

Article original

## Analyse du gène RB1 chez des patients atteints de rétinoblastome dans la population Algérienne

Analysis of the RB1 gene in patients with retinoblastoma in the Algerian population

Amina Mama Boubekour<sup>1</sup>, Lotfi Louhibi<sup>1</sup>, Khadidja Mahmoudi<sup>2</sup>, Fatima Zohra Moghtit<sup>1</sup>, Meriem Aberkane<sup>3</sup>, Rym Khadidja Abderrahmane<sup>1</sup>, Meriem Abdi<sup>1</sup>, Aness Kouar<sup>4</sup>, Nadhira Mehtar<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Génétique Moléculaire et Cellulaire, Département de génétique moléculaire appliquée, Université des Sciences et de la Technologie d'Oran USTO MB, BP 1505 EL M'naouer 31000 Oran Algérie.

<sup>2</sup> Service d'Ophthalmologie pédiatrique, Etablissement Hospitalier Spécialisé « Canastel » Oran, Algérie.

<sup>3</sup> Département de pharmacie, faculté de médecine, université Oran1, BP El M'naouer 31000 Oran Algérie.

<sup>4</sup> Service de toxicologie, EHU Oran Algérie.

### MOTS CLÉS

Rétinoblastome; tumeur; gène Rb; mutation; HPLC; PCR-séquençage; diagnostic moléculaire.

### KEY WORDS

Retinoblastoma; tumor; Rb gene; mutation; HPLC; PCR sequencing; Molecular diagnosis.

### Résumé

Une mutation des deux allèles du gène Rb durant le développement rétinien normal est responsable de l'apparition du rétinoblastome. La recherche de mutations au niveau du gène Rb reste difficile, car la majorité des altérations sont uniques et dispersées tout au long du gène. Nous rapportons dans notre étude le résultat de l'analyse du gène Rb au niveau constitutionnel et tumoral dans la population algérienne.

Notre étude a porté sur un échantillon de 21 patients atteints de rétinoblastome. Le promoteur et les 27 exons avec leurs séquences introniques flanquantes composant le gène Rb ont été amplifiés et analysés par HPLC (chromatographie liquide à haute performance) suivie d'un séquençage. Les variations de bases identifiées au niveau constitutionnel et tumoral sont au nombre de 7 dont 3 mutations non sens, une mutation affectant le site d'épissage, une délétion et 2 polymorphismes.

L'analyse du gène Rb a été réalisée chez des enfants atteints de rétinoblastome ne présentant aucun antécédent familial de la maladie. Par cette étude, nous avons pu identifier deux cas sur les 21 étudiés ayant un rétinoblastome pouvant être transmissible. Deux mutations rapportées n'ont jamais été décrites dans la littérature.

### Abstract

Inactivation of both alleles of the RB1 gene during normal retinal development initiates the formation of a retinoblastoma (RB) tumor. RB1 screening remains difficult, most of the alterations being unique and randomly distributed throughout the entire coding sequence. In this report, we present the results of a constitutional and

<sup>1</sup> Auteur correspondant: amina.boubekour@hotmail.fr

tumoral RB1 analysis in an Algerian population. The detection of RB1 gene deletion or mutation was performed by high performance liquid chromatography (HPLC) and sequence analyses in 21 patients. Germline abnormalities were found in 2/21 patients of sporadic unilateral retinoblastoma. The spectrum of germline and tumoral alterations included 3 nonsense mutations, 1 mutation affecting splice site, 1 deletion and 2 polymorphisms. In general, for the 21 patients with no family history of the disease we have identified mutations in germinal level in two of them showing that it is a transmissible form of retinoblastoma in these two cases known to be sporadic. A total of 2 mutations have not been previously reported.

