

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

ECOLE DOCTORALE DE BIOLOGIE-SANTE

THESE DE DOCTORAT

En vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences
de l'Université des Sciences et Technologies de Lille

Présentée par

EMILIE LE RHUN

Recherche de Biomarqueurs Protéiques dans le But de Réaliser une Classification
Moléculaire des Gliomes : Etude GLIOMIC

Soutenue à Lille, le 24 avril 2017

Devant le jury composé de :

Rapporteur	Florence Lefranc	Professeur (Université Libre de Bruxelles)
Rapporteur	Serge Nataf	Professeur (Université de Lyon 1)
Examineur	Isabelle Fournier	Professeur (Université de Lille 1)
Examineur	Pierre Bedossa	Professeur (Université Paris Diderot)
Directeur de thèse	Michel Salzet	Professeur (Université de Lille 1)
Co-encadrant	Nicolas Reyns	Professeur (Université de Lille 2)

REMERCIEMENTS

Cette thèse est l'aboutissement d'une longue aventure pleine de vie et d'enthousiasme. Elle est aussi le début d'une nouvelle aventure que je souhaite longue, trépidante et enrichissante tant sur le plan humain que scientifique.

Je remercie vivement Michel Salzet, Professeur à l'Université de Lille 2 et directeur du laboratoire Protéomique, Réponse Inflammatoire, Spectrométrie de Masse (PRISM), U1192, pour avoir accepté d'encadrer mes travaux de recherche, d'assurer la direction de cette thèse, de m'avoir fait profiter de son expérience et de ses précieux conseils, et également pour son énergie tout au long de ces trois années.

Je remercie chaleureusement Nicolas Reyns, Professeur dans le Département de Neurochirurgie au CHRU de Lille, pour son encadrement, pour l'aide, le soutien et les conseils apportés tout au long de ces années et pendant la rédaction de cette thèse.

Je tiens à remercier Florence Lefranc, Professeur de Neurochirurgie à l'Université Libre de Bruxelles, et Serge Nataf, Professeur à l'Université de Lyon 1 pour l'intérêt porté à mon travail et pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse.

Je remercie également Isabelle Fournier, Professeur à Lille 2 et Pierre Bedossa, Professeur à l'Université Paris Diderot, qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'examiner mon travail.

Mes remerciements chaleureux vont au Professeur Claude Alain Maurage, au Docteur Fabienne Escande et au Docteur Florence Renaud pour leur aide, leur disponibilité et leur soutien indispensable dans ce travail. Sans eux, rien n'était possible.

Je remercie le Professeur Jean-Paul Lejeune et le Docteur François Dubois pour m'avoir autorisée et encouragée à passer cette thèse.

Je tiens également à remercier le Professeur Luc Taillandier du CHU de Nancy et le Dr Ahmed Idbah de l'Hôpital La Pitié Salpêtrière qui ont été membres des

Comités de Suivi de Thèse et ont pu aider à améliorer le projet par leurs précieux conseils.

Mes remerciements vont également au Docteur Maxence Wisztorski et au Docteur Marie Duhamel du Laboratoire PRISM qui ont toujours été disponibles pour répondre à mes interrogations tout au long de ces trois années.

J'exprime ma profonde reconnaissance pour l'aide qu'ils m'ont apportée tout au long de cette aventure doctorale à mes amis et collègues neurochirurgiens au CHRU de Lille :

Le Docteur Fahed Zairi

Le Docteur Marc Baroncini

Le Docteur Marie Charlotte Tetard

Je remercie l'ensemble des personnes qui aident chaque jour à la mise en œuvre du projet au CHRU de Lille: Valérie Grégoire, Clotilde Descarpentries, Sylvie Janas, Matthieu Chabel, Bertrand Acart, Patrick Gelé, ainsi que l'équipe des Assistants de Recherche Clinique Investigation de neuro-oncologie: Marie Domagala, Camille Gombert, Pascal Bechu, et l'équipe de la Promotion de la Recherche Clinique au CHRU: Malek Dib, Idriss Benbouta.

Je tiens à remercier Madame Laurence Fofana et Monsieur François Delcroix, pour leur patience et leur grande disponibilité tout au long de ces années.

Mes remerciements vont également au Professeur Michael Weller de l'Hôpital Universitaire de Zurich qui m'a accueillie dans son laboratoire afin de continuer à développer mes connaissances, tout en permettant de mener à bien ce projet de thèse. Je remercie également le Docteur Emese Szabo, mon superviseur au Laboratoire de Zurich ainsi que Birthe Lohmann.

Je remercie tous les amis qui m'ont soutenue depuis toutes ces années et qui sont toujours là pour m'encourager dans mes projets.

Enfin, je remercie ma famille pour toute l'aide, le soutien et l'écoute pour chaque nouvelle aventure de la vie.

AVERTISSEMENT

Cette thèse et la thèse du Docteur Marie Duhamel (Unité PRISM INSERM U1192) ayant été réalisées en partenariat dans le cadre du projet soutenu par le SIRIC ONCOLILLE, certains résultats ou figures sont communs aux deux thèses.

PUBLICATIONS - COMMUNICATIONS

Publications reliées au travail de thèse

Articles

Le Rhun E*, Duhamel M*, Wisztorski M, Gimeno JP, Zairi F, Escande F, Reyns N, Kobeissy F, Maurage CA, Salzet M, Fournier I. Evaluation of non-supervised MALDI mass spectrometry imaging combined with microproteomics for glioma grade III classification. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Nov 24. pii: S1570-9639(16)30249-7.

Communications affichées

Duhamel M, **Le Rhun E**, Wisztorski M, Zairi F, Escande F, Maurage CA, Fournier I, Reyns N, Salzet M. Classification of high-grade glioma using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry imaging (MALDI MSI): interim results of the GLIOMIC study. European Association of Neuro-Oncology (EANO). Mannheim, Allemagne, 12-16 octobre 2016

Duhamel M, **Le Rhun E**, Wisztorski M, Zairi F, Maurage CA, Fournier I, Reyns N, Salzet M. Classification of high grade glioma using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging (MALDI MSI) : interim results of the GLIOMIC study. Institut Thématique Multi-Organismes (ITMO). Montpellier, France, 15-16 décembre 2015

Le Rhun E*, Duhamel M*, Wisztorski M, Zairi F, Maurage CA, Fournier I, Reyns N, Salzet M. Classification of high grade glioma using matrix-assisted laser desorption / ionization mass spectrometry imaging (MALDI MSI): interim results of the GLIOMIC study. METB 07. Society for Neuro Oncology (SNO). San Antonio, USA, 17-22 Novembre 2015

Autres communications et publications acceptées depuis l'inscription en thèse en septembre 2014

Conférences sur invitation et communications orales

- **En lien avec la thématique des gliomes**

Le Rhun E. Safety and tolerability of novel immunotherapies. European Society of Medical Oncology (ESMO) Asia. Singapore, Malaisie, 16-19 décembre, 2016

Le Rhun E. Challenges in Radiotherapy for Patients with Brain Glioma - Management of side effects of radiotherapy and chemotherapy during and after treatment. European School of Oncology- European Association of Neuro-Oncology (ESO-EANO) Masterclass in Neuro-Oncology. Lugano, Suisse, 15-17 septembre 2016

Le Rhun E. Approche moléculaire et biomarqueurs des gliomes. Journée scientifique de l'axe « Résistance » du Site Intégré de Recherche sur le Cancer (SIRIC) ONCOLille. Lille, France, 13 septembre 2016

Wick W, Brandes AA, Gorlia T, Bendszus M, Sahm F, Taal W, Taphoorn M, Domont J, Idbaih A, Campone M, Clement PM, Stupp R, Fabbro M, **Le Rhun E**, Dubois F, Musmeci D, Klein M, Platten M, Weller M, Golfopoulos V, van den Bent M. EORTC 26101 trial phase III trial exploring the combination of bevacizumab and lomustine in patients with first progression of a glioblastoma. American Society of Clinical Oncology (ASCO). Chicago, Illinois, USA, 3-7 juin 2016

Le Rhun E. Update in the medical treatment of high grade glioma. 4^e journée du Site Intégré de Recherche sur le Cancer (SIRIC) de Montpellier. Montpellier, France, 20 mai 2016

Le Rhun E. Actualités en neuro-oncologie: journées de neuro-oncologie. Centre Hospitalier Régional et Universitaire (CHRU) Lille. Lille, France, 15 décembre 2015

Le Rhun E. Gliomes et Thrombose : congrès annuel de l'Association de Neuro-

Oncologie d'Expression Française (ANOCEF). Amiens, France, 19 juin 2015

Le Rhun E. Actualités en neuro-oncologie. Symposium Côte d'Opale. Bergues, France, 17 octobre 2015

Le Rhun E. Gliadel en Neuro-oncologie. Symposium Neurochirurgie. Centre Hospitalier Régional et Universitaire (CHRU) Lille. Lille, France, 5 octobre 2015

Le Rhun E. Dispositif NOVOTTF. Réunion Association pour la Recherche sur les Tumeurs Cérébrales. Centre Hospitalier Régional et Universitaire (CHRU) Lille. Lille, France, 25 septembre 2015

Le Rhun E. Thérapies ciblées en neuro-oncologie, 13^e Journée Arrageoise de Cancérologie. Arras, France. 18 avril 2015

Le Rhun E, Taillibert S, Zairi F, Boulanger T, Farre I, Deligny N, Bachelot T, Bonnetterre J. Prolonged response with bevacizumab + navelbine as third line of treatment of breast cancer leptomeningeal metastases: a case report- ePoster Discussion (BM-18), Society for Neuro-oncology (SNO). Miami, USA, 13-17 novembre 13-17, 2014

Le Rhun E. Conservative treatment in elderly glioblastoma. European Association of Neuro-Surgery (EANS). Prague, République Tchèque, 17 octobre 2014

- **Autres**

Le Rhun E. Leptomeningeal metastases: Systemic versus intrathecal chemotherapy. European Society of Medical Oncology (ESMO). Madrid, Espagne, 8-12 septembre 2017

Le Rhun E. Challenges for standardization of diagnosis and treatment of leptomeningeal metastasis: an update on the LANO and EANO-ESMO efforts.

World Federation of Neuro Oncology Societies (WFNOS). Zurich, Suisse, 4-7 mai 2017

Le Rhun E. Leptomeningeal metastasis from solid tumors: EANO-ESMO recommendations and management in the routine practice. World Federation of Neuro Oncology Societies (WFNOS). WFNOS Zurich nursing day. Zurich, Suisse, 4-7 mai 2017

Le Rhun E. Diagnostic et traitement des métastases leptoméningées. Grand colloque de Neurosciences Cliniques. Lausanne, Suisse, 26 avril 2017

Le Rhun E. Prise en charge de la maladie cérébro-méningée. 4^e Journées d'échanges en pathologie mammaire (JEM4). Paris, France, 24-25 mars 2017

Le Rhun E. EANO-ESMO recommendations for the diagnosis and treatment of leptomeningeal metastasis from solid tumors. CNIO Frontiers Meetings. Primary and secondary brain tumors. Madrid, Espagne, 19-22 février 2017

Le Rhun E. Intrathecal chemotherapy for leptomeningeal metastasis. European cancer congress (ECCO). Amsterdam, Hollande, 27-30 janvier 2017

Le Rhun E. Targeted Therapy for Meningioma in Europe. Society for Neuro-Oncology (SNO). Scottsdale, Arizona, USA, 17-20 novembre 2016

Le Rhun E. Diagnosing and treating leptomeningeal metastasis across Europe: a web-based survey. Annual Brain Metastases Research and Emerging Therapy Conference. Marseille, France, 30 septembre-01 octobre 2016

Le Rhun E. Chemobrain. 3^e Journées du Centre Oscar Lambret (JOCOL)-sein, «Cancer du sein traité et qualité de vie, ou comment gérer les conséquences de nos traitements au quotidien». Lille, France, 24 septembre 2016

Le Rhun E. Diagnosing and treating leptomeningeal metastasis across Europe: a web-based survey. 17th Biennial Canadian Neuro-Oncology (CNO) Meeting. Toronto,

Canada, 9-11 juin 2016

Le Rhun E. Pièges diagnostiques clinico-radiologiques des méningites tumorales. Journées de Neurologie de Langue Française (JNLF). Nantes, France, 05-08 avril 2016

Le Rhun E. Nouveautés dans la prise en charge des méningites carcinomateuses. Workshop métastases cérébrales. Les questions d'actualité. Paris, France, 27 novembre 2015

Le Rhun E. Méningites tumorales des cancers du sein. Symposium Neuro-oncologie Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Grenoble. Grenoble, France, 26 novembre 2015

Le Rhun E. Métastases cérébrales, présentation du référentiel ANOCEF, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Brest. Brest, France, 20 mars 2015

Le Rhun E. Résultats de l'étude Mnémosyne. Réseau Onconeurotox, Centre Hospitalier Régional et Universitaire (CHRU) Lille. Lille, France, 16 décembre 2014

Le Rhun E. Référentiel ANOCEF métastases cérébrales, Première journée annuelle du réseau régionale de cancérologie Onco Nord-Pas de Calais. Lille, France. 20 novembre 2014

Le Rhun E. Prise en charge des métastases du système nerveux central. Bayonne, France, 02 octobre 2014

Articles référencés dans Pubmed

- **En lien avec la thématique des gliomes**

Weller M, van den Bent M, Tonn JC, Stupp R, Preusser M, Cohen-Jonathan-Moyal E, Henriksson R, **Le Rhun E**, Balana C, Chinot O, Bendszus M, Reijneveld JC, Dhermain F, French P, Marosi C, Watts C, Oberg I, Pilkington G, Baumert BG, Taphoorn MJB, Hegi M, Westphal M, Reifenberger G, Soffietti R, Wick W. EANO guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. (In press Lancet Oncology)

Le Rhun E, Perry JR. Vascular complications in glioma patients. *Handb Clin Neurol.* 2016;134:251-66

Le Rhun E, Taillibert S, Chamberlain MC. Current Management of Adult Diffuse Infiltrative Low Grade Gliomas. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2016 Feb;16(2):15

Taillibert S, **Le Rhun E**, Chamberlain MC. Tumor treating fields: a new standard treatment for glioblastoma? *Curr Opin Neurol.* 2015 Dec;28(6):659-64

Le Rhun E, Chamberlain MC, Zairi F, Delmaire C, Idbaih A, Renaud F, Maurage CA, Grégoire V. Patterns of response to crizotinib in recurrent glioblastoma according to ALK and MET molecular profile in two patients. *CNS Oncol.* 2015;4(6):381-6

Taillibert S, Taillandier L, **Le Rhun E**. Venous thrombosis in patients with high-grade glioma. *Curr Opin Oncol.* 2015 Nov;27(6):516-21

Le Rhun E, Taillibert S, Chamberlain MC. Anaplastic glioma: current treatment and management. *Expert Rev Neurother.* 2015 Jun;15(6):601-20

Le Rhun E, Taillibert S, Chamberlain MC. The future of high-grade glioma: Where we are and where are we going. *Surg Neurol Int.* 2015 Feb 13;6(Suppl 1):S9-S44

Turpin A, Sharif A, Stoven L, Blond S, Maurage CA, **Le Rhun E**. [The stem cell niche

in glioblastoma: from fundamental aspects to targeted therapies]. Bull Cancer. 2015 Jan;102(1):24-33

- **Autres**

Kuchcinski G, **Le Rhun E**, Cortot AB, Drumez E, Duhal R, Lalisse M, Dumont J, Lopes R, Pruvo JP, Leclerc X, Delmaire C. Dynamic contrast-enhanced MR imaging pharmacokinetic parameters as predictors of treatment response of brain metastases in patients with lung cancer. Eur Radiol. 2017 Feb 16.

Remon J, **Le Rhun E**, Besse B. Leptomeningeal carcinomatosis in non-small cell lung cancer patients: A continuing challenge in the personalized treatment era. Cancer Treat Rev. 2017 Feb;53:128-137.

Le Rhun E, Taillibert S, Chamberlain MC. Neoplastic Meningitis Due to Lung, Breast, and Melanoma Metastases. Cancer Control. 2017 Jan;24(1):22-32.

Zairi F, Aboukais R, **Le Rhun E**, Marinho P, Maurage CA, Lejeune JP. Close follow-up after discontinuation of cyproterone acetate: a possible option to defer surgery in patients with voluminous intracranial meningioma. J Neurosurg Sci. 2017 Feb;61(1):98-101.

Chamberlain M, Junck L, Brandsma D, Soffietti R, Rudà R, Raizer J, Boogerd W, Taillibert S, Groves MD, **Le Rhun E**, Walker J, van den Bent M, Wen PY, Jaeckle KA. Leptomeningeal metastases: a RANO proposal for response criteria. Neuro Oncol. 2016 Dec 29

Frappaz D, Sunyach MP, **Le Rhun E**, Blonski M, Laurence V, Bonneville Levard A, Loiseau H, Meyronnet D, Callies A, Laigle-Donadey F, Faure Conter C; au nom de l'ANOCEF, GO-AJA, de la SFCE. [Adolescent and Young Adults (AYAS) brain tumor national Web conference. On behalf of ANOCEF, GO-AJA and SFCE societies]. Bull Cancer. 2016 Dec;103(12):1050-1056

Zairi F, Aboukais R, **Le Rhun E**, Marinho P, Maurage CA, Lejeune JP. Close follow-up after discontinuation of cyproterone acetate: a possible option to defer surgery in patients with voluminous intracranial meningioma. *J Neurosurg Sci*. 2017 Feb;61(1):98-101

Le Rhun E, Galanis E. Leptomeningeal metastases of solid cancer. *Curr Opin Neurol*. 2016 Dec;29(6):797-805

Taillibert S, **Le Rhun E**, Chamberlain MC. Chemotherapy-Related Neurotoxicity. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2016 Sep;16(9):81.

Reich M, Girard E, **Le Rhun E**. Breast leptomeningeal metastasis recurrence presenting as a manic episode. *Palliat Support Care*. 2016 Jun 27:1-4

Le Rhun E, Dhermain F, Vogin G, Reyns N, Metellus P. Radionecrosis after stereotactic radiotherapy for brain metastases. *Expert Rev Neurother*. 2016 Aug;16(8):903-14

Le Rhun E, Taillibert S, Chamberlain MC. Systemic therapy for recurrent meningioma. *Expert Rev Neurother*. 2016 Aug;16(8):889-901

Simon N, Vasseur M, Chauffert B, Taillandier L, **Le Rhun E**. [Systemic therapies administration for adult patients in neuro-oncology: The standards of the Association of the neuro-oncologists of French expression (ANOCEF)]. *Bull Cancer*. 2016 Apr;103(4):400-1

Cortés J, Dieras V, Ro J, Barriere J, Bachelot T, Hurvitz S, **Le Rhun E**, Espié M, Kim SB, Schneeweiss A, Sohn JH, Nabholz JM, Kellokumpu-Lehtinen PL, Taguchi J, Piacentini F, Ciruelos E, Bono P, Ould-Kaci M, Roux F, Joensuu H. Afatinib alone or afatinib plus vinorelbine versus investigator's choice of treatment for HER2-positive breast cancer with progressive brain metastases after trastuzumab, lapatinib, or both (LUX-Breast 3): a randomised, open-label, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2015 Dec;16(16):1700-10

Lévy C, Allouache D, Lacroix J, Dugué AE, Supiot S, Campone M, Mahe M, Kichou S, Leheurteur M, Hanzen C, Dieras V, Kirova Y, Campana F, **Le Rhun E**, Gras L, Bachelot T, Sunyach MP, Hrab I, Geffrelot J, Gunzer K, Constans JM, Grellard JM, Clarisse B, Paoletti X. REBECA: a phase I study of bevacizumab and whole-brain radiation therapy for the treatment of brain metastasis from solid tumours. *Ann Oncol*. 2015 Nov;26(11):2359

Tu Q, Wu X, **Le Rhun E**, Blonski M, Wittwer B, Taillandier L, De Carvalho Bittencourt M, Faure GC. CellSearch technology applied to the detection and quantification of tumor cells in CSF of patients with lung cancer leptomeningeal metastasis. *Lung Cancer*. 2015 Nov;90(2):352-7

Furtner J, Schöpf V, Seystahl K, **Le Rhun E**, Rudà R, Roelcke U, Koeppen S, Berghoff AS, Marosi C, Clement P, Faedi M, Watts C, Wick W, Soffietti R, Weller M, Preusser M. Kinetics of tumor size and peritumoral brain edema before, during, and after systemic therapy in recurrent WHO grade II or III meningioma. *Neuro Oncol*. 2016 Mar;18(3):401-7

Le Rhun E, Delbeuck X, Lefeuvre-Plesse C, Kramar A, Skrobala E, Pasquier F, Bonnetterre J. A phase III randomized multicenter trial evaluating cognition in post-menopausal breast cancer patients receiving adjuvant hormone therapy. *Breast Cancer Res Treat*. 2015 Aug;152(3):569-80

Metellus P, Bialecki E, **Le Rhun E**, Dhermain F. Neurosurgical and radiosurgical decision making in brain metastasis patients in the area of targeted therapies? *Chin Clin Oncol*. 2015 Jun;4(2):19

Ursu R, Taillibert S, Banissi C, Vicaut E, Bailon O, **Le Rhun E**, Guillamo JS, Psimaras D, Tibi A, Sacko A, Marantidou A, Belin C, Carpentier AF. Immunotherapy with CpG-ODN in neoplastic meningitis: A phase I trial. *Cancer Sci*. 2015 Sep;106(9):1212-8. doi: 10.1111/cas.12724

Zairi F, **Le Rhun E**, Bertrand N, Boulanger T, Taillibert S, Aboukais R, Assaker R, Chamberlain MC. Complications related to the use of an intraventricular access device

for the treatment of leptomeningeal metastases from solid tumor: a single centre experience in 112 patients. *J Neurooncol.* 2015 Sep;124(2):317-23

Aboukais R, Zairi F, **Le Rhun E**, Lejeune JP, Devos P, Reyns N. Radiation-associated grade 2 meningiomas: A nine patient-series and review of the literature. *Clin Neurol Neurosurg.* 2015 Sep;136:10-4

Sakji-Dupré L, **Le Rhun E**, Templier C, Desmedt E, Blanchet B, Mortier L. Cerebrospinal fluid concentrations of vemurafenib in patients treated for brain metastatic BRAF-V600 mutated melanoma. *Melanoma Res.* 2015 Aug;25(4):302-5

Le Rhun E, Taillibert S, Boulanger T, Zairi F, Bonneterre J, Chamberlain MC. Prolonged Response and Restoration of Functional Independence with Bevacizumab plus Vinorelbine as Third-Line Treatment for Breast Cancer-Related Leptomeningeal Metastases. *Case Rep Oncol.* 2015 Feb 12;8(1):72-7

Aboukais R, Zairi F, Lejeune JP, **Le Rhun E**, Vermandel M, Blond S, Devos P, Reyns N. Grade 2 meningioma and radiosurgery. *J Neurosurg.* 2015 May;122(5):1157-62

Le Rhun E, Dhermain F, Noël G, Reyns N, Carpentier A, Mandonnet E, Taillibert S, Metellus P; ANOCEF. Association des neuro-oncologues d'expression française. [ANOCEF guidelines for the management of brain metastases]. *Cancer Radiother.* 2015 Feb;19(1):66-71

Taillibert S, Conforti R, Bonneterre J, Bachelot T, **Le Rhun E**, Bernard-Marty C. [Systemic treatment of brain metastases from breast cancer]. *Cancer Radiother.* 2015 Feb;19(1):36-42

Taillandier L, **Le Rhun E**, Métellus P, Mornex F, Mazon JJ. [Editorial]. *Cancer Radiother.* 2015 Feb;19(1):1-2

Le Rhun E, Mateus C, Mortier L, Dhermain F, Guillot B, Grob JJ, Lebbe C, Thomas M, Jouary T, Leccia MT, Robert C. [Systemic treatment of melanoma brain metastases]. *Cancer Radiother.* 2015 Feb;19(1):48-54

Métellus P, Tallet A, Dhermain F, Reyns N, Carpentier A, Spano JP, Azria D, Noël G, Barlési F, Taillibert S, **Le Rhun E**. [Global brain metastases management strategy: a multidisciplinary-based approach]. *Cancer Radiother*. 2015 Feb;19(1):61-5.

Delmaire C, Savatovsky J, Boulanger T, Dhermain F, **Le Rhun E**, Métellus P, Gerber S, Carsin-Nicole B, Petyt G. [Brain metastases imaging]. *Cancer Radiother*. 2015 Feb;19(1):16-9

Le Rhun E, Taillibert S, Blonski M, Jouniaux Delbez N, Delgadillo D, Taillia H, Auquier P, Belin C, Bonnetain F, Varin D, Tallet A, Taillandier L. [Supportive care, cognition and quality of life in brain metastases]. *Cancer Radiother*. 2015 Feb;19(1):55-60

Taillibert S, **Le Rhun E**. [Epidemiology of brain metastases]. *Cancer Radiother*. 2015 Feb;19(1):3-9

Lévy C, Allouache D, Lacroix J, Dugué AE, Supiot S, Campone M, Mahe M, Kichou S, Leheurteur M, Hanzen C, Dieras V, Kirova Y, Campana F, **Le Rhun E**, Gras L, Bachelot T, Sunyach MP, Hrab I, Geffrelet J, Gunzer K, Constans JM, Grellard JM, Clarisse B, Paoletti X. REBECA: a phase I study of bevacizumab and whole-brain radiation therapy for the treatment of brain metastasis from solid tumours. *Ann Oncol*. 2014 Dec;25(12):2351-6

Zairi F, Ouammou Y, **Le Rhun E**, Aboukais R, Blond S, Vermandel M, Deken V, Devos P, Reyns N. Relevance of gamma knife radiosurgery alone for the treatment of non-small cell lung cancer brain metastases. *Clin Neurol Neurosurg*. 2014 Oct;125:87-93

Taillibert S, **Le Rhun E**, Chamberlain MC. Intracranial cystic lesions: a review. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2014 Sep;14(9):481

Aboukais R, Zairi F, Reyns N, **Le Rhun E**, Touzet G, Blond S, Lejeune JP. Surgery followed by radiosurgery: a deliberate valuable strategy in the treatment of intracranial meningioma. *Clin Neurol Neurosurg*. 2014 Sep;124:123-6

Chamberlain M, Soffiatti R, Raizer J, Rudà R, Brandsma D, Boogerd W, Taillibert S, Groves MD, **Le Rhun E**, Junck L, van den Bent M, Wen PY, Jaeckle KA. Leptomeningeal metastasis: a Response Assessment in Neuro-Oncology critical review of endpoints and response criteria of published randomized clinical trials. *Neuro Oncol.* 2014 Sep;16(9):1176-85

Articles soumis

Le Rhun E, Weller M, Brandsma D, Van den Bent M, de Azambuja E, Henriksson R, Boulanger T, Peters S, Watts C, Wick W, Wesseling P, Ruda R, Preusser M. EANO ESMO Recommendations for the Diagnosis and Treatment of Leptomeningeal Metastasis from Solid Tumors

Pace A, Dirven L, Koekkoek JAF, Golla H, Fleming J, Rudà R, Marosi C, **Le Rhun E**, Grant R, Oliver K, Oberg I, Bulbeck H, Rooney AG, Henriksson R, Pasmán HRW, Oberndorfer S, Weller M, Taphoorn MJB, on behalf of the European Association of Neuro-Oncology Task Force on Palliative Care. EANO guidelines for palliative care in adult glioma patients

Soffiatti R, Abacioglu U, Baumert B, Combs S, Kinhult S, Kros JM, Marosi C, Metellus P, Radbruch A, Villa Freixa SS, Brada M, Carmine Carapella, Preusser M, **Le Rhun E**, Rudà R, Tonn JC, Weber D, Weller M. Diagnosis and treatment of brain metastases from solid tumors : Guidelines from the European Association of Neuro-Oncology (EANO)

Wolpert F, Weller M, Berghoff AS, Rushing E, Füreder LM, Petyt G, Leske H, Andratschke N, Regli L, Neidert MC, Stupp R, Dummer R, Frauenfelder T, Roth P, Reyns N, Kaufmann PA, Preusser M, **Le Rhun E**. ¹⁸F-fluorodesoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET/CT) for the detection of the primary lesion and staging in brain metastasis (BM) patients with cancer of unknown primary site (CUPS)

Le Rhun E, Rudà R, Devos P, Hoang-Xuan K, Brandsma D, Pérez Segura P, Soffiatti R, Weller M. Diagnosis and treatment patterns for patients with leptomeningeal metastasis from solid tumors across Europe

Furet E, Feugeas JP, Miquel C, Leboeuf C, El Bouchtaoui M, Beytout C, Bertheau P, **Le Rhun E**, Bonnetterre J, Janin A, Bousquet G. Increased risk of brain metastases in women with breast cancer and p16 expression in metastatic lymph nodes

Tallet A, Dhermain F, Noël G, **Le Rhun E**, Kirova Y. Safety of concurrent brain irradiation and targeted therapy or immune checkpoint blockade

Durand B, Zairi F, Boulanger T, Bonnetterre J, Mortier L, **Le Rhun E**. Chemical meningitis related to intra-CSF liposomal cytarabine

Girard E, Lacour A, Randane N, Templker C, Dziwnizl V, Desmedt E, **Le Rhun E**, Mortier L. Occurrence of Vismodegib-induced cramps in the treatment of basal cell carcinoma: a prospective study in 30 patients

Chapitres d'ouvrages nationaux et internationaux

- **En lien avec la thématique des gliomes**

Le Rhun E, Perry JR. Vascular Complications in Glioma Patients. Chapter 15 for Handbook of Clinical Neurology (third series) volume on gliomas. Berger MS, Weller M (eds), Elsevier Press 2016

Reyns N, Dhermain F, Sarrazin T, **Le Rhun E**. Radiochirurgie et radiothérapie stéréotaxique des tumeurs cérébrales. Encyclopédie Médicochirurgicale [17-235-A-30] 2014

- **Autres**

Le Rhun E, Taillibert S, Chamberlain MC. Neurological Complications of Breast Cancer and its Treatment. Neurological Complications of Specific Malignancies. Third edition of Cancer Neurology in Clinical Practice. Schiff D, Kesari S, Wen P (eds) en révision

Le Rhun E, Taillibert S, Chamberlain MC. Neuroradiology of Leptomeningeal Metastases. Chapter 57 for Handbook of Neuro-Oncology Neuroimaging, Herbert B. Newton. Second Edition. 2016

Taillibert S, **Le Rhun E**, Chamberlain MC. Neoplastic Meningitis. Chapter 8 for Handbook of Neuro-Oncology Neuroimaging, Herbert B. Newton. Second Edition. 2016

Communications affichées

- **En lien avec la thématique des gliomes**

Le Rhun E, Parrott T, Estok T, Gorlia T, Golfopoulos V, Weller M. EORTC 1608: a phase 1b study of TG02, an oral cyclin-dependent kinase 9/5 inhibitor, in elderly patients with newly diagnosed glioblastoma stratified by MGMT promoter methylation status. ACTR-30. Society for Neuro-Oncology (SNO). Scottsdale, Arizona, USA, 17-20 novembre 2016

Parrot T, Weller M, Estok T, **Le Rhun E**. TG02, an oral CDK inhibitor, demonstrates activity in glioma models: EORTC Brain Tumor Group Conducts Phase 1b study (STEAM / EORTC 1608). European Association of Neuro-Oncology (EANO). Mannheim, Allemagne, 12-16 octobre 2016

Wick W, Stupp R, Gorlia T, Bendszus M, Sahm F, Bromberg J, Brandes AA, Vos M, Domont J, Idbaih A, Campone M, Clement PM, Fabbro M, **Le Rhun E**, Dubois F,

Musmeci D, Platten M, Golfinopoulos V, van den Bent MJ. Phase II part of EORTC study 26101: the sequence of bevacizumab and lomustine in patients with first recurrence of a glioblastoma. J Clin Oncol 34, 2016 (suppl; abstr 2019). American Society of Clinical Oncology (ASCO). Chicago, Illinois, USA, 3-7 juin 2016

Leroy HA, Delmaire C, **Le Rhun E**, Caron S, Assaker R, Lejeune JP, Reyns N. Impact of intraoperative MRI on surgical outcome in patients with gliomas. SURG 18. Society for Neuro-Oncology (SNO). San Antonio, Texas, USA, 17-22 novembre 2015

Wick W, Stupp R, Gorlia T, Bendszus M, Sahm F, Bromberg JE, Brandes AA, Vos MJ, Domont J, Idbaih A, Frenel JS, Clement PM, Fabbro M, **Le Rhun E**, Dubois F, Musmeci D, Platten M, Golfinopoulos V, Van Den Bent MJ. Phase II part of EORTC study 26101: The sequence of bevacizumab and lomustine in patients with first recurrence of a glioblastoma. J Clin Oncol 34, 2016 (suppl; abstr 2019). American Society of Clinical Oncology (ASCO). Chicago, Illinois, USA, 3-7 juin 2016

Le Rhun E, Taillandier L, Cajfinger F, Vedrine L, Farge D, Devos P, Taillibert S; Management of venous thromboembolic events (VTE) in glioblastoma (GBM) patients: An ANOCEF (Association des Neuro-Oncologues d'Expression Française) Group study. J Clin Oncol 33, 2015 (suppl; abstr e13008). American Society of Clinical Oncology (ASCO). Chicago, Illinois, USA, 29 mai – 2 juin 2015

Berteloot AS, **Le Rhun E**, Briand G, Dobbelaere P, Sabbah M, Girard-Buttaz I. Oligoastrocytome associé à une acidurie l-2-hydroxyglutarique. Journées de Neurologie de Langue Française (JNLF). Marseille, France, 31 mars–03 Avril 2015

- **Autres**

Capelle C, Scalbert C, Lepsant P, Templier C, Desmedt E, **Le Rhun E**, Mortier L. Les anti-PD1 font leurs preuves sur les métastases cérébrales. Journées de Dermatologie de Paris (JDP) 2016/ABS-1592. Paris, France, 6-10 déc 2016

Le Rhun E, Weller M, Soffietti R, Ruda R, for the European Leptomeningeal

Metastasis Initiative. Diagnosing and treating leptomeningeal metastasis across Europe: a web-based survey. BMET-18. Society for Neuro-Oncology (SNO). Scottsdale, Arizona, USA, 17-20 novembre 2016

Le Rhun E, Gregoire V, Girard E, Baranzelli A, Descarpentries C, Maurage CA, Cortot A, Escande F. Determination of the EGFR and T790M statuses in the cerebro-spinal fluid of EGFR mutated non-small cell lung cancer. BMET-31. (Society for Neuro-Oncology (SNO). Scottsdale, Arizona, USA, 17-20 novembre 2016

Le Rhun E, Weller M, Soffiatti R, Ruda R, for the European Leptomeningeal Metastasis Initiative. Diagnosing and treating leptomeningeal metastasis across Europe: a web-based survey. European Association of Neuro-Oncology (EANO). Mannheim, Allemagne, 12-16 octobre 2016

Le Rhun E, Weller M, Soffiatti R, Ruda R, for the European Leptomeningeal Metastasis Initiative. Diagnosing and treating leptomeningeal metastasis across Europe: a web-based survey. Canadian Neuro-Oncology (CNO) Meeting. Toronto, Canada, 9-11 juin 2016

Mailliez A, Girard E, Boulanger T, Giraud C, Maes P, Bonnetterre J, **Le Rhun E**. Response to adotrastuzumab emtansine according to RANO criteria in central nervous system metastases of HER2 positive breast cancers. J Clin Oncol 34, 2016 (suppl; abstr 605). American Society of Clinical Oncology (ASCO). Chicago, Illinois, USA, 3-7 juin 2016

Sahebjam S, **Le Rhun E**, Kulanthaivel P, Turner K, Klise S, Wang T, Tolaney S. Assessment of concentrations of abemaciclib and its major active metabolites in plasma, CSF, and brain tumor tissue in patients with brain metastases secondary to hormone receptor positive (HR+) breast cancer. J Clin Oncol 34, 2016 (suppl; abstr 526). American Society of Clinical Oncology (ASCO). Chicago, Illinois, USA, 3-7 juin 2016

Frappaz D, Chinot OL, Meyronet D, Garin G, Laigle-Donadey F, **Le Rhun E**, Bonneville – Levard A, Frenel JS, Idbaih A, Gourmelon C, Homisco K, Hottinger A, Remir E, Laure

