

**Université de Limoges**  
**Faculté de Médecine**

Année 2016

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'état de docteur en Médecine

présentée et soutenue publiquement  
le 9 septembre 2016  
par

**Aurélie Charissoux**

née le 7 mai 1987, à limoges

**ÉTUDE GÉNOMIQUE COMPARATIVE DU TISSU TUMORAL SOLIDE  
ET DES CELLULES TUMORALES INFILTRANTES DE  
GLIOBLASTOME**

Examineurs de la thèse :

M. le Professeur François Labrousse

M. le Professeur François Caire

M<sup>me</sup>. le Professeur Marie-Odile Jauberteau-Marchan

M<sup>me</sup>. le Docteur Karine Durand

M<sup>me</sup>. le Docteur Laura Mesturoux

Président

Juge

Juge

Juge

Membre invité





**Université de Limoges**  
**Faculté de Médecine**

Année 2016

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'état de docteur en Médecine

présentée et soutenue publiquement  
le vendredi 9 septembre  
par

**Aurélie Charissoux**

née le 7 mai 1987, à Limoges

**ÉTUDE GÉNOMIQUE COMPARATIVE DU TISSU TUMORAL SOLIDE  
ET DES CELLULES TUMORALES INFILTRANTES DE  
GLIOBLASTOME**

Examineurs de la thèse :

M. le Professeur François Labrousse

M. le Professeur François Caire

M<sup>me</sup>. le Professeur Marie-Odile Jauberteau-Marchan

M<sup>me</sup>. le Docteur Karine Durand

M<sup>me</sup>. le Docteur Laura Mesturoux

Président

Juge

Juge

Juge

Membre invité



## Professeurs des Universités - praticiens hospitaliers

---

<b>ABOYANS</b> Victor	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier CARDIOLOGIE Responsable de service
<b>ACHARD</b> Jean-Michel	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier PHYSIOLOGIE
<b>ADENIS</b> Jean-Paul	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier OPHTALMOLOGIE
<b>ALAIN</b> Sophie	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
<b>ALDIGIER</b> Jean-Claude	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier NEPHROLOGIE
<b>ARCHAMBEAUD</b> Françoise	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier MEDECINE INTERNE Responsable de service
<b>ARNAUD</b> Jean-Paul	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE et TRAUMATOLOGIQUE
<b>AUBARD</b> Yves	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE Responsable de service
<b>AUBRY</b> Karine	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier O.R.L.
<b>BEDANE</b> Christophe	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier DERMATO-VENEREOLOGIE Responsable de service
<b>BERTIN</b> Philippe	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier THERAPEUTIQUE Responsable de service de RHUMATOLOGIE
<b>BESSEDE</b> Jean-Pierre	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier O.R.L. Responsable de service
<b>BONNAUD</b> François	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier PNEUMOLOGIE Doyen Honoraire



<b>BORDESSOULE</b> Dominique	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier HEMATOLOGIE Responsable de service d'HEMATOLOGIE CLINIQUE et THERAPIE CELLULAIRE
<b>CAIRE</b> François	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier NEUROCHIRURGIE
<b>CHARISSOUX</b> Jean-Louis	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE et TRAUMATOLOGIQUE
<b>CLAVERE</b> Pierre	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier RADIOTHERAPIE Responsable de service
<b>CLEMENT</b> Jean-Pierre	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier PSYCHIATRIE d'ADULTES Responsable de service
<b>COGNE</b> Michel	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier IMMUNOLOGIE Responsable de service
<b>CORNU</b> Elisabeth	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE
<b>COURATIER</b> Philippe	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier NEUROLOGIE Responsable de service
<b>DANTOINE</b> Thierry	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier GERIATRIE et BIOLOGIE du VIEILLISSEMENT Responsable de service
<b>DARDE</b> Marie-Laure	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE Responsable de service
<b>DAVIET</b> Jean-Christophe	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION
<b>DESCAZEAUD</b> Aurélien	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier UROLOGIE
<b>DESSPORT</b> Jean-Claude	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier NUTRITION



<b>DRUET-CABANAC</b> Michel	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier MEDECINE et SANTE au TRAVAIL Responsable de service
<b>DUMAS</b> Jean-Philippe	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier UROLOGIE Responsable de service
<b>ESSIG</b> Marie	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier NEPHROLOGIE Responsable de service
<b>FAUCHAIS</b> Anne-Laure	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier MEDECINE INTERNE Responsable de service
<b>FEUILLARD</b> Jean	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier HEMATOLOGIE Responsable de service du Laboratoire d'HEMATOLOGIE
<b>FOURCADE</b> Laurent	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier CHIRURGIE INFANTILE Responsable de service
<b>GAINANT</b> Alain	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier CHIRURGIE DIGESTIVE
<b>GUIGONIS</b> Vincent	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier PEDIATRIE
<b>JACCARD</b> Arnaud	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier HEMATOLOGIE
<b>JAUBERTEAU-MARCHAN</b> M. Odile	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier IMMUNOLOGIE
<b>LABROUSSE</b> François	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier ANATOMIE et CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES Responsable de service
<b>LACROIX</b> Philippe	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier MEDECINE VASCULAIRE
<b>LAROCHE</b> Marie-Laure	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier PHARMACOLOGIE CLINIQUE



<b>LASKAR</b> Marc	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE Responsable de service Assesseur
<b>LIENHARDT-ROUSSIE</b> Anne	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier PEDIATRIE Responsable de service
<b>LOUSTAUD-RATTI</b> Véronique	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier HEPATOLOGIE
<b>MABIT</b> Christian	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier ANATOMIE Responsable de service d'ORTHOPEDIE- TRAUMATOLOGIE
<b>MAGY</b> Laurent	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier NEUROLOGIE
<b>MARQUET</b> Pierre	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE Responsable de service
<b>MATHONNET</b> Muriel	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier CHIRURGIE DIGESTIVE
<b>MELLONI</b> Boris	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier PNEUMOLOGIE Responsable de service
<b>MERLE</b> Louis	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier PHARMACOLOGIE CLINIQUE
<b>MOHTY</b> Dania	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier CARDIOLOGIE
<b>MONTEIL</b> Jacques	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier BIOPHYSIQUE et MEDECINE NUCLEAIRE Responsable de service
<b>MOREAU</b> Jean-Jacques	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier NEUROCHIRURGIE Responsable de service Assesseur
<b>MOUNAYER</b> Charbel	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE



<b>NATHAN-DENIZOT</b> Nathalie	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION Responsable de service
<b>PARAF</b> François	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier MEDECINE LEGALE et DROIT de la SANTE Responsable de service
<b>PLOY</b> Marie-Cécile	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE Responsable de service
<b>PREUX</b> Pierre-Marie	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION Responsable de service du SIME Assesseur
<b>ROBERT</b> Pierre-Yves	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier OPHTALMOLOGIE Responsable de service
<b>SALLE</b> Jean-Yves	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION Responsable de service
<b>SAUTEREAU</b> Denis	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier GASTRO-ENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE Responsable de service
<b>STURTZ</b> Franck	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE Responsable de service
<b>TEISSIER-CLEMENT</b> Marie-Pierre	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier ENDOCRINOLOGIE, DIABETE et MALADIES METABOLIQUES
<b>TREVES</b> Richard	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier RHUMATOLOGIE
<b>TUBIANA-MATHIEU</b> Nicole	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier CANCEROLOGIE Responsable de service
<b>VALLEIX</b> Denis	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier ANATOMIE Responsable de service de CHIRURGIE DIGESTIVE et ENDOCRINIENNE Doyen





<b>VERGNENEGRE</b> Alain	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION Responsable de service de l'UNITE ONCO- THORACIQUE et CUTANEE
<b>VERGNE-SALLE</b> Pascale	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier THERAPEUTIQUE
<b>VIGNON</b> Philippe	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier REANIMATION Responsable de service
<b>VINCENT</b> François	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier PHYSIOLOGIE
<b>VIROT</b> Patrice	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier CARDIOLOGIE
<b>WEINBRECK</b> Pierre	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier MALADIES INFECTIEUSES Responsable de service
<b>YARDIN</b> Catherine	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier CYTOLOGIE et HISTOLOGIE Responsable de service

#### **PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE**

<b>BUCHON</b> Daniel	Professeur des Universités MEDECINE GENERALE
----------------------	---

#### **MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS**

<b>AJZENBERG</b> Daniel	Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE
<b>BARRAUD</b> Olivier	Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
<b>BOURTHOUMIEU</b> Sylvie	Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier CYTOLOGIE et HISTOLOGIE
<b>BOUTEILLE</b> Bernard	Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE



<b>CHABLE</b> Hélène	Maître de Conférence des Universités-Praticien Hospitalier BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
<b>DURAND</b> Karine	Maître de Conférence des Universités-Praticien Hospitalier BIOLOGIE CELLULAIRE
<b>DURAND-FONTANIER</b> Sylvaine	Maître de Conférence des Universités-Praticien Hospitalier ANATOMIE
<b>ESCLAIRE</b> Françoise	Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier BIOLOGIE CELLULAIRE
<b>HANTZ</b> Sébastien	Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
<b>LE GUYADER</b> Alexandre	Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE
<b>LIA</b> Anne-Sophie	Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
<b>MARIN</b> Benoît	Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION
<b>QUELVEN-BERTIN</b> Isabelle	Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier BIOPHYSIQUE et MEDECINE NUCLEAIRE
<b>TCHALLA</b> Achille	Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier GERIATRIE et BIOLOGIE du VIEILLISSEMENT
<b>TERRO</b> Faraj	Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier BIOLOGIE CELLULAIRE
<b>WOILLARD</b> Jean-Baptiste	Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE



### **PROFESSEURS ASSOCIES**

**DUMOITIER** Nathalie                      Professeur associé à mi-temps  
MEDECINE GENERALE

**PREVOST** Martine                          Professeur associé à mi-temps  
MEDECINE GENERALE

### **MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE**

**MENARD** Dominique                      Maître de Conférences associé à mi-temps  
MEDECINE GENERALE

### **PROFESSEURS EMERITES**

**BONNETBLANC** Jean-Marie              Professeur des Universités Emérite

**VALLAT** Jean-Michel                      Professeur des Universités Emérite

Le 09 septembre 2014



## Assistants Hospitaliers Universitaires – Chefs de Clinique

---

Le 1<sup>er</sup> novembre 2014

### **ASSISTANTS HOSPITALIERS UNIVERSITAIRES**

<b>BLANC</b> Philippe	BIOPHYSIQUE et MEDECINE NUCLEAIRE
<b>CHAUZEIX</b> Jasmine	HEMATOLOGIE
<b>COUVÉ-DEACON</b> Elodie	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE (Centre d'Investigation Clinique)
<b>DONISANU</b> Adriana	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
<b>FILLOUX</b> Matthieu	IMMUNOLOGIE
<b>FRUIT</b> Dorothée	PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE (Centre d'Investigation Clinique)
<b>FREDON</b> Fabien	ANATOMIE (assistant associé du 01-11-2014 au 31-10-2015)
<b>GAGNOUD</b> Rémi	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
<b>GALY</b> Antoine	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
<b>GENIAUX</b> Hélène	PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE ; PHARMACOLOGIE CLINIQUE ; ADDICTOLOGIE
<b>MANCIA</b> Claire	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
<b>MATHIEU</b> Pierre-Alain	ANATOMIE (Service d'Orthopédie-Traumatologie)
<b>MESTUROUX</b> Laura	ANATOMIE et CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES
<b>OLOMBEL</b> Guillaume	IMMUNOLOGIE
<b>ROGER</b> Lucie	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION (Surnombre du 1 <sup>er</sup> novembre 2014 au 06 mars 2015 inclus)
<b>ROULET-COUDRIER</b> Fanny	CYTOLOGIE et HISTOLOGIE
<b>SERENA</b> Claire	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
<b>THOLANCE</b> Yannick	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE



## **CHEFS DE CLINIQUE - ASSISTANTS DES HOPITAUX**

<b>ABDEH</b> Ali	CHIRURGIE DIGESTIVE (Chef de clinique associé du 01-11-2014 au 30-04-2015)
<b>ARDOUIN</b> Elodie	RHUMATOLOGIE
<b>ASLOUM</b> Youcef	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE et TRAUMATOLOGIQUE
<b>AUBOUR</b> Marine	RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE
<b>BORDAS</b> Mathieu	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE
<b>BORDES</b> Jérémie	MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION
<b>BOULOGNE</b> Cyrille	CARDIOLOGIE
<b>BOURMAULT</b> Loïc	OPHTALMOLOGIE
<b>BUISSON</b> Géraldine	PEDOPSYCHIATRIE
<b>CAZAVET</b> Alexandre	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE
<b>CENTI</b> Joachim	UROLOGIE
<b>CHAPELLAS</b> Catherine	REANIMATION
<b>COSTE-MAZEAU</b> Perrine	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
<b>CYPIERRE</b> Anne	MEDECINE INTERNE A
<b>DAIX</b> Thomas	REANIMATION
<b>DIJOUX</b> Pierrick	CHIRURGIE INFANTILE
<b>DONADEL</b> Lorène	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE (Surnombre du 1 <sup>er</sup> novembre 2014 au 20 février 2015 inclus)
<b>DOST</b> Laura	OPHTALMOLOGIE
<b>DURAND</b> Lise-Marie	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE (Surnombre du 1 <sup>er</sup> novembre 2014 au 06 mars 2015 inclus)
<b>EGENOD</b> Thomas	PNEUMOLOGIE



<b>ENESCU-FLORICA</b> Eléna-Cécilia	DERMATOLOGIE-VENERELOGIE
<b>ENSERGUEIX</b> Gaël	NEPHROLOGIE
<b>ESPAGNE-DUBREUILH</b> Gaelle	GERIATRIE et BIOLOGIE du VIEILLISSEMENT
<b>EVENO</b> Claire	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE
<b>GANTOIS</b> Clément	NEUROCHIRURGIE
<b>GIMENEZ</b> Laetitia	NEUROLOGIE
<b>GSCHWIND</b> Marion	MEDECINE INTERNE B
<b>HUMMEL</b> Vincent	RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE
<b>IOSIF</b> Christina	RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE (Chef de clinique associée du 14-11-2013 au 13-05- 2014 et du 14-05-2014 au 13-11-2014)
<b>JACQUES</b> Jérémie	GASTRO-ENTEROLOGIE
<b>KENNEL</b> Céline	HEMATOLOGIE
<b>LACORRE</b> Aymeline	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
<b>LAPÉBIE</b> François-Xavier	MEDECINE INTERNE A
<b>LE COUSTUMIER</b> Eve	MALADIES INFECTIEUSES
<b>LEGROS</b> Emilie	PSYCHIATRIE d'ADULTES
<b>LERAT</b> Justine	O.R.L.
<b>MAILLOCHON</b> Edouard	CHIRURGIE DIGESTIVE
<b>MARTIN</b> Sylvain	RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE
<b>MASSON</b> Alexandra	PEDIATRIE
<b>MESNARD</b> Chrystelle	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
<b>MONTCUQUET</b> Alexis	NEUROLOGIE
<b>PETITALOT</b> Vincent	CARDIOLOGIE
<b>PONTHIER</b> Laure	PEDIATRIE
<b>ROGER</b> Thomas	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE et TRAUMATOLOGIQUE



**SALERNO** Baptiste

CARDIOLOGIE

**SCOMPARIN** Aurélie

O.R.L.

**TABOURET** Tessa

GASTRO-ENTEROLOGIE

**TALLON** Elizabeth

PSYCHIATRIE d'ADULTES

**TRIGOLET** Marine

PEDIATRIE

**CHEF DE CLINIQUE – MEDECINE GENERALE**

**RUDELLE** Karen

**CHEF DE CLINIQUE ASSOCIE – MEDECINE GENERALE**

(du 1<sup>er</sup> novembre 2014 au 31 octobre 2015)

**LAUCHET** Nadège

**PRATICIEN HOSPITALIER UNIVERSITAIRE**

**CROS** Jérôme

ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION

(du 1<sup>er</sup> mai 2014 au 31 octobre 2018)



à mon chéri, à mes parents, à ceux que j'aime





## Remerciements

---

Tout d'abord, au Professeur François Labrousse, je vous remercie d'avoir accepté d'être le président de mon jury de thèse. Je souhaite également vous remercier, pour l'ensemble de mon internat, réalisé en grande partie dans votre service, pour nos discussions parfois tardives sur cette spécialité passionnante et difficile qu'est l'anatomo-pathologie (en particulier quand il s'agit des tumeurs gliales). Merci, pour votre enseignement et votre disponibilité, notamment pour les séances à la bibliothèque sur les biopsies hépatiques. Un grand merci pour m'avoir poussée à faire un master 1 puis un master 2 et pour m'avoir soutenue dans le choix ce dernier semestre bordelais centré sur la dermatopathologie.

Au professeur François Caire, un grand merci pour avoir accepté d'être un des juges de ma thèse. Je vous remercie également d'avoir permis ce travail sur les glioblastomes, car sans la « matière première », il n'y aurait rien à étudier.

Au professeur Marie-Odile Jauberteau-Marchan, je vous remercie d'avoir accepté d'être un des juges de cette thèse. Je tenais également à vous remercier pour m'avoir accueillie dans votre équipe de recherche à deux reprises pendant mon internat, ce fut un réel plaisir.

Un très grand merci au Docteur Karine Durand, tout d'abord pour avoir accepté d'être ma directrice de thèse, en sachant l'ensemble du travail que cela implique. Je te remercie pour ta disponibilité et ta patience lors des explications (et elles ont été nombreuses) concernant notamment les techniques de biologie moléculaire, l'analyse statistique, les résultats de ce travail, pour ton aptitude à répondre à toutes mes questions, mes doutes et ce même le soir, que dis-je presque la nuit et le weekend. Merci également pour tes conseils lors des relectures. Tout simplement, je suis vraiment ravie que mon internat m'ait permis de te connaître, de travailler ensemble ou de ne pas travailler d'ailleurs. Un dernier merci pour nos discussions en toute liberté (et en toute discrétion) dans les couloirs.

Au Docteur Laura Mesturoux, un très grand merci pour avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse, j'imagine l'effort que cela représente. Merci d'avoir encadré (comme co-interne) mes premiers pas dans la spécialité dans ce magnifique bureau des internes du 2<sup>ème</sup> sous-sol. Merci pour ta gentillesse, ta patience et ta disponibilité (et il en a fallu) comme co-interne et puis après comme chef. Tu es un peu ma maman de l'anatomo-pathologie, je suis ravie de t'avoir eu comme co-interne puis comme chef, tu me manques vraiment.

Aux médecins du service d'anatomopathologie,

Au Docteur Delage, merci d'être toujours là, merci pour ton enseignement, ta gentillesse et ta patience. Merci également pour ta bonne humeur quotidienne, c'est vraiment agréable de travailler avec toi.



Au Docteur Béma Coulibaly, merci de ta gentillesse et de ta disponibilité pour l'enseignement. Merci également de ta bonne humeur, ton rire et tes blagues, mon internat n'aurait pas été le même sans toi.

Au Docteur Fabrice Progetti, (oui je t'ai mis dans les médecins du service) puisqu'il y a déjà une maman, merci d'avoir été mon papa de l'anatomo-pathologie.

Aux Docteurs Isabelle Pommepuy, Valère Mbou-Belle et Véronique Fermeaux merci de votre enseignement et de votre patience, à Sophie Martin.

Au Professeur François Paraf, merci pour votre enseignement et votre présence hebdomadaire au staff du mardi.

Aux autres médecins attachés du service, merci d'avoir été là quand j'avais des questions, avec une pensée tout particulière pour le Docteur Rougier (lors de mes questions sur les « petites bêtes » de la spécialité)

A mes co-internes,

Mes « piou-piou », Anne, Armand, Bertrand, merci d'être là, de m'avoir soutenue et supportée pendant mon internat. A Anne particulièrement, merci de ton aide lors de ce dernier semestre, ce n'est pas facile de gérer à distance, heureusement que tu étais là.

A Denis, merci de ta gentillesse et un grand merci également pour l'iconographie radiologique.

A mes autres co-internes, je pense bien sûr à Safaë, Mathieu, Marion, Marie, Ali, David et Dat, merci, pour ce semestre ensemble, c'était vraiment sympa.

A Julie, c'était sympa de faire ensemble cette folle aventure poitevine.

A mes co-internes bordelais, Adeline, Aurore, Julien Bertrand et Magalie, merci pour votre accueil et les belles soirées passées ensemble.

Aux techniciens du service d'anatomopathologie,

Aux techniciennes de la macroscopie, Carine « chou », Elodie, Marie, Laura, Audrey Fanny, Stéphanie et Carole merci d'avoir encadré mes débuts, merci de votre patience.

Aux techniciens de l'immunohistochimie, de la coupe, de la coloration, Pascale, Chantale, Cédric, Sandrine, Annie, Kim, Sylvie, benjamin, merci !

A la « team biomio », Sylvain, Emilie, Jade, Maeva et Alain merci d'être aussi cool.



Aux secrétaires, Pascale, Nadine, Sandra, Anne-marie et Joëlle merci.

A Daniel et Katia, un grand merci pour vos blagues et votre bonne humeur tout au long de mon internat.

A Françoise, merci (notamment pour les commandes toujours urgente de réactif).

Je souhaite également remercier, Rémi Moulinas et Nicolas Bargues, Bio-informaticiens, pour votre aide pour l'analyse bioinformatique, et pour les explications sur l'analyse des données, l'utilisation des logiciels. Et pour votre disponibilité lors de mes passages itératifs à l'unité de séquençage.

Je remercie Emilie Guerin, l'ingénieur de l'unité de séquençage GENOLIM, pour m'avoir permis d'assister aux étapes que je n'ai pas pu réaliser.

Je remercie Sandrine Robert, pour m'avoir permis d'accéder aux articles scientifiques indispensables pour établir «l'état de l'art ».

Le meilleur pour la fin, à mes amis et ma famille,

A Alexia et Benjamin, merci d'être là, et d'avoir toujours été là, et ce malgré la distance et oui Toulouse c'est quand même à 3 heures. Ce sera bientôt votre tour !

Aux filles, Aurélie, Sarah, Oriane et Yasmine, merci, je vous fais des bisous.

A mes parents, Romain et ma belle-famille, merci de m'avoir soutenue, encouragée et supportée pendant cette année éreintante et durant l'ensemble de mes études, je vous aime.

A ceux que j'ai oubliés, merci, et désolé !



## Droits d'auteurs

---

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



## Table des matières

Introduction .....	26
I.1. Histopathologie des glioblastomes .....	27
I.1.1. Grade histo-pronostique des gliomes .....	27
I.1.2. Définition spatiale des gliomes .....	30
I.1.3. Définition des glioblastomes primaires et secondaires .....	33
I.1.4. Apport de la classification OMS 2016 .....	33
I.2. Aspect radiologique des glioblastomes .....	36
I.3. Altérations moléculaires des glioblastomes .....	39
I.4. Classification moléculaire des glioblastomes .....	42
Objectif de l'étude .....	45
Matériels et méthodes .....	46
I.1. Données cliniques et histopathologiques .....	46
I.2. Génétique moléculaire .....	46
I.2.1. Extraction de l'ADN génomique à partir des tissus tumoraux .....	47
I.2.2. Extraction de l'ADN génomique à partir du tissu cérébral sain péri-tumoral .....	47
I.2.3. Extraction de l'ADN génomique à partir de sang total .....	47
I.2.4. Quantification de l'ADN génomique .....	47
I.2.5. Génotypage par séquençage nouvelle génération .....	48
I.2.5.1 Procédure de préparation des bibliothèques .....	49
I.2.5.2 Réaction d'amplification clonale par PCR en émulsion .....	51
I.2.5.3 Chargement de la puce et réaction de séquençage .....	52
I.2.6. Analyse bio-informatique des données .....	53
I.2.7. Interprétations des données .....	55
I.2.8. Annotation des variants SNP et prédiction de pathogénicité in silico .....	55
I.2.9. Analyse statistique .....	56
Résultats .....	57
I.1. Données cliniques et histopathologiques .....	57
I.2. Données du rapport de séquençage .....	58
I.3. Résultats de l'analyse des variants .....	59
I.3.1. Analyse des variants somatiques dont la fréquence allélique observée dans le CTI est supérieure à celle du TT (Condition 1) .....	64
I.3.2. Analyse des variants a priori non somatiques, de fréquence allélique dans le CTI supérieure à celle du TT (condition 1) .....	69
I.3.3. Analyse des variants somatiques de fréquence allélique comparable entre les deux contingents tumoraux (condition 0 en somatique) .....	69
I.3.4. Comparaison des fréquences alléliques des variants entre le TCS et le sang pour trois cas .....	73
I.3.5. Comparaison des fréquences alléliques des variants pour des échantillons de même type à partir d'extraction d'ADN différente .....	74
I.3.6. Analyse de l'amplification d' <i>EGFR</i> et de <i>PDGFRA</i> et analyse de la survie .....	76
Discussion .....	79
Conclusion .....	84
Références bibliographiques .....	85
Annexes .....	90



## Table des illustrations

Figure 1 : coupe histologique visualisée au microscope optique de glioblastome : atypies cyto-nucléaires marquées Hémalum Phloxine Safran (HPS) x 200. ....	28
Figure 2 : coupe histologique visualisée au microscope optique de glioblastome : nécrose tumorale avec aspect pseudo-palissadique des cellules tumorales en péri-nécrotique HPS x100. ....	29
Figure 3 : coupe histologique visualisée au microscope optique de glioblastome : prolifération micro-vasculaire HPS x100. ....	29
Figure 4 : coupe histologique visualisée au microscope optique de glioblastome : prolifération micro-vasculaire Periodic acid schiff (PAS) x100. ....	30
Figure 5 : représentation schématique des deux composantes (TT et CTI) des glioblastomes. ....	31
Figure 6 : coupe histologique de glioblastome, vu de la lame, permettant d'apprécier le gradient d'infiltration tumorale (à droite) du parenchyme cérébral (à gauche). ....	31
Figure 7 : coupe histologique de glioblastome visualisée au microscope optique : tissu tumoral solide TT, HPS x 200. ....	32
Figure 8 : coupe histologique de glioblastome visualisée au microscope optique : cellules tumorales infiltrantes CTI, HPS x 200. ....	32
Figure 9 : coupe histologique visualisée au microscope optique : parenchyme cérébral « sain » péri-tumoral TCS, HPS x 200. ....	33
Figure 10 : algorithme de classification des gliomes diffus, d'après la figure 1 de l'article de Louis et collaborateurs : la 4 <sup>ème</sup> édition révisée de la classification OMS 2016 des tumeurs du système nerveux central (Louis et al., 2016). ....	35
Figure 11 : acquisition d'une IRM cérébrale, en coupe axiale passant par les ventricules latéraux, en séquence T1 : lésion frontale droite en hyposignal. ....	37
Figure 12 : acquisition d'une IRM cérébrale, en séquence T1 avec injection de gadolinium : rehaussement intense et irrégulier de la partie charnue périphérique, avec effet de masse sur le ventricule latéral droit et les structures médianes (engagement sous falcoriel). ....	37
Figure 13 : acquisition d'une IRM cérébrale, en séquence T2 : hypersignal intense au centre de la lésion en rapport avec la nécrose centrale et hypersignal périphérique moins marqué, mal limité, en rapport avec le CTI et l'œdème péri-tumoral. ....	38
Figure 14 : acquisition d'une IRM cérébrale, en séquence FLAIR : hypersignal intense au centre de la lésion en rapport avec la nécrose centrale et hypersignal périphérique moins marqué, mal limité, en rapport avec le CTI et l'œdème péri-tumoral. ....	38
Figure 15 : liste des 409 gènes du Comprehensive Cancer Panel <sup>TM</sup> . ....	49
Figure 16 : arbre décisionnel permettant l'identification de mutations pathogènes. ....	56
Figure 17 : caractéristiques des gènes ayant un variant somatique présent dans au moins deux cas avec une fréquence allélique comparable pour le CTI et le TT. Sur cette	

figure, sont également représentés avec des couleurs différentes, les variants présentant les autres conditions en somatique. ....	72
Figure 18 : <b>courbes de point pour les cas n°2 (A), n°5 (B) et n°13 (C)</b> , permettant d'obtenir des coefficients de corrélation positifs et statistiquement significatifs entre le TCS et le sang pour les trois cas ( $p < 0,0001$ ). ....	74
Figure 19 : <b>courbes de point pour le cas n°7, montrant une corrélation positive entre les deux échantillons de tissu tumoral solide en (A), de tissu tumoral infiltrant en (B) et de tissu sain, sang, en (C)</b> , statistiquement significative pour les trois ( $p < 0,0001$ ). ....	75
Figure 20 : <b>courbes de point pour le cas n°2 montrant une corrélation positive entre les deux échantillons de tissu tumoral infiltrant en (A), et ceux de tissu sain, sang, en (B)</b> , statistiquement significative pour les deux ( $p < 0,0001$ ). ....	76
Figure 21 : <b>courbes de point pour le cas n°13 montrant une corrélation positive entre les deux échantillons de tissu tumoral solide en (A), et ceux de tissu cérébral sain péri-tumoral, en (B)</b> , statistiquement significative pour les deux ( $p < 0,0001$ ). ....	76
Figure 22 : <b>comparaison des médianes de survie par rapport à l'âge, ou par rapport à la présence ou l'absence des variants <i>FGFR3</i>, <i>SAMD9v1</i> et <i>SAMD9v2</i></b> . ....	78