## Introduction

Le rétinoblastome est une tumeur maligne de la rétine, d'origine neuro-épithéliale. Son incidence est stable, décrite autour de 1/15.000 naissances en Algérie [1]. Ce cancer affecte le nourrisson et le jeune enfant en général avant l'âge de 5ans [2]. On peut distinguer deux formes de rétinoblastomes: la forme sporadique et la forme héréditaire. Les cas sporadiques sont toujours unilatéraux et représentent 60% des patients, avec un âge médian au moment du diagnostic d'environ 2 ans tandis que les formes héréditaires sont, pour la plupart, bilatérales [3]. Ces dernières représentent 40% des patients: 10% sont transmises directement d'un parent affecté et 30% semblent résulter d'une mutation de novo [4, 5] ; l'âge médian au moment du diagnostic est alors d'environ 1 an.

Sur le plan clinique, les principaux symptômes révélateurs sont une leucocorie (60,5%) et un strabisme (21,5%) [6]. La leucocorie (reflet blanc pupillaire «œil de chat») correspond à la visualisation directe de la tumeur à travers l'aire pupillaire.

Le gène du rétinoblastome, gène Rb localisé sur le chromosome 13 en q14.2, exerce une fonction physiologique majeure de contrôle du cycle cellulaire. Il s'agit d'un gène suppresseur de tumeur [7]. Pour ce type de gène, la transformation maligne d'une cellule rétinienne en cellule de rétinoblastome nécessite deux événements mutationnels affectant les 2 allèles du gène RB1. Dans les formes héréditaires de rétinoblastomes, il existe une anomalie constitutionnelle du gène RB1. Le gène mutant serait soit hérité d'un parent, soit formé de novo durant la gamétogenèse d'un des parents. Il suffit qu'un second événement survienne au niveau du second allèle dans une cellule rétinienne pour qu'une tumeur se développe: c'est la raison pour laquelle les patients atteints de forme héréditaire de rétinoblastome ont très souvent des tumeurs bilatérales et multiples dans chaque œil [8]. La transmission du rétinoblastome se fait selon le mode autosomique dominant avec une pénétrance élevée: 90% des patients porteurs d'une anomalie constitutionnelle du gène RB1 développent un rétinoblastome [4]. Dans les formes sporadiques, les deux événements de mutation surviennent successivement sur chacun des deux allèles

du gène RB1 au niveau d'une seule cellule de la rétine. Etant donné la faible probabilité d'un tel événement, sa survenue dans les deux yeux reste rarissime. C'est pourquoi, la forme sporadique est quasiment toujours unilatérale [9].

Le gène Rb code pour une protéine de 928 acides aminés, pRB [10]. De nombreuses observations ont élucidé le rôle, qualifié d'anti-oncogène, de pRB dans les cellules normales. Elle permet la transduction des signaux extra-cellulaires provoquant l'arrêt de la multiplication cellulaire [11, 12]. Par un jeu de phosphorylations et déphosphorylations successives, elle joue ainsi un rôle important dans l'aptitude de la cellule à entrer dans la phase S, période pendant laquelle l'ADN est synthétisé [13]. Son absence explique que la croissance des cellules portant le gène muté n'est plus régulée et devient anarchique.

Notre étude s'est basée sur la recherche de mutations du gène Rb au niveau constitutionnel et tumoral chez des patients algériens atteints de rétinoblastome.

Dans le rétinoblastome comme dans la plupart des cancers, le pronostic dépend de la précocité du diagnostic. Ce diagnostic précoce, éventuellement prénatal de la mutation, permettra la prise en charge rapide de ces enfants par un suivi continu et contribuera ainsi à la prévention de la maladie.

## Matériels et méthodes

Notre étude a porté sur un total de 21 patients non apparentés, tous atteints de rétinoblastome de forme sporadique unilatérale ou bilatérale, désignés par la mention RUS pour les formes unilatérales sporadiques suivie d'un numéro. Seuls 6 individus ont pu être investigués au niveau constitutionnel et tumoral, le reste des patients ont été analysés uniquement au niveau constitutionnel.