Jaouen L, Arbault C, Cropet C, PéroI D. MEVITEM: A European, randomized, open-label Phase I/II of vismodegib in combination with temozolomide versus temozolomide alone in adult patients with recurrent/ refractory medulloblastoma presenting an activation of the Sonic Hedgehog pathway. J Clin Oncol 34, 2016 (suppl; abstr TPS2083). American Society of Clinical Oncology (ASCO). Chicago, Illinois, USA, 3-7 juin 2016

Le Rhun E, Zairi F, Boulanger T, Barrière J, Fabbro M, Wallet J, Bonnetterre J, Taillibert S. Results of the interim safety analysis of the DEPOSEIN trial in leptomeningeal metastases from breast cancer. BMET 25. Society for Neuro-Oncology (SNO). San Antonio, Texas, USA, 17-22 novembre 2015

Darmon I, Mathieu Boone M, Blonski M, **Le Rhun E**, Taillandier T, Chauffert B, Coutte A. Upfront treatment with temozolomide and bevacizumab (TEMOBEVA) in patients with bulky, multifocal glioblastoma and/or with severe neurological impairment. J Clin Oncol 33, 2015 (suppl; abstr e13037). American Society of Clinical Oncology (ASCO). Chicago, Illinois, USA, 29 mai – 2 juin 2015

Cortés J, Dieras V, Ro J, Barriere J, Bachelot T, Hurvitz S, **Le Rhun E**, Espie M, Kim SB, Schneeweiss A, Hyuk Sohn J, Nabholz JM, Kellokumpu-Lehtinen PL, Taguchi L, Piacentini F, Ciruelos E, Bono P, Ould-Kaci M, Roux F, Joensuu H. Randomized Phase II trial of afatinib alone or with vinorelbine versus investigator's choice of treatment in patients with HER2-positive breast cancer with progressive brain metastases after trastuzumab and/or lapatinib-based therapy: LUXBreast 3 ; P5-19-07. San Antonio Breast Cancer Symposium. San Antonio, Texas, USA, 9-13 décembre 2014

Chamberlain MC, Junck L, Brandsma D, Soffiatti R, Jeffrey J. Raizer JJ, Roberta Ruda R, Willem Boogerd W, Taillibert S, Groves MD, **Le Rhun E**, Bromberg JE, Van Den Bent MJ, Wen PY, Jaeckle KA. Leptomeningeal metastases: A RANO proposal for response criteria. J Clin Oncol 32, 2014 (suppl; abstr e13019). American Society of Clinical Oncology (ASCO). Chicago, Illinois, USA, 30 mai-3 juin 2014

CONFERENCES ET COURS SUIVIS

2017

- Centro Nacional de Investigaciones (CNIO) Frontiers Meetings. Primary and secondary brain tumors. Madrid, Espagne, 19-22 février 2017
- Congrès European cancer congress (ECCO). Amsterdam, Hollande, 27-30 janvier 2017

2016

- Congrès European Society of Medical Oncology (ESMO) Asia. Singapore, Malaisie, 16-19 décembre, 2016
- Congrès Society for Neuro-Oncology (SNO). Scottsdale, Arizona, USA, 17-20 novembre 2016
- Journée éducationnelle l'Association des Neuro-Oncologues d'Expression Française (ANOCEF). Paris, France, 30 novembre 2016
- Congrès European Association of Neuro-Oncology (EANO). Mannheim, Allemagne, 12-16 octobre 2016
- Congrès 4th Annual Brain Metastases Research and Emerging Therapy Conference Brain, Marseille, France, 30 septembre- 1^{er} octobre 2016
- Conférence Journées du Centre Oscar Lambret (JOCOL) sénologie, Lille, France- 24 septembre 2016
- European School of Oncology - European Association of Neuro-Oncology (ESO-EANO) Masterclass in Neuro-Oncology - European Neuro-oncology : challenges in radiotherapy for patients with gliomes. Lugano, Suisse, 15-17 septembre 2016
- Congrès annuel ANOCEF de l'Association des Neuro-Oncologues d'Expression Française (ANOCEF). Bruxelles, Belgique, 17-18 juin 2016
- Congrès 17th Biennial Canadian Neuro-Oncology (CNO) Meeting. Toronto, Canada, 9-11 juin 2016
- Congrès American Society of Clinical Oncology Annual Meeting (ASCO). Chicago, Illinois, USA 3-7 juin 2016
- Journées de Neurologie de Langue Française (JNLF). Nantes, France, 5-8 avril 2015
- 4^e journée du Site Intégré de Recherche sur le Cancer (SIRIC) de Montpellier. Montpellier, France, 20 mai 2016
- Conférence Neurotox Lille, France, 12 janvier 2016

2015

- Journée éducationnelle de l'Association des Neuro-Oncologues d'Expression Française (ANOCEF). Paris, France, 16 décembre 2015
- Symposium Neurochirurgie : Tumeurs cérébrales primitives. Lille, France, 15 décembre 2015
- Congrès Society for Neuro-oncology (SNO). San Antonio, Texas, USA, 19-22 novembre 2015
- 6th Workshop du Club Français de Neuro-Immunologie. Paris, France, 06 novembre 2015
- Actualités en neurologie, Symposium de la Côte d'Opale. Bergues, France, 17 octobre 2015
- Réunion EORTC Brain tumor group (BTG). Bruxelles, Belgique, 09 octobre 2015
- Congrès 5th Annual Brain Metastases Research and Emerging Therapy Conference Brain. Marseille, France, 2-3 octobre 2015
- Congrès Annuel de l'Association des Neuro-Oncologues d'Expression Française (ANOCEF), Amiens, France, 19 – 20 juin 2015
- Conférence Onconeurotox. Lille, France, 9 juin 2015
- Congrès American Society of Clinical Oncology Annual Meeting (ASCO). Chicago, Illinois, USA, 29 mai – 2 juin 2015
- 13^e journée Arrageoise de Cancérologie. Arras, France, 18 avril 2015

2014

- Congrès EGAM (EORTC Groups Annual Meeting), Bruxelles, Belgique, 12 mars 2015
- Conférence Onconeurotox. Lille, France, 16 décembre 2014
- Première journée annuelle du Réseau Régional de Cancérologie Onco Nord Pas de Calais. Lille, France, 20 novembre 2014
- Congrès Society for Neurooncology (SNO), 19th Society for NeuroOncology, Annual scientific Meeting and Education da Society For Neurooncology. Miami, Floride, USA, 13 -16 novembre 2014
- Congrès European Congress of Neurosurgery (EANS), 15th European Congress of Neurosurgery. Prague, République Tchèque, 12 -17 octobre 2014
- Congrès European Association for Neuro-oncology (EANO): 11th European Association for Neuro-oncology Meeting. Turin, Italie, 9 -12 octobre 2014

- Congrès 4th Annual Brain Metastases Research and Emerging Therapy Conference
Brain. Marseille, France, 19 et 20 septembre 2014

ENSEIGNEMENT

Enseignement réalisé depuis l'inscription en thèse en septembre 2014

- **Cours internes DES**

- DES Oncologie: Lille, Strasbourg, Paris, en moyenne 4 à 6 heures par an
Traitements systémiques des gliomes, traitements systémiques des métastases cérébrales, prise en charge des métastases cérébrales, prise en charge des méningites tumorales, soins de support en neuro-oncologie

- DES Neurologie: Lille, Paris, en moyenne 4 à 6 heures par an
Traitements systémiques des gliomes, traitements systémiques des métastases cérébrales, prise en charge des métastases cérébrales, prise en charge des méningites tumorales

- DES Neuroradiologie: Lille, 6 heures en 2016
Tumeurs gliales ; Métastases du système nerveux central

- **Diplôme Inter-Universitaire (DIU) et Diplôme Universitaire (DU)**

- DIU Neuro-oncologie médecin session 2014-2016
Méningites tumorales, Paris 20 mai 2016 (30 minutes)
Métastases leptoméningées des tumeurs solides, Nancy, 25 février 2016 (1 heure)
Corrections de copies et participation aux évaluations orales en 2016

- DIU Neuro-oncologie IDE sessions 2014-2015, 2015-2016, 2016-2017

Coordination du DIU infirmier de neuro-oncologie avec Stéphanie Cartalat-Carel (Lyon), Luc Taillandier (Nancy) et Khê Hoang Xuan (Paris) depuis sa création en 2013

Métastases parenchymateuses et méningées, Paris 24 mars 2017 (1 heure)
Epidémiologie et symptomatologie clinique des tumeurs du système nerveux central, Paris, 23 septembre 2016 (1 heure)

Métastases parenchymateuses et méningées, Paris, 25 mars 2016 (1 heure)
Epidémiologie et symptomatologie clinique des tumeurs du système nerveux central,
Paris 25 septembre 2015 (1 heure)
Métastases parenchymateuses et méningées, Paris 27 mars 2015 (1 heure)
Epidémiologie et symptomatologie clinique des tumeurs du système nerveux central,
Paris, 17 octobre 2014 (1 heure)
Métastases parenchymateuses et méningées, Paris 28 mars 2014 (1 heure)

Préparation des questions d'examen depuis la création du DIU
Corrections de copies depuis la création du DIU, évaluations orales

- DU Oncopsychologie - Lille

Tumeurs cérébrales malignes de l'adulte. Point de vue du neuro-oncologue, Lille, 05
décembre 2014 (1 heure)

- DU Neuropsychologie clinique - Lille

Tumeurs cérébrales - conséquences du traitement des cancers. Lille 05 avril 2016 (3
heures)

- **Autres cours et formations**

- IDE de la Clinique Neurologique du CHRU de Lille, du Centre Oscar Lambret de Lille,
de Neurologie du CH de Valenciennes
Tumeurs cérébrales, Atteintes méningées métastatiques (en moyenne 1 à 2 heures
par an par établissement en 2014, 2015, 2016)

- Cours manipulateurs radiologie

Généralités sur les tumeurs cérébrales, Lycée de l'Escaut, Valenciennes, 20 avril 2015
(2 heures)

Généralités sur les tumeurs cérébrales, Lycée de l'Escaut, Valenciennes, 14 mars
2016 (2 heures)

- Cours assistants de recherche clinique

Méningites tumorales, Centre Oscar Lambret, Lille, 17 mai 2016 (2 heures)

Généralités sur les tumeurs cérébrales, Neuro-oncologie, CHRU Lille, Lille, 24 juin 2016 (2 heures)

- Organisation des réunions Neurotox

2 réunions de 1h30 par an soutenues par le Centre Régional de Référence en Cancérologie (CRRC) et le Réseau Onco-Nord-Pas de Calais (ONCONPDC)

ENCADREMENT

- Thèses et mémoires

- Encadrement de thèse de médecine

Encadrement de thèse de médecine (Nicolas Bertrand (Oncologie médicale, Université Lille 2 Droit et Santé) – Single Nucleotide Polymorphism et métastases du système nerveux central des cancers du sein (en cours)

- Encadrement de mémoire de DIU de neuro-oncologie

Efficacité des traitements systémiques dans la prise en charge des métastases cérébrales de cancer du sein : Sarah Oinino, interne DES oncologie (en cours)

- Articles et posters

- Formes familiales de gliomes : Enora Vauléon, interne DES oncologie (article en cours)

- Analyse rétrospective d'une cohorte de mélanomes en évolution méningée métastatique : Sarah Oinino, interne DES oncologie (article en cours)

- Chemical meningitis related to intra-CSF liposomal cytarabine : Benedicte Durand, interne DES oncologie (article soumis)

- Turpin A, Sharif A, Stoven L, Blond S, Maurage CA, Le Rhun E. [The stem cell niche in glioblastoma: from fundamental aspects to targeted therapies]. Bull Cancer. 2015 Jan;102(1):24-33: Anthony Turpin, interne DES oncologie (article publié)

- Sakji-Dupre L, Blanchet B, Carole Templier C, Desmedt E, Mortier L, Le Rhun E. Intra cerebrospinal fluid concentrations of Vemurafenib in melanome patients presenting with CNS metastases. BM-30. SNO (Society for Neuro Oncology), Miami, Floride, USA. 13-17 novembre 2014 (poster présenté en congrès international)

- Encadrement des internes pour des communications orales lors de congrès

- Durand B, Zairi F, Boulanger T, Mortier L, Le Rhun E. Méningite chimique après injection de cytarabine liposomale : discussion à propos d'un cas. Congrès ANOCEF

(Association de Neuro-Oncologie d'Expression Française), Amiens, France, 19-20 juin 2015

- Monfilliette A, Mailliez A, Zairi F, Boulanger T, Rodrigues I, Dubois F, Bonnetterre J, Le Rhun E. Réponse prolongée de plus de 4 ans d'une méningite métastatique de cancer du sein. Congrès ANOCEF (Association de Neuro-Oncologie d'Expression Française), session IDE, Amiens, France, 19-20 juin 2015

- Jury de thèse de médecine et de masters et thèses en recherche clinique
- Jury de thèse de médecine Grégory Kuchinski (Neuroradiologie, Université Lille 2 Droit et Santé), Lille le 13.10.14
- Jury Master Institut Lillois d'Ingénierie de la Santé (ILIS) Idriss Benbouta, Lille 16 octobre 2015
- Jury Thèse Institut Lillois d'Ingénierie de la Santé (ILIS) Justine Hache, Lille 3 octobre 2014

- Encadrement des internes au cours des stages pratiques

TABLE DES MATIERES

Remerciements.....	2
Avertissement.....	6
Publications – Communications.....	7
Conférences et cours suivis.....	25
Enseignement.....	29
Encadrement.....	33
Table des matières.....	36
Liste des figures.....	40
Liste des tableaux.....	43
Liste des abréviations.....	45
Problématique et objectifs de la thèse.....	50
Généralités.....	54
I. Les gliomes	55
1. Epidémiologie des gliomes.....	55
2. Diagnostic des gliomes.....	58
3. Pronostic des gliomes.....	59
4. Classifications OMS 2007 et OMS 2016 des gliomes.....	61
5. Principaux types de gliomes de la classification OMS 2016 étudiés au laboratoire.....	65
5.1 Gliomes astrocytaires avec mutation IDH.....	65
5.2 Gliomes oligodendriaux avec mutation IDH et co-délétion 1p/19q.....	65

5.3 Glioblastomes IDH non mutés.....	66
5.4 Glioblastomes IDH mutés.....	66
6. Classifications des glioblastomes.....	67
7. Prise en charge des gliomes.....	68
7.1 Chirurgie.....	68
7.2 Radiothérapie.....	69
7.3 Pharmacothérapie.....	70
7.4 Traitements symptomatiques.....	71
8. Suivi des gliomes.....	71
9. Recommandations spécifiques pour les principales entités tumorales étudiées au sein du laboratoire.....	72
9.1 Astrocytome diffus, OMS grade II.....	72
9.2 Astrocytome anaplasique, OMS grade III.....	73
9.3 Oligodendrogliomes, IDH-mutés avec codélétion 1p/19q, OMS grade II.....	74
9.4 Oligodendrogliomes anaplasiques, IDH-mutés avec codélétion 1p/19q, OMS grade III.....	74
9.5 Glioblastomes, OMS grade IV.....	75
II. Intérêt de la spectrométrie de masse dans l'analyse des tumeurs.....	78
1. Généralités.....	78
2. Courte description des principales approches de séparation des protéines...79	
2.1 Techniques de gels 2D (2D-PAGE).....	79
2.2 Analyse shotgun ou analyse LC-MS/MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry).....	80
2.3 Imagerie par spectrométrie de masse MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation) MSI (Mass Spectrometry Imaging) et microprotéomique.....	80
3. Protéomique des gliomes.....	91
3.1 Lignées cellulaires et modèles animaux.....	91
3.2 Fluides.....	92
3.3 Echantillons tumoraux.....	94

Classification protéomique des gliomes par analyse en spectrométrie de masse MALDI couplée à la microprotéomique : Etude GLIOMIC - Recherche de Biomarqueurs Protéiques dans le But de Réaliser une Classification Moléculaire des Gliomes.....	102
I. Présentation de l'étude GLIOMIC.....	103
1. Logistique de l'étude.....	103
2. Objectifs de l'étude.....	103
3. Critères d'évaluation de l'étude.....	105
4. Critères d'inclusion.....	106
5. Nombre de participants et analyse statistique.....	107
6. Description du déroulement général de l'étude.....	108
7. Données recueillies dans le cadre du protocole GLIOMIC.....	109
8. Lettre d'information et consentements pour les patients.....	113
II. Résultats de l'analyse préliminaire sur les gliomes anaplasiques.....	122
1. Description des résultats.....	122
2. Article « Evaluation of non-supervised MALDI mass spectrometry imaging combined with microproteomics for glioma grade III classification ».....	134
3. Conclusion.....	134
III. Résultats de l'analyse des glioblastomes.....	135
1. Données cliniques, histologiques et de biologie moléculaire.....	135
1.1 Flow chart.....	135
1.2 Analyses histologiques morphologiques et immunohistochimiques, et de biologie moléculaire.....	136
1.3 Résultats.....	138
2. Données de l'analyse en spectrométrie de masse.....	144
2.1 Analyse des lipides.....	144
2.2 Analyse des protéines.....	151
3. Conclusion.....	154
Discussion et perspectives.....	155
Références.....	161

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Distribution des tumeurs malignes du système nerveux central par histologie (adapté de Ostrom et al., 2015)

Figure 2 : Distribution des gliomes du système nerveux central par sous-types histologiques (adapté de Ostrom et al., 2015)

Figure 3 : Age médian au moment du diagnostic de tumeur cérébrale (adapté de Ostrom et al., 2015, CBTRUS)

Figure 4 : Recommandations EANO de prise en charge des gliomes (adapté de Weller et al., 2017, in press)

Figure 5 : Diagramme des différentes approches en protéomique (adapté de Niclou et al., 2010)

Figure 6 : Les deux modes d'analyse par spectrométrie de masse MALDI sur échantillons tissulaires

Figure 7 : Stratégie expérimentale de l'imagerie MALDI

Figure 8 : Analyses statistiques d'images de coupes d'adénocarcinomes pancréatiques contenant des zones de tissu insulinémique et sain

Figure 9 : Identification de REG- α comme biomarqueur du cancer de l'ovaire

Figure 10 : Imagerie MALDI de tissu du cancer de la prostate : Classification hiérarchique des spectres obtenus pour chaque zone histologique de la coupe de tissu

Figure 11: Stratégie de micro-extraction pour l'identification des molécules par micro-injection liquide de la surface de l'échantillon

Figure 12 : Données histologiques et MALDI MSI des 5 cas de gliomes anaplasiques de la cohorte de classification

Figure 13 : Analyse de microprotéomique shotgun des 5 cas de gliomes anaplasiques de la cohorte de classification

Figure 14 : Représentation des réseaux de protéines impliquées dans le groupe 3 après analyse par biologie systémique

Figure 15 : Protéines identifiées par protéomique shotgun à partir d'exosome de rat C6 traité 6h à la trypsine.

Figure 16 : Validation de la classification sur les 5 patients additionnels

Figure 17 : Flow chart de l'étude GLIOMIC

Figure 18 : Segmentation individuelle des 19 échantillons de glioblastomes de l'étude GLIOMIC analysés en imagerie MSI des lipides

Figure 19 : Exemple de corrélation entre segmentation individuelle et lame histologique sur 10 échantillons de glioblastome de l'étude GLIOMIC analysés en imagerie MSI des lipides

Figure 20 : Analyses de co-localisation des ions en segmentation individuelle

Figure 21 : Segmentation globale des 10 échantillons de glioblastome de l'étude GLIOMIC analysés en imagerie MSI des lipides

Figure 22 : Segmentation individuelle des peptides des 9 échantillons tumoraux de glioblastome

Figure 23 : Segmentation globale des peptides des 9 échantillons tumoraux de glioblastome

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Taux de survie à 1 an, 2 ans, 5 ans et 10 ans des principaux types tumoraux étudiés au laboratoire (d'après les données du CBTRUS)

Tableau 2 : Médianes de survie des glioblastomes dans différents essais cliniques

Tableau 3 : Anomalies génétiques, épigénétiques et chromosomiques fréquentes dans les astrocytomes et les oligodendrogliomes diffus de l'adulte (adapté de Reifenberger et al., 2016)

Tableau 4 : Principales études de protéomiques réalisées sur des échantillons tumoraux humains

Tableau 5 : Description des données histologiques et des marqueurs moléculaires des 48 cas enregistrés dans l'étude GLIOMIC

Tableau 6 : Données de biologie moléculaire des échantillons regroupés selon les caractéristiques des lipides en segmentation globale

LISTE DES ABREVIATIONS

A : astrocytome
ACNU : nimustine
ACVR1 : Activin A receptor, type I
ADN : acide désoxyribonucléique
ALA : 5-aminolevulinic acid
AMPK : AMP-activated protein kinase
ANOCEF : Association de Neuro-Oncologie d'Expression Française
ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé
ASCO : American Society of Clinical Oncology
ATRX : alpha-thalassemia/mental retardation X-linked
AYAS : adolescent and young adults
BCNU : carmustine
BM : brain metastasis
BMI1 : Polycomb complex protein
BTG-EORTC : Brain Tumor Group of European Organization for Research and Treatment of Cancer
CATNON : Phase III Trial on Concurrent and Adjuvant Temozolomide Chemotherapy in Non-1p/19q Deleted Anaplastic Glioma. The CATNON Intergroup Trial
CBTRUS : Central Brain Tumor Registry of the United States
CCND1-3 : cyclin D1-3
CCNU : lomustine
CD4 : cluster de différenciation 4
CD8 : cluster de différenciation 8
CD44 : cluster de différenciation 44
CDK : Cyclin Dependent Kinase
p CHEK1 : phospho-Chk1
CHI3L1 (YKL-40) : Chitinase-3-like protein 1
CHRU : Centre Hospitalier Régional et Universitaire
CHU : Centre Hospitalier et Universitaire
CIC : homolog of Drosophila capicua
cIEF : capillary isoelectric focusing
CMC : carboxyméthylcellulose
CNIO : Centro Nacional de Investigaciones
CNO : Canadian Neuro-Oncology
CNS : Central Nervous System
CODEL : Phase III Randomized Study of RT vs. RT+TMZ vs. TMZ for Newly Diagnosed 1p/19q-Codeleted Anaplastic Oligodendroglial Tumors
Cox-2 : Cyclo-oxygénase 2
CRIP1 : Cysteine-rich protein 1
CRP : C-réactive protéine
CRRC : Centre Régional de Référence en Cancérologie
CUPS : cancer of unknown primary site
kDa : kilo Dalton
2D-DIGE : two-dimensional difference in gel electrophoresis
2DE : électrophorèse 2D
DES : Diplôme d'Etudes Spécialisées
DHB : 2,5-dihydroxybenzoic acid
DIU : Diplôme Inter-Universitaire
Dg : Diagnostic
DU : Diplôme Universitaire

EANO : European Association of Neuro-Oncology
EANS : European Association of Neuro-Surgery
ECCO : European cancer congress
ECOG : Eastern Cooperative Oncology Group
EFGR : epidermal growth factor receptor
EGFRvIII : Epidermal Growth Factor Receptor variant III
EORTC : European Organization for Research and Treatment of Cancer
ESI : Electro Spray Ionization
ESMO : European Society of Medical Oncology
ESO : European School of Oncology
EYA : Eyes absents proteins
F : féminin
FDG-PET/CT : ¹⁸F-fluorodesoxyglucose positron emission tomography computed tomography
FFPE : Formalin Fixed, Paraffin-Embedded
FGFR1 : Fibroblast growth factor receptor 1
FLAIR : fluid-attenuated inversion recovery
FTL : Ferritin Light Chain
FTMS : Fourier transformation mass spectrometry
FUBP : far-upstream binding protein
GAB2 : GRB2-associated-binding protein 2
GABRA1 : Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor Alpha1 Subunit
G-CIMP : glioma-CpG island methylation phenotype
GC-TOFMS : gas chromatography-time of flight mass spectrometry
GeLC-MS/ MS : gel electrophoresis followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry
GFAP : glial fibrillary acidic protein
GGN : German glioma network
GLIOMIC : Recherche de biomarqueurs protéiques dans le but de réaliser une classification moléculaire des gliomes
GNS : glioblastoma multiforme-derived neural stem
GO-AJA : Groupe Onco-hématologie, Adolescent et Jeunes Adultes
Gy : Gray
HCCA : matrice α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid
HER2 : Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HES : Hématoxyline Eosine Safran
histo : histologique
d-2-HG : d-2-hydroxyglutarate
ICPL : isotope-coded protein labeling;
IDE : infirmières diplômées d'état
IDH 1/2 : isocitrate dehydrogenase 1/2 gene
ID-RCB : Identifiant Recherches et Collections Biologiques
i.e. : itaque est
IEF : Isoelectric focusing
IGF-I : insulin-like growth factor-1
IGFBP-2 : Insulin-like growth factor-binding protein 2
IGFBP-3 : Insulin-like growth factor-binding protein 3
IGHG1 : immunoglobulin heavy constant gamma 1
ILIS : Institut Lillois d'Ingénierie de la Santé
INSERM : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
IT : ion trap
ITMO : Institut Thématique Multi-Organismes
ITO : Indium Tin Oxide (Oxyde Indium Etain)
iTRAQ : Isobaric tags for relative and absolute quantitation
JNLF : Journée de Neurologie de Langue Française
JOCOL : Journée du Centre Oscar Lambret
 α -KG : α -ketoglutarate
KRAS : Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LC : liquid chromatography
LC/MS-MS : liquid chromatography/mass spectrometry – mass spectrometry
LCR : liquide céphalo-rachidien
LOH : loss of heterozygosity
M : masculin
MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
MDM2 : murine double minute 2
MDM4 : murine double minute 4
MERTK : myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase
MGMT : O⁶-methylguanine DNA methyltransferase
MGMTp met : méthylation du promoteur MGMT
MS : mass spectrometry
MSI : Mass Spectrometry Imaging
nano-LC : nano liquid chromatography
nano-RPLC : nano-reversed phase liquid chromatography
NEDD9 : neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9
NEFL : Neurofilament light polypeptide
NF1 : neurofibromatose 1
p NFkB1 : Nuclear factor NF-kappa-B p105
NGS : next generation sequencing
NO : oxyde nitrique
NOA-04 : Randomized Phase III Study of Sequential Radiochemotherapy of Anaplastic Glioma With PCV or Temozolomide
NOS : Not otherwise specified
NR : non réalisé
NS : neural stem
O : oligodendrogliome
OA : oligoastrocytome
OLIG2 : Oligodendrocyte transcription factor
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
ONCONDPC : Réseau Onco-Nord-Pas de Calais
OPC : Oligodendrocyte Precursor
P53 : Tumor protein p53
2D-PAGE : 2 dimensional polyacrylamide gel electrophoresis
PCV : procarbazine, lomustine (aussi appelé CCNU) et vincristine
PDGF : Platelet-derived growth factor
PDGFR : Platelet-derived growth factor receptor
PDPN : podoplanin
PIK3R1 : phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)
PKNs : Protein kinases N
P3Kinase : phosphoinositide 3-kinase

PPMD1 : Protein phosphatase 1D
 POLCA : PCV Only for 1p/19q Codeleted Anaplastic gliomas
 PQBP1 : Polyglutamine binding protein-1
 PRISM : Protéomique, Réponse Inflammatoire. Spectrométrie de Masse
 PTEN : Phosphatase and TENsin homolog
 RANO : Response Assessment in Neuro-Oncology
 RELA : REL-associated protein
 RNA : acide ribonucléique
 mRNA : acide ribonucléique messenger
 hnRNPs : protéines heterogeneous nuclear ribonucleoproteins
 RPLC : nano-reversed phase liquid chromatography
 RPPA : reverse phase protein array
 RT : radiothérapie
 RTK I : receptor tyrosine kinase I
 RTK II : receptor tyrosine kinase II
 RTOG : Radiation Therapy Oncology Group
 S100 : protéine S100
 SCiLS : Social Care Information and Learning Service
 SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
 SELDI : Surface enhanced laser desorption ionization
 SELDI-ToF MS : Surface Enhanced Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry
 SFCE : Société Française De Lutte Contre Les Cancers Et Leucémies De L'enfant Et De L'Adolescent
 SIRIC : Sites de Recherche Intégrée sur le Cancer
 SLC12A5 : Solute Carrier Family 12 Member 5
 SMAD1 : Mothers against decapentaplegic homolog 1
 SNO : Society for Neuro-oncology
 SNX1 : Sorting Nexin 1
 p Src : Phospho-SRC
 STAT3 : Signal transducer and activator of transcription 3
 STUB1 : STIP1 homology and U-Box containing protein 1
 SYT1 : Synaptotagmin-1
 TCF12 : transcription factor 12
 TEP : tomographie par émission de positons
 TERT : telomerase reverse transcriptase
 TGM2 : Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2
 TMZ : Temozolomide
 TOF : Time of Flight spectrometry
 mTORC2 : Rapamycin Complex 2
 TTF : Tumor treating fields
 UPR : Unfolded Proteins Response
 VEGF : vascular endothelial growth factor
 VEGFR : vascular endothelial growth factor receptor inhibitor
 WFNOS : World Federation of Neuro Oncology Societies
 WHO : World Health Organization
 YWHAH : tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta

PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE LA THESE

Lors de la dernière mise à jour du rapport du Central Brain Tumor Registry of the United States (CBTRUS) publié en 2015 sur les données 2008-2012 (Ostrom et al., 2015), les tumeurs cérébrales primitives, bénignes et malignes confondues, avaient une incidence de 28.6 par 100 000 habitants par an. Les gliomes, ou tumeurs gliales, représentent les tumeurs cérébrales primitives les plus fréquentes. Les gliomes sont des pathologies incurables. La survie varie selon le sous-type tumoral, avec des taux de survie à 5 ans d'environ 48% pour les astrocytomes diffus, 28% pour les astrocytomes anaplasiques, 80% pour les oligodendrogliomes, 52% pour les oligodendrogliomes anaplasiques et 5% pour les glioblastomes. Une meilleure compréhension des mécanismes de ces tumeurs et de nouvelles pistes thérapeutiques sont essentielles afin d'améliorer le pronostic des patients.

Au démarrage de ce projet, la classification alors utilisée pour les gliomes était la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) 2007. Cette classification était basée sur les aspects histologiques des gliomes. Cependant, des discordances majeures intra et interobservateurs ont été mises en évidence pour le diagnostic histologique d'un même sous-type tumoral et notamment pour les gliomes diffus infiltrants (van den Bent, 2010). Par ailleurs, pour un même type et un même grade tumoral, des variations sont observées en terme de pronostic (van den Bent, 2010). En raison de ces limites, de nouvelles approches étaient nécessaires afin de réduire ce manque de reproductibilité et d'améliorer l'identification de facteurs pronostiques et de facteurs prédictifs de réponse aux traitements. Dans différentes études, il a été montré que la classification moléculaire était davantage corrélée au pronostic que la classification histologique (Cancer Genome Atlas Research Network 2015 ; Suzuki et al., 2015 ; Wiestler et al., 2014 ; Weller et al., 2015). Une nouvelle classification OMS intégrant ces marqueurs moléculaires aux données histologiques a finalement été établie en 2016 (Louis et al., 2016). Cette classification en sous-groupes plus homogènes permet de mieux guider les différentes options thérapeutiques.

La nouvelle classification OMS 2016 regroupe différentes entités tumorales définies à la fois par l'aspect histologique mais également par les anomalies observées en biologie moléculaire. Les biomarqueurs requis par la classification OMS 2016 sont les suivants : les mutations isocitrate déshydrogénase (IDH) 1/2, les codélétions 1p/19q, les mutations des histones H3F3A ou HIST1H3B/CK27M (H3-K27M) et les fusions

REL-associated protein (RELA) C11 ou f95. D'autres marqueurs peuvent cependant avoir un intérêt pour mieux caractériser les tumeurs. Les nouvelles recommandations EANO proposent une prise en charge des gliomes pour chacune des nouvelles entités définies (Weller et al., 2017, in press).

Il est donc important de continuer à améliorer les connaissances sur la physiopathologie des gliomes et de continuer à améliorer les systèmes de classification des gliomes afin de définir au mieux le pronostic et surtout la prise en charge thérapeutique. L'approche en protéomique pourrait permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Des études de protéomique ont déjà été réalisées avec des méthodologies différentes sur des lignées cellulaires, des modèles animaux, du sang, du liquide céphalo-rachidien ou des échantillons tumoraux. Jusqu'à présent principalement deux méthodologies ont été utilisées pour les études de protéomiques dans les gliomes : technique de profiling de protéines basée sur des gels et protéomique quantitative. Cependant, aucune de ces études n'a utilisé la méthodologie d'imagerie par spectrométrie de masse (MSI) couplée à l'analyse en microprotéomique. Cette méthode permet d'obtenir des imageries moléculaires des différentes classes de biomolécules obtenues à partir d'échantillons tissulaires sans utiliser d'anticorps ou de sonde marquée au niveau de différentes régions d'intérêt d'un échantillon tumoral (Franck et al., 2009).

Nous nous sommes intéressés dans cette thèse à la comparaison de la classification résultant des analyses non-supervisées obtenues d'après les données de MSI combinées aux données de clustering non supervisées pour mettre en évidence d'éventuels réseaux spécifiques, aux données cliniques et aux annotations de l'analyse histopathologique standard.

Le but de la thèse est d'identifier des marqueurs protéiques afin de réaliser une classification des gliomes dans le cadre de l'étude GLIOMIC (NCT02473484) et ainsi d'évaluer l'intérêt de la spectrométrie de masse couplée à la microprotéomique dans les gliomes anaplasiques et glioblastomes par rapport aux données de la classification OMS des gliomes.

L'objectif principal initial de l'étude GLIOMIC était d'évaluer la concordance

entre la classification OMS 2007 et la classification par spectrométrie de masse des gliomes (lipides, peptides, protéines). Suite à la présentation du projet au Comité de Suivi de Thèse du 29 septembre 2015, les objectifs de l'étude ont été modifiés. Il a été décidé de réaliser les analyses préliminaires sur 10 échantillons de gliomes anaplasiques afin de valider la faisabilité de la technique, puis de centrer l'étude sur l'analyse des échantillons de glioblastomes. Il paraît en effet plus logique d'isoler cette entité. Les glioblastomes sont les tumeurs cérébrales malignes primitives les plus fréquentes. Ils représentent un spectre de tumeurs biologiquement distinctes avec des différences dans l'âge de début, dans la localisation tumorale et le pronostic (Sturm et al., 2012 ; Brennan et al., 2013 ; Ceccarelli et al., 2016 ; Korshunov et al., 2015). Les analyses de l'expression de mRNA ont mis en évidence 4 sous-types distincts de glioblastomes: proneural, neural, classique et mésenchymateux (Verhaak et al., 2010). Cette classification génomique confirme une hétérogénéité au sein de ce groupe tumoral mais reste jusqu'à présent peu utilisée en routine clinique. Une nouvelle approche en protéomique semble intéressante dans ce groupe de tumeurs. Il est décidé lors de ce Comité de Suivi de Thèse de continuer à inclure en prospectif des patients présentant un nouveau diagnostic de glioblastome et correspondant aux autres critères d'inclusion, puis de compléter cette cohorte par une cohorte de 50 cas qui seront ensuite collectés de façon rétrospective après validation du projet par les autorités compétentes. La cohorte prospective permet de recueillir des échantillons de tumeurs selon des critères de qualité optimale et de sang, la cohorte rétrospective permettra d'atteindre plus rapidement les 100 échantillons tumoraux attendus dans cette étude. Par ailleurs, la publication d'une nouvelle classification OMS étant prévue en 2016, il a également été décidé d'utiliser cette nouvelle classification dans ce travail de thèse.

GENERALITES

I. Les gliomes

1. Epidémiologie des gliomes

Il existe plus de 100 types distincts de tumeurs cérébrales primitives du système nerveux central (Ostrom et al., 2015). Dans le cadre de la base de données du CBTRUS, la classification des tumeurs est la classification OMS 2007 bien que certains sous-types tumoraux soient toujours décrits selon la classification OMS 2000. Lors de la dernière mise à jour du rapport CBTRUS publié en 2015 sur les données 2008-2012 (Ostrom et al., 2015), les tumeurs cérébrales primitives, bénignes et malignes confondues, avaient une incidence de 28.6 par 100 000 habitants par an. Les gliomes ou tumeurs gliales, issues du tissu de soutien ou glie, représentent les tumeurs cérébrales primitives les plus fréquentes. On dénombre 2500 à 3000 nouveaux cas recensés par an en France (Viegas et al., 2011 ; Bauchet al., 2007). L'incidence annuelle est estimée à 6.6 pour 100 000 aux Etats Unis (Ostrom et al., 2015).