## Table des tableaux

---

Tableau 1 : <b>comparaison entre la 4<sup>ème</sup> édition et la 4<sup>ème</sup> édition révisée de la classification OMS des tumeurs du SNC.</b> .....	36
Tableau 2 : <b>sous-types moléculaires de glioblastome, (CH : chromosome)</b> .....	43
Tableau 3 : <b>données cliniques et histopathologiques pour chaque patient.*</b> âge au diagnostic en années, **RT : radiothérapie, CT : chimiothérapie, *** DDN : Date des dernières nouvelles en mois après le diagnostic.....	57
Tableau 4 : <b>paramètres principaux du rapport de séquençage pour chaque puce</b> .....	58
Tableau 5 : <b>répartition des variants par cas et par échantillon.</b> Les échantillons annotés 2 (TT2, CTI2, sang 2 et TCS2) correspondent à une deuxième analyse de l'échantillon. ....	59
Tableau 6 : <b>nombre de variants et de gènes présentant des variants en fonction des conditions pour les douze cas.</b> .....	62
Tableau 7 : <b>nombre de variants et de gènes présentant des variants en fonction des conditions pour les douze cas</b> * concernant la condition 1 : pour les cas 6 et 8 deux variants ont une fréquence allélique dans le sang non interprétable du fait d'une couverture limite, ne permettant pas de définir un statut somatique ou non somatique. ....	63
Tableau 8 : <b>résumé des caractéristiques en fonction des cas des différents variants présentant la condition 1.</b> .....	68
Tableau 9 : <b>caractéristiques de certains variants présentant la condition 1, et considérés comme non somatiques lors de l'analyse, a priori.</b> .....	71



## Introduction

---

Les glioblastomes sont des tumeurs intracérébrales primitives. Parmi les gliomes, ils représentent le sous-type le plus malin chez l'adulte. Leur incidence annuelle est estimée à 3-4 cas pour 100000 habitants, dans les pays caucasiens. Ils affectent majoritairement les adultes, avec un âge moyen dépendant du type de glioblastome. En effet, la 4<sup>ème</sup> édition révisée de la classification de l'organisation mondiale de la santé (OMS), des tumeurs du système nerveux central sépare distinctement les glioblastomes selon le statut sauvage ou muté du gène *IDH* (isocitrate dehydrogenase). De ce fait, les deux groupes présentent des caractéristiques épidémiologiques distinctes. Les glioblastomes *IDH*-sauvage constituent le type majoritaire, ils représentent 90% de l'ensemble des glioblastomes. Ils affectent préférentiellement l'adulte, avec un âge moyen de 62 ans au diagnostic. Le pic d'incidence de l'âge des patients atteints est compris entre 55 et 85 ans. Les glioblastomes comptent pour 15% de l'ensemble des tumeurs intracérébrales et pour 45-55% de l'ensemble des tumeurs malignes du système nerveux central (Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, 2016). Les glioblastomes *IDH*-sauvage sont préférentiellement localisés dans les régions hémisphériques et la localisation temporale est la plus fréquemment observée dans ce type de tumeur. Les glioblastomes *IDH*-muté équivalent à 10% de l'ensemble des glioblastomes. Ils se manifestent chez des patients plus jeunes, avec un âge moyen au diagnostic de 45 ans. Ces glioblastomes sont développés sur des tumeurs de grade inférieur, avec une localisation élective pour le lobe frontal. L'ensemble des glioblastomes constitue un groupe de tumeur hautement maligne, même si les glioblastomes *IDH*-muté ont un meilleur pronostic, avec une survie médiane au diagnostic, plus longue (survie médiane de 31 mois) que celle des glioblastomes *IDH*-sauvage. Pour les glioblastomes *IDH*-sauvage la survie médiane au diagnostic est estimée à 15 mois (Louis et al., 2007)(Stupp et al., 2005). Ce faible taux de survie est lié à différents facteurs. Ce sont notamment des tumeurs à développement rapide, infiltrant le parenchyme cérébral. Du fait de cette nature infiltrante, les glioblastomes ne peuvent être réséqués complètement, ce qui explique leurs récives après l'exérèse chirurgicale. Actuellement les stratégies thérapeutiques utilisées sont la résection chirurgicale associée à une chimiothérapie et à une radiothérapie. La chirurgie a pour objectif de réduire le volume tumoral. La radiothérapie peut être adjuvante, exclusive ou associée à la chimiothérapie. Diverses chimiothérapies peuvent être utilisées, comme le Temozolomide (TMZ) qui est un agent alkylant (Carlsson et al., 2014). L'association du TMZ et de la radiothérapie de manière concomitante en traitement après la chirurgie, suivi par du TMZ en adjuvant augmente la survie à 14,6 mois en comparaison à la chirurgie seule (médiane de survie à 6 mois) (Stupp et al., 2005) (Stupp et al., 2009). C'est actuellement le traitement de référence pour les glioblastomes (Weller et al., 2014). D'autres thérapies ont

également l'autorisation de mise sur le marché (AMM), en première ligne : il s'agit de chimiothérapie *in situ* composée d'implants imprégnés de Carmustine, une nitroso-urée placée dans la cavité tumorale lors de la chirurgie (Institut National du Cancer, 2012). Des découvertes récentes sur la compréhension de la physiopathologie et de la biologie de ces cancers ont permis le développement de nouvelles approches thérapeutiques. Ainsi, de multiples thérapies ciblant spécifiquement les altérations moléculaires présentes dans les glioblastomes sont en cours d'essais cliniques (Wilson et al., 2014). Récemment il a été montré que le Bevacizumab, un anticorps monoclonal humanisé contre le VEGF A (vascular endothelial growth factor A), n'améliore pas la survie globale des patients quand il est utilisé en première ligne. Néanmoins cet anticorps est fréquemment utilisé pour le traitement des récurrences de glioblastomes (Gilbert et al., 2014).

## **I.1. Histopathologie des glioblastomes**

### **I.1.1. Grade histo-pronostique des gliomes**

Les glioblastomes appartiennent au groupe des tumeurs gliales appelées gliomes et en constituent la forme la plus maligne. Les gliomes sont des proliférations tumorales constituées de cellules gliales, c'est à dire des cellules neuro-épithéliales non neuronales.

La classification histopathologique de l'OMS 2007 des gliomes est fondée sur deux axes. Le premier, est la reconnaissance d'un type cellulaire prédominant : les tumeurs à différenciation astrocytaire correspondent aux astrocytomes alors que les tumeurs à différenciation oligodendrogliale constituent le groupe des oligodendrogliomes. Le deuxième, est la détermination d'un grade de malignité. Récemment, la dernière édition de l'OMS 2016 (4<sup>ème</sup> édition révisée), classe les gliomes diffus non plus, seulement sur une ressemblance histologique mais également en fonction de paramètres moléculaires. Le grade de malignité, quant à lui inchangé dans la 4<sup>ème</sup> édition révisée, est un facteur déterminant pour adapter le schéma thérapeutique à la malignité de la tumeur. Il s'agit d'une véritable échelle de malignité. Le plus haut grade de malignité, grade IV, correspond notamment au diagnostic de glioblastome (Louis et al., 2007),(Louis et al., 2016).

Les glioblastomes sont formés de cellules tumorales peu différenciées avec, au moins focalement, une différenciation astrocytaire. Les cellules présentent des atypies cyto-nucléaires importantes, associées à une prolifération micro-vasculaire et une nécrose tumorale essentielle au diagnostic. En effet, le grade des gliomes est établi sur l'évaluation de quatre critères :

- la présence d'atypies cyto-nucléaires marquées (anaplasie cellulaire) (Figure 1)
- une activité mitotique
- une nécrose tumorale (Figure 2)

- une prolifération micro-vasculaire (Figures 3 et 4).

L'index de prolifération dans les glioblastomes peut être évalué grâce à l'étude immunohistochimique par l'anticorps KI-67 qui marque les noyaux des cellules entrées dans le cycle cellulaire (dont les mitoses). La valeur de cet index de prolifération peut être variable au sein de la tumeur, les valeurs moyennes observées dans les séries sont de 20%.

La prolifération micro-vasculaire observée dans les glioblastomes est la conséquence de plusieurs processus d'angiogenèse impliqués dans ces tumeurs. L'hypoxie est un des facteurs prépondérant de l'angiogenèse des glioblastomes, elle entraîne la stabilisation du facteur de transcription « hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  » (HIF-1 $\alpha$ ). Ce facteur active la transcription de gènes contrôlant l'angiogenèse dont le « vascular endothelial growth factor » (VEGF).

La nécrose tumorale est un des signes fondamentaux du diagnostic de glioblastome, elle peut représenter une grande majorité du volume tumoral. Cette nécrose est classiquement décrite comme en carte de géographie avec un aspect pseudo-palissadique du fait de la disposition radiaire des cellules et du stroma tumoral entourant la nécrose.

Les grades histo-pronostiques ainsi obtenus vont de I à IV, et la présence de trois ou quatre critères sur quatre correspond au grade IV, et notamment au glioblastome.

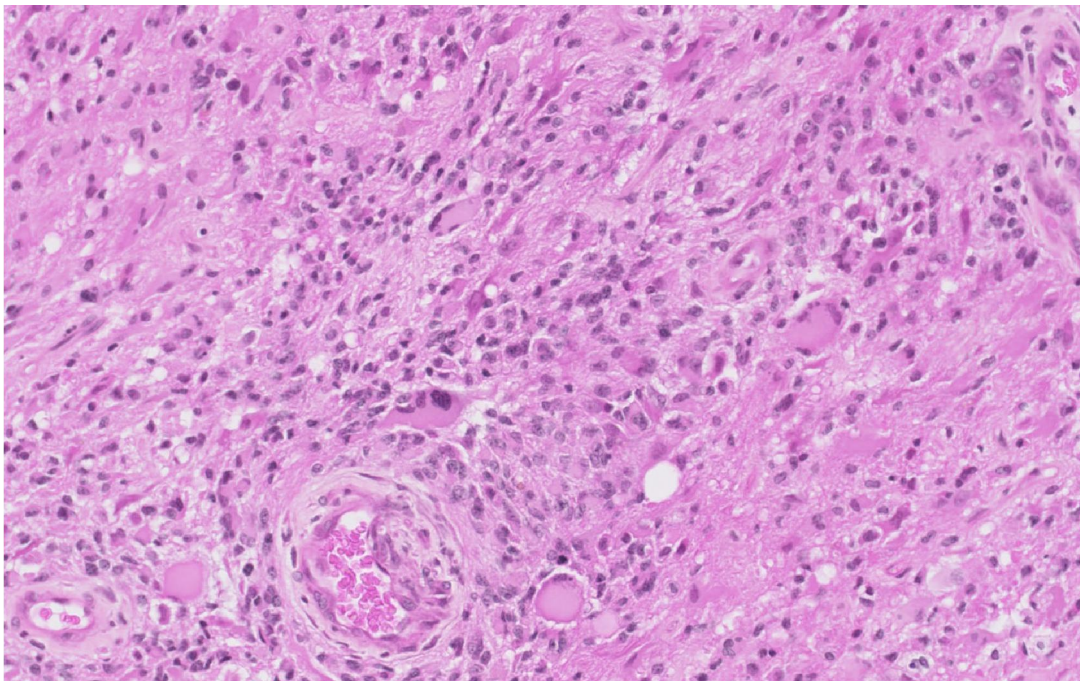


Figure 1 : coupe histologique visualisée au microscope optique de glioblastome : atypies cytonucléaires marquées Hémalum Phloxine Safran (HPS) x 200.





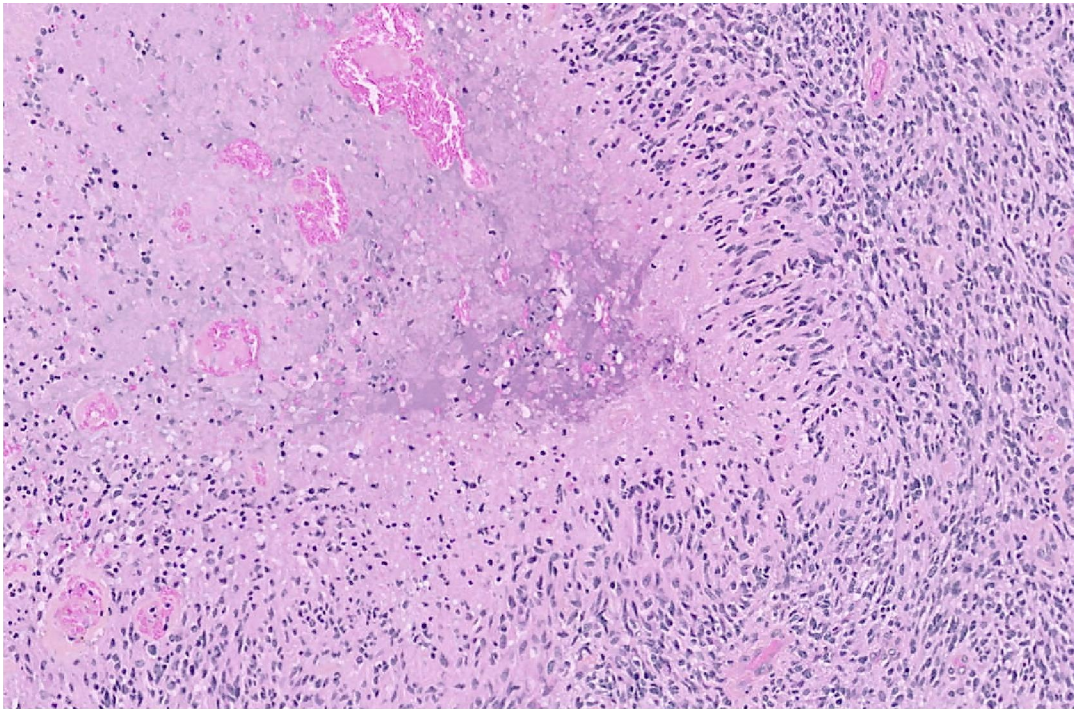


Figure 2 : coupe histologique visualisée au microscope optique de glioblastome : nécrose tumorale avec aspect pseudo-palissadique des cellules tumorales en péri-nécrotique HPS x100.

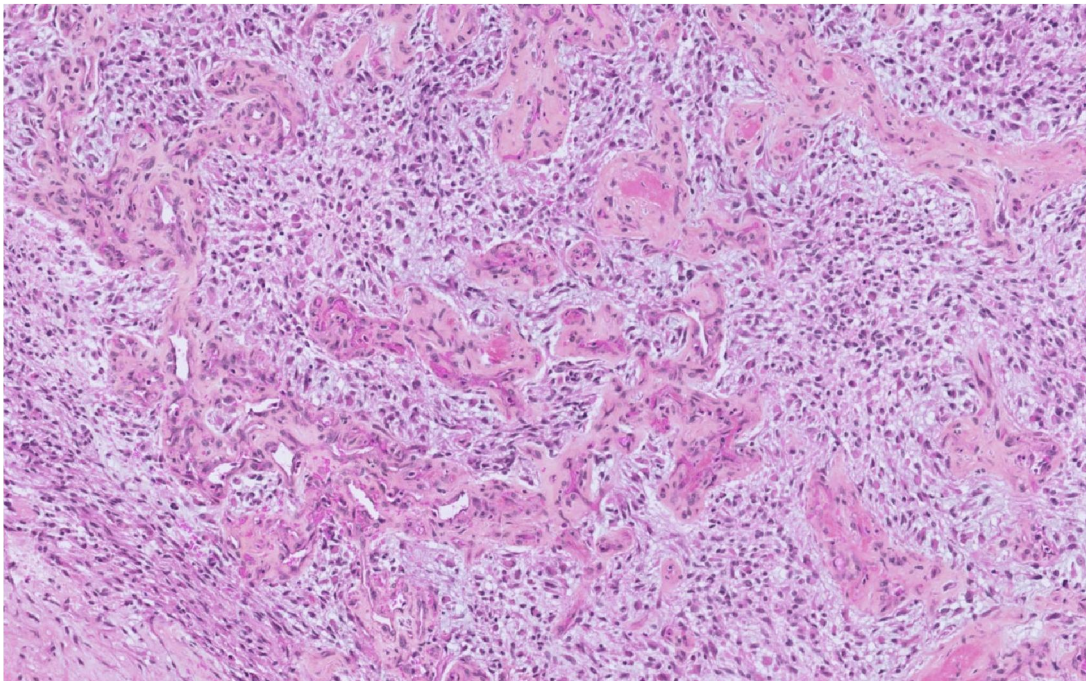


Figure 3 : coupe histologique visualisée au microscope optique de glioblastome : prolifération micro-vasculaire HPS x100.





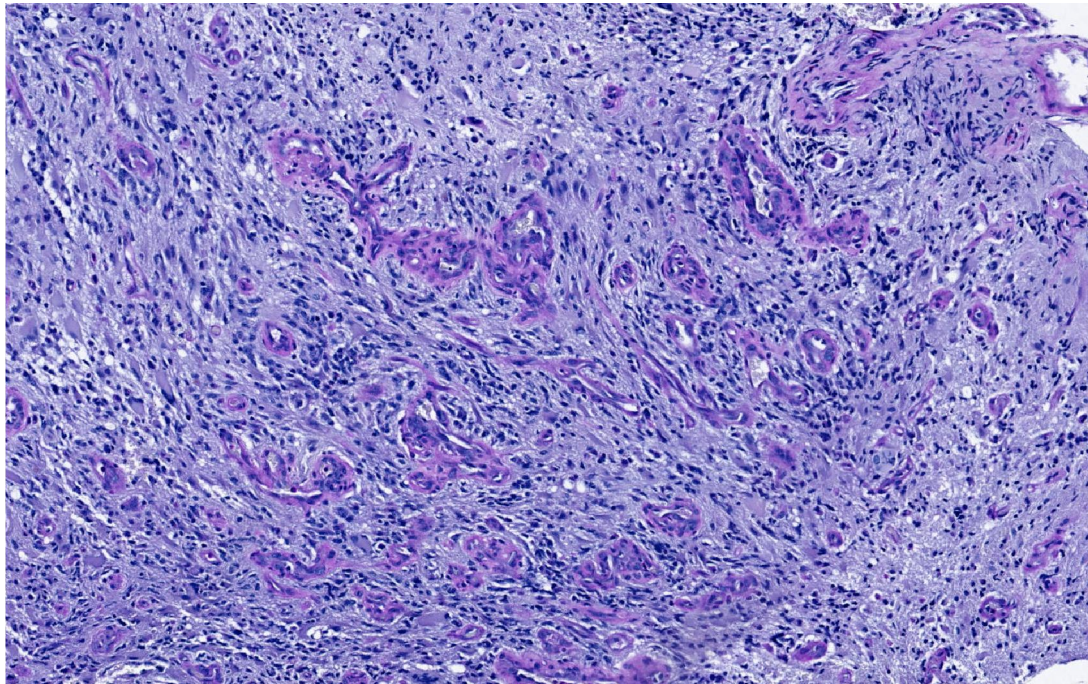


Figure 4 : **coupe histologique visualisée au microscope optique de glioblastome : prolifération micro-vasculaire** Periodic acid schiff (PAS) x100.

### **I.1.2. Définition spatiale des gliomes**

Un autre facteur particulier des gliomes à prendre en compte est leur structure spatiale (Figures 5 et 6). Deux contingents peuvent être distingués (Daumas-Duport et al., 1987). Le premier est constitué de tissu tumoral solide composé de cellules tumorales et d'un stroma tumoral (vaisseaux), ce contingent est appelé tissu tumoral (TT) (Figure 7). Le second est formé de cellules tumorales isolées, infiltrant le parenchyme cérébral, appelé cellules tumorales infiltrantes (CTI), (Figure 8), (Figarella-Branger et al., 2008). Certains gliomes ne sont constitués que de TT comme l'astrocytome pilocytique alors que d'autres ont un contingent de CTI. Ces derniers sont appelés gliomes « diffus » ou infiltrants (Louis et al., 2007). Les glioblastomes sont donc des tumeurs gliales, à différenciation astrocytaire prédominante, avec une structure mixte de TT et CTI de grade IV. On peut donc comprendre l'impact de la présence du contingent CTI, pour le projet thérapeutique et notamment pour la résection chirurgicale. La figure 9 illustre la cellularité du parenchyme cérébral « sain » péri-tumoral.



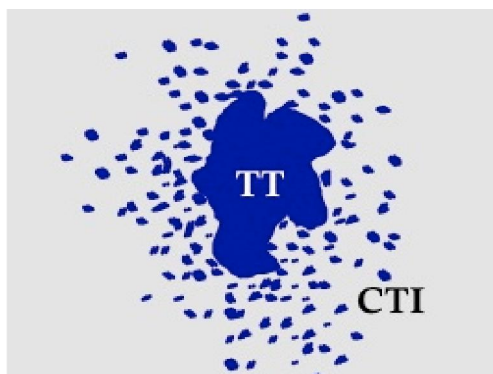


Figure 5 : représentation schématique des deux composantes (TT et CTI) des glioblastomes.

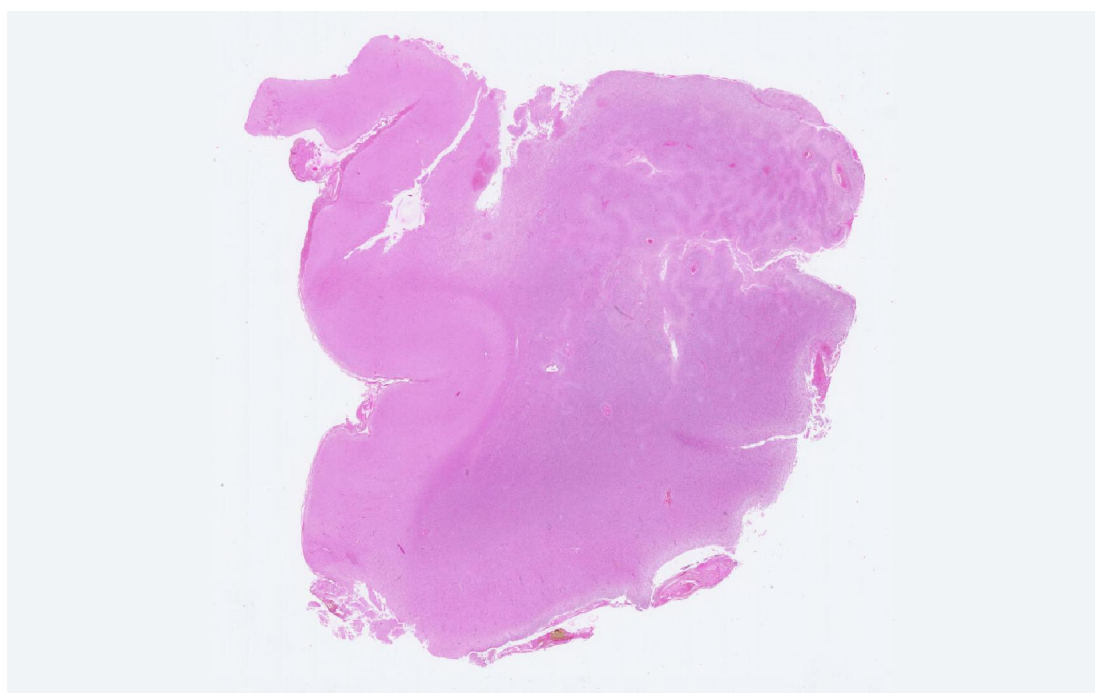


Figure 6 : coupe histologique de glioblastome, vu de la lame, permettant d'apprécier le gradient d'infiltration tumorale (à droite) du parenchyme cérébral (à gauche).



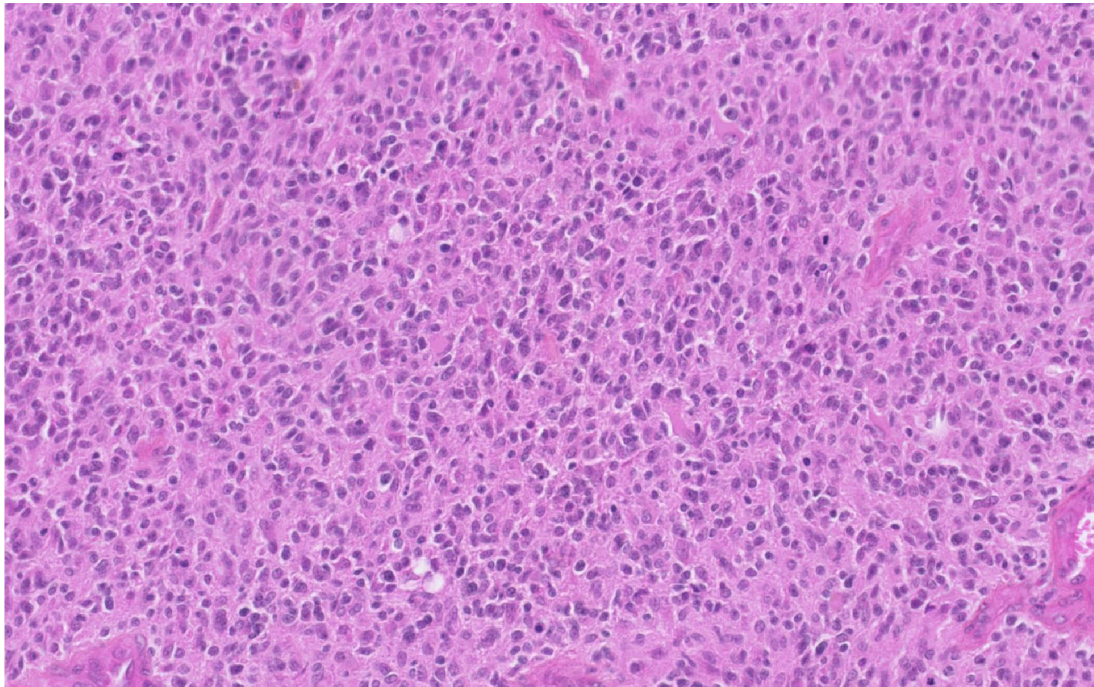


Figure 7 : coupe histologique de glioblastome visualisée au microscope optique : tissu tumoral solide TT, HPS x 200.

