIE

Il est important, lorsque l'on énumère les différentes anomalies chromosomiques et moléculaires observées dans un cancer donné et leur association avec des paramètres anatomo-pathologiques, de considérer que de telles anomalies ne peuvent être détectées sans ambiguïté que lorsqu'elles sont clonales dans une tumeur. Cette remarque s'applique particulièrement à la mise en évidence de pertes d'hétérozygotie, le seuil de significativité pour un déséquilibre allélique étant généralement fixé à 40-50%, affectant donc au moins une cellule sur deux dans le prélèvement analysé. De même, en cytogénétique conventionnelle, une anomalie chromosomique n'est répertoriée que si elle est observée simultanément dans plusieurs mitoses. Il en résulte un décalage difficile à estimer entre l'apparition d'une anomalie et sa détection dans la population des cellules cancéreuses. On peut donc considérer que la détection d'un événement biologique à une étape de la maladie cancéreuse reflète les propriétés concomitantes à cet événement (prolifération, invasion, dissémination, ou encore chimio et/ou radio-résistance) plutôt que l'étape à laquelle il est apparu ou la relation de cause (génotype) à effet (phénotype). En ce qui concerne les carcinomes de vessie, il faut également prendre en compte le fait que la progression des tumeurs papillaires Ta est un événement extrêmement rare (moins de 5% des cas) par rapport à ce qui est observé pour les tumeurs T1, en particulier celles de haut grade (40% des cas) [323, 324]. Il a donc été proposé qu'un pourcentage non négligeable de tumeurs envahissant la lame basale (T1) ou le muscle (\geq T2) pourrait avoir un carcinome *in situ* comme précurseur [325, 152], comme l'ont d'ailleurs confirmé les analyses moléculaires [326, 327].

Contrairement aux tumeurs papillaires superficielles (Ta) qui présentent essentiellement les mutations du FGFR3 et des anomalies du chromosome 9 et pourraient accumuler les autres au cours de leur évolution, les dysplasies et carcinomes *in situ* présentent d'emblée un grand nombre d'altérations génétiques qui sont observées dans les tumeurs invasives (Figure 11). En particulier les mutations du gène *p53*

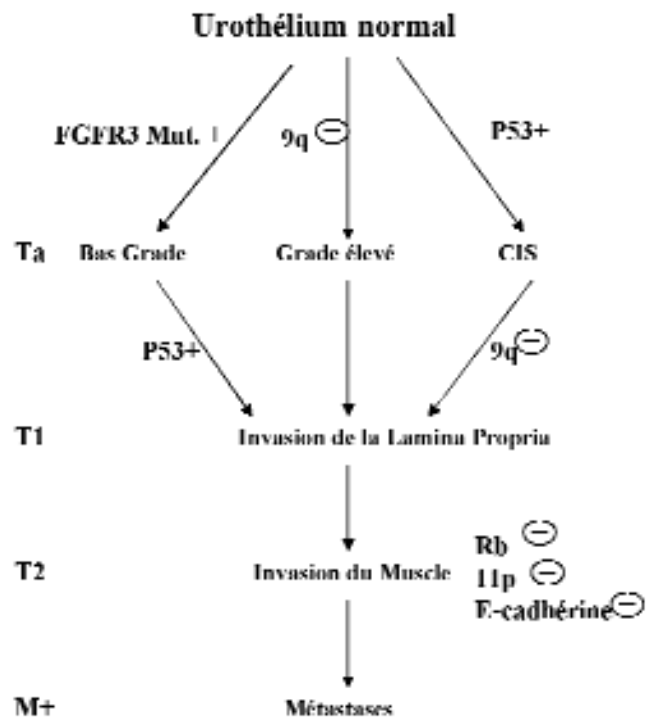


Figure 11 : Modèle génétique et moléculaire de progression du cancer de vessie. Ces précisions faites, on peut néanmoins, en plaçant sur une échelle représentant le stade et le grade des tumeurs les différentes anomalies génétiques et épigénétiques en fonction de leur fréquence à une étape donnée de l'évolution tumorale, proposer un modèle génétique de la progression des carcinomes de vessie, comme cela a déjà été fait par les groupes de Bert Vogelstein, Gilles Thomas et Webster Cavenee pour les cancers colorectaux et les astrocytomes [328-331]. Comme pour les carcinomes colorectaux [330, 331], deux voies de tumorigénèse distinctes sont proposées pour les carcinomes de vessie: la voie des tumeurs papillaires et la voie des dysplasies/carcinomes *in situ* [161, 325, 332, 326, 327] (Figure 11).

et les pertes d'hétérozygotie des bras de chromosomes 3p, 4p, 4q, 5q, 8p, 9p, 9q, 11p, 11q, 13q, 14q, 17p et 18q [326, 327], les pertes des chromosomes 2, 6, 10 et 16, observées dans une proportion significative des tumeurs de vessie, de même que les amplifications géniques, n'ayant pas été évaluées dans les carcinomes *in situ*. Les tumeurs papillaires, dont l'évolution est rare et lente, sont caractérisées par l'accumulation progressive d'altérations génétiques, alors que les carcinomes *in situ* évoluent rapidement et présentent de nombreuses altérations génétiques. Récemment, l'étude de cultures primaires de carcinomes de vessie a montré que l'inactivation soit du gène *p16/INK4A* (9p21) soit du gène *RBI* (13q14) est nécessaire pour permettre aux cellules tumorales

d'outrepasser la sénescence et d'acquérir un phénotype malin [333]. Elle a également confirmé que les altérations de ces deux gènes suppresseurs de tumeurs agissant dans la même voie sont généralement mutuellement exclusives dans les carcinomes de vessie.

IV. MECANISMES DES ALTERATIONS GENETIQUES IMPLIQUEES DANS LA CARCINOGENESE UROTHELIALE. FACTEURS DE SUSCEPTIBILITE GENETIQUE ET ENVIRONNEMENTALE

Nous envisageons dans cette partie les mécanismes exogènes et endogènes impliqués dans la genèse des altérations génétiques précédemment décrites en fonction du polymorphisme génétique de l'hôte (le terrain).

Les xénobiotiques subissent des biotransformations faisant intervenir différents systèmes métaboliques et pouvant conduire à l'apparition de dérivés électrophiles très réactifs en cas d'hyperactivité enzymatique et/ou d'accumulation de carcinogènes lorsque les voies de détoxification sont déficientes [334].

1. ACETYLTRANSFERASES ET XENOBIOTIQUES

Une des voies de détoxification est celle des *N*-acétyltransférases (NATs), dont le polymorphisme génétique est connu depuis environ 40 ans [335]. Ce polymorphisme est à l'origine de variations interindividuelles de la biotransformation de différents xénobiotiques porteurs d'amine aromatique ou de structure d'hydrazine [336]. Ainsi, plusieurs carcinogènes sont métabolisés par les NATs, tels les acétoxy-esters, les arylamines, les amines hétérocycliques et le 4-aminobiphényle [337, 338]. De plus, la *N*-acétyltransférase rentre en compétition avec la *N*-hydroxylation, qui transforme les arylamines (amines aromatiques) en carcinogènes actifs [336].

a) Polymorphisme génétique des *N*-acétyltransférases

Chez l'Homme, trois gènes NAT ont été découverts : *NAT1*, *NAT2* et *NATP*. Le gène *NATP* est considéré comme un pseudo-gène car il n'est pas exprimé. Les deux autres, localisés dans des locus très voisins du chromosome 8, jouent des rôles complémentaires

dans l'acétylation des xénobiotiques. En effet, *NAT2* a une sensibilité pour des substrats polymorphes, dont la disposition est affectée par le phénotype d'acétylation dans la population humaine. Des substances comme l'isoniazide, la sulfaméthazine ou la caféine sont métabolisées par *NAT2*. A l'opposé, *NAT1* métabolise de façon élective des substrats monomorphes, dont la disposition n'est pas affectée par le phénotype d'acétylation. L'acide *p*-aminosalicylique est métabolisé par *NAT1* [336]. Des études *in vitro* et *in vivo* ont démontré l'indépendance d'expression des NATs [339, 340]. Certains composés sont tout de même acétylés à la fois par *NAT1* et *NAT2* : benzidine, 4-aminobiphényle, 2-naphtylamine, 4,4-dichloroaniline et autres amines aromatiques [336].

Des tests phénotypiques et génotypiques ont mis en évidence plusieurs allèles pour chacun des locus *NAT1* et *NAT2* chez l'Homme. Ces différents variants sont représentés dans les Tableaux 6 et 7.

Il existe des corrélations entre le phénotype, le génotype et le niveau de l'activité enzymatique [336]. Ainsi, la présence de l'allèle *NAT1*10* est associée à une activité *NAT1* plus élevée dans l'urothélium vésical et la muqueuse colique. Par ailleurs, dans la muqueuse colique de ces patients il existe un niveau plus élevé d'adduits à l'ADN [341, 342].

La distribution de la prévalence des phénotypes et génotypes *NAT1* et *NAT2* lents, n'est pas la même selon les groupes ethniques. Ainsi, la prédominance du génotype *NAT1* lent est retrouvée chez 71% de Caucasiens Britanniques, chez 57% de Caucasiens Français et chez 50% d'Américains. De même, le génotype *NAT2* lent est rencontré chez 60% de Caucasiens Germaniques, chez 53% de Caucasiens Américains. A l'opposé, chez les populations de l'Extrême-Orient (Chine, Japon) le génotype rapide est largement prédominant [336].

b) Risque carcinogène associé aux différents génotypes NAT : exemple du cancer vésical induit par les amines aromatiques

Les amines aromatiques sont normalement transformées (par le cytochrome P4501A2 hépatique) en *N*-hydroxylarylamines pouvant former des adduits par interaction avec l'hémoglobine et l'urothélium vésical. Leur détoxification est possible grâce aux *N*-acétyltransférases hépatiques. Il a été rapporté [341] que les individus acétylateurs lents ont un risque accru

Tableau 6 : Les allèles variants du locus NAT1 humain d'après Vatsis et coll. [343] et Grant et coll. [344].

Allèle	Conséquence <i>in vitro</i>	Conséquence <i>in vivo</i>
NAT1*4	Type sauvage (wild type)	
NAT1*3	Non connues	
NAT1*5	Non connues	
NAT1*10	≠ NAT1	
NAT1*11	↑ Vmax	↑ NAT1
NAT1*14	↓ affinité	↓ NAT1
NAT1*15	Pas de NAT1 (codon stop)	↓ NAT1
NAT1*16	Non connues	

Tableau 7 : Les allèles variants du locus NAT2 humain d'après Vatsis et coll. [343] et Grant et coll. [344].

Allèle	Phénotype	Conséquence <i>in vitro</i>	Conséquence <i>in vivo</i>
NAT2*4	Rapide	Type sauvage (wild type)	
NAT2*5A	Lent	↓ Vmax	↓ NAT2
NAT2*5B	Lent		
NAT2*5C	Lent		
NAT2*6A	Lent	↓ stabilité	↓ NAT2
NAT2*6B	Lent		
NAT2*7A	Lent	↓ stabilité	↓ NAT2
NAT2*7B	Lent	↑ affinité	
NAT2*12A	Rapide	Pas de conséquence	
NAT2*12B	Rapide		
NAT2*13	Rapide		
NAT2*14A	Lent	↓ stabilité	↓ NAT2
NAT2*14B	Lent		
NAT2*17	Non connu	Non connues	
NAT2*18	Non connu	Non connues	

d'apparition de tumeur vésicale, du fait de la détoxification réduite des métabolites N-hydroxylés des amines aromatiques par les N-acétyltransférases NAT1 et NAT2. De plus, le tissu vésical contient des N-acétyltransférases pouvant intervenir dans une étape ultérieure d'activation des N-hydroxylarylamines en esters N-acétoxy, qui forment des adduits avec l'ADN des cellules urothéliales de la vessie.

Les différentes études génotypiques ont démontré une association entre un génotype NAT2 lent et le risque de cancer vésical induit par les amines aro-

matiques [345]. De même, l'allèle NAT1*10 prédominant est associé à un risque de cancer vésical induit par le tabac [346].

Si le rôle de l'activité des enzymes de l'acétylation dans l'apparition du cancer de vessie a été établi, les deux enzymes NAT1 et NAT2, n'ont pas le même impact dans la détoxification des arylamines chez les fumeurs. Plusieurs études ont démontré que la N-acétyltransférase 2 joue un rôle mineur, sans différence significative entre fumeurs et non-fumeurs [347]. Taylor et coll. ont étudié l'impact des poly-

morphismes NAT1 sur le cancer vésical induit par le tabac [348]. Les auteurs ont démontré que lorsque les gènes sont considérés sans tenir compte du facteur tabagisme, un faible risque est associé à l'allèle *NAT1*10*. A l'opposé, lorsque les gènes et le tabagisme sont pris en compte simultanément, le risque lié à l'allèle *NAT1*10* dépend à la fois de la durée d'exposition et du génotype : il est faible chez les individus non porteurs de l'allèle *NAT1*10*, intermédiaire chez les porteurs hétérozygotes et élevé chez les homozygotes pour ce gène. Il apparaît alors que la N-acétyltransférase 1 présente un polymorphisme génétique qui influe sur le risque d'apparition de tumeur vésicale, qui dépend en plus du tabagisme (quantité, durée). Ce risque est majoré chez les patients fumeurs ayant une activité NAT2 lente. En effet, il est intéressant de noter ici que le génotype *NAT2*, qui joue un rôle mineur lorsqu'il est considéré seul ou en combinaison avec le tabagisme, devient déterminant lorsqu'il est considéré en conjonction avec le génotype *NAT1* et le tabac [348]. Au total, le risque de cancer vésical est le plus élevé chez les sujets acétyleurs NAT2 lents et homozygotes pour *NAT1*10* ; il est moyen chez les acétyleurs NAT2 lents et hétérozygotes *NAT1*10* ; toutes les autres combinaisons ont un faible risque. Il s'agit là d'un modèle de triple interaction gène-gène-environnement. Le mécanisme proposé en serait le suivant : chez un sujet acétyleur rapide, les arylamines sont rapidement détoxifiées par le foie, de façon que seul un faible taux gagne l'urothélium avant d'être soumis à l'action de NAT1. Par conséquent, chez un sujet acétyleur NAT2 rapide, son génotype *NAT1* aura un faible impact sur le risque de cancer vésical. En revanche, la détoxification incomplète chez les acétyleurs lents donne lieu à une plus grande quantité d'arylamine hydroxylée dans l'urothélium vésical ; le rôle de NAT1 devient alors déterminant [348].

c) Risque carcinogène lié aux variations génétiques d'autres systèmes

Par ailleurs, le génotype homozygote déficient de l'activité enzymatique de la Glutathion-S-transférase M1 (GSTM1), qui détoxifie les hydrocarbures aromatiques polycycliques (par la catalyse de leur glucuroconjugaison avec le glutathion ou GSH), est associé à un risque accru de tumeur de vessie en particulier chez les fumeurs. Il ne serait par contre pas associé à un risque accru de tumeur chez les individus exposés à des cancérogènes vésicaux professionnels. De la même façon, le génotype GSTP1b homozygote

(résultant d'une substitution d'un acide aminé qui altère la fonction enzymatique) serait associé à un risque d'apparition de carcinome urothélial 3,6 fois plus élevé que pour le génotype sauvage [349].

d) Instabilité génétique

La survenue spontanée de mutations est un événement rare dans les cellules normales (10^{-7} mutation par gène par division) [1]. Dans les tumeurs malignes, ce nombre de mutations est plus élevé, ce qui pourrait s'expliquer par une absence de stabilité de leur génome [350].