Les gliomes incluent les astrocytomes, les glioblastomes, les oligodendrogliomes, les épendymomes, les gliomes mixtes, les gliomes malins, les gliomes non spécifiques et quelques rares autres histologies dans la base de données du CBTRUS (Ostrom et al., 2015). Les gliomes représentaient 27% de toutes les tumeurs confondues et 80% des tumeurs malignes. Les glioblastomes représentaient 55% des gliomes, et sont ainsi la tumeur cérébrale maligne primitive la plus fréquente (**Figures 1 et 2**).

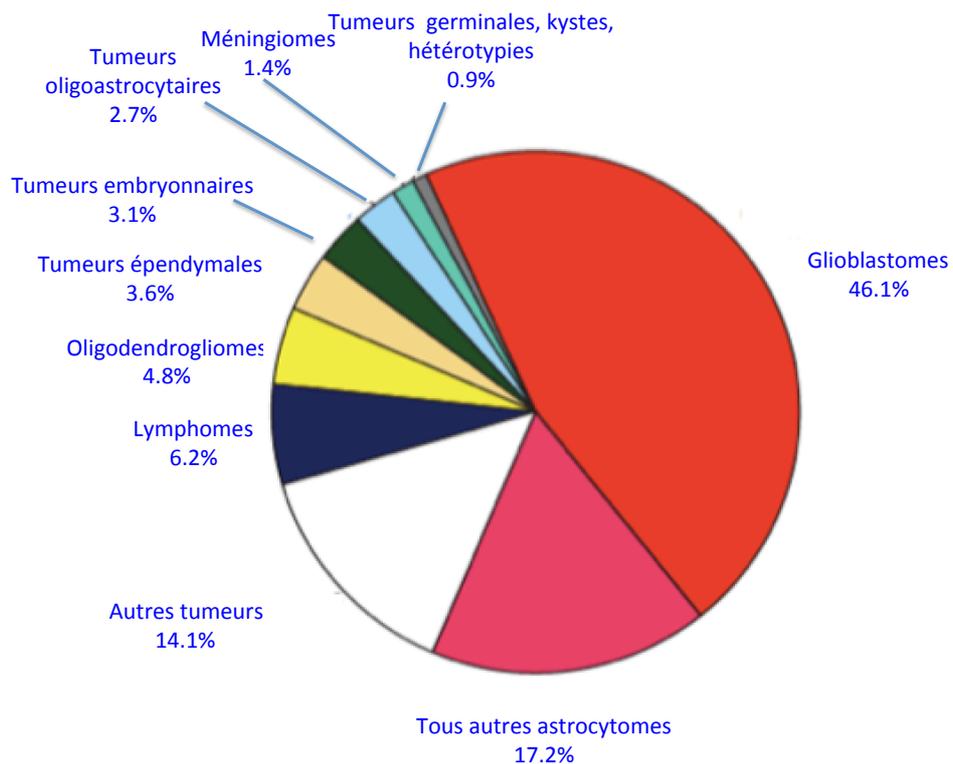


Figure 1 : Distribution des tumeurs malignes primitives du système nerveux central par histologie (adapté de Ostrom et al., 2015)

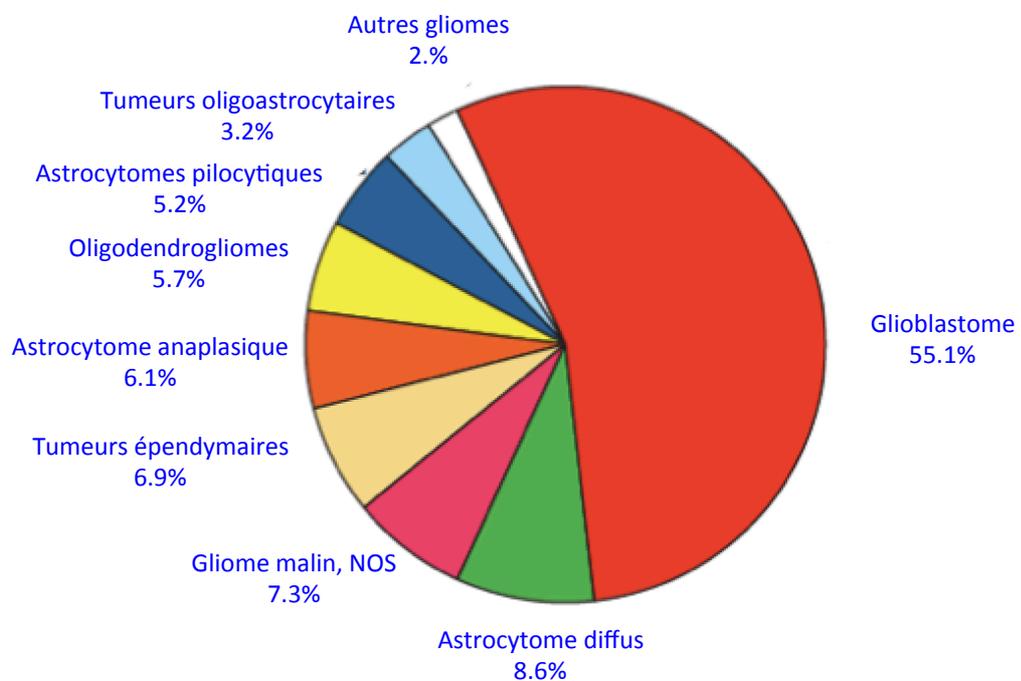


Figure 2 : Distribution des gliomes du système nerveux central par sous-types histologiques (adapté de Ostrom et al., 2015)

L'âge médian au moment du diagnostic de tumeur cérébrale varie selon le sous-type histologique (**Figure 3**). L'âge médian au moment du diagnostic de glioblastome est de 64 ans. On note une légère prédominance masculine pour la plupart des tumeurs cérébrales, en dehors des méningiomes et des tumeurs de la tige pituitaire.

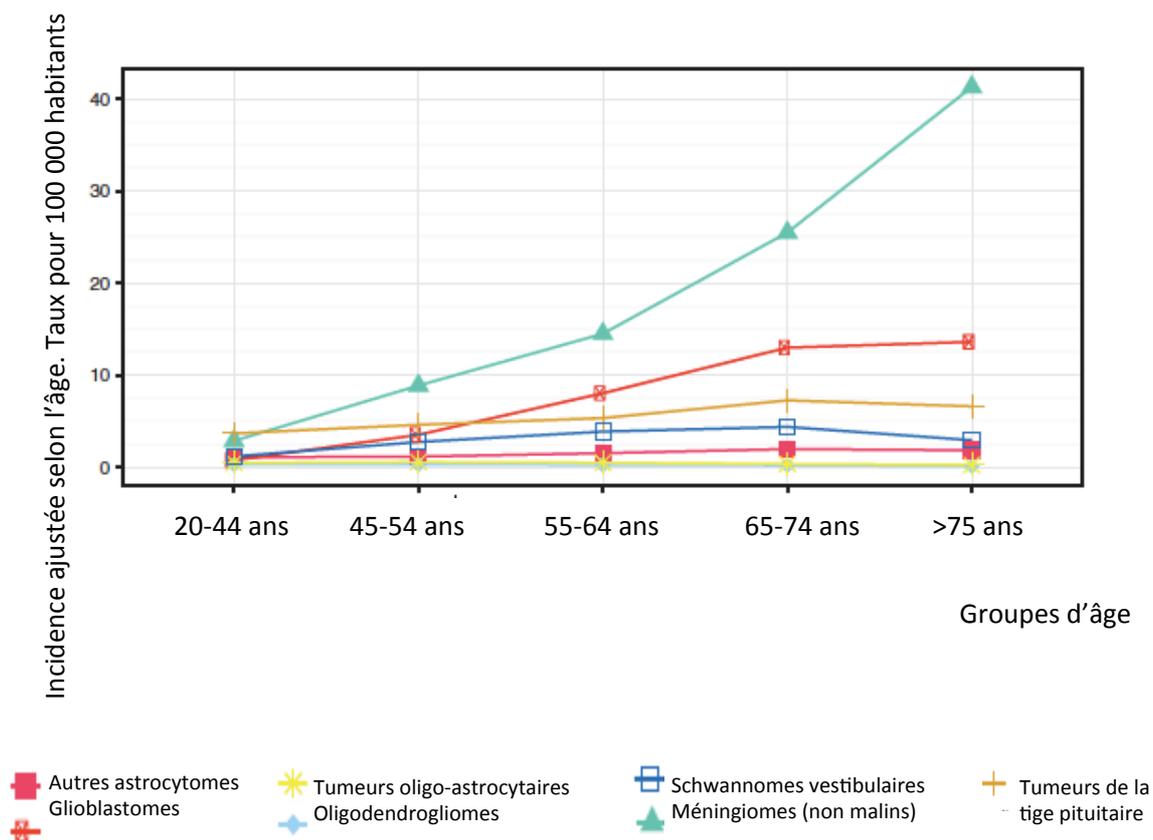


Figure 3 : Age médian au moment du diagnostic de tumeur cérébrale (adapté de Ostrom et al., 2015, CBTRUS)

Les facteurs étiologiques sont encore mal connus. Le principal facteur de risque de tumeurs cérébrales primitives est représenté par les radiations ionisantes à haute énergie (rayons X à fortes doses). Quelques facteurs génétiques ont été identifiés, notamment des syndromes génétiques tels que neurofibromatoses de type I (maladie de Recklinghausen) et de type II ou le syndrome de Li-Fraumeni ou le syndrome de Turcot. Cinq pour-cent des gliomes ont également une histoire familiale en dehors de tout syndrome identifié (Hemminki et al., 2009).

2. Diagnostic des gliomes

Les gliomes peuvent parfois évoluer rapidement en quelques semaines ou mois rendant ainsi leur dépistage difficile dans la population à grande échelle. Le dépistage systématique est donc limité à quelques populations particulières très à risque, telles que patients avec neurofibromatose de type I, syndrome de Turcot ou syndrome de Li Fraumeni. Il n'existe pas actuellement de recommandation spécifique pour la prise en charge des cas familiaux de gliomes.

Les gliomes sont généralement révélés par un symptôme clinique. La rapidité d'évolution des symptômes reflète la vitesse de croissance tumorale. Les symptômes et signes cliniques apparaissent généralement en quelques semaines à mois pour les tumeurs d'évolution rapide, alors qu'ils sont d'évolution lente et diagnostiqués seulement plusieurs années après l'apparition de la tumeur cérébrale en cas d'évolution lente de la tumeur. Les signes cliniques incluent des crises d'épilepsie, des déficits focaux dont des troubles cognitifs.

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) cérébrale, avec des séquences T1 avant et après injection et des séquences fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR), est très sensible pour le diagnostic de gliome (Ellingson et al., 2015). Elle permet de détecter même de petites tumeurs. L'IRM représente l'examen de référence pour le diagnostic des gliomes. Le suivi des gliomes et l'effet des traitements sur la tumeur doit être, en l'absence de contre-indication, réalisé par IRM, de préférence sur le même appareil ou sur un appareil de même champ magnétique. Le scanner cérébral est rarement réalisé à la recherche de calcifications et l'angiographie uniquement à la demande du chirurgien en vue de préparer le geste opératoire. De même, la tomographie par émission de positons (TEP) peut être réalisée avant la chirurgie afin de définir les zones à biopsier de préférence par exemple (Albert et al., 2016).

Aucun marqueur sanguin n'a été identifié jusqu'à présent pour permettre une détection précoce de la maladie. Les analyses du liquide céphalo-rachidien (LCR) n'ont pas de rôle dans le diagnostic de gliomes et peuvent au contraire être contre-indiquées chez ces patients si un effet de masse est présent. Enfin, les électroencéphalogrammes n'ont pas de rôle diagnostique mais peuvent aider au diagnostic d'épilepsie, qui peut être un symptôme de la tumeur cérébrale.

3. Pronostic des gliomes

Les gliomes sont des pathologies incurables. Les survies varient selon le sous-type tumoral (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Taux de survie à 1 an, 2 ans, 5 ans et 10 ans des principaux types tumoraux étudiés au laboratoire (d'après les données du CBTRUS)

	survie à 1 an % (95% CI)	survie à 2 ans % (95% CI)	survie à 5 ans % (95% CI)	survie à 10 ans % (95% CI)
astrocytomes diffus	72% (97.4-98.4)	61.5 (60.3-62.7)	47.9% (46.4-49.3)	37.6% (36.1-39.0)
astrocytomes anaplasiques	62.1% (60.5-63.6)	44.0% (42.4-45.6)	27.9% (26.4-29.5)	19.8% (18.2-21.4)
oligodendrogliomes	98.9% (93.0-94.7)	89.5% (88.4-90.6)	79.8% (78.2-81.2)	64.0% (61.9-66.1)
oligodendrogliomes anaplasiques	81.5% (79.3-83.4)	68.9% (66.3-71.3)	52.5% (49.6-55.4)	38.9% (35.6-42 .2)
glioblastomes	37.2% (37.6-37.7)	15.2% (14.8-15.7)	5.1% (4 .8-5.4)	2.6% (2.4-2.9)

Le pronostic des glioblastomes reste à l'heure actuelle sévère (**Tableaux 1 et 2**). La médiane de survie était de 15.8 mois après le diagnostic pour les patients traités par radiothérapie et témozolomide concomitant et de maintenance dans l'étude princeps de Stupp (Stupp et al., 2009). Dans les groupes contrôles des principales études suivantes, les médianes de survie variaient de 18 à 20.4 mois depuis le diagnostic (Gilbert et al., 2013; Chinot et al., 2014; Gilbert et al., 2014; Stupp et al., 2015). Une survie plus longue (21.7 mois) était observée en cas d'exérèse complète et absence de récurrence après radiothérapie temozolomide concomitant (Weller et al., 2014). A noter également que la survie est plus courte chez les patients âgés de plus de 65 ans (Perry et al., 2016). Dans les études de population, les médianes de survie sont un peu plus faibles, d'environ 12 mois (Ostrom et al., 2015; Gramatzki et al., 2016).

Tableau 2 : Médianes de survie des glioblastomes dans différents essais cliniques

	Médiane de survie depuis randomisation	Médiane de survie depuis le diagnostic	% exérèse chirurgicale complète
Stupp et al., 2009 Groupe chir, RT/TMZ-TMZ (n=287)	14.6 mois	15.8 mois	39%
Gilbert et al., 2013 (RTOG 0525)	16.6 mois	~ 19.6 mois	56%
Chinot et al., 2014 (Avaglio) groupe contrôle chir, RT/TMZ-TMZ (n=463)	16.7 mois	~ 18 mois	42%
Gilbert et al., 2014, groupe contrôle chir, RT/TMZ-TMZ RTOG 0825 (n=317)	16.1 mois	~ 19.1 mois	59%
Weller et al., 2014 (GGN) patients avec exérèse complète de glioblastome sans récurrence après RT/TMZ-TMZ (n=85)	NA	21.7 mois	100%
Stupp et al., 2015, (n=229)	16.5 mois	~ 20.4 mois	64%
Perry et al., 2015 Patients de plus de 65 ans Groupe chir, RT/TMZ-TMZ	9.3 mois	NA	NA (<68.3%)

RT radiothérapie, TMZ temzolomide, GGN German glioma network, RTOG: Radiation Therapy Oncology Group

Dans l'étude princeps de Stupp, on note que 9.8% de patients inclus dans l'étude et traités par la combinaison radiothérapie chimiothérapie étaient encore en vie à 5 ans (Stupp et al., 2009). Selon les données du CBTRUS, qui reflètent davantage la population générale, la survie à 5 ans est de 2.6% (Ostrom et al., 2015). D'une façon générale, les longues survies, définies par une survie de plus de 5 ans, concernent moins de 5% des patients (Dolecek et al., 2012).

Les facteurs de mauvais pronostiques habituellement reconnus des gliomes sont un âge supérieur à 40 ans, une épilepsie difficilement contrôlable, des signes déficitaires ou une hypertension intracrânienne, un mauvais état général reflété par un

indice de Karnofsky bas, un volume important, un effet de masse, une évolutivité volumétrique rapide, une prise de contraste, et une modification de la perfusion. L'étendue de la résection chirurgicale est également un élément déterminant majeur du pronostic. Au niveau moléculaire, les facteurs de bon pronostic sont la présence d'une mutation IDH et d'une codélétion 1p/19q, qui sont maintenant au centre de la classification OMS 2016 (Steinbach et al., 2006; Krex et al., 2007; Yan et al., 2009 ; Weller et al., 2017). Les facteurs associés à une longue survie des glioblastomes restent cependant encore mal connus à l'heure actuelle et font actuellement l'objet d'une étude clinique (EORTC 1419).

4. Classifications OMS 2007 et OMS 2016 des gliomes

Ce projet de thèse a débuté sur la base de la classification des gliomes OMS 2007 alors utilisée. Cette classification était basée sur les aspects histologiques des gliomes, le type de gliome étant défini par le phénotype cellulaire le plus représenté (astrocytome, oligodendrogliome, oligo-astrocytome, glioblastome), et le grade d'anaplasie étant défini par les aspects de différenciation cellulaire, de densité cellulaire, de nécrose, de prolifération vasculaire, d'atypies nucléaires, d'activité mitotique et d'images apoptotiques.

On distinguait alors notamment en autre groupe au sein du groupe des gliomes, les astrocytomes pilocytiques (grade I), les astrocytomes diffus (grade II), les astrocytomes anaplasiques (grade III), les oligodendrogliomes (grade II), les oligodendrogliomes anaplasiques (grade III), les oligo-astrocytomes (grade II), les oligo-astrocytomes anaplasiques (grade III) et les glioblastomes (grade IV). Des discordances majeures intra et interobservateurs sur la reproductibilité d'un diagnostic pour un même sous-type tumoral ont cependant été mises en évidence, notamment pour les gliomes diffus infiltrants (van den Bent, 2010). Par ailleurs, pour un même type et un même grade tumoral, des variations étaient également observées en termes de pronostic (van den Bent, 2010). De nouvelles approches étaient donc nécessaires afin de réduire ce manque de reproductibilité et d'améliorer l'identification de facteurs pronostiques et de facteurs prédictifs de réponse aux traitements.

Des changements majeurs ont été proposés afin d'améliorer la classification des tumeurs en sous types distincts de gliomes. Une nouvelle classification intégrant des

marqueurs moléculaires aux données histologiques a finalement été établie en 2016 (Louis et al., 2016). Les biomarqueurs requis par la classification OMS 2016 sont les suivants : mutations IDH1/2, codélétion 1p/19q, les mutations des histones H3F3A ou HIST1H3B/CK27M (H3-K27M) et les fusions RELN C11 ou f95. D'autres biomarqueurs peuvent également avoir un intérêt, notamment la perte d'expression de l'alpha-thalassaemia/mental retardation X-linked (ATRX), les mutations du promoteur de TERT, les fusions KIAA1549-BRAF, les mutations BRAF-V600E, les mutations H3F3A-G34 et d'autres altérations associées aux gliomes (Reifenberg et al., 2016). Dans cette classification, les gliomes correspondent aux tumeurs astrocytaires et oligodendrogiales diffuses, ainsi qu'aux autres tumeurs astrocytaires (astrocytome pilocytique, astrocytome subépendymal à cellules géantes, xanthoastrocytome pléomorphe, épendymome, épendymome RELN fusion positive, épendymome anaplasique) et autres gliomes (gliome angiocentrique, gliome choroïde du 3^e ventricule). Les tumeurs diffuses astrocytaires et oligodendrogiales sont maintenant classées en : astrocytome diffus IDH-mutant, IDH-wildtype, not otherwise specified (NOS) ; astrocytome anaplasique IDH-mutant, IDH-wildtype, NOS ; glioblastome IDH-mutant, IDH-wildtype, NOS ; gliome diffus de la ligne médiane ; oligodendrogliome IDH-mutant et codélétés 1p/19q, oligodendrogliome NOS ; oligodendrogliome anaplasique IDH-mutant et codélétés 1p/19q et oligodendrogliome anaplasique NOS ; oligoastrocytome NOS et oligoastrocytome anaplasique NOS.

Les anomalies génétiques, épigénétiques et chromosomiques les plus fréquentes dans les astrocytomes et les oligodendrogliomes diffus de l'adulte sont présentées dans le tableau ci-dessous (**Tableau 3**). Dans la nouvelle classification OMS 2016, les gliomes oligo-astrocytaires n'ont pas de profil distinct et ce diagnostic doit être limité aux rares cas pour lesquels le profil moléculaire ne permet pas de conclure ou n'a pas pu être effectué correctement. De même, les gliomatoses cérébrales n'ont pas de profil génétique ou épigénétique précis et ne sont plus considérées comme des entités de gliomes spécifiques (Sahm et al., 2014 ; Herlinger et al., 2014 ; Louis et al., 2016).

Tableau 3 : Anomalies génétiques, épigénétiques et chromosomiques fréquentes dans les astrocytomes et les oligodendrogliomes diffus de l'adulte (adapté de Reifenberger et al., 2016)

Entité tumorale	Anomalies génétiques	Anomalies épigénétiques	Anomalies chromosomiques
astrocytome diffus, IDH-muté	mutations <i>IDH1</i> ou <i>IDH2</i> , <i>TP53</i> , <i>ATRX</i>	G-CIMP	trisomie 7 ou gain 7q; LOH 17p
astrocytome anaplasique IDH-muté	mutations <i>IDH1</i> ou <i>IDH2</i> , <i>TP53</i> , <i>ATRX</i>	G-CIMP	trisomie 7 ou gain 7q ; LOH 17p
oligodendrogliome, IDH-muté et avec codélétion 1p/19q	mutations <i>IDH1</i> ou <i>IDH2</i> , <i>TERT</i> , <i>CIC</i> , <i>FUBP1</i>	G-CIMP	codélétion 1p/19q
oligodendrogliome anaplasique, IDH-muté et avec codélétion 1p/19q	mutations <i>IDH1</i> ou <i>IDH2</i> , <i>TERT</i> , <i>CIC</i> , <i>FUBP1</i> , <i>TCF12</i> ; délétion <i>CDKN2A</i>	G-CIMP	codélétion 1p/19q
glioblastome IDH-muté	mutations <i>IDH1</i> ou <i>IDH2</i> , <i>TP53</i> , <i>ATRX</i> ; délétion homozygote <i>CDKN2A</i>	G-CIMP	trisomie 7 ou 7q gain; LOH 17p, délétion 10q
glioblastome IDH-non muté	mutations <i>TERT</i> , <i>PTEN</i> , <i>TP53</i> , <i>PIK3CA</i> , <i>PIK3R1</i> , <i>NF1</i> , <i>H3F3A-G34</i> mutation; délétions homozygotes <i>CDKN2A</i> , <i>PTEN</i> ; amplifications <i>EGFR</i> , <i>PDGFRA</i> , <i>MET</i> , <i>CDK4</i> , <i>CDK6</i> , <i>MDM2</i> , <i>MDM4</i> ; réarrangement <i>EGFRvIII</i>	G-CIMP	trisomie 7 ou 7q gain; monosomie du 10 ; chromosomes double minute
gliome diffus de la ligne médiane H3-K27M-muté	mutations <i>H3F3A-K27M</i> ou <i>HIST1H3B/C-K27M</i> , <i>TP53</i> , <i>PPMD1</i> , <i>ACVR1</i> , <i>FGFR1</i> ; amplifications <i>PDGFRA</i> , <i>MYC</i> , <i>MYCN</i> , <i>CDK4</i> , <i>CDK6</i> , <i>CCND1-3</i> , <i>ID2</i> , <i>MET</i>	perte de la triméthyalation de l'histone-H3-lysine	-

Quatre marqueurs moléculaires sont essentiels au diagnostic et au traitement des gliomes: mutation IDH, codélétion 1p/19q, mutation H3-K27M et méthylation du promoteur de O⁶-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT). Les trois premiers marqueurs pré-cités ont un rôle diagnostique dans la classification OMS 2016, alors que le dernier peut aider à guider les décisions thérapeutiques concernant le traitement par chimiothérapie notamment (Weller et al., 2013). La détection par immunohistochimie de la perte de l'expression nucléaire d'ATRX est également un élément important pour le diagnostic d'astrocytome IDH-muté. Les mutations du promoteur de TERT sont présentes dans les oligodendrogliomes avec co-délétions 1p/19q et les glioblastomes, et leur rôle diagnostique est limité. De plus, leur rôle pronostic n'est pas clairement déterminé.

Une des modifications majeures de la classification OMS 2016 est la distinction entre les sous-types de gliomes basée sur le statut de la mutation IDH1/2. La présence d'une mutation IDH1/2 définit en effet des tumeurs distinctes sur le plan biologique et sur le plan du comportement clinique (Weller et al., 2015). La mutation IDH est une des anomalies génétiques les plus précoces lors du développement d'un gliome (Suzuki et al., 2015), elle n'est cependant pas suffisante à elle seule pour induire une tumeur chez la souris (Sasaki et al., 2012). Les protéines IDH mutées acquièrent une activité enzymatique qui permet la conversion de α -ketoglutarate (α -KG) en d-2-hydroxyglutarate (d-2-HG), et inhibe les dioxygénases α -KG dépendantes (Xu et al., 2011). La conséquence d'une mutation IDH est donc une méthylation aberrante de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et des histones, pouvant résulter en une méthylation large des îlots CpG, correspondant à la terminologie G-CIMP glioma CpG-island methylator phenotype (Nousmehr et al., 2010). La présence de mutation IDH est généralement dépistée par immunohistochimie avec un anticorps dirigé contre IDH1-R132H, mutation représentant 90% des mutations IDH. Quand les tumeurs sont négatives en immunohistochimie, il est recommandé de réaliser un testing moléculaire, par exemple séquençage ADN, à la recherche d'autres mutations (Reifenberger et al., 2016).

En pratique, 3 grands groupes de gliomes sont observés : les tumeurs IDH mutées avec codélétion 1p19q, correspondant aux oligodendrogliomes moléculaires, les tumeurs IDH mutées sans codélétion 1p19q, correspondant aux astrocytomes

moléculaires, les tumeurs IDH wild type (non mutées) et sans codélétion 1p19q, correspondant aux glioblastomes moléculaires. Les tumeurs IDH wild type (non mutées) avec codélétion 1p19q ne sont pas observées en pratique.

De nouvelles approches classant les gliomes selon le profil de méthylation et le profil obtenu par analyse next generation sequencing (NGS) sont également discutées (Reifenberger et al., 2016). Dans différentes études, il a été montré que la classification moléculaire était davantage corrélée au pronostic que la classification histologique (Cancer Genome Atlas Research Network 2015 ; Suzuki et al., 2015 ; Wiestler et al., 2014 ; Weller et al., 2015).

5. Principaux types de gliomes de la classification OMS 2016 étudiés au laboratoire

5.1 Gliomes astrocytaires avec mutation IDH

Les astrocytomes avec mutations IDH ont généralement d'autres anomalies, telles que des mutations de TP53 et ATRX (Cancer Genome Atlas Research network 2015 ; Suzuki et al., 2015). La mutation ATRX induit une perte d'expression nucléaire du régulateur transcriptionnel ATRX, qui est impliqué dans le modelage de la chromatine et de la longueur des télomères (Watson et al., 2015).

5.2 Gliomes oligodendriaires avec mutation IDH et co-délétion 1p/19q

Des mutations du promoteur de telomerase reverse transcriptase (TERT), conduisant à une expression aberrante de la telomerase reverse transcriptase, sont retrouvées dans 95% des tumeurs oligodendrogiales. Des mutations CIC, conduisant à une inactivation de la protéine Drosophila capicua, répresseur de transcription est notée chez plus de deux tiers des patients (Bettegowda et al., 2011). Les mutations de far-upstream binding protein (FUBP)-A, codant pour upstream element-binding protein 1 impliqué dans la régulation de MYC, sont retrouvées dans un tiers des tumeurs. Des anomalies affectant la voie NOTCH, les régulateurs épigénétiques tels que SETD2, et la voie phosphoinositide 3-kinase (PI3K) sont également retrouvées mais de façon moins fréquente (Reifenberger et al., 2016). Les anomalies génétiques associées à un phénotype plus agressif incluent les délétions 9q21, les mutations du gène transcription factor 12 (TCF12) et les aberrations de signal de MYC (Alentorn et

al., 2015 ; Kamoun et al., 2016 ; Huse et al., 2015).

5.3 Glioblastomes IDH non mutés

Les glioblastomes peuvent être divisés en glioblastomes primaires ou secondaires selon qu'ils surviennent de novo ou selon qu'ils surviennent après l'évolution d'un gliome de grade II ou III. Les glioblastomes primaires ont une histoire clinique courte, généralement de moins de 3 mois avant le diagnostic et sans détection au préalable de gliome de plus bas grade (Louis et al., 2016). Les glioblastomes qui se développent dans d'autres localisations que la ligne médiane chez des patients d'au moins 55 ans peuvent être classés comme glioblastome IDH négatif quand la mutation IDH R132H n'est pas détectée en immunohistochimie (Louis et al., 2016). Chez les patients de moins de 55 ans et chez les patients avec un antécédent de gliome de bas grade, il est néanmoins nécessaire de s'assurer de l'absence d'autres mutations IDH (Louis et al., 2016). Les glioblastomes IDH non mutés de l'adulte sont fréquemment caractérisés par un gain du chromosome 7, une monosomie du chromosome 10, une mutation ou une délétion homozygote de CDKN2A et CDKN2B ainsi que des mutations du promoteur de TERT (Verhaak et al., 2010). Les autres altérations moins fréquentes incluent des mutations de TP53, PIK3CA, PIK3R1 et NF1 (Brennan et al., 2013). Enfin des amplifications d'EGFR, PDGFRA, MET, CDK4 et CDK6, MDM2 et MDM4 sont également retrouvées. En particulier, 40% des glioblastomes IDH non mutés sont associés à une amplification d'EGFR et à une expression d'EGRvIII dans 20% des cas (Weller et al., 2015 ; Adalpe et al., 2015). Enfin, BRAF-V600E encode pour une protéine pouvant être une cible thérapeutique dans 50% des glioblastomes épithélioïdes (Kleinschmidt DeMasters et al., 2013). Les glioblastomes à cellules géantes et les gliosarcomes sont également des variants des glioblastomes IDH non mutés (Louis et al., 2016).

5.4 Glioblastomes IDH mutés

Les glioblastomes IDH mutés représentent moins de 10% des glioblastomes et sont plus fréquents chez les jeunes (Louis et al., 2016). Il s'agit principalement de glioblastomes secondaires, et le profil moléculaire est donc similaire à celui d'astrocytomes IDH-mutés. Le pronostic est également meilleur que celui des patients avec un glioblastome non muté. A noter également une plus grande fréquence de méthylation du promoteur MGMT dans cette population (Weller et al., 2015 ; Adalpe

et al., 2015).

6. Classifications des glioblastomes

Les glioblastomes primaires et secondaires, provenant de précurseurs génétiques différents, expriment des altérations génétiques différentes et ont donc des signatures génétiques différentes. Les glioblastomes primaires expriment plus fréquemment une surexpression de EGFR, des mutations de PTEN et une perte du chromosome 10, alors que les glioblastomes secondaires expriment plus fréquemment des mutations IDH1, des mutations TP53 et des pertes du 19q (Ohgaki et al., 2013 ; Nicolaidis et al., 2015).

Les analyses de l'expression de mRNA ont mis en évidence 4 sous-types distincts de glioblastomes: proneural, neural, classique et mésenchymateux (Verhaak et al., 2010). Les critères principaux du type proneural sont une amplification de PDGFRA, une mutation d'IDH1 et une mutation et/ou perte d'hétérozygotie de P53. De plus, des gènes généralement associés aux oligodendrogliomes, tels que PDGFRA, NKX2-2 et OLIG2 sont généralement largement exprimés dans ce sous-groupe. Le type neural est défini par une expression de marqueurs neuronaux comme NEFL, GABRA1, SYT1 et SLC12A5. Le type classique est caractérisé par une expression élevée d'EGFR associée à des amplifications du chromosome 7 et une faible expression de p16INK4A et de p14ARF, en rapport avec une délétion homozygote focale 9p21.3. Le type classique est associé à la présence de marqueurs de cellules souches neurales, comme la nestine, ainsi qu'à la présence de composants des réseaux de Notch et Sonic hedgehog. Enfin, le type mésenchymateux est caractérisé par des délétions focales homozygotes en 17q11.2, contenant le gène NF1, et une expression élevée d'YKL-40 (CHI3L1), MET, CD44 et MERTK. Le type mésenchymateux a été rapporté comme étant associé à une radiorésistance et à un plus mauvais pronostic (Bhat et al., 2013) alors que le type proneural serait associé à une meilleure réponse aux traitements anti-angiogéniques dans le cas des glioblastomes IDH-non mutés (Sandmann et al., 2015). Cette classification est cependant peu utilisée en clinique. En effet, différentes régions hétérogènes peuvent exister au sein d'une même tumeur. Par ailleurs, ces signatures peuvent changer en réponse aux stimuli extérieurs, dont les traitements (Bhat et al., 2013 ; Patel et al., 2014).

Les profils de méthylation de l'ADN permettent également de différencier 4 sous-

groupes de glioblastomes selon les anomalies épigénétiques, avec un groupe IDH-muté, G-CIMP positif et typiquement méthylation du promoteur MGMT avec un profil d'expression proneural, et 3 sous-groupes IDH non mutés. Parmi ces derniers, un sous-groupe « receptor tyrosine kinase I » (RTK I) principalement retrouvé chez les jeunes patients et avec amplification PDGFRA et un profil d'expression proneural, un sous-groupe « receptor tyrosine kinase II » (RTK II) classique et un sous-groupe « mésenchymal », qui se différencie du profil classique par des profils de méthylation différents, moins d'aberrations du nombre de copie et une signature mésenchymale (Brennan et al., 2013).

7. Prise en charge des gliomes

Suite à la nouvelle classification OMS 2016, de nouvelles recommandations de prise en charge ont été proposées par la société Européenne de Neuro-Oncologie, l'EANO (European Association de Neuro-Oncologie) en collaboration avec le groupe brain tumor group of European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC BTG) (Weller et al., 2017, in press).

7.1 Chirurgie

Les objectifs de la chirurgie sont doubles : diagnostiques et thérapeutiques. Selon les recommandations EANO, la chirurgie des gliomes doit être réalisée dans un centre expert habitué à la prise en charge de ces patients (Williams et al., 2016 ; Weller et al., 2017, in press).

L'obtention d'un diagnostic précis est important pour la décision thérapeutique mais est également un élément important pour le patient et les proches lorsqu'une décision de soins palliatifs est à prendre. Une décision de soins palliatifs sans aucun diagnostic histologique devrait être évitée en dehors des situations à haut risque pour le patient lors de la réalisation de la biopsie. En effet, les biopsies stéréotaxiques ou chirurgicales sont généralement associées à une faible morbidité (Kreth et al., 2001).

L'échantillon tumoral doit être adressé à une équipe de pathologistes et biologistes moléculaires également habituée à la prise en charge des tumeurs cérébrales. Les échantillons tumoraux sont fixés en paraffine pour les études histologiques, immunohistochimiques et moléculaires. Si possible, un échantillon de la

tumeur doit être également congelé pour de potentielles analyses sur des marqueurs moléculaires. La classification OMS 2016 doit maintenant être utilisée pour le diagnostic de gliome afin de connaître le pronostic, et guider de façon précise les options thérapeutiques en fonction des caractéristiques moléculaires de la tumeur et notamment du statut de la mutation IDH et de la codélétion 1p/19q. Il est important d'obtenir le diagnostic précis dans les meilleurs délais sans retarder le début de la radiothérapie ou des traitements systémiques. Une analyse immunohistochimique est d'abord réalisée afin de déterminer le statut de la mutation IDH1-R132H et de la perte d'expression d'ATRX. En cas de gliomes diffus localisés sur la ligne médiane, il est également nécessaire de déterminer le statut de la mutation des histones 3 K27M. Après analyse en immunohistochimie, les analyses moléculaires sont effectuées afin de rechercher si nécessaire d'autres mutations IDH que la mutation R132H et de déterminer le statut 1p/19q.