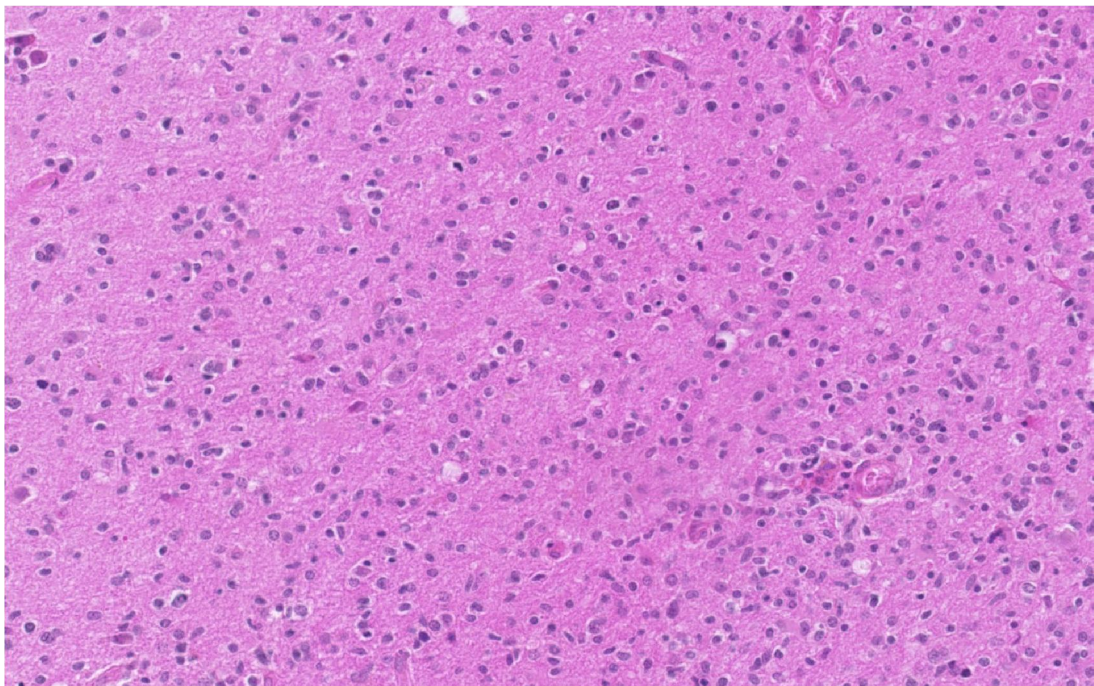


Figure 8 : coupe histologique de glioblastome visualisée au microscope optique : cellules tumorales infiltrantes CTI, HPS x 200.





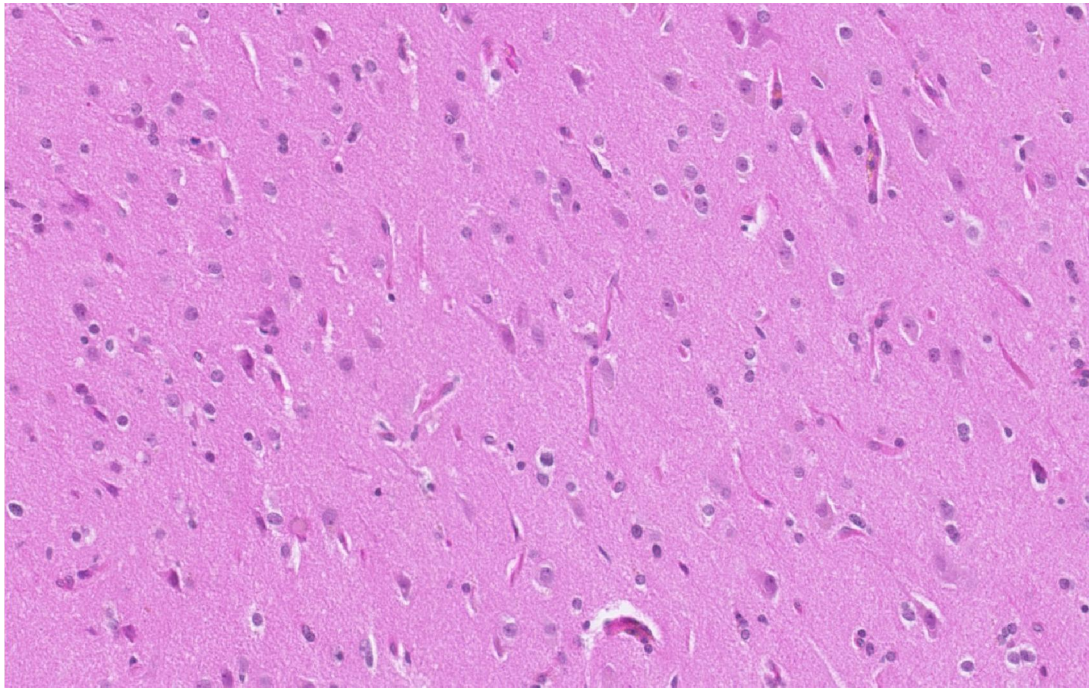


Figure 9 : coupe histologique visualisée au microscope optique : parenchyme cérébral « sain » péri-tumoral TCS, HPS x 200.

### I.1.3. Définition des glioblastomes primaires et secondaires

Il est décrit deux types de glioblastomes : les plus fréquents (90%) sont des glioblastomes de croissance rapide, *de novo*, sans lésion précurseur, appelés « glioblastomes primaires » ; les « glioblastomes secondaires » correspondent quant à eux à des glioblastomes ayant évolués à partir d'une tumeur de grade inférieur (astrocytome diffus ou astrocytome anaplasique) (Ohgaki and Kleihues, 2013). La distinction entre ces deux types de glioblastomes est basée sur la présence de marqueurs moléculaires spécifiques, notamment les mutations du gène *IDH* (qui sont décrites dans le chapitre sur les altérations moléculaires observées dans les glioblastomes) et des caractéristiques cliniques. D'un point de vue clinique, les glioblastomes secondaires affectent une population plus jeune. La moyenne d'âge est comprise entre 33-45 ans pour les glioblastomes secondaires, et entre 59-62 ans pour les glioblastomes primaires. L'histoire clinique précédant le diagnostic est plus courte pour les patients présentant un glioblastome primaire : 6,3 mois contre 16,8 mois pour les glioblastomes secondaires (Ohgaki and Kleihues, 2013). Avec la révision de la 4<sup>ème</sup> édition de l'OMS, les glioblastomes *IDH*-sauvage correspondent à des glioblastomes primaires *IDH*-sauvage, et les glioblastomes *IDH*-muté sont synonymes des glioblastomes secondaires *IDH*-muté (Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, 2016).

### I.1.4. Apport de la classification OMS 2016

La 4<sup>ème</sup> édition révisée de la classification OMS des tumeurs du système nerveux central est basée sur une approche diagnostic phénotypique et génotypique (Louis et al., 2016). Les



glioblastomes font partie du groupe comprenant les astrocytomes diffus et les tumeurs oligodendrogiales. De plus, une modification concerne notamment les glioblastomes, puisqu'ils sont désormais séparés en trois sous-groupes: les glioblastomes *IDH*-sauvage, les glioblastomes *IDH*-muté et les glioblastomes NOS (not otherwise specific, sans autre spécificité) (Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, 2016). Les glioblastomes classés dans la catégorie «sans autre spécificité» sont des tumeurs où l'absence d'information concernant le statut somatique de *IDH* ne permet pas de les assigner à un sous-groupe plus spécifique. Le statut *IDH*-sauvage peut-être donné dans deux conditions, la première correspond à une étude par immunohistochimie pour détecter le mutant R132H de *IDH1*, négative, combinée à un séquençage du codon 132 de *IDH1* et du codon 172 de *IDH2* négatif, la seconde correspond uniquement à un séquençage du codon 132 et 172 de *IDH1* et 2 respectivement, négatif. Le sous-groupe des glioblastomes *IDH*-sauvage constitue une large majorité des diagnostics de glioblastome, et il correspond fréquemment aux glioblastomes dit primaires ou *de novo*. De manière analogue, les glioblastomes *IDH*-muté, plus rares (10% des cas) équivalent presque exclusivement aux glioblastomes dits secondaires, ces patients ayant un antécédent d'astrocytome anaplasique ou d'astrocytome diffus, correspondant à une lésion précurseur de grade inférieur.

Il faut noter, que pour les patients atteints d'un glioblastome, et âgés de plus de 55 ans, la négativité de l'immunohistochimie pour le mutant R132H de *IDH1*, pourrait éventuellement suffire à classer ces glioblastomes dans le sous-groupe *IDH*-sauvage (Chen et al., 2014)

De plus, un nouveau sous-type de glioblastome *IDH*-sauvage est décrit : le glioblastome épithélioïde. Ces glioblastomes sont plus fréquemment observés chez l'enfant ou l'adulte jeune, ils sont formés par des cellules épithélioïdes à l'abondant cytoplasme éosinophile et au noyau nucléolé. Ces tumeurs présentent souvent une mutation *BRAF* V600E.



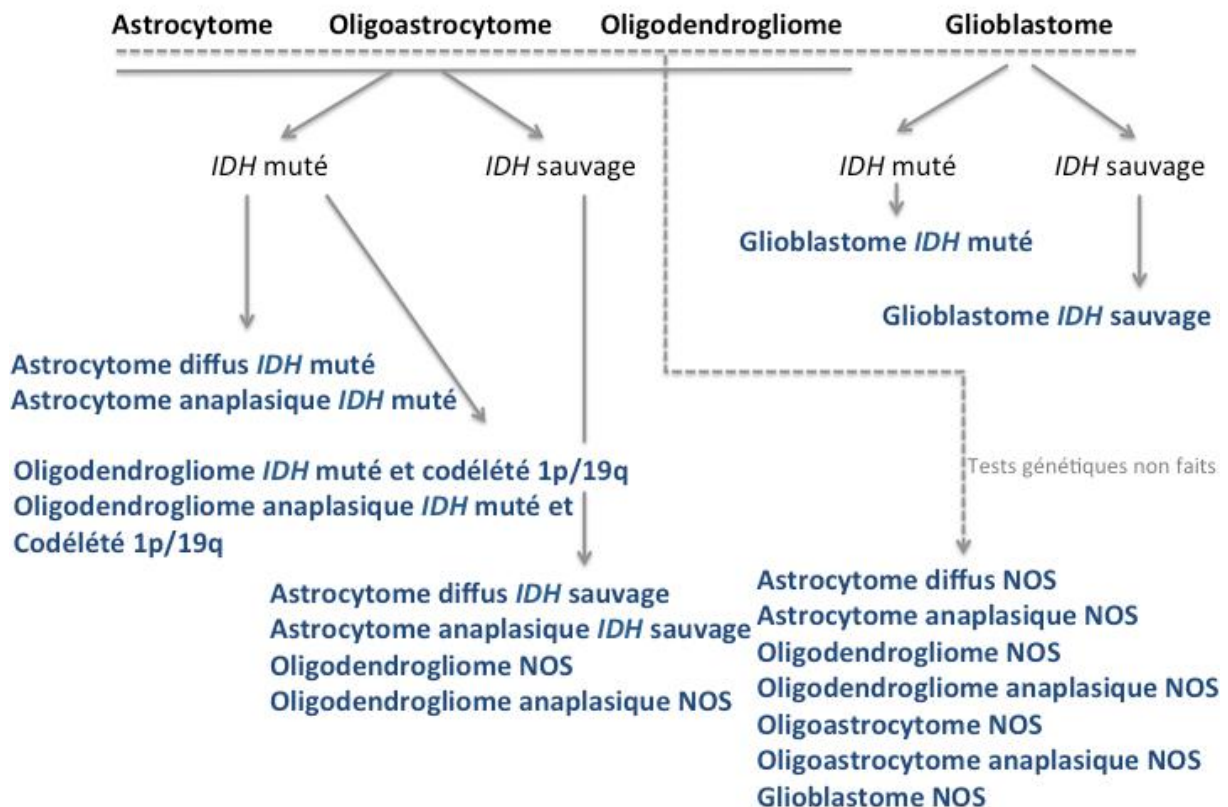


Figure 10 : **algorithme de classification des gliomes diffus, d'après la figure 1 de l'article de Louis et collaborateurs : la 4<sup>ème</sup> édition révisée de la classification OMS 2016 des tumeurs du système nerveux central** (Louis et al., 2016).

Le tableau 1 reprend une partie de la 4<sup>ème</sup> édition et de la 4<sup>ème</sup> édition révisée de la classification des tumeurs du système nerveux central. Dans la 4<sup>ème</sup> édition révisée, les astrocytomes de grade II et III, les oligodendrogliomes de grade II et II et les glioblastomes appartiennent au même groupe, celui des gliomes diffus. Ainsi les tumeurs astrocytaires ayant une croissance moins infiltrante, sans mutation de *IDH* et présentant des altérations de *BRAF* (astrocytome pilocytique, xanthoastrocytome pléomorphe) ou *TSC1/TSC2* (astrocytome sous épendymaire à cellules géantes) sont désormais exclues du groupe des gliomes diffus. Les tumeurs mixtes oligo-astrocytaires sont également exclues (classées en NOS) du fait de leur reclassement en fonction des altérations moléculaires qu'elles présentent ou non.



Tableau 1 : comparaison entre la 4<sup>ème</sup> édition et la 4<sup>ème</sup> édition révisée de la classification OMS des tumeurs du SNC.

Classification 4 <sup>ème</sup> édition	Classification 4 <sup>ème</sup> édition révisée
<p><b>Tumeur astrocytaire</b></p> <p>Astrocytome pilocytique                      Astrocytome sous épendymaire à cellules géantes                      Xanthoastrocytome pléomorphe                      Astrocytome diffus                      Astrocytome anaplasique                      Glioblastome</p> <p><b>Tumeur oligodendrogliale</b></p> <p>Oligodendrogliome                      Oligodendrogliome anaplasique</p> <p><b>Tumeur oligo-astrocytaire</b></p> <p>Oligoastrocytome                      Oligoastrocytome anaplasique</p>	<p><b>Astrocytome diffus et tumeurs oligodendrogiales</b></p> <p>Astrocytome diffus IDH muté                      Astrocytome diffus IDH sauvage                      Astrocytome diffus NOS</p> <p>Astrocytome anaplasique IDH muté                      Astrocytome anaplasique IDH sauvage                      Astrocytome anaplasique NOS</p> <p>Glioblastome IDH sauvage                      Glioblastome IDH muté                      Glioblastome NOS</p> <p>Gliome diffus H3K27M muté</p> <p>Oligodendrogliome IDH muté et co-déléte pour 1p/19q                      Oligodendrogliome NOS</p> <p>Oligodendrogliome anaplasique IDH muté et co-déléte pour 1p/19q                      Oligodendrogliome anaplasique NOS</p> <p>Oligoastrocytome NOS                      Oligoastrocytome anaplasique NOS</p> <p><b>Autres tumeurs astrocytaires</b></p> <p>Astrocytome pilocytique                      Astrocytome sous épendymaire à cellules géantes                      Xanthoastrocytome pléomorphe                      Xanthoastrocytome pléomorphe anaplasique</p>

## I.2. Aspect radiologique des glioblastomes

Les glioblastomes sont en imagerie de volumineuses masses d'aspect hétérogène. Les deux contingents, TT et CTI, des glioblastomes sont mis en évidence par l'imagerie notamment grâce à l'imagerie par résonance magnétique (IRM). La composante de TT n'étant formée que des cellules tumorales associées au stroma vasculaire, elle se traduit par un hyposignal en séquence T1 (Figure 11) et un rehaussement intense après injection de gadolinium (Figure 12). Le centre nécrotique de la tumeur apparaît en hypersignal en séquence T2 et FLAIR (Figure 13 et 14). Quant à la composante CTI, infiltrant le parenchyme cérébral sans stroma tumoral à part entière, elle n'est pas individualisable du reste du parenchyme cérébral et ne se rehausse pas après l'injection de gadolinium en séquence T1. Néanmoins, il existe fréquemment un hyposignal en séquence T1 et un hypersignal en séquence T2 à l'IRM autour de la zone tumorale charnue liée à la composante tumorale infiltrante et à l'œdème péri-tumoral, ces deux derniers ne pouvant être distingués en imagerie.

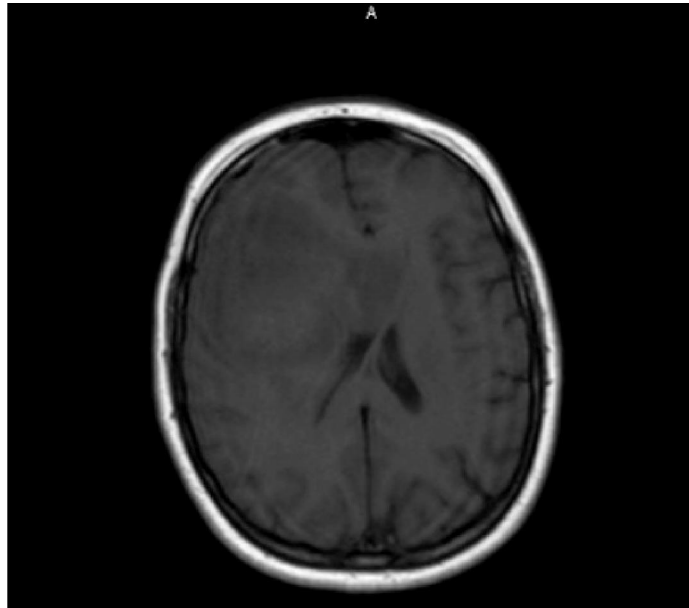


Figure 11 : acquisition d'une IRM cérébrale, en coupe axiale passant par les ventricules latéraux, en séquence T1 : lésion frontale droite en hyposignal.

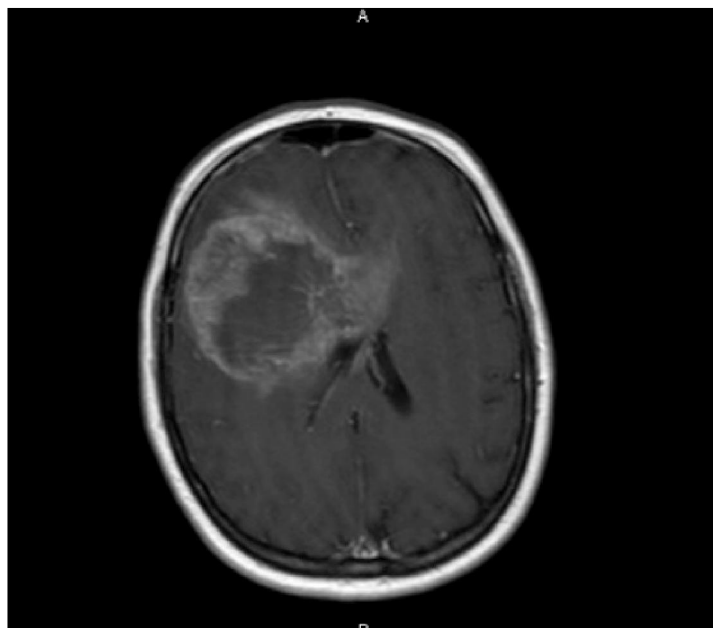


Figure 12 : acquisition d'une IRM cérébrale, en séquence T1 avec injection de gadolinium : rehaussement intense et irrégulier de la partie charnue périphérique, avec effet de masse sur le ventricule latéral droit et les structures médianes (engagement sous falcoriel).





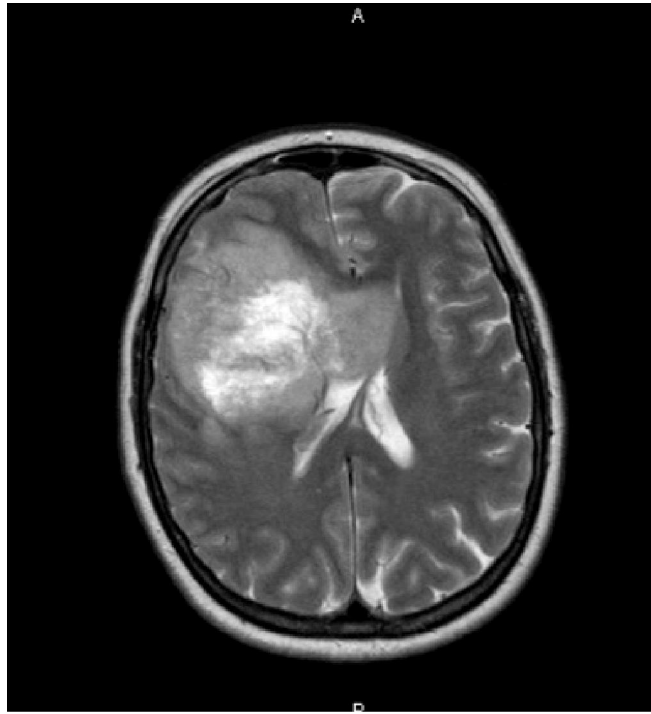


Figure 13 : acquisition d'une IRM cérébrale, en séquence T2 : hypersignal intense au centre de la lésion en rapport avec la nécrose centrale et hypersignal périphérique moins marqué, mal limité, en rapport avec le CTI et l'œdème péri-tumoral.

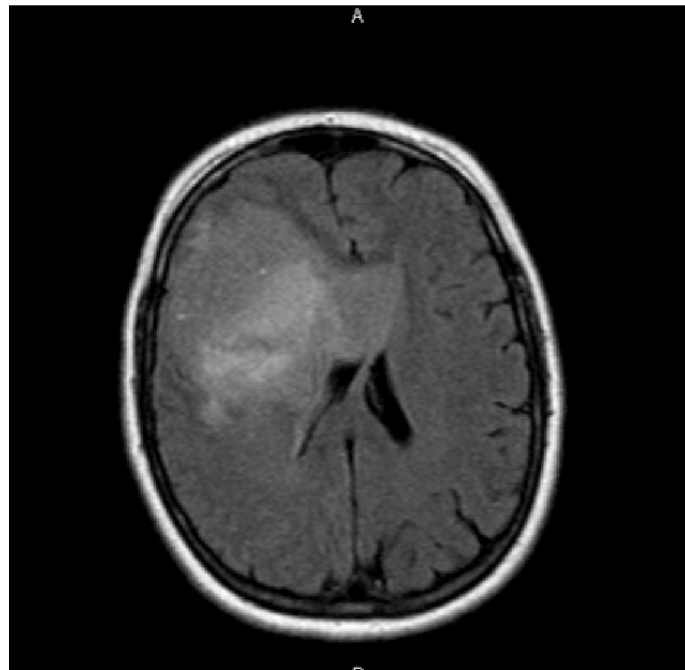


Figure 14 : acquisition d'une IRM cérébrale, en séquence FLAIR : hypersignal intense au centre de la lésion en rapport avec la nécrose centrale et hypersignal périphérique moins marqué, mal limité, en rapport avec le CTI et l'œdème péri-tumoral.

### I.3. Altérations moléculaires des glioblastomes

De nombreuses altérations génétiques sont impliquées dans l'apparition et la progression des glioblastomes. Certaines mutations sont définies comme des mutations « driver » car elles favorisent la tumorigenèse. Les mutations « passager » quant à elles surviennent lors de la prolifération des cellules tumorales mais ne sont pas responsables de cette prolifération. Il est donc difficile d'utiliser des thérapies ciblées dans ces cancers car les voies de signalisation impliquées dans la croissance et l'invasion tumorale sont nombreuses. De plus, l'hétérogénéité intra-tumorale apporte un niveau de complexité supplémentaire dans l'identification de ces mutations car toutes les cellules tumorales ne possèdent pas les mêmes mutations (Eder and Kalman, 2014) (Gerlinger et al., 2012) (Nobusawa et al., 2010).

Dans les glioblastomes, de nombreuses altérations moléculaires intéressent les récepteurs à activité tyrosine kinase, entraînant l'activation des cascades intracellulaires de signalisation correspondantes. C'est notamment le cas pour les récepteurs EGFR (epidermal growth factor receptor) et PDGFR (platelet derived growth factor receptor alpha polypeptide).

L'amplification du gène de l'*EGFR* est observée dans 50% des glioblastomes définis comme primaires. Elle entraîne la suractivation des voies de signalisation des MAPK (mitogen-activated protein kinase). Parmi les glioblastomes primaires avec l'*EGFR* amplifié, il existe une association dans 10 à 60% des cas avec l'expression du mutant *EGFRvIII* présentant une délétion entre les exons 2 à 7. Cette délétion a pour conséquence la perte du domaine extracellulaire de liaison au ligand, entraînant la formation d'un mutant constitutivement actif, activant des voies de signalisation responsables de la croissance et de la prolifération cellulaire (Karsy et al., 2014). Ces altérations jouent également un rôle dans l'invasion en augmentant l'expression de MMP (matrix metalloproteinase) et d'autres protéases (Teodorczyk and Martin-Villalba, 2010).

La valeur pronostique de l'amplification d'*EGFR* dans les glioblastomes est controversée : certaines études montrent que c'est un facteur de mauvais pronostic alors que d'autres études en font un marqueur neutre. Shinojima et collaborateurs ont montré suite à une analyse multivariée, que l'amplification d'*EGFR* est un facteur de mauvais pronostic, indépendant, pour la survie globale (HR=1,67 avec un p=0,038). L'amplification de l'*EGFR* est également un facteur de mauvais pronostic lié à l'âge, puisque chez les patients plus jeunes (<60 ans), l'amplification de l'*EGFR* est encore de moins bon pronostic pour la survie globale (HR=3,15 avec p=0,0003) (Shinojima et al., 2003). A l'opposé, l'étude de Quan et collaborateurs ne met pas en évidence d'association significative entre le statut de l'*EGFR* et la survie et ce, même après une analyse avec une stratification par l'âge (âge inférieur ou supérieur à 60 ans) (Quan et al., 2005).

L'amplification ou les mutations du gène *PDGFRA* sont décrites dans 30% des glioblastomes. Elles activent également les voies de signalisation entraînant la prolifération cellulaire. La mutation de *PDGFRA* la plus fréquemment trouvée, entraîne la délétion des exons 8 et 9 codant pour une partie du domaine extracellulaire. Ce mutant présente une activité tyrosine kinase augmentée du fait d'une activation constitutive.

Les mutations du gène suppresseur de tumeur *p53* sont décrites dans 50% des glioblastomes (Karsy et al., 2014). Ces mutations de *p53* sont le plus souvent associées au diagnostic de glioblastome secondaire. Elles génèrent une forme constitutivement active de la protéine *p53* avec perte de fonction de la protéine sauvage. *P53* perd sa capacité à contrôler le cycle cellulaire et notamment à induire l'apoptose en cas de dommage de l'ADN (acide désoxy-ribo-nucléique). L'inactivation de *p53* peut aussi être causée par des mutations sur *MDM2* (O6-méthylguaninie DNA méthyltransferase), antagoniste de *p53*, dont l'amplification est reportée dans 8 à 10% des glioblastomes primaires. De plus la méthylation du promoteur de *p14<sup>arf</sup>* (qui est un inhibiteur de *MDM2*) est décrite dans 6% des glioblastomes primaires. La méthylation du promoteur du gène *MDM2* est fréquente dans les glioblastomes (40-50% des cas), elle entraîne un bénéfice au traitement par des agents alkylants comme le Temozolomide. *MDM2* en situation normal, est impliqué dans la réparation de l'ADN, en enlevant les groupements alkyl à la position O6 de la guanine de l'ADN. Lorsque le promoteur de *MDM2* est méthylé, il s'en suit une répression transcriptionnelle du gène qui ne peut plus réparer les dommages créés par les agents alkylants au niveau, notamment de l'ADN des cellules tumorales (Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, 2016). La méthylation du promoteur de *MGMT* est un facteur de bon pronostic.

Le deuxième gène suppresseur de tumeur le plus fréquemment muté (20% à 40% des glioblastomes) ou inhibé par méthylation de son promoteur est le gène *PTEN* (phosphatase tensin homolog deleted on chromosome ten). La protéine *PTEN* est impliquée dans la régulation de la voie de signalisation *PI3K/mTOR/AKT* (phosphoinositide 3 kinase/mammalian target of rapamycin/serine-threonine kinase). Cette voie de signalisation est impliquée dans la migration, l'invasion et la survie cellulaire. Une fois *PI3K* activée en aval des récepteurs tyrosine kinase, elle phosphoryle le *PIP2* (phosphatidylinositol 4,5-biphosphate) qui devient le *PIP3*, qui lui-même active indirectement *AKT*, en facilitant sa localisation sous membranaire et sa phosphorylation par les kinases *PKD1* et *2* (phosphoinositide-dependent kinase protein kinase). La kinase *AKT*, peut ainsi phosphoryler de nombreux substrats favorisant la progression tumorale. *PTEN* entraîne la déphosphorylation de *PIP3* (phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate). Ainsi, l'inactivation de



PTEN dans les glioblastomes explique l'absence de contrôle de cette cascade intracellulaire (Carrasco-García et al., 2014).