Cette instabilité porte plus préférentiellement sur des séquences de l'ADN appelées microsatellites (zones du génome constituées par d'unités oligonucléotidiques (comportant de 1 à 6 nucléotides) répétées un certain nombre de fois [1]). Différents systèmes de gènes semblent être impliqués dans cette instabilité génétique, parmi lesquels les systèmes de réparation des mésappariements de l'ADN. Ainsi, la forme familiale de cancer colique non lié à une polyposé (HNPCC pour *hereditary non polyposis colorectal cancer*) est à la fois caractérisée par une instabilité génétique portant dans les régions des microsatellites et par des mutations des gènes de réparation des mésappariements *hMSH2* et *hMLH1* [351]. Cette association n'est pas obligatoire ; en effet, l'instabilité des microsatellites peut exister en l'absence de toute mutation de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN [1].

e) Modèles de cancérisation progressive

Pendant la transformation d'une cellule normale en cellule maligne, plusieurs altérations géniques successives sont nécessaires (Figure 12). L'étude de la plupart des modèles animaux suggère que chez l'Homme des altérations et insuffisances de quatre voies de signalisation intracellulaire sont nécessaires à cette transformation cancéreuse de la cellule [352].

La promotion et la progression tumorale (Figure 13) sont le support de l'induction de la prolifération cellulaire par une substance carcinogène. En effet, suite à l'accumulation d'erreurs et de modifications génétiques, la cellule échappe progressivement aux mécanismes de contrôle. Ainsi, l'épithélium colique devient hyperplasique sous l'influence du gène *APC*, avant de donner lieu à des adénomes puis au carcinome, suite à l'activation de proto-oncogènes (*Ki-ras*) et à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur (*p53*) [33, 353].

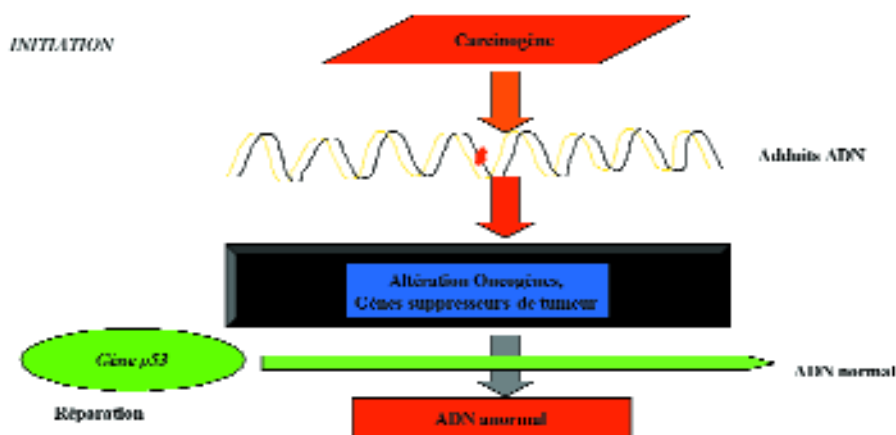


Figure 12 : Mécanismes de carcinogenèse : INITIATION

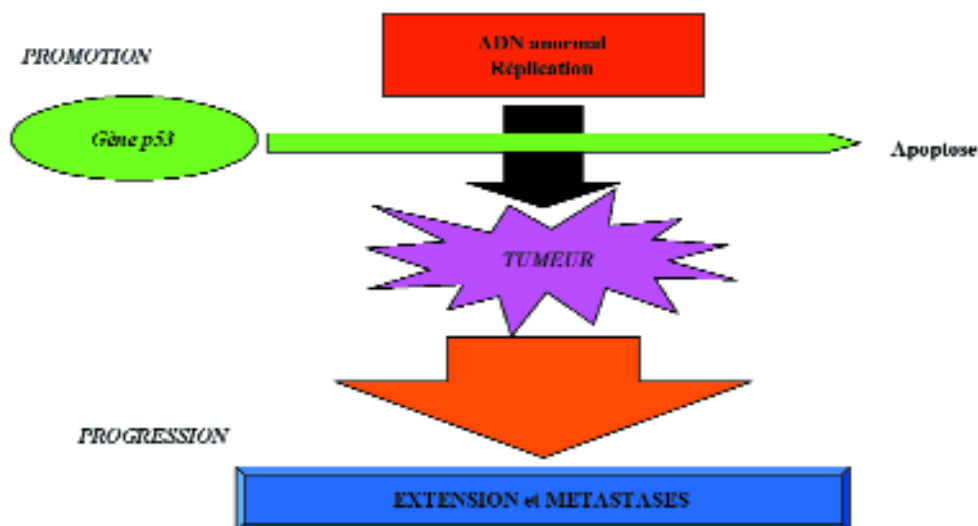


Figure 13 : Mécanismes de carcinogenèse : Promotion et Progression Tumorales

V. SYNTHÈSE : LES DIFFÉRENTES ÉTAPES DE LA CANCÉROGENÈSE

Dans les systèmes d'expérimentation animale, les mécanismes de carcinogenèse ont été classés en trois grandes étapes : initiation, promotion et progression. Dans ces systèmes, il est possible de mettre en évidence l'action spécifique d'un agent cancérigène à une étape précise. En cancérogenèse humaine, aucune de ces étapes n'est obligatoire et il n'existe aucune standardisation à ce niveau. Plus que ces trois étapes classiques, la carcinogenèse est le résultat d'une accumulation d'altérations génétiques et de

variations dans la prolifération conduisant à la perte de l'homéostasie cellulaire et tissulaire. Dans ce processus complexe, certains agents cancérigènes peuvent agir de façon précoce (initiation) ou plus tardive (progression).

Ainsi, après l'exposition à un toxique (procarcinogène), celui-ci est habituellement métabolisé par l'organisme, ce qui assure sa transformation en carcinogène. A ce niveau, les possibilités d'inactivation et/ou d'élimination dépendent des systèmes enzymatiques qui assurent son métabolisme (phase I : fonctionnalisation ; phase II : détoxification ou détoxification). L'initiation du processus tumoral peut survenir

à ce stade, suite à une ou plusieurs altérations génétiques. Celles-ci sont le résultat de l'action directe du toxique sur l'ADN ou de son action sur l'ARN ou encore sur les systèmes enzymatiques de la réplication. Les possibilités de contrôle et de réparation à ce niveau dépendent de l'intégrité des gènes suppresseurs de tumeurs, en particulier du gène p53. Les altérations de l'expression génique et les mécanismes de la prolifération cellulaire peuvent ensuite transformer cette cellule précancéreuse en une population distincte de cellules cancéreuses. A ce stade, le développement tumoral peut être accéléré (« promotion ») par d'autres carcinogènes (par exemple, d'origine nutritionnelle). Sous l'influence de l'accumulation d'altérations génétiques, la tumeur progresse d'abord localement, puis en envahissant les tissus avoisinants et distants (métastase) [301].

REFERENCES

- 1 FAJAC A. and BERNAUDIN J.-F., 2001, Aspects moléculaires de la carcinogénèse et états précancéreux, J.-C. Pairon, P. Brochard, J.-P. Le Bourgeois and P. Ruffié, Paris, Margaux Orange, Tome I, 3-20
- 2 HUNTER T. Oncoprotein networks. *Cell*; 1997; 88: 333-46.
- 3 SCHLESSINGER J., PLOTNIKOV A.N., IBRAHIMI O.A., ELISEENKOVA A.V., YEH B.K., YAYON A., LINHARDT R.J. and MOHAMMADI M. Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Mol Cell*; 2000; 6: 743-50.
- 4 BONAVENTURE J., ROUSSEAU F., LEGEAI-MALLET L., LE MERRER M., MUNNICH A. and MAROTEAUX P. Common mutations in the fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) gene account for achondroplasia, hypochondroplasia, and thanatophoric dwarfism. *Am J Med Genet*; 1996; 63: 148-54.
- 5 WEBSTER M.K. and DONOGHUE D.J. Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor 3 by the transmembrane domain point mutation found in achondroplasia. *Embo J*; 1996; 15: 520-7.
- 6 CHESI M., NARDINI E., BRENTS L.A., SCHROCK E., RIED T., KUEHL W.M. and BERGSAGEL P.L. Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet*; 1997; 16: 260-4.
- 7 RICHELDA R., RONCHETTI D., BALDINI L., CRO L., VIGGIANO L., MARZELLA R., ROCCHI M., OTSUKI T., LOMBARDI L., MAIOLO A.T. and NERI A. A novel chromosomal translocation t(4; 14)(p16.3; q32) in multiple myeloma involves the fibroblast growth-factor receptor 3 gene. *Blood*; 1997; 90: 4062-70.
- 8 FRACCHIOLLA N.S., LUMINARI S., BALDINI L., LOMBARDI L., MAIOLO A.T. and NERI A. FGFR3 gene mutations associated with human skeletal disorders occur rarely in multiple myeloma. *Blood*; 1998; 92: 2987-9.
- 9 CHESI M., NARDINI E., LIM R.S., SMITH K.D., KUEHL W.M. and BERGSAGEL P.L. The t(4;14) translocation in myeloma dysregulates both FGFR3 and a novel gene, MMSET, resulting in IgH/MMSET hybrid transcripts. *Blood*; 1998; 92: 3025-34.
- 10 STEC I., WRIGHT T.J., VAN OMMEN G.J., DE BOER P.A., VAN HAERINGEN A., MOORMAN A.F., ALTHERR M.R. and DEN DUNNEN J.T. WHSC1, a 90 kb SET domain-containing gene, expressed in early development and homologous to a Drosophila dysmorphia gene maps in the Wolf-Hirschhorn syndrome critical region and is fused to IgH in t(4;14) multiple myeloma. *Hum Mol Genet*; 1998; 7: 1071-82.
- 11 CAPPELLEN D., DE OLIVEIRA C., RICOL D., DE MEDINA S., BOURDIN J., SASTRE-GARAU X., CHOPIN D., THIERY J.P. and RADVANYI F. Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. *Nat Genet*; 1999; 23: 18-20.
- 12 BILLEREY C., CHOPIN D., AUBRIOT-LORTON M.H., RICOL D., GIL DIEZ DE MEDINA S., VAN RHIJN B., BRALET M.P., LEFRERE-BELDA M.A., LAHAYE J.B., ABBOU C.C., BONAVENTURE J., ZAFRANI E.S., VAN DER KWAST T., THIERY J.P. and RADVANYI F. Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors. *Am J Pathol*; 2001; 158: 1955-9.
- 13 VAN RHIJN B.W., LURKIN I., RADVANYI F., KIRKELS W.J., VAN DER KWAST T.H. and ZWARTHOFF E.C. The fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) mutation is a strong indicator of superficial bladder cancer with low recurrence rate. *Cancer Res*; 2001; 61: 1265-8.
- 14 BITTARD H., DESCOTES F., BILLEREY C., LAMY B. and ADESSI G.R. A genotype study of the c-Ha-ras-1 locus in human bladder tumors. *J Urol*; 1996; 155: 1083-8.
- 15 FUJITA J., SRIVASTAVA S.K., KRAUS M.H., RHIM J.S., TRONICK S.R. and AARONSON S.A. Frequency of molecular alterations affecting ras protooncogenes in human urinary tract tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 1985; 82: 3849-53.
- 16 KNOWLES M.A. and WILLIAMSON M. Mutation of H-ras is infrequent in bladder cancer: confirmation by single-strand conformation polymorphism analysis, designed restriction fragment length polymorphisms, and direct sequencing. *Cancer Res*; 1993; 53: 133-9.
- 17 VIOLA M.V., FROMOWITZ F., ORAVEZ S., DEB S. and SCHLOM J. ras Oncogene p21 expression is increased in premalignant lesions and high grade bladder carcinoma. *J Exp Med*; 1985; 161: 1213-8.
- 18 ZHANG Z.T., PAK J., HUANG H.Y., SHAPIRO E., SUN T.T., PELLICER A. and WU X.R. Role of Ha-ras activation in superficial papillary pathway of urothelial tumor formation. *Oncogene*; 2001; 20: 1973-80.
- 19 DESCOTES F., BITTARD H., BITTARD M. and ADESSI