La chirurgie a également pour objectif de réaliser la résection chirurgicale la plus complète possible sans mettre en danger les fonctions neurologiques du patient. Les techniques de micro-chirurgie sont habituellement utilisées. Différents outils peuvent aider lors de l'acte chirurgical, notamment les techniques de neuronavigation, l'IRM per-opératoire, les ultra-sons en per-opératoire, le monitoring fonctionnel, la fluorescence par 5-aminolevulinic acid (ALA). Il faut garder en mémoire que les gliomes restent des pathologies incurables et qu'il est donc important d'éviter d'aggraver la situation clinique des patients. La prévention de déficits permanents et le maintien de la meilleure qualité de vie possible restent la priorité par rapport à la qualité de la résection lors de la prise en charge chirurgicale. Il est cependant important de contrôler la qualité de la résection par une imagerie cérébrale dans les 24 à 72 heures après la chirurgie (Weller et al., 2017, in press).

7.2 Radiothérapie

L'objectif de la radiothérapie est d'améliorer le contrôle local. Le schéma de radiothérapie (dose et fractionnement) est déterminé par le diagnostic précis de la tumeur, et les facteurs pronostiques tels qu'âge, indice de Karnofsky et étendue de la résection (Laperriere et al., 2002). La dose de radiothérapie varie de 50 à 60 Gy administrées en fractions de 1.8 à 2 Gy selon les différentes caractéristiques précitées. Chez les patients âgés ou en cas de mauvais pronostic, un hypofractionnement avec des doses plus élevées délivrées par fraction peut être réalisé. D'une façon

générale, le volume tumoral total à irradier est défini par les images résiduelles prenant le contraste en séquence T1 avec également une marge de sécurité variant de 1 à 2.5 centimètres et incluant les images observées sur les séquences T2 FLAIR. Une seconde marge de sécurité est également observée afin de réduire les erreurs induites par la technique lors du déroulement du traitement (Weller et al., 2017, in press).

Les organes à risque doivent être respectés. Ces organes sont notamment les nerfs optiques, le chiasma optique, la rétine, le cristallin, le tronc cérébral, la tige pituitaire, la cochlée et l'hippocampe. Les nouvelles techniques de radiothérapie, comme la modulation d'intensité, permettent d'améliorer les doses délivrées aux organes cibles tout en préservant les organes à risque.

7.3 Pharmacothérapie

Les chimiothérapies cytotoxiques font partie du traitement standard pour la plupart des gliomes. Ces traitements ne peuvent être administrés qu'après vérification des fonctions biologiques (hématologie, fonctions rénales et hépatique) et vérification de l'absence de pathologie majeure cardiaque ou pulmonaire, ou de pathologie infectieuse.

Le temozolomide est un agent anti-alkylant qui possède une bonne pénétration de la barrière hémato-méningée et qui est fréquemment utilisé dans le traitement des gliomes. La tolérance est généralement correcte, avec principalement un risque de toxicité hématologique et plus rarement hépatique. Les nitrosourées, comme la lomustine (CCNU), la carmustine (BCNU), la nimustine (ACNU) ou la fotemustine sont également employées dans le traitement des gliomes, généralement après échec du temozolomide. Des études randomisées comparant les protocoles comparant procarbazine - lomustine (CCNU) - vincristine (PCV) au temozolomide manquent à l'heure actuelle. Cependant quelques données suggèrent une meilleure efficacité du PCV par rapport au temozolomide chez les patients avec un gliome anaplasique de bon pronostic (Lassman et al., 2011 ; Wick et al., 2016). La principale toxicité des nitroso-urées est également hématologique, avec des cas parfois sévères et prolongés de thrombopénie ou neutropénie. Une fibrose pulmonaire peut également être observée avec la carmustine. Des pastilles de carmustine peuvent être implantées dans la cavité chirurgicale après exérèse complète en cas de gliomes de grade III ou IV nouvellement diagnostiqués ou en cas de récurrence de glioblastome (Westphal et al., 2003), mais cela reste en pratique peu utilisé, principalement en l'absence d'étude

randomisée contre le traitement standard et mais aussi en raison des effets secondaires rapportés (Bregi et al., 2013). Parmi les différents agents anti-angiogéniques évalués dans des essais cliniques, seul le bevacizumab, anti-vascular endothelial growth factor (VEGF), est approuvé aux Etats Unis, au Canada et en Suisse ainsi que dans plusieurs pays en dehors de l'Union Européenne. Jusqu'à présent il n'a pas été mis en évidence de marqueur d'efficacité ou de résistance au bevacizumab dans des bases de données indépendantes. Les autres approches plus récentes incluent de nouvelles thérapies ciblées, l'immunothérapie et les vaccins, qui sont actuellement explorés dans le cadre d'essais cliniques.

7.4 Traitements symptomatiques

D'une façon générale, des corticostéroïdes sont administrés avant la chirurgie ou en cas de progression tumorale symptomatique afin de réduire l'oedème associé à la tumeur. Leur usage est cependant à éviter en cas de suspicion de lymphome cérébral ou de lésions inflammatoires avant la réalisation de biopsies cérébrales. La dose minimale nécessaire est toujours recherchée. L'usage d'agents anti-osmotique est rarement nécessaire. Les agents anti-épileptiques ne sont pas recommandés en préventif (Weller et al., 2012) et ne sont utilisés qu'après la survenue d'une première crise. Ces agents doivent être de préférence non-inducteurs enzymatiques.

8. Suivi des gliomes

Les patients sont généralement suivis tous les 3 mois par une évaluation clinique et une IRM cérébrale. Dans le cas de pathologies moins agressives, des intervalles plus longs peuvent être observés. Inversement, en cas de doute sur une progression, des contrôles plus rapprochés semblent raisonnables (Weller et al., 2017, in press). Généralement les pseudo-progressions et pseudo-réponses sont observées dans les 3 mois après la mise en route du traitement. Les séquences de perfusion en IRM ou les TEP aux aminoacides peuvent aider à différencier une pseudo-progression d'une réelle progression tumorale. Les biopsies cérébrales ont généralement moins d'intérêt car même en cas de pseudo-progression, des cellules tumorales résiduelles peuvent être observées (Weller et al., 2017, in press). Le groupe Response Assessment in Neuro-Oncology (RANO) recommande d'étudier également la composante sans prise

de contraste lors du suivi des gliomes (Wen et al., 2010).

9. Recommandations spécifiques pour les principales entités tumorales étudiées au sein du laboratoire

Les recommandations ci-dessous sont celles proposées dans les guidelines EANO-ESMO (Weller et al., 2017, in press).

9.1 Astrocytome diffus, OMS grade II

Traitement initial

- Astrocytome diffus, avec mutation IDH, OMS grade II

Il est recommandé une chirurgie avec résection aussi maximale que possible. Les stratégies de surveillance, sans obtention de preuve histologique, sont de moins en moins répandues même pour les patients pour lesquels la tumeur est découverte de façon fortuite. Après résection complète de la tumeur, les patients de moins de 40 ans asymptomatiques ou avec seulement des crises d'épilepsie bien contrôlées peuvent être surveillés. Dans les autres situations, c'est à dire pour les patients de plus de 40 ans ou avec une résection incomplète, une radiothérapie focalisée sur la tumeur à 50 Gy est recommandée (van den Bent et al., 2005) afin d'améliorer la survie sans progression sans toutefois augmenter la survie globale.

La chimiothérapie seule peut être considérée comme traitement initial en particulier en cas de tumeur extensive bien que l'efficacité du temozolomide dans cette indication soit probablement moindre que celle de la radiothérapie (Baumert et al., 2016). L'essai RTOG 9802 a montré une amélioration majeure de la survie en ajoutant une chimiothérapie par PCV à la radiothérapie (54 Gy) par rapport à la radiothérapie seule, avec des médianes de survie de 7.8 ans pour le groupe radiothérapie seule versus 13.3 ans pour le groupe avec traitement combiné chez les patients avec un gliome de grade II classé à haut risque, c'est à dire avec un âge compris entre 18 et 39 ans et avec une résection chirurgicale subtotalaire ou une biopsie ou chez les patients de 40 ans et plus quelque soit le résultat de la résection chirurgicale (Buckner et al., 2016). Le bénéfice était rapporté quelque soit le sous-groupe histologique. Ainsi la radiothérapie suivie de PCV constitue le nouveau standard de soins pour ces populations de patients.

- Astrocytome diffus, sans mutation IDH, OMS grade II

Ces tumeurs ont le plus souvent un profil bien plus agressif, similaire à celui des glioblastomes, en particulier chez les sujets âgés (Reuss et al., 2015).

Traitement à la récurrence

Le traitement à progression dépend de l'état neurologique, des traitements initiaux reçus et du pattern de progression. Une nouvelle chirurgie doit être de principe discutée, complétée par une radiothérapie pour les patients non initialement irradiés ou par un traitement par chimiothérapie. Le temozolomide est souvent préféré au PCV en raison d'une administration plus aisée et d'un profil de sécurité plus favorable.

9.2 Astrocytome anaplasique, OMS grade III

Traitement initial

- Astrocytome anaplasique, avec mutation IDH, OMS grade III

Le standard de soin inclut une chirurgie d'exérèse maximale, ou de biopsies si la chirurgie n'est pas faisable, suivie d'une radiothérapie à 60 Gy en fraction de 1.8 à 2 Gy. L'essai NOA-04 a montré que le PCV ou le temozolomide étaient aussi actifs que la radiothérapie seule en terme de survie sans progression et en terme de survie globale (Wick et al., 2016 ; Wick et al., 2009). L'essai EORTC 26053 (CATNON), a montré que l'addition à la radiothérapie de temozolomide concomitant ou en maintenance améliore le pronostic par rapport à la radiothérapie seule chez les patients avec un nouveau diagnostic de gliome anaplasie sans codélétion 1p/19q. Une première analyse intermédiaire a montré que 12 cycles de temozolomide de maintenance prolongent la survie globale. Ce schéma doit être considéré comme le standard actuel, car la valeur du temozolomide concomitant reste mal connue (van den Bent et al., 2016). Les analyses des tumeurs en fonction des marqueurs moléculaires n'ont pas encore été réalisées.

- Astrocytome anaplasique, sans mutation IDH, OMS grade III

Une étude rétrospective poolant plusieurs bases de données a montré que les patients avec une tumeur IDH non mutée et méthylation MGMT tirent bénéfice d'une chimiothérapie avec agent alkylant (Wick et al., 2013).

Traitement à la récurrence

En cas de récurrence, le traitement est à nouveau décidé en fonction de l'état neurologique, des traitements de première ligne et du pattern de progression. Une chirurgie doit être de principe discutée. Pour les patients récidivant après radiothérapie dans un intervalle d'au moins 12 mois après la fin de la radiothérapie, une ré-irradiation peut être envisagée. Des études randomisées manquent cependant pour confirmer cette attitude. Les agents alkylants peuvent être envisagés chez les patients naïfs de chimiothérapie progressant après radiothérapie. Le temozolomide et les nitroso-urées ont probablement à peu près la même efficacité (Brada et al., 2010 ; Yung et al., 1999). Le bevacizumab est généralement utilisé après échec de la radiothérapie et de la chimiothérapie, avec des taux de survie sans progression à 6 mois de 20 à 60% (Desjardins et al., 2008 ; Chamberlain et Johnston, 2009). Ces données sur l'intérêt du bevacizumab seul ou combiné à de la chimiothérapie n'ont cependant pas été contrôlées dans des essais randomisés.

9.3 Oligodendrogliomes, IDH-mutés avec codélétion 1p/19q, OMS grade II

Une chirurgie d'exérèse la plus large possible est recommandée. Aucun essai n'est actuellement disponible pour cette population de patients. Cependant une stratégie de surveillance semble justifiée en cas de résection complète ainsi que chez les patients de moins de 40 ans avec une résection incomplète si la tumeur n'entraîne pas d'autres déficits qu'une épilepsie contrôlée. Si un traitement est nécessaire, il est alors préférable de réaliser une radiothérapie puis un traitement par PCV (Buckner et al., 2016).

9.4 Oligodendrogliomes anaplasiques, IDH-mutés avec codélétion 1p/19q, OMS grade III

A nouveau, une chirurgie d'exérèse la plus large possible est recommandée. Bien qu'il s'agisse de tumeurs de grade III, une surveillance peut être réalisée chez les patients les plus jeunes notamment en cas de résection complète et en l'absence de déficits neurologiques (Weller et al., 2017, in press). Deux larges essais randomisés (EORTC 26951 et RTOG 9402) ont montré que l'addition de chimiothérapie par PCV à la radiothérapie, quelque soit la séquence utilisée, prolonge la survie globale de plusieurs années (van den Bent et al., 2013 ; Cairncross et al., 2013), définissant ainsi

le standard de soin dans cette population. Se posent les questions de la toxicité notamment cognitive à long terme dans cette population et l'intérêt d'un traitement par temozolomide concomitant et/ou de maintenance associé à la radiothérapie. L'étude NOA-04 a cependant démontré que la chimiothérapie n'est pas supérieure à la radiothérapie, incitant à ne pas utiliser de chimiothérapie seule en traitement de première ligne de ces tumeurs. Cette approche fait cependant actuellement l'objet d'un essai clinique en France (POLCA, NCT 02444000). Le rôle du temozolomide est en cours d'exploration dans un essai clinique international (CODEL, NCT00887146). Le traitement à progression dépend comme pour les autres tumeurs de l'état neurologique du patient, des traitements déjà administrés et du pattern de progression. Un traitement par bevacizumab, seul ou combiné à une chimiothérapie, semble également pouvoir apporter quelques résultats (Chamberlain et Johnston, 2009 ; Taillibert et al., 2009).

9.5 Glioblastomes, OMS grade IV

La majorité des glioblastomes sont IDH non mutés, et cette catégorie inclut également les glioblastomes avec cellules géantes, les gliosarcomes et les glioblastomes épithélioïdes.

Les glioblastomes épithélioïdes portent une mutation BRAF V600E, cependant l'efficacité des traitements par inhibiteurs BRAF, bien que prometteuse, n'a pas été validée dans des essais cliniques pour cette population de patients.

Pour les autres glioblastomes IDH non mutés, le standard inclut une résection chirurgicale aussi maximale que possible. En effet, un essai randomisé chez des patients de plus de 65 ans avec un diagnostic de gliome de grade III ou IV montrait un bénéfice en survie de la chirurgie par rapport aux biopsies (Vuorinen et al., 2003), bien que discuté en raison de l'effectif limité et de l'état général des patients non parfaitement identique entre les 2 groupes. Il semble que seule une exérèse complète soit associée à une amélioration du pronostic (Kreth et al., 2013, Asklund et al., 2015). Suite à la chirurgie, le traitement est complété par une radiothérapie avec temozolomide concomitant puis de maintenance pendant 6 mois chez les patients jusqu'à 70 ans et en bon état général présentant un nouveau diagnostic de glioblastome (Stupp et al., 2005 ; Stupp et al., 2009, Hart et al., 2013). Il n'y a probablement pas d'intérêt à prolonger le traitement par temozolomide au delà des 6 cures réalisées dans le protocole princeps (Blumenthal et al., 2015 ; Gramatzki et al.,

2016). L'intérêt d'un traitement combinant radiothérapie et chimiothérapie a également été confirmé chez les patients de 65 ans ou plus dans un essai randomisé (Perry et al., 2016). Le bénéfice du temozolomide est plus marqué chez les patients avec méthylation du promoteur de la MGMT (Perry et al., 2016, Hegi et al., 2005).

Les essais NOA-08 et Nordic ont permis de définir la conduite à tenir chez les sujets âgés qui ne sont pas éligibles à un traitement concomitant : les patients avec méthylation du promoteur de la MGMT devraient être traités par temzolomide seul selon le schéma standard pendant 12 mois ou jusqu'à progression, alors que les patients sans méthylation du promoteur de la MGMT devraient être traités par radiothérapie hypofractionnée (Wick et al., 2012 ; Roa et al., 2015). La radiothérapie hypofractionnée est également le traitement recommandé en cas de statut non déterminé du promoteur de la MGMT.

Il a été démontré dans un essai que les pastilles de BCNU utilisées avec la radiothérapie permettent d'augmenter la survie de 11.6 mois à 13.9 mois par rapport à une radiothérapie seule chez les patients présentant un gliome de haut grade. Cependant, ce bénéfice disparaissait dans l'étude en ne prenant en compte que les glioblastomes (Westphal et al., 2003 ; Hart et al., 2013, Westphal et al., 2006).

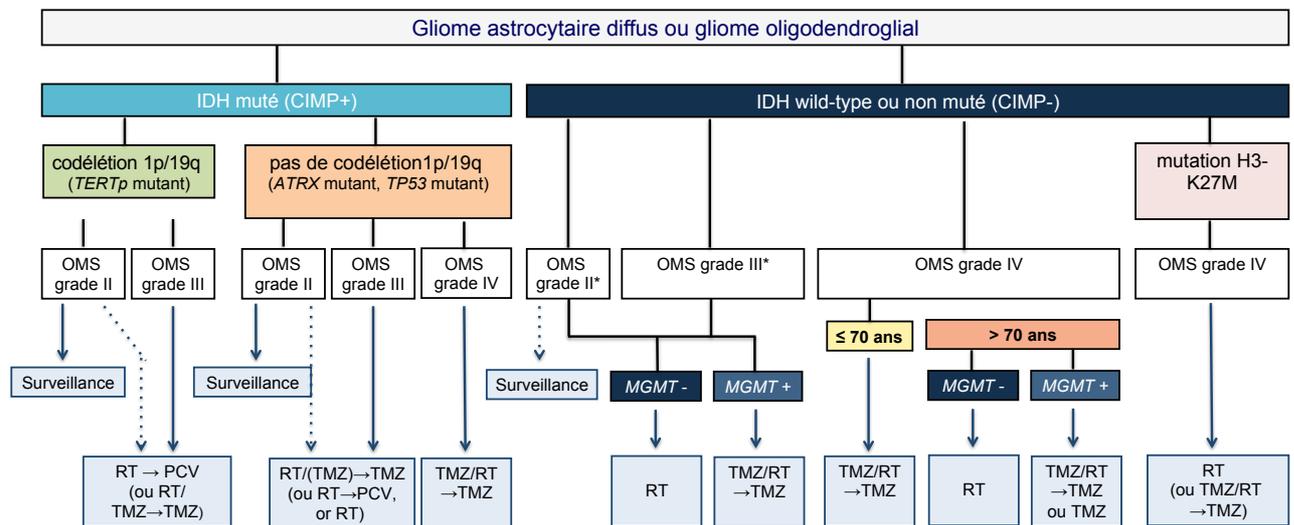
Deux essais cliniques randomisés ont démontré un gain en survie sans progression de 3 à 4 mois, mais pas en survie globale quand le bevacizumab est ajouté au traitement conventionnel par radiothérapie et temozolomide concomitant puis de maintenance (Gilbert et al., 2014 ; Chinot et al., 2014). Le bevacizumab bien que non approuvé dans cette indication, peut être parfois utilisé dès le diagnostic chez des patients très symptomatiques et résistants aux corticoïdes qui ne pourraient pas autrement tolérer le traitement par radiothérapie (Weller et al., 2017, in press).

Les Tumor-treating fields (TTFields) représentent une nouvelle modalité de traitement qui utilise les courants électriques alternatifs. Un essai randomisé de phase III réalisé chez des patients avec un nouveau diagnostic de glioblastome a mis en évidence un gain en survie sans progression et un gain en survie globale (Stupp et al., 2015). Cependant, des questions concernant le mécanisme d'action, l'interprétation des données et le coût du dispositif font que la place de cette approche dans le traitement standard des glioblastomes nouvellement diagnostiqués reste à définir (Wick, 2016 ; Bernard-Arnoux et al., 2016).

Une prise en charge palliative peut être proposée d'emblée chez les patients avec des lésions larges et multifocales, et/ou avec un état neurologique très dégradé.

En cas de récurrence, le traitement n'est pas clairement défini. Une seconde chirurgie semble possible pour 20% à 30% des patients lors de la pratique clinique. Des essais randomisés sur l'intérêt de cette seconde chirurgie manquent. De même les données sur l'intérêt de ré-irradier les patients manquent encore. Le plus souvent, le traitement systémique lors de la récurrence consiste en l'administration de nitrosé-urée, de ré-administration de temozolomide en cas de méthylation du promoteur de la MGMT, ou de bevacizumab (Weller et al., 2010 ; Batchelor et al., 2013 ; Perry et al., 2010 ; Taal et al., 2014 ; Friedman et al., 2009 ; Stupp et al., 2012 ; Wick et al., 2015).

Les recommandations sont résumées dans la figure ci dessous (**Figure 4**).



* Correspond aux entités provisoires d'astrocytomes diffus, IDH non muté et astrocytome anaplasique, IDH non muté.

Figure 4 : Recommandations EANO de prise en charge des gliomes (adapté de Weller et al., 2017, in press)

II. Intérêt de la spectrométrie de masse dans l'analyse des tumeurs

1. Généralités

L'identification des composants moléculaires impliqués dans les mécanismes cellulaires est nécessaire à une meilleure compréhension des différents mécanismes physiopathologiques. Les dysfonctionnements cellulaires ont un impact sur ces composants moléculaires, que ce soit au niveau de la régulation (activation ou répression de la synthèse de protéines), de la structure (clivage de protéines par des enzymes, modifications post-transcriptionnelles), de l'arrangement spatial et de l'interaction avec l'environnement (Quanico et al., 2013).

Les analyses protéomiques permettent d'évaluer directement les modifications observées lors des pathologies en apportant des informations par l'analyse de leur fonction, par leur structure primaire et par leur structure tridimensionnelle mais permettent également de connaître les modifications post-transcriptionnelles comme la glycosylation, la phosphorylation, l'acétylation (Bleau et al., 2009 ; Huse et al., 2009 ; Niclou et al., 2010 ; Underhill et al. 2011).

La spectrométrie à haut débit génère une quantité importante de liste de protéines exprimées dans un tissu analysé. Cette approche est de plus en plus utilisée dans l'étude des mécanismes tumoraux. Les protéines identifiées comme liées au processus tumoral peuvent être en rapport avec soit une cause soit une conséquence du processus tumoral, et permettent d'améliorer la connaissance des mécanismes impliqués dans les différentes étapes.

La protéomique peut utiliser différentes stratégies, différentes méthodologies ou instruments (Niclou et al., 2010 ; Quanico et al., 2013) (**Figure 5**).

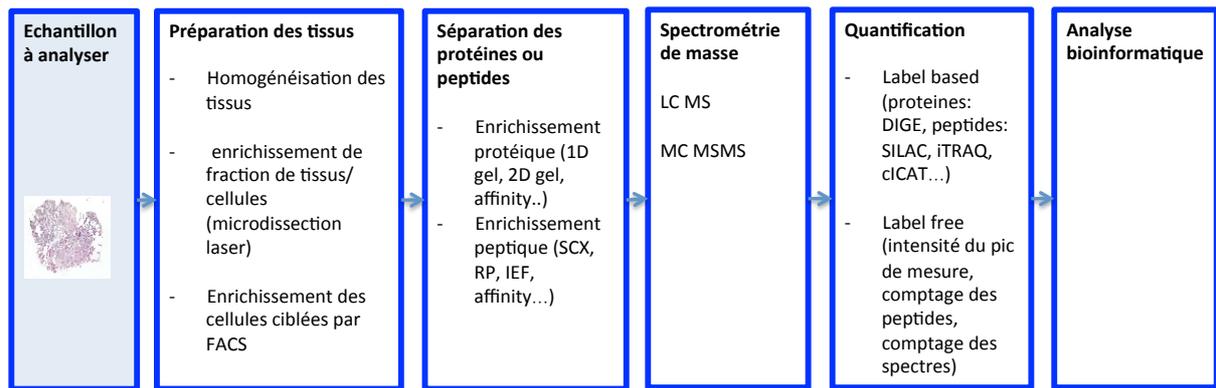


Figure 5 : Diagramme des différentes approches en protéomique (adapté de Niclou et al., 2010)

2. Courte description des principales approches de séparation des protéines

Les deux principales approches sont les techniques de gel deux dimensions (2D) et l'analyse shotgun.

2.1 Techniques de gels 2D (2D-PAGE)

Les techniques de gels 2D séparent les protéines d'un échantillon selon la masse moléculaire et le point isoélectrique sur un gel de polyacrylamide. Les protéines sont quantifiées par un dosage protéique avant d'être soumises à la séparation en 2 dimensions. Les protéines sont ensuite colorées puis soumises à une digestion enzymatique par la trypsine dans le gel. Les peptides de digestion sont séparés en chromatographie sur colonne de phase inverse couplé à un spectromètre de masse pour être identifiés. Entre 500 et 800 protéines peuvent être visualisées, dont les deux tiers identifiées. L'avantage de cette technique est de permettre une analyse précise des modifications post-traductionnelles. Les principales limites sont liées à la co-détection de protéines co-migrantes, ainsi qu'aux difficultés de détection des protéines avec une grande masse moléculaire, un grand point isoélectrique ou ayant des propriétés hydrophobes. La reproductibilité reste donc limitée.

2.2 Analyse shotgun ou analyse LC-MS/MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry)

La technique shotgun identifie et quantifie des peptides de digestion issus de mélanges de protéines en couplant les techniques de chromatographie liquide et de spectrométrie de masse. Le mélange complexe est passé au travers d'une membrane permettant de laisser passer les protéines inférieures à 10 kDa. Les autres sont conservées pour être digérées par la trypsiine ou par une endopeptidase de type LysC. Une séparation en une ou plusieurs dimensions par chromatographie liquide est ensuite réalisée sur les peptides de digestion, puis une analyse en mode MS/MS est réalisée. Les protéines sont identifiées et quantifiées par label free sur la base des séquences de peptides identifiées avec une grande sensibilité. La protéomique shotgun permet d'avoir accès à un grand nombre de protéines mais le plus souvent il s'agit de protéines abondantes et la localisation spatiale de celles-ci n'est pas précise au sein d'un tissu. Pour remédier à ces manques l'imagerie par spectrométrie de masse associée à la microprotéomique tend à répondre à ces problèmes. L'imagerie par spectrométrie de masse permet la localisation d'un grand nombre d'espèces de biomolécules (Gagnon et al., 2012). La microprotéomique consiste en la microdigestion localisée sur une coupe histologique et en l'extraction des peptides de la zone microdigérée suivie d'une analyse par Shotgun protéomique (Quanico et al., 2013).

2.3 Imagerie par spectrométrie de masse MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation) MSI (Mass Spectrometry Imaging) et microprotéomique

Depuis plus de dix ans, la technique d'imagerie par spectrométrie de masse MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation) est devenue la méthode de protéomique en haut débit suscitant le plus d'intérêt pour la découverte de biomarqueurs de différentes pathologies au sein de prélèvements tissulaires (Fournier et al., 2003 ; Fournier et al., 2008 ; Franck et al., 2009 ; Gagnon et al., 2012). Cette technologie associe la technique d'analyse moléculaire par spectrométrie de masse MALDI aux techniques d'histologie classique. Elle permet, à partir d'une coupe de tissu, la cartographie et l'identification de biomarqueurs peptidiques (Lemaire et al., 2007 ; Stauber et al., 2008 ; Hanrieder et al., 2011 ; Minerva et al., 2011 ; Meriaux et al., 2011), protéiques (Seeley et al., 2008, El-ayed et al., 2010 ; Franck et al., 2010),

lipidiques (Veloso et al., 2011 ; Rompp et al., 2010 ; Chen et al., 2010 ; Djida et al., 2009 ; Chen et al., 2009 ; Colsch et al., 2011 ; Delvolve et al., 2011, Meriaux et al., 2010), d'agents médicamenteux (Castellino et al. 2011 ; Prideaux et al., 2011 ; Goodwin et al., 2011 ; Goodwin et al. 2010 ; Goodwin et al., 2010 ; Khatib-Shahidi et al., 2006 ; Bouslimani et al., 2010 ; Solon et al. 2010) et de leurs métabolites (Lee et al., 2012 ; Sarsby et al., 2012 ; Yoshimura et al., 2012 ; Porta et al., 2011 ; Van Dyck et al., 2010 ; Miura et al., 2010 ; Esquenazi et al., 2008). Elle permet de détecter les composants retrouvés au sein des différentes régions d'une même tumeur.

Principe

L'objectif de l'imagerie MALDI-MSI est de représenter la distribution moléculaire d'un échantillon (Fournier et al., 2008 ; Franck et al., 2009; Angel et Caprioli 2013) (Figure 6).

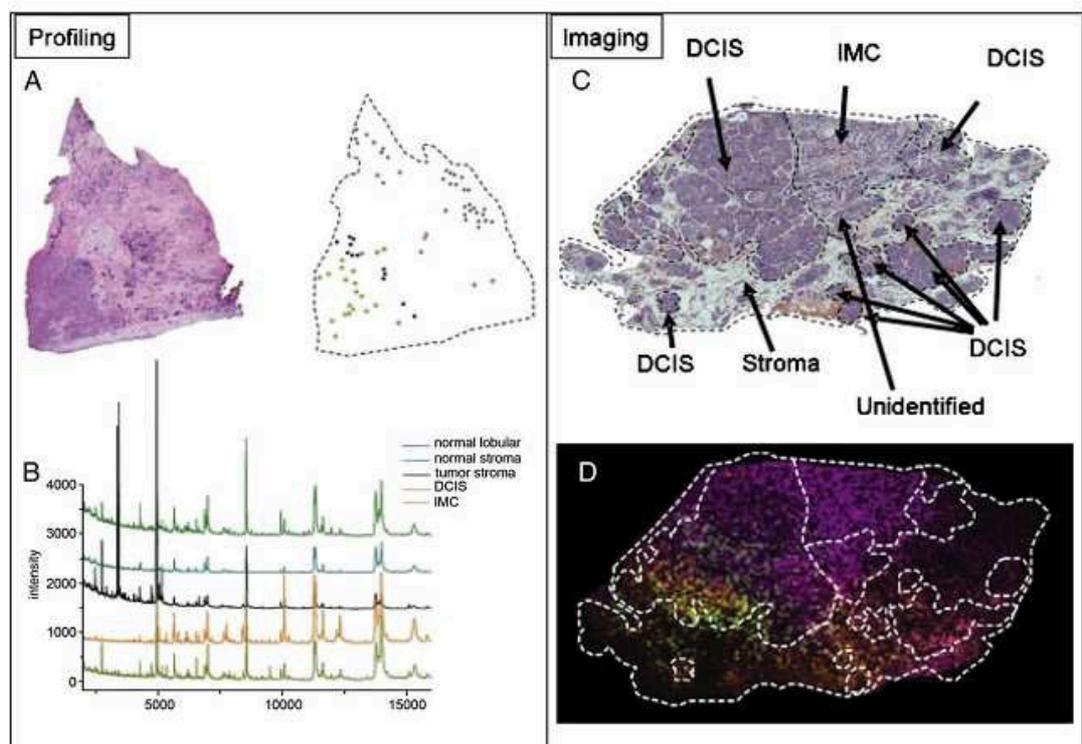


Figure 6 : Les deux modes d'analyse par spectrométrie de masse MALDI sur échantillons tissulaires :

- A) image optique d'une coupe de tissu du cancer du sein colorée à l'hématoxyline et éosine (HES) et localisation d'aires selon les différents types cellulaires.
- B) spectres de masses obtenus pour chacune des aires localisées.

- C) image optique d'une coupe de tissu du cancer du sein HES et annotations histopathologiques.
- D) imagerie MALDI de protéines spécifiques à chaque zone histologique. Chaque couleur correspond à une valeur de m/z .

La spectrométrie de masse analyse les molécules selon leur rapport masse sur charge (m/z). Un spectromètre de masse est composé d'une source d'ionisation, d'un analyseur de masse et d'un détecteur. L'analyse MALDI permet l'obtention de profils d'expression tout en maintenant l'intégrité cellulaire et moléculaire. Cette technique a une grande sensibilité car les molécules sont ablatées, ionisées et détectées directement à partir de l'échantillon étudié.

Stratégie expérimentale

Différentes étapes sont réalisées au cours de l'analyse : section et transfert sur lames de verre Oxyde Indium Etain (ITO), préparation de l'échantillon et dépôt de la matrice, analyse MALDI, traitement des données et reconstruction des images puis analyse informatique avec segmentation spatiale (**Figure 7**).

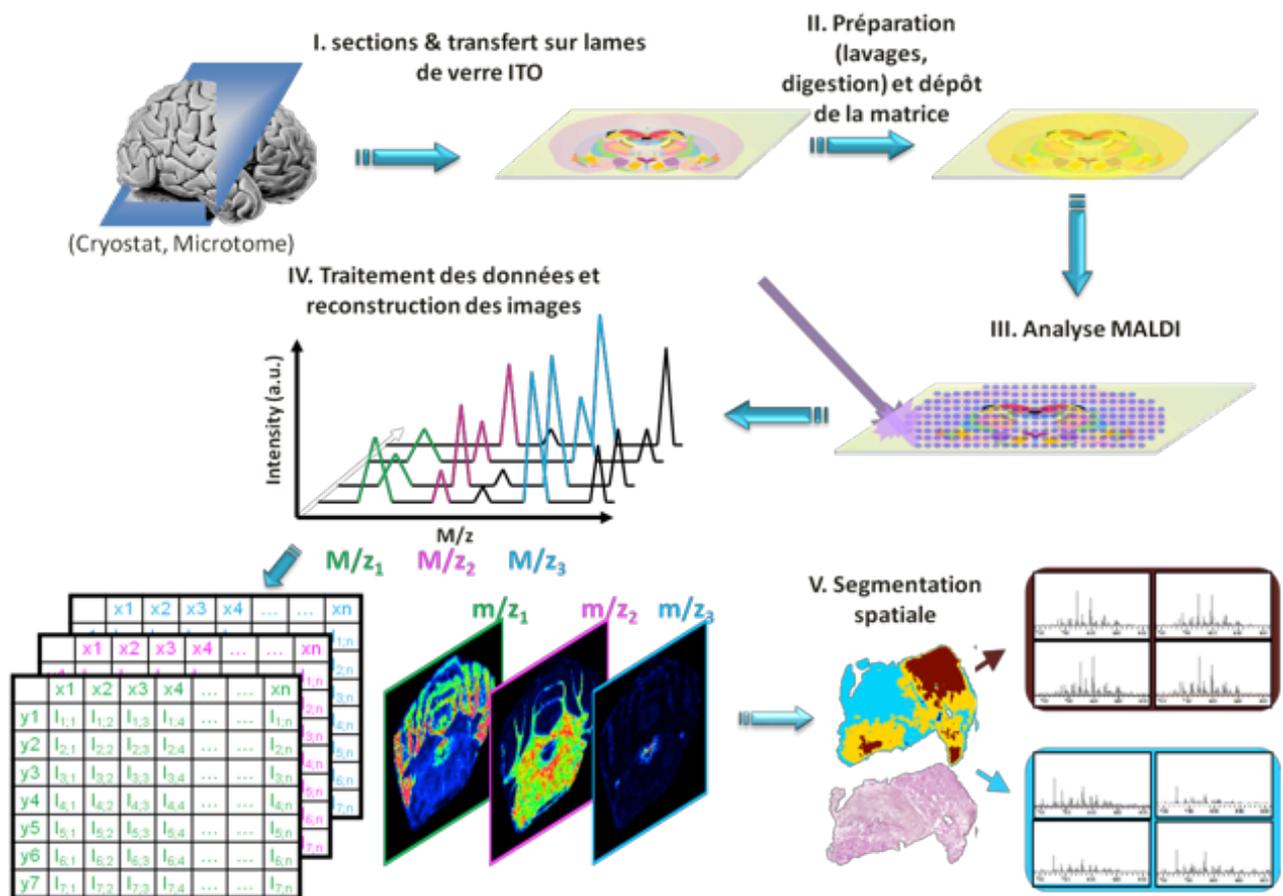


Figure 7 : Stratégie expérimentale de l'imagerie MALDI

Après avoir réalisé des coupes de tissu et les avoir transférées sur des lames conductrices, la matrice est déposée. Les spectres de masse sont enregistrés pour chaque point du tissu. Les spectres de masse enregistrés avec leurs coordonnées sur le tissu sont traités et les images moléculaires peuvent être générées et représentent la localisation des molécules sur le tissu. (Adaptée de Franck et al, *Molecular and Cellular Proteomics*).