Par ailleurs, la perte de protéines régulatrices du cycle cellulaire est largement observée dans les glioblastomes, comme, par exemple, la perte d'expression de RB1 (retinoblastoma1) par mutation homozygote ou par méthylation du promoteur du gène.

Les mutations des régions promotrices du gène *TERT* (telomerase reverse transcriptase) sont également largement présentes dans les glioblastomes, elles sont décrites dans une étude à une fréquence de 80% dans les glioblastomes primaires (Simon et al., 2015). Ces mutations entraînent une expression aberrante de TERT et une augmentation de l'activité de la télomérase, en démasquant les sites de liaison aux facteurs de transcription de la famille ETS (Huse, 2015).

Les mutations de *ATRX* (alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked) sont observées dans les glioblastomes *IDH*-muté. Ces mutations sont présentes à un stade précoce de la gliomagenèse. Les mutations de *ATRX* entraînent une perte d'expression de la protéine qui peut être mise en évidence par étude immunohistochimique, cette perte est associée à la différenciation astrocytaire des tumeurs, elle est fréquemment trouvée dans les astrocytomes de grades II ou III (Ebrahimi et al., 2016). *ATRX* est impliquée dans le remodelage de la chromatine, en association avec son partenaire DAXX (death-associated protein 6), elles sont nécessaires pour l'incorporation de l'histone H3.3 dans les régions télomériques des chromosomes. Le dysfonctionnement du complexe *ATRX/DAXX* cause une instabilité génomique liée à un mécanisme appelé « alternative lengthening of telomere », correspondant à un mécanisme de maintien des télomères indépendant de la télomérase.(Kannan et al., 2012)

Des altérations chromosomiques sont également présentes dans ces tumeurs. La perte complète du chromosome 10 est corrélée à un mauvais pronostic (Durand et al., 2011), alors que la perte complète des bras chromosomiques 1p19q, caractéristiques des composantes oligodendrogiales, est de bon pronostic mais est très rarement retrouvée dans ce type de tumeur (Durand et al., 2010). Une méta-analyse regroupant 3408 gliomes de tous grades, montre que la codélétion 1p/19q est associée à une meilleure survie sans progression (HR=0,63 avec un intervalle de confiance à 95% compris entre 0,52 et 0,76) et une meilleure survie globale (HR=0,43 avec un intervalle de confiance à 95% compris entre 0,35 et 0,53) (Zhao et al., 2014).

Les mutations du gène *IDH* (isocitrate dehydrogenase), sont majoritairement observées chez les patients jeunes et dans des glioblastomes secondaires (80%) et sont une altération plus

rarement présente dans les glioblastomes définis comme primaires. En effet, environ 90% des glioblastomes sont *IDH*-sauvage, correspondant presque exclusivement aux glioblastomes dit primaires. Ces mutations ne sont pas spécifiques des glioblastomes puisqu'elles sont également observées dans des astrocytomes, et des oligodendrogliomes diffus et anaplasiques. Il s'agit donc un évènement précoce dans la gliomagénèse. Les mutations des gènes *IDH* sont hétérozygotes et concernent les gènes *IDH1* et 2. Ce sont les mutations d'*IDH1*, qui sont les plus fréquemment observées, avec un hot spot au niveau du codon 132, correspondant à la mutation R132H. Les mutations d'*IDH2* quant à elles sont localisées au codon 172, correspondant notamment à la mutation R172K. Fonctionnellement, l'isocitrate déshydrogénase est une enzyme du cycle de Krebs, les mutations d'*IDH* entraînent une réduction de l'activité de cette enzyme, qui en situation normale convertit l'isocitrate en  $\alpha$ -kétoglutarate. Les mutations d'*IDH* sont des mutations de type gain de fonction, les mutants *IDH* produisent à la place de l' $\alpha$ -kétoglutarate du D-2-Hydroxy-glutarate, un onco-métabolite, qui empêche l'hydroxylation responsable de l'élimination de HIF1  $\alpha$ . Le facteur de transcription HIF1  $\alpha$  stabilisé, va se fixer sur ses gènes cibles (*VEGF*...), les activer et favoriser la croissance tumorale en condition d'hypoxie (Parker and Metallo, 2015). L'accumulation de D-2-Hydroxy-glutarate est également responsable d'une hyperméthylation des îlots CpG de l'ADN et des histones notamment en inhibant des enzymes telles que la TET 5- methylcytosine hydroxylase et les histones déméthylases avec un domaine Jumonji C (Jin et al., 2013). Les mutations d'*IDH* sont associées à un meilleur pronostic (Ohgaki and Kleihues, 2013), (Parsons et al., 2008). Une méta-analyse réalisée sur 9487 patients, montre que les patients porteurs d'un gliome *IDH*-muté présente un avantage significatif ( $p < 0,001$ ) sur la survie globale par rapport aux gliomes *IDH* sauvage avec un Hazard Ratio HR= 0,39 (IC 95% : 0,34-0,45) . Cet avantage est également observé pour la survie sans progression ( $p < 0,001$ ) avec un HR = 0,42 (IC 95% : 0,35-0,51) (Xia et al., 2015).

#### **I.4. Classification moléculaire des glioblastomes**

Une étude par séquençage haut débit a permis d'individualiser quatre sous-types moléculaires de glioblastome (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008). Cette étude est basée sur l'expression de différents gènes responsables d'une signature moléculaire. Les différents sous-types sont les sous-types proneural, neural, classique et mésenchymateux (Verhaak et al., 2010), (Brennan et al., 2013). L'anomalie moléculaire principale, les corrélations cliniques et la réponse aux traitements (radio-chimiothérapie concomitante) en fonction des sous-types moléculaires sont décrits dans le tableau 2, qui est établi d'après les données de l'article de Verhaak et collaborateurs (Verhaak et al., 2010).

Tableau 2 : **sous-types moléculaires de glioblastome**, (CH : chromosome).

	<b>Classique</b>	<b>Mésenchymateux</b>	<b>Proneural</b>	<b>Neural</b>
Anomalie moléculaire principale	Amplification CH7 Amplification <i>EGFR</i>	Délétion CH 17q11.2 perte expression <i>NF1</i>	Mutation <i>IDH1</i> amplification <i>PDGFRA</i>	
Expression de gène signature de cellules cérébrales normales	Différenciation astrocytaire	Différenciation astrogliale	Différenciation oligodendrocytaire	Différenciation astrocytaire, oligodendrocytaire et neuronale
Corrélation clinique	Patients plus jeunes dans le sous-type proneural			
Réponse aux traitements	Réduction mortalité (HR=0,45 p=0,02)	Réduction mortalité (HR= 0,54 p=0,02)	Pas de réduction de la mortalité (HR=0,8 p=0,4)	Réduction de la mortalité non significative (HR=0,56 p=0,1)
Récidive tumorale	Présente dans tous les sous-types tumoraux			

Le sous-type classique est défini par une amplification du chromosome 7 associée à une perte du chromosome 10. L'amplification de l'*EGFR* est observée dans 97% des cas du type classique et n'est que peu présente dans les autres types. On note également l'absence de mutation *p53* dans ce sous type (p=0,04). Des précurseurs neuraux, des marqueurs de cellules souches et les protéines des voies de signalisation comme celle de Notch et Sonic hedgehog (*SMO*, *GAS1*, *GLI2*) sont fortement exprimés.

Le sous-type mésenchymateux est caractérisé par une délétion hétérozygote d'un locus du chromosome 17 (17q11.2) où le gène *NF1* est localisé, entraînant une baisse de l'expression de *NF1*, et par l'expression de marqueurs mésenchymateux comme *CHI3L1* et *MET*. Les gènes de la famille du TNF (tumor necrosis factor) et de la voie de signalisation NF-κB sont surexprimés dans ce sous-type, ceci est probablement la cause de l'infiltrat inflammatoire et de la nécrose observés.

Le sous-type proneural est caractérisé par deux altérations moléculaires concernant *PDGFRA* et *IDH1*. L'amplification du locus 4q12 contenant *PDGFRA* est significativement plus fréquente dans ce sous-type (p<0,01), des mutations de *IDH1* y sont également observées. Les mutations et les LOH (« Loss of heterozygoty », perte d'hétérozygotie) de *p53* sont fréquentes dans ce sous-type. Plusieurs gènes du développement proneural comme *SOX* sont exprimés. De plus, il est décrit dans le sous-type proneural, un phénotype hyperméthylé au niveau des îlots CpG, le phénotype G-CIMP (Glioma cpG island methylator phenotype). Ce phénotype est observé dans 30% des glioblastomes de ce sous-type, et il

est associé à une meilleure survie, avec une médiane de survie de 150 semaines lorsqu'il est présent, contre 42 semaines quand il est absent (Noushmehr et al., 2010).

L'expression de marqueurs neuronaux comme *NEFL*, *GABRA1* et *SYT1* est quant à elle, caractéristique du sous-type neural.

## Objectif de l'étude

---

L'objectif est de comparer les altérations moléculaires observées pour le contingent tissu tumoral infiltrant contenant les cellules tumorales infiltrantes (CTI), à celles observées pour le contingent tissu tumoral solide (TT) de glioblastome, sur un panel de 409 gènes (Comprehensive Cancer Panel™). Ainsi le but est de voir si une mutation donnée est présente spécifiquement dans un des deux contingents, ou si elle est plus ou moins fréquente dans le CTI par rapport au TT.

Hypothèse du sujet : on observe une différence phénotypique entre les deux contingents des glioblastomes ; un contingent présente une distribution spatiale massive (solide), tandis que l'autre a une distribution spatiale dispersée : existe t-il des mutations pouvant expliquer ce phénotype ?



## Matériels et méthodes

---

### I.1. Données cliniques et histopathologiques

Les prélèvements tumoraux ont été obtenus à partir de 13 patients âgés de 49 ans ou plus et opérés au CHU de Limoges pour un glioblastome primaire entre 2010 et 2015. Le diagnostic histopathologique a été établi selon la classification de l'OMS 2007. Le tissu sain contrôle, était du sang, les prélèvements sanguins ont été obtenus à partir des 13 mêmes patients au cours de l'hospitalisation suivant l'intervention chirurgicale. Pour trois patients, du tissu cérébral « sain » (TCS) était présent, ce tissu correspondait à du parenchyme cérébral péri-tumoral qui n'était pas microscopiquement infiltré par la tumeur. Les échantillons tumoraux et le tissu cérébral sain ont été sélectionnés rétrospectivement sur du matériel inclus en paraffine à la suite d'une fixation au formaldéhyde-zinc à 4% pendant 24 à 48 heures et sur la présence pour chaque cas de matériel sanguin cryopréservé à -80°C dans la Tumorothèque du Limousin. Le recueil des échantillons a été effectué conformément aux dispositions de la loi de Bioéthique de 2004.

Pour chaque patient inclus, la composante tumorale solide (TT) et la composante tumorale infiltrante (CTI) ont été sélectionnées sur des coupes tissulaires de 4 µm colorées à l'hémalum-phloxine-safran (HPS) étudiées au microscope optique. Cette sélection a ensuite été validée par un neuro-pathologiste. Pour chaque cas, la composante tumorale infiltrante a été sélectionnée de façon à être majoritaire par rapport au tissu cérébral non tumoral qu'elle infiltre.

Pour chaque cas inclus, lorsque du tissu cérébral péri-tumoral était présent, ce tissu a été sélectionné s'il était dépourvu d'infiltration tumorale microscopiquement identifiable par le pathologiste. Ce tissu cérébral « sain » (TCS) a été sélectionné sur des coupes tissulaires de 4 µm colorées à l'hémalum-phloxine-safran (HPS) étudiées au microscope optique.

Les données cliniques, radiologiques et anatomo-pathologiques des 13 patients sélectionnés ont été obtenues par consultation des dossiers médicaux informatisés (CROSSWAY®) et des bases de données (DIAMIC®) du service d'anatomie pathologique (CHU Limoges). Lors de l'absence de données cliniques récentes, ou de données manquantes, les informations ont été recueillies auprès des médecins généralistes par appel téléphonique.

### I.2. Génétique moléculaire

Il s'agit de rechercher des mutations des gènes inclus dans le Comprehensive Cancer Panel™ (ThermoFischer) par séquençage nouvelle génération, pour les différentes composantes tumorales des glioblastomes, le tissu cérébral péri-tumoral et les échantillons sanguins.

### **I.2.1. Extraction de l'ADN génomique à partir des tissus tumoraux**

Pour chaque patient, à partir des zones sélectionnées sur la coupe en paraffine, l'équivalent de 10 mg de tissu tumoral solide et 10 mg de la composante tumorale infiltrante inclus dans le bloc correspondant ont été prélevés. La technique de prélèvement des tissus inclus dans les blocs de paraffine était une macro-dissection au scalpel. Ces tissus ont été déparaffinés par incubation avec du xylène pendant 10 minutes puis avec de l'éthanol absolu pendant 30 secondes. L'extraction d'ADN génomique (ADNg) a été ensuite réalisée selon le protocole recommandé par le fournisseur, QIAamp DNA Micro kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Les différentes étapes du protocole ont été :

- lyse cellulaire et élimination des protéines (tampon ATL et protéinase K, incubation sous agitation à 56°C pendant 16 heures)
- réversion des pontages ADN-protéines et protéines-protéines engendrés par la fixation au formol et l'inclusion en paraffine (1 heure à 90°C)
- élimination de l'acide ribonucléique (RNase A)
- concentration et purification de l'ADN (tampon AL et précipitation à l'éthanol absolu avec filtration sur colonne de silice)
- lavage de l'ADN fixé sur la colonne de silice (tampon AW1 et AW2)
- élution de l'ADN (20 µL de tampon AE : acétate-EDTA)

### **I.2.2. Extraction de l'ADN génomique à partir du tissu cérébral sain péri-tumoral**

Pour les trois patients pour lesquels du tissu cérébral sain (TCS) était présent dans le prélèvement, à partir des zones sélectionnées sur la coupe en paraffine, l'équivalent de 10 mg de tissu cérébral sain inclus dans le bloc correspondant a été prélevé par macro-dissection. Le protocole d'extraction est ensuite en tout point semblable à celui précédemment décrit pour l'extraction de l'ADN génomique à partir des tissus tumoraux.

### **I.2.3. Extraction de l'ADN génomique à partir de sang total**

Pour chaque patient, l'extraction d'ADNg non tumoral a été réalisée à partir de sang total, préalablement décongelé et homogénéisé, selon le protocole recommandé par le fournisseur, (QIAamp DNA Mini kit, Qiagen). Les différentes étapes du protocole sont celles précédemment décrites pour les tissus en paraffine, hormis les temps d'incubation (10 minutes à 56°C pour la lyse cellulaire sans tampon ATL et 1 heure à 90°C), et le volume d'élution final de l'ADN (200 µL de tampon AE).

### **I.2.4. Quantification de l'ADN génomique**

L'ADNg des trois ou quatre échantillons par patient a ensuite été dosé, dans un premier temps, par spectrophotométrie pour évaluer leur concentration et s'assurer de la pureté de l'extraction puis par amplification pour obtenir une quantification précise.



Le spectrophotomètre (Nanodrop ND1000, Labtech, Palaiseau, France) permet d'évaluer la pureté de l'extraction grâce au ratio de l'absorbance des densités optiques (DO) qui ont été mesurées à 260 nm (acides nucléiques) et 280 nm (protéines). La pureté était correcte si le ratio ( $DO^{260}/DO^{280}$ ) était compris entre 1,8 et 2. Cependant, ce type de dosage ne permet pas de distinguer les nucléotides libres et l'ADN scindé/dégradé de l'ADNg réellement amplifiable. Ce dernier a donc été quantifié par PCR (polymerase chain reaction) quantitative en temps réel en utilisant le kit TaqMan RNase P detection Reagents (ThermoFischer). Ce kit permet l'amplification du gène de la RNase P de l'ADNg à quantifier, à partir d'un couple amorce/sonde spécifique, et comparativement à une gamme étalon obtenue à partir de concentrations connues d'un ADNg contrôle. Les différentes étapes du protocole ont été :

- Préparation d'une gamme étalon de dilution de référence avec un ADNg contrôle (sept points de gamme en triple)
- Calcul du nombre de réactions nécessaires selon l'équation : total des réactions = (nombre d'échantillons x 2 dilutions x 3 répliques) + 21 points de gamme contrôle + 3 témoins négatifs avec de l'eau sans nucléase
- Dilution des échantillons au 100<sup>ème</sup> et au 500<sup>ème</sup> en triple et préparation du mélange réactionnel en fonction du nombre de réactions, composé de TaqMan Universal PCR Master Mix 1X, de RNase P Primer-Probe mix 0,1X et d'eau sans nucléase, pour un volume final de 20  $\mu$ L
- Réalisation de la plaque 96 puits selon un schéma de plaque prévu à priori, avec pour chaque puits 17,5  $\mu$ L de PCR master mix et 2,5  $\mu$ L d'ADNg dilué contrôle, ou des échantillons
- Réaction de PCR en temps réel dans le thermocycleur (initialisation à 50°C pendant 2 min, activation de l'enzyme à 95°C pendant 10 min, et 40 cycles comprenant une dénaturation à 95°C pendant 15 sec et une hybridation/élongation à 60°C pendant 1 min)

Les résultats obtenus ont ensuite été comparés à ceux de l'ADNg contrôle pour établir la concentration des ADNg des échantillons.

Suite à la détermination des concentrations de chaque échantillon, des dilutions ont permis d'obtenir une concentration de 2 ng/ $\mu$ L pour chaque échantillon. Les échantillons ont ensuite été stockés à -20°C, jusqu'à la réalisation des librairies.

### **I.2.5. Génotypage par séquençage nouvelle génération**

Le dispositif de génotypage par séquençage nouvelle génération utilisé est le séquenceur Ion Proton<sup>TM</sup> (Ion Torrent, ThermoFischer). Le déroulement de la manipulation peut se décomposer en trois étapes détaillées ci-dessous.



### I.2.5.1 Procédure de préparation des librairies

L'objectif a été d'amplifier des régions cibles correspondant aux 409 gènes du Comprehensive Cancer Panel™, à partir des ADNg de chacune des zones tissulaires sélectionnées et des prélèvements sanguins. Les 409 gènes de ce panel sont des gènes connus pour être impliqués dans l'oncogenèse de cancers solides ou hématologiques, ils sont listés dans la figure 15.

ABL1	AURKA	BMPR1A	CDK4	CTNNB1	EPHB4	FANCD2	FZR1
ABL2	AURKB	BRAF	CDK6	CYLD	EPHB6	FANCF	G6PD
ACVR2A	AURKC	BRD3	CDK8	CYP2C19	ERBB2	FANCG	GATA1
ADAMTS20	AXL	BRIP1	CDKN2A	CYP2D6	ERBB3	FAS	GATA2
AFF1	BAI3	BTK	CDKN2B	DAXX	ERBB4	FBXW7	GATA3
AFF3	BAP1	BUB1B	CDKN2C	DCC	ERCC1	FGFR1	GDNF
AKAP9	BCL10	CARD11	CEBPA	DOB2	ERCC2	FGFR2	GNA11
AKT1	BCL11A	CASC5	CHEK1	DDIT3	ERCC3	FGFR3	GNAQ
AKT2	BCL11B	CBL	CHEK2	DDR2	ERCC4	FGFR4	GNAS
AKT3	BCL2	CCND1	CIC	DEK	ERCC5	FH	GPR124
ALK	BCL2L1	CCND2	CKS1B	DICER1	ERG	FLCN	GRM8
APC	BCL2L2	CCNE1	CMPK1	DNMT3A	ESR1	FLI1	GUCY1A2
AR	BCL3	CD79A	COL1A1	DPYD	ETS1	FLT1	HCAR1
ARID1A	BCL6	CD79B	CRBN	DST	ETV1	FLT3	HIF1A
ARID2	BCL9	CDC73	CREB1	EGFR	ETV4	FLT4	HLF
ARNT	BCR	CDH1	CREBBP	EML4	EXT1	FN1	HNF1A
ASXL1	BIRC2	CDH11	CRKL	EP300	EXT2	FOXO2	HOOK3
ATF1	BIRC3	CDH2	CRTC1	EP400	EZH2	FOXO1	HRAS
ATM	BIRC5	CDH20	CSF1R	EPHA3	FAM123B	FOXO3	HSP90AA1
ATR	BLM	CDH5	CSMD3	EPHA7	FANCA	FOXP1	HSP90AB1
ATRX	BLNK	CDK12	CTNNA1	EPHB1	FANCC	FOXP4	ICK
IDH1	KRAS	MLH1	NFKB2	PIK3C2B	RARA	SOCS1	TOP1
IDH2	LAMP1	MLL	NIN	PIK3CA	RB1	SOX11	TP53
IGF1R	LCK	MLL2	NKX2-1	PIK3CB	RECQL4	SOX2	TPR
IGF2	LIFR	MLL3	NLRP1	PIK3CD	REL	SRC	TRIM24
IGF2R	LPHN3	MLLT10	NOTCH1	PIK3CG	RET	SSX1	TRIM33
IKBKB	POT1	MMP2	NOTCH2	PIK3R1	RHOH	STK11	TRIP11
IKBKE	LPP	MN1	NOTCH4	PIK3R2	RNASEL	STK36	TRRAP
IKZF1	LRP1B	MPL	NPM1	PIM1	RNF2	SUFU	TSC1
IL2	LTF	MRE11A	NRAS	PKHD1	RNF213	SYK	TSC2
IL21R	LTK	MSH2	NSD1	PLAG1	ROS1	SYNE1	TSHR
IL6ST	MAF	MSH6	NTRK1	PLCG1	RPS6KA2	TAF1	UBR5
IL7R	MAFB	MTOR	NTRK3	PLEKHG5	RRM1	TAF1L	UGT1A1
ING4	MAGEA1	MTR	NUMA1	PML	RUNX1	TAL1	USP9X
IRF4	MAG1	MTRR	NUP214	PMS1	RUNX1T1	TBX22	VHL
IRS2	MALT1	MUC1	NUP98	PMS2	SAMD9	TCF12	WAS
ITGA10	MAML2	MUTYH	PAK3	POU5F1	SBDS	TCF3	WHSC1
ITGA9	MAP2K1	MYB	PALB2	PPARG	SDHA	TCF7L1	WRN
ITGB2	MAP2K2	MYC	PARP1	PPP2R1A	SDHB	TCF7L2	WT1
ITGB3	MAP2K4	MYCL1	PAX3	PRDM1	SDHC	TCL1A	XPA
JAK1	MAP3K7	MYCN	PAX5	PRKAR1A	SDHD	TET1	XPC
JAK2	MAPK1	MYD88	PAX7	PRKDC	SEPT9	TET2	XP01
JAK3	MAPK8	MYH11	PAX8	PSIP1	SETD2	TFE3	XRCC2
JUN	MARK1	MYH9	PBRM1	PTCH1	SF3B1	TGFBR2	ZNF384
KAT4A	MARK4	NBN	PBX1	PTEN	SGK1	TGM7	ZNF521
KAT4B	MBD1	NCOA1	PDE4DIP	PTGS2	SH2D1A	THBS1	
KDM5C	MCL1	NCOA2	PDGFB	PTPN11	SMAD2	TIMP3	
KDM6A	MDM2	NCOA4	PDGFRA	PTPRD	SMAD4	TLR4	
KDR	MDM4	NF1	PDGFRB	PTPRT	SMARCA4	TLX1	
KEAP1	MEN1	NF2	PER1	RAD50	SMARCB1	TNFAIP3	
KIT	MET	NFE2L2	PGAP3	RAF1	SMD	TNFRSF14	
KLF6	MITF	NFKB1	PHOX2B	RALGDS	SMUG1	TNK2	

Figure 15 : liste des 409 gènes du Comprehensive Cancer Panel™.

Les amorces étaient disponibles dans quatre mélanges d'amorces différents contenant environ 4000 paires d'amorces chacun. Quatre librairies différentes ont donc été préparées pour chaque échantillon, soit 12 librairies par patient (ou 16 librairies pour les patients où le tissu cérébral sain était présent). Les puces Ion PI™ v2 ayant une capacité de séquençage d'environ 12 Gigabases et le pré-requis de profondeur de lecture pour une étude d'altérations somatiques étant approximativement de 500X, un total de 16 librairies a pu être inclus pour chaque nouvelle puce réalisée : 4 échantillons ont été sélectionnés avec, soit 3 échantillons d'un même patient et un échantillon d'un autre patient, soit deux échantillons de deux patients différents, soit une autre combinaison des différents échantillons.

Pour chaque échantillon, les librairies ont été préparées à partir de 24 µL d'ADNg concentré à 2ng/µL, soit 6 µL d'ADN concentré à 2ng/µL pour chaque mélange d'amorces.

Les différentes étapes du protocole pour la réalisation d'une puce ont été :

Amplification des cibles : pour chacun des 4 mélanges d'amorces contenus dans le Comprehensive Cancer Panel™, un mélange réactionnel a été préparé, contenant :

- 16 µL de solution « Ion Ampliseq Hifi Mix »
- 40 µL d'amorces (Ion Ampliseq Primer Pool 1 ou 2 ou 3 ou 4).

Soit un total de 16 librairies pour les 4 échantillons à analyser.

Ensuite la programmation du thermocycleur a permis de réaliser successivement les étapes d'activation de l'enzyme, de dénaturation et d'élongation des produits de PCR. Les programmes des thermocycleurs qui diffèrent selon la nature de l'échantillon (sang ou paraffine) avec les étapes, les températures et les temps sont précisés dans le manuel de l'utilisateur « Ion Ampliseq™ DNA Library Preparation » disponible sur le site : [www.ioncommunity.lifetechnologies.com](http://www.ioncommunity.lifetechnologies.com).

Digestion partielle des amorces : cette étape a été réalisée par ajout de 2 µL de Fupa Reagent à chaque librairie, suivi d'un second programme dans le thermocycleur.

Ligature des codes-barres aux amplicons : un code-barre unique a été assigné par échantillon afin de distinguer les différents contingents tumoraux ou le tissu sain péri-tumoral ou sanguin lors de l'analyse des données. Pour chaque échantillon un mélange contenant les éléments codes-barres/adaptateurs a été préparé de la manière suivante :

- 2 µL de solution « Ion P1 adaptater » (adaptateur)
- 2 µL de solution « Ion Xpress barcode » (code-barre)
- 4 µL d'eau sans nucléase

Deux microlitres de ce mélange et 4 µL de solution Switch, puis 2 µL d'ADN ligase ont ensuite été ajoutés à chaque librairie. Un troisième programme dans le thermocycleur a ainsi permis d'obtenir des amplicons encadrés par un élément adaptateur code-barre (X) et un adaptateur P1 (de manière non orientée).

Purification des librairies non amplifiées : les amplicons ont été liés à des billes magnétiques par une liaison réversible non spécifique, par l'ajout de 45  $\mu\text{L}$  de réactif AMPure XP (Agencourt, Fullerton, USA). Deux éluions successives avec de l'éthanol à 70%, réalisées sur un support magnétique ont permis d'éliminer les dNTP, les amorces et les autres résidus de la réaction de PCR. Avant de réaliser l'étape suivante, l'éthanol a été complètement éliminé par évaporation.

Amplification des librairies purifiées : les amplicons des librairies obtenues à l'issue de l'étape précédente et fixés sur les billes magnétiques, ont été amplifiés suite à l'ajout des réactifs suivants :

- 50  $\mu\text{L}$  de réactif Platinum PCR
  - 2  $\mu\text{L}$  de solution « Library amplification Primer » qui contient les amorces complémentaires des adaptateurs P1 et X encadrant les amplicons,
- suivi de réalisation de la réaction par un quatrième programme dans le thermocycleur.