- G.L.[Restriction polymorphism of C-HA-ras-1 locus in bladder tumors]. *Bull Cancer*; 1993; 80: 653-8.
- 20 MESSING E.M., FAHEY J.L., DEKERNION J.B., BHUTA S.M. and BUBBERS J.E.Serum-free medium for the in vitro growth of normal and malignant urinary bladder epithelial cells. *Cancer Res*; 1982; 42: 2392-7.
- 21 MESSING E.M.Clinical implications of the expression of epidermal growth factor receptors in human transitional cell carcinoma. *Cancer Res*; 1990; 50: 2530-7.
- 22 NEAL D.E., MARSH C., BENNETT M.K., ABEL P.D., HALL R.R., SAINSBURY J.R. and HARRIS A.L.Epidermal-growth-factor receptors in human bladder cancer: comparison of invasive and superficial tumours. *Lancet*; 1985; 1: 366-8.
- 23 RAVERY V., GRIGNON D., ANGULO J., PONTES E., MONTIE J., CRISSMAN J. and CHOPIN D.Evaluation of epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, epidermal growth factor and c-erbB2 in the progression of invasive bladder cancer. *Urol Res*; 1997; 25: 9-17.
- 24 EL-MARJOU A., DELOUVEE A., THIERY J.P. and RADVANYI F.Involvement of epidermal growth factor receptor in chemically induced mouse bladder tumour progression. *Carcinogenesis*; 2000; 21: 2211-8.
- 25 THOGERSEN V.B., SORENSEN B.S., POULSEN S.S., ORNTOFT T.F., WOLF H. and NEXO E.A subclass of HER1 ligands are prognostic markers for survival in bladder cancer patients. *Cancer Res*; 2001; 61: 6227-33.
- 26 HARRIS H., MILLER O.J., KLEIN G., WORST P. and TACHIBANA T.Suppression of malignancy by cell fusion. *Nature*; 1969; 223: 363-8.
- 27 KNUDSON A.G., JR.Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 1971; 68: 820-3.
- 28 COMINGS D.E.A general theory of carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 1973; 70: 3324-8.
- 29 KNUDSON A.G., JR.Retinoblastoma: a prototypic hereditary neoplasm. *Semin Oncol*; 1978; 5: 57-60.
- 30 CAVENEE W.K., DRYJA T.P., PHILLIPS R.A., BENEDICT W.F., GODBOUT R., GALLIE B.L., MURPHREE A.L., STRONG L.C. and WHITE R.L.Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature*; 1983; 305: 779-84.
- 31 FRIEND S.H., BERNARDS R., ROGELJ S., WEINBERG R.A., RAPAPORT J.M., ALBERT D.M. and DRYJA T.P.A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature*; 1986; 323: 643-6.
- 32 LEE W.H., BOOKSTEIN R., HONG F., YOUNG L.J., SHEW J.Y. and LEE E.Y.Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. *Science*; 1987; 235: 1394-9.
- 33 VOGELSTEIN B., FEARON E.R., KERN S.E., HAMILTON S.R., PREISINGER A.C., NAKAMURA Y. and WHITE R.Allelotype of colorectal carcinomas. *Science*; 1989; 244: 207-11.
- 34 CLURMAN B. and GROUDINE M.Tumour-suppressor genes. Killer in search of a motive? *Nature*; 1997; 389: 122-3.
- 35 HABER D. and HARLOW E.Tumour-suppressor genes: evolving definitions in the genomic age. *Nat Genet*; 1997; 16: 320-2.
- 36 KINZLER K.W. and VOGELSTEIN B.Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature*; 1997; 386: 761, 763.
- 37 KINZLER K.W. and VOGELSTEIN B.Landscaping the cancer terrain. *Science*; 1998; 280: 1036-7.
- 38 LEVINE A.J.p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*; 1997; 88: 323-31.
- 39 CARSON D.A. and LOIS A.Cancer progression and p53. *Lancet*; 1995; 346: 1009-11.
- 40 HOLLSTEIN M., SIDRANSKY D., VOGELSTEIN B. and HARRIS C.C.p53 mutations in human cancers. *Science*; 1991; 253: 49-53.
- 41 SHERR C.J.Cancer cell cycles. *Science*; 1996; 274: 1672-7.
- 42 CHUMAKOV P.M. and JENKINS J.R.BstNI/NciI polymorphism of the human p53 gene (TP53). *Nucleic Acids Res*; 1991; 19: 6969.
- 43 CORDON-CARDO C., DALBAGNI G., SAEZ G.T., OLIVA M.R., ZHANG Z.F., ROSAI J., REUTER V.E. and PELLICER A.p53 mutations in human bladder cancer: genotypic versus phenotypic patterns. *Int J Cancer*; 1994; 56: 347-53.
- 44 BEROUD C. and SOUSSI T.p53 gene mutation: software and database. *Nucleic Acids Res*; 1998; 26: 200-4.
- 45 VET J.A., BRINGUIER P.P., SCHAAFSMA H.E., WITJES J.A., DEBRUYNE F.M. and SCHALKEN J.A.Comparison of P53 protein overexpression with P53 mutation in bladder cancer: clinical and biologic aspects. *Lab Invest*; 1995; 73: 837-43.
- 46 POPOV Z., HOZNEK A., COLOMBEL M., BASTUJ-GARIN S., LEFRERE-BELDA M.A., BELLOT J., ABBOH C.C., MAZEROLLES C. and CHOPIN D.K.The prognostic value of p53 nuclear overexpression and MIB-1 as a proliferative marker in transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer*; 1997; 80: 1472-81.
- 47 TSAI Y.C., NICHOLS P.W., HITI A.L., WILLIAMS Z., SKINNER D.G. and JONES P.A.Allelic losses of chromosomes 9, 11, and 17 in human bladder cancer. *Cancer Res*; 1990; 50: 44-7.
- 48 GREENBLATT M.S., BENNETT W.P., HOLLSTEIN M. and HARRIS C.C.Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*; 1994; 54: 4855-78.
- 49 WARREN W., BIGGS P.J., EL-BAZ M., GHONEIM M.A., STRATTON M.R. and VENITT S.Mutations in the p53 gene in schistosomal bladder cancer: a study of 92 tumours from Egyptian patients and a comparison between mutational spectra from schistosomal and non-schistosomal urothelial tumours. *Carcinogenesis*; 1995; 16: 1181-9.
- 50 ESRIG D., SPRUCK C.H., 3RD, NICHOLS P.W., CHAIWUN B., STEVEN K., GROSHEN S., CHEN S.C., SKINNER D.G., JONES

- P.A. and COTE R.J. p53 nuclear protein accumulation correlates with mutations in the p53 gene, tumor grade, and stage in bladder cancer. *Am J Pathol*; 1993; 143: 1389-97.
- 51 LACOMBE L., DALBAGNI G., ZHANG Z.F., CORDON-CARDO C., FAIR W.R., HERR H.W. and REUTER V.E. Overexpression of p53 protein in a high-risk population of patients with superficial bladder cancer before and after bacillus Calmette- Guerin therapy: correlation to clinical outcome. *J Clin Oncol*; 1996; 14: 2646-52.
- 52 SIDRANSKY D., VON ESCHENBACH A., TSAI Y.C., JONES P., SUMMERHAYES I., MARSHALL F., PAUL M., GREEN P., HAMILTON S.R., FROST P. and ET AL. Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science*; 1991; 252: 706-9.
- 53 SIDRANSKY D. and HOLLSTEIN M. Clinical implications of the p53 gene. *Annu Rev Med*; 1996; 47: 285-301.
- 54 VET J.A., WITJES J.A., MARRAS S.A., HESSELS D., VAN DER POEL H.G., DEBRUYNE F.M. and SCHALKEN J.A. Predictive value of p53 mutations analyzed in bladder washings for progression of high-risk superficial bladder cancer. *Clin Cancer Res*; 1996; 2: 1055-61.
- 55 McSHANE L.M., AAMODT R., CORDON-CARDO C., COTE R., FARAGGI D., FRADET Y., GROSSMAN H.B., PENG A., TAUBE S.E. and WALDMAN F.M. Reproducibility of p53 immunohistochemistry in bladder tumors. National Cancer Institute, Bladder Tumor Marker Network. *Clin Cancer Res*; 2000; 6: 1854-64.
- 56 CHOPIN D. [p53 and prognosis of urothelial bladder tumors]. *Pathol Biol (Paris)*; 1997; 45: 893-7.
- 57 HOROWITZ J.M., YANDELL D.W., PARK S.H., CANNING S., WHYTE P., BUCHKOVICH K., HARLOW E., WEINBERG R.A. and DRYJA T.P. Point mutational inactivation of the retinoblastoma antioncogene. *Science*; 1989; 243: 937-40.
- 58 CLARKE A.R., MAANDAG E.R., VAN ROON M., VAN DER LUGT N.M., VAN DER VALK M., HOOPER M.L., BERNS A. and TE RIELE H. Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development. *Nature*; 1992; 359: 328-30.
- 59 JACKS T., FAZELI A., SCHMITT E.M., BRONSON R.T., GOODELL M.A. and WEINBERG R.A. Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature*; 1992; 359: 295-300.
- 60 LEE E.Y., CHANG C.Y., HU N., WANG Y.C., LAI C.C., HERRUP K., LEE W.H. and BRADLEY A. Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. *Nature*; 1992; 359: 288-94.
- 61 MAANDAG E.C., VAN DER VALK M., VLAAR M., FELTKAMP C., O'BRIEN J., VAN ROON M., VAN DER LUGT N., BERNS A. and TE RIELE H. Developmental rescue of an embryonic-lethal mutation in the retinoblastoma gene in chimeric mice. *Embo J*; 1994; 13: 4260-8.
- 62 BREHM A., MISKA E.A., McCANCE D.J., REID J.L., BANNISTER A.J. and KOUZARIDES T. Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature*; 1998; 391: 597-601.
- 63 DEPINHO R.A. Transcriptional repression. The cancer-chromatin connection. *Nature*; 1998; 391: 533, 535-6.
- 64 MAGNAGHI-JAULIN L., GROISMAN R., NAGUIBNEVA I., ROBIN P., LORAIN S., LE VILLAIN J.P., TROALEN F., TROUCHE D. and HAREL-BELLAN A. Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase. *Nature*; 1998; 391: 601-5.
- 65 PEEPER D.S., UPTON T.M., LADHA M.H., NEUMAN E., ZALVIDE J., BERNARDS R., DECAPRIO J.A. and EWEN M.E. Ras signalling linked to the cell-cycle machinery by the retinoblastoma protein. *Nature*; 1997; 386: 177-81.
- 66 COTE R.J., DUNN M.D., CHATTERJEE S.J., STEIN J.P., SHI S.R., TRAN Q.C., HU S.X., XU H.J., GROSHEN S., TAYLOR C.R., SKINNER D.G. and BENEDICT W.F. Elevated and absent pRb expression is associated with bladder cancer progression and has cooperative effects with p53. *Cancer Res*; 1998; 58: 1090-4.
- 67 CORDON-CARDO C., ZHANG Z.F., DALBAGNI G., DROBNJAK M., CHARYTONOWICZ E., HU S.X., XU H.J., REUTER V.E. and BENEDICT W.F. Cooperative effects of p53 and pRB alterations in primary superficial bladder tumors. *Cancer Res*; 1997; 57: 1217-21.
- 68 GROSSMAN H.B., LIEBERT M., ANTELO M., DINNEY C.P., HU S.X., PALMER J.L. and BENEDICT W.F. p53 and RB expression predict progression in T1 bladder cancer. *Clin Cancer Res*; 1998; 4: 829-34.
- 69 MAHONEY P.A., WEBER U., ONOFRECHUK P., BIESSMANN H., BRYANT P.J. and GOODMAN C.S. The fat tumor suppressor gene in *Drosophila* encodes a novel member of the cadherin gene superfamily. *Cell*; 1991; 67: 853-68.
- 70 FRIKEN U.H., BEHRENS J., SACHS M., EBERLE G., VOSS B., WARDA A., LOCHNER D. and BIRCHMEIER W.E. Cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol*; 1991; 113: 173-85.
- 71 VLEMINCKX K., VAKAET L., JR., MAREEL M., FIERS W. and VAN ROY F. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell*; 1991; 66: 107-19.
- 72 PERL A.K., WILGENBUS P., DAHL U., SEMB H. and CHRISTOFORI G. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature*; 1998; 392: 190-3.
- 73 BECKER K.F., ATKINSON M.J., REICH U., HUANG H.H., NEKARDA H., SIEWERT J.R. and HOFLER H. Exon skipping in the E-cadherin gene transcript in metastatic human gastric carcinomas. *Hum Mol Genet*; 1993; 2: 803-4.
- 74 BECKER K.F., ATKINSON M.J., REICH U., BECKER I., NEKARDA H., SIEWERT J.R. and HOFLER H. E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. *Cancer Res*; 1994; 54: 3845-52.
- 75 ODA T., KANAI Y., OYAMA T., YOSHIURA K., SHIMOYAMA Y., BIRCHMEIER W., SUGIMURA T. and HIROHASHI S. E-cadherin gene mutations in human gastric carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 1994; 91: 1858-62.
- 76 GUILFORD P., HOPKINS J., HARRAWAY J., McLEOD M., McLEOD N., HARAWIRA P., TAITE H., SCOLAR R., MILLER