Le matériel biologique est constitué de 21 ADN génomiques extrait à partir du sang total et 6 ADN tumoraux prélevés à partir de tissus tumoraux des patients. Les prélèvements de sang ainsi que les tumeurs nous ont été fournis par le service d'ophtalmologie pédiatrique « Hôpital pédiatrique de Canastel » Oran.

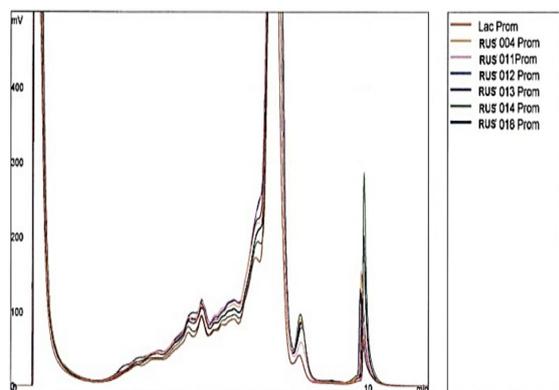
Le sang est prélevé, sur une solution d'Éthylène Diamine Tétracétique (EDTA) 0,5M. L'ADN génomique est extrait à partir du sang total selon la technique utilisant le NaCl [14] et l'ADN tumoral en utilisant du TRIZOL prêt à l'emploi [15]. Vingt sept couples d'amorces ont été utilisés pour l'amplification du promoteur et des 27 exons composant le gène Rb au niveau constitutionnel et tumoral. Les exons 15 et 16 sont amplifiés conjointement avec un couple d'amorces. Le choix des amorces a été fait dans les parties introniques flanquant chacun des exons de façon à couvrir, avec l'ensemble des amorces, la majeure partie du gène Rb.

## Résultats

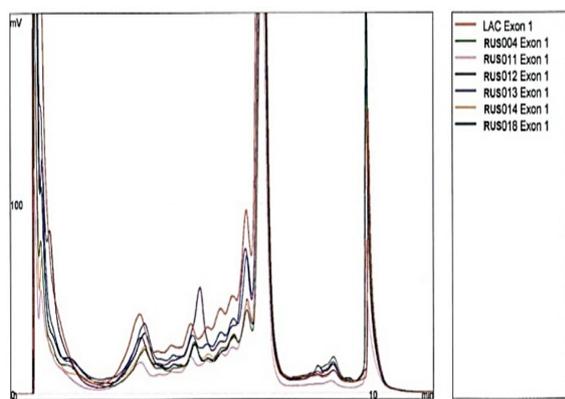
L'analyse du gène Rb au niveau constitutionnel et tumoral est réalisée par la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) [1] (Figure1,2). Les ADN des cas index, ayant donné des profils particuliers (différents du contrôle négatif) par analyse en HPLC, sont séquencés systématiquement.

L'analyse des séquences est effectuée en utilisant deux logiciels: «Seqscanner» (<https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cd=4cutNavigate2&cut>

**Figure 1.** Exemple d'un résultat de HPLC, absence de variation de base



**Figure 2.** Exemple d'un résultat de HPLC, présence de variation de séquence



ID=600583) et «Multalin» (<http://ribosome.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>)

L'analyse du gène Rb par HPLC nous a permis d'identifier 4 variations de base au niveau constitutionnel et 7 au niveau tumoral concernant 6 patients. Pour le patient RUS018, aucune variation de base n'a été détectée (tableau 1). Les 15 patients dont seulement l'ADN génomique analysé au niveau constitutionnel ne présentent pas de variation de séquence.

## Discussion

Le séquençage de l'ADN constitutionnel ayant présenté des profils particuliers en HPLC a permis l'identification de deux mutations exoniques causales et 2 polymorphismes. La première mutation siège au niveau de l'exon 1. Elle a pour conséquence l'arrêt prématuré de la traduction donnant ainsi une protéine courte altérée fonctionnellement suite à l'absence des domaines importants se trouvant en aval et qui sont requis pour l'activité de la protéine pRb [10]. La deuxième mutation touche l'exon 7 et provoque un décalage dans le cadre de lecture. Ceci a pour conséquence la synthèse d'une protéine tronquée de 211 acides aminés, inactive car les domaines fonctionnels de cette dernière sont codés par la séquence comprise entre les exons 12 et 27 du gène Rb. Les deux mutations touchant l'exon 1 et 7 sont originales et n'ont jamais été décrites par la littérature. Les polymorphismes présents au niveau de l'intron 2 à la position +75 et l'intron 10 à la position +58, ont déjà été décrits dans la bibliographie [18, 19].