Purification des librairies amplifiées : deux purifications successives sur un support magnétique ont été réalisées à l'aide du réactif Agencourt AMPure XP. Cette étape a été suivie de deux éluions par de l'éthanol à 70%. Une fois l'éthanol évaporé, 50  $\mu\text{L}$  de solution d'éluion « Low TE » ont été ajoutés à chaque puits pour éluer les amplicons fixés sur les billes.

Quantification des librairies : chaque librairie amplifiée a ensuite été quantifiée par le fluorimètre Qubit 2.0 en utilisant le kit « Qubit dsDNA HS Assay ». Les concentrations obtenues étaient généralement comprises entre 100 et 1500 ng/ml.

Dilution des librairies à une concentration de 15 ng/mL, équivalente à 100 pM : elle a été réalisée avec de l'eau sans nucléase stérile. Les librairies ont ensuite été conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à la manipulation de séquençage.

### **I.2.5.2 Réaction d'amplification clonale par PCR en émulsion**

Un mélange équimolaire des 16 librairies a été réalisé, suivi d'une dilution pour obtenir une concentration de 10 pM.

Les librairies ont ensuite été amenées à l'ingénieur en charge de l'Ion Proton (Unité GENOLIM, GEIST, Limoges) qui a réalisé l'étape de PCR en émulsion suivie de l'étape de chargement de la puce IonPI™ v2, auxquelles j'ai pu assister. Le but de cette étape a été d'obtenir des sphères appelées « Ion Sphere particles » qui ont à leur surface des amorces complémentaires des adaptateurs P1 situés aux extrémités des amplicons et sont donc capable de fixer ces derniers. La PCR en émulsion a permis d'obtenir une amplification clonale de l'ADN des librairies autour des sphères. L'émulsion a été réalisée dans un mélange eau-huile pour permettre la formation de micro-gouttelettes (de milieu réactionnel dans l'huile) entourant chaque sphère appelée microréacteur. Chaque microréacteur contient

une sphère avec l'ADN à amplifier et le milieu réactionnel contenant l'ensemble des réactifs nécessaires à la réaction de PCR. Les sphères ont été ensuite enrichies par un couplage biotine-streptavidine, pour ne conserver que celles présentant de l'ADN à la surface. La biotine était présente sur le brin d'ADN complémentaire à celui lié à la sphère, la streptavidine était liée à une bille magnétique. Ainsi les sphères vides qui ne présentaient pas l'ADN biotinilé et donc ne pouvaient pas se lier aux billes magnétiques ont été éliminées. Une dénaturation a ensuite permis d'éliminer le brin d'ADN biotinilé. Pour finir, une vérification du chargement des sphères a été réalisée grâce au fluorimètre Qubit 2.0, ce qui a permis de poursuivre par le chargement de la puce lorsque les sphères liées à l'ADN représentaient 10 à 25%.

### **1.2.5.3 Chargement de la puce et réaction de séquençage**

La puce IonPI™ v2 et le séquenceur Ion Proton™ ont été utilisés dans notre étude. Cette puce contient 163 millions de micro-puits et est à usage unique. Dans chaque micro-puits une sphère a été incorporée par centrifugation, soit approximativement 160 millions de sphères par puce. Les sphères non incorporées dans un micro-puits ont été éliminées par lavage. La capacité de lecture de la puce, c'est à dire le nombre de fragment d'ADN séquencé (appelé read), est de 60 à 80 millions pour une puce par séquençage.

La technique utilisée par l'Ion Proton™ est le séquençage semi-conducteur. Celui-ci est basé sur le fait, que lorsque l'ADN polymérase incorpore un nucléotide lors de l'élongation de l'ADN, un proton est libéré. A chaque cycle, une base différente est injectée (A, T, C, ou G). Si elle est complémentaire à l'ADN à séquencer, un proton est libéré entraînant une modification de pH dans le micro-puits correspondant de la puce qui contient un senseur à proton (ion H<sup>+</sup>). La variation de pH est ensuite transformée proportionnellement en signal électrique qui est quantifié par l'appareil. Ce principe permet de connaître la nature de la base incorporée, ainsi que le nombre de bases incorporées (homopolymères). Ainsi, lors de l'incorporation d'un nucléotide complémentaire de la séquence à déterminer, on observe une impulsion électrique, si le nucléotide n'est pas complémentaire, le signal électrique reste plat. Ce signal est proportionnel au nombre de bases intégrées, si deux bases identiques sont intégrées successivement, alors l'amplitude du signal sera doublée.

La notion de profondeur ou couverture a été importante dans l'étude. La profondeur (X) correspond au nombre de fois où une même base est lue. Plus la profondeur est importante plus une mutation rare peut-être mise en évidence. La profondeur recommandée pour les altérations somatiques est de 500X en théorie.



### **I.2.6. Analyse bio-informatique des données**

Le séquençage avec le Comprehensive Cancer Panel™ a été créé pour détecter des anomalies d'un seul nucléotide : « single nucleotide polymorphisme » (SNP) et les délétions/insertions courtes sur quelques paires de bases (INDELs).

Une fois le séquençage terminé, il a été possible de récupérer pour chaque puce le rapport de séquençage. Ce rapport a permis d'obtenir des renseignements sur la qualité du chargement de la puce, des reads (correspondant à un fragment d'ADN séquencé) et des variants trouvés, puisque de cette qualité dépend la validité des résultats.

Les données du séquençage de chaque puce étaient disponibles sur le serveur Torrent Browser du CHU de Limoges sous la forme de fichier : Variant Calling Format (VCF). Le fichier VCF est obtenu après une première étape d'alignement automatique des reads contre le génome humain de référence, et une seconde étape d'analyse par le logiciel Torrent Variant Caller qui détecte les variants et les classe en SNP, délétion ou insertion (INDELs). Les données sur les séquences de référence des gènes sont prises sur le site des séquences de référence du génome humain : Human Genome 19 (hg19) du National Center of Biotechnology Information (NCBI) : [www.ncbi.nih.gov/refseq/](http://www.ncbi.nih.gov/refseq/). Cet alignement a été réalisé automatiquement par le programme Torrent Mapping Alignment lors du séquençage, et a permis d'obtenir un fichier BAM (Binary Alignment Map). Puis, à partir de ce fichier BAM, le logiciel Variant Caller a détecté les variants pour les 409 gènes du Comprehensive Cancer Panel™, permettant d'obtenir un fichier au format VCF. Pour chaque puce, la présence des différents code-barres sur les librairies a permis de relier le fichier VCF à un échantillon (TT ou CTI ou tissu sanguin ou tissu cérébral sain péri-tumoral) d'un patient et chaque ligne du fichier VCF correspondait à un variant.

A partir du fichier VCF, une annotation a été faite à l'aide d'un programme : Table Annotar et d'un script « perl » créé par le Bio-informaticien de la plateforme Genolim du CHU de Limoges. Le programme Annotar a permis d'annoter de manière multiple le fichier VCF en fonction de critères définis (listés ci-dessous) ; et le script a permis d'annoter les paramètres à comparer. L'objectif de l'étude était de comparer la fréquence allélique (en %) de chaque variant, en fonction du type de contingent tumoral (TT et CTI) et non tumoral (TCS et/ou sang). La fréquence allélique a été obtenue en calculant le rapport de la profondeur du variant sur la profondeur totale à une position génomique donnée par le variant. Le fichier VCF « multi-annoté » est ensuite converti en fichier Excel permettant d'avoir des filtres pour chaque critère. Pour chaque variant, les critères qui ont été définis étaient le chromosome, la position chromosomique sur hg19, le nucléotide de référence et le nucléotide le remplaçant (variant), la fréquence allélique du variant dans le TT, le CTI, le tissu sanguin et le TCS, le type de variant : SNP, insertion, délétion, le gène avec la localisation (intronique, exonique, UTR), le type de mutation : synonyme ou non synonyme, l'identification de la mutation avec

sa nomenclature dans la séquence de référence NM\_ du gène, le numéro d'identification du patient, les couvertures pour le variant et totale pour le TT, le CTI et le tissu sanguin.

Les différents critères ont formé les colonnes du tableur Excel des résultats, dont chaque ligne définissait un variant.

Un filtre de stringence élevée composé de dix paramètres a été appliqué pour la détection des différents variants lors de l'analyse avec le Torrent Variant Caller, afin d'éviter la détection de faux positifs:

Le 1<sup>er</sup> paramètre défini a été la fréquence allélique minimale, avec une détection du variant quand sa fréquence est supérieure à 2 %.

Le 2<sup>ème</sup> paramètre défini a été la qualité minimale correspondant au nombre d'erreurs toléré, ici supérieure ou égale à 10, soit une tolérance de moins d'une erreur de lecture pour une base sur dix.

Le 3<sup>ème</sup> paramètre était la couverture, profondeur minimale, correspondant au nombre de fois ou la même séquence d'ADN a été lue : soit au minimum 20 lectures par variant.

Le 4<sup>ème</sup> paramètre était la couverture minimale par brin, avec un minimum de 3 pour chaque brin (brin sens et antisens).

Le 5<sup>ème</sup> paramètre était le biais maximum par brin, avec un score strictement inférieur à 0,9, soit à moins de 90% pour un brin et plus de 10% pour le brin d'ADN complémentaire, soit au moins 10% de lecture sur le brin sens et antisens.

Le 6<sup>ème</sup> paramètre était la qualité minimale du read, correspondant à la moyenne des scores de qualité de tous les nucléotides du read. Le résultat n'était pas valable si ce score était strictement inférieur à 8,5.

Le 7<sup>ème</sup> paramètre était la variation du signal électrique et concernait les SNP uniquement. Lors de l'incorporation d'un nucléotide, la libération d'un proton entraîne la modification du pH qui est transformé en un signal électrique dont la hauteur peut varier proportionnellement au nombre de bases incorporées. Cependant pour une base incorporée, on tolère une variation dans la hauteur du signal électrique strictement inférieur à 0,25 autour de 1, si 1 est la valeur de référence du signal.

Le 8<sup>ème</sup> et le 9<sup>ème</sup> paramètres étaient la variation du signal électrique et concernaient les INDELS (insertion ou délétion). Selon le même principe que pour le 7<sup>ème</sup> paramètre, pour les INDELS, le seuil de variation défini était strictement inférieur à 0,2.

Le dernier paramètre était la longueur maximale d'un homopolymère, correspondant au nombre maximum d'incorporations successives d'un même nucléotide, le maximum était de 8.

Enfin, un autre logiciel d'analyse nommé Integrative Genomics Viewer (IGV) a été utilisé pour quelques cas. Ce logiciel a permis de visualiser une cartographie des variants, avec

leur position chromosomique et ainsi de comparer un locus donné pour deux échantillons. Cette analyse a été réalisée en plus, sur quelques variants d'intérêt.

### **I.2.7. Interprétations des données**

Les données de fréquence allélique obtenues pour chaque variant ont été classées grâce à une fonction Excel de type logique : SI, qui a permis d'obtenir trois conditions. Cette démarche est expliquée dans les résultats. Pour chaque mutation d'intérêt, les sites internet Genatlas ([www.genatlas.medicine.univ-paris5.fr](http://www.genatlas.medicine.univ-paris5.fr)), Ensembl GRCh37 ([grch.ensembl.org](http://grch.ensembl.org)), dbSNP ([www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/)) et COSMIC (catalogue of somatic mutations in cancer : [www.cancer.sanger.ac.uk](http://www.cancer.sanger.ac.uk)), (Shepherd et al., 2011) ont été consultés pour connaître la séquence de référence NM\_ du gène cible et le caractère répertorié ou non des variants mis en évidence par l'analyse.

La présence d'une amplification des gènes *EGFR* et *PDGFRA* a été recherchée pour les treize patients. Cette analyse est décrite dans les résultats.

### **I.2.8. Annotation des variants SNP et prédiction de pathogénicité *in silico***

A partir du fichier VCF annoté par le logiciel Annotvar, différents filtres ont permis de distinguer les variants correspondant à des polymorphismes, des variants correspondant à des mutations. L'algorithme des filtres a été défini par le Bio-informaticien de la plateforme de Génétique Moléculaire des Cancers du CHU de Limoges. Le premier filtre appliqué sur tous les variants SNP concernait le score de la base de données « 1000 génomes » (<http://www.1000genomes.org/>). Les variants présentant un score supérieur à 5% ont été éliminés car considérés comme des polymorphismes (variant retrouvé dans plus de 5% de la population générale 1000 génomes). Ensuite, le second filtre appliqué permettait de prédire l'impact du variant sur la fonction et la pathogénicité éventuel de celui-ci. Ce deuxième filtre concernait le score SIFT (prédiction de la conséquence d'un SNP sur l'acide aminé correspondant et la structure protéique) et le score CADD (prédiction de la conséquence bénigne ou délétère (=pathogène) d'un SNP). Lorsque les variants présentaient un score SIFT inférieur à 0,05 et un score CADD supérieur à 1,5, ils ont été conservés car il pouvait y avoir un impact sur la fonction protéique et donc une pathogénicité d'après ces scores de prédiction *in silico*. Cet arbre décisionnel est schématisé dans la figure 16.



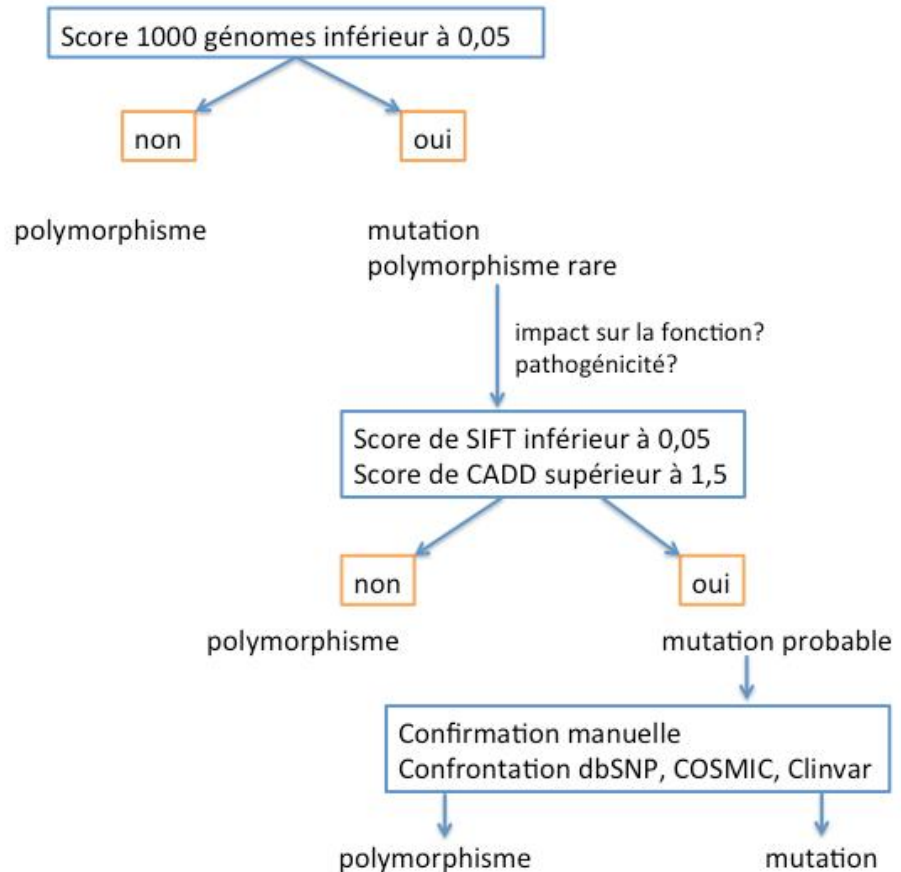


Figure 16 : **arbre décisionnel permettant l'identification de mutations pathogènes.**

### I.2.9. Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel StatView 5.0 (SAS Institute). Les comparaisons des variables qualitatives (sexe, âge, présence ou non d'une altération) ont été réalisées par un test du Chi-2. Les comparaisons de moyennes (index de prolifération) entre deux groupes de variables quantitatives ont été réalisées par le test non paramétrique de Mann-Whitney. Les fréquences de variants dans les contingents ont été comparées en appliquant un test non paramétrique de rangs de Wilcoxon.

La comparaison des moyennes de deux échantillons appariés a été faite en appliquant le test paramétrique t de Student. Ce test a notamment été utilisé lors des comparaisons des deux tissus sains lorsqu'ils étaient présents (TCS et sang).

L'association de deux variables quantitatives a été étudiée par le test non paramétrique de corrélation de Pearson.

L'analyse de survie globale a été réalisée par la méthode de Kaplan-Meier. La date d'origine était la date de diagnostic. Les comparaisons des médianes de survie ont été faites par le test de log-rank. Le seuil de significativité choisi pour l'ensemble des analyses statistiques était de 0,05.





## Résultats

### I.1. Données cliniques et histopathologiques

Les données cliniques et histopathologiques des 13 patients sélectionnés sont indiquées dans le Tableau 3. Les treize patients ont été pris en charge par une exérèse chirurgicale en première intention suivie d'un traitement adjuvant.

Tableau 3 : **données cliniques et histopathologiques pour chaque patient.**\* âge au diagnostic en années, \*\*RT : radiothérapie, CT : chimiothérapie, \*\*\* DDN : Date des dernières nouvelles en mois après le diagnostic.

N° cas	sexe	Age *	Localisation du glioblastome	Index de prolifération KI 67 (%)	Traitement adjuvant**	DDN***	Etat clinique à la DDN
1	H	61	Frontale gauche	20	RT et CT	20	décédé
2	H	58	Frontale droite	40	RT et CT	29	décédé
3	F	76	Temporale gauche	30	RT et CT	8	décédé
4	F	63	Temporale droite	35	RT et CT	38	décédé
5	F	55	Frontale droite	35	RT et CT	4	décédé
6	H	70	Pariéto-occipitale gauche	35	RT et CT	16	récidive
7	F	61	Temporale droite	40	RT et CT	11	décédé
8	H	72	Fronto-pariétale droite	40	RT et CT	5	décédé
9	H	77	Frontale gauche	25	RT et CT	15	stable
10	H	78	Pariétale droite	50	RT et CT	12	décédé
11	H	49	Frontale droite	30	RT et CT	7	récidive
12	F	72	Pariétale droite	30	RT et CT	1	stable
13	F	70	Frontale droite	20	RT et CT	13	récidive



L'imagerie par résonance magnétique (IRM) cérébrale réalisée lors du diagnostic montrait une tumeur intra-parenchymateuse en hyposignal T1, hypersignal T2 (T1 et T2 sont deux séquences d'acquisition de l'IRM) et prenant le contraste lors de l'injection de Gadolinium. Cet aspect radiologique était présent pour les treize patients.

## I.2. Données du rapport de séquençage

Pour les 13 patients inclus dans l'étude, 15 puces ont été réalisées. La moyenne de chargement observée, c'est-à-dire le nombre de micro-puits contenant une sphère, était de 73% pour l'ensemble des puces. Le nombre moyen de fragments d'ADN cible correspondant aux fragments d'ADN analysables, ou reads, était de 67 millions. Enfin, la qualité globale des séquences obtenue a été validée par l'alignement des bases et des reads complets sur le génome humain, ainsi que par les indices de qualité AQ (Quality Alignment). Ces informations sont présentées dans le tableau 4.

Tableau 4 : **paramètres principaux du rapport de séquençage pour chaque puce**

\* Les indices de qualité AQ17, AQ20 et AQ30 correspondaient respectivement à une erreur d'une base sur 50 sur 100 ou sur 1000.

Puce	Chargement	Nombre de reads	Longueur des reads (bp)			Alignement		Indice de qualité *		
			moyenne	médiane	mode	bases	reads	AQ17	AQ20	AQ30
1	73%	57,7x10 <sup>6</sup>	107	110	121	99%	99%	5,4G	5G	4,4G
2	81%	79,8x10 <sup>6</sup>	112	116	125	99%	99,5%	8G	7,4G	6,5G
3	60%	45,8x10 <sup>6</sup>	120	123	128	87%	98,8%	4,2G	3,8G	3,3G
4	79%	82,9x10 <sup>6</sup>	110	112	125	97%	99,5%	8G	7,4G	6G
5	80%	85,6x10 <sup>6</sup>	109	111	127	98%	99,5%	8G	7,2G	6G
6	79%	86,4x10 <sup>6</sup>	110	114	125	98%	99,4%	8,2G	7,4G	6,4G
7	82%	85,8x10 <sup>6</sup>	114	118	131	98%	99,7%	8,7G	8G	7G
8	68%	76,2x10 <sup>6</sup>	111	114	130	98%	99,5%	7,4G	6,7G	5,9G
9	86%	84,5x10 <sup>6</sup>	111	115	130	98%	99,3%	8,1G	7,4G	6,4G
10	72%	48,7x10 <sup>6</sup>	111	108	88	95%	99,8%	4,8G	4,4G	4G
11	72%	47,8x10 <sup>6</sup>	111	114	128	94%	99,5%	4,8G	4,4G	4G
12	87%	92,5x10 <sup>6</sup>	116	117	128	97%	99,6%	9,5G	8,9G	8G
13	56%	43,2x10 <sup>6</sup>	114	117	128	99%	99,8%	4,5G	4,2G	3,7G
14	88%	77,7 x10 <sup>6</sup>	118	117	128	94%	99,7%	8G	7,4G	6,6G
15	32%	10,7x10 <sup>6</sup>	110	108	95	97%	99,6%	1G	977M	892M



### I.3. Résultats de l'analyse des variants

De nombreux variants de type SNP ont été mis en évidence dans les différents échantillons (TT, CTI, TCS et sang) lors de l'analyse avec un filtre de stringence élevé (tableau 5). En revanche les INDELS, rares dans nos échantillons, n'ont pas été analysés.

Tableau 5 : répartition des variants par cas et par échantillon. Les échantillons annotés 2 (TT2, CTI2, sang 2 et TCS2) correspondent à une deuxième analyse de l'échantillon.

Puce	Cas	Echantillon	Nombre de variants	Puce	Cas	Echantillon	Nombre de variants	
1	Cas n°3	TT	1864	8	Cas n°8	CTI	1130	
		CTI	9649			Cas n°9	TT	1094
		sang	1063				CTI	1119
2	Cas n°4	TT	1084	9	Cas n°10	sang	1110	
		CTI	1076			TT	1067	
		sang	1034			CTI	982	
3	Cas n°5	sang	958	10	Cas n°5	sang	1049	
4	Cas n°1	TT	1128			Cas n°11	TT	1394
		CTI	1144	CTI	1448			
		sang	1111	sang	1204			
5	Cas n°2	TT	1434	11	Cas n°12	CTI	485	
		CTI	1218			Cas n°12	TT	1270
		sang	1127				sang	1175
6	Cas n°2	CTI	1734	12	Cas n°7	TT 2	1283	
		sang	1127			CTI 2	1064	
		7	Cas n°6			TT	1121	13
CTI	1121			TCS	1899			
sang	1043			CTI 2	681			
8	Cas n°7	TT	886	14	Cas n°13	sang 2	1085	
		CTI	1139			TT	1104	
		sang	1120			CTI	1154	
9	Cas n°8	TT	1140	15	Cas n°13	sang	1163	
		sang	1133			TCS	1108	
		TT 2	1158					
						TCS 2	909	

L'analyse des variants a été réalisée par application d'un filtre pour chaque critère formant une colonne du fichier Excel. Ainsi, le filtre du critère définissant le type de mutation a permis d'exclure les mutations synonymes. Celui définissant la localisation chromosomique a permis d'analyser les variants exoniques. Enfin, les variants pour lesquels la profondeur totale était de moins de 100 X, que se soit pour le TT, le CTI ou le sang n'ont pas été inclus dans l'analyse, à priori.

Afin de comparer les contingents tumoraux TT et CTI pour chaque patient et entre les patients, les variants ont été classés en fonction de leur fréquence allélique pour les deux contingents tumoraux et le sang. La fréquence allélique est exprimée en pourcentage et correspond au rapport de la profondeur (X) du variant sur la profondeur totale, à la position génomique donnée par le variant. Ainsi, nous avons défini trois conditions pour pouvoir comparer les fréquences alléliques d'un même variant dans le CTI et dans le TT.

Ces trois conditions ont été définies par une fonction Excel logique =SI(Fx>=0,1\*Ex+Ex;1;SI(Fx<=Ex-Ex\*0,1;2;0)), Fx étant la fréquence allélique d'un variant dans le CTI et Ex la fréquence allélique du même variant dans le TT. Après l'application de cette formule, pour l'ensemble des 13 cas, les variants étaient donc répartis en trois conditions ainsi définies :

Condition 1 : la fréquence allélique du variant dans les cellules tumorales infiltrantes (CTI) est supérieure ou égale à 10% de la fréquence allélique du même variant dans le contingent tumoral solide (TT), soit  $CTI \geq TT + (0,1*TT)$ .

Condition 2 : la fréquence allélique du variant dans le CTI est inférieure ou égale à 10% de la fréquence allélique du même variant dans le TT, soit  $CTI \leq TT - (0,1*TT)$ .

Condition 0 : la fréquence allélique du variant dans le CTI ne correspond à aucune des deux conditions précédemment décrites, soit  $TT - (0,1*TT) < CTI < TT + (0,1*TT)$ .

Le nombre de variants et le nombre de gènes cibles mis en évidence par l'application de ces trois conditions est présenté pour 12 des 13 patients dans les tableaux 6 et 7, en précisant si la mutation est considérée comme somatique, et donc dépendante de la tumeur, ou non somatique et donc indépendante de la tumeur. Le statut somatique ou non d'un variant, a été défini par une seconde fonction Excel logique comparant la fréquence allélique du variant observée dans le TT par rapport celle observée dans le sang. Lorsque les fréquences alléliques sont comparables dans ces deux échantillons ou lorsque la fréquence est inférieure dans le TT par rapport au sang le variant est considéré comme non somatique. Lorsque la fréquence allélique du variant observée dans le TT est supérieure par rapport à celle du sang, le variant est considéré comme somatique.

Pour un patient (cas n°12), les reads étaient le plus souvent de mauvaise qualité avec une profondeur souvent trop faible, c'est à dire inférieure à 100 que ce soit pour le CTI le TT ou

le sang. Ce cas n'est donc pas présenté dans le tableau 7, il est exclu de la suite de l'analyse bioinformatique à posteriori.



		Cas n°1		Cas n°2		Cas n°3		Cas n°4		Cas n°5	
		Nombre de variants	Nombre de gènes	Nombre de variants	Nombre de gènes	Nombre de variants	Nombre de gènes	Nombre de variants	Nombre de gènes	Nombre de variants	Nombre de gènes
<b>CTI&gt;TT</b> <b>Condition 1</b>	Nombre de variants somatiques	3	3	2	2	1	1	3	3	1	1
	Nombre de variants non somatiques	19	13	25	15	29	22	30	24	10	5
<b>CTI=TT</b> <b>Condition 0</b>	Nombre de variants somatiques	10	10	19	18	3	3	17	13	∅	∅
	Nombre de variants non somatiques	132	78	107	64	62	48	128	76	18	14
<b>CTI&lt;TT</b> <b>Condition 2</b>	Nombre de variants somatiques	5	3	9	7	8	8	10	20	2	2
	Nombre de variants non somatiques	7	5	11	9	26	18	12	11	8	6
<b>Total</b>	Nombre de variants somatiques	18	16	30	25	12	11	30	25	3	3
	Nombre de variants non somatiques	158	86	143	76	117	76	170	95	36	23
<b>Nombre de variants et gènes total</b>		<b>176</b>	<b>92</b>	<b>173</b>	<b>91</b>	<b>129</b>	<b>81</b>	<b>200</b>	<b>108</b>	<b>39</b>	<b>26</b>

Tableau 6 : nombre de variants et de gènes présentant des variants en fonction des conditions pour les douze cas.