- A. and REEVE A.E.E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature*; 1998; 392: 402-5.
- 77 RISINGER J.I., BERCHUCK A., KOHLER M.F. and BOYD J. Mutations of the E-cadherin gene in human gynecologic cancers. *Nat Genet*; 1994; 7: 98-102.
- 78 BERX G., CLETON-JANSEN A.M., NOLLET F., DE LEEUW W.J., VAN DE VIJVER M., CORNELISSE C. and VAN ROY F.E. cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers. *Embo J*; 1995; 14: 6107-15.
- 79 BRINGUIER P.P., UMBAS R., SCHAAFSMA H.E., KARTHAUS H.F., DEBRUYNE F.M. and SCHALKEN J.A. Decreased E-cadherin immunoreactivity correlates with poor survival in patients with bladder tumors. *Cancer Res*; 1993; 53: 3241-5.
- 80 GRAFF J.R., HERMAN J.G., LAPIDUS R.G., CHOPRA H., XU R., JARRARD D.F., ISAACS W.B., PITHA P.M., DAVIDSON N.E. and BAYLIN S.B. E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer Res*; 1995; 55: 5195-9.
- 81 HENNIG G., BEHRENS J., TRUSS M., FRISCH S., REICHMANN E. and BIRCHMEIER W. Progression of carcinoma cells is associated with alterations in chromatin structure and factor binding at the E-cadherin promoter in vivo. *Oncogene*; 1995; 11: 475-84.
- 82 YOSHIURA K., KANAI Y., OCHIAI A., SHIMOYAMA Y., SUGIMURA T. and HIROHASHI S. Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 1995; 92: 7416-9.
- 83 HENNIG G., LOWRICK O., BIRCHMEIER W. and BEHRENS J. Mechanisms identified in the transcriptional control of epithelial gene expression. *J Biol Chem*; 1996; 271: 595-602.
- 84 GRAFF J.R., GREENBERG V.E., HERMAN J.G., WESTRA W.H., BOGHAERT E.R., AIN K.B., SAJI M., ZEIGER M.A., ZIMMER S.G. and BAYLIN S.B. Distinct patterns of E-cadherin CpG island methylation in papillary, follicular, Hurthle's cell, and poorly differentiated human thyroid carcinoma. *Cancer Res*; 1998; 58: 2063-6.
- 85 LARUE L., OHSUGI M., HIRCHENHAIN J. and KEMLER R.E. cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 1994; 91: 8263-7.
- 86 GIROLDI L.A., BRINGUIER P.P. and SCHALKEN J.A. Defective E-cadherin function in urological cancers: clinical implications and molecular mechanisms. *Invasion Metastasis*; 1994; 14: 71-81.
- 87 DE MEDINA S.G., POPOV Z., CHOPIN D.K., SOUTHGATE J., TUCKER G.C., DELOUVEE A., THIERY J.P. and RADVANYI F. Relationship between E-cadherin and fibroblast growth factor receptor 2b expression in bladder carcinomas. *Oncogene*; 1999; 18: 5722-6.
- 88 GIROLDI L.A., SHIMAZUI T., SCHALKEN J.A., YAMASAKI H. and BRINGUIER P.P. Classical cadherins in urological cancers. *Morphologie*; 2000; 84: 31-8.
- 89 POPOV Z., GIL-DIEZ DE MEDINA S., LEFRERE-BELDA M.A., HOZNEK A., BASTUJI-GARIN S., ABBOU C.C., THIERY J.P., RADVANYI F. and CHOPIN D.K. Low E-cadherin expression in bladder cancer at the transcriptional and protein level provides prognostic information. *Br J Cancer*; 2000; 83: 209-14.
- 90 KAMB A., GRUIS N.A., WEAVER-FELDHaus J., LIU Q., HARSHMAN K., TAVTIGIAN S.V., STOCKERT E., DAY R.S., 3RD, JOHNSON B.E. and SKOLNICK M.H. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science*; 1994; 264: 436-40.
- 91 CALDAS C., HAHN S.A., DA COSTA L.T., REDSTON M.S., SCHUTTE M., SEYMOUR A.B., WEINSTEIN C.L., HRUBAN R.H., YEO C.J. and KERN S.E. Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet*; 1994; 8: 27-32.
- 92 HUSSUSSIAN C.J., STRUEWING J.P., GOLDSTEIN A.M., HIGGINS P.A., ALLY D.S., SHEAHAN M.D., CLARK W.H., JR., TUCKER M.A. and DRACOPOLI N.C. Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat Genet*; 1994; 8: 15-21.
- 93 LUKAS J., PARRY D., AAGAARD L., MANN D.J., BARTKOVA J., STRAUSS M., PETERS G. and BARTEK J. Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature*; 1995; 375: 503-6.
- 94 SERRANO M., GOMEZ-LAHOZ E., DEPINHO R.A., BEACH D. and BAR-SAGI D. Inhibition of ras-induced proliferation and cellular transformation by p16INK4. *Science*; 1995; 267: 249-52.
- 95 CAIRNS P., MAO L., MERLO A., LEE D.J., SCHWAB D., EBY Y., TOKINO K., VAN DER RIET P., BLAUGRUND J.E. and SIDRANSKY D. Rates of p16 (MTS1) mutations in primary tumors with 9p loss. *Science*; 1994; 265: 415-7.
- 96 DEVLIN J., KEEN A.J. and KNOWLES M.A. Homozygous deletion mapping at 9p21 in bladder carcinoma defines a critical region within 2cM of IFNA. *Oncogene*; 1994; 9: 2757-60.
- 97 SPRUCK C.H., 3RD, GONZALEZ-ZULUETA M., SHIBATA A., SIMONEAU A.R., LIN M.F., GONZALES F., TSAI Y.C. and JONES P.A. p16 gene in uncultured tumours. *Nature*; 1994; 370: 183-4.
- 98 CAIRNS P., POLASCIK T.J., EBY Y., TOKINO K., CALIFANO J., MERLO A., MAO L., HERATH J., JENKINS R., WESTRA W. and ET AL. Frequency of homozygous deletion at p16/CDKN2 in primary human tumours. *Nat Genet*; 1995; 11: 210-2.
- 99 SERRANO M., LEE H., CHIN L., CORDON-CARDO C., BEACH D. and DEPINHO R.A. Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell*; 1996; 85: 27-37.
- 100 MAO L., MERLO A., BEDI G., SHAPIRO G.I., EDWARDS C.D., ROLLINS B.J. and SIDRANSKY D. A novel p16INK4A transcript. *Cancer Res*; 1995; 55: 2995-7.
- 101 QUELLE D.E., ZINDY F., ASHMUN R.A. and SHERR C.J. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell*; 1995; 83: 993-1000.
- 102 STONE S., JIANG P., DAYANANTH P., TAVTIGIAN S.V.,

- KATCHER H., PARRY D., PETERS G. and KAMB A. Complex structure and regulation of the P16 (MTS1) locus. *Cancer Res*; 1995; 55: 2988-94.
- 103 KAMIJO T., ZINDY F., ROUSSEL M.F., QUELLE D.E., DOWNING J.R., ASHMUN R.A., GROSVELD G. and SHERR C.J. Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell*; 1997; 91: 649-59.
- 104 POMERANTZ J., SCHREIBER-AGUS N., LIEGEOIS N.J., SILVERMAN A., ALLAND L., CHIN L., POTES J., CHEN K., ORLOW I., LEE H.W., CORDON-CARDO C. and DEPINHO R.A. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell*; 1998; 92: 713-23.
- 105 KRIMPENFORT P., QUON K.C., MOOI W.J., LOONSTRA A. and BERNS A. Loss of p16Ink4a confers susceptibility to metastatic melanoma in mice. *Nature*; 2001; 413: 83-6.
- 106 WILLIAMSON M.P., ELDER P.A., SHAW M.E., DEVLIN J. and KNOWLES M.A. p16 (CDKN2) is a major deletion target at 9p21 in bladder cancer. *Hum Mol Genet*; 1995; 4: 1569-77.
- 107 JEN J., HARPER J.W., BIGNER S.H., BIGNER D.D., PAPADOPOULOS N., MARKOWITZ S., WILLSON J.K., KINZLER K.W. and VOGELSTEIN B. Deletion of p16 and p15 genes in brain tumors. *Cancer Res*; 1994; 54: 6353-8.
- 108 HERMAN J.G., MERLO A., MAO L., LAPIDUS R.G., ISSA J.P., DAVIDSON N.E., SIDRANSKY D. and BAYLIN S.B. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res*; 1995; 55: 4525-30.
- 109 HERMAN J.G., CIVIN C.I., ISSA J.P., COLLECTOR M.I., SHARKIS S.J. and BAYLIN S.B. Distinct patterns of inactivation of p15INK4B and p16INK4A characterize the major types of hematological malignancies. *Cancer Res*; 1997; 57: 837-41.
- 110 HANNON G.J. and BEACH D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature*; 1994; 371: 257-61.
- 111 KNOWLES M.A. What we could do now: molecular pathology of bladder cancer. *Mol Pathol*; 2001; 54: 215-21.
- 112 OGAWA O., BECROFT D.M., MORISON I.M., ECCLES M.R., SKEEN J.E., MAUGER D.C. and REEVE A.E. Constitutional relaxation of insulin-like growth factor II gene imprinting associated with Wilms' tumour and gigantism. *Nat Genet*; 1993; 5: 408-12.
- 113 OGAWA O., ECCLES M.R., SZETO J., MCNOE L.A., YUN K., MAW M.A., SMITH P.J. and REEVE A.E. Relaxation of insulin-like growth factor II gene imprinting implicated in Wilms' tumour. *Nature*; 1993; 362: 749-51.
- 114 WEKSBERG R., SHEN D.R., FEI Y.L., SONG Q.L. and SQUIRE J.D. Disruption of insulin-like growth factor 2 imprinting in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nat Genet*; 1993; 5: 143-50.
- 115 EDEN S. and CEDAR H. Genomic imprinting. Action at a distance. *Nature*; 1995; 375: 16-7.
- 116 FERGUSON-SMITH A.C., SASAKI H., CATTANACH B.M. and SURANI M.A. Parental-origin-specific epigenetic modification of the mouse H19 gene. *Nature*; 1993; 362: 751-5.
- 117 DRYJA T.P., MUKAI S., PETERSEN R., RAPAPORT J.M., WALTON D. and YANDELL D.W. Parental origin of mutations of the retinoblastoma gene. *Nature*; 1989; 339: 556-8.
- 118 LEACH R.J., MAGEWU A.N., BUCKLEY J.D., BENEDICT W.F., ROTHER C., MURPHREE A.L., GRIEGEL S., RAJEWSKY M.F. and JONES P.A. Preferential retention of paternal alleles in human retinoblastoma: evidence for genomic imprinting. *Cell Growth Differ*; 1990; 1: 401-6.
- 119 BAYLIN S.B., HERMAN J.G., GRAFF J.R., VERTINO P.M. and ISSA J.P. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res*; 1998; 72: 141-96.
- 120 GAMA-SOSA M.A., WANG R.Y., KUO K.C., GEHRKE C.W. and EHRLICH M. The 5-methylcytosine content of highly repeated sequences in human DNA. *Nucleic Acids Res*; 1983; 11: 3087-95.
- 121 LANDOLPH J.R. and JONES P.A. Mutagenicity of 5-azacytidine and related nucleosides in C3H/10T 1/2 clone 8 and V79 cells. *Cancer Res*; 1982; 42: 817-23.
- 122 SANTI D.V., NORMENT A. and GARRETT C.E. Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 1984; 81: 6993-7.
- 123 JACKSON-GRUSBY L. and JAENISCH R. Experimental manipulation of genomic methylation. *Semin Cancer Biol*; 1996; 7: 261-8.
- 124 HAAFT. The effects of 5-azacytidine and 5-azadeoxycytidine on chromosome structure and function: implications for methylation-associated cellular processes. *Pharmacol Ther*; 1995; 65: 19-46.
- 125 CHEN R.Z., PETTERSSON U., BEARD C., JACKSON-GRUSBY L. and JAENISCH R. DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature*; 1998; 395: 89-93.
- 126 LAIRD P.W., JACKSON-GRUSBY L., FAZELI A., DICKINSON S.L., JUNG W.E., LI E., WEINBERG R.A. and JAENISCH R. Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation. *Cell*; 1995; 81: 197-205.
- 127 RIDEOUT W.M., 3RD, COETZEE G.A., OLUMI A.F. and JONES P.A. 5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes. *Science*; 1990; 249: 1288-90.
- 128 MAGEWU A.N. and JONES P.A. Ubiquitous and tenacious methylation of the CpG site in codon 248 of the p53 gene may explain its frequent appearance as a mutational hot spot in human cancer. *Mol Cell Biol*; 1994; 14: 4225-32.
- 129 JACKSON-GRUSBY L., LAIRD P.W., MAGGE S.N., MOELLER B.J. and JAENISCH R. Mutagenicity of 5-aza-2'-deoxycytidine is mediated by the mammalian DNA methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 1997; 94: 4681-5.
- 130 KAUTIAINEN T.L. and JONES P.A. DNA methyltransferase levels in tumorigenic and nontumorigenic cells in culture. *J Biol Chem*; 1986; 261: 1594-8.