Le séquençage du gène Rb au niveau de l'ADN tumoral a permis l'identification de 7 variations de bases, comprenant quatre mutations exoniques, une mutation touchant le site accepteur d'épissage et deux polymorphismes introniques. Les mutations exoniques se trouvent au niveau des exons 1, 7, 14 et 18. Elles sont toutes causales étant donné qu'elles entraînent l'apparition d'une protéine tronquée, inactive suite à l'absence de la région comprise entre les exons 12 et 27. En effet, cette région code pour une structure nommée « poche de fixation des oncoprotéines ». Cette poche comprend deux domaines, de 179 acides aminés (codon 393 au codon 571) et 125 acides aminés (codon 649-773), séparés par une zone libre de 76 acides aminés appelée « gap » (codon 572 au 648) [20]. Elle sert à la fixation du facteur de transcription E2F [21]. Cette région est donc requise pour la protéine pRb dans sa fonction régulatrice du cycle cellulaire et toute modification ou mutation survenant à son niveau pourrait altérer cette fonction et sera à l'origine du rétinoblastome chez le sujet portant cette mutation. La variation de base qui est à l'origine d'une anomalie de l'épissage, abolit l'épissage de l'intron 12 par la modification de la séquence consensus GT, correspondant au site donneur d'épissage en AT [22]. Ceci entraîne la production d'une protéine plus longue car l'intron 12 va être traduit. Cette variation peut affecter la conformation de la protéine qui aura un impact sur

**Tableau 1.** Tableau récapitulatif des résultats obtenus de l'analyse du gène Rb au niveau constitutionnel et tumoral

Patient	1 <sup>er</sup> événement (au niveau germlinal)	Conséquence	2 <sup>ème</sup> événement (au niveau somatique)	Conséquence	Rétinoblastome sporadique	Rétinoblastome transmissible
RUS 004	-	-	-Transition C $\rightarrow$ T 150037 du gène -Transition G $\rightarrow$ A +1 intron 12	-Arg579Stop -Perturbation du processus d'épissage	+	-
RUS 011	-Transition T $\rightarrow$ C +75 intron 2 -Transition G $\rightarrow$ A +58 intron 10	Sans conséquence	-Transition T $\rightarrow$ C +75 intron 2 -Transition G $\rightarrow$ A +58 intron 10	Sans conséquence	+	-
RUS 012	Transversion G $\rightarrow$ T 2150 du gène RB	Glu31Stop	Perte d'un allèle RB	Hémizygotie du gène RB	-	+
RUS013	Transition G $\rightarrow$ A +58 intron 10	-	-Transition G $\rightarrow$ A +58 intron 10 -Transition C $\rightarrow$ T 76430 du gène RB	- -Arg445Stop	+	-
RUS014	Délétion GATC 56875-56879 du gène RB	212Stop	Perte d'un allèle RB	Hémizygotie du gène RB	-	+
RUS018	-	-	-	-	+	-

sa fonction régulatrice normale. Une étude fonctionnelle et structurale de la protéine pRb reste nécessaire pour confirmer le rôle de cette mutation. Les deux polymorphismes retrouvés au niveau constitutionnel ont été retrouvés au niveau tumoral.