		Cas n°6		Cas n°7		Cas n°8		Cas n°9		Cas n°10		Cas n°11		Cas n°13	
		Nombre de variants	Nombre de gènes	Nombre de variants	Nombre de gènes	Nombre de variants	Nombre de gènes	Nombre de variants	Nombre de gènes	Nombre de variants	Nombre de gènes	Nombre de variants	Nombre de gènes	Nombre de variants	Nombre de gènes
CTI> TT Condition 1	variants somatiques	∅	∅	2	2	1	1	2	1	∅	∅	1	1	1	1
		1*				1*									
	variants non somatiques	17	15	16	12	11	10	20	16	23	19	28	15	13	12
CTI=TT Condition 0	variants somatiques	8	8	13	13	13	13	14	12	5	4	16	15	14	12
	variants non somatiques	79	49	122	75	158	88	122	70	108	63	79	55	132	74
CTI<TT Condition 2	variants somatiques	2	2	2	2	10	10	6	6	19	17	12	10	10	10
	variants non somatiques	6	4	7	7	8	4	12	10	11	8	14	10	17	15
Total		1*				1*									
	variants somatiques	10	10	17	16	24	24	22	18	24	21	29	15	25	19
	variants non somatiques	102	57	145	86	177	94	154	86	142	81	121	72	162	85
Nombre de variants et gènes total		112+1*	64	162	98	201+1*	106	176	96	166	98	150	79	187	95

Tableau 7 : nombre de variants et de gènes présentant des variants en fonction des conditions pour les douze cas \* concernant la condition 1 : pour les cas 6 et 8 deux variants ont une fréquence allélique dans le sang non interprétable du fait d'une couverture limite, ne permettant pas de définir un statut somatique ou non somatique.



Les douze cas présentent en moyenne 156 variants, dont une moyenne de 20 variants somatiques. Selon les cas, il y a été observé jusqu'à 3 variants somatiques correspondant à la condition 1, c'est-à-dire considérés comme plus spécifiques du CTI. Deux cas ne présentent aucun variant remplissant les critères de cette condition. La majorité des variants décrits correspondent aux conditions 0 ou 2, ce qui signifie qu'ils sont présents dans les deux contingents tumoraux de manière équivalente ou en moindre fréquence dans le CTI par rapport au TT, respectivement.

### **I.3.1. Analyse des variants somatiques dont la fréquence allélique observée dans le CTI est supérieure à celle du TT (Condition 1)**

Les caractéristiques des variants présentant la condition 1, et considérés comme somatiques sont résumés dans le tableau 8. Dans la suite des résultats, les variants sont présentés selon la nomenclature internationale.

**Cas n°1** : ce patient présente trois variants somatiques sur trois gènes différents pour lesquels la fréquence allélique dans le CTI est supérieure à celle du TT. Ces gènes sont *FANCA*, *NCOA4* et *TCF7L2*.

Le gène *FANCA* situé sur le chromosome 16 présente un variant en position 89849480 du génome de référence hg19. Le nucléotide de référence est une cytosine (C) remplacée par une thymine (T) mais correspond en nomenclature internationale sur l'exon 16 à c.1501G>A car le gène *FANCA* est lu sur le brin reverse. Cela correspond au niveau protéique à la variation p.Gly501Ser. Cette mutation est présente à une fréquence allélique de 87% dans le CTI et 73 % dans le TT, elle est présente à une fréquence de 46% dans le sang. Ce même variant est observé dans quatre autres cas. Pour trois de ces cas, la fréquence de ce variant est comparable dans les 3 tissus, indiquant que la mutation est probablement de type non somatique. Pour le dernier cas, la fréquence du variant dans le CTI est comparable à celle du sang mais inférieure à celle observée dans le TT.

Le gène *NCOA4* situé sur le chromosome 10 présente un variant en position 51568378 de nomenclature c.22T>G sur l'exon 2, qui correspond au niveau protéique à la variation p.Phe8Val. Cette mutation est présente à une fréquence allélique de 90% dans le CTI et 79 % dans le TT, et à une fréquence de 48% dans le sang. Ce même variant est observé dans cinq autres cas: pour deux de ces cas la mutation est présente à des fréquences comparables dans les trois échantillons (97%, 98%, 98% et 41%, 42%, 48% dans le TT, le CTI et le sang respectivement) et donc considérée comme non somatique. Alors que pour deux autres cas, elle est observée à 51 ou 52% dans le sang et sa fréquence augmente de manière comparable dans le TT et le CTI (respectivement 75% et 83% dans le TT vs 79% et 75% dans le CTI). Enfin pour le dernier cas la fréquence du variant est de 49% pour le TT et chute à 10% dans le CTI, alors qu'elle est à 31% dans le sang.

Le gène *TCF7L2* situé sur le chromosome 10 présente un variant en position 1149253669 de nomenclature c.1429C>A sur l'exon 14, qui correspond au niveau protéique à la variation p.Pro477Thr. Cette mutation est présente à une fréquence allélique de 97% dans le CTI et 86 % dans le TT, elle est de 52% dans le sang. Ce même variant n'est observé dans aucun des autres cas.

**Cas n°2 :** ce patient présente deux variants sur les gènes *TRIP11* et *FANCD2* décrits dans le tableau 8. Le variant de *TRIP11* est présent dans trois autres cas. Un est considéré comme somatique (avec une fréquence de 12% dans le TT, de 4% dans le CTI et de 5% dans le sang). Les deux autres cas sont considérés comme non somatiques, car les fréquences sont comparables dans les 3 échantillons. Le variant de *FANCD2* quant à lui est présent dans 6 autres cas dont 5 en non somatiques. Le seul cas où le variant de *FANCD2* est considéré comme somatique présente une fréquence allélique dans le CTI inférieure à celle du TT.

**Cas n°3 :** ce patient présente un variant sur le gène *PLEKHG5* décrit dans le tableau 8. Ce variant n'est présent que pour un autre patient, où il est non somatique avec des fréquences comparables dans les 3 échantillons.

**Cas n°4 :** ce patient présente un variant sur le gène *FGFR3*.

Le gène *FGFR3* situé sur le chromosome 4 présente un variant en position 1808286 de nomenclature c.2044G>A sur l'exon 16, qui correspond au niveau protéique à la variation p.Val682Ile. Cette mutation, de fréquence allélique 68% dans le CTI et 61% dans le TT, elle est présente à 53% dans le sang (visualisation de ce variant par IGV, annexe 2). Ce même variant est observé dans neuf autres cas, mais avec des fréquences alléliques variables dans les deux contingents tumoraux et le sang. Pour trois cas, cette mutation est observée à une fréquence allélique comprise entre 33% et 47% dans le sang, mais nettement supérieure dans les deux contingents tumoraux. Néanmoins, les fréquences alléliques des variants dans le CTI et le TT sont comparables (comprises entre 84 -96% pour le TT et 82-96% pour le CTI respectivement). Pour trois autres cas, le polymorphisme du tissu sanguin est difficilement interprétable (30%, 29% et 79%) mais les fréquences alléliques des deux contingents tumoraux sont soit comparables (57%/54% pour un cas et 94/95% pour l'autre), soit inférieure dans le CTI (61%) par rapport au TT (73%). Pour deux cas, la fréquence est supérieure dans le CTI (46% et 47%) par rapport au TT (37% et 29% respectivement), néanmoins pour ces deux cas ce variant est considéré comme non somatique, car les deux fréquences observées dans les échantillons tumoraux sont soit comparables à celle du sang (41%) pour le premier soit inférieures (57%). Enfin, pour le dernier cas, la fréquence allélique du variant dans le sang n'est pas interprétable du fait d'une profondeur trop faible, néanmoins pour le TT et le CTI les fréquences sont interprétables avec un variant dont la fréquence est supérieure dans le CTI par rapport au TT. Ce dernier cas est présenté dans le

tableau 9. L'analyse de prédiction révèle que ce variant est une mutation avec une pathogénicité *in silico* (score de SIFT à 0).

Ce cas présente également deux autres variants sur les gènes *THBS1* et *PML*.

Le variant du gène *THBS1* (chromosome 15) est présent à la position génomique 39884882. Ce variant de l'exon 17 de nomenclature c.2646G>T correspond au niveau protéique à la variation p.Gln882His. Il est présent à une fréquence allélique de 53% pour le TT, 59% pour le CTI et considéré comme somatique (45% pour le sang). Ce variant est également observé pour deux autres patients, pour lesquels les valeurs des fréquences alléliques le classe dans la catégorie non somatique. L'analyse de prédiction identifie ce variant comme une mutation potentiellement pathogène *in silico* (score de SIFT à 0).

Le dernier variant de cas est présent sur le gène *PML*, il est décrit dans le tableau 8.

**Cas n°5** : ce patient présente un variant sur le gène *IL6ST* décrit dans le tableau 8.

**Cas n°7** : ce patient présente deux variants sur deux gènes différents, l'un sur le gène de l'*EGFR* et l'autre sur le gène *GATA2*.

Le gène *EGFR* situé sur le chromosome 7 présente un variant en position 55229255 de nomenclature c.1562G>A sur l'exon 13, qui correspond au niveau protéique à la variation p.Arg521Lys. Cette mutation est présente à une fréquence allélique de 66% dans le CTI, 60 % dans le TT et à 53% dans le sang. Ce même variant est également présent dans quatre autres cas avec des statuts différents, deux considérés comme somatiques et deux autres considérés comme non somatiques.

Le gène *GATA2* situé sur le chromosome 3 présente un variant en position 128202753 de nomenclature c.967C>T sur l'exon 4, qui correspond au niveau protéique à la variation p.His323Tyr. Cette mutation est présente à une fréquence de 63% et 75% dans le TT et le CTI respectivement. Elle est également observée pour le cas n°8 avec une fréquence de 40% pour le TT et 72% pour le CTI (tableau 9). Cette mutation est également présente dans deux autres cas décrit dans la figure 17 avec une fréquence allélique comparable entre le CTI et le TT (79%, 65% pour le TT ; 86%, 68% pour le CTI) et dans un dernier cas où la fréquence est plus faible dans le CTI (51%) par rapport au TT (66%). Pour ces trois cas les fréquences sont de 38%, 37% et 28% dans le sang respectivement.

**Cas n°8** : ce patient présente un variant sur le gène *BRIP1* décrit dans le tableau 8.

**Cas n°9** : ce patient présente deux variants qui sont présents sur le même gène *PLEKHG5*.

Le gène *PLEKHG5* situé sur le chromosome 1 présente le premier variant en position 6531589. Le nucléotide de référence C est remplacé par T mais correspond en nomenclature internationale à c.1240G>A sur l'exon 12 car le gène *PLEKHG5* est lu sur le brin reverse. Cela correspond au niveau protéique à la variation p.Ala414Thr. Ce variant est présent à 70% dans le TT, 78% dans le CTI et à 52% dans le sang. Ce variant n'est présent dans aucun des autres cas.

Le deuxième variant de ce gène est en position 6533393 et de nomenclature c.713C>G sur l'exon 8, correspondant au niveau protéique à la variation p.Thr238Ser. Ce variant est présent à 70% dans le TT, 77% dans le CTI, et à 44% dans le sang. Ce variant est également présent dans deux autres cas considérés comme non somatiques.

**Cas n°11** : ce patient présente un variant sur le gène *PDE4DIP* en position 144916748 et de nomenclature c.1607G>C sur l'exon 13, correspondant au niveau protéique à la variation p.536Thr. Ce variant est présent à 54% dans le TT, 61% dans le CTI et 47% dans le sang.

Ce même variant est observé dans 5 autres cas, un seul de ces cas est considéré comme somatique avec des fréquences comparables dans les tissus tumoraux.

**Cas n°13** : ce patient présente un variant sur le gène *NLRP1* en position 546263 et de nomenclature c.3175G>A sur l'exon 11, correspondant au niveau protéique à la variation p.Val1052Met. Ce même variant est observé dans deux autres cas, pour lesquels il est considéré comme non somatique.

Les patients des **cas n°6** et **n°10** ne présentent pas de variants somatiques avec une fréquence allélique dans le CTI supérieure à celle du TT.

Il existe une différence statistiquement significative ( $p=0,0003$ ) entre les fréquences alléliques des altérations trouvées dans le CTI par rapport au TT. On observe également une différence statistiquement significative ( $p=0,0004$ ) entre la fréquence allélique des variants du TT et celle du sang.



	Gène	Référence NM	Exon	Variant		Fréquence allélique du variant (en %)			Profondeur totale			COSMIC	db SNP
				ADN	transcrit	TT	CTI	sang	TT	CTI	sang		
Cas 1	<i>FANCA</i>	_000135	16	c.1501G>A	p.Gly501Ser	73	87	46	272	294	2455	Non référencé	rs2239359
	<i>NCOA4</i>	_001145260	2	c.22T>G	p.Phe8Val	79	90	48	400	642	4423	Non référencé	rs10761581
	<i>TCF7L2</i>	_030756	14	c.1429C>A	p.Pro477Thr	86	97	52	271	115	1168	Non référencé	rs77961654
Cas 2	<i>TRIP11</i>	_004239	19	c.5479G>A	p.Gly1827Ser	14	17	6	676	1383	1681	Non référencé	rs1051340
	<i>FANCD2</i>	_033084	15	c.1214A>G	p.Asn405Ser	16	20	7	4353	7924	7097	Non référencé	rs73126218
Cas 3	<i>PLEKHG5</i>	_001042664	20	c.2428G>A	p.Gly810Ser	54	62	45	193	217	553	Non référencé	rs76625876
Cas 4	<i>FGFR3</i>	_000142	16	c.2044G>A	p.Val682Ile	61	68	53	709	637	470	Non référencé	Non référencé
	<i>THBS1</i>	_003246	17	c.2646G>T	p.Gln882His	53	59	45	267	214	300	Non référencé	Non référencé
	<i>PML</i>	_033250	7	c.2170A>G	p.Ser724Gly	51	58	46	376	284	485	Non analysable*	rs743580
Cas 5	<i>IL6ST</i>	_175767	5	c.442G>C	p.Gly148Arg	54	62	46	187	871	632	Non référencé	rs2228044
Cas 7	<i>EGFR</i>	_005228	13	c.1562G>A	p.Arg521Lys	60	66	53	4106	3669	1445	Référencé COSM3721608	rs2227983
	<i>GATA2</i>	_032638	4	c.967C>T	p.His323Tyr	63	75	36	277	465	1153	Non référencé	Non référencé
Cas 8	<i>BRIP1</i>	_032043	19	c.2755T>C	p.Ser919Pro	51	58	43	736	387	552	Non référencé	rs4986764
Cas 9	<i>PLEKHG5</i>	_001042664	12	c.1240G>A	p.Ala414Thr	70	78	52	498	731	828	Non référencé	rs74809741
	<i>PLEKHG5</i>	_001042664	8	c.713C>G	p.Thr238Ser	70	77	44	468	718	872	Non référencé	rs61741379
Cas 11	<i>PDE4DIP</i>	_14644	13	c.1607G>T	p.Ser536Thr	54	61	47	393	279	601	Non référencé	rs17477930
Cas 13	<i>NLRP1</i>	_014922	11	c.3175G>A	p.Val1059Met	63	70	51	231	298	1117	Non référencé	rs2301582

Tableau 8 : résumé des caractéristiques en fonction des cas des différents variants présentant la condition 1.

\*la séquence de référence du gène *PML* est NM\_033238



### **I.3.2. Analyse des variants à priori non somatiques, de fréquence allélique dans le CTI supérieure à celle du TT (condition 1)**

Les gènes de cette condition présentent un variant considéré comme non somatique car la fréquence allélique du variant est comparable dans le TT et dans le sang. Nous avons choisi de présenter certains de ces variants car la fréquence allélique dans le CTI est sensiblement supérieure à celle du sang, en émettant l'hypothèse que, pour le CTI, l'augmentation de la fréquence allélique du variant serait liée à ce contingent de la tumeur et donc de type somatique. Les caractéristiques de ces variants dont la fréquence allélique du CTI est supérieure au TT et au sang et considérés comme non somatiques dans le classement à priori sont présentés dans le tableau 9. Pour les cas n°6 et 8 les variants *FGFR3* et *GATA2* respectivement ont une fréquence allélique dans le sang non interprétable du fait d'une profondeur définie comme limite car inférieure à 100. Cependant, du fait d'une profondeur élevée pour le TT et le CTI ces deux variants sont présentés dans le tableau 9. Il existe une différence statistiquement significative entre les fréquences alléliques du CTI et du sang ( $p < 0,001$ ) pour les variants présentés dans le tableau 9. Les cas n°5, n°7 et n°13 ne sont pas présentés dans le tableau 9 car ils n'ont pas de tels variants.

### **I.3.3. Analyse des variants somatiques de fréquence allélique comparable entre les deux contingents tumoraux (condition 0 en somatique)**

La figure 17 montre les variants somatiques qui ont des mutations dont la fréquence allélique dans le TT est comparable à celle observée dans le CTI, et qui sont présents pour au moins deux cas. Pour chaque variant la profondeur minimale totale pour le TT, le CTI et le sang est de 100.

Les gènes *GATA2*, *EGFR*, *ETV1*, le variant 1 du gène *SAMD9* (= *SAMD9v1*), *XRCC2*, *PIK3R2* et *CRCT1* ont un variant observé pour deux patients. Le gène *SAMD9* présente également un autre variant, nommé *SAMD9v2* observé pour trois patients. Les gènes *AKAP9* et *FGFR3* ont un variant observé pour quatre patients.

Aucune des altérations de ces gènes n'est significativement associée avec le sexe ou l'âge des patients ou l'index de prolifération de la tumeur. Plusieurs variants somatiques sont significativement associés entre eux. C'est le cas du variant d'*EGFR* avec les variants *SAMD9v2* ( $p=0,0005$ ), *XRCC2* ( $p=0,007$ ) et *SAMDv1* ( $p=0,0007$ ). Les variants *AKAP9/CRCT1*, *SAMDv1/SAMDv2* et *SAMD9v2/XRCC2* sont également significativement associés entre eux avec respectivement ( $p=0,03$ ,  $p=0,007$  et  $p=0,007$ ). Le variant *GATA2* quant à lui tend à être associé aux variants de *ETV1* ( $p=0,07$ ), de *XRCC2* ( $p=0,07$ ) et de *RET* ( $p=0,09$ ) en se rapprochant de valeurs statistiquement significatives. Il en est de même l'association entre les variant *FGFR3* et *AKAP9* qui ont une tendance à être associées sans atteindre de valeur significative ( $p=0,08$ ).

L'ensemble des variants somatiques des gènes précédemment présentés, quelques soient les fréquences alléliques dans le CTI et le TT est récapitulé dans la figure 17.

Les patients des cas n°5, n°10 et n°13 ne présentent pas de variants avec les critères de profondeur ou de statut mutationnel précédemment définis, ils n'ont donc pas de variants décrits dans la figure 17.



	Gène	Référence NM	exon	Variant		Fréquence allélique du variant (en %)			Profondeur totale			COSMIC	db SNP
				ADN	transcrit	TT	CTI	sang	TT	CTI	sang		
Casn°1	PDE4DIP	_001002811	1	c.379G>A	p.Ala127Thr	57	63	54	810	1158	1478	Non analysable*	rs2762745
Cas n°2	PDE4DIP	_014644	7	c.824C>T	p.Ser275Leu	53	59	50	179	148	8697	Non référencé	rs1359300
Cas n°3	MTRR	_024010	2	c.147A>G	p.Ile49Met	41	78	51	400	113	2177	Non référencé	rs1801394
	DCC	_005215	3	c.601C>G	p.Arg201Gly	53	69	53	1187	411	3326	Non référencé	rs2229080
	IL7R	_002185	8	c.1066A>G	p.Ile356Val	53	69	50	1288	649	2150	Non référencé	rs3194051
	IL7R	_002185	6	c.731C>T	p.Thr244Ile	40	94	48	148	137	2046	Référencé COSM132904	rs687932
	BCL9	_004326	8	c.2011C>T	p.Pro671Ser	61	76	58	379	127	1257	Non référencé	rs3820129
	BCL9	_004326	8	c.2707G>A	p.Ala903Thr	47	60	49	273	299	805	Non référencé	Non référencé
	ITGA10	_003637	30	c.3481A>G	p.Arg1161Gly	47	68	47	355	506	2506	Non référencé	rs75496347
	ALK	_004304	29	c.4587C>G	p.Asp1529Glu	47	65	48	446	231	941	Référencé COSM3758201	rs1881421
Cas n°4	NUMA1	_006185	15	c.2381C>G	p.Ala794Gly	45	62	48	316	348	739	Non référencé	rs370913
	HIF1A	_001530	12	c.1744C>T	p.Pro582Ser	46	62	48	860	313	1806	Non référencé	rs11549465
	EML4	_019063	11	c.1144A>G	p.Ile382Val	55	63	55	574	293	1506	Non référencé	rs10202624
Cas n°6	IGF2R	_000876	34	c.4855A>G	p.Arg1619Gly	53	63	52	3262	1011	1780	Non référencé	rs629849
	IL7R	-002185	6	c.731C>T	p.Thr244Ile	45	59	46	2705	1147	3863	Référencé COSM132904	rs687932
Cas n°8	FGFR3	_000142	16	c.2044G>A	p.Val682Ile	45	58	Ø*	206	486	40 Ø*	Non référencé	Non référencé
Cas n°9	GATA2	_032638	4	c.967C>T	p.His323Tyr	40	72	Ø*	1368	561	58 Ø*	Non référencé	Non référencé
	KAT6B	_012330	5	c.821C>T	p.Ala274Val	49	90	66	1206	799	1374	Non référencé (myst4)	Non référencé
Cas n°10	ERCC2	_000400	10	c.934G>A	p.Asp312Asn	49	64	53	637	723	326	Non référencé	rs1799793
	EML4	_019063	11	c.1144A>G	p.Ile382Val	63	72	66	1066	554	667	Non référencé	rs10202624
Cas n°11	AFF3	_001025108	14	c.1556A>G	p.Asn519Ser	49	64	52	1949	268	2067	Non référencé	rs1047265
	TSHR	_000369	1	c.154C>A	p.Pro52Thr	46	61	45	1619	311	880	Non référencé	rs2234919
	STK36	_015690	27	c.3838T>C	p.Ser1280Pro	40	71	49	1143	161	1846	Non référencé	rs147792143
Cas n°11	LRP1B	_018557	2	c.143A>G	p.Gln48Arg	45	60	49	596	760	597	Non référencé	rs12990449
	PDE4DIP	_14644	26	c.3796A>G	p.Lys1266Glu	45	56	46	192	160	354	Non référencé	rs12568796
	RNF213	_00125071	40	c.11512G>C	p.Val3838Leu	50	58	49	213	108	359	Non analysable*	rs72216493
	LTK	_002344	2	c.125G>A	p.Arg42Gln	50	64	49	319	246	3157	Non référencé	rs2305030

Tableau 9 : caractéristiques de certains variants présentant la condition 1, et considérés comme non somatiques lors de l'analyse, a priori.

\* pour les cas 6 et 8 deux variants ont une fréquence allélique dans le sang non interprétable du fait d'une couverture limite, ne permettant pas de définir un statut somatique ou non.

\*variant non analysable sur COSMIC car la séquence NM\_ n'est pas celle présente sur le site. Les variants ayant une séquence de polymorphisme en orange (rs) sont identifiés par l'algorithme de prédiction de pathogénicité comme des mutations potentiellement pathogènes.

Gène	Exon	Variant*	Cas 1			Cas 2			Cas 3			Cas 4			Cas 5			Cas 6			Cas 7			Cas 8			Cas 9			Cas 10			Cas 11			Cas 13								
			sang	TT	CTI	sang	TT	CTI	sang	TT	CTI	sang	TT	CTI	sang	TT	CTI	sang	TT	CTI	sang	TT	CTI	sang	TT	CTI	sang	TT	CTI	sang	TT	CTI	sang	TT	CTI	sang	TT	CTI	sang	TT	CTI			
<i>GATA2</i>	4	c.967C>T → p.His323Tyr							28	66	51	38	79	85				39	65	68	36	63	75	47	40	72																		
<i>FGFR3</i>	16	c.2044C>T → p.Val682Ile	37	84	82	47	96	96	33	89	90	53	61	68				23	45	58	29	57	54				30	74	61							79	94	95						
<i>ETV1</i>	7	c.298A>G → p.Ser100Gly																54	61	60	48	66	63																					
<i>EGFR</i>	13	c.1562G>A → p.Arg521Lys										52	98	98							53	60	66				47	59	64															
<i>AKAP9</i>	33	c.8375A>G → p.Asn2792Ser	45	64	68	49	63	61													49	63	66				51	62	61															
<i>SAMD9v1</i>	3	c.1645G>T → p.Val549Leu										52	68	63													51	62	64															
<i>SAMD9v2</i>	3	c.428T>C → p.Ile143Thr										49	68	62							51	66	63				49	59	63															
<i>XRCC2</i>	3	c.563G>A → p.Arg188His										53	60	60							51	62	56																					
<i>PIK3R2</i>	9	c.937T>C → p.Ser313Pro				46	64	61				47	63	61																														
<i>CRTC1</i>	9	c.982A>G → p.Thr328Ala				57	63	68													55	60	54																					
<i>PKHD1</i>	32	c.3785C>T → p.Ala1262Val																						32	49	49							52	84	81									
<i>RET</i>	11	c.2071G>A → p.Glu691ser				50	94	82																			47	68	74				51	81	75									
<i>NCOA4</i>	2	c.22T>G → p.Phe8Val	48	79	90							52	75	52																			52	83	75									

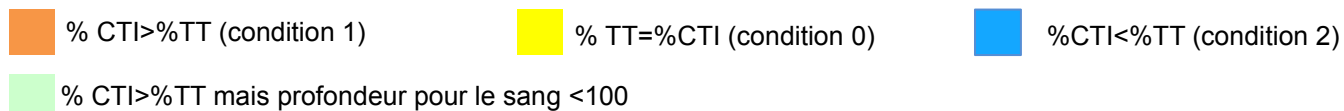


Figure 17 : caractéristiques des gènes ayant un variant somatique présent dans au moins deux cas avec une fréquence allélique comparable pour le CTI et le TT. Sur cette figure, sont également représentés avec des couleurs différentes, les variants présentant les autres conditions en somatique.

\*seuls les variants somatiques et pour lesquels la profondeur est supérieure à 100 sont présentés.

### **I.3.4. Comparaison des fréquences alléliques des variants entre le TCS et le sang pour trois cas**

Pour les cas n°2, n°5 et n°13 du tissu cérébral sain péri-tumoral (TCS) était accessible. Pour ces trois cas, les fréquences alléliques de l'ensemble des variants observés dans les deux prélèvements ont été comparées pour voir s'il existe une différence entre ces deux types d'échantillons à priori non tumoraux. Seul les variants avec une profondeur de 0 pour le TCS ou le sang n'ont pas été inclus dans cette analyse.

Pour le cas n°2, la moyenne de la fréquence allélique des variants pour le sang est de  $64,9 \pm 28,5$  et de  $65,4 \pm 29$  pour le TCS. La comparaison des moyennes des fréquences alléliques des variants des deux échantillons montrent que les moyennes sont comparables puisqu'il n'y a pas de différence statistiquement significative ( $p=0,27$ ). Le coefficient de corrélation est positif avec une valeur de  $r^2=0,883$ , il est statistiquement significatif ( $p<0,0001$ ). Ce dernier test confirme que les fréquences alléliques des variants du TCS et du sang sont comparables, la figure 18 montre la courbe de point obtenue.

Pour les cas n°5 et n°13 les résultats sont comparables puisque les moyennes des fréquences alléliques des variants du TCS et du sang sont respectivement de  $65,6 \pm 26,6$  et  $65,8 \pm 26,4$  pour le cas n°5; et de  $63,1 \pm 27,4$  et  $63,2 \pm 27,3$  pour le cas n°13. Ces deux résultats sont comparables car il n'y a pas de différence significative ( $p=0,62$  pour le cas n°5 et  $p=0,36$  pour le cas n°13). Les coefficients de corrélation obtenus sont positifs et significatifs ( $p<0,0001$ ) pour les deux cas. Ils sont de  $r^2=0,933$  pour le cas n°5 et  $r^2=0,968$  pour le cas n°13. La figure 18 montre les courbes de points pour les deux cas.