- 131 BAYLIN S.B., HOPPENER J.W., DE BUSTROS A., STEENBERGH P.H., LIPS C.J. and NELKIN B.D. DNA methylation patterns of the calcitonin gene in human lung cancers and lymphomas. *Cancer Res*; 1986; 46: 2917-22.
- 132 BAYLIN S.B., FEARON E.R., VOGELSTEIN B., DE BUSTROS A., SHARKIS S.J., BURKE P.J., STAAL S.P. and NELKIN B.D. Hypermethylation of the 5' region of the calcitonin gene is a property of human lymphoid and acute myeloid malignancies. *Blood*; 1987; 70: 412-7.
- 133 DE BUSTROS A., NELKIN B.D., SILVERMAN A., EHRLICH G., POIESZ B. and BAYLIN S.B. The short arm of chromosome 11 is a "hot spot" for hypermethylation in human neoplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 1988; 85: 5693-7.
- 134 CEDAR H. DNA methylation and gene activity. *Cell*; 1988; 53: 3-4.
- 135 FEARON E.R., VOGELSTEIN B. and FEINBERG A.P. Somatic deletion and duplication of genes on chromosome 11 in Wilms' tumours. *Nature*; 1984; 309: 176-8.
- 136 KOUFOS A., HANSEN M.F., LAMPKIN B.C., WORKMAN M.L., COPELAND N.G., JENKINS N.A. and CAVENEE W.K. Loss of alleles at loci on human chromosome 11 during genesis of Wilms' tumour. *Nature*; 1984; 309: 170-2.
- 137 ORKIN S.H., GOLDMAN D.S. and SALLAN S.E. Development of homozygosity for chromosome 11p markers in Wilms' tumour. *Nature*; 1984; 309: 172-4.
- 138 REEVE A.E., HOUSIAUX P.J., GARDNER R.J., CHEWINGS W.E., GRINDLEY R.M. and MILLOW L.J. Loss of a Harvey ras allele in sporadic Wilms' tumour. *Nature*; 1984; 309: 174-6.
- 139 FEARON E.R., FEINBERG A.P., HAMILTON S.H. and VOGELSTEIN B. Loss of genes on the short arm of chromosome 11 in bladder cancer. *Nature*; 1985; 318: 377-80.
- 140 KOUFOS A., HANSEN M.F., COPELAND N.G., JENKINS N.A., LAMPKIN B.C. and CAVENEE W.K. Loss of heterozygosity in three embryonal tumours suggests a common pathogenetic mechanism. *Nature*; 1985; 316: 330-4.
- 141 SCRABLE H.J., WITTE D.P., LAMPKIN B.C. and CAVENEE W.K. Chromosomal localization of the human rhabdomyosarcoma locus by mitotic recombination mapping. *Nature*; 1987; 329: 645-7.
- 142 MAKOS M., NELKIN B.D., LERMAN M.I., LATIF F., ZBAR B. and BAYLIN S.B. Distinct hypermethylation patterns occur at altered chromosome loci in human lung and colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 1992; 89: 1929-33.
- 143 LEE Y.W., KLEIN C.B., KARGACIN B., SALNIKOW K., KITAHARA J., DOWJAT K., ZHITKOVICH A., CHRISTIE N.T. and COSTA M. Carcinogenic nickel silences gene expression by chromatin condensation and DNA methylation: a new model for epigenetic carcinogens. *Mol Cell Biol*; 1995; 15: 2547-57.
- 144 RABBITS T.H. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature*; 1994; 372: 143-9.
- 145 RODRIGUEZ E., SREEKANTIAH C. and CHAGANTI R.S. Genetic changes in epithelial solid neoplasia. *Cancer Res*; 1994; 54: 3398-406.
- 146 GIBAS Z., PROUT G.R., JR., CONNOLLY J.G., PONTES J.E. and SANDBERG A.A. Nonrandom chromosomal changes in transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res*; 1984; 44: 1257-64.
- 147 ATKIN N.B. and BAKER M.C. Cytogenetic study of ten carcinomas of the bladder: involvement of chromosomes 1 and 11. *Cancer Genet Cytogenet*; 1985; 15: 253-68.
- 148 BABU V.R., LUTZ M.D., MILES B.J., FARAH R.N., WEISS L. and VAN DYKE D.L. Tumor behavior in transitional cell carcinoma of the bladder in relation to chromosomal markers and histopathology. *Cancer Res*; 1987; 47: 6800-5.
- 149 SMEETS W., PAUWELS R., LAARAKKERS L., DEBRUYNE F. and GERAEDTS J. Chromosomal analysis of bladder cancer. II. A practical method. *Cancer Genet Cytogenet*; 1987; 29: 23-7.
- 150 SMEETS W., PAUWELS R., LAARAKKERS L., DEBRUYNE F. and GERAEDTS J. Chromosomal analysis of bladder cancer. III. Nonrandom alterations. *Cancer Genet Cytogenet*; 1987; 29: 29-41.
- 151 SIDRANSKY D., FROST P., VON ESCHENBACH A., OYASU R., PREISINGER A.C. and VOGELSTEIN B. Clonal origin bladder cancer. *N Engl J Med*; 1992; 326: 737-40.
- 152 KNOWLES M.A., ELDER P.A., WILLIAMSON M., CAIRNS J.P., SHAW M.E. and LAW M.G. Allelotype of human bladder cancer. *Cancer Res*; 1994; 54: 531-8.
- 153 KALLIONIEMI A., KALLIONIEMI O.P., SUDAR D., RUTOVITZ D., GRAY J.W., WALDMAN F. and PINKEL D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*; 1992; 258: 818-21.
- 154 KALLIONIEMI A., KALLIONIEMI O.P., CITRO G., SAUTER G., DEVRIES S., KERSCHMANN R., CAROLL P. and WALDMAN F. Identification of gains and losses of DNA sequences in primary bladder cancer by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*; 1995; 12: 213-9.
- 155 VOORTER C., JOOS S., BRINGUIER P.P., VALLINGA M., POGGIGHE P., SCHALKEN J., DU MANOIR S., RAMAEKERS F., LICHTER P. and HOPMAN A. Detection of chromosomal imbalances in transitional cell carcinoma of the bladder by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol*; 1995; 146: 1341-54.
- 156 RICHTER J., JIANG F., GOROG J.P., SARTORIUS G., EGENTER C., GASSER T.C., MOCH H., MIHATSCH M.J. and SAUTER G. Marked genetic differences between stage pTa and stage pT1 papillary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res*; 1997; 57: 2860-4.
- 157 BRUCH J., WOHR G., HAUTMANN R., MATTFELDT T., BRUDERLEIN S., MOLLER P., SAUTER S., HAMEISTER H., VOGEL W. and PAISS T. Chromosomal changes during progression of transitional cell carcinoma of the bladder and delineation of the amplified interval on chromosome arm 8q. *Genes Chromosomes Cancer*; 1998; 23: 167-74.
- 158 HOVEY R.M., CHU L., BALAZS M., DEVRIES S., MOORE D.,

- SAUTER G., CARROLL P.R. and WALDMAN F.M. Genetic alterations in primary bladder cancers and their metastases. *Cancer Res*; 1998; 58: 3555-60.
- 159 MERTENS F., JOHANSSON B., HOGLUND M. and MITELMAN F. Chromosomal imbalance maps of malignant solid tumors: a cytogenetic survey of 3185 neoplasms. *Cancer Res*; 1997; 57: 2765-80.
- 160 PRESTI J.C., JR., REUTER V.E., GALAN T., FAIR W.R. and CORDON-CARDO C. Molecular genetic alterations in superficial and locally advanced human bladder cancer. *Cancer Res*; 1991; 51: 5405-9.
- 161 DALBAGNI G., PRESTI J., REUTER V., FAIR W.R. and CORDON-CARDO C. Genetic alterations in bladder cancer. *Lancet*; 1993; 342: 469-71.
- 162 LI M., ZHANG Z.F., REUTER V.E. and CORDON-CARDO C. Chromosome 3 allelic losses and microsatellite alterations in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Am J Pathol*; 1996; 149: 229-35.
- 163 OHTA M., INOUE H., COTTICELLI M.G., KASTURY K., BAFFA R., PALAZZO J., SIPRASHVILI Z., MORI M., McCUE P., DRUCK T. and ET AL. The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. *Cell*; 1996; 84: 587-97.
- 164 SIPRASHVILI Z., SOZZI G., BARNES L.D., McCUE P., ROBINSON A.K., ERYOMIN V., SARD L., TAGLIABUE E., GRECO A., FUSETTI L., SCHWARTZ G., PIEROTTI M.A., CROCE C.M. and HUEBNER K. Replacement of Fhit in cancer cells suppresses tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 1997; 94: 13771-6.
- 165 MAO L. Tumor suppressor genes: does FHIT fit? *J Natl Cancer Inst*; 1998; 90: 412-4.
- 166 OTTERSON G.A., XIAO G.H., GERADTS J., JIN F., CHEN W.D., NIKLINSKA W., KAYE F.J. and YEUNG R.S. Protein expression and functional analysis of the FHIT gene in human tumor cells. *J Natl Cancer Inst*; 1998; 90: 426-32.
- 167 BRONNER C.E., BAKER S.M., MORRISON P.T., WARREN G., SMITH L.G., LESCOE M.K., KANE M., EARABINO C., LIPFORD J., LINDBLOM A. and ET AL. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature*; 1994; 368: 258-61.
- 168 PAPADOPOULOS N., NICOLAIDES N.C., LIU B., PARSONS R., LENGAUER C., PALOMBO F., D'ARRIGO A., MARKOWITZ S., WILLSON J.K., KINZLER K.W. and ET AL. Mutations of GTBP in genetically unstable cells. *Science*; 1995; 268: 1915-7.
- 169 GONZALEZ-ZULUETA M., RUPPERT J.M., TOKINO K., TSAI Y.C., SPRUCK C.H., 3RD, MIYAO N., NICHOLS P.W., HERMANN G.G., HORN T., STEVEN K. and ET AL. Microsatellite instability in bladder cancer. *Cancer Res*; 1993; 53: 5620-3.
- 170 MAO L., LEE D.J., TOCKMAN M.S., EROZAN Y.S., ASKIN F. and SIDRANSKY D. Microsatellite alterations as clonal markers for the detection of human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 1994; 91: 9871-5.
- 171 MARKOWITZ S., WANG J., MYEROFF L., PARSONS R., SUN L., LUTTERBAUGH J., FAN R.S., ZBOROWSKA E., KINZLER K.W., VOGELSTEIN B. and ET AL. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science*; 1995; 268: 1336-8.
- 172 MYEROFF L.L., PARSONS R., KIM S.J., HEDRICK L., CHO K.R., ORTH K., MATHIS M., KINZLER K.W., LUTTERBAUGH J., PARK K. and ET AL. A transforming growth factor beta receptor type II gene mutation common in colon and gastric but rare in endometrial cancers with microsatellite instability. *Cancer Res*; 1995; 55: 5545-7.
- 173 GNARRA J.R., TORY K., WENG Y., SCHMIDT L., WEI M.H., LI H., LATIF F., LIU S., CHEN F., DUH F.M. and ET AL. Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet*; 1994; 7: 85-90.
- 174 HERMAN J.G., LATIF F., WENG Y., LERMAN M.I., ZBAR B., LIU S., SAMID D., DUAN D.S., GNARRA J.R., LINEHAN W.M. and ET AL. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 1994; 91: 9700-4.
- 175 BUETOW K.H., MURRAY J.C., ISRAEL J.L., LONDON W.T., SMITH M., KEW M., BLANQUET V., BRECHOT C., REDEKER A. and GOVINDARAJAH S. Loss of heterozygosity suggests tumor suppressor gene responsible for primary hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 1989; 86: 8852-6.
- 176 SATO T., SAITO H., MORITA R., KOI S., LEE J.H. and NAKAMURA Y. Allelotype of human ovarian cancer. *Cancer Res*; 1991; 51: 5118-22.
- 177 FUJIMOTO Y., HAMPTON L.L., WIRTH P.J., WANG N.J., XIE J.P. and THORGEIRSSON S.S. Alterations of tumor suppressor genes and allelic losses in human hepatocellular carcinomas in China. *Cancer Res*; 1994; 54: 281-5.
- 178 MITRA A.B., MURTY V.V., LI R.G., PRATAP M., LUTHRA U.K. and CHAGANTI R.S. Allelotype analysis of cervical carcinoma. *Cancer Res*; 1994; 54: 4481-7.
- 179 NAWROZ H., VAN DER RIET P., HRUBAN R.H., KOCH W., RUPPERT J.M. and SIDRANSKY D. Allelotype of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*; 1994; 54: 1152-5.
- 180 NING Y., WEBER J.L., KILLARY A.M., LEDBETTER D.H., SMITH J.R. and PEREIRA-SMITH O.M. Genetic analysis of indefinite division in human cells: evidence for a cell senescence-related gene(s) on human chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 1991; 88: 5635-9.
- 181 ELDER P.A., BELL S.M. and KNOWLES M.A. Deletion of two regions on chromosome 4 in bladder carcinoma: definition of a critical 750kB region at 4p16.3. *Oncogene*; 1994; 9: 3433-6.
- 182 and SIDRANSKY D. Distinct regions of allelic loss on chromosome 4 in human primary bladder carcinoma. *Cancer Res*; 1995; 55: 5396-9.
- 183 BELL S.M., ZUO J., MYERS R.M. and KNOWLES M.A. Fluorescence in situ hybridization deletion mapping at 4p16.3 in bladder cancer cell lines refines the localisa-

- tion of the critical interval to 30 kb. *Genes Chromosomes Cancer*; 1996; 17: 108-17.
- 184 HAMPTON G.M., LARSON A.A., BAERGEN R.N., SOMMERS R.L., KERN S. and CAVENEE W.K. Simultaneous assessment of loss of heterozygosity at multiple microsatellite loci using semi-automated fluorescence-based detection: subregional mapping of chromosome 4 in cervical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 1996; 93: 6704-9.
- 185 SOLOMON E., VOSS R., HALL V., BODMER W.F., JASS J.R., JEFFREYS A.J., LUCIBELLO F.C., PATEL I. and RIDER S.H. Chromosome 5 allele loss in human colorectal carcinomas. *Nature*; 1987; 328: 616-9.
- 186 BODMER W.F., BAILEY C.J., BODMER J., BUSSEY H.J., ELLIS A., GORMAN P., LUCIBELLO F.C., MURDAY V.A., RIDER S.H., SCAMBLER P. and ET AL. Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature*; 1987; 328: 614-6.
- 187 KINZLER K.W., NILBERT M.C., VOGELSTEIN B., BRYAN T.M., LEVY D.B., SMITH K.J., PREISINGER A.C., HAMILTON S.R., HEDGE P., MARKHAM A. and ET AL. Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. *Science*; 1991; 251: 1366-70.
- 188 KINZLER K.W., NILBERT M.C., SU L.K., VOGELSTEIN B., BRYAN T.M., LEVY D.B., SMITH K.J., PREISINGER A.C., HEDGE P., MCKECHNIE D. and ET AL. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science*; 1991; 253: 661-5.
- 189 NISHISHO I., NAKAMURA Y., MIYOSHI Y., MIKI Y., ANDO H., HORII A., KOYAMA K., UTSUNOMIYA J., BABA S. and HEDGE P. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science*; 1991; 253: 665-9.
- 190 TAMURA G., OGASAWARA S., NISHIZUKA S., SAKATA K., MAESAWA C., SUZUKI Y., TERASHIMA M., SAITO K. and SATODATE R. Two distinct regions of deletion on the long arm of chromosome 5 in differentiated adenocarcinomas of the stomach. *Cancer Res*; 1996; 56: 612-5.
- 191 WIELAND I. and BOHM M. Frequent allelic deletion at a novel locus on chromosome 5 in human lung cancer. *Cancer Res*; 1994; 54: 1772-4.
- 192 WIELAND I., BOHM M., ARDEN K.C., AMMERMULLER T., BOGATZ S., VIARS C.S. and RAJEWSKY M.F. Allelic deletion mapping on chromosome 5 in human carcinomas. *Oncogene*; 1996; 12: 97-102.
- 193 BOHM M., KIRCH H., OTTO T., RUBBEN H. and WIELAND I. Deletion analysis at the DEL-27, APC and MTS1 loci in bladder cancer: LOH at the DEL-27 locus on 5p13-12 is a prognostic marker of tumor progression. *Int J Cancer*; 1997; 74: 291-5.
- 194 BERGER C.S., SANDBERG A.A., TODD I.A., PENNINGTON R.D., HADDAD F.S., HECHT B.K. and HECHT F. Chromosomes in kidney, ureter, and bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet*; 1986; 23: 1-24.
- 195 DE SOUZA A.T., HANKINS G.R., WASHINGTON M.K., FINE R.L., ORTON T.C. and JIRTLE R.L. Frequent loss of heterozygosity on 6q at the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor locus in human hepatocellular tumors. *Oncogene*; 1995; 10: 1725-9.
- 196 DE SOUZA A.T., HANKINS G.R., WASHINGTON M.K., ORTON T.C. and JIRTLE R.L. M6P/IGF2R gene is mutated in human hepatocellular carcinomas with loss of heterozygosity. *Nat Genet*; 1995; 11: 447-9.
- 197 HANKINS G.R., DE SOUZA A.T., BENTLEY R.C., PATEL M.R., MARKS J.R., IGLEHART J.D. and JIRTLE R.L. M6P/IGF2 receptor: a candidate breast tumor suppressor gene. *Oncogene*; 1996; 12: 2003-9.
- 198 KNOWLES M.A., SHAW M.E. and PROCTOR A.J. Deletion mapping of chromosome 8 in cancers of the urinary bladder using restriction fragment length polymorphisms and microsatellite polymorphisms. *Oncogene*; 1993; 8: 1357-64.
- 199 TAKLE L.A. and KNOWLES M.A. Deletion mapping implicates two tumor suppressor genes on chromosome 8p in the development of bladder cancer. *Oncogene*; 1996; 12: 1083-7.
- 200 EMI M., FUJIWARA Y., NAKAJIMA T., TSUCHIYA E., TSUDA H., HIROHASHI S., MAEDA Y., TSURUTA K., MIYAKI M. and NAKAMURA Y. Frequent loss of heterozygosity for loci on chromosome 8p in hepatocellular carcinoma, colorectal cancer, and lung cancer. *Cancer Res*; 1992; 52: 5368-72.
- 201 BOVA G.S., CARTER B.S., BUSSEMAKERS M.J., EMI M., FUJIWARA Y., KYPRIANOU N., JACOBS S.C., ROBINSON J.C., EPSTEIN J.I., WALSH P.C. and ET AL. Homozygous deletion and frequent allelic loss of chromosome 8p22 loci in human prostate cancer. *Cancer Res*; 1993; 53: 3869-73.
- 202 FUJIWARA Y., EMI M., OHATA H., KATO Y., NAKAJIMA T., MORI T. and NAKAMURA Y. Evidence for the presence of two tumor suppressor genes on chromosome 8p for colorectal carcinoma. *Cancer Res*; 1993; 53: 1172-4.
- 203 KERANGUEVEN F., ESSIUX L., DIB A., NOGUCHI T., ALLIONE F., GENEIX J., LONGY M., LIDEREAU R., EISINGER F., PEBUSQUE M.J. and ET AL. Loss of heterozygosity and linkage analysis in breast carcinoma: indication for a putative third susceptibility gene on the short arm of chromosome 8. *Oncogene*; 1995; 10: 1023-6.
- 204 YAREMKO M.L., RECENT W.M. and WESTBROOK C.A. Loss of heterozygosity from the short arm of chromosome 8 is an early event in breast cancers. *Genes Chromosomes Cancer*; 1995; 13: 186-91.
- 205 VOCKE C.D., POZZATTI R.O., BOSTWICK D.G., FLORENCE C.D., JENNINGS S.B., STRUP S.E., DURAY P.H., LIOTTA L.A., EMMERT-BUCK M.R. and LINEHAN W.M. Analysis of 99 microdissected prostate carcinomas reveals a high frequency of allelic loss on chromosome 8p12-21. *Cancer Res*; 1996; 56: 2411-6.
- 206 WU C.L., ROZ L., SLOAN P., READ A.P., HOLLAND S., PORTER S., SCULLY C., SPEIGHT P.M. and THAKKER N. Deletion mapping defines three discrete areas of allelic imbalance on chromosome arm 8p in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer*; 1997; 20: 347-53.