L'étude du gène Rb au niveau constitutionnel et tumoral a permis d'identifier, pour le patient RUS012, une transversion G  $\rightarrow$  T à la position 91 de l'exon 1 provoquant ainsi le remplacement de l'acide aminé glutamique par un codon stop. Cette mutation n'a jamais été décrite par la bibliographie. Elle est présente à l'état hétérozygote au niveau constitutionnel, par contre au niveau tumoral, elle se trouve à l'état homozygote. Ceci est en parfaite concordance avec la théorie de Knudson [23], largement confirmée, selon laquelle le premier événement est germlinal (pour les formes transmissibles), présent dans toutes les cellules de l'organisme et le deuxième événe-

ment somatique correspondant dans notre cas à une perte de l'allèle normal. Cette situation est en faveur d'une perte de l'hétérozygotie car les chances d'avoir une même mutation au niveau des deux allèles du gène Rb et au sein d'une seule cellule sont infiniment rares. Ces deux événements, le premier conduisant à la production d'une protéine courte de 31 acides aminés et le deuxième entraînant la perte de l'allèle sauvage (Tableau1), semblent être à l'origine du développement du rétinoblastome chez notre patient.

Concernant le patient RUS014, nous avons mis en évidence une délétion de 4pb entre les codons 7 et 10 dans l'exon 7. Cette délétion n'a jamais été décrite dans la littérature. Elle se trouve à l'état hétérozygote au niveau constitutionnel et l'analyse de cet exon par le logiciel « seqscanner » montre des pics en chevêtrés suite au chevauchement des bases séquen-

cées des allèles normal et muté (Figure3). Au niveau tumoral, nous avons des pics nets tout au long de la séquence montrant ainsi une délétion présente à l'état homozygote (Figure3).

Cette mutation conduit à un décalage dans le cadre de lecture qui entraîne l'apparition d'un codon stop et constitue le premier événement. Le deuxième événement est fort probablement dû à la perte de l'hétérozygotie au niveau tumoral (Tableau1). Ces deux événements pourraient être à l'origine du développement de la pathologie chez le sujet RUS014.

Le patient RUS013 a présenté deux variations de bases, la première est un polymorphisme qui correspond à une transition G=A à la position +58 de l'intron 10. Cette variation de base est présente à l'état hétérozygote au niveau constitutionnel et tumoral. La deuxième correspond à une mutation par transition C=T en position 1 de l'exon 14 (Tableau 1). Elle provoque la substitution d'un codon arginine par un codon non-sens à la position 445. Le polymorphisme retrouvé au niveau germinale et somatique n'est vraisemblablement pas l'un des événements à l'origine du développement de la maladie. Par contre une mutation de type non-sens est trouvée au niveau somatique. Elle siège dans la région fonctionnelle du gène Rb comprise entre les exons 12 et 27. Un seul événement est donc trouvé chez cet individu et ne permet pas d'expliquer la survenue du rétinoblastome; ce qui nous conduit à supposer que le deuxième événement pourrait se trouver au niveau post transcriptionnel ou post traductionnel. Par ailleurs, l'existence d'autres voies de signalisations pouvant jouer un rôle dans le développement de cette pathologie, n'est pas exclue. Il a récemment été montré que dans le rétinoblastome, que la défaillance de Rb pourrait conduire à l'inactivation de la protéine p53 en affectant la voie P53 impliquant les gènes p14 AlternateReadingFrame/Mouse Double Minute2/ Mouse Double Minute X (p14ARF/MDM2/MDM4) [24]. Dans l'exon 18 et pour le patient RUS004, nous n'avons trouvé aucune mutation au niveau constitutionnel. Par contre au niveau tumoral, nous avons identifié deux mutations, la première correspondant à une transition C=T à la 40ème base dans cet exon qui entraîne la substitution de l'acide aminé arginine par un codon stop à la position 579. La deuxième mutation entraîne une transition G=A en position +1 de l'intron 12 (tableau1)

Ces deux mutations sont causales car la première se trouve également dans une région fonctionnelle importante du gène et la deuxième touche le site donneur d'épissage et perturbe par conséquent ce processus en entraînant la traduction de l'intron 12.