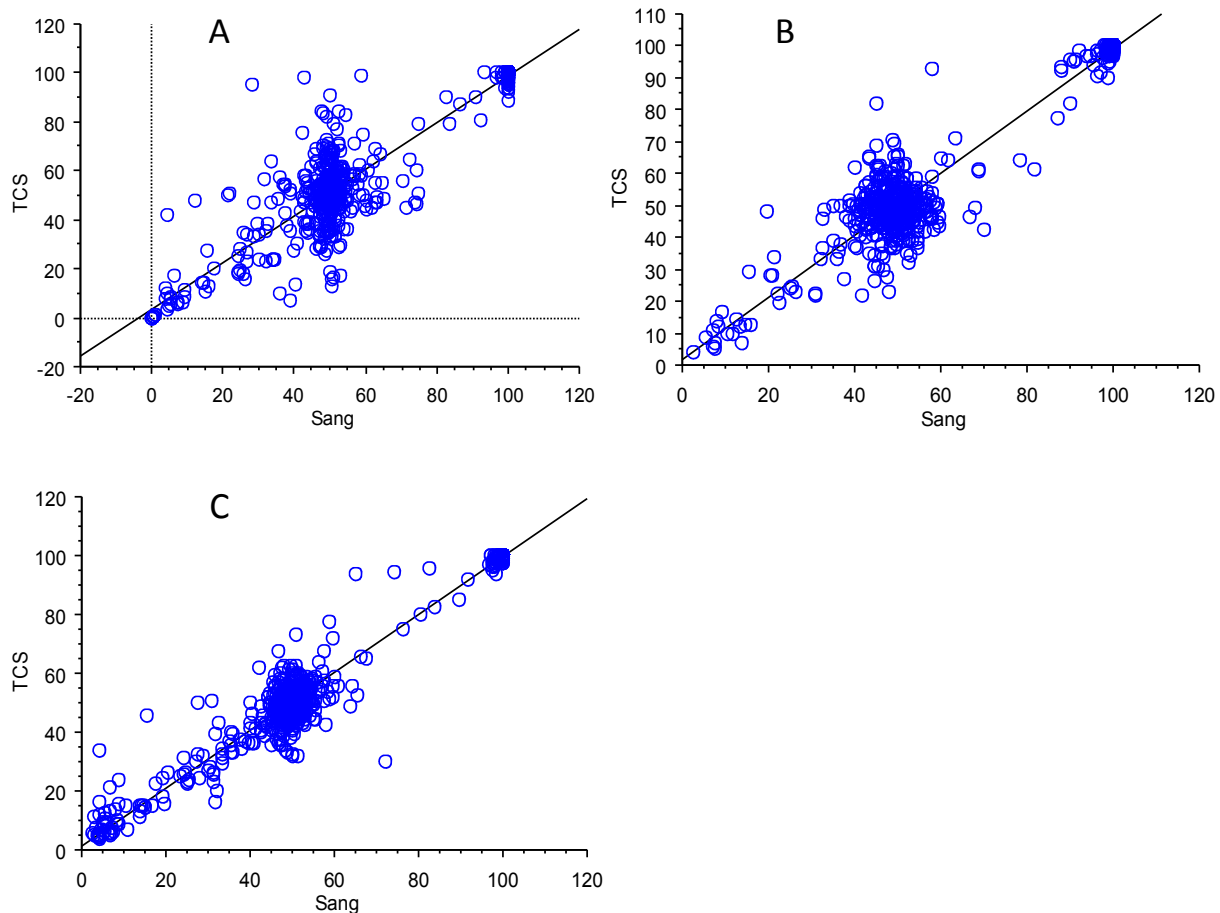


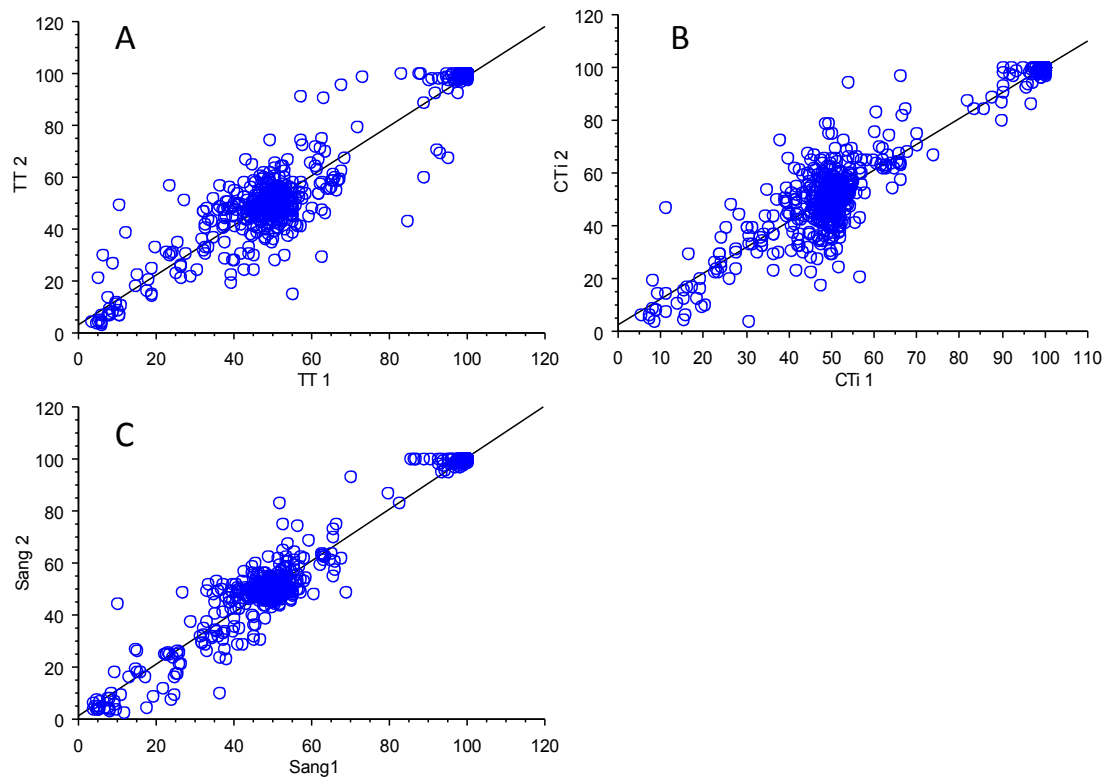
Figure 18 : **courbes de point pour les cas n°2 (A), n°5 (B) et n°13 (C)**, permettant d'obtenir des coefficients de corrélation positifs et statistiquement significatifs entre le TCS et le sang pour les trois cas ( $p < 0,0001$ ).

### I.3.5. Comparaison des fréquences alléliques des variants pour des échantillons de même type à partir d'extraction d'ADN différente.

Pour apprécier la variabilité des fréquences alléliques des variants dans un même échantillon, pour certains cas, les échantillons ont été ré-analysés à partir de l'ADNg d'une deuxième extraction. Les fréquences alléliques de l'ensemble des variants observés ont été comparées pour voir s'il existe une différence entre deux mêmes types d'échantillons. Seul les variants avec une profondeur de 0 pour un des deux échantillons n'ont pas été inclus dans cette analyse.

Pour le cas 7 une deuxième analyse a été réalisée sur le CTI, le TT et le sang appelée respectivement CTI 2, TT 2 et Sang 2. Pour les échantillons tumoraux (TT 2 et CTI 2) l'ADNg a été extrait à partir de la même zone sélectionnée pour la première analyse. En comparant les fréquences alléliques de variants entre TT et TT 2, le coefficient de corrélation est positif avec  $r^2=0,928$  et significatif ( $p < 0,0001$ ). Les corrélations sont également positives et

significatives ( $p < 0,0001$ ) pour les comparaisons du CTI et CTI 2 et celle du sang et sang 2 avec respectivement des coefficients  $r^2 = 0,929$  et  $r^2 = 0,972$ . La figure 19 montre les courbes de point obtenues pour les comparaisons des trois échantillons.



**Figure 19 : courbes de point pour le cas n°7, montrant une corrélation positive entre les deux échantillons de tissu tumoral solide en (A), de tissu tumoral infiltrant en (B) et de tissu sain, sang, en (C), statistiquement significative pour les trois ( $p < 0,0001$ ).**

Pour le cas n°2, une seconde analyse a pu être faite sur le tissu tumoral infiltrant appelé CTI 2 et le sang (sang 2). Ce nouveau séquençage permet d'étudier la corrélation entre ces deux échantillons et ceux précédemment étudiés. Les deux coefficients de corrélation sont positifs et significatifs ( $p < 0,0001$ ), avec  $r^2 = 0,914$  pour CTI et CTI2 et  $r^2 = 0,957$  pour le sang et sang 2. Les courbes de point montrant cette corrélation positive sont sur la figure 20.

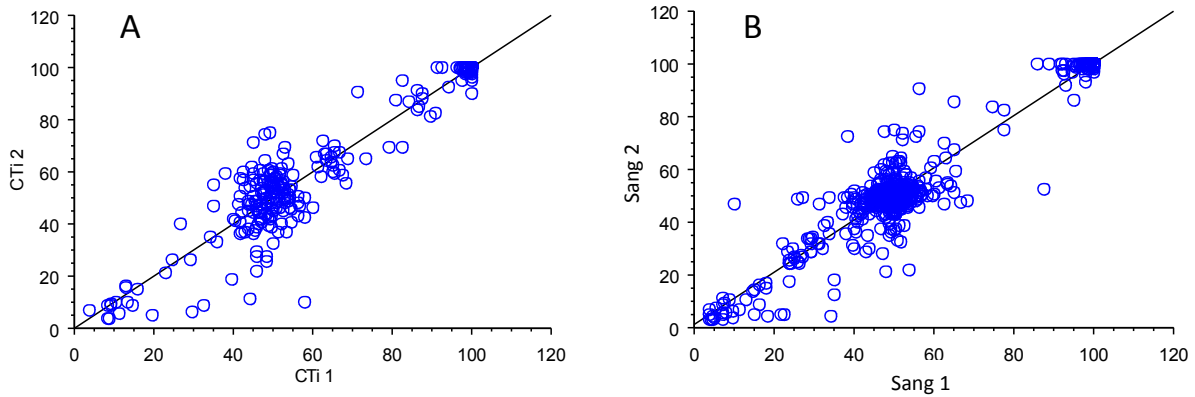


Figure 20 : courbes de point pour le cas n°2 montrant une corrélation positive entre les deux échantillons de tissu tumoral infiltrant en (A), et ceux de tissu sain, sang, en (B), statistiquement significative pour les deux ( $p < 0,0001$ )

Enfin pour le cas n°13 une seconde analyse a permis d'obtenir le TT 2 et le TCS 2. Les corrélations entre TT et TT 2 et TCS et TCS 2 sont positives et significatives ( $p < 0,0001$ ), avec  $r^2 = 0,866$  et  $r^2 = 0,864$  respectivement. La figure 21 illustre ces corrélations positives.

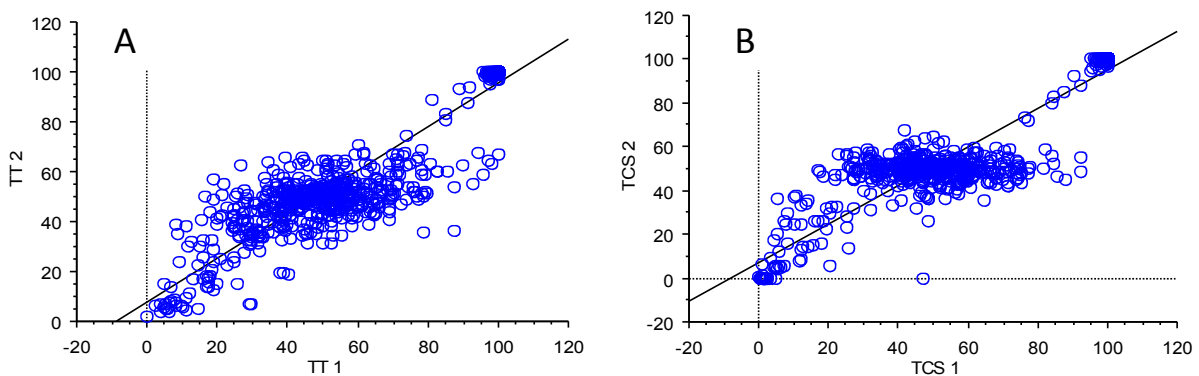


Figure 21 : courbes de point pour le cas n°13 montrant une corrélation positive entre les deux échantillons de tissu tumoral solide en (A), et ceux de tissu cérébral sain péri-tumoral, en (B), statistiquement significative pour les deux ( $p < 0,0001$ ).

### I.3.6. Analyse de l'amplification d'*EGFR* et de *PDGFRA* et analyse de la survie

La présence ou non d'une amplification des gènes *EGFR* et *PDGFRA* a été analysée en calculant la moyenne des ratios « profondeur par position/moyenne des profondeurs totales de l'échantillon » observée pour le contingent tumoral TT et le CTI par rapport au sang.

Pour huit patients, le ratio pour l'*EGFR* est 5 à 150 fois plus élevé dans les contingents tumoraux que dans le sang. Ces patients présentent donc tous une amplification de l'*EGFR* décrit dans le sous-type classique de la classification moléculaire des glioblastomes.

Un autre patient présente une amplification de *PDGFRA* avec un ratio 10 fois plus élevé dans les contingents tumoraux que dans le sang. Ce type d'altération moléculaire est décrit dans le sous-type proneural. Trois patients ne présentent ni amplification de l'*EGFR* ni amplification de *PDGFRA*, pour le dernier patient (cas n°12) ce statut n'est pas interprétable au vu de la faible profondeur observée dans les différents échantillons.

L'amplification d'*EGFR* n'est pas significativement associée avec le sexe ou l'âge des patients, ou avec l'index de prolifération de la tumeur. De plus, elle n'est associée à aucun variant somatique des gènes *GATA2*, *EGFR*, *ETV1*, *SAMD9v1*, *XRCC2*, *PIK3R2*, *CRTC1*, *SAMD9v2*, *AKAP9*, *FGFR3*, *PKHD1*, *RET* et *NCOA4* (gènes présentés dans la figure 17). Pour l'ensemble des patients, la médiane de survie globale était de 20 mois. Huit patients étaient décédés à la date de point.

La survie globale n'est pas associée à l'âge ou au sexe des patients, ni à l'amplification d'*EGFR* même si, 6 des patients décédés présentaient cette dernière altération. Néanmoins, la survie globale tend à être associée à la présence de certains variants somatiques, sans atteindre une valeur statistiquement significative. En effet, quand le variant *FGFR3* est présent, la médiane de survie est de 20 mois contre 5 mois quand le variant est absent ( $p=0,08$ ). Il en est de même pour les variants *SAMD9v1* et *PIK3R2* avec respectivement une médiane de survie de 38 et 29 mois lorsqu'ils sont présents contre 20 et 12 mois lorsqu'ils sont absents (avec un  $p=0,09$  pour les deux). La figure 22 montre la comparaison des médianes de survie pour l'âge et lors de la présence des variants de *FGFR3*, *SAMD9v1* et *PIK3R2*.





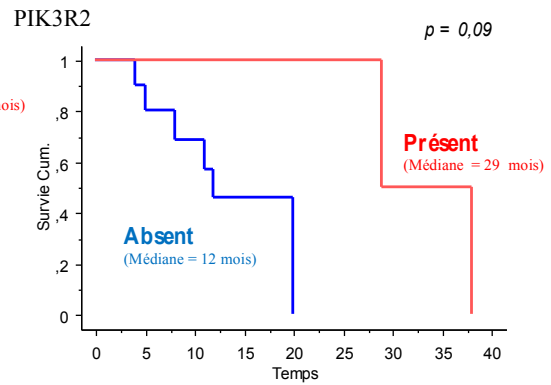
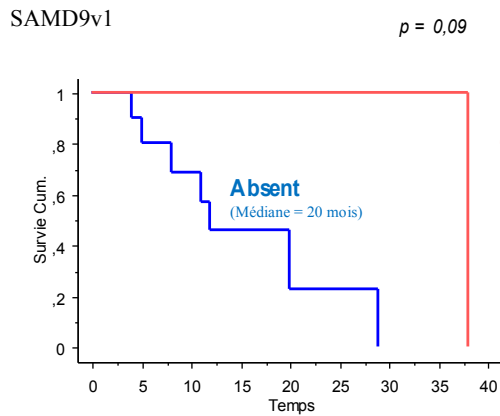
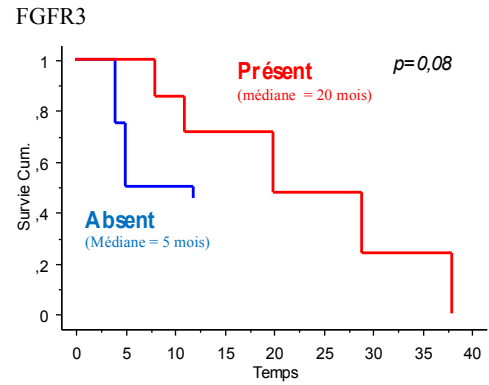
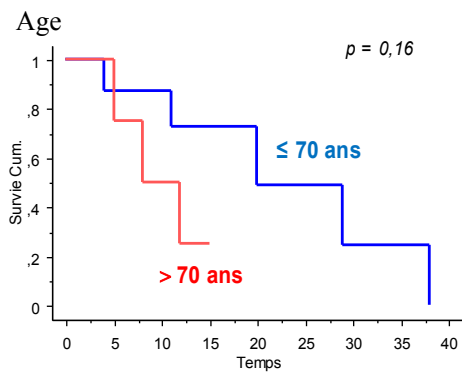


Figure 22 : comparaison des médianes de survie par rapport à l'âge, ou par rapport à la présence ou l'absence des variants *FGFR3*, *SAMD9v1* et *SAMD9v2*.

## Discussion

---

Les glioblastomes sont des tumeurs intracérébrales primitives de mauvais pronostic. Ceci est étroitement dépendant de leur localisation et de leur répartition spatiale qui empêche une exérèse chirurgicale complète. Ces tumeurs appartiennent au groupe des gliomes définis comme diffus ou infiltrants d'après l'OMS. Elles présentent donc deux contingents tumoraux distincts, l'un solide (TT) et l'autre formé de cellules tumorales infiltrant le parenchyme cérébral (CTI). Dans cette étude, le séquençage nouvelle génération nous a permis de comparer pour ces deux contingents tumoraux, les gènes du Comprehensive Cancer Panel™ qui sont connus pour être impliqués dans l'oncogenèse de différents cancers solides ou hématologiques, afin de savoir si la différence phénotypique observée entre les deux contingents peut en partie s'expliquer par des altérations moléculaires spécifiques. Les altérations observées, également appelées variants, ont été classées en comparant la fréquence allélique du variant dans le CTI par rapport au TT et également par rapport au tissu sain (sang et tissu cérébral sain péri-tumoral, lorsqu'il était présent) pour définir leur statut somatique ou non somatique.

La qualité des réactions de séquençage pour les 15 puces est très variable d'une puce à l'autre, avec un chargement des puces compris entre 32% et 88% mais une seule puce a un chargement inférieur à 50% (32%). Cette dernière puce comportait quatre échantillons, mais seulement deux étaient analysables, correspondant au séquençage du TT et du TCS de la deuxième extraction d'ADNg pour le dernier cas. Ce faible chargement peut s'expliquer par une erreur de manipulation lors du chargement des sphères dans les micro-puits de celle-ci, ou d'une surestimation du nombre des sphères liées à l'ADN. De plus, la qualité du séquençage dépend de la qualité de l'ADNg des échantillons. En effet, l'étude de Paoli-Iseppi et al, qui compare les résultats d'un séquençage nouvelle génération obtenu entre des tissus fixés au formaldéhyde et inclus en paraffine et des tissus congelés, montre une meilleure qualité d'analyse à partir de ces derniers. Néanmoins cette étude intéresse l'exome entier, et le matériel inclus en paraffine utilisé était conservé depuis les années 1999 (De Paoli-Iseppi et al., 2016). Contrairement à cette précédente étude, notre série intéresse un panel de gène permettant un séquençage ciblé et le matériel utilisé était conservé depuis les années 2010. L'utilisation de tissu tumoraux congelés pourrait évidemment permettre de s'affranchir des dommages lié à la fixation au formaldéhyde des tissus, mais elle ne permettrait pas d'identifier avec certitude les deux contingents tumoraux d'intérêt (TT et CTI). Dans notre série, l'utilisation du sang comme tissu sain contrôle semble acceptable, car les fréquences alléliques des variants dans le sang sont comparables et corrélée positivement à

celles observées dans le tissu sain cérébral péri-tumoral, dans les trois cas où ce dernier était présent.

Dans notre cohorte et comparativement à la littérature, la majorité des patients (67%) présentent une amplification de l'*EGFR*, et aucun ne présentent de mutation du gène *IDH1* au niveau du codon 132 et du gène *IDH2* au niveau du codon 172, nous confortant dans la sélection de patients atteints d'un glioblastome primaire.

Cette étude a mis en évidence de nombreux gènes présentant des variants dont la fréquence allélique varie au sein d'une même tumeur (entre le TT et le CTI) et entre les différents cas. Néanmoins, l'ensemble des variants présents dans le CTI l'était également dans le TT mais avec des fréquences alléliques différentes. C'est notamment le cas pour les variants des gènes *FGFR3*, *GATA2*, *EGFR* et *PLEKHG5*.

Le variant du gène *FGFR3* est observé pour dix patients de notre série dont sept avec un statut somatique et un avec un statut non interprétable du fait d'une profondeur de lecture inférieure à 100 pour le sang. *FGFR3* est un récepteur tyrosine kinase dont l'activation constitutive par mutation (substitution) au niveau du domaine extracellulaire ou au niveau du domaine tyrosine kinase (exon 15), entraîne la prolifération cellulaire et un effet anti-apoptotique par activation intracellulaire des voies des MAPK (di Martino et al., 2009). Cette activation du *FGFR3* est décrite principalement dans les carcinomes urothéliaux comme un événement précoce de l'oncogenèse (di Martino et al., 2015). Comme dans cette étude, la mutation observée dans notre série est une substitution entraînant un changement d'acide aminé au niveau du domaine tyrosine kinase du *FGFR3* (exon 16). Contrairement aux cancers urothéliaux, cette mutation n'est pas référencée sur les bases de données COSMIC pour les glioblastomes. Pour ces derniers, seule une mutation ponctuelle dans le domaine tyrosine kinase de *FGFR1*, a déjà été décrite (Rand et al., 2005). *In vitro*, l'expression du mutant *FGFR3* (au niveau du domaine extracellulaire) dans des cellules urothéliales non tumorales augmentent la prolifération cellulaire. Ces cellules présentent également une adhésion intercellulaire et à la matrice extracellulaire diminuée, par dérégulation de l'expression de gènes impliqués dans l'adhésion (di Martino et al., 2015). Dans notre série, la substitution au niveau de l'exon 16 du domaine tyrosine kinase de *FGFR3* n'est également pas référencée sur les bases de données des polymorphismes dbSNP et cette substitution est identifiée comme potentiellement pathogène par les scores de prédiction de pathogénicité *in silico*.

Le variant du gène *GATA2* est observé pour cinq patients dont quatre avec un statut somatique et un avec un statut non interprétable. *GATA2* est un facteur de transcription dont les altérations sont essentiellement décrites en pathologie hématologique. Une mutation au niveau de l'exon 4 codant pour un domaine en doigt de zinc est présente dans les leucémies myéloïdes aiguës. Ce mutant altérerait les propriétés de liaison à l'ADN du facteur de

transcription, entraînant une surexpression de gènes de la prolifération tels que *c-Jun* ou *c-Myc*. (Greif et al., 2012). Le variant de notre série est une substitution au niveau du domaine en doigt de zinc dans l'exon 4. Ce variant n'est pas référencé dans les bases de données COSMIC ni dans les bases de données des polymorphismes. Néanmoins, ce variant n'est pas identifié comme potentiellement délétère par les scores *in silico*.

Récemment, Wang et collaborateurs ont montré qu'il existe une surexpression de GATA2 dans les glioblastomes et que *in vitro*, l'expression de GATA2 dans des lignées cellulaires de gliomes est nécessaire à la prolifération, la migration et l'invasion cellulaire (Wang et al., 2015).

Le variant du gène de l'*EGFR* est observé pour cinq cas dont trois ont un statut somatique pour cette mutation. Elle est située au niveau du domaine 4 du récepteur au facteur de croissance qui est un domaine de dimérisation de l'*EGFR*, elle a déjà été référencée dans les carcinomes épidermoïdes oraux (Pickering et al., 2013) mais non décrites dans les tumeurs cérébrales. Ce variant est également référencé comme polymorphisme dans les bases dbSNP.

Les variants du gène *PLEKHG5* sont observés dans deux cas. Un cas présente deux variants somatiques (au niveau de l'exon 8 et 12) et l'autre cas un variant somatique au niveau de l'exon 20. Dachsel et collaborateurs ont montré que *PLEKHG5* est exprimé dans plusieurs lignées cellulaires de glioblastome. *PLEKHG5* est un facteur d'échange nucléotidique spécifique de la protéine G RhoA qui est nécessaire *in vitro* pour acquérir une polarité cellulaire, avec l'émission de lamellipodes qui permettent la migration cellulaire, en régulant les activités de Dia et de ROCK (Dachsel et al., 2013). Néanmoins aucune altération de ce gène n'est référencée dans les glioblastomes.

Nos résultats sont le reflet de l'importante hétérogénéité moléculaire intra et inter-tumorale des glioblastomes. Nous avons pu observer une variabilité importante des fréquences alléliques des variants que ce soit dans les contingents tumoraux ou dans le tissu sain (sang ou tissu cérébral péri tumoral). Dans la tumeur, cette variabilité peut s'expliquer par l'existence d'un mosaïcisme somatique des mutations, c'est à dire la présence des variants dans une catégorie spécifique de cellules tumorales parmi l'ensemble des cellules tumorales du tissu. Dans le sang, le mosaïcisme d'une mutation mise en évidence par NGS peut s'expliquer par un évènement post-zygotique plutôt que par une mutation germinale (Amitrano et al., 2015), qui a déjà été montré dans d'autres pathologies cancéreuses.

Les variations de fréquence allélique observées entre le tissu sain et les échantillons tumoraux pourraient résulter d'une variation du nombre de copies (CNV) par perte ou gain d'un locus ou d'un bras chromosomique entier au niveau duquel se trouve le variant observé dans les tissus tumoraux. En effet, beaucoup des variants que nous avons identifiés comme somatiques sont situés sur les chromosomes 7 et 10, bien connus pour être la cible d'une

polysomie ou d'une perte dans les glioblastomes. A partir des fichiers BAM des échantillons tumoraux et du tissu sain pour chaque cas, des logiciels tel que VarScan 2 pourraient permettre d'identifier les CNV sur des échantillons tumoraux (Koboldt et al., 2012). A partir d'une analyse préliminaire de nos résultats sur le logiciel IGV, nous avons par exemple observé que la présence du variant *EGFR* p.Arg521Lys est concomitante à une amplification de l'allèle muté du gène *EGFR*, alors que dans les cas où ce variant est absent, c'est l'allèle sauvage du gène qui est amplifié (résultats non montrés, en cours d'analyse). De la même manière, la variation de fréquence des autres variants d'intérêt comme par exemple *FGFR3* p.Val682Ile, pourrait être liée à un gain ou une perte d'un locus ou d'un bras chromosomique complet portant soit l'allèle sauvage, soit l'allèle muté selon le cas. Les CNV peuvent être vérifiés par plusieurs méthodes. Une perte pourrait être mise en évidence grâce à l'étude de marqueurs microsatellites répartis sur le bras du chromosome cible, pour des couples ADN tumoral et ADN sain contrôle. Des techniques similaires sont utilisées pour mettre en évidence les LOH dans d'autres cancers (Bluteau, 2008). Une analyse du nombre de copie des gènes par CGH array peut également mettre en évidence une perte ou un gain du nombre de copie du gène d'intérêt. Dans les glioblastomes, il peut également être observé une duplication de l'allèle muté associé à une perte de l'allèle sauvage. Ce type d'anomalie peut donc causer une augmentation de la fréquence allélique d'un variant avec un nombre de copie du gène normal, ce type d'anomalie se nomme APUD (acquired uniparental disomy). Une étude réalisée sur des glioblastomes a montré l'avantage de technique telle que la technique SNP Chip pour identifier les APUD (Yin et al., 2009).