Ainsi, la qualité de l'imagerie MSI dépend de différents paramètres : collection des échantillons, préparation des échantillons, instrumentation et analyse des données. L'ensemble de ces étapes doit être standardisé afin de garantir la reproductibilité des analyses entre les différents laboratoires (Addona et al., 2009).

- Collection des échantillons

Les échantillons doivent être de bonne qualité afin de ne pas modifier leur morphologie. La technique MALDI MSI permet la détection de protéines après digestion enzymatique in situ de tissus fixés et conservés en paraffine : Formalin

Fixed, Paraffin-Embedded (FFPE) ou à partir de tissus congelés.

Les tissus fixés et conservés en paraffine (FFPE) ne permettent que l'analyse des peptides obtenus après digestion trypsique, alors que les tissus frais et congelés rapidement permettent l'analyse de toutes les molécules.

- Préparation des échantillons

Les tissus FFPE sont coupés au cryostat puis sont étalés sur lame. Les tissus frais et congelés sont coupés à l'aide d'un cryostat avec une épaisseur pouvant varier de 7 à 12 μm .

Pour certains instruments comme le MALDI-TOF/TOF (Bruker, Daltonics, Bremen, Germany), les tissus sont déposés sur des lames conductrices ITO. Afin d'éviter l'accumulation de charges lors de l'analyse, une tension de 20 kV doit alors être appliquée sur le porte-échantillon.

- Analyse MALDI et analyse des données

La source de production d'ions de type MALDI nécessite l'utilisation d'un composé organique acide de faible poids moléculaire : la matrice (Angel et Caprioli, 2013). Son rôle est d'absorber l'énergie du laser et de permettre la désorption/ionisation des analytes. Le choix de la matrice dépend de la nature des molécules que l'on souhaite analyser. Pour les lipides, on utilise généralement une matrice 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB), alors que pour les peptides, on privilégie une matrice α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid (HCCA).

La matrice est co-cristallisée avec les composés à analyser en mélangeant la solution matrice et l'échantillon à analyser, le plus souvent par des techniques de micro-nébulisation afin d'éviter de délocaliser les composés à étudier et de conserver une bonne résolution spatiale. Ces micro-nébulisations sont réalisées par des robots afin de contrôler le débit, la taille des gouttes et l'épaisseur du dépôt.

Les images sont ensuite acquises en mode point par point selon le déplacement du porte-échantillon sous le laser. Le spectre de masse des peptides, protéines ou lipides est déterminé pour chaque point étudié. La résolution spatiale dépend du nombre de points évalués (pixels) et de leur taille, ainsi que de la zone d'irradiation du laser incident. La résolution spatiale est généralement située entre 50 et 100 μm pour une coupe entière.

L'acquisition des images s'adosse à des outils de biostatistique tels que l'analyse

en composante principale et la classification hiérarchique permettant à partir des images moléculaires issues de l'analyse d'une coupe de tissu, la discrimination des spectres générés au sein des zones stromales ou néoplasiques (Fournier et al., 2008 ; Bonnel et al., 2011) (**Figure 8**).

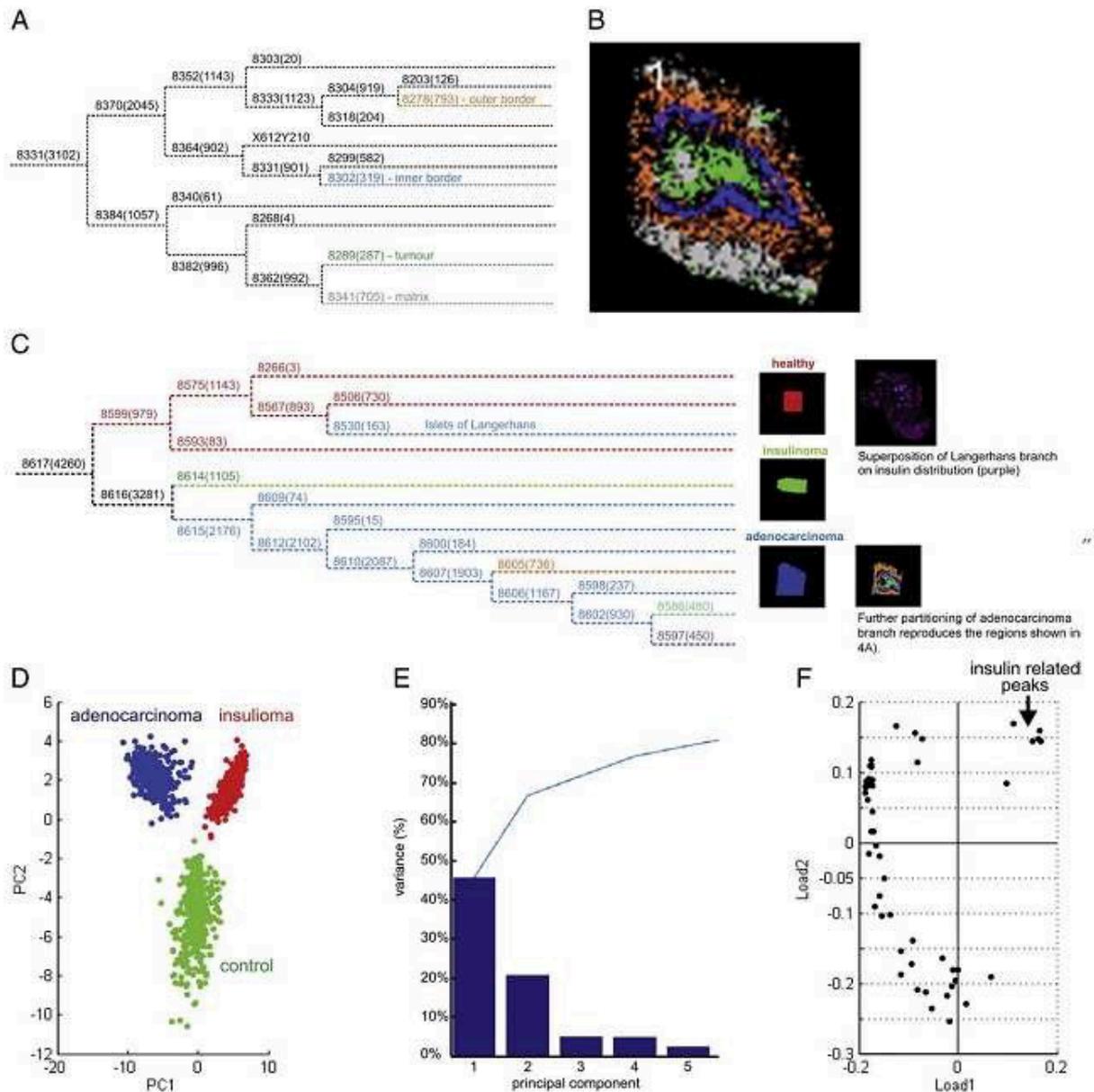


Figure 8: Analyses statistiques d'images de coupes d'adénocarcinomes pancréatiques contenant des zones de tissu insulinémique et sain

La classification hiérarchique des données spectrales du tissu d'adénocarcinome révèle les sous-structures du tissu (A). La classification hiérarchique des données combinées permet de distinguer les tissus d'adénocarcinome, insulinémique et sains (B) ainsi que les différents sous-structures au niveau de chaque sous-branche (C). L'analyse par composante principale révèle que les spectres des trois tissus peuvent être clairement distingués (D), en utilisant la composante principale ayant le maximum de variance (E), et indique le rôle des différentes protéines dans cette séparation (F).

Les spectres sont lissés et le bruit de fond est soustrait, puis une étape de réalignement des spectres est effectuée pour corriger les variations de m/z des pics liées à la position du porte-échantillon et les variations de rugosité de la surface étudiée. Une normalisation est ensuite effectuée pour corriger les variations d'intensité du courant ionique total afin de réduire les variations inter-spectres observées au cours de la même acquisition. Les données permettent ensuite de reconstruire des cartes 2D de densité ionique de la distribution des composants étudiés. Pour chaque signal, la variation d'intensité est reportée sur une échelle de couleur. Les résultats peuvent alors être présentés pour chaque composé individuellement ou pour 2 à 3 composés sur une même image. Des outils informatiques permettent de faciliter l'interprétation (Jones et al. 2012). Notamment, des régions d'intérêt peuvent être définies et comparées par analyse de segmentation ou Hierarchical Clustering.

Applications de l'imagerie MALDI en oncologie

L'imagerie MALDI peut être appliquée aux tissus sains et aux tissus tumoraux. Elle permet d'étudier des métabolites issus de médicaments, des lipides, des peptides ou des protéines. Ces applications pourraient donc être larges en oncologie : amélioration du diagnostic en intégrant les données de la protéomique aux données histopathologiques et de biologie moléculaire, identification des combinaisons thérapeutiques à privilégier en identifiant les marqueurs tumoraux et les marqueurs pronostiques, évaluation de l'efficacité et de la toxicité des traitements (Franck et al., 2009).

- Identification de marqueurs tumoraux

Dans une étude sur le cancer de l'ovaire, l'imagerie MALDI a permis d'identifier un biomarqueur ayant un ratio m/z de 9744 et correspondant à un fragment de la sous-unité régulatrice du protéasome 11S (REG- α) permettant de mettre en évidence la transformation des cellules de l'état bénin à un état malin, autorisant ainsi un diagnostic précoce (**Figure 9**) (Lemaire et al., 2007). Ce marqueur a ensuite été validé sur une cohorte de 175 patients de stade 3 et 4. Il a été retrouvé au niveau de stade plus précoce, stade 1 et il est marqueur de la rechute (Longuespée et al., 2012). D'autres équipes ont confirmé sa présence dans des études multi-centriques dans d'autres cancers e.g. le cancer du sein (Dekker et al., 2014), et dans les sarcomes (Lou et al., 2017).

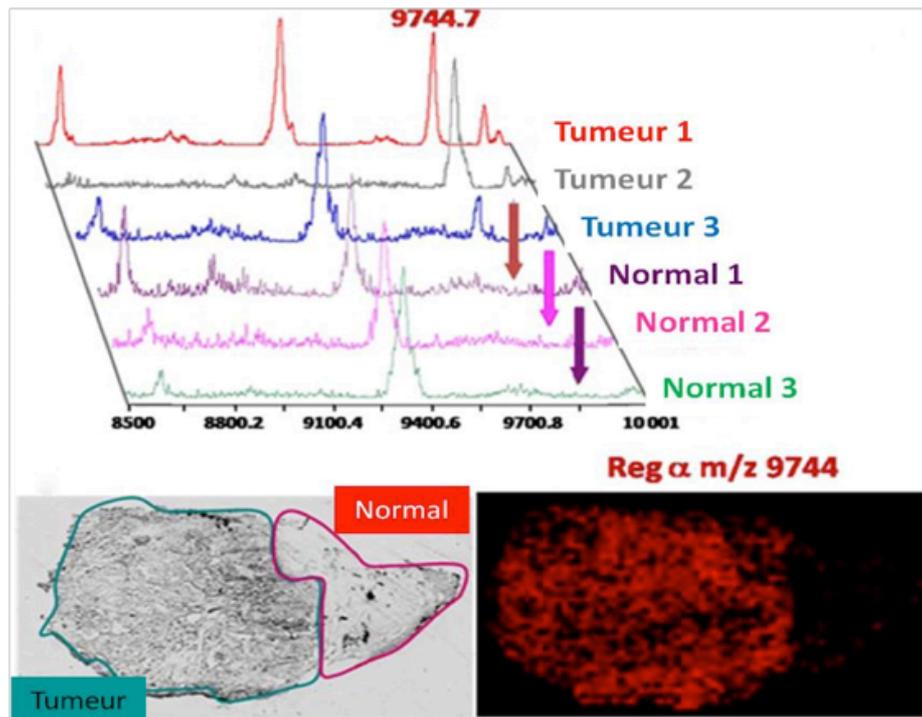


Figure 9 : Identification de REG- α comme biomarqueur du cancer de l'ovaire
*Profils MALDI de trois échantillons de cancer de l'ovaire versus trois échantillons sains et image moléculaire du fragment de REG- α (m/z 9744) a une résolution de 50 μm d'une section de tissu de cancer de l'ovaire. (Adaptée de Franck et al., *Molecular and Cellular Proteomics*).*

- Détermination des marges tumorales

L'analyse MALDI-MSI couplée aux analyses statistiques a permis la discrimination de régions tissulaires hyperplasiques, néoplasiques et stromatiques de cancer de la prostate stade IV (Bonnel et al., 2011) (**Figure 10**).

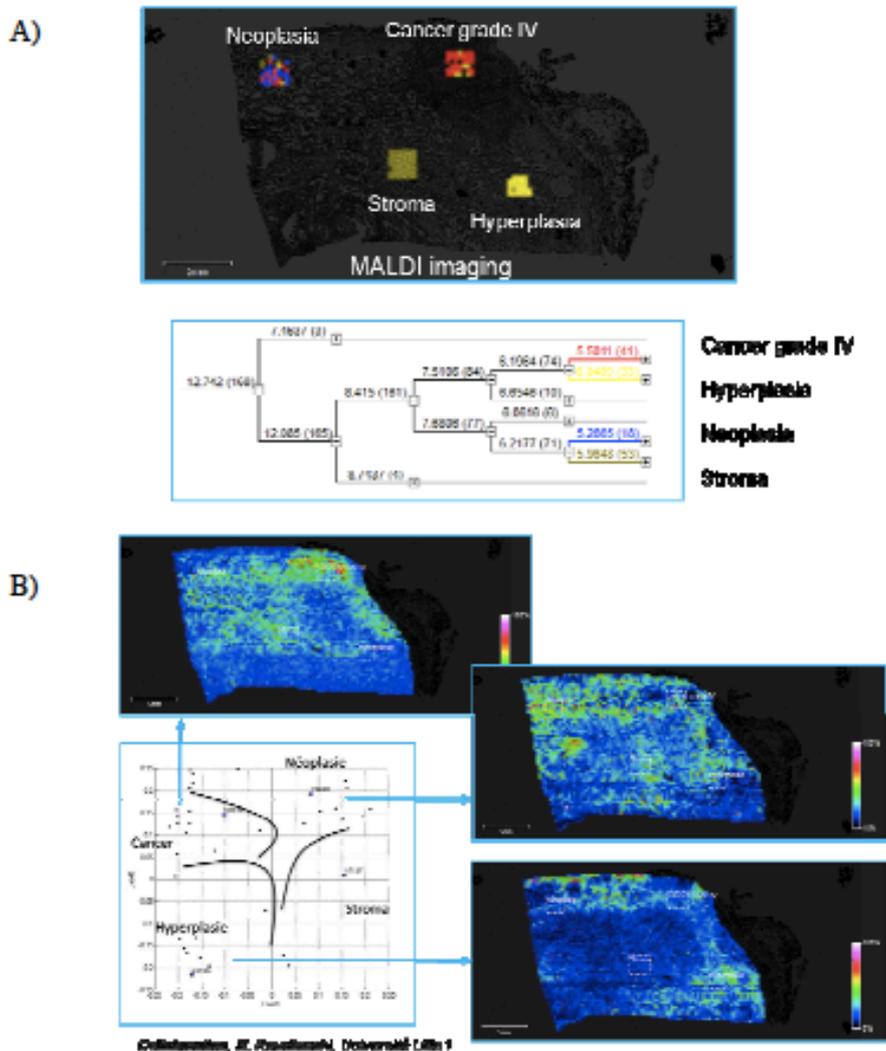


Figure 10 : Imagerie MALDI de tissu du cancer de la prostate : *Classification hiérarchique des spectres obtenus pour chaque zone histologique de la coupe de tissu* Chaque couleur correspond à un groupe de spectre (« cluster ») (A). Image moléculaire de chacun des ions issus de chacun des groupes hiérarchiques de spectres (B).

Dans une autre étude, 4 régions d'intérêt étaient mises en évidence : tumeur, marge tumorale, marge saine et tissu sain. L'imagerie MALDI permettait ainsi de différencier les signatures moléculaires des tissus adjacents histologiquement sains et des tissus tumoraux (Oppenheimer et al., 2010).

- Détermination de marqueurs pronostiques

Des profils protéiques corrélés à la survie de patients présentant des cancers gastro-intestinaux ont été identifiés. Une signature de 7 protéines était associée à un pronostic défavorable. Le rôle pronostic défavorable de 3 protéines identifiées

(HNP-1, CRIP1 et S100-A6) était validé sur une cohorte indépendante (Balluff et al., 2011).

- Détermination des effets thérapeutiques des traitements

Dans une étude évaluant l'intérêt de la combinaison d'un traitement par radiothérapie et par un inhibiteur d'EFGR (epidermal growth factor receptor)/VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor inhibitor), AEE788, dans un modèle animal de cancers de prostate, les analyses MSI ont démontré que l'agent AEE78 était distribué de façon hétérogène mais suffisante dans les cohortes de répondeurs (Huamani et al., 2008).

Imagerie MALDI couplée à l'analyse microprotéomique

L'imagerie MALDI met en évidence des signatures moléculaires mais ne permet pas d'identifier les marqueurs sélectionnés. Cette identification peut être réalisée par fragmentation des peptides obtenus après digestion enzymatique in situ directement sur le tissu (Franck et al., 2010 ; Bonnel et al., 2011). Cependant dans ce cas, le nombre de protéines identifiées est limité à quelques dizaines parmi les plus abondantes en raison d'une intensité de signal faible de la majorité des peptides. Ainsi, le spectre obtenu contient un nombre trop faible de fragments et ne permet pas une identification précise des protéines dont ces fragments sont issus lors de l'interrogation des banques de données. De nouvelles stratégies ont donc été développées, utilisant la microprotéomique, afin d'identifier un grand nombre de protéines à partir d'un micro-environnement à une échelle de 500 µm en réalisant une micro-digestion sur les régions d'intérêt sélectionnées d'un échantillon. Après l'étape de micro-digestion, les régions d'intérêt sont soumises à une extraction des peptides par micro-injection liquide (Quanico et al. 2013, Wisztorski et al., 2013 ; Wisztorski et al. 2016). Les peptides de digestion ou les protéines entières sont ensuite extraits pour être analysés par LC-MS/MS en vue de leur identification (**Figure 11**).

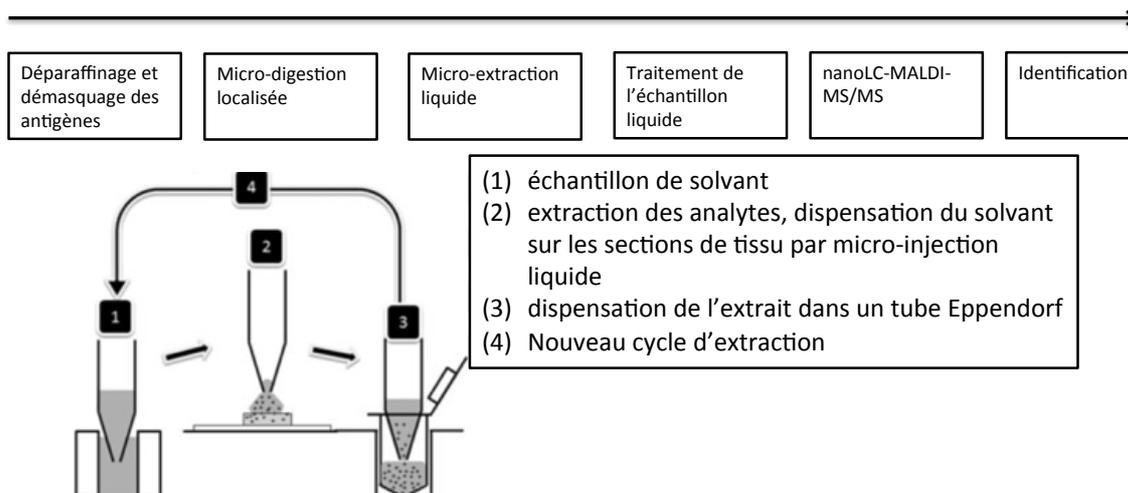


Figure 11: Stratégie de micro-extraction pour l'identification des molécules par micro-injection liquide de la surface de l'échantillon

Les étapes 1 à 4 peuvent être répétées plusieurs fois pour optimiser l'extraction. (D'après Wisztorski et al., 2013).

La faisabilité et l'intérêt de cette technique ont été démontrés dans le cadre des tumeurs de l'ovaire (Wisztorski et al., 2013). Des profils différents étaient mis en évidence avec d'une part des protéines correspondant à des régions tumorales avec des protéines de la voie P53 et des protéines habituellement impliquées dans les cancers de l'ovaire, et d'autre part des protéines correspondant à des régions bénignes. La reproductibilité de la qualité et la quantité de protéines identifiées par cette technique ont également été rapportées lors d'analyse de cerveaux de rats (Wisztorski et al. 2016).

En résumé, l'imagerie MALDI détermine la localisation de molécules et de signatures moléculaires. La spectrométrie de masse permet d'identifier ces molécules en réalisant des micro-extractions. Ainsi, à partir des spectres obtenus dans les zones de tissu pathologique, sont extraites les informations de masse des composés responsables de la discrimination de ces spectres. Ces composés biomarqueurs potentiels peuvent ensuite être identifiés directement sur la coupe pour les petites molécules (lipides, métabolites et peptides) ou en association avec des techniques de microprotéomique localisées pour les protéines. C'est dans ce sens qu'on parle d'« histologie moléculaire » pour définir l'imagerie par spectrométrie de masse MALDI (Fournier et al., 2008).

3. Protéomique des gliomes

Quelques équipes se sont intéressées jusqu'à présent au profil protéomique des gliomes. Certains marqueurs ont déjà été identifiés sur différents supports : cultures cellulaires, fragments tumoraux, liquides céphalo-rachidiens, plasmas de patients atteints de gliome.

3.1 Lignées cellulaires et modèles animaux

De nombreuses études ont évalué les analyses de protéomique sur les lignées cellulaires. Les analyses protéomiques ont été utilisées pour explorer les mécanismes physiopathologiques et l'effet des traitements notamment.

Dans le cadre de l'étude des mécanismes physiopathologiques, on note notamment le screening et l'identification des cibles de micro RNA-128 qui pourraient inhiber la prolifération des gliomes par l'intermédiaire des gènes E2F3a et BMI1 (Yang et al., 2015), l'analyse des glycoprotéines de surface (Bock et al., 2012 ; Autelitano et al., 2015), la comparaison entre protéome et sécrétome des cellules glioblastoma multiforme-derived neural stem (GNS) et des cellules neural stem (NS) (Thirant et al., 2012 ; Okawa et al., 2016), les différences entre glioblastomes primaires et secondaires à travers les lignées HRAS et mutant IDH1-driven (Doll et al., 2016), le rôle de unfolded proteins response (UPR) (Redzic et al., 2016), l'étude du micro-environnement tumoral (hypoxie) (Yoon et al., 2014), l'étude des phénomènes de migration cellulaire et de dégradation de la matrice extra cellulaire (Mallawaarachy et al., 2015), l'étude du rôle de mTORC2 (rapamycin complex 2) (Chantaravisoot et al., 2015).

Dans le cadre de l'étude des effets des traitements et des phénomènes de résistance, on peut souligner la résistance à la cytotoxicité des cellules NK (He et al., 2014), l'analyse des effets de l'EGFR sur les protéines impliquées dans l'invasion par les cellules de glioblastomes (Sangar et al., 2014), la résistance à l'oxyde nitrique (NO), utilisé pour inhiber la croissance des cellules tumorales dans des modèles animaux (Leon et al., 2015), la résistance au BCNU, agent de chimiothérapie utilisé pour le traitement des gliomes (Poschmann et al., 2015), au S3I201, un inhibiteur de STAT3 (Jain et al., 2017). Cette approche permet d'étudier les modifications protéomiques associées aux traitements et à la résistance aux traitements.

Concernant ces modèles, il faut rappeler que des signatures différentes ont été mises en évidence lors de cultures cellulaires primaires issues de glioblastomes entre lignées cellulaires neurosphères et lignées cellulaires adhérentes (Collet et al., 2014). Dans une autre étude comparant le statut génomique et protéomique de 26 échantillons tumoraux et les cultures primaires correspondantes, les gains et amplifications génomiques étaient généralement perdus en culture, alors que les pertes génomiques étaient conservées (Howley et al., 2012). Des différences étaient également observées entre les études en protéomique des lignées cellulaires de gliomes et les lignées obtenues directement à partir de tissu tumoral de glioblastome (Vogel et al., 2015). Ainsi, 160 protéines étaient gagnées et 60 étaient perdues en culture par rapport aux échantillons obtenus à partir de glioblastomes. Parmi ces protéines, 7 étaient significativement augmentées et 10 significativement diminuées dans les cultures déjà établies. Dans ces protéines on retrouvait des facteurs de transcription, des gènes suppresseurs de tumeurs, des protéines du cytosquelette et des protéines du métabolisme cellulaire.

Enfin, quelques modèles animaux ont été utilisés pour l'étude du profil protéomique des xénogreffes de glioblastomes (Goplen et al., 2006 ; Rajcevic et al., 2009 ; Ait Belkacem et al., 2014), de l'invasion par les cellules de gliomes malins (Maruo et al., 2013), l'effet de la radiothérapie (Wibom et al., 2006) ou la réponse au traitement anti-angiogénique (Demeure et al., 2016).

3.2 Fluides

La mise en évidence de marqueurs spécifiques dans le sang pour le dépistage ou le suivi de tumeurs cérébrales représente un enjeu majeur car le geste reste peu invasif par rapport à une chirurgie intracrânienne et pourrait être répété au cours du suivi des patients. Différentes techniques de protéomique ont été étudiées sur des patients ou des témoins sains.

Dans une étude comparant le protéome du sang de patients et de contrôles sains par technique 2DE et 2D-DIGE, 55 spots de protéines étaient statistiquement différents entre les 2 groupes de patients (Gollapalli et al., 2012). Parmi les protéines identifiées, on notait l'haptoglobine, le précurseur du plasminogène, les apolipoprotéines A-1 et M, et la transthyrétine, déjà connues pour leur rôle dans la croissance et la migration tumorales. L'analyse des lipides retrouvait des taux élevés de cholestérol, triacylglycérol et lipoprotéines de faible densité chez les patients présentant un

glioblastome.

Un panel de 3 protéines, FTL, S100A9 et CNDP1, était identifié comme biomarqueur potentiel de glioblastome par la technique iTRAQ couplée à LC-MS/MS (Gautam et al., 2013). Un second panel de 3 protéines S100AB, S100A9 et CXCL4 était identifié dans le sang comme biomarqueur potentiel de glioblastome par SELDI-ToF MS technology (Popescu et al., 2014). Enfin, un troisième panel de 3 protéines LYAM1, BHEA40 et CRP était identifié dans le sang par antibody microarray, comme biomarqueurs de glioblastomes (Nijaguna et al., 2015).

Dans une autre étude utilisant l'approche human proteome chips, des signatures permettant de classer avec une bonne sensibilité et une bonne spécificité le sang des patients porteurs d'une tumeur cérébrale selon son grade ont été mises en évidence (Syed et al., 2016). Les protéines SNX1, EYA1, PQBP1 et IGHG1 étaient retrouvées dans les différents grades de tumeurs, alors que NEDD9, impliquée dans la migration cellulaire, était dysrégulée dans les glioblastomes et que STUB1 et YWHAH étaient dysrégulées dans les grades II.

L'analyse du liquide céphalo-rachidien (LCR) est également un enjeu chez les patients avec gliomes. L'analyse du LCR permet de court-circuiter la barrière hémato-méningée qui peut impacter les résultats observés dans le sang. Par ailleurs, la présence de protéines majoritaires est moindre dans le LCR par rapport au sang. L'étude du LCR peut être réalisée après recueil de LCR lors d'une ponction lombaire ou lors d'une chirurgie cérébrale. Il faut toutefois rappeler que la réalisation d'une ponction lombaire est un geste plus invasif qu'une prise de sang et surtout parfois contre-indiqué chez les patients avec une tumeur cérébrale. Dans une méta-analyse, 19 protéines étaient identifiées comme pouvant servir de marqueur différentiel dans le LCR de gliome (Shen et al., 2014). Ces protéines interviennent dans la réponse inflammatoire, la réponse au stress et à l'hypoxie et l'apoptose. Une seule protéine, l'attractine, était identifiée par 2 fois parmi les 8 études réalisées.

Les différences observées entre ces études peuvent être expliquées par des variations dans la taille des échantillons analysés (nombre de LCR analysés), dans les procédures de préparation et d'analyse et enfin dans les critères définissant le niveau requis pour être qualifié de différentiel. Il faut souligner que les seules informations provenant des protéines sécrétées par les cellules tumorales ou les exosomes peuvent être identifiées par analyse du sang ou du LCR. Par ailleurs, dans les fluides, comme

le sérum ou le LCR, la concentration en protéines peut varier très largement, et la présence de protéines très abondantes peut masquer la présence de protéines moins abondantes (Anderson et al., 2002).

Ainsi, les résultats de ces études sur les fluides, bien que prometteurs restent à valider sur des populations plus grandes de patients et en utilisant des techniques plus précises, telles que l'analyse MALDI couplée à la microprotéomique.

3.3 Echantillons tumoraux

Plusieurs études de protéomique ont été réalisées sur des échantillons tumoraux collectés directement après chirurgie cérébrale. Les principales études sont présentées dans le **Tableau 4**.

La qualité des études dépend de différents facteurs: le nombre d'échantillons analysés doit être suffisant pour permettre la réalisation d'analyses statistiques fiables, les variations individuelles au sein de chaque échantillon doivent être vérifiées, le volume des échantillons doit être suffisant pour la réalisation des analyses de protéomiques (1 mm² pour les tissus en général), la qualité des échantillons doit être vérifiée en terme de dégradation et de contamination et enfin des procédures doivent être établies pour chaque étape (Kalinina et al., 2013 ; Heroux et al., 2014).

Initialement les études de protéomique étaient principalement réalisées par des techniques de gel-based protéine profiling. Cependant les approches par spectrométrie de masse ont ensuite été développées car elles autorisent une meilleure résolution, et améliorent la mise en évidence des protéines exprimées de façon différentielles.

Seul un nombre limité de publications ont inclus au moins 50 échantillons : Iwadate et al., 2004; Iwadate et al., 2005; Schwartz et al., 2005; Jiang et al., 2006; Khalil et al., 2007; Polisetty et al., 2013 et Stetson et al., 2016.

L'analyse protéomique était réalisée par analyse de gel 2D pour 4 d'entre-elles (Iwadate et al., 2004; Iwadate et al., 2005; Schwartz et al., 2005; Khalil et al., 2007), par reverse phase protein array pour 2 d'entre-elles (Jiang et al., 2006; Stetson et al., 2016), par iTRAQ et spectrométrie de masse à haute résolution pour une (Polisetty et al., 2013).

En 2004, une étude réalisée en gel 2D sur 85 échantillons tumoraux mettait en

évidence un set de 37 protéines exprimées de façon différentielle entre tumeur et cerveau sain (Iwadate et al., 2004). La plupart des protéines du set identifiées dans les glioblastomes ont un rôle dans la transduction, comme par exemple les protéines G.

La même équipe a ensuite étudié la chimiosensibilité des gliomes à divers agents thérapeutiques (cyclophosphamide, nimustine, cisplatine, cytosine arabinoside, mitomycine C, peplomycine, adriamycine, etoposide, vincristine, paclitaxel) sur 93 échantillons tumoraux analysés selon des techniques de gel 2D (Iwadate et al., 2005). Un set de 41 protéines était significativement affecté par chaque catégorie de traitements anti-cancéreux.

En 2005, une expression différentielle de protéines était également mise en évidence par analyse de gel 2D et MALDI sur 108 échantillons de gliomes, avec à la fois des patients avec une longue survie et des patients ayant une survie plus courte (Schwartz et al., 2005). Six biomarqueurs significativement différents entre les 2 groupes étaient identifiés : calyculin, dynéine light chain, calpactine I light chain, tubuline-spécifique chaperone A, protéine phosphoprotéine astrocytaire PEA 15*, protéine liant les acides gras 5, et deux biomarqueurs étaient retrouvés comme ayant une valeur pronostique : dyneine light chain 2 et calyculin.

En 2006, une autre équipe mettait en évidence un set de 12 protéines capable de différencier les glioblastomes des gliomes de bas grade à partir de 82 échantillons tumoraux (37 glioblastomes et 45 gliomes de bas grade) évalués reverse phase protein array (Jiang et al., 2006). L'association de la phosphorylation d'AKT en Thr 308 et non Ser473 avec les glioblastomes suggère un rôle spécifique de cette voie lors de la transformation en glioblastome.

Une équipe a étudié en 2007, par technique 2D gel 50 échantillons de gliomes de grade divers, et a mis en évidence 91 protéines uniques, dont 20 n'avaient jusqu'alors jamais été décrites dans un contexte de tumeur cérébrale, apportant ainsi de nouvelles informations sur cette pathologie (Khalil et al., 2007).

L'équipe de Polisetty a évalué 100 échantillons tumoraux de gliomes, dont 45 étaient des astrocytomes et 6 contrôles correspondant à des échantillons de cortex temporal prélevés dans le cadre d'une chirurgie pour épilepsie (Polisetty et al., 2012 ; Polisetty et al., 2013). Les auteurs ont mis en évidence un set de protéines exprimés différemment entre les 2 groupes par la technique liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry Isobaric tags for relative and absolute quantitation

(LC-MS/MS iTRAQ), appartenant principalement à des phénomènes cellulaires tels que modification post-transcriptionnelle, translation protéique, réponse précoce au signal. Les protéines heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs), impliquées dans les modifications, la stabilité et la distribution d'ARNm semblaient jouer un rôle particulièrement important.

Une équipe a étudié les caractéristiques protéomiques de 203 glioblastomes nouvellement diagnostiqués (102 dans une cohorte de training et 101 dans une cohorte de validation, bien équilibrées en terme de facteurs pronostiques) par la technique reverse phase protein array (RPPA) et a analysé le rôle pronostic de ces données (Stetson et al., 2016). Un set de 13 protéines avec un rôle pronostic était identifié (dénommé PROTGLIO): Cox-2 and Annexin 1, AMP-activated protine kinase (AMPK)-1, p Jun, p Met, p CHEK1, Cox-2, GAB2, IGFBP2, p NFKB1, SMAD1, p Src, Src, TGM2. Cette signature protéique permettait de prédire la survie (log-rank test: $p=0.0009$): dans la cohorte de training, la médiane de survie était de 12 mois dans le groupe à haut risque et de 26 mois dans le groupe à faible risque et dans la cohorte de validation, la médiane de survie était de 13 mois dans le groupe à haut risque et 20 mois dans le groupe à faible risque. Cette signature protéique était distincte des autres facteurs pronostiques déjà connus tels que âge au diagnostic, qualité de la résection chirurgicale, indice de Karnosky en post-opératoire, traitement par temozolomide et radiothérapie, et méthylation du gène MGMT. Le modèle était ensuite également validé sur un set de tumeurs de grade II IDH non mutées.

Une autre équipe a examiné l'évolution des données de protéomique entre le moment du diagnostic de glioblastome et la récurrence tumorale chez un patient (de Aquino et al., 2015). Dans cette étude, une expression des protéines différentes était mise en évidence au niveau de mêmes régions anatomiques entre le moment du diagnostic et le moment de la récurrence, à un an d'intervalle. Plusieurs protéines clés, comme S100A9 et plusieurs réseaux, comme Ras, RHO GTPases activate PKNs ou ceux liés au phénomène d'apoptose étaient identifiés.

L'ensemble des études ont été regroupées dans le **Tableau 4**, ci-dessous.