La présence de mutations seulement au niveau somatique pour les cas RUS004 et RUS013

permet de confirmer qu'il s'agit d'un rétinoblastome sporadique donc il n'existe aucun risque de transmission pour les

proches de ces malades ainsi que pour leur descendance. Pour le cas RUS018, aucune variation de base n'a été détectée que ce soit au niveau germinale ou bien somatique. Le fait de ne trouver aucune mutation au niveau germinale montre bien qu'il s'agit d'un rétinoblastome sporadique par contre l'absence de mutations au niveau somatique nous conduit à suspecter l'intervention d'autres voies de signalisation dans le développement du rétinoblastome [24].

Dix à vingt pour cents des rétinoblastomes n'ont pas de mutation sur le gène Rb [25]. Le développement de cette tumeur peut être soit dû à un virus ou bien à la méthylation du gène, la question fait toujours l'objet de débats à l'heure actuelle.

Les oncoprotéines virales, en particulier la protéine E1A de l'adénovirus et l'antigène T du SV40, ainsi que l'oncoprotéine E7 du papillomavirus sont susceptibles de se lier à la protéine pRb. Cette liaison est en relation avec la transformation cellulaire et suggère que ces oncoprotéines transforment la cellule par blocage de la fonction de la protéine pRb, ce qui produirait un effet comparable à une délétion génique et serait à l'origine du rétinoblastome [26].

Chez le patient RUS011, nous avons identifié un polymorphisme dans l'intron 2, qui correspond à une transition T=C à la position +75 de l'intron. Ce dernier est présent à l'état hétérozygote au niveau constitutionnel et tumoral.

Un deuxième polymorphisme est trouvé dans l'intron 10 chez ce patient et correspond à une transition G=A à la position +58 de l'intron (tableau1). Cette variation est présente à l'état hétérozygote au niveau germinale et somatique. Ces polymorphismes ont déjà été décrits par la littérature.

De manière générale, pour les six patients ne présentant aucun antécédent familial de la maladie, nous avons identifié pour deux d'entre eux (RUS012 et RUS014) des mutations au niveau germinale montrant ainsi qu'il s'agit d'une forme transmissible du rétinoblastome chez ces deux cas considérés comme sporadiques. Ce résultat n'est pas surprenant sachant qu'il demeure un risque de transmission de 10 à 12% pour les rétinoblastomes de forme sporadique [27].

Par ailleurs, à travers cette étude, nous confirmons qu'il n'existe pas pour le gène Rb de sites privilégiés de mutations ou points chauds, les mutations sont dispersées le long du gène. Les mutations touchant l'exon 1 et 7 sont originales car elles n'ont jamais été décrites dans la littérature.

Pour les mutations introniques, il est difficile de trancher sur leur causalité. En effet, une mutation n'a pas de valeur tant qu'elle n'est pas validée comme étant responsable de la pathologie. L'éventuelle implication de ces dernières dans la pathologie devrait être prouvée et confirmée par des études structurales et fonctionnelles.

Il serait intéressant d'étudier la méthylation des îlots CpG au niveau de certaines régions du gène Rb, car la substitution de base la plus fréquente qui joue un rôle dans le développement du rétinoblastome est la transition C-T touchant les dinucléotides CpG méthylés [28]. Ces îlots pourraient être considérés comme des régions de prédisposition à des mutations. En effet, sur les 14 codons arginine (CGA) constituant le gène Rb, 11 sont fréquemment mutés [29]. Dans notre étude cette mutation est présente chez 2 individus sur 6.

La transition C>T modifiant le codon CGA en codon TGA (codon stop) est due à la méthylation des résidus cytosines qui entraîne une déamination spontanée du 5 méthyl cytosine en thymidine [30].

Sur les trois autres codons CGA, se trouvant respectivement sur les exons 1, 26 et 27 aucune mutation n'a été retrouvée à l'heure actuelle.

Pour ce qui est de l'exon 1, il n'y a pas ce type de mutation au niveau du codon CGA, parce que le dinucléotide CpG n'est pas méthylé, ce qui confirme que la méthylation des îlots CpG confère une prédisposition aux mutations du type déjà cité.