Alternativement, une analyse par hybridation in situ par fluorescence (FISH) avec une ou plusieurs sondes s'hybridant sur le locus d'intérêt et une sonde centromérique, pourrait également permettre de mettre en évidence une amplification ou délétion du locus.

Le séquençage nouvelle génération est une technique de screening permettant de mettre en évidence de nombreuses altérations pour un même échantillon. Dans notre étude, la présence de certains des variants est à confirmer par une technique de référence comme le séquençage Sanger. Néanmoins, afin de confirmer que l'augmentation de fréquence allélique observée est bien spécifique d'un contingent en particulier et qu'elle peut résulter d'un mosaïcisme tissulaire, sanguin ou tumoral, des techniques qui permettent de cibler et de quantifier les différents allèles devront être réalisées. Ainsi, la variation de fréquence allélique sera vérifiée pour les variants d'intérêt dans les trois tissus des patients de l'étude par exemple par PCR digitale spécifique d'allèle, qui permet de quantifier avec une extrême précision la présence d'une mutation grâce à une sonde spécifique (Campbell et al., 2015).

Dans notre série, nous avons pu observer des fréquences alléliques de variants comparables entre un tissu tumoral (TT) essentiellement constitué par la tumeur et un contingent tumoral infiltrant (CTI) constitué également de cellules non tumorales. Cette

observation et a fortiori lors de la présence d'une fréquence allélique du variant supérieure dans le CTI, même si elle reste à confirmer par une autre méthode, indiquerait soit que les variants seraient présents dans les cellules infiltrantes et dans les cellules du tissu tumoral qui ont un potentiel infiltrant, soit que d'autres cellules que les cellules tumorales pourraient également porter la mutation. Ainsi, la distribution des variants au sein des cellules du contingent CTI reste à explorer et rejoint la question du micro-environnement dans l'oncogenèse gliale.

Dernièrement, dans notre étude le gène *THBS1* nous a semblé être intéressant. Un variant de ce gène, qui est présent dans un cas et considéré comme somatique, avec une fréquence supérieure dans le CTI par rapport au TT, est identifié selon l'analyse de prédiction comme une mutation potentiellement pathogène *in silico*. Par ailleurs, une expression protéique augmentée de THBS1, et de TGF $\beta$  (transforming growth factor beta) pourrait être corrélée au grade de malignité dans les gliomes (Kawataki et al., 2000). De manière comparable, la méthylation du promoteur de *THBS1* est associée à une augmentation de la survie des patients atteints de glioblastome (Rankeillor et al., 2014). De plus, TGF $\beta$  est connue pour être une composante importante du micro-environnement des glioblastomes, et *in vitro* l'exposition de lignées cellulaires de glioblastomes au TGF $\beta$ , favorise leur migration (Joseph et al., 2014) (Joseph et al., 2013). Ce dernier exemple montre la nécessité de poursuivre la caractérisation des cellules tumorales infiltrantes et du micro-environnement non seulement sur une analyse des variants génétiques comme nous l'avons fait mais également sur une analyse plus complète en étudiant le méthylome, le transcriptome et le protéome.



## Conclusion

---

Notre étude a mis en évidence des variants qui étaient à la fois présents dans le tissu tumoral solide et dans le tissu tumoral infiltrant. Les variations remarquées entre ces deux tissus tumoraux étaient quantitatives. En effet pour un même variant les fréquences alléliques différaient. Sur un plan fondamental, des altérations des gènes impliquées dans l'adhésion et la migration cellulaire nous ont semblé être intéressantes. Ces altérations et leur variation entre les deux tissus tumoraux restent à confirmer par d'autres techniques de séquençage. Il semble également nécessaire de poursuivre la caractérisation du CTI, en étudiant le méthylome, le transcriptome et le protéome.





## Références bibliographiques

---

Amitrano, S., Marozza, A., Somma, S., Imperatore, V., Hadjistilianou, T., De Francesco, S., Toti, P., Galimberti, D., Meloni, I., Cetta, F., et al. (2015). Next generation sequencing in sporadic retinoblastoma patients reveals somatic mosaicism. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG*.

Bluteau, O. (2008). Détection quantitative semi-automatique des pertes d'hétérozygotie sur le bras long du chromosome 4 dans les carcinomes hépatocellulaires.

Brennan, C.W., Verhaak, R.G.W., McKenna, A., Campos, B., Nounshmehr, H., Salama, S.R., Zheng, S., Chakravarty, D., Sanborn, J.Z., Berman, S.H., et al. (2013). The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 155, 462–477.

Campbell, I.M., Shaw, C.A., Stankiewicz, P., and Lupski, J.R. (2015). Somatic mosaicism: implications for disease and transmission genetics. *Trends Genet. TIG*.

Cancer Genome Atlas Research Network (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455, 1061–1068.

Carlsson, S.K., Brothers, S.P., and Wahlestedt, C. (2014). Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme. *EMBO Mol. Med.* 6, 1359–1370.

Carrasco-García, E., Saceda, M., and Martínez-Lacaci, I. (2014). Role of receptor tyrosine kinases and their ligands in glioblastoma. *Cells* 3, 199–235.

Chen, L., Voronovich, Z., Clark, K., Hands, I., Mannas, J., Walsh, M., Nikiforova, M.N., Durbin, E.B., Weiss, H., and Horbinski, C. (2014). Predicting the likelihood of an isocitrate dehydrogenase 1 or 2 mutation in diagnoses of infiltrative glioma. *Neuro-Oncol.* 16, 1478–1483.

Dachsel, J.C., Ngok, S.P., Lewis-Tuffin, L.J., Kourtidis, A., Geyer, R., Johnston, L., Feathers, R., and Anastasiadis, P.Z. (2013). The Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor Syx Regulates the Balance of Dia and ROCK Activities To Promote Polarized-Cancer-Cell Migration. *Mol. Cell. Biol.* 33, 4909–4918.

Daumas-Duport, C., Scheithauer, B.W., and Kelly, P.J. (1987). A histologic and cytologic method for the spatial definition of gliomas. *Mayo Clin. Proc.* 62, 435–449.

Durand, K., Guillaudeau, A., Pommepuy, I., Mesturoux, L., Chaunavel, A., Gadeaud, E., Porcheron, M., Moreau, J.-J., and Labrousse, F. (2011). Alpha-internexin expression in gliomas: relationship with histological type and 1p, 19q, 10p and 10q status. *J. Clin. Pathol.* 64, 793–801.

Durand, K.S., Guillaudeau, A., Weinbreck, N., DeArmas, R., Robert, S., Chaunavel, A., Pommepuy, I., Bourthoumieu, S., Caire, F., Sturtz, F.G., et al. (2010). 1p19q LOH patterns and expression of p53 and Olig2 in gliomas: relation with histological types and prognosis. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* 23, 619–628.



Ebrahimi, A., Skardelly, M., Bonzheim, I., Ott, I., Mühleisen, H., Eckert, F., Tabatabai, G., and Schittenhelm, J. (2016). ATRX immunostaining predicts IDH and H3F3A status in gliomas. *Acta Neuropathol. Commun.* 4, 60.

Eder, K., and Kalman, B. (2014). Molecular heterogeneity of glioblastoma and its clinical relevance. *Pathol. Oncol. Res. POR* 20, 777–787.

Figarella-Branger, D., Colin, C., Coulibaly, B., Quilichini, B., Maues De Paula, A., Fernandez, C., and Bouvier, C. (2008). [Histological and molecular classification of gliomas]. *Rev. Neurol. (Paris)* 164, 505–515.

Gerlinger, M., Rowan, A.J., Horswell, S., Larkin, J., Endesfelder, D., Gronroos, E., Martinez, P., Matthews, N., Stewart, A., Tarpey, P., et al. (2012). Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N. Engl. J. Med.* 366, 883–892.

Gilbert, M.R., Dignam, J.J., Armstrong, T.S., Wefel, J.S., Blumenthal, D.T., Vogelbaum, M.A., Colman, H., Chakravarti, A., Pugh, S., Won, M., et al. (2014). A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 370, 699–708.

Greif, P.A., Dufour, A., Konstandin, N.P., Ksienzyk, B., Zellmeier, E., Tizazu, B., Sturm, J., Benthaus, T., Herold, T., Yaghmaie, M., et al. (2012). GATA2 zinc finger 1 mutations associated with biallelic CEBPA mutations define a unique genetic entity of acute myeloid leukemia. *Blood* 120, 395–403.

Huse, J.T. (2015). TERT promoter mutation designates biologically aggressive primary glioblastoma. *Neuro-Oncol.* 17, 5–6.

Institut National du Cancer (2012). Référentiels de bon usage. Tumeurs cérébrales malignes de l'adulte.

Jin, G., Reitman, Z.J., Duncan, C.G., Spasojevic, I., Gooden, D.M., Rasheed, B.A., Yang, R., Lopez, G.Y., He, Y., McLendon, R.E., et al. (2013). Disruption of wild type IDH1 suppresses D-2-hydroxyglutarate production in IDH1-mutated gliomas. *Cancer Res.* 73, 496–501.

Joseph, J.V., Balasubramaniyan, V., Walenkamp, A., and Kruyt, F.A.E. (2013). TGF- $\beta$  as a therapeutic target in high grade gliomas - promises and challenges. *Biochem. Pharmacol.* 85, 478–485.

Joseph, J.V., Conroy, S., Tomar, T., Eggens-Meijer, E., Bhat, K., Copray, S., Walenkamp, A.M.E., Boddeke, E., Balasubramanyian, V., Wagemakers, M., et al. (2014). TGF- $\beta$  is an inducer of ZEB1-dependent mesenchymal transdifferentiation in glioblastoma that is associated with tumor invasion. *Cell Death Dis.* 5, e1443.

Kannan, K., Inagaki, A., Silber, J., Gorovets, D., Zhang, J., Kasthuber, E.R., Heguy, A., Petrini, J.H., Chan, T.A., and Huse, J.T. (2012). Whole-exome sequencing identifies ATRX mutation as a key molecular determinant in lower-grade glioma. *Oncotarget* 3, 1194–1203.

Karsy, M., Huang, T., Kleinman, G., and Karpel-Massler, G. (2014). Molecular,



histopathological, and genomic variants of glioblastoma. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 19, 1065–1087.

Kawataki, T., Naganuma, H., Sasaki, A., Yoshikawa, H., Tasaka, K., and Nukui, H. (2000). Correlation of thrombospondin-1 and transforming growth factor-beta expression with malignancy of glioma. *Neuropathol. Off. J. Jpn. Soc. Neuropathol.* 20, 161–169.

Koboldt, D.C., Zhang, Q., Larson, D.E., Shen, D., McLellan, M.D., Lin, L., Miller, C.A., Mardis, E.R., Ding, L., and Wilson, R.K. (2012). VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res.* 22, 568–576.

Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., Scheithauer, B.W., and Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 114, 97–109.

Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Kleihues, P., and Ellison, D.W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 131, 803–820.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK (2016). WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System WHO/IARC Classification of Tumours, 4th Edition Revised, Volume 1. (WHO),.

Di Martino, E., L'Hôte, C., Kennedy, W., Tomlinson, D., and Knowles, M. (2009). Mutant Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Induces Intracellular Signaling and Cellular Transformation in a Cell Type- and Mutation-Specific Manner. *Oncogene* 28, 4306–4316.

Di Martino, E., Kelly, G., Roulson, J.-A., and Knowles, M.A. (2015). Alteration of cell-cell and cell-matrix adhesion in urothelial cells: an oncogenic mechanism for mutant FGFR3. *Mol. Cancer Res. MCR* 13, 138–148.

Nobusawa, S., Lachuer, J., Wierinckx, A., Kim, Y.H., Huang, J., Legras, C., Kleihues, P., and Ohgaki, H. (2010). Intratumoral patterns of genomic imbalance in glioblastomas. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 20, 936–944.

Noushmehr, H., Weisenberger, D.J., Diefes, K., Phillips, H.S., Pujara, K., Berman, B.P., Pan, F., Pelloski, C.E., Sulman, E.P., Bhat, K.P., et al. (2010). Identification of a CpG Island Methylator Phenotype that Defines a Distinct Subgroup of Glioma. *Cancer Cell* 17, 510–522.

Ohgaki, H., and Kleihues, P. (2013). The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 19, 764–772.

De Paoli-Iseppi, R., Johansson, P.A., Menzies, A.M., Dias, K.-R., Pupo, G.M., Kakavand, H., Wilmott, J.S., Mann, G.J., Hayward, N.K., Dinger, M.E., et al. (2016). Comparison of whole-exome sequencing of matched fresh and formalin fixed paraffin embedded melanoma tumours: implications for clinical decision making. *Pathology (Phila.)* 48, 261–266.

Parker, S.J., and Metallo, C.M. (2015). Metabolic consequences of oncogenic IDH mutations. *Pharmacol. Ther.* 152, 54–62.

Parsons, D.W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J.C.-H., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I.-M., Gallia, G.L., et al. (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 321, 1807–1812.

Pickering, C.R., Zhang, J., Yoo, S.Y., Bengtsson, L., Moorthy, S., Neskey, D.M., Zhao, M., Ortega Alves, M.V., Chang, K., Drummond, J., et al. (2013). Integrative genomic characterization of oral squamous cell carcinoma identifies frequent somatic drivers. *Cancer Discov.* 3, 770–781.

Quan, A.L., Barnett, G.H., Lee, S.-Y., Vogelbaum, M.A., Toms, S.A., Staugaitis, S.M., Prayson, R.A., Peereboom, D.M., Stevens, G.H.J., Cohen, B.H., et al. (2005). Epidermal growth factor receptor amplification does not have prognostic significance in patients with glioblastoma multiforme. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 63, 695–703.

Rand, V., Huang, J., Stockwell, T., Ferriera, S., Buzko, O., Levy, S., Busam, D., Li, K., Edwards, J.B., Eberhart, C., et al. (2005). Sequence survey of receptor tyrosine kinases reveals mutations in glioblastomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 14344–14349.

Rankeillor, K.L., Cairns, D.A., Loughrey, C., Short, S.C., Chumas, P., Ismail, A., Chakrabarty, A., Lawler, S.E., and Roberts, P. (2014). Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification identifies promoter methylation events associated with survival in glioblastoma. *J. Neurooncol.* 117, 243–251.

Shepherd, R., Forbes, S.A., Beare, D., Bamford, S., Cole, C.G., Ward, S., Bindal, N., Gunasekaran, P., Jia, M., Kok, C.Y., et al. (2011). Data mining using the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer BioMart. *Database J. Biol. Databases Curation* 2011, bar018.

Shinojima, N., Tada, K., Shiraishi, S., Kamiryo, T., Kochi, M., Nakamura, H., Makino, K., Saya, H., Hirano, H., Kuratsu, J.-I., et al. (2003). Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Res.* 63, 6962–6970.

Simon, M., Hosen, I., Gousias, K., Rachakonda, S., Heidenreich, B., Gessi, M., Schramm, J., Hemminki, K., Waha, A., and Kumar, R. (2015). TERT promoter mutations: a novel independent prognostic factor in primary glioblastomas. *Neuro-Oncol.* 17, 45–52.

Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J.B., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., et al. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 352, 987–996.

Stupp, R., Hegi, M.E., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Taphoorn, M.J.B., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., et al. (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 10, 459–466.



Teodorczyk, M., and Martin-Villalba, A. (2010). Sensing invasion: cell surface receptors driving spreading of glioblastoma. *J. Cell. Physiol.* 222, 1–10.

Verhaak, R.G.W., Hoadley, K.A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M.D., Miller, C.R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J.P., et al. (2010). Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17, 98–110.

Wang, Z., Yuan, H., Sun, C., Xu, L., Chen, Y., Zhu, Q., Zhao, H., Huang, Q., Dong, J., and Lan, Q. (2015). GATA2 promotes glioma progression through EGFR/ERK/Elk-1 pathway. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* 32, 87.

Weller, M., van den Bent, M., Hopkins, K., Tonn, J.C., Stupp, R., Falini, A., Cohen-Jonathan-Moyal, E., Frappaz, D., Henriksson, R., Balana, C., et al. (2014). EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma. *Lancet Oncol.* 15, e395–403.

Wilson, T.A., Karajannis, M.A., and Harter, D.H. (2014). Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. *Surg. Neurol. Int.* 5, 64.

Xia, L., Wu, B., Fu, Z., Feng, F., Qiao, E., Li, Q., Sun, C., and Ge, M. (2015). Prognostic role of IDH mutations in gliomas: a meta-analysis of 55 observational studies. *Oncotarget* 6, 17354–17365.

Yin, D., Ogawa, S., Kawamata, N., Tunici, P., Finocchiaro, G., Eoli, M., Ruckert, C., Huynh, T., Liu, G., Kato, M., et al. (2009). High-resolution genomic copy number profiling of glioblastoma multiforme by single nucleotide polymorphism DNA microarray. *Mol. Cancer Res. MCR* 7, 665–677.

Zhao, J., Ma, W., and Zhao, H. (2014). Loss of heterozygosity 1p/19q and survival in glioma: a meta-analysis. *Neuro-Oncol.* 16, 103–112.



## Annexes

---

Annexe 1. Liste des abréviations .....	91
Annexe 2. Aperçu du variant de <i>FGFR3</i> pour le cas n°4, sur le logiciel IGV (integrative genomics viewer) : en A, variant dans le TT (61% de fréquence allélique) et en B, variant dans le CTI (68% de fréquence allélique). .....	94



## **Annexe 1. Liste des abréviations**

**ADN** : acide désoxy-ribo-nucléique

**ADNg** : ADN génomique

**AFF3** : AF4/FMR2 family, member 3

**AKAP9** : a kinase (PRKA) anchor protein (yotiao) 9

**ALK** : anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase

**AMM** : Autorisation de mise sur le marché

**APUD** : acquired uniparental disomy

**AQ** : quality alignment

**ATRX** : alpha thalassemia/ mental retardation syndrome X-linked

**BAM** : binary alignment map

**BCL9** : B-cell CLL/lymphoma 9

**BRIP1** : BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1

**CGH array** : comparative genomic hybridization array

**CNV** : copy number variation

**CRCT1** : CREB regulated transcription coactivator 1

**CTI** : cellules tumorales infiltrantes de glioblastome

**DCC** : deleted in colorectal carcinoma

**Dia** : Diaphanous homologue

**DO** : densité optique

**EGFR** : Epidermal growth factor receptor

**EML4** : echinoderm microtubule associated protein like 4

**ERCC2** : excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2

**ETV1** : E-twenty six variant 1

**FANCA** : Fanconi anemia, complementation group A

**FANCD2** : Fanconi anemia, complementation group D2

**FGFR3** : fibroblast growth factor receptor 3

**GATA2** : GATA binding protein 2

**Hg 19** : human genome 19

**HIF1a** : hypoxia-inducible factor 1, sous-unité alpha

**HPS** : Hémalun Phloxine Safran

**IDH1** : isocitrate dehydrogenase 1

**IGF2R** : insulin-like growth factor 2 receptor

**IL6ST** : interleukin 6 signal transducer





**IL7R** : interleukin 7 receptor  
**IRM** : Imagerie par résonance magnétique  
**ITGA10** : integrin, alpha 10  
**KAT6B** : K (lysine) acetyltransferase 6B  
**LOH** : loss of heterozygoty  
**LRP1B** : low density lipoprotein-related protein 1B  
**MAPK** : mitogen activated protein kinase  
**MDM2** : O6-methylguaninie DNA methyltranferase  
**MMP** : matrix metalloproteinase  
**mTOR** : mammalian target of rapamycin  
**MTRR** : 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase  
**NCOA4** : nuclear receptor coactivator 4  
**NF1** : neurofibromin 1  
**NGS** : next generation sequencing  
**NLR1** : NLR family, pyrin domain containing 1  
**NUMA1** : nuclear mitotic apparatus protein 1  
**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé  
**PCR** : polymerase chain reaction  
**PDE4DIP** : phosphodiesterase 4D interacting protein  
**PDGFRA** : platelet derived growth factor receptor alpha polypeptide  
**PIP2** : phosphatidylinositol 4,5-biphosphate  
**PIP3** : phosphatiylinositol 3,4,5-triphosphate  
**PI3K** : phosphoinositide-3-kinase  
**PIK3R2** : phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 2  
**PKHD1** : polycystic kidney and hepatic disease 1  
**PLEKHG5** : pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member  
5  
**PML** : promyelocytic leukemia  
**PTEN** : phosphatase et tensin homolog  
**RB1** : retinoblastoma 1  
**RET** : ret proto-oncogene  
**ROCK** : Rho associated kinase  
**SAMD9** : sterile alpha motif domain containing 9  
**SNP** : single nucleotide polymorphisme  
**STK36** : Drosophila fused protein homolog  
**TCF7L2** : transcription factor 7-like 2  
**TCS** : tissu cérébral sain



**TERT** : telomerase reverse transcriptase

**TGF  $\beta$**  : transforming growth factor beta

**THBS1** : thrombospondin 1

**TMZ** : témozolomide

**TRIP11** : thyroid hormone receptor interactor 11

**TSHR** : thyroid stimulating hormone receptor

**TT** : tissu tumoral solide de glioblastome

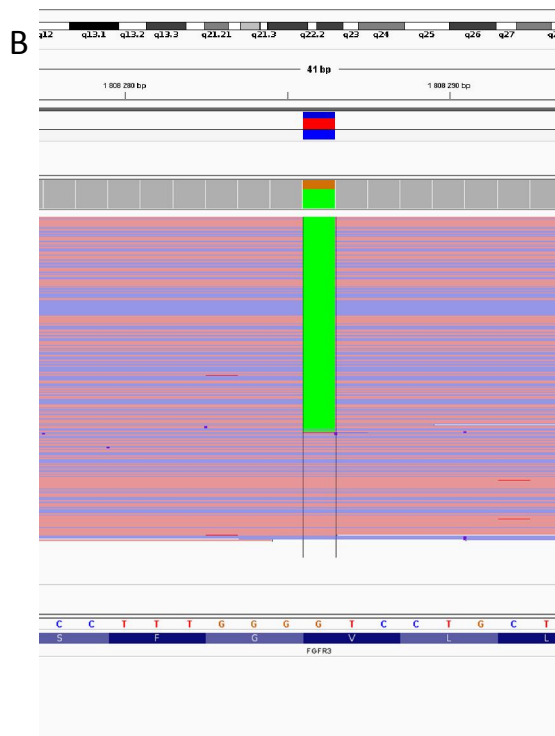
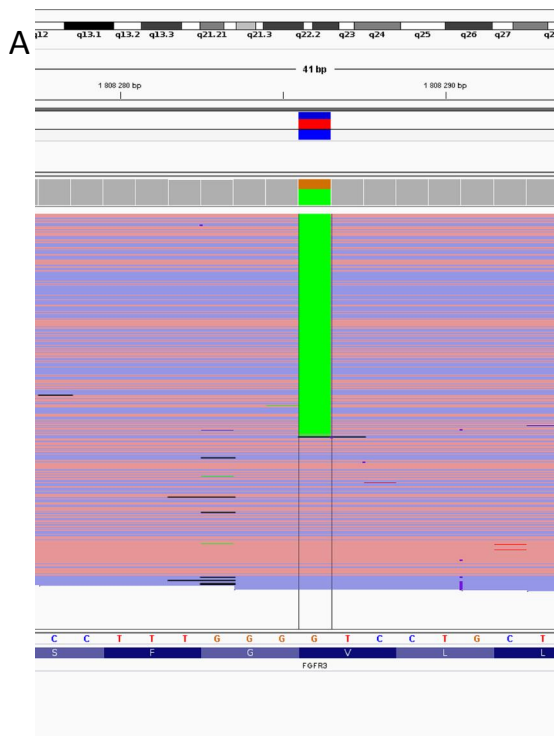
**VCF** : variant calling format

**VEGFA** : vascular endothelial growth factor A

**XRCC2** : X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 2



**Annexe 2. Aperçu du variant de *FGFR3* pour le cas n°4, sur le logiciel IGV (integrative genomics viewer) : en A, variant dans le TT (61% de fréquence allélique) et en B, variant dans le CTI (68% de fréquence allélique).**



## Serment d'Hippocrate

---

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

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

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

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

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





## ÉTUDE GÉNOMIQUE COMPARATIVE DU TISSU TUMORAL SOLIDE ET DES CELLULES TUMORALES INFILTRANTES DE GLIOBLASTOME

---

Les glioblastomes sont des tumeurs intracérébrales de haut grade de malignité et de mauvais pronostic, notamment du fait de leur nature infiltrante qui limite les possibilités d'exérèse. Ils sont constitués d'un contingent tumoral solide (TT) et d'un contingent de cellules tumorales isolées infiltrant le parenchyme cérébral (CTI). L'objectif de l'étude est de comparer le profil génétique de ces deux contingents. Du tissu correspondant à chacun des deux contingents a été sélectionné sur coupe histologique, pour 13 patients. Une fois l'ADN génomique extrait à partir de matériel fixé au formol et inclus en paraffine, une étude par séquençage haut débit, avec le Comprehensive Cancer Panel a été réalisée. Les variants ont été classés en comparant leur fréquence allélique dans le TT, le CTI et également par rapport au tissu sain (sang), nous permettant de définir un statut somatique ou non. Environ 20 variants par tumeur, considérés comme somatiques ont été observés dans les deux contingents, pour lesquels seule la fréquence allélique varie. C'est le cas pour *FGFR3* et *GATA2* qui présentent un même variant somatique dans 7 et 4 tumeurs respectivement. Aucune tumeur n'avait de mutation d'*IDH*. Une amplification de l'*EGFR* a été observée dans 67% des cas. La présence de variants à des fréquences comparables dans le TT et le CTI pourrait indiquer qu'ils seraient soit plus présents dans les cellules tumorales infiltrantes soit liés aux cellules non tumorales. Des mutations de *FGFR3* et *GATA2* décrites dans d'autres tumeurs, semblent indiquer qu'ils jouent un rôle dans la prolifération et l'adhésion cellulaire. Ces données restent à confirmer par d'autres méthodes de séquençage.

---

Mots-clés : glioblastome, NGS, *FGFR3*, *GATA2*, cellules tumorales infiltrantes

## GENOMIC COMPARATIVE STUDY OF SOLID TUMOR TISSUE AND INFILTRATING TUMOR CELLS IN GLIOBLASTOMA

---

Glioblastomas are malignant cerebral tumors with poor prognosis, in part due to their invasive nature which limits surgical resection. These tumors are formed of two components: solid tumor tissue (TT) on one hand and infiltrating tumor cells (ITC), which invade brain parenchyma, on the other hand. The aim of the study is to compare genetic alterations between these two components. Formaldehyde fixed paraffin-embedded samples from the two tumor tissues were selected, and analysed by next generation sequencing, targeting Comprehensive Cancer Panel genes for 13 patients. Variants observed were compared on allelic frequency between the two tumor tissues and with non tumor tissue (blood) to define somatic status or not. About 20 somatic variants per tumor were identified in both tumor tissues. Only allelic frequency changed between the two components. The same somatic variant was detected in both tumor tissues for *FGFR3* and *GATA2* in 7 and 4 tumors respectively. Variants found at similar allelic frequencies in TT and ITC seems to indicate they may mostly be present in infiltrating tumor cells or linked to surrounding non tumor cells. Our study didn't identify any *IDH* mutation. *EGFR* amplification was noticed in 67% of our cases. Mutations of *FGFR3* and *GATA2* described in other tumors would mean that these genes are involved in proliferation and cellular adhesion. These results have to be confirmed by other sequencing analyses.

---

Keywords : glioblastoma, NGS, *FGFR3*, *GATA2*, infiltrating tumor cells