- 207 ICHIKAWA T., NIHEI N., SUZUKI H., OSHIMURA M., EMI M., NAKAMURA Y., HAYATA I., ISAACS J.T. and SHIMAZAKI J. Suppression of metastasis of rat prostatic cancer by introducing human chromosome 8. *Cancer Res*; 1994; 54: 2299-302.
- 208 GUSTAFSON C.E., WILSON P.J., LUKEIS R., BAKER E., WOOLLATT E., ANNAB L., HAWKE L., BARRETT J.C. and CHENEVIX-TRENCH G. Functional evidence for a colorectal cancer tumor suppressor gene at chromosome 8p22-23 by monochromosome transfer. *Cancer Res*; 1996; 56: 5238-45.
- 209 NIHEI N., ICHIKAWA T., KAWANA Y., KURAMOCHI H., KUGOH H., OSHIMURA M., HAYATA I., SHIMAZAKI J. and ITO H. Mapping of metastasis suppressor gene(s) for rat prostate cancer on the short arm of human chromosome 8 by irradiated microcell-mediated chromosome transfer. *Genes Chromosomes Cancer*; 1996; 17: 260-8.
- 210 VAN HUL W., WUYTS W., HENDRICKX J., SPELEMAN F., WAUTERS J., DE BOULLE K., VAN ROY N., BOSSUYT P. and WILLEMS P.J. Identification of a third EXT-like gene (EXTL3) belonging to the EXT gene family. *Genomics*; 1998; 47: 230-7.
- 211 AHN J., LUDECKE H.J., LINDOW S., HORTON W.A., LEE B., WAGNER M.J., HORSTHEMKE B. and WELLS D.E. Cloning of the putative tumour suppressor gene for hereditary multiple exostoses (EXT1). *Nat Genet*; 1995; 11: 137-43.
- 212 STICKENS D., CLINES G., BURBEE D., RAMOS P., THOMAS S., HOGUE D., HECHT J.T., LOVETT M. and EVANS G.A. The EXT2 multiple exostoses gene defines a family of putative tumour suppressor genes. *Nat Genet*; 1996; 14: 25-32.
- 213 MCCORMICK C., LEDUC Y., MARTINDALE D., MATTISON K., ESFORD L.E., DYER A.P. and TUFARO F. The putative tumour suppressor EXT1 alters the expression of cell-surface heparan sulfate. *Nat Genet*; 1998; 19: 158-61.
- 214 STICKENS D. and EVANS G.A. A sugar fix for bone tumours? *Nat Genet*; 1998; 19: 110-1.
- 215 YU C.E., OSHIMA J., FU Y.H., WIJSMAN E.M., HISAMA F., ALISCH R., MATTHEWS S., NAKURA J., MIKI T., OUAIS S., MARTIN G.M., MULLIGAN J. and SCHELLENBERG G.D. Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science*; 1996; 272: 258-62.
- 216 FUJIWARA Y., OHATA H., KUROKI T., KOYAMA K., TSUCHIYA E., MONDEN M. and NAKAMURA Y. Isolation of a candidate tumor suppressor gene on chromosome 8p21.3-p22 that is homologous to an extracellular domain of the PDGF receptor beta gene. *Oncogene*; 1995; 10: 891-5.
- 217 CAIRNS P., SHAW M.E. and KNOWLES M.A. Initiation of bladder cancer may involve deletion of a tumour-suppressor gene on chromosome 9. *Oncogene*; 1993; 8: 1083-5.
- 218 MIYAO N., TSAI Y.C., LERNER S.P., OLUMI A.F., SPRUCK C.H., 3RD, GONZALEZ-ZULUETA M., NICHOLS P.W., SKINNER D.G. and JONES P.A. Role of chromosome 9 in human bladder cancer. *Cancer Res*; 1993; 53: 4066-70.
- 219 RUPPERT J.M., TOKINO K. and SIDRANSKY D. Evidence for two bladder cancer suppressor loci on human chromosome 9. *Cancer Res*; 1993; 53: 5093-5.
- 220 KEEN A.J. and KNOWLES M.A. Definition of two regions of deletion on chromosome 9 in carcinoma of the bladder. *Oncogene*; 1994; 9: 2083-8.
- 221 HABUCHI T., DEVLIN J., ELDER P.A. and KNOWLES M.A. Detailed deletion mapping of chromosome 9q in bladder cancer: evidence for two tumour suppressor loci. *Oncogene*; 1995; 11: 1671-4.
- 222 SIMONEAU A.R., SPRUCK C.H., 3RD, GONZALEZ-ZULUETA M., GONZALGO M.L., CHAN M.F., TSAI Y.C., DEAN M., STEVEN K., HORN T. and JONES P.A. Evidence for two tumor suppressor loci associated with proximal chromosome 9p to q and distal chromosome 9q in bladder cancer and the initial screening for GAS1 and PTC mutations. *Cancer Res*; 1996; 56: 5039-43.
- 223 CAIRNS P., TOKINO K., EBY Y. and SIDRANSKY D. Homozygous deletions of 9p21 in primary human bladder tumors detected by comparative multiplex polymerase chain reaction. *Cancer Res*; 1994; 54: 1422-4.
- 224 WANG M.R., PERISSEL B., TAILLANDIER J., KEMENY J.L., FONCK Y., LAUTIER A., BENKHALIFA M. and MALET P. Nonrandom changes of chromosome 10 in bladder cancer. Detection by FISH to interphase nuclei. *Cancer Genet Cytogenet*; 1994; 73: 8-10.
- 225 HABUCHI T., OGAWA O., KAKEHI Y., OGURA K., KOSHIBA M., HAMAZAKI S., TAKAHASHI R., SUGIYAMA T. and YOSHIDA O. Accumulated allelic losses in the development of invasive urothelial cancer. *Int J Cancer*; 1993; 53: 579-84.
- 226 MORITA R., SAITO S., ISHIKAWA J., OGAWA O., YOSHIDA O., YAMAKAWA K. and NAKAMURA Y. Common regions of deletion on chromosomes 5q, 6q, and 10q in renal cell carcinoma. *Cancer Res*; 1991; 51: 5817-20.
- 227 SPEAKS S.L., SANGER W.G., MASIH A.S., HARRINGTON D.S., HESS M. and ARMITAGE J.O. Recurrent abnormalities of chromosome bands 10q23-25 in non-Hodgkin's lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*; 1992; 5: 239-43.
- 228 REMPEL S.A., SCHWECHHEIMER K., DAVIS R.L., CAVENEE W.K. and ROSENBLUM M.L. Loss of heterozygosity for loci on chromosome 10 is associated with morphologically malignant meningioma progression. *Cancer Res*; 1993; 53: 2386-92.
- 229 HERBST R.A., WEISS J., EHNIS A., CAVENEE W.K. and ARDEN K.C. Loss of heterozygosity for 10q22-10qter in malignant melanoma progression. *Cancer Res*; 1994; 54: 3111-4.
- 230 GRAY I.C., PHILLIPS S.M., LEE S.J., NEOPTOLEMOS J.P., WEISSENBACH J. and SPURR N.K. Loss of the chromosomal region 10q23-25 in prostate cancer. *Cancer Res*; 1995; 55: 4800-3.
- 231 PEIFFER S.L., HERZOG T.J., TRIBUNE D.J., MUTCH D.G., GERSELL D.J. and GOODFELLOW P.J. Allelic loss of sequences from the long arm of chromosome 10 and replication errors in endometrial cancers. *Cancer Res*; 1995; 55: 1922-6.
- 232 RASHEED B.K., MCLENDON R.E., FRIEDMAN H.S.,

- FRIEDMAN A.H., FUCHS H.E., BIGNER D.D. and BIGNER S.H. Chromosome 10 deletion mapping in human gliomas: a common deletion region in 10q25. *Oncogene*; 1995; 10: 2243-6.
- 233 SIMON M., VON DEIMLING A., LARSON J.J., WELLENREUTHER R., KASKEL P., WAHA A., WARNICK R.E., TEW J.M., JR. and MENON A.G. Allelic losses on chromosomes 14, 10, and 1 in atypical and malignant meningiomas: a genetic model of meningioma progression. *Cancer Res*; 1995; 55: 4696-701.
- 234 ITTMANN M. Allelic loss on chromosome 10 in prostate adenocarcinoma. *Cancer Res*; 1996; 56: 2143-7.
- 235 RASKIND W.H., CONRAD E.U. and MATSUSHITA M. Frequent loss of heterozygosity for markers on chromosome arm 10q in chondrosarcomas. *Genes Chromosomes Cancer*; 1996; 16: 138-43.
- 236 TRYBUS T.M., BURGESS A.C., WOJNO K.J., GLOVER T.W. and MACOSKA J.A. Distinct areas of allelic loss on chromosomal regions 10p and 10q in human prostate cancer. *Cancer Res*; 1996; 56: 2263-7.
- 237 ZEDENIUS J., WALLIN G., SVENSSON A., BOVEE J., HOOG A., BACKDAHL M. and LARSSON C. Deletions of the long arm of chromosome 10 in progression of follicular thyroid tumors. *Hum Genet*; 1996; 97: 299-303.
- 238 CAPPELLEN D., GIL DIEZ DE MEDINA S., CHOPIN D., THIERY J.P. and RADVANYI F. Frequent loss of heterozygosity on chromosome 10q in muscle-invasive transitional cell carcinomas of the bladder. *Oncogene*; 1997; 14: 3059-66.
- 239 OLUMI A.F., TSAI Y.C., NICHOLS P.W., SKINNER D.G., CAIN D.R., BENDER L.I. and JONES P.A. Allelic loss of chromosome 17p distinguishes high grade from low grade transitional cell carcinomas of the bladder. *Cancer Res*; 1990; 50: 7081-3.
- 240 REEVE A.E., SIH S.A., RAIZIS A.M. and FEINBERG A.P. Loss of allelic heterozygosity at a second locus on chromosome 11 in sporadic Wilms' tumor cells. *Mol Cell Biol*; 1989; 9: 1799-803.
- 241 SHIPMAN R., SCHRAML P., COLOMBI M., RAEFLE G. and LUDWIG C.U. Loss of heterozygosity on chromosome 11p13 in primary bladder carcinoma. *Hum Genet*; 1993; 91: 455-8.
- 242 DONG J.T., LAMB P.W., RINKER-SCHAEFFER C.W., VUKANOVIC J., ICHIKAWA T., ISAACS J.T. and BARRETT J.C. KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2. *Science*; 1995; 268: 884-6.
- 243 DONG J.T., SUZUKI H., PIN S.S., BOVA G.S., SCHALKEN J.A., ISAACS W.B., BARRETT J.C. and ISAACS J.T. Down-regulation of the KAI1 metastasis suppressor gene during the progression of human prostatic cancer infrequently involves gene mutation or allelic loss. *Cancer Res*; 1996; 56: 4387-90.
- 244 YU Y., YANG J.L., MARKOVIC B., JACKSON P., YARDLEY G., BARRETT J. and RUSSELL P.J. Loss of KAI1 messenger RNA expression in both high-grade and invasive human bladder cancers. *Clin Cancer Res*; 1997; 3: 1045-9.
- 245 CALL K.M., GLASER T., ITO C.Y., BUCKLER A.J., PELLETIER J., HABER D.A., ROSE E.A., KRAL A., YEGER H., LEWIS W.H. and ET AL. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell*; 1990; 60: 509-20.
- 246 GESSLER M., POUSTKA A., CAVENEY W., NEVE R.L., ORKIN S.H. and BRUNS G.A. Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature*; 1990; 343: 774-8.
- 247 PELLETIER J., BRUENING W., LI F.P., HABER D.A., GLASER T. and HOUSMAN D.E. WT1 mutations contribute to abnormal genital system development and hereditary Wilms' tumour. *Nature*; 1991; 353: 431-4.
- 248 LI L. and COHEN S.N. Tsg101: a novel tumor susceptibility gene isolated by controlled homozygous functional knockout of allelic loci in mammalian cells. *Cell*; 1996; 85: 319-29.
- 249 LI L., LI X., FRANCKE U. and COHEN S.N. The TSG101 tumor susceptibility gene is located in chromosome 11 band p15 and is mutated in human breast cancer. *Cell*; 1997; 88: 143-54.
- 250 STEINER P., BARNES D.M., HARRIS W.H. and WEINBERG R.A. Absence of rearrangements in the tumour susceptibility gene TSG101 in human breast cancer. *Nat Genet*; 1997; 16: 332-3.
- 251 LI L., FRANCKE U. and COHEN S.N. Retraction. The TSG101 tumor susceptibility gene is located in chromosome 11 band p15 and is mutated in human breast cancer. *Cell*; 1998; 93: following 660.
- 252 WANG Q., DRIOUCH K., COURTOIS S., CHAMPENE M.H., BIECHE I., TREILLEUX I., BRIFFOD M., RIMOKH R., MAGAUD J.P., CURMI P., LIDEREAU R. and PUISIEUX A. Low frequency of TSG101/CC2 gene alterations in invasive human breast cancers. *Oncogene*; 1998; 16: 677-9.
- 253 LEE M.P., REEVES C., SCHMITT A., SU K., CONNORS T.D., HU R.J., BRANDENBURG S., LEE M.J., MILLER G. and FEINBERG A.P. Somatic mutation of TSSC5, a novel imprinted gene from human chromosome 11p15.5. *Cancer Res*; 1998; 58: 4155-9.
- 254 LEE M.H., REYNISDOTTIR I. and MASSAGUE J. Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev*; 1995; 9: 639-49.
- 255 MATSUOKA S., EDWARDS M.C., BAI C., PARKER S., ZHANG P., BALDINI A., HARPER J.W. and ELLEDGE S.J. p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev*; 1995; 9: 650-62.
- 256 HATADA I., OHASHI H., FUKUSHIMA Y., KANEKO Y., INOUE M., KOMOTO Y., OKADA A., OHISHI S., NABETANI A., MORISAKI H., NAKAYAMA M., NIIKAWA N. and MUKAI T. An imprinted gene p57KIP2 is mutated in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nat Genet*; 1996; 14: 171-3.
- 257 SAVITSKY K., BAR-SHIRA A., GILAD S., ROTMAN G., ZIV Y., VANAGAITE L., TAGLE D.A., SMITH S., UZIEL T., SFEZ S.