Enfin pour les exons 26 et 27, aucune mutation n'est retrouvée au niveau des 2 codons CGA, ceci est expliqué par le fait que la protéine tronquée produite par cette mutation peut avoir une activité suppressive suffisante pour prévenir le développement du rétinoblastome [31].

## Conclusion

De manière générale, la situation est différente selon qu'il s'agisse d'un cas sporadique avec un premier événement germinale ou d'un cas à mutations purement somatiques.

Pour les patients montrant une anomalie constitutionnelle du gène Rb, une investigation des parents reste primordiale pour distinguer s'ils sont porteurs de l'allèle délétère tout en étant asymptomatiques ou bien s'il s'agit tout simplement d'une néomutation. Par contre, pour les individus ne présentant pas de mutation au niveau constitutionnel, on peut confirmer qu'il s'agit d'un rétinoblastome non transmissible et qu'il n'est pas nécessaire d'investiguer les membres des familles de ces derniers.

La détection des néomutations est d'un grand intérêt dans le cas du conseil génétique pour les membres d'une famille où il n'existe qu'un cas sporadique de rétinoblastome car elle permet de rassurer définitivement la branche de la famille non concernée par le remaniement.

## Remerciements

Toute notre gratitude à Michael Dyer, le directeur de la division

de biologie développementale au sein de l'hôpital saint jude, Memphis (Tennessee) de nous avoir accueillies dans son laboratoire et d'avoir permis la réalisation de ce travail.

## Conflit d'intérêt

Tous les co-auteurs énumérés ont lu et approuvé le manuscrit et il n'y a pas de conflit d'intérêt à divulguer.

## Références bibliographiques

- [1] Mahmoudi K. Epidémiologie du rétinoblastome. Journée pédiatrique de Canastel, 2012.
- [2] Doz F, Brisse H, Stoppa-Lyonnet D, Pinkerton R, Polnman PN, Pieters R. Retinoblastoma. p 323, édition Paediatric Oncology, 2004.
- [3] Valverde J, Alonso J, Palacios I, Pestana A. RB1 gene mutation update, a meta-analysis based on 932 reported mutations available in a searchable database. BMC Genetics 2005. 6: 53-61
- [4] Draper G.J, Sanders B.M, Brownbill P.A, Hawkins M.M. Patterns of risk of hereditary retinoblastoma and applications to genetic counselling. Br J Cancer 1993, 66 :211-219.
- [5] Turleau C, Blanquet V, De Grouchy J. Génétique et conseil génétique : le cas du retinoblastoma. Bull cancer 1991, 78 :69-76.
- [6] Hansen J.B, Jorgensen C, Petersen R.K, Hallenborg P, De Matteis R, Boye H.A, Petrovic N, Enerback S, Nedergaard J, Cinti S, te Riele H, Kristiansen K. Symptome of retinoblastoma. Porc Natt Acad Sci USA 2004, 101 :4112-17
- [7] Hunter T. Oncoprotein networks. Cell 1997,88 :333-46
- [8] Orjuela MA, Titievsky L, Liu X, Ramirez-Ortiz M, Ponce-Castaneda V, Lecona E, Molina E, Beaverson K, Abramson DH, Mueller NE. Fruit and vegetable intake during pregnancy and risk for development of sporadic retinoblastoma. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005 Jun;14(6):1433-40
- [9] Gauthier-Villars M, Couturier FDD, Stoppa-Lyonnet D. Le conseil génétique du rétinoblastome. Médecine clinique des pédiatries 2004,3 :35-40
- [10] Uma M Sachdeva, Joan M O'Brien. Understanding pRb : toward the necessary development of targeted treatments for retinoblastoma. J Clin Invest 2012, 1 ;122(2) :425-34
- [11] Chen P. L, Scully P, ShewY.T, Wang J.Y.T, Lee W.H. Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. Cell 1989, 58:1193.
- [12] Decaprio J.A, Ludlow J.W, Lynch D, Furukawa Y, Griffin J, Livingston D.M. The product of the retinoblastoma susceptibility gene has properties of a cell regulatory element. Cell 1998, 58:1085-1095.
- [13] Sellers W.R, Kaelin W.G. Role of the retinoblastoma protein in the pathogenesis of human cancer. J Clin Oncol 1997, 15:3301-3312.
- [14] Miller SA, Dakes DD, Polesky HF. A sample scalling-out for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic acids Res 1989, 16:1215.
- [15] Bracete AM, Fox DK, Simms D. Focus 1998, 15, 99.