Tableau 4 : Principales études de protéomiques réalisées sur des échantillons tumoraux humains

References	Type et nombre d'échantillons	Extraction des protéines	Analyse protéique	Protéines identifiées	Commentaires sur les protéines identifiées
Hanash et al., 2002	glioblastome (n=12) Grade I et II (n=11)	ND	gel 2D, LC	22 protéines d'intérêt surexprimées	patterns différents selon le grade tumoral
Hiratsuka et al., 2003	glioblastome (n=2) grade I (n=1) grade III (n=2) et zones péritumorales	ND	gel 2D, MALDI-TOF-MS	15 protéines d'intérêt : 11 surexprimées et 4 sous-exprimées protéines du cytoquelette dont SIRT2 (sirtuin homologue 2) tubulin deacetylase	patterns différents entre tissu tumoral et péritumoral
Hobbs et al., 2003	glioblastome (n=4)	lysis buffer	gel 2D, SELDI-TOF-MS	Identification de protéine, sans profil caractéristique	mise en évidence d'une hétérogénéité de l'expression protéique au sein d'une même tumeur
Iwadate et al., 2004	glioblastome (n=52) astrocytomes anaplasiques (n=13) astrocytomes grade II (n=10) cerveau normal (n=10)	lysis buffer	gel 2D, MALDI TOF-MS	350 protéines identifiées / 37 protéines différentielles protéines de transduction du signal dont small G-proteins	patterns différents entre tissu tumoral et cerveau normal patterns différents selon le grade tumoral
Furuta et al., 2004	glioblastome primaire (n= 6), glioblastome secondaire (n=7) astrocytome grade II (n=5) astrocytomes grade III (n=2)	microdissection manuelle et lysis buffer	gel 2D, Nano LC-MS/MS (QSTAR)	11 protéines différentielles	patterns différents entre les glioblastomes primaires et les glioblastomes secondaires
Schwartz et al., 2005	gliome (n=14) tumeur crête neurale (n=1) contrôle (n=5)	frozen tumor section	MALDI-MS	>200–400 pics	patterns différents selon le grade patterns différents entre tissu tumoral et cerveau normal
Chumbalkar et al., 2005	astrocytomes (n=27) Contrôle avec épilepsie (n=ND)	lysis buffer	gel 2D, MALDI-TOF	72 protéines différentielles protéines du cytosquelette, protéines des filaments intermédiaires, heat shock proteins	patterns différents selon le grade tumoral
Iwadate et al., 2005	gliomes (n=93) après drogues cytologiques	lysis buffer	2DE, silver stain, MALDI-TOF MS: PMF	41 protéines différentielles protéines de transcription du signal associées à une meilleure sensibilité de la chimiothérapie	Identification de protéines permettant de définir l'efficacité des chimiothérapies
Wang et al., 2005	glioblastome (n=1)	microdissection manuelle et lysis buffer	Capillary IEF-nRP-LC (cIEF), IEF; RP ESI MS/MS (QTOF)	1820 protéines différentielles Nestin, Anx A1 (16 and 18 unique peptides, respectively)	hétérogénéité intratumorale
Odreman et al., 2005	glioblastome (n=10) astrocytomes fibrillaires grade II (n=10)	lysis buffer	2DE, IEF ; LC-ESI-MS/MS (ion trap)	85 protéines identifiées, dont 15 différentielles	patterns d'expression différents selon le grade
Schwartz et al., 2005	glioblastome (n=57) grade III (n=22) grade II (n=29) cerveau normal (n=19)	frozen tumor section	gel 2D et MALDI MS/ MS ou ESI-IT	300–500 pics de protéines 6 protéines discriminantes pour la survie	pattern pronostic
Jiang et al.,	gliomes grade II (n=82)	lysis buffer	RPPA	46 protéines identifiées, dont 18	patterns d'expression différent

2006	astrocytomas (n=8) oligodendrogliomas (n=7) oligoastrocytomas (n=3) anaplastic astrocytomas (n=10) oligodendrogliomas (n=11) oligoastrocytomas (n=6) glioblastome (n=37)			différentielles protéines impliquées dans prolifération cellulaire, survie cellulzre, apoptose, angiogenèse et invasion cellulaire	selon le grade
Li et al., 2006	astrocytomes de grade II-IV (n=10) vs cerveau normal (n=4)	microdissection manuelle	gel 2D, Nano-LC-MS/MS peptide identification	500 protéines identifiées, dont 17 différentielles protéines facteurs de transcription, facteurs de croissance, prolifération pathway	pattern d'expression différent selon le grade
Khalil et al., 2007	gliomes (n=50) vs. contrôles	lysis buffer	gel 2D, MALDI TOF MS: PMF LC-MS/MS	211 protéines identifiées, dont 91 différentielles	identification de nouvelles protéines impliquées dans les gliomes
Okamoto et al., 2007	oligodendrogliomes de grade III (n=3), oligodendrogliomes de grade II (n=6)	lysis buffer	gel 2D, LC-MS	panel de 19 protéines	pattern permettant de différencier les oligodendrogliomes avec et sans délétion 1p
Mustafa et al., 2007	vaisseaux sanguins de GB (n=10) vs. cerveau normal (n=10)	microdissection laser	direct MALDI-FTMS nano-LC-MALDI-TOF/ TOF	189 protéines idendifiées, 16 différentielles 4 protéines identifiées uniquement dans les vaisseaux de gliome protéines impliquées dans angiogénèse	identification de protéines présentes uniquement dans vaisseaux tumoraux et non dans vaisseaux cérébraux normaux
Li et al. 2008	grade II (n=4) grade III (n=4) glioblastome (n=4)	microdissection manuelle	capillary IEF-nRP-LC- MS/MS 12 unique cIEF peptide fractions analysed by RP and quadrupole-TOF-MS.	104 protéines différentielles mise en évidence de Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1 (WHSC1)	rôle de WHSC1 dans prolifération tumorale
An et al., 2009	glioblastome (n=10) vs. lignées cellulaires (U87, HEK293T, neural stem cells)	lysis buffer	2DE : IEF; MALDI-TOF: PMF	99 protéines différentielles dont annexin 2	rôle de annexine 2 dans migration cellulaire
Melchior et al., 2009	glioblastome (n=1)	lysis buffer	bottom-up: peptide 2D-LC, MALDI-TOF/ TOF; semi-top down: IP-RP HPLC on protein and peptide level, MALDI- TOF/TOF	2660 protéines totales / 1401 protéines différentielles technique bottom-up : 1245 protéines technique bottom-down : 1005 protéines overlap de 580 protéines (34.6%)	exploration overlap entre techniques bottom-up et bottom-down
Park et al., 2009	glioblastome (n=3)	lysis buffer	2DE: IEF ; MALDI-TOF: PMF	NR protéines totales / 12 protéines différentielles rôle dans pathway impliqués dans la progression des tumeurs cérébrales	hétérogénéité intra-tumorale
Rostomily et al., 2010	Oligodendrogliomes grade II with (n=5) and without 1p/ 19q deletions (n=5)	lysis buffer	microcapillary LC-MS, ICAT	442 protéines idenitifiées / 163 protéines différentielles protéines impliquées dans invasion extracellulaire, invasion, migration	patterns différents entre tumeurs avec et sans codélétion 1p/19q

Collet et al., 2011	glioblastome (n=5) Cerveau normal, patients épileptiques (n=5)	lysis buffer	gel 2D avec standard mixte intégré et DeCyder software	51 protéines identifiées / 22 protéines différentielles	patterns d'expression différents entre glioblastome et tissu sain
Fang et al., 2012	glioblastome (n=5) astrocytome grade III (n=3) astrocytome grade II (n=4)	microdissec tion	CITP/ nano-RPLC	177, 120, et 594 protéines différentielles nucléaires détectées grades II, III, and IV, respectivement protéines impliquées dans STAT expression in the Jak-Stat signaling pathway (activation de la différentiation des astrocytes) protéines de membrane dont EGFR et Erbb2	patterns différents entre grades de gliome
Polisetty et al., 2012	astrocytomes (n=45, dont 13 anaplasiques)	lysis buffer	iTRAQ and high- resolution mass spectrometry (LTQ Orbitrap Velos)	1834 protéines identifiées, dont 356 différentielles protéines de membrane, signal du calcium et homéostasie	patterns de sous-type tumoral
Yang et al., 2012	oligodendrogliomes avec perte 1p (n=4) oligodendrogliomes sans perte 1p (n=4)	lysis buffer	iTRAQ, 2D-LC- MS/MS	449 protéines différentielles, dont 13 significativement différentes entre les groupes	patterns différents selon statut 1p
Patel et al., 2013	glioblastome (n=16)	lysis buffer	LC-MS/MS	1491 protéines identifiées identificatif d'une signature protéomique à partir de 50 gènes	pattern marqueur de pronostic
Lemée et al., 2013	Zone péri-tumorale de glioblastome (n=6) et contrôles avec épilepsie (n=3)	lysis buffer	ICPL method followed by GLC-MS/MS analysis	197 protéines non-redondantes dont 35 différentielles	patterns différents entre tumeur et zone péri-tumorale
Mueller et al., 2013	glioblastome nouvellement diagnostiqués (n=39)	microdissec tion laser	RPPMA	133 protéines et phosphoprotéines identifiées, dont 44% différentielles dont cibles de mTOR, AKT, STAT1, VEGFR2, or BCL2	importance de la standardisation de la technique (rôle du tumor cell enrichment)
Polisetty et al., 2013	gliomes (n=6) contrôle (n= 3)	digestion trypsique	iTRAQ and high resolution LC- MS/MS mass spectrometry (LTQ Orbitrap Velos)	2642 protéines identifiées, dont 266 protéines différentielles signal post transcriptionnel, acute phase response signaling	patterns différents entre tumeurs et échantillons contrôles
Simeone et al., 2014	tumeurs de haut grade (n=25) tumeurs de bas grade (n=10) contrôle (n=5)	sonication	2D-PAGE	48 protéines différentielles réseaux p53 et EGFR	patterns différents entre tumeurs et échantillons contrôles
Turtoi et al., 2014	glioblastome (n=6) et lignée cellulaire U87	lysis buffer	nanoHPLC- MS/MS	898 protéines identifiées, dont 633 différentielles	mise en évidence COL6A1 dans les régions péri- vasculaires tumorales et dans les structures pseudopalladiques des cellules gliales

Heroux et al., 2014	glioblastome (n=10) contrôles de patients épileptiques (n=10)	sonication	SDS-PAGE puis LC/MS	gliomes : 6402 protéines identifiées épilepsie : 1201 protéines identifiées protéines impliquées dans la progression tumorale, l'agressivité et l'invasion tumorale	patterns différents entre tumeurs et échantillons contrôles
Deighton et al., 2014	glioblastome de patients jeune (âge médian 36 ans) vs. Contrôle péri-tumoral de 10 jeunes patients (âge médian= 32) puis 5 glioblastome > 60 ans	ND	Gel 2D, puis LC/MS	90 protéines significativement altérées chez les jeunes patients protéines impliquées dans les interactions protéines-protéines de l'immunoprotéosome, le signal NFkB, les fonctions mitochondriales	patterns différents entre les glioblastomes de sujets jeunes et de sujets âgés
Gimenez et al., 2015	glioblastome (n=8, dont 4 avec une courte survie et 4 avec une longue survie), astrocytome grade II (n=4), oligodendrogliome grade II (n=4), oligodendroglioma grade III (n=4) contrôles non tumoraux (n=4)	lysis buffer	iTRAQ-based quantitative proteomic analysis	1095 protéines identifiées, dont 268 différentielles protéines impliquées dans les processus métaboliques, les processus de régulation, liaison aux protéines, ARN et nucléotide	patterns pronostiques et patterns de sous-type tumoral
Guo et al., 2015	gliome (n=1)	lysis buffer	Gel 2D, LC-ESI-MS/MS	24 phosphotyrosine-containing protéines identifiées protéines impliquées dans différents réseaux comme stress oxydatif, réponse au stress, migration cellulaire	présence de protéine tyrosine phosphorylation
Khaghani-Razi-Abad et al., 2015	glioblastome ou oligodendrogliome de haut grade (n=10) tissu contrôle (ND)	lysis buffer	gel 2D, MALDI TOF/TOF mass	1328 spots identifiés, dont 157 sous-exprimés et 276 sur-exprimés protéines impliquées dans les modifications post-translacionnelles	patterns différents entre tumeurs et échantillons contrôles
Robertson et al., 2015	glioblastome (n=4) oligodendrogliome grade III (n=4), astrocytome grade II (n=4), oligodendrogliome grade II (n=4)	lysis buffer	iTRAQ-based quantitative proteomic analysis	1095 protéines identifiées, dont 268 différentielles protéines impliquées dans les processus métaboliques, régulation de processus biologiques et la liaison aux protéines, ARN et nucléotides	patterns diagnostiques et pronostiques
Gupta et al., 2016	glioblastome (n=22)	digestion tryptique	iTRAQ and high-resolution mass spectrometry (LTQ Orbitrap Velos)	1834 protéines identifiées, dont 710 différentielles overlap de 327 protéines (60%) entre transcriptomique et protéomique protéines impliquées dans la prolifération, l'invasion	overlap transcriptomique et protéomique
Ren et al., 2016	glioblastome (n=5), astrocytome grade III (n=5) astrocytome (n=2) gliome grade I (n=5)	lysis buffer	iTRAQ, 2D LC/MS-MS	2190 protéines identifiées rapport aux grades I : 173 (12.4%), 304 (14%), et 462 (21.2%) de protéines différentielles avec les grades II, III, and IV, respectivement	patterns différents entre les différents grades de tumeur

				protéines impliquées dans la prolifération cellulaires, l'invasion et l'angiogénèse avec une epxression croissante entre bas et haut grade	
Stetson et al., 2016	glioblastome (n=203)	X	RPPA	13 protéines, dont certaines-avec un rôle pronostic protéines impliquées dans la réponse inflammatoire (Cox-2, Annexin 1)	élaboration d'un modèle pronostic indépendant PROTGLIO
De Aquino et al., 2016	glioblastome : 1 cas, au diagnostic initial et à récive	sonication	4-plex iTRAQ	768 protéines notamment protéines S100A9 et Ras pathway, RHO GTPases activate PKNs pathway	protéines différentes sur les échantillons obtenus sur les mêmes régions tumorales lors de la récive à un an

cIEF : capillary isoelectric focusing ; ESI : Electro Spray Ionization ; FTMS : Fourier transformation mass spectrometry ; ICPL : isotope-coded protein labeling; IEF : Isoelectric focusing ; iQTAQ; Isobaric tags for relative and absolute quantification; IT : ion trap ; iTRAQ: Isobaric tags for relative and absolute quantitation; LC : liquid chromatography ; LC/MS-MS: liquid chromatography/mass spectrometry – mass spectrometry; MALDI: Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation ; MS : mass spectrometry ; nano-RPLC: nano-reversed phase liquid chromatography; RPPA: reverse phase protein array; RPPMA : Reverse Phase Protein Microarray Analysis, nano-RPLC : nano-reversed phase liquid chromatography; SELDI : Surface enhanced laser desorption ionization ; TOF : time of flight spectrometry

**CLASSIFICATION PROTEOMIQUE DES GLIOMES PAR ANALYSE EN
SPECTROMETRIE DE MASSE MALDI COUPLEE A LA MICROPROTEOMIQUE :
ETUDE GLIOMIC - RECHERCHE DE BIOMARQUEURS PROTÉIQUES DANS LE
BUT DE RÉALISER UNE CLASSIFICATION MOLÉCULAIRE DES GLIOMES**

I. Présentation de l'étude GLIOMIC

L'étude GLIOMIC (NCT02473484) constitue le sujet de cette thèse. Afin de pouvoir réaliser cette étude de cohorte prospective monocentrique promue par le CHRU de Lille, un dossier a été déposé (N° ID-RCB 2014-A00185-42). L'accord du Comité de Protection des Personnes a été obtenu le 08/04/2014.

Le soutien financier est apporté par le Laboratoire PRISM et le SIRIC Onco-Lille.

1. Logistique de l'étude

Equipes participantes

- Le Service de Neurochirurgie, Hôpital Roger Salengro, CHRU De Lille
- Le Centre de Biologie Pathologie, CHRU LILLE, 59037 Lille Cedex
- Le Centre de Ressources Biologiques / Centre d'Investigations Cliniques 9301, CHRU LILLE, 59037 Lille Cedex
- Laboratoire de Spectrométrie de Masse Biologique Fondamentale et Appliquée, 59650 Villeneuve d'Ascq

Lieux de réalisation de la recherche

- Recrutement des patients : Département de Neurochirurgie, CHRU de Lille, sous la coordination du Dr Emilie Le Rhun

Lieu des analyses

- Analyses anatomopathologiques et de biologie moléculaire : au Centre de Biologie Pathologie, CHRU Lille, 59037 Lille Cedex
- Analyse de spectrométrie de masse : au laboratoire de Spectrométrie de Masse Biologique Fondamentale et Appliquée, 59650 Villeneuve d'Ascq

2. Objectifs de l'étude

Le but de l'étude est d'évaluer l'intérêt de la spectrométrie de masse couplée à la microprotéomique dans les gliomes anaplasiques et glioblastomes par rapport aux données de la classification OMS des gliomes.

L'objectif principal initial était d'évaluer la concordance entre la classification

OMS 2007 et la classification par spectrométrie de masse des gliomes (lipides, peptides, protéines).

Suite à la présentation du projet au Comité de Suivi de Thèse du 29 septembre 2015, les objectifs de l'étude ont été modifiés.

Il a été décidé :

- (1) de réaliser les analyses préliminaires sur 10 échantillons de gliomes anaplasiques afin de valider la faisabilité de la technique,
- (2) puis de centrer l'étude sur l'analyse des échantillons de glioblastomes, en continuant à inclure en prospectif des patients présentant un nouveau diagnostic de glioblastome et correspondant aux autres critères d'inclusion, puis de compléter cette cohorte par une cohorte de 50 cas qui seront ensuite collectés de façon rétrospective après validation du projet par les autorités compétentes. La cohorte prospective permet de recueillir des échantillons de tumeurs selon des critères de qualité optimale et de sang, la cohorte rétrospective permettra d'atteindre plus rapidement les 100 échantillons tumoraux attendus dans cette étude.
- (3) d'intégrer la nouvelle classification OMS, dont la publication était alors prévue.

Seuls les nouveaux objectifs de l'étude GLIOMIC sont présentés par la suite dans cette thèse.

Objectif principal

L'objectif de cette étude est d'évaluer la concordance entre la classification OMS 2016 et la classification par spectrométrie de masse (métabolites, lipides, peptides ou protéines) couplée à la microprotéomique des gliomes de haut grade.

Objectifs secondaires

Les objectifs secondaires sont :

- d'évaluer la discordance *a posteriori* entre la classification standard OMS 2016 et la classification par spectrométrie de masse (métabolites, lipides, peptides ou protéines) des gliomes de haut grade.
- d'évaluer la concordance entre la classification OMS 2016 couplée à l'analyse génétique (par immunohistochimie et biologie moléculaire) et à l'interprétation

de l'IRM et la classification par spectrométrie de masse (métabolites, lipides, peptides ou protéines) couplée à la microprotéomique des gliomes de haut grade.

- d'évaluer la discordance *a posteriori* entre la classification standard OMS 2016 couplée à l'analyse génétique (par immunohistochimie et biologie moléculaire) et à l'interprétation de l'IRM et la classification par spectrométrie de masse (métabolites, lipides, peptides ou protéines) des gliomes de haut grade.
- d'identifier par spectrométrie de masse (métabolites, lipides, peptides ou protéines) des marqueurs au sein des prélèvements sanguins moléculaires de pronostic des gliomes de haut grade.
- d'évaluer différents marqueurs de biologie moléculaire non utilisés en routine sur les prélèvements tumoraux des patients inclus dans l'étude.

3. Critères d'évaluation de l'étude

Critère Principal :

- L'analyse *kappa* permettra d'évaluer la concordance entre la classification standard OMS 2016 et la classification par spectrométrie de masse des gliomes.

Critères Secondaires :

- La survie globale et la survie sans progression *a posteriori* permettront d'évaluer la discordance entre la classification histopronostique OMS 2016 et la classification par spectrométrie de masse des gliomes.
- L'analyse *kappa* permettra d'évaluer la concordance entre la classification OMS 2016 (données anatomopathologiques) couplée à l'analyse moléculaire (1p, 19q, IDH1, IDH2, MGMT) et à l'interprétation de l'IRM (prise de contraste, nécrose, perfusion...) et la classification par spectrométrie de masse des gliomes (données de la spectrométrie de masse).

- La survie globale et la survie sans progression *a posteriori* permettront d'évaluer la discordance entre la classification histologique couplée à l'analyse moléculaire et à l'interprétation de l'IRM et la classification par spectrométrie de masse des gliomes.
- La comparaison des prélèvements tumoraux et sanguins par spectrométrie de masse permettra de rechercher des marqueurs moléculaires sanguins de pronostic des gliomes.
- La survie sans progression et la survie globale permettront d'étudier la valeur diagnostique et pronostique de certains marqueurs non évalués en routine en anatomie pathologique et en biologie moléculaire au CHRU de Lille (mutation de l'histone H3, PDGFR alpha, erbB2, PTEN, p16/CDKN2A) et en biologie moléculaire (chromosome 10, amplifications ou délétions d'EGFR, pertes de PTEN, pertes de CDKN2A, amplifications d'HER2, amplifications de P53, mutations de KRAS, BRAF, P3Kinase).

4. Critères d'inclusion

Suite à la réunion de Comité de suivi de thèse de septembre 2015, il a été décidé de centrer l'analyse sur les glioblastomes et de ne plus inclure de gliomes anaplasiques.

1. Patients atteints d'un gliome anaplasique (1^{ère} partie du travail), gliome de grade IV (glioblastome) nouvellement diagnostiqué avec preuve histologique selon la classification OMS 2016 (2^{ème} partie du travail),
2. Indication chirurgicale retenue,
3. Tissu tumoral disponible à la tumorothèque de Lille,
4. Homme ou femme âgé ≥ 18 ans,
5. Personne bénéficiant d'un régime de protection sociale,
6. Consentement éclairé et signé par le patient ou son représentant légal.
7. Absence d'antécédent d'autre cancer, sauf cancer baso-cellulaire cutané ou cancer *in situ* du col de l'utérus,
8. Absence d'antécédent de radiothérapie encéphalique,

9. Absence de traitement systémique anti-tumoral (chimiothérapie ou thérapie ciblée) antérieur à la chirurgie du gliome,
10. Absence de maladie génétique pouvant être à l'origine de tumeur cérébrale, tumeur potentiellement radio-induite,
11. Absence d'antécédent de maladie neurologique dégénérative antérieure au diagnostic,
12. Absence de contre-indication à l'IRM,
13. Patient capable de se conformer aux exigences du protocole,
14. Patient non en situation d'urgence,
15. Patient non en détention.

5. Nombre de participants et analyse statistique

En 2012, le recrutement au CHRU était de plus de 150 glioblastomes et de plus de 40 gliomes anaplasiques. En pratique, dans la population des gliomes de grade III et IV, le recrutement annuel au CHRU est de 25% de grade III et de 75% de grade IV.

Détermination du nombre de sujets

Après avis du Comité de Suivi de Thèse de septembre 2015, et en tenant compte du recrutement du CHRU de Lille, il a été décidé d'inclure :

- 10 patients avec un nouveau diagnostic retenu de gliome anaplasique en prospectif
- 50 patients avec un nouveau diagnostic retenu de glioblastome en prospectif (la cohorte de glioblastomes sera ensuite étendue dans le cadre d'un amendement du protocole).

Pour être considérés évaluable, les échantillons tumoraux doivent :

- provenir de patients ayant signé le consentement de participation à l'étude
- provenir de patients présentant les critères d'inclusion
- être parvenus à la tumorotheque dans les 2 heures après exérèse chirurgicale

Les échantillons ne présentant pas ces critères ne seront pas gardés dans l'analyse de l'étude et seront remplacés pour arriver au nombre d'échantillons prévus dans cette étude.

Méthode et stratégie d'analyse

Les analyses statistiques bio-informatiques seront réalisées par le groupe du Professeur Maass, à l'Université de Bremen en Allemagne, en intégrant les données issues de l'analyse en spectrométrie de masse (métabolites, lipides, peptides ou protéines) et les données cliniques (âge, localisation de la tumeur, caractéristiques IRM), statuts IDH1, ATRX, P53, EGFR, MGMT, codélétion 1p19q, analyses NGS notamment des chromosomes 7 et 10, amplification EGFR et statut CDKN2A, survie sans progression et survie globale. La survie sans progression sera définie par le temps entre le diagnostic et la 1ère progression de la maladie selon les critères RANO. La survie globale sera définie par le temps entre le diagnostic et le décès du patient (décès lié à la pathologie ou sa prise en charge).

6. Description du déroulement général de l'étude

La participation au protocole GLIOMIC est proposée aux patients avec une suspicion de gliome de haut grade lors des consultations réalisées dans le cadre du soin avant la chirurgie.

Les patients répondant a priori aux critères d'inclusion, c'est à dire pour lesquels le diagnostic de gliome de haut grade est fortement évoqué en préopératoire, reçoivent l'information nécessaire (l'objectif de l'étude, déroulement, bénéfices et risques...) par l'un des investigateurs. Un délai de réflexion nécessaire leur est accordé. Les patients doivent signer le consentement libre et éclairé avant toute participation à l'étude. Une fois le formulaire de consentement signé, le prélèvement tumoral obtenu lors de la chirurgie du patient est transféré dans les meilleurs délais (moins de 2 heures) de la salle d'opération au service d'anatomopathologie du CHRU de Lille dans un conteneur dédié permettant d'entourer de glace le prélèvement chirurgical afin de limiter la dégradation des protéines. Le conteneur est étiqueté GLIOMIC. L'heure à laquelle le prélèvement quitte le bloc opératoire et l'heure de sa réception dans le service d'anatomopathologie sont notées. La tumeur est séparée en deux fragments, un traité dans le cadre du circuit classique du soin et l'autre dédié exclusivement à l'étude.

Un échantillon de sang est également prélevé au bloc opératoire ou pendant l'hospitalisation du patient. Aucun examen supplémentaire n'est réalisé en dehors du prélèvement d'un tube de sang de 5 millilitres.

Cette procédure ne modifie pas la prise en charge habituelle des patients.

7. Données recueillies dans le cadre du protocole GLIOMIC

Les analyses génétiques réalisées au cours de l'étude ne concernent que le génome tumoral.

Données démographiques et cliniques

Date de naissance, date du diagnostic, âge au diagnostic, sexe, Eastern Oncology Group (ECOG)-Performance Status, date de la chirurgie, type de prélèvement, qualité de l'exérèse chirurgicale, description des différentes lignes de traitement, date de récurrence ou de progression, date de décès et cause de décès liée à la maladie ou autre.

Date et données de l'imagerie morphologique standard (IRM)

- Sur l'examen initial : localisation de la tumeur, volume initial, présence de nécrose, de remaniements hémorragiques, caractéristiques de la perfusion (présence d'une hyperperfusion et caractéristiques de la perméabilité lésionnel).

Sur l'examen post-opératoire réalisé dans les 48 heures : qualité de l'exérèse chirurgicale, remaniements post-opératoires.

- Sur les examens de suivi : évaluation selon les critères RANO.

Analyse pathologique et moléculaire des échantillons tumoraux réalisée au CHRU de Lille

- Analyses standards

- en anatomopathologie (immunohistochimie): IDH (R132H), p53, EGFR.
- en biologie moléculaire: 1p, 19q, IDH1, IDH2, MGMT / NGS (next-generation sequencing)

Les analyses IDH et 1p/19q sont réalisées en routine dans le cadre de la classification OMS 2016.

- Examens ou analyses supplémentaires réalisés dans le cadre du protocole de recherche

- en anatomopathologie: mutation de l'histone H3, PDGRF alpha, erbB2, PTEN, p16/CDKN2A.
- en biologie moléculaire : analyse du chromosome 10, recherche sur tissus congelés des amplifications ou délétions d'EGFR, des pertes de PTEN, des pertes de CDKN2A, des amplifications d'HER2, des amplifications ou mutations de P53, des mutations de KRAS, BRAF, P3Kinase, mutations de TERT.

Ces analyses seront rediscutées au moment de l'analyse finale des échantillons tumoraux.

Echantillon tumoral identifié, issu de la tumorotheque pour analyse protéomique

Les échantillons tumoraux (lames paraffinées et lames congelées) sont conservés par la tumorotheque. Les coupes congelées sont stockées à -80°C et les coupes FFPE à température ambiante jusqu'à enlèvement. Les échantillons sont alors acheminés lors d'envois groupés dans le laboratoire PRISM dans une chambre permettant le transport des lames dans de la glace pour les tissus frais ou dans des boîtes remplies d'un piègeur d'humidité pour les tissus FFPE. Les échantillons sont alors stockés dans les congélateurs sécurisés à -80° C au laboratoire PRISM, U1192 INSERM.

- **Réalisation des coupes**

- les tissus frais congelés : les morceaux suffisamment grands sont coupés sans enrobage au cryostat, les morceaux plus petits sont enrobés lors de la congélation dans du carboxyméthylcellulose (CMC) à 2% puis coupés au cryostat avec ce milieu d'enrobage et déposés sur lames ITO.

- les tissus fixés et enrobés dans la paraffine : ces tissus seront coupés au microtome et déposés sur des lames ITO traitées préalablement à la polylysine.

- **Séries de lames**

- Série de 7 lames en tissus frais congelés

La série de 7 lames en tissu frais congelé se décomposera ainsi :

- 2 lames (poly-Lysine ou superfrost) avec une coloration histologique (épaisseur standard 5 à 7 μm) permettant de réaliser une lame virtuelle annotée.
- 2 lames conductrices (ITO) avec des coupes de 7 μm d'épaisseur (2 coupes minimum, surface totale de tissu entre 25 mm^2 et 1 cm^2) destinées à l'analyse en imagerie MALDI
- 3 lames (poly-Lysine ou superfrost) avec des coupes à 20 μm (deux lames) et à 12 μm (une lame) d'épaisseur (2 coupes minimum, surface totale de tissu entre 25 mm^2 et 1 cm^2) destinées à l'analyse microprotéomique.

- Série en FFPE

En fin d'étude, les échantillons inutilisés seront intégralement restitués à la tumorothèque du CHRU de Lille

- **Disposition sur la lame**

De 1 à 3 coupes congelées ou FFPE sont déposées sur les lames pour avoir une surface de tissus de 1 à 2 cm^2 .

- **Utilisation des lames**

Les différentes lames sont utilisées comme suit :

- La lame colorée et annotée permet de repérer facilement les régions d'intérêt dans les coupes destinées à l'imagerie moléculaire et la microprotéomique.
- Une coupe déposée sur lame ITO est utilisée pour l'analyse et la localisation de protéines entières (10 à 30 kDa) après réalisation de différents traitements, puis recouvertes d'une solution de matrice, molécule organique nécessaire pour l'analyse en spectrométrie de masse.
- Une coupe déposée sur lame ITO est utilisée pour l'analyse et la localisation de petites molécules (métabolites, lipides...), puis recouverte d'une solution de matrice, molécule organique nécessaire pour l'analyse en spectrométrie de masse.
- Une coupe déposée sur lame ITO est utilisée pour l'analyse et la localisation de protéines après digestion enzymatique (permettant l'accès à des protéines de haut poids moléculaires jusqu'à 100kDa) en utilisant des instruments de micro-dépôt ou de nébulisation pour conserver la localisation des protéines, puis recouvertes d'une solution de matrice, molécule organique nécessaire pour l'analyse en spectrométrie de masse.
- Une coupe déposée sur lame classique est utilisée pour réaliser des digestions

localisées sur des zones d'intérêts de 500µm de diamètre environ puis des extractions liquides des peptides de digestion sont effectuées par un dispositif de micro-jonction liquide. L'extrait liquide est ensuite purifié et une nano chromatographie liquide est réalisée pour séparer les peptides obtenus et faciliter leur identification en couplage par spectrométrie de masse (Orbitrap).

- Une coupe déposée sur lame classique est utilisée pour réaliser des extractions liquides localisées sur des zones d'intérêts de 800 µm de diamètre environ des protéines entières par un dispositif de micro-jonction liquide. L'extrait liquide est ensuite soumis à une analyse GeLCMS/ MS consistant en un préfractionnement en SDS-PAGE, une digestion des bandes et une séparation nano-LC pour séparer les peptides obtenus et faciliter leur identification en couplage par spectrométrie de masse (Orbitrap).

- Pour la série de lames FFPE, seules les expériences de digestion enzymatique (suivies de la réalisation d'une image de micro-extraction liquide) sont réalisées. Ces lames seront de plus soumises à un protocole de démasquage d'antigènes.

Les résultats sont donnés soit sous forme de liste de m/z correspondant à des masses de molécules, soit sous forme de listes de protéines identifiées.

Prélèvement sanguin pour analyse protéomique

Le tube de 5 ml de sang sur tube hépariné est prélevé lors de l'hospitalisation initiale du patient au moment de la prise en charge chirurgicale dès que celui-ci a accepté de participer à l'étude.

Ce tube est acheminé par un transporteur spécialisé dans la glace dans le laboratoire PRISM. Le plasma sera purifié des protéines sanguines majoritaires (6 protéines majoritaires: albumine, IgG, IgA, transferrine, haptoglobuline et l'antitrypsine) par passage sur colonne d'affinité de type MARS (Biorad). L'analyse des échantillons sanguins sera réalisée après obtention des résultats sur les échantillons tumoraux.

8. Lettre d'information et consentements pour les patients

Note d'Information version 1 du 22/12/2013 GLIOMIC

Note d'information pour les participants à la recherche biomédicale intitulée :

« Recherche de biomarqueurs protéiques dans le but de réaliser une classification moléculaire des gliomes » – Etude GLIOMIC

Promoteur : CHRU de Lille

Investigateur Principal : Dr Emilie Le RHUN

Clinique de Neurochirurgie, Hôpital Roger Salengro 59037 LILLE Cedex Tél : 03 20

44 65 22 - Fax : 03 20 44 68 08

Madame, Monsieur,

Le présent document décrit l'étude à laquelle il vous est proposé de participer. Il résume les informations actuellement disponibles en répondant aux différentes questions que vous pouvez vous poser dans le cadre de votre participation à cette recherche.

1) Pourquoi me propose-t-on de participer à cette étude?

Cette étude vous est proposée car vous allez être opéré(e) ou vous venez d'être opéré(e) d'une lésion évoquant un gliome de haut grade (un gliome est une tumeur cérébrale).

A l'heure actuelle, la prise en charge des gliomes de haut grade est basée sur la classification histo-pronostique des tumeurs du système nerveux central de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS 2007). On entend par histo-pronostique l'évaluation du pronostic d'une tumeur maligne fondée sur l'étude de son aspect histologique au microscope.

Cette classification nécessite une grande expertise, car il existe un risque de manque de reproductibilité inter-observateurs (entre 2 observateurs différents) mais également intra- observateur (même observateur à des moments différents). De plus, après relecture collégiale experte des préparations microscopiques, éliminant les problèmes de reproductibilité, deux patients atteints d'une tumeur identique (type histologique et grade histo-pronostique) peuvent avoir un pronostic très différent après avoir bénéficié du même traitement. Une classification histo-moléculaire (basée sur de nouveaux marqueurs biologiques et génétiques) des gliomes tend à

Note d'Information version 1 du 22/12/2013 GLIOMIC

compléter la classification purement microscopique de l’OMS.

Une voie alternative à la classification purement microscopique par la détermination des biomarqueurs moléculaires serait la technique d’imagerie par spectrométrie de masse (la spectrométrie de masse est une technique physique d’analyse permettant de détecter et d’identifier des molécules d’intérêt par mesure de leur masse). Cette technique identifie directement sur une coupe de la tumeur des petites molécules (lipides, métabolites et peptides) et permet de classer les différentes zones tumorales en fonction de leur contenu en petites molécules.

2) Quel est l’objectif de la recherche ?

L’objectif principal de l’étude est d’évaluer la concordance entre la classification OMS 2007, utilisée actuellement, qui permet de définir le type et le grade d’une tumeur, et la spectrométrie de masse qui mesure les lipides, les peptides et les protéines du gliome, et de vérifier si cette nouvelle technique permet une meilleure évaluation du pronostic de la tumeur dès son diagnostic afin d’améliorer la prise en charge thérapeutique.

3) Comment va se dérouler la recherche ?

Vous avez été récemment opéré(e) ou vous serez prochainement opéré(e) d’une lésion cérébrale dont les caractéristiques en IRM font évoquer un gliome de haut grade. L’indication opératoire n’est pas retenue en fonction de votre participation ou non à cette étude.

Dans le cadre de l’étude GLIOMIC et avant la mise en œuvre de toute procédure liée à cette étude, vous aurez donné votre accord de participation (en datant et signant le formulaire de consentement éclairé qui vous sera remis). Comme dans le cas de chaque chirurgie, la tumeur enlevée sera analysée selon les techniques habituelles au CHRU de Lille dans les laboratoires d’anatomopathologie et de biologie moléculaire afin d’obtenir le diagnostic précis de votre tumeur selon la classification OMS 2007. Une partie de la tumeur sera traitée au laboratoire du Pr SALZET de l’Université de Lille 1 pour réaliser des analyses par la technique de spectrométrie de masse.