- and ET AL. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science*; 1995; 268: 1749-53.
- 258 LAAKE K., ODEGARD A., ANDERSEN T.I., BUKHOLM I.K., KARESEN R., NESLAND J.M., OTTESTAD L., SHILOH Y. and BORRESEN-DALE A.L. Loss of heterozygosity at 11q23.1 in breast carcinomas: indication for involvement of a gene distal and close to ATM. *Genes Chromosomes Cancer*; 1997; 18: 175-80.
- 259 DERKINDEREN D.J., KOTEN J.W., NAGELKERKE N.J., TAN K.E., BEEMER F.A. and DEN OTTER W. Non-ocular cancer in patients with hereditary retinoblastoma and their relatives. *Int J Cancer*; 1988; 41: 499-504.
- 260 SANDERS B.M., JAY M., DRAPER G.J. and ROBERTS E.M. Non-ocular cancer in relatives of retinoblastoma patients. *Br J Cancer*; 1989; 60: 358-65.
- 261 HOROWITZ J.M., PARK S.H., BOGENMANN E., CHENG J.C., YANDELL D.W., KAYE F.J., MINNA J.D., DRYJA T.P. and WEINBERG R.A. Frequent inactivation of the retinoblastoma anti-oncogene is restricted to a subset of human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 1990; 87: 2775-9.
- 262 CAIRNS P., PROCTOR A.J. and KNOWLES M.A. Loss of heterozygosity at the RB locus is frequent and correlates with muscle invasion in bladder carcinoma. *Oncogene*; 1991; 6: 2305-9.
- 263 XU H.J., CAIRNS P., HU S.X., KNOWLES M.A. and BENEDICT W.F. Loss of RB protein expression in primary bladder cancer correlates with loss of heterozygosity at the RB locus and tumor progression. *Int J Cancer*; 1993; 53: 781-4.
- 264 MIYAMOTO H., SHUIN T., TORIGOE S., IWASAKI Y. and KUBOTA Y. Retinoblastoma gene mutations in primary human bladder cancer. *Br J Cancer*; 1995; 71: 831-5.
- 265 CORDON-CARDO C., WARTINGER D., PETRYLAK D., DALBAGNI G., FAIR W.R., FUKS Z. and REUTER V.E. Altered expression of the retinoblastoma gene product: prognostic indicator in bladder cancer. *J Natl Cancer Inst*; 1992; 84: 1251-6.
- 266 LOGOTHETIS C.J., XU H.J., RO J.Y., HU S.X., SAHIN A., ORDONEZ N. and BENEDICT W.F. Altered expression of retinoblastoma protein and known prognostic variables in locally advanced bladder cancer. *J Natl Cancer Inst*; 1992; 84: 1256-61.
- 267 BROWN A.G., ROSS F.M., DUNNE E.M., STEEL C.M. and WEIR-THOMPSON E.M. Evidence for a new tumour suppressor locus (DBM) in human B-cell neoplasia telomeric to the retinoblastoma gene. *Nat Genet*; 1993; 3: 67-72.
- 268 CHANG W.Y., CAIRNS P., SCHOENBERG M.P., POLASCIC T.J. and SIDRANSKY D. Novel suppressor loci on chromosome 14q in primary bladder cancer. *Cancer Res*; 1995; 55: 3246-9.
- 269 KOVACS G. and FRISCH S. Clonal chromosome abnormalities in tumor cells from patients with sporadic renal cell carcinomas. *Cancer Res*; 1989; 49: 651-9.
- 270 TAKAYAMA H., SUZUKI T., MUGISHIMA H., FUJISAWA T., OOKUNI M., SCHWAB M., GEHRING M., NAKAMURA Y., SUGIMURA T., TERADA M. and ET AL. Deletion mapping of chromosomes 14q and 1p in human neuroblastoma. *Oncogene*; 1992; 7: 1185-9.
- 271 YOUNG J., LEGGETT B., WARD M., THOMAS L., BUTTENSCHAW R., SEARLE J. and CHENEVIX-TRENCH G. Frequent loss of heterozygosity on chromosome 14 occurs in advanced colorectal carcinomas. *Oncogene*; 1993; 8: 671-5.
- 272 FUJINO T., RISINGER J.I., COLLINS N.K., LIU F.S., NISHII H., TAKAHASHI H., WESTPHAL E.M., BARRETT J.C., SASAKI H., KOHLER M.F. and ET AL. Allelotype of endometrial carcinoma. *Cancer Res*; 1994; 54: 4294-8.
- 273 SUZUKI H., VEDA R. and TAKAHASHI T. Altered imprinting in lung cancer. *Nat Genet*; 1994; 6: 332-3.
- 274 BERGER M.S., GREENFIELD C., GULLICK W.J., HALEY J., DOWNWARD J., NEAL D.E., HARRIS A.L. and WATERFIELD M.D. Evaluation of epidermal growth factor receptors in bladder tumours. *Br J Cancer*; 1987; 56: 533-7.
- 275 DRIOUCH K., DORION-BONNET F., BRIFFOD M., CHAMPEME M.H., LONGY M. and LIDEREAU R. Loss of heterozygosity on chromosome arm 16q in breast cancer metastases. *Genes Chromosomes Cancer*; 1997; 19: 185-91.
- 276 LATIL A., CUSSENOT O., FOURNIER G., DRIOUCH K. and LIDEREAU R. Loss of heterozygosity at chromosome 16q in prostate adenocarcinoma: identification of three independent regions. *Cancer Res*; 1997; 57: 1058-62.
- 277 DRIOUCH K., BRIFFOD M., BIECHE I., CHAMPEME M.H. and LIDEREAU R. Location of several putative genes possibly involved in human breast cancer progression. *Cancer Res*; 1998; 58: 2081-6.
- 278 BIGGS P.J., WOOSTER R., FORD D., CHAPMAN P., MANGION J., QUIRK Y., EASTON D.F., BURN J. and STRATTON M.R. Familial cylindromatosis (turban tumour syndrome) gene localised to chromosome 16q12-q13: evidence for its role as a tumour suppressor gene. *Nat Genet*; 1995; 11: 441-3.
- 279 LEE S.W. H-cadherin, a novel cadherin with growth inhibitory functions and diminished expression in human breast cancer. *Nat Med*; 1996; 2: 776-82.
- 280 BAKER S.J., FEARON E.R., NIGRO J.M., HAMILTON S.R., PREISINGER A.C., JESSUP J.M., VAN TUINEN P., LEDBETTER D.H., BARKER D.F., NAKAMURA Y. and ET AL. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science*; 1989; 244: 217-21.
- 281 FUJIMOTO K., YAMADA Y., OKAJIMA E., KAKIZOE T., SASAKI H., SUGIMURA T. and TERADA M. Frequent association of p53 gene mutation in invasive bladder cancer. *Cancer Res*; 1992; 52: 1393-8.
- 282 WALES M.M., BIEL M.A., EL DEIRY W., NELKIN B.D., ISSA J.P., CAVENEE W.K., KUERTITZ S.J. and BAYLIN S.B. p53 activates expression of HIC-1, a new candidate tumour suppressor gene on 17p13.3. *Nat Med*; 1995; 1: 570-7.
- 283 FEARON E.R., CHO K.R., NIGRO J.M., KERN S.E., SIMONS J.W., RUPPERT J.M., HAMILTON S.R., PREISINGER A.C.,

- THOMAS G., KINZLER K.W. and ET AL. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science*; 1990; 247: 49-56.
- 284 BREWSTER S.F., GINGELL J.C., BROWNE S. and BROWN K.W. Loss of heterozygosity on chromosome 18q is associated with muscle-invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Cancer*; 1994; 70: 697-700.
- 285 EPPERT K., SCHERER S.W., OZCELIK H., PIRONE R., HOODLESS P., KIM H., TSUI L.C., BAPAT B., GALLINGER S., ANDRULIS I.L., THOMSEN G.H., WRANA J.L. and ATTISANO L. MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGFbeta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. *Cell*; 1996; 86: 543-52.
- 286 HAHN S.A., SCHUTTE M., HOQUE A.T., MOSKALUK C.A., DA COSTA L.T., ROZENBLUM E., WEINSTEIN C.L., FISCHER A., YEO C.J., HRUBAN R.H. and KERN S.E. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science*; 1996; 271: 350-3.
- 287 RIGGINS G.J., THIAGALINGAM S., ROZENBLUM E., WEINSTEIN C.L., KERN S.E., HAMILTON S.R., WILLSON J.K., MARKOWITZ S.D., KINZLER K.W. and VOGELSTEIN B. Mad-related genes in the human. *Nat Genet*; 1996; 13: 347-9.
- 288 THIAGALINGAM S., LENGAUER C., LEACH F.S., SCHUTTE M., HAHN S.A., OVERHAUSER J., WILLSON J.K., MARKOWITZ S., HAMILTON S.R., KERN S.E., KINZLER K.W. and VOGELSTEIN B. Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers. *Nat Genet*; 1996; 13: 343-6.
- 289 BARR F.G. Translocations, cancer and the puzzle of specificity. *Nat Genet*; 1998; 19: 121-4.
- 290 LIYANAGE M., COLEMAN A., DU MANOIR S., VELDMAN T., MCCORMACK S., DICKSON R.B., BARLOW C., WYNSHAW-BORIS A., JANZ S., WIENBERG J., FERGUSON-SMITH M.A., SCHROCK E. and RIED T. Multicolour spectral karyotyping of mouse chromosomes. *Nat Genet*; 1996; 14: 312-5.
- 291 VELDMAN T., VIGNON C., SCHROCK E., ROWLEY J.D. and RIED T. Hidden chromosome abnormalities in haematological malignancies detected by multicolour spectral karyotyping. *Nat Genet*; 1997; 15: 406-10.
- 292 MATSUYAMA H., BERGERHEIM U.S., NILSSON I., PAN Y., SKOOG L., TRIBUKAIT B. and EKMAN P. Nonrandom numerical aberrations of chromosomes 7, 9, and 10 in DNA-diploid bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet*; 1994; 77: 118-24.
- 293 SMITH K., FENNELLY J.A., NEAL D.E., HALL R.R. and HARRIS A.L. Characterization and quantitation of the epidermal growth factor receptor in invasive and superficial bladder tumors. *Cancer Res*; 1989; 49: 5810-5.
- 294 PONZETTO C., GIORDANO S., PEVERALI F., DELLA VALLE G., ABATE M.L., VAULA G. and COMOGGIO P.M. c-met is amplified but not mutated in a cell line with an activated met tyrosine kinase. *Oncogene*; 1991; 6: 553-9.
- 295 DI RENZO M.F., OLIVERO M., FERRO S., PRAT M., BONGARZONE I., PILOTTI S., BELFIORE A., COSTANTINO A., VIGNERI R., PIEROTTI M.A. and ET AL. Overexpression of the c-MET/HGF receptor gene in human thyroid carcinomas. *Oncogene*; 1992; 7: 2549-53.
- 296 SCHMIDT L., DUH F.M., CHEN F., KISHIDA T., GLENN G., CHOYKE P., SCHERER S.W., ZHUANG Z., LUBENSKY I., DEAN M., ALLIKMETS R., CHIDAMBARAM A., BERGERHEIM U.R., FELTIS J.T., CASADEVALL C., ZAMARRON A., BERNUES M., RICHARD S., LIPS C.J., WALTHER M.M., TSUI L.C., GEIL L., ORCUTT M.L., STACKHOUSE T., ZBAR B. and ET AL. Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nat Genet*; 1997; 16: 68-73.
- 297 WIRSCHUBSKY Z., WIENER F., SPIRA J., SUMEGI J. and KLEIN G. Triplication of one chromosome No. 15 with an altered c-myc containing EcoRI fragment and elimination of the normal homologue in a T-cell lymphoma line of AKR origin (TIKAUT). *Int J Cancer*; 1984; 33: 477-81.
- 298 BIANCHI A.B., ALDAZ C.M. and CONTI C.J. Nonrandom duplication of the chromosome bearing a mutated Ha-ras-1 allele in mouse skin tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 1990; 87: 6902-6.
- 299 BREMNER R. and BALMAIN A. Genetic changes in skin tumor progression: correlation between presence of a mutant ras gene and loss of heterozygosity on mouse chromosome 7. *Cell*; 1990; 61: 407-17.
- 300 XIE J., MURONE M., LUOH S.M., RYAN A., GU Q., ZHANG C., BONIFAS J.M., LAM C.W., HYNES M., GODDARD A., ROSENTHAL A., EPSTEIN E.H., JR. and DE SAUVAGE F.J. Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature*; 1998; 391: 90-2.
- 301 RESEARCH W.C.R.F.I.A.W.A.I.F.C., Series Ed^{ns} Eds, 1997, Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective, 1759 R St NW Washington, DC 20009, WCRF
- 302 SAUTER G., CARROLL P., MOCH H., KALLIONIEMI A., KERSCHMANN R., NARAYAN P., MIHATSCH M.J. and WALDMAN F.M. c-myc copy number gains in bladder cancer detected by fluorescence in situ hybridization. *Am J Pathol*; 1995; 146: 1131-9.
- 303 PROCTOR A.J., COOMBS L.M., CAIRNS J.P. and KNOWLES M.A. Amplification at chromosome 11q13 in transitional cell tumours of the bladder. *Oncogene*; 1991; 6: 789-95.
- 304 KINZLER K.W., BIGNER S.H., BIGNER D.D., TRENT J.M., LAW M.L., O'BRIEN S.J., WONG A.J. and VOGELSTEIN B. Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. *Science*; 1987; 236: 70-3.
- 305 OLINER J.D., KINZLER K.W., MELTZER P.S., GEORGE D.L. and VOGELSTEIN B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature*; 1992; 358: 80-3.
- 306 HABUCHI T., KINOSHITA H., YAMADA H., KAKEHI Y., OGAWA O., WU W.J., TAKAHASHI R., SUGIYAMA T. and YOSHIDA O. Oncogene amplification in urothelial cancers with p53 gene mutation or MDM2 amplification. *J Natl Cancer Inst*; 1994; 86: 1331-5.
- 307 LIANES P., ORLOW I., ZHANG Z.F., OLIVA M.R., SARKIS