- [16] Houdayer C, Gauthier-Villars M, Laugé A, Pagès-Berhouet S, Dehainault C, Caux-Moncoutier V, Karczynski P, Tosi M, Doz F, Desjardins L, Couturier J, and Stoppa-Lyonnet D. Comprehensive Screening for Constitutional RB1 Mutations by HPLC and QMPSF. *Hu. Mutat* 2004, 23:193-202.
- [17] Joseph R. The Rb/E2F pathway and cancer. *Human Molecular Genetics* 2001, 7:699-70
- [18] Blanquet V, Turleau C, Gross-Morand MS, Senamaud-Beaufort C, Doz F, Besmond C. Spectrum of germline mutations in the RB1 gene a study of 232 patients with hereditary and non-hereditary retinoblastoma. *Hum Molec Genet* 4:383-388 (1995)
- [19] Blanquet V, Turleau C, Gross-Morand MS, Goossens M, Besmond C. Identification of germline mutations in the RB1 gene by denaturing gradient gel electrophoresis and polymerase chain reaction direct sequencing. *Hum Mol Genet* 2(7):975-9, (1993)
- [20] Dietmar R, Lohmann, Brenda L, Gallie. Retinoblastoma: Revisiting the model prototype of inherited cancer. *American journal of medical genetics* 2004, 129:23-28.
- [21] Goodrich DW. The retinoblastoma tumor-suppressor gene, the exception that proves the rule. *Oncogene* 2006, 25 :5233-5243.
- [22] Nadine H, Béatrice P, Dominique V, Michel V. Mécanismes et conséquences des mutations. *Médecine/Science* 2005, 21:11.
- [23] Knudson AG. Mutation and cancer : Statistical study of retinoblastoma. *Pro Nat Acad Sci* 68 :820-23 (1971)
- [24] Gonin-Laurent N, Hadj-Hamou NS, Vogt N, Houdayer C, Gauthiers-Villars M, Dehainault C, Sastre-Garau X, Chevillard S, Malfoy B. RB1 and TP53 pathways in radiation-induced sarcomas. *Oncogene* 2007, 26(41):6106-12.
- [25] Knudson AG. Historical perspective on retinoblastoma. *St jude special seminar*. 2005.
- [26] Phelps WC, Munger K, Yee CL, Barnes JA, Howley PM. Structure function analysis of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *J Virol* (1992) 66(4) :2418-27
- [27] F. Doz. Rétinoblastome : aspects récents. *Retinoblastoma: a review. Arch Pediatr*, 13 (2006), pp. 1329-1337
- [28]. Valverde J, Alonso J, Palacios I and Pestaña. RB1 gene mutation update, a meta-analysis based on 932 reported mutations available in a searchable database. *BMC Genetics* 2005, 6: 53-61
- [29] Stenson PD, Ball EV, Mort M, Philips AD, Shield JA, Thomas NS, Abeyasinghe S, Krawczak M, Cooper DN. Human gene mutation database (HGMD). *Human Mut* 2003, 21 :577-578
- [30] Mancini D, Sing S, Ainsworth P, Rodenhiser D. Constitutively methylated CpG dinucleotides as mutation hot spots in the retinoblastoma gene (RB1). *Am J Hum Genet* 1997, 61:80-87
- [31] Hentze MW, Kulozik AE. A perfect message : RNA surveillance and nonsense mediated decay. *Cell* 1999, 96:307-31