Note d’Information version 1 du 22/12/2013 GLIOMIC

Aucun examen supplémentaire ne sera réalisé en dehors du prélèvement d’un tube

de sang de 5 ml.

4) Que se passera-t-il à la fin de ma participation à cette recherche ?

Votre participation à cet essai sera terminée après la chirurgie et la prise de sang.

Votre participation est volontaire, ainsi vous pouvez décider de retirer votre consentement à tout moment si vous le souhaitez (sans avoir à fournir de justification et sans encourir aucune responsabilité ni aucun préjudice de ce fait). Les autorités de santé peuvent décider d'arrêter votre participation à cet essai clinique à tout moment, et ce, dans votre intérêt. De même, Le Promoteur et/ou votre médecin peuvent décider dans les circonstances définies ci-après d'interrompre votre participation.

5) Quels sont les bénéfices attendus ?

Il n'y a pas de bénéfice direct pour votre participation à cette recherche. L'étude GLIOMIC permettra d'accroître les connaissances sur cette pathologie pour améliorer à terme la prise en charge des personnes atteintes comme vous d'un gliome.

6) La recherche comporte-t-elle des risques, des effets indésirables et/ou des contraintes particulières ?

Par rapport à la prise en charge standard, seuls des examens biologiques supplémentaires seront réalisés sur la tumeur opérée. Aucun examen supplémentaire ne sera réalisé en dehors du prélèvement d'un tube de sang de 5ml. Aucun risque ou effet secondaire lié à l'analyse de la tumeur n'est attendu dans le cadre de cette étude. L'indication de chirurgie n'est pas retenue en fonction de la participation à cet essai. Les prélèvements chirurgicaux serviront d'abord à l'analyse standard permettant le diagnostic. Les études de biologie complémentaires ne seront réalisées qu'en cas de prélèvement de volume suffisant.

Les effets secondaires possibles de la prise de sang sont : hématome, infection au point de ponction, malaise vagal.

Tous les frais liés à la recherche seront pris en charge par le promoteur de l'étude.

Note d'Information version 1 du 22/12/2013 GLIOMIC

7) Quelles sont les conditions de participation à la recherche ?

Afin de pouvoir participer à cette étude, vous devez être affilié(e) à un régime

obligatoire d'Assurance Maladie ou ayant droit d'un assuré social. Votre participation à cette étude nécessite que nous informions votre médecin traitant, sauf si vous le refusez.

8) Quels sont mes droits en tant que participant à la recherche ?

Vous êtes libre d'accepter ou de refuser de participer à cette recherche sans avoir à vous justifier et sans que cela ne modifie la relation de soin existant avec l'équipe médicale vous prenant en charge.

Vous n'êtes pas obligé(e) de nous donner votre décision tout de suite ; vous disposez du temps que vous estimez nécessaire pour prendre votre décision.

En cas d'acceptation, vous pourrez à tout moment revenir sur votre décision, sans nous en préciser la raison, et sans que cela n'altère la qualité des soins qui vous sont dispensés. Par ailleurs, vous pourrez obtenir au cours ou à l'issue de la recherche, la communication de vos données de santé détenues par votre médecin.

Dans le cadre de la recherche, un traitement de vos données personnelles sera mis en œuvre pour permettre d'analyser les résultats de l'étude au regard de l'objectif de cette dernière qui vous a été présentée. A cette fin, les données médicales vous concernant ou tout autre type de données existantes seront transmises au Promoteur de la recherche ou aux personnes ou société agissant pour son compte en France ou à l'étranger. Ces données seront identifiées par un numéro de code et vos initiales. Ces données pourront également, dans des conditions assurant leur confidentialité, être transmises aux autorités de santé françaises. Conformément aux dispositions de la loi relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés, vous disposez d'un droit d'accès et de rectification. Vous disposez également d'un droit d'opposition à la transmission des données couvertes par le secret professionnel susceptibles d'être utilisées et traitées dans le cadre de cette recherche. Ces droits s'exercent auprès du médecin qui vous a proposé de participer à cette étude.

Si vous le souhaitez, vous obtiendrez la communication des résultats globaux de l'étude à la fin de celle-ci. Vous n'aurez à supporter aucune charge financière supplémentaire du fait de votre participation à cette étude.

Note d'Information version 1 du 22/12/2013 GLIOMIC

9) Le CHRU de Lille est-il autorisé à réaliser ce type de recherche ?

Oui, en application de la loi, cette étude a été autorisée par l'ANSM¹, le 04/03/2014 ;

elle a également reçu, le 08/04/2014, un avis favorable du Comité de Protection des Personnes Nord Ouest IV, organisme officiel et indépendant qui a vocation à protéger la sécurité des personnes qui se prêtent à la recherche.

¹ Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé.

En outre, le CHRU de Lille, en sa qualité de promoteur, a souscrit une assurance pour la réalisation de cette étude (SHAM, n° 144.893).

10) A qui dois-je m'adresser en cas de questions ou de problèmes ?

Vous pouvez poser toutes les questions que vous souhaitez, avant, pendant et après l'étude en vous adressant au docteurau numéro suivant :

En cas d'urgence et si votre médecin n'est pas joignable, vous pouvez vous adresser au Dr Emilie Le Rhun, médecin coordonnateur de cette recherche, au 03 20 44 65 22.

*Nous vous remercions de parapher chaque page de ce document (réalisé en trois exemplaires), afin d'attester que vous l'avez lu et compris. Si vous êtes d'accord pour participer à cette étude, nous vous remercions également de bien vouloir donner votre consentement écrit en signant le formulaire ci-après.

Formulaire de consentement de participation à la recherche biomédicale intitulée :

« Recherche de biomarqueurs protéiques dans le but de réaliser une classification moléculaire des gliomes » – Etude GLIOMIC

Promoteur : CHRU de Lille

Investigateur Principal: Dr Emilie Le RHUN Clinique de Neurochirurgie, Hôpital Roger Salengro 59037 LILLE Cedex Tél : 03 20 44 65 22 - Fax : 03 20 44 68 08

Je soussigné(e) Mme, Mlle, M. (rayer les mentions inutiles) accepte librement et volontairement de participer à la recherche biomédicale intitulée :

«Validation d'une classification moléculaire des gliomes par analyse des biomarqueurs protéiques – Etude GLIOMIC»

dont le CHRU de Lille est promoteur et qui m'a été proposée par le Docteur/Professeur (nom, coordonnées).....

Etant entendu que :

- Le médecin qui m'a informé(e) et a répondu à toutes mes questions, m'a précisé que ma participation à cette étude est libre et que je peux arrêter d'y participer à tout moment en informant préalablement mon médecin. - J'ai été clairement informé(e) des éléments suivants : But de la Recherche- Méthodologie - Durée de ma participation - Bénéfices attendus – Contraintes - Risques prévisibles.
- J'ai bien compris que pour pouvoir participer à cette recherche, je dois être affilié(e) à un régime de sécurité sociale ou être ayant-droit d'un assuré social. Je confirme que c'est bien le cas.
- Si je le souhaite, je serai informé(e) par le médecin des résultats globaux de cette recherche selon les modalités figurant dans la note d'information qui m'a été remise, - Mon consentement ne décharge en rien le médecin et le promoteur de l'ensemble de leurs responsabilités et je conserve tous mes droits garantis par la loi.

Dans le cadre de cette étude, un examen de mon génome tumoral va être effectué :

J'accepte que cet examen soit effectué dans le cadre de cette étude, conformément à ce qui m'a été expliqué.

Je refuse que cet examen soit effectué.

Fait à, le.....
Signature du participant
ou du représentant légal (barrer la
mention inutile)

Fait à, le.....
Signature du médecin investigateur

Le présent formulaire est réalisé en trois exemplaires, dont un est remis à l'intéressé.
Un exemplaire sera conservé par l'investigateur ; le dernier sera conservé par le
promoteur en toute confidentialité, conformément à la loi.

**FORMULAIRE D'INFORMATION ET DE CONSENTEMENT POUR LA
CONSERVATION ET L'UTILISATION DES PRELEVEMENTS BIOPSIQUES ET
CHIRURGICAUX**

IDENTIFIANT DU PATIENT (étiquette)

Nom
Prénom
Date de naissance

Madame, Monsieur,

Dans le cadre de votre prise en charge au sein du service de neurochirurgie du Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille, des prélèvements seront/ont été effectués afin d'établir le diagnostic et de vous proposer le traitement le mieux adapté à votre pathologie.

Vos prélèvements et échantillons seront conservés pour votre bénéfice au sein du Centre de Biologie-Pathologie Pierre-Marie DEGAND du CHRU.

Sauf opposition de votre part une partie de ces échantillons pourra être utilisée pour la recherche médicale ou scientifique, dans le respect de la confidentialité.

Aucun prélèvement supplémentaire par rapport à votre prise en charge médicale habituelle ne sera effectué à cette fin.

Aucun examen des caractéristiques génétiques constitutionnelles ne sera réalisé sans votre consentement écrit.

N'hésitez pas à nous poser toutes les questions qui vous semblent nécessaires sur l'intérêt et les modalités de conservation de prélèvements au 03 20 44 49 84.

Cochez la case correspondant à votre choix :

J'accepte de donner mon consentement pour la conservation et l'utilisation de mes échantillons biologiques, ainsi que la diffusion des données clinico-biologiques associées anonymisées à des fins de recherche médicale et scientifique.

Je refuse de donner mon consentement pour la conservation et l'utilisation de mes échantillons biologiques à des fins de recherche médicale et scientifique.

A Lille, le :

Nom et signature du patient:

A Lille, le :

Qualité, Nom et signature de la personne ayant délivré l'information :

Si vous changez d'avis, vous pouvez à tout moment nous en faire part par écrit à l'adresse suivante : Institut de Pathologie, Centre de Biologie-Pathologie, Tumorotheque, CHRU de Lille, 2 avenue Oscar Lambret, 59037 Lille cedex.

Ou par Fax au 03 20 44 47 27

Ou par e-mail : tumorotheque@chru-lille.fr

« Les données médicales recueillies sur le prélèvement seront réunies sur un fichier informatique permettant leur traitement automatisé dans le cadre de recherches. Conformément à la loi « informatique et libertés » du 6 janvier 1978, modifiée par la loi du 6 août 2004, vous disposez à leur égard d'un droit d'accès, de rectification et d'opposition. Si vous souhaitez exercer ce droit et obtenir communication des informations vous concernant, veuillez vous adresser au secrétariat de la Tumorotheque au 03 20 44 49 85»

« Conformément à la loi, les prélèvements ne pourront être cédés à titre commercial ni donner lieu à une rémunération à votre bénéfice. Ils pourront être utilisés pour des recherches effectuées par un ou plusieurs organismes publics ou privés »

Ce document est à réaliser en 3 exemplaires : un à remettre au patient, un à conserver dans le dossier médical et un à transmettre au service d'Anatomie et Cytologie-Pathologiques (Tumorotheque).

II. Résultats de l'analyse préliminaire sur les gliomes anaplasiques

1. Description des résultats

Comme nous l'avons vu dans le chapitre Généralités, le développement de nouvelles classifications a pour objectif d'identifier des entités tumorales plus homogènes sur le plan clinique et mieux définir pour chaque entité la meilleure stratégie thérapeutique. Dans notre travail, nous proposons une nouvelle approche visant à améliorer la classification OMS 2016 actuellement proposée basée sur des données histologiques et de biologie moléculaire, en intégrant des données de microprotéomique qui prennent en compte l'hétérogénéité tumorale rencontrée au niveau de chaque échantillon, mais également des données cliniques. Cette nouvelle approche en microprotéomique pourrait également permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques en fonction des protéines identifiées. Ainsi plusieurs questions sont posées : Peut-on corréliser les données de classification obtenues par imagerie en microprotéomique aux données cliniques, histologiques et génomiques et ainsi améliorer le diagnostic, le pronostic, voire les connaissances physiopathologiques ? peut-on identifier en microprotéomique de potentielles nouvelles cibles thérapeutiques ?

Des études protéomiques ont déjà été réalisées sur les lignées cellulaires de gliomes (Bock et al., 2012 ; Howler et al., 2012 ; Yoo et al., 2014 ; Yoo et al., 2014 ; He et al., 2014 ; Sangar et al., 2014 ; Collet et al., 2014 ; Yang et al., 2015 ; Leone et al., 2015 ; Autelitano et al., 2015 ; Mallawaarachy et al., 2015 ; Vogel et al., 2015 ; Chantaravisoot et al., 2015 ; Poschmann et al., 2015 ; Thirant et al., 2012 ; Okawa et al., 2016 ; Doll et al., 2016 ; Redzic et al., 2016 ; Jain et al., 2017), des modèles animaux (Goplen et al., 2006 ; Wibom et al., 2006 ; Rajcevic et al., 2009 ; Maruo et al., 2013 ; Ait Belkacem et al., 2014 ; Demeure et al., 2011), des fluides de patients (Gollapalli et al., 2012 ; Gautam 2013 ; Popescu et al., 2014 ; Nijaguna et al., 2015 ; Syed et al., 2016) ou des échantillons issus de patients humains, (Iwadate et al., 2004 ; Iwadate et al., 2005 ; Schwartz et al., 2005 ; Jiang et al., 2006 ; Khalil et al., 2007 ; Polisetty et al., 2013 et Stetson et al., 2016). Par ailleurs, principalement deux méthodologies ont été utilisées pour les études de protéomiques dans les gliomes : les techniques de profiling de protéines basées sur des gels (Deighton et al., 2014 ;

Guo et al., 2015 ; Simeone et al. 2014) et la protéomique quantitative (Nijaguan et al., 2015 ; Popescu et al., 2014 ; Patel et al., 2013 ; Polisetty et al., 2012). Aucune de ces techniques ne prend en compte la localisation spatiale des biomarqueurs et ne permet donc de tenir compte de l'hétérogénéité tumorale.

Nous proposons dans notre travail d'utiliser la méthodologie MSI couplée à l'analyse en microprotéomique, qui permet une analyse très précise de chaque région d'un échantillon tumoral. Nous nous sommes focalisés dans un premier temps sur une étude prospective de 10 individus de grade 3 afin de valider la technologie en vue d'une étude à plus grande échelle à la fois prospective de 50 patients et rétrospective de 50 autres patients.

Notre étude est basée sur une étude non supervisée par imagerie MALDI qui sera confrontée à celle du pathologiste afin d'appréhender le bénéfice de cette approche en protéomique vis-à-vis du rationnel déjà existant, puis de compléter cette classification par l'addition de la sous-classification par microprotéomique. L'idée sous-jacente est que l'apport de la microprotéomique réalisée sur plusieurs régions d'intérêt au sein de l'échantillon tumoral doit refléter l'hétérogénéité tumorale et apporter des informations sur les modifications post-transcriptionnelles et les fonctions des protéines tumorales, permettant d'améliorer la classification. Cette étude est pionnière car elle prend également en compte les données cliniques. La concordance avec classification OMS 2016 sera également étudiée.

L'objectif de cette première étude a été de valider la technique et de déterminer les caractéristiques moléculaires des gliomes anaplasiques par imagerie MALDI MSI et microprotéomique en résolution spatiale et de comparer les résultats obtenus aux données cliniques et histologiques. Cette première étape a fait l'objet d'un article publié dans *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* :

Le Rhun E, Duhamel M, Wisztorski M, Gimeno JP, Zairi F, Escande F, Reyns N, Kobeissy F, Maurage CA, Salzet M, Fournier I. Evaluation of non-supervised MALDI mass spectrometry imaging combined with microproteomics for glioma grade III classification. Biochim Biophys Acta. 2016 Nov 24.

Dans ce travail, nous avons vérifié la faisabilité de l'analyse MALDI Mass

Spectrometry Imaging (MALDI MSI) associée à la microprotéomique pour l'analyse d'échantillons tumoraux de gliomes anaplasiques congelés dans un délai inférieur à 2 heures et élaborer une première classification microprotéomique. Pour cela, une première cohorte servant à l'élaboration a été étudiée, puis une deuxième cohorte a servi à valider les données.

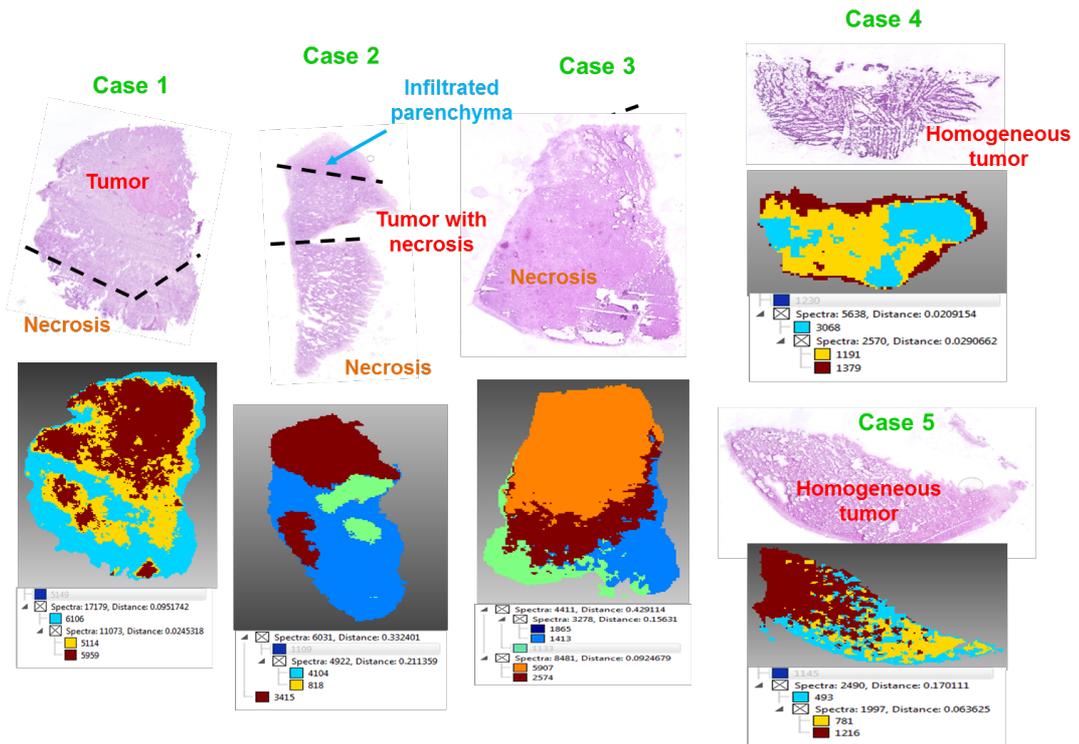
Elaboration de la classification

Une première cohorte de 5 patients était initialement analysée afin de servir de cohorte de classification. Les échantillons tumoraux étaient d'abord annotés par le Professeur Claude Alain Maurage après coloration par Hematoxyline Eosine Safran (HES) afin de définir les zones de nécrose et les zones de parenchyme infiltré par des cellules tumorales avant les analyses MALDI MSI. Puis les images MALDI MSI ont été réalisées après digestion des tissus par la trypsine.

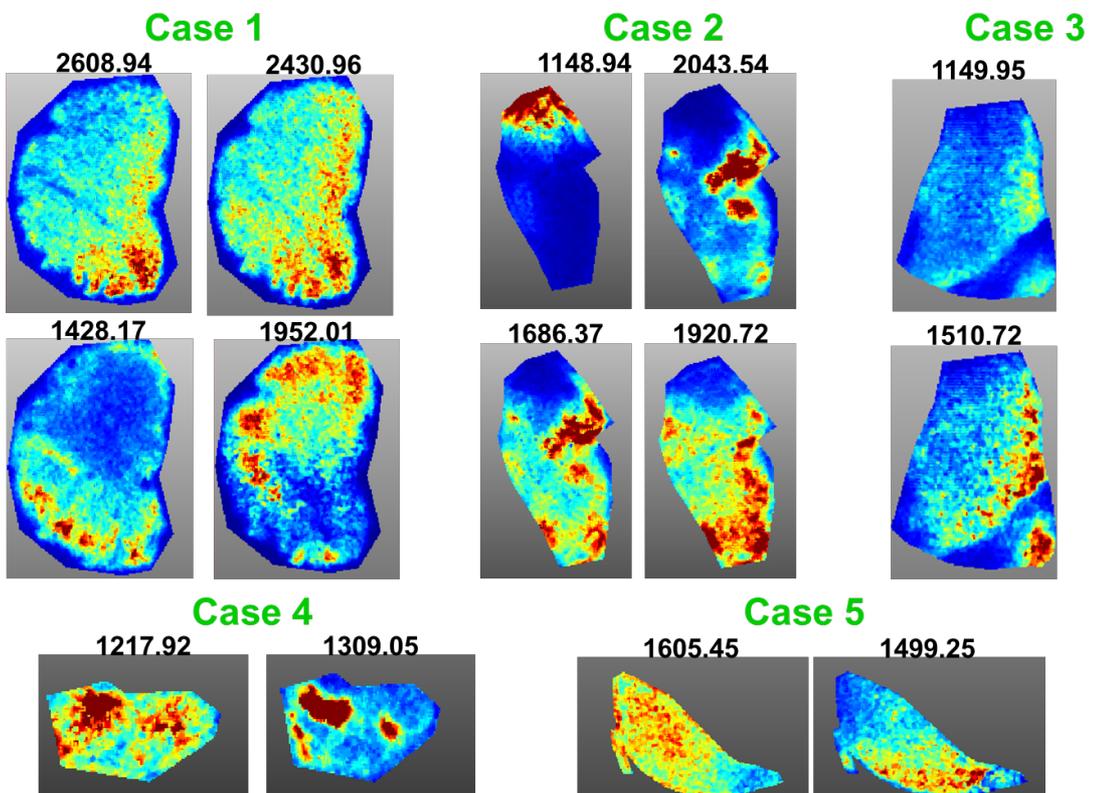
Un clustering individualisé a ensuite été réalisé à partir des données obtenues pour chaque échantillon tumoral (**Figure 12**) avec un spectre de segmentation spatiale pour chaque échantillon définissant ainsi des régions avec des profils moléculaires spécifiques. Les analyses individuelles ont confirmé la présence d'ions spécifiques délimitant des régions tumorales spécifiques et des zones spécifiques de nécrose (**Figure 12**). Ces analyses de segmentation individuelle ont mis en évidence des différences entre les annotations pathologiques basées sur les critères morphologiques et les résultats obtenus par les images MALDI MSI pour certains échantillons.

La segmentation globale de l'ensemble du set d'échantillons a également montré que certains échantillons partageaient des caractéristiques communes pouvant être regroupées sur le plan moléculaire. Trois régions moléculaires différentes ont été identifiées, regroupant les cas 1 et 4, le cas 5 et certaines régions des cas 2 et 3, ainsi que certaines parties des cas 2 et 3 (**Figure 12**).

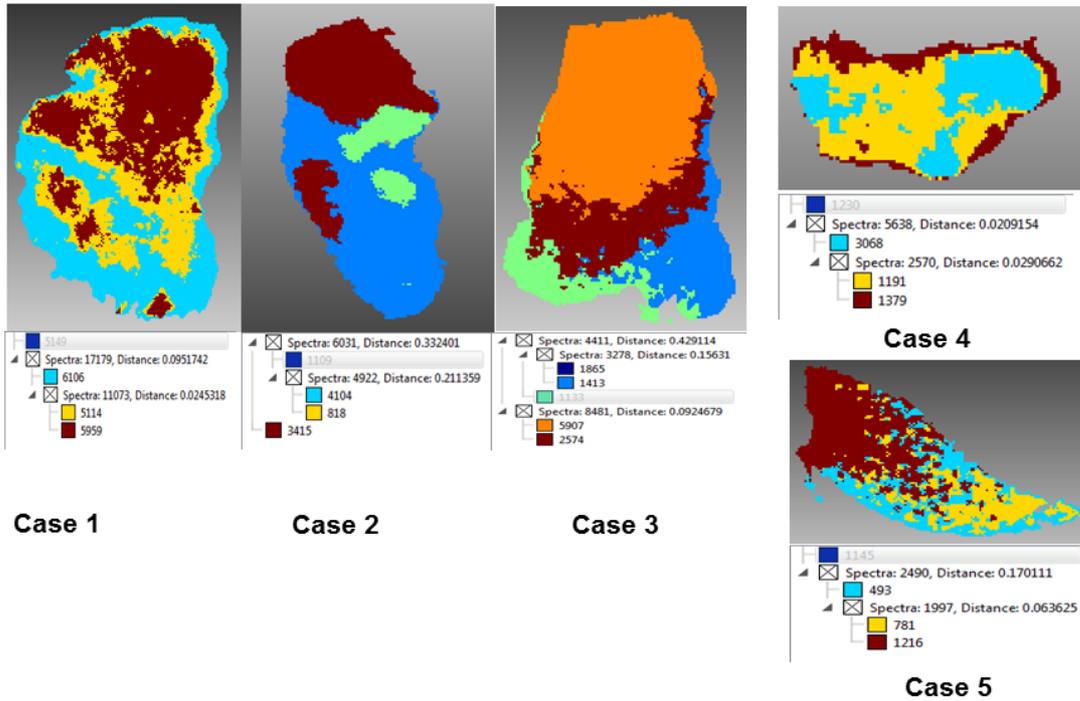
A



B



C



D

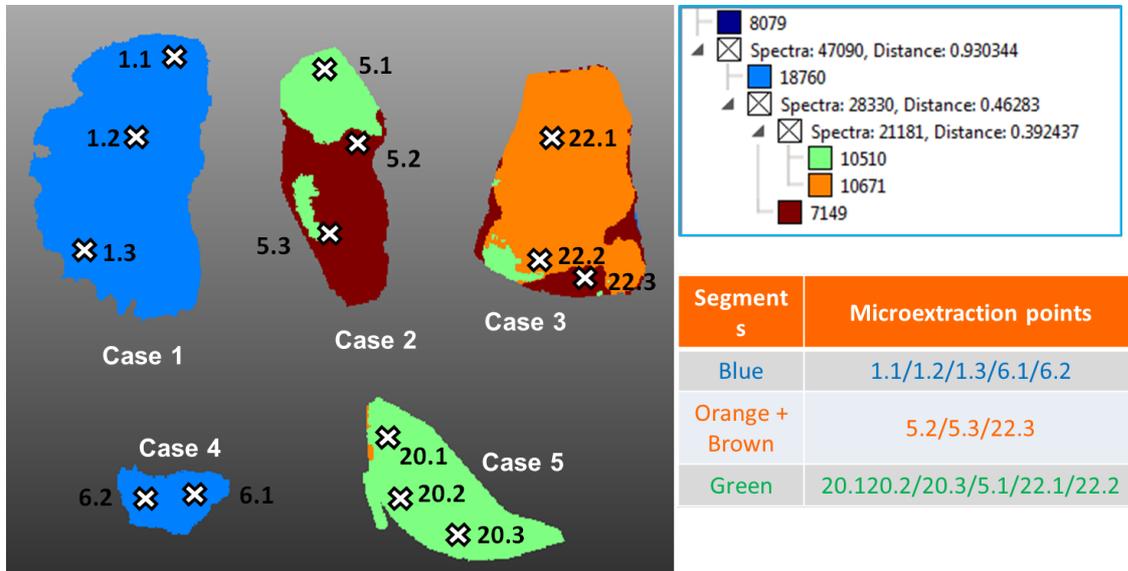


Figure 12 : Données histologiques et MALDI MSI des 5 cas de gliomes anaplasiques de la cohorte de classification

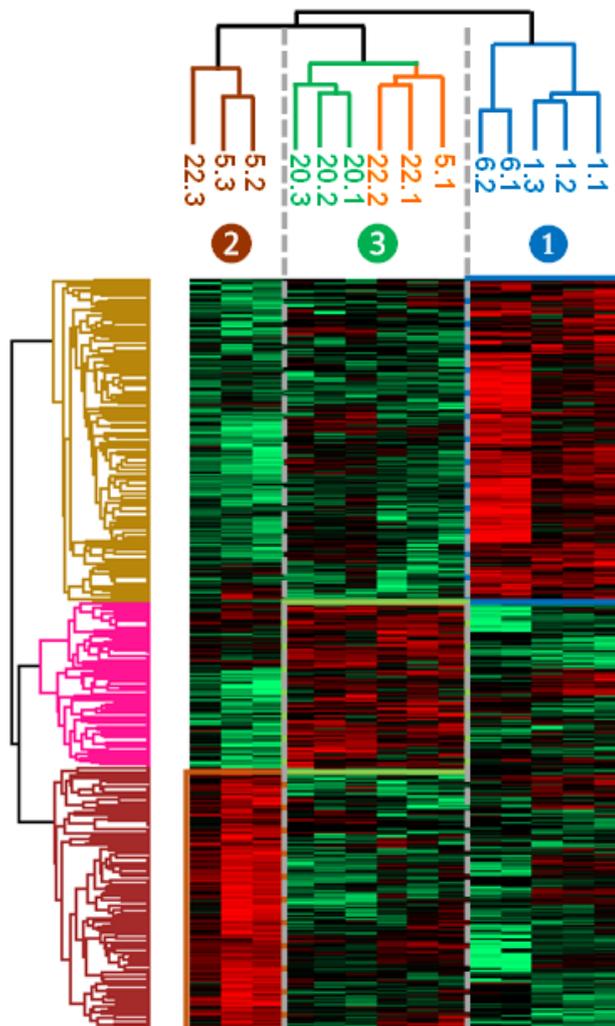
(A) images après coloration par hématoxyline-eosine-safran et annotations du pathologiste. (B) segmentation individuelle pour chaque cas. La carte de segmentation montre 3 clusters pour les cas 1, 2, 4 et 5 et 3 clusters pour le cas 3. Les couleurs représentent des régions moléculairement différentes. Pour 2 tissus différents, des couleurs similaires ne correspondent pas forcément à des groupes moléculaires identiques.

(C) images MALDI MSI des caractéristiques m/z

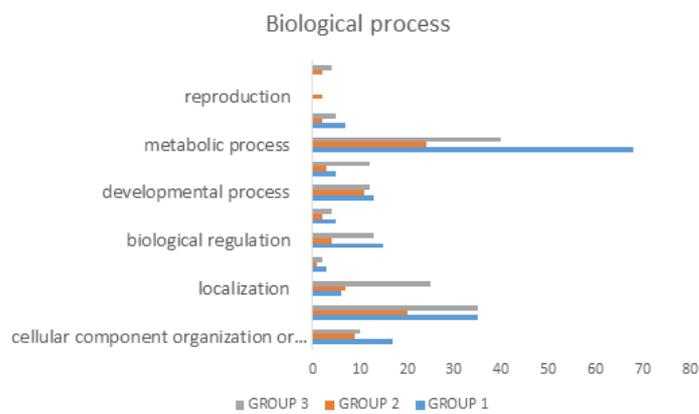
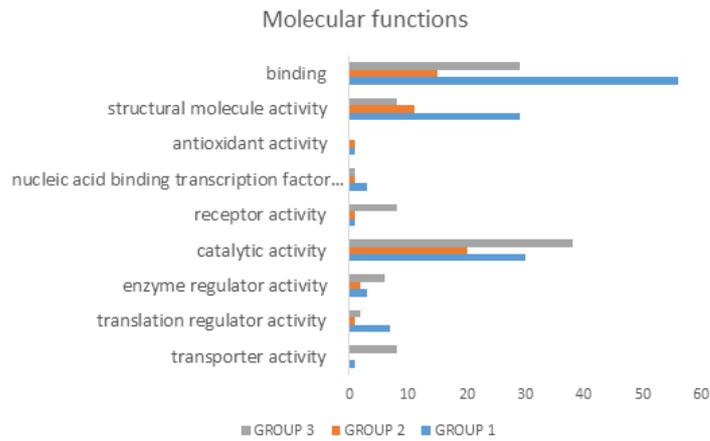
(D) segmentation globale de l'ensemble des tissus. Les couleurs représentent des régions moléculaires différentes. La segmentation met en évidence 4 clusters principaux. Les cas 1 et 4 sont moléculairement similaires et représentent le groupe bleu (groupe 1). Les cas 2, 3 et 5 sont groupés en orange, vert et brun. Ces derniers échantillons peuvent être subdivisés en 2 groupes : brun (groupe 2) et vert/orange (groupe 3). Les spots de micro-extraction (1.1, 1.2, 1.3 pour le cas 1 ; 5.1, 5.2, 5.3 pour les cas 2 ; 6.1, 6.2 pour le cas 4 ; 20.1, 20.2, 20.3 pour le cas 3, 22.1, 22.2 et 22.3 pour le cas 5) sont localisés dans les différentes régions d'intérêt et sont indiqués par une croix blanche.

Des analyses de microprotéomique ont alors été réalisées sur ces régions d'intérêt afin de rechercher les protéines caractéristiques des groupes et les régions définies par les données d'imagerie MALDI MSI. Le clustering hiérarchique a mis en évidence 2 branches principales, séparant les cas 1 et 4, des cas 2, 3 et 5 (**Figure-13**).

A



B



C

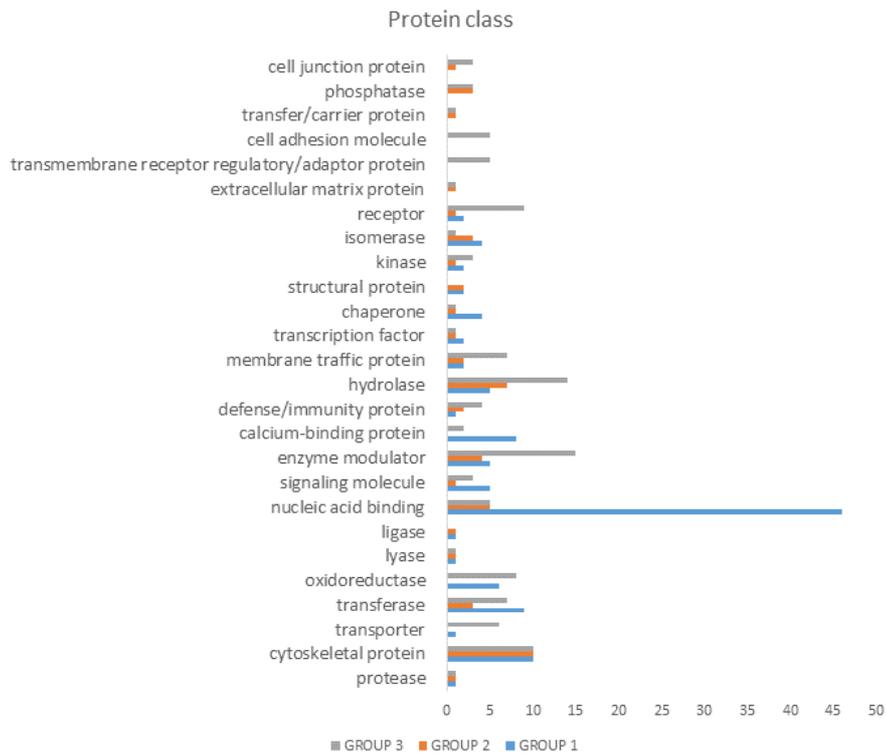


Figure 13 : Analyse de microprotéomique shotgun des 5 cas de gliomes anaplasiques de la cohorte de classification

Les analyses Shotgun proteomics ont été réalisées après digestion enzymatique par trypsine par micro-extraction de spots déterminés selon les données MALDI MSI.

(A) Heat map de protéines avec profils de régulation déterminés après label free quantification dans les 3 groupes soulignant la présence de 3 clusters.

(B) Diagrammes montrant les fonctions moléculaires et les processus biologiques associés à une hyper-régulation des protéines après analyse des clusters de protéines par le logiciel Panther.

(C) Classes de protéines des protéines hyper-régulées après analyse des clusters de protéines par le logiciel Panther.

Les cas 2, 3 et 5 sont moléculairement proches, et appartiennent à la même branche sur le heat map. Cette classification basée sur l'expression des protéines sous ou sur régulées, est en bonne concordance avec la classification obtenue par imagerie MALDI MSI (**Figure 14**). La composition en protéines des 3 principaux groupes correspondant à des régions d'intérêt différentes issus de l'analyse microprotéomique a ensuite été analysée.