- A.S., REUTER V.E. and CORDON-CARDO C. Altered patterns of MDM2 and TP53 expression in human bladder cancer. *J Natl Cancer Inst*; 1994; 86: 1325-30.
- 308 SIGALAS I., CALVERT A.H., ANDERSON J.J., NEAL D.E. and LUNEC J. Alternatively spliced mdm2 transcripts with loss of p53 binding domain sequences: transforming ability and frequent detection in human cancer. *Nat Med*; 1996; 2: 912-7.
- 309 KING C.R., KRAUS M.H. and AARONSON S.A. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science*; 1985; 229: 974-6.
- 310 SEMBA K., KAMATA N., TOYOSHIMA K. and YAMAMOTO T. A v-erbB-related protooncogene, c-erbB-2, is distinct from the c-erbB-1/epidermal growth factor-receptor gene and is amplified in a human salivary gland adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 1985; 82: 6497-501.
- 311 YAMAMOTO T., IKAWA S., AKIYAMA T., SEMBA K., NOMURA N., MIYAJIMA N., SAITO T. and TOYOSHIMA K. Similarity of protein encoded by the human c-erbB-2 gene to epidermal growth factor receptor. *Nature*; 1986; 319: 230-4.
- 312 SLAMON D.J., CLARK G.M., WONG S.G., LEVIN W.J., ULLRICH A. and MCGUIRE W.L. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*; 1987; 235: 177-82.
- 313 POPESCU N.C., KING C.R. and KRAUS M.H. Localization of the human erbB-2 gene on normal and rearranged chromosomes 17 to bands q12-21.32. *Genomics*; 1989; 4: 362-6.
- 314 SLAMON D.J., GODOLPHIN W., JONES L.A., HOLT J.A., WONG S.G., KEITH D.E., LEVIN W.J., STUART S.G., UDOVE J., ULLRICH A. and ET AL. Studies of the HER-2/neu protooncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*; 1989; 244: 707-12.
- 315 COOMBS L.M., PIGOTT D.A., SWEENEY E., PROCTOR A.J., EYDMANN M.E., PARKINSON C. and KNOWLES M.A. Amplification and over-expression of c-erbB-2 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Br J Cancer*; 1991; 63: 601-8.
- 316 LUNEC J., CHALLEN C., WRIGHT C., MELLON K. and NEAL D.E. c-erbB-2 amplification and identical p53 mutations in concomitant transitional carcinomas of renal pelvis and urinary bladder. *Lancet*; 1992; 339: 439-40.
- 317 SAUTER G., MOCH H., MOORE D., CARROLL P., KERSCHMANN R., CHEW K., MIHATSCH M.J., GUDAT F. and WALDMAN F. Heterogeneity of erbB-2 gene amplification in bladder cancer. *Cancer Res*; 1993; 53: 2199-203.
- 318 SCHOENBERG M., KIEMENEY L., WALSH P.C., GRIFFIN C.A. and SIDRANSKY D. Germline translocation t(5;20)(p15;q11) and familial transitional cell carcinoma. *J Urol*; 1996; 155: 1035-6.
- 319 RODIER J.M., VALLES A.M., DENOYELLE M., THIERY J.P. and BOYER B. pp60c-src is a positive regulator of growth factor-induced cell scattering in a rat bladder carcinoma cell line. *J Cell Biol*; 1995; 131: 761-73.
- 320 BOYER B., ROCHE S., DENOYELLE M. and THIERY J.P. Src and Ras are involved in separate pathways in epithelial cell scattering. *Embo J*; 1997; 16: 5904-13.
- 321 SAVELIEVA E., BELAIR C.D., NEWTON M.A., DEVRIES S., GRAY J.W., WALDMAN F. and REZNIKOFF C.A. 20q gain associates with immortalization: 20q13.2 amplification correlates with genome instability in human papillomavirus 16 E7 transformed human uroepithelial cells. *Oncogene*; 1997; 14: 551-60.
- 322 ZHOU H., KUANG J., ZHONG L., KUO W.L., GRAY J.W., SAHIN A., BRINKLEY B.R. and SEN S. Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet*; 1998; 20: 189-93.
- 323 FITZPATRICK J.M., WEST A.B., BUTLER M.R., LANE V. and O'FLYNN J.D. Superficial bladder tumors (stage pTa, grades 1 and 2): the importance of recurrence pattern following initial resection. *J Urol*; 1986; 135: 920-2.
- 324 BIRCH B.R. and HARLAND S.J. The pT1 G3 bladder tumour. *Br J Urol*; 1989; 64: 109-16.
- 325 HARRINGTON K. and WAXMAN J. Genetic alterations in bladder cancer. *Lancet*; 1993; 342: 1184-5.
- 326 SPRUCK C.H., 3RD, OHNESEIT P.F., GONZALEZ-ZULUETA M., ESRIG D., MIYAO N., TSAI Y.C., LERNER S.P., SCHMUTTE C., YANG A.S., COTE R. and ET AL. Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res*; 1994; 54: 784-8.
- 327 ROSIN M.P., CAIRNS P., EPSTEIN J.I., SCHOENBERG M.P. and SIDRANSKY D. Partial allelotyping of carcinoma in situ of the human bladder. *Cancer Res*; 1995; 55: 5213-6.
- 328 FEARON E.R. and VOGELSTEIN B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*; 1990; 61: 759-67.
- 329 FURNARI F.B., HUANG H.J. and CAVENEE W.K. Molecular biology of malignant degeneration of astrocytoma. *Pediatr Neurosurg*; 1996; 24: 41-9.
- 330 KINZLER K.W. and VOGELSTEIN B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*; 1996; 87: 159-70.
- 331 OLSCHWANG S., HAMELIN R., LAURENT-PUIG P., THUILLE B., DE RYCKE Y., LI Y.J., MUZEAU F., GIRODET J., SALMON R.J. and THOMAS G. Alternative genetic pathways in colorectal carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 1997; 94: 12122-7.
- 332 KNOWLES M.A. and CURRIE G.A. Genetic alterations in bladder cancer. *Lancet*; 1993; 342: 1184.
- 333 YEAGER T.R., DEVRIES S., JARRARD D.F., KAO C., NAKADA S.Y., MOON T.D., BRUSKEWITZ R., STADLER W.M., MEISNER L.F., GILCHRIST K.W., NEWTON M.A., WALDMAN F.M. and REZNIKOFF C.A. Overcoming cellular senescence in human cancer pathogenesis. *Genes Dev*; 1998; 12: 163-74.
- 334 HEIN D.W., DOLL M.A., FRETLAND A.J., LEFF M.A., WEBB S.J., XIAO G.H., DEVANABOYINA U.S., NANGJU N.A. and FENG Y. Molecular genetics and epidemiology of the NAT1 and NAT2 acetylation polymorphisms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 2000; 9: 29-42.

- 335 EVANS D.A. N-acetyltransferase. *Pharmacol Ther*; 1989; 42: 157-234.
- 336 HIRVONEN A. Chapter 20. Polymorphic NATs and cancer predisposition. *IARC Sci Publ*; 1999; 148: 251-70.
- 337 KADLUBAR F.F. Detection of human DNA-carcinogen adducts. *Nature*; 1992; 360: 189.
- 338 VINEIS P., BARTSCH H., CAPORASO N., HARRINGTON A.M., KADLUBAR F.F., LANDI M.T., MALAVEILLE C., SHIELDS P.G., SKIPPER P., TALASKA G. and ET AL. Genetically based N-acetyltransferase metabolic polymorphism and low-level environmental exposure to carcinogens. *Nature*; 1994; 369: 154-6.
- 339 GRANT D.M., BLUM M. and MEYER U.A. Polymorphisms of N-acetyltransferase genes. *Xenobiotica*; 1992; 22: 1073-81.
- 340 GRANT D.M., JOSEPHY P.D., LORD H.L. and MORRISON L.D. Salmonella typhimurium strains expressing human arylamine N-acetyltransferases: metabolism and mutagenic activation of aromatic amines. *Cancer Res*; 1992; 52: 3961-4.
- 341 BADAWI A.F., HIRVONEN A., BELL D.A., LANG N.P. and KADLUBAR F.F. Role of aromatic amine acetyltransferase, NAT1 and NAT2, in carcinogen-DNA adduct formation in the human bladder. *Cancer Res*; 1995; 55: 5230-7.
- 342 BELL D.A., BADAWI A.F., LANG N.P., ILETT K.F., KADLUBAR F.F. and HIRVONEN A. Polymorphism in the N-acetyltransferase 1 (NAT1) polyadenylation signal: association of NAT1*10 allele with higher N-acetylation activity in bladder and colon tissue. *Cancer Res*; 1995; 55: 5226-9.
- 343 VATSIS K.P., WEBER W.W., BELL D.A., DUPRET J.M., EVANS D.A., GRANT D.M., HEIN D.W., LIN H.J., MEYER U.A., RELLING M.V. and ET AL. Nomenclature for N-acetyltransferases. *Pharmacogenetics*; 1995; 5: 1-17.
- 344 GRANT D.M., HUGHES N.C., JANEZIC S.A., GOODFELLOW G.H., CHEN H.J., GAEDIGK A., YU V.L. and GREWAL R. Human acetyltransferase polymorphisms. *Mutat Res*; 1997; 376: 61-70.
- 345 GREEN J., BANKS E., BERRINGTON A., DARBY S., DEO H. and NEWTON R. N-acetyltransferase 2 and bladder cancer: an overview and consideration of the evidence for gene-environment interaction. *Br J Cancer*; 2000; 83: 412-7.
- 346 HSIEH F.I., PU Y.S., CHERN H.D., HSU L.I., CHIOU H.Y. and CHEN C.J. Genetic polymorphisms of N-acetyltransferase 1 and 2 and risk of cigarette smoking-related bladder cancer. *Br J Cancer*; 1999; 81: 537-41.
- 347 BROCKMOLLER J., CASCORBI I., KERB R. and ROOTS I. Combined analysis of inherited polymorphisms in arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferases M1 and T1, microsomal epoxide hydrolase, and cytochrome P450 enzymes as modulators of bladder cancer risk. *Cancer Res*; 1996; 56: 3915-25.
- 348 TAYLOR J.A., UMBACH D.M., STEPHENS E., CASTRANIO T., PAULSON D., ROBERTSON C., MOHLER J.L. and BELL D.A. The role of N-acetylation polymorphisms in smoking-associated bladder cancer: evidence of a gene-gene-exposure three-way interaction. *Cancer Res*; 1998; 58: 3603-10.
- 349 HARRIES L.W., STUBBINS M.J., FORMAN D., HOWARD G.C.W. and WOLF C.R. Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis*; 1997; 18: 641-4.
- 350 JACKSON A.L. and LOEB L.A. On the origin of multiple mutations in human cancers. *Semin Cancer Biol*; 1998; 8: 421-9.
- 351 JACKSON A.L., NEWCOMB T.G. and LOEB L.A. Origin of multiple mutations in human cancers. *Drug Metab Rev*; 1998; 30: 285-304.
- 352 HAHN W.C., COUNTER C.M., LUNDBERG A.S., BEIJERSBERGEN R.L., BROOKS M.W. and WEINBERG R.A. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*; 1999; 400: 464-8.
- 353 VOGELSTEIN B. and KINZLER K.W. The multistep nature of cancer. *Trends Genet*; 1993; 9: 138-41.