Les protéines sur ou sous régulées de façon spécifique dans ces groupes ont été identifiées par microprotéomique Shotgun. Les protéines identifiées dans le groupe 1 sont en majorité impliquées dans les processus métaboliques, les activités de liaison et les activités catalytiques. Tous ces réseaux de protéines sont impliqués dans le cancer, la réponse immune innée, l'autophagie, la réponse au stress oxydatif, le métabolisme mRNA, le protein folding, le spliceosome, la régulation de la traduction. Le groupe 2 est principalement impliqué dans les fonctions de reproduction biologique mais également dans les processus cellulaires et métaboliques. L'analyse des réseaux confirme que les protéines de ce groupe sont principalement impliquées dans la pathologie gliale, la migration cellulaire, la mobilité, l'assemblage des microtubules du cytosquelette. Le groupe 3 semble plus lié à la différenciation de cellules nerveuses, la croissance des neurites, la guidance des axones, la formation des filopodes et aux phénomènes de sécrétion. Ainsi, le groupe 1 est principalement associé au cancer, avec de nombreuses protéines impliquées dans la croissance cellulaire. Le groupe 2 regroupe des protéines impliquées dans l'inflammation et les métastases. Le groupe

3 a un profil proche des cellules souche avec des protéines impliquées dans la différenciation des cellules nerveuses et la croissance des neurites.

Les analyses protéomiques du groupe 3 ont révélé un patron d'expression impliquant de la régénération nerveuse, de la guidance axonale, de la différenciation cellulaire et de la neurogénèse (**Figure 14**). Ce patron est proche de celui précédemment mis en évidence au sein de l'unité dans le cadre des études d'épilepsie temporelle (Meriaux et al., 2014).

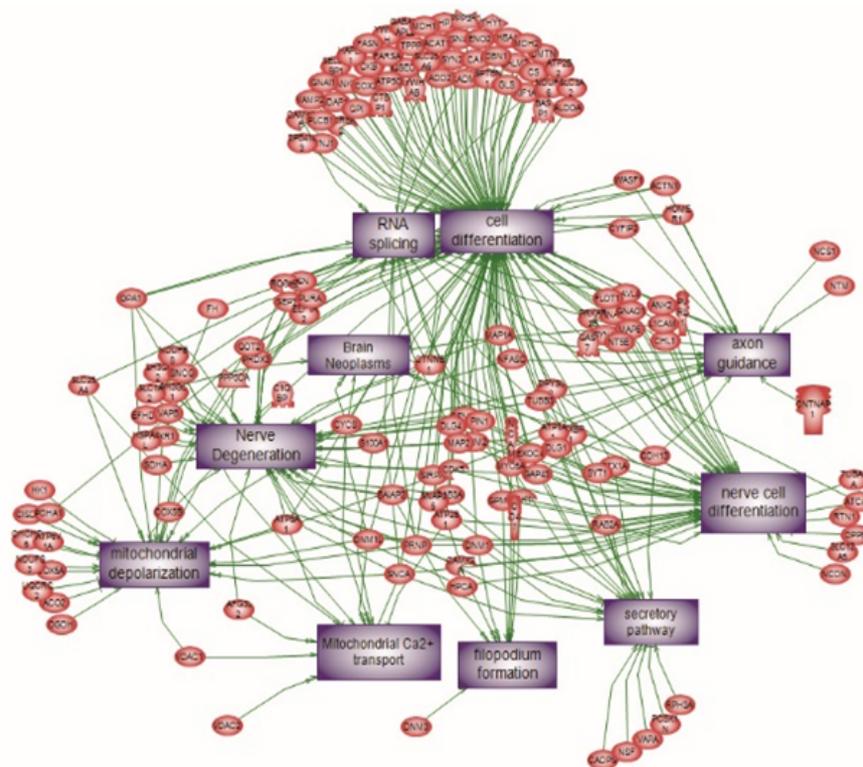


Figure 14 : Représentation des réseaux de protéines impliqués dans le groupe 3 après analyse par biologie systémique

Il est intéressant de noter que nous avons mis en évidence lors de nos études sur les exosomes de gliomes de rat C6 (**Figure 15**), la présence de la protéine DENND5b qui est marqueur de l'épilepsie (Han et al., 2016). On peut donc faire l'hypothèse que les cellules composant certains gliomes sont capables de produire un type d'exosome qui pourrait être à l'origine d'un phénotype épileptique.

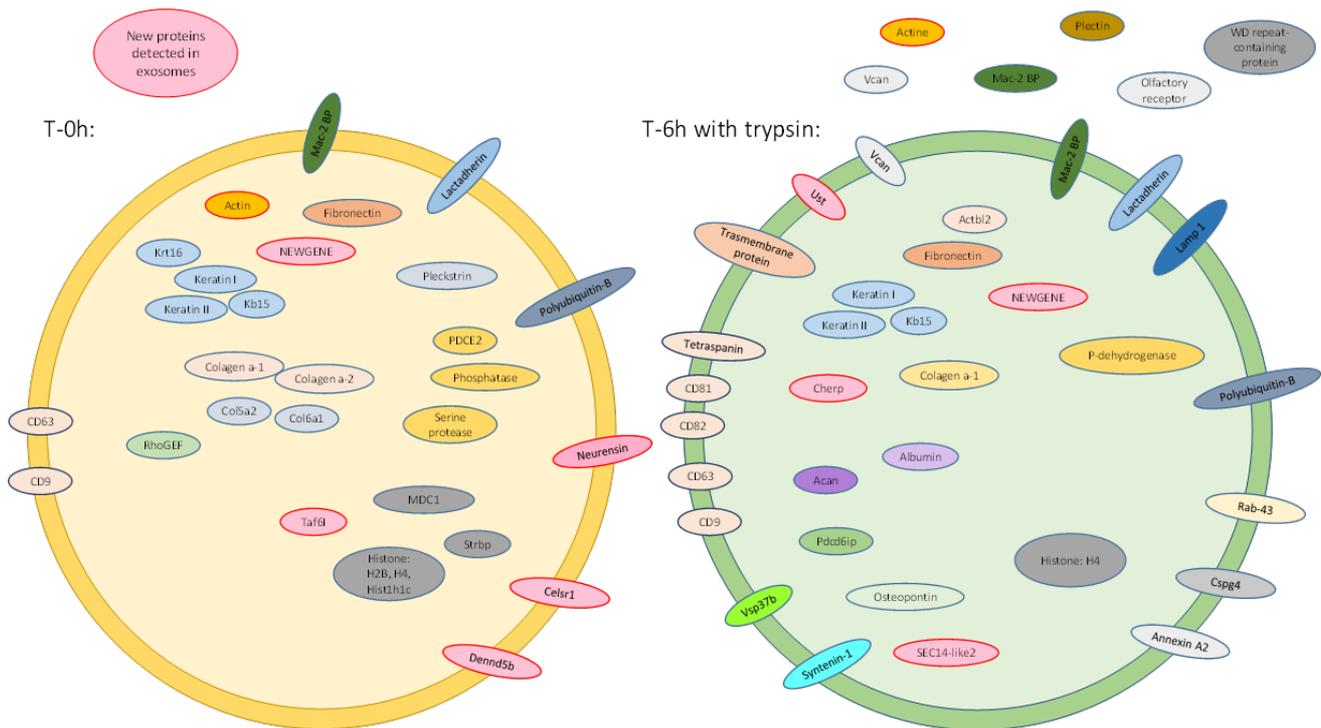
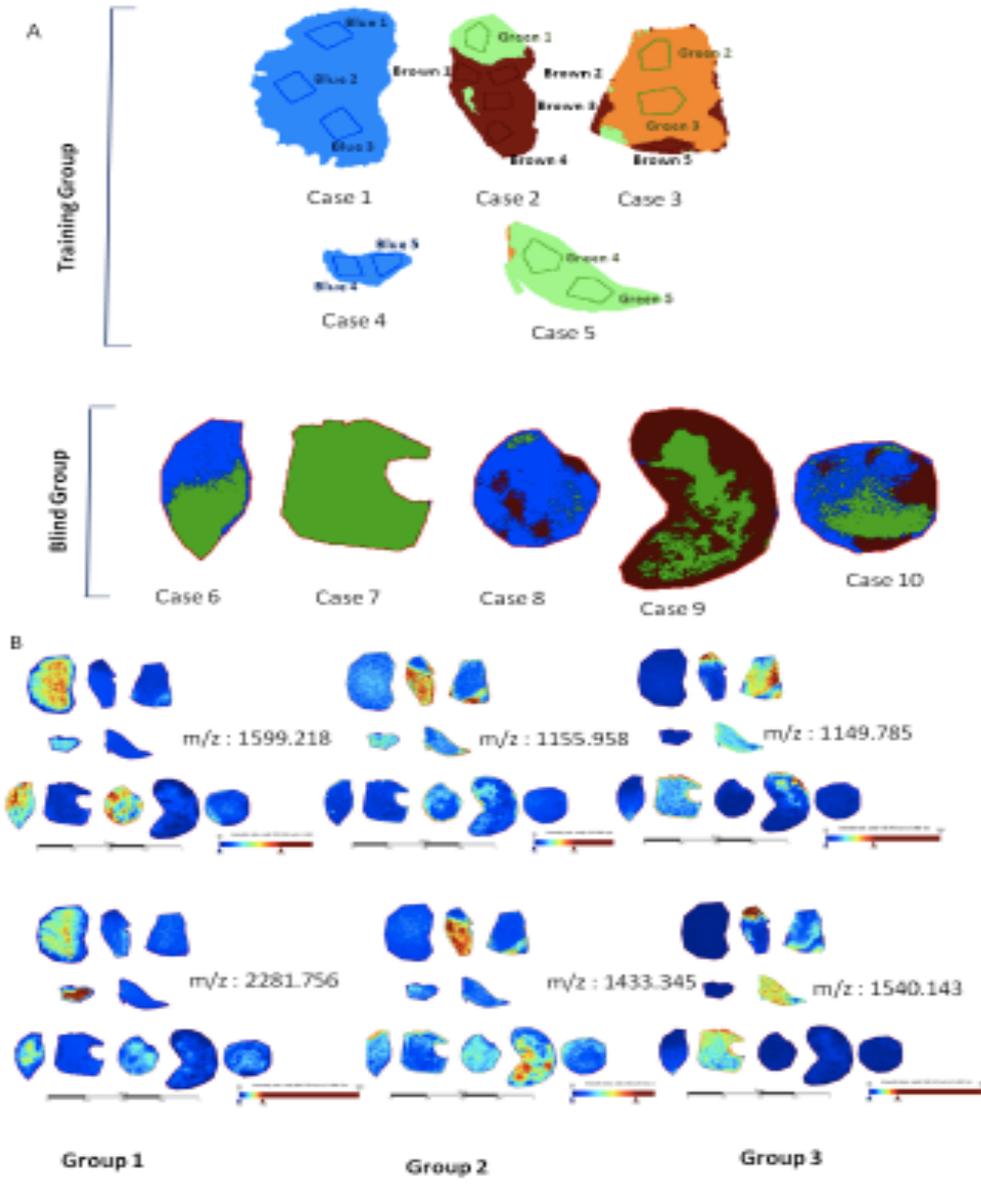


Figure 15 : Protéines identifiées par protéomique shotgun à partir d'exosome de rat C6 traité 6h à la trypsine

Cette classification effectuée sur 5 premiers échantillons tumoraux (cas 1 à 5) a été validée avec 5 autres échantillons (cas 6 à 10). Le modèle initialement obtenu a été appliqué aux échantillons tumoraux. Les échantillons tumoraux 6, 8 et 10 étaient classés dans le groupe 1. Le cas 9 est classé dans le groupe 2, et le cas 7 dans le groupe 3. Cependant, les groupes 2 et 3 sont difficiles à séparer complètement en raison des régions d'intérêt appartenant à l'un et l'autre des groupes et sont finalement regroupés en une combinaison des sous-groupes 2 et 3. Ces 2 groupes sont également moléculairement proches. Ainsi 2 principaux groupes étaient identifiés : groupes 1 avec les cas 1, 4, 8 et une partie des cas 6 et 10, et 2, à diviser en 2 sous-groupes et regroupant les cas 2, 3, 5, 7 une partie des cas 6 et 9.

Une nouvelle segmentation non supervisée a ensuite été réalisée sur les 10 échantillons (**Figure 16**). De cette nouvelle analyse, seulement 2 groupes principaux pouvaient être identifiés. Le 1^{er} groupe comporte les cas 2, 3, 5 et 7 et le second groupe

comporte les cas 1, 4, 8, 10. Les cas 6 et 9 étaient plus difficiles à classer, car comportaient des signatures moléculaires non spécifiques.



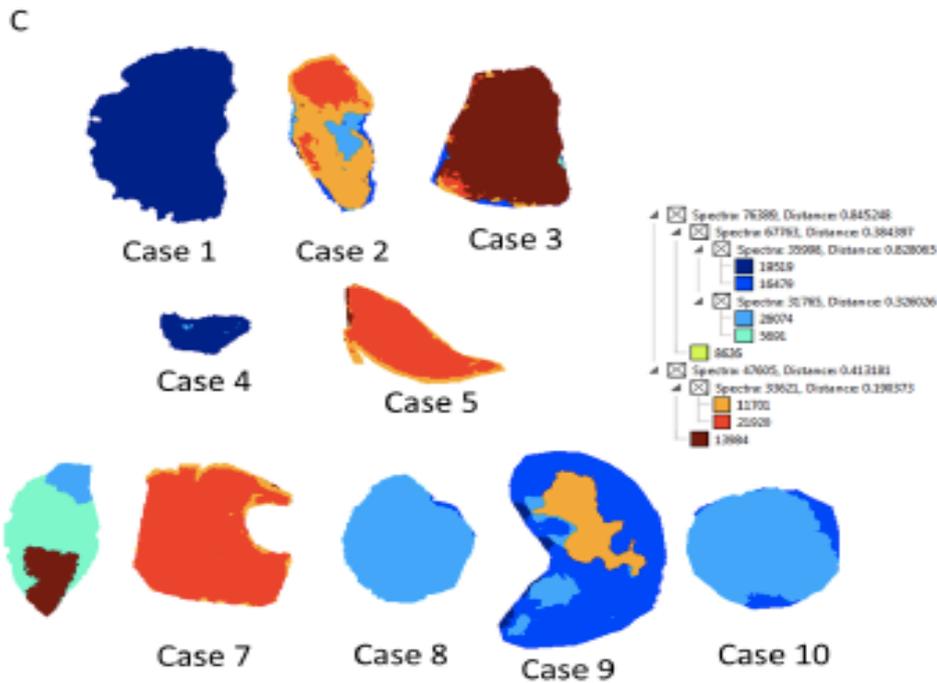


Figure 16 : Validation de la classification sur les 5 patients additionnels

(A) un modèle de classification a été élaboré. Le groupe training est composé de 3 classes. Dans la 1ère classe, 3 régions du groupe bleu ont été utilisées pour le training et 2 pour la validation. Dans la 2nde classe, 3 régions du groupe vert/orange ont été utilisées pour le training et 2 pour la validation. Dans le 3ème groupe, 3 régions du groupe brun ont été utilisées pour le training et 2 pour la validation. Ce modèle a été utilisé pour classer les 5 nouveaux échantillons. L'échantillon 7 est classé dans la région verte. L'échantillon 8 est classé dans la région bleue. Les échantillons 6, 9 et 10 sont hétérogènes.

(B) images m/z extraites pour chaque groupe.

(C) images de segmentation MALDI sur les 10 tissus. La segmentation montre 2 clusters principaux : bleu vs orange/brun. Les couleurs représentent des régions moléculaires différentes.

Les résultats confirment l'hétérogénéité des tumeurs déjà connue d'après les données pathologiques. Cependant on note une divergence entre les données histologiques et les données moléculaires pour la définition des sous-régions tumorales, donnant ainsi accès à de nouvelles informations. L'analyse combinée des données non supervisées d'imagerie MALDI et de microprotéomiques sont concordantes. Deux groupes sont individualisés correctement malgré le faible nombre d'échantillons. Un troisième groupe (groupe 3) plus hétérogène est également identifié, avec des caractéristiques communes aux deux autres groupes. Les corrélations avec les données cliniques, histologiques et de biologie moléculaire ne faisaient pas l'objet de ce travail en raison du faible effectif de patients dans ce premier travail. Il est bien sûr envisagé de s'y intéresser dans de futurs travaux.

2. Article “*Evaluation of non-supervised MALDI mass spectrometry imaging combined with microproteomics for glioma grade III classification*”

Le Rhun E, Duhamel M, Wisztorski M, Gimeno JP, Zairi F, Escande F, Reyns N, Kobeissy F, Maurage CA, Salzet M, Fournier I. Evaluation of non-supervised MALDI mass spectrometry imaging combined with microproteomics for glioma grade III classification. Biochim Biophys Acta. 2016 Nov 24.

3. Conclusion

L'analyse préliminaire des gliomes anaplasiques a démontré la faisabilité du projet et a confirmé l'intérêt du projet. Cette première étape a permis de confirmer l'hétérogénéité tumorale et de mettre en évidence à la fois des concordances et des discordances pour les échantillons tumoraux entre des analyses pathologiques et des analyses de spectrométrie de masse.

D'une façon générale, plus de régions d'intérêt étaient identifiées lors l'imagerie moléculaire MALDI MSI que lors de l'analyse du pathologiste expérimenté. Par ailleurs, certains échantillons bien qu'identifiés comme homogènes par le pathologiste étaient moléculairement hétérogènes. Ce résultat suggère que la technique MALDI MSI couplée à la protéomique pourrait apporter des informations supplémentaires et améliorer la connaissance des gliomes anaplasiques.

L'analyse MALDI-MDI couplée à la microprotéomique a par ailleurs permis de mettre en évidence 3 groupes moléculairement homogènes. Le groupe 1 est principalement associé au cancer, avec de nombreuses protéines impliquées dans la croissance cellulaire. Le groupe 2 regroupe des protéines impliquées dans l'inflammation et les métastases. Le groupe 3 a un profil proche des cellules souches avec des protéines impliquées dans la différenciation des cellules nerveuses et la croissance des neurites.

En conclusion, les analyses de protéomique apportent de nouvelles informations qui pourraient améliorer la connaissance sur la biologie des gliomes, la classification des gliomes et permettre l'identification de potentielles nouvelles cibles thérapeutiques. Ces analyses pourraient ainsi déterminer de nouveaux biomarqueurs protéomiques potentiellement intéressants à intégrer aux analyses histologiques combinées aux analyses génomiques. Ces résultats doivent être confirmés sur de plus grandes populations de patients avec un gliome.

III. Résultats de l'analyse des glioblastomes

1 Données cliniques, histologiques et de biologie moléculaire

1.1 Flow chart

Un total de 88 patients a été inclus dans l'étude entre le 24 juin 2014 et le 25 novembre 2016. Comme présenté dans le flow chart ci-dessous, 48 patients sont analysables dans le cadre de l'étude. Trente six patients ont été exclus de cette analyse, car le diagnostic histologique n'était pas celui de glioblastome dans 27 cas et pour des raisons techniques (délai trop long entre résection chirurgicale et prise en charge à la tumorotheque) dans 7 ou pour un antécédent de cancer dans 2 cas (**Figure 17**).

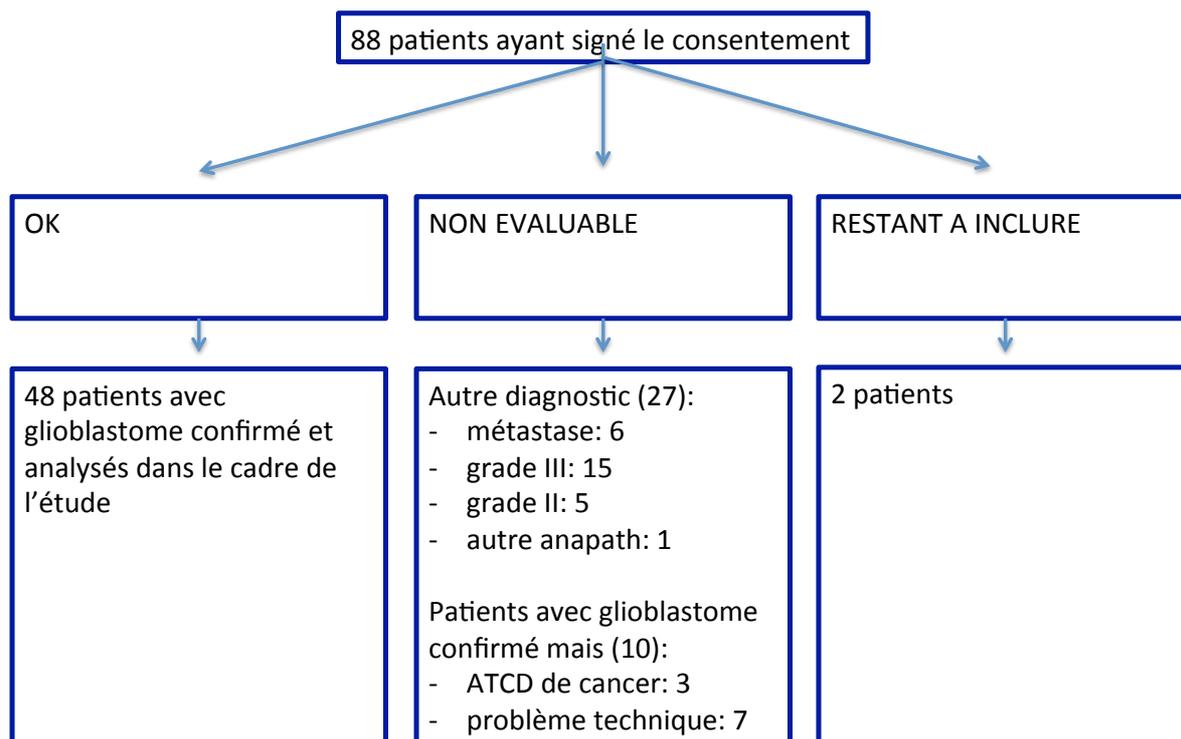


Figure 17 : Flow chart de l'étude GLIOMIC

1.2 Analyses histologiques morphologiques et immunohistochimiques, et de biologie moléculaire

Les analyses histologiques morphologiques et immunohistochimiques ont été réalisées par le Professeur Claude-Alain Maurage et les analyses de biologie moléculaire par le Docteur Fabienne Escande.

Seules les analyses des statuts IDH1, ATRX, P53, EGFR, MGMT, codélétion 1p19q, analyses CGH array notamment des chromosomes 7 et 10, recherche d'amplification d'EGFR et de délétion homozygote CDKN2A ont été réalisés pour le moment dans le cadre de l'analyse de routine effectuée au CHRU de Lille pour le diagnostic des gliomes.

- Analyses immunohistochimiques

Les analyses immunohistochimiques suivantes ont été réalisées sur FFPE de 4 micromètres d'épaisseur : IDH1-R132H, ATRX, P53, EGFR. Un contrôle positif était utilisé pour la détermination du statut IDH1-R132H. Comme cela est recommandé par la nouvelle classification OMS 2016, lorsque l'immunohistochimie IDH1-R132H était négative, aucune autre mutation n'était recherchée lorsque le glioblastome était développé dans d'autres localisations que la ligne médiane et que le patient était âgé de plus de 55 ans. Par contre, pour les patients de moins de 55 ans ou en cas d'antécédent de gliome de bas grade, si l'immunohistochimie était négative, les autres mutations étaient recherchées en biologie moléculaire (Louis et al., 2016). Le marquage ATRX était considéré comme conservé lorsque plus de 10% des cellules tumorales exprimaient ATRX. P53 était considéré comme positif quand au moins 10% des noyaux étaient positifs. L'expression EGFR était quantifiée selon le score de Hirsch. IDH1 R132H analysé à l'aide du clone Diavona H09, à la dilution 1/40 dilution, ATRX en utilisant Sigma, ref HPA001906, à la dilution 1/200, P53 en utilisant Dako, clone DO-7, à la dilution 1/100, et EGFR en utilisant Invitrogen, clone 31G7, à la dilution 1/20.

- Extraction et quantification de l'ADN

Les analyses étaient réalisées sur FFPE. Les tests suivants ont été réalisés : Comparative genomic hybridization (CGH)-array, O-6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation et mutations IDH1/IDH2. Tous les tissus utilisés pour les analyses ADN ont été évalués quant à la proportion de cellules tumorales. Seuls les échantillons tumoraux comportant au moins 70% de cellules tumorales ont été analysés. Les extractions d'ADN sur FFPE ont été réalisées en utilisant le kit QIAamp DNA FFPE Tissue (Qiagen). Les profils CGH ont été déterminés en utilisant le kit SurePrint G3 Human CGH Microarray, 8x60K (Agilent) et le logiciel CytoGenomics v2.7. La limite de résolution est de 1 Mb. La présence d'une codélétion 1p/19q, le gain du chromosome 7, la perte du chromosome 10, l'amplification du gène EGFR et du gène homozygous deletion of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A (CDKN2A) ont été particulièrement examinés. La mutation affectant le codon 132 de *IDH1* (ref seq NM_005896.2), le codon 172 de *IDH2* (ref seq NM_002168.2) était validé par séquençage PCR Sanger quand l'immunohistochimie était négative. La méthylation du promoteur MGMT (CpGs 74-78)

était déterminée après traitement par bisulfite par pyrosequençage sur PyroMark Q96 avec le kit MGMT PyroMark (Qiagen). La présence d'une méthylation était affirmée quand le score de méthylation était d'au moins 8%.

1.3 Résultats

Quarante huit patients (35 hommes) sur les 50 patients attendus sont actuellement enregistrés dans la cohorte glioblastome de l'étude GLIOMIC. L'âge médian est de 56,3 ans (minimum 20 ans, maximum 80 ans). Les tumeurs étaient localisées en frontal dans 14 cas (droite, n=7 ; gauche, n=7), en pariétal dans 8 cas (droit, n=5 ; gauche, n=3), en fronto-pariétal dans 2 cas (droit, n=1 ; gauche, n=1), temporal dans 19 cas (droit, n=12 ; gauche, n=7), occipital dans 2 cas (droit, n=1 ; gauche, n=1), pariéto-occipital gauche dans 2 cas et temporo-pariéto-occipital gauche dans 1 cas. Dans tous les cas sauf un seul, de la nécrose était identifiée sur l'IRM cérébrale pré-opératoire. Une prise de contraste était notée dans tous les cas. L'ensemble des patients inclus dans l'étude GLIOMIC a, comme cela est précisé dans les critères d'inclusion, bénéficié d'une exérèse chirurgicale. L'exérèse était totale, confirmée en IRM, pour 29 des 48 patients, subtotale pour 4 patients et partielle pour 15 patients.

Parmi les 48 glioblastomes analysés,

- Une expression de IDH1 (R132H) était mise en évidence dans 2 tumeurs, les 46 autres étant IDH1 (R132H) négatives. Aucune analyse NGS n'a mis en évidence une autre mutation IDH non analysable en immunohistochimie. Ainsi, 46 tumeurs étaient classées IDH négatives.
- Aucune codélétion 1p/19q n'était retrouvée (examen non encore réalisé pour 2 tumeurs).
- Une perte de l'expression d'ATRX était observée dans 3 cas (examen non encore réalisé pour 1 tumeur).
- Le pourcentage de méthylation moyen de l'ensemble de la cohorte était de 12% (minimum 1% - maximum 95%). Une méthylation du promoteur de la MGMT

était observée dans 14 cas. Ainsi, 32 tumeurs n'avaient pas de méthylation du promoteur de la MGMT (examen non encore réalisé pour 2 tumeurs).

- P53 était exprimé en immunohistochimie pour 18 tumeurs (examen non encore réalisé pour 4 tumeurs).
- Le score de Hirsch médian EGFR était de 257 (minimum 100 – maximum 400) (examen non encore réalisé pour 4 tumeurs).
- Une amplification du gène EGFR était mise en évidence dans 22 cas (examen non encore réalisé pour 1 tumeur).
- Un gain du 7 associé à une perte du 10 était retrouvé dans 38 cas (examen non encore réalisé pour 1 tumeur).
- Une délétion homozygote CDKN2A était retrouvée dans 26 cas et une amplification CDKN2A était retrouvée dans 1 cas (examen non encore réalisé pour 1 tumeur).

A noter que les glioblastomes IDH non mutés, qui représentent 96% de nos cas, étaient caractérisés par un gain du chromosome 7 combiné à une perte du chromosome 10 dans 38 cas, et par une délétion homozygote CDKN2A dans 26 cas (ou une amplification CDKN2A dans 1 cas). Ces patterns d'anomalies sont fréquemment associés dans notre série comme dans la littérature (Verhaak et al., 2010). Des amplifications EFGR, également rapportées comme associées à ces tumeurs (Ohgaki et al., 2013 ; Nicolaidis et al., 2015), étaient notées dans 22 cas.

Le **Tableau 5** reprend la description des résultats histologiques et de biologie moléculaire obtenus chez chaque patient.

Tableau 5 : Description des données histologiques et des marqueurs moléculaires des 48 cas enregistrés dans l'étude GLIOMIC

N° inclusion	âge au dg	sexe	localisation tumorale	IDH1	codel 1p/19q	ATRX	MGMTp meth	% MGMT	P53	EGFR score de Hirsch	ampli EGFR	del CDKN 2A	chromosomes 7 et 10
01-04	38	M	frontal gauche	positif	non	perdu	négatif	6%	100%	170	non	non	gain10q, del partielle 10c
01-05	68	M	frontal gauche	négatif	non	conservé	négatif	2%	75%	180	non	non	gain 7, perte 10
01-06	60	M	temporal droit	négatif	non	conservé	négatif	4%	3%	300	oui	oui	gain 7, perte 10
01-12	47	M	temporal droit	négatif	non	conservé	négatif	3%	15%	200	non	oui	gain 7, perte 10
01-17	46	M	pariétal droit	négatif	non	conservé	négatif	2%	<5%	300	non	non	gain 7, perte 10
01-19	54	F	pariétal gauche	négatif	non	conservé	négatif	5%	50%	120	non	non	pas d'anomalie
01-20	56	F	pariétal gauche	négatif	non	conservé	négatif	4%	4%	360	oui	oui	gain 7, perte 10
01-21	48	F	fronto-pariétal gauche	négatif	non	conservé	positif	95%	1%	390	oui	non	gain 7
01-22	61	F	temporal gauche	négatif	non	conservé	positif	12%	66%	300	non	non	gain 7
01-25	20	M	frontal droit	négatif	non	conservé	négatif	2%	70%	100	non	non	del partielle 7
01-26	66	M	temporal droit	négatif	non	conservé	négatif	4%	<5%	100	oui	oui	perte 10, ampli 7
01-27	59	M	temporal gauche	négatif	non	conservé	positif	11%	10%	120	non	non	pas d'anomalie
01-28	80	F	frontal gauche	négatif	non	conservé	négatif	2%	50%	280	oui	oui	gain 7, perte 10
01-29	24	M	frontal droit	positif	non	perdu	positif	16%	<10%	200	non	non	gain partiel 7q
01-31	50	M	temporal droit	négatif	non	conservé	négatif	6%	2%	250	oui	oui	gain 7, perte 10
01-32	51	F	temporal droit	négatif	non	conservé	négatif	2%	<5%	110	non	non	gain 7, perte 10
01-35	64	M	frontal droit	négatif	non	conservé	positif	10%	75%	350	non	oui	gain 7, perte 10
01-37	65	F	pariétal droit	négatif	non	conservé	négatif	1%	2%	400	oui	oui	gain 7, perte 10

01-42	45	F	frontal droit	négatif	non	conservé	négatif	4%	5%	400	oui	non	perte 10
01-43	70	M	occipital droit	négatif	non	conservé	négatif	1.6%	3%	300	oui	oui	gain 7, perte 10
01-45	43	M	temporal droit	négatif	non	conservé	négatif	4.8%	50%	140	non	non	gain 7, perte 10
A	51	M	frontal droit	négatif	non	conservé	négatif	2%	3%	250	non	oui	gain 7, perte 10
B	66	M	temporal gauche	négatif	non	conservé	négatif	3%	50%	200	non	non	gain 7, perte 10
C	45	M	pariétal droit	négatif	non	conservé	positif	30.8%	5%	250	oui	oui	gain 7, perte 10
01-50	67	F	frontal gauche	négatif	non	conservé	négatif	1%	5%	140	oui	non	gain 7, perte 10
01-51	62	M	temporal droit	négatif	non	conservé	négatif	2.2%	<5%	400	oui	oui	gain 7, perte 10
01-52	51	M	temporal droit	négatif	non	conservé	NR	NR	5%	330	oui	oui	gain 7, perte 10
01-53	60	F	temporal droit	négatif	non	conservé	négatif	1.8%	20%	360	oui	oui	gain 7, perte 10
D	59	M	temporal gauche	négatif	non	conservé	négatif	7.8%	5%	220	non	oui	gain 7, perte 10
01-54	58	F	pariétal droit	négatif	non	conservé	positif	14%	10%	100	non	oui	gain 7, perte 10
01-55	68	M	pariéto occ gauche	négatif	non	conservé	négatif	3%	10%	350	oui	oui	gain 7, perte 10
01-56	63	M	frontal gauche	négatif	non	conservé	positif	31%	5%	350	oui	oui	gain 7, perte 10
01-57	50	M	pariétal gauche	négatif	non	conservé	négatif	3.6%	5%	375	oui	oui	gain 7, perte 10
01-59	58	F	temporo pariéto occ gauche	négatif	non	conservé	négatif	3.8%	80%	300	oui	oui	gain 7, perte 10
01-60	60	M	pariétal droit	négatif	non	conservé	négatif	4%	>50%	110	non	non	gain 7, perte 10
01-61	68	M	frontal droit	négatif	non	conservé	positif	29%	<5%	350	oui	oui	gain 7, perte 10
E	65	M	occipital gauche	négatif	non	conservé	négatif	3%	5%	250	non	non	gain 7, perte 10
01-67	56	M	temporal droit	négatif	non	conservé	négatif	1.8%	5%	340	oui	oui	gain 7, perte 10
01-70	36	M	temporal droit	négatif	non	conservé	positif	59.8%	2%	350	non	oui	gain 7, perte 10
01-72	63	M	temporal gauche	négatif	non	conservé	positif	18%	70%	230	non	non	gain 7, perte 10
01-73	56	M	frontal droit	négatif	non	conservé	négatif	2%	10%	200	non	non	gain 7, perte 10

01-69	75	M	temporal droit	négatif	non	conservé	positif	26%	15%	150	non	non	gain 7, perte 10
01-64	76	M	frontal gauche	négatif	non	conservé	négatif	2%	2.5%	250	non	oui	gain 7, perte 10
01-65	55	M	fronto-pariétal droit	négatif	non	conservé	positif	68%	2.5%	400	oui	oui	gain 7, perte 10
F	42	M	frontal gauche	négatif	non	perdu	NR	NR	NR	NR	non	non	perte partielle 7
G	51	M	temporal droit	négatif	NR	NR	négatif	2%	NR	NR	NR	NR	NR
H	73	M	temporal gauche	négatif	NR	conservé	positif	34%	NR	NR	oui	oui	gain 7, perte 10
01-71	63	F	pariéto-occipital gauche	négatif	non	conservé	négatif	1%	15%	NR	non	non	gain 7, perte 10

dg : diagnostic, histo : histologique, M : masculin, F : féminin, A : astrocytome, O : oligodendrogliome, OA : oligoastrocytome, NR : non réalisé, MGMTp met : méthylation du promoteur MGMT

Un traitement était réalisé après confirmation du diagnostic de glioblastome, en complément de la résection chirurgicale pour l'ensemble des patients pour lesquelles les données sont disponibles (pour 3 patients, ces données ne sont pas connues à ce jour). Quatorze patients ont bénéficié d'un traitement standard par radiothérapie (60 Gy) temozolomide concomitant puis de maintenance (6 cycles). Neuf patients sont en cours de traitement standard actuellement (radiothérapie temolozomide concomitant puis de maintenance, avec 6 cycles de maintenance prévus). Deux patients ont reçus 7 cycles de temozolomide de maintenance à l'issue de la radiothérapie chimiothérapie concomitante pour des questions de délai de réalisation de l'IRM cérébrale. Deux patients ont arrêté le temozolomide de maintenance après respectivement 1 et 3 cycles en raison d'une thrombopénie prolongée. La radiothérapie a été arrêtée à la demande du patient pour problème d'intolérance du masque de radiothérapie après une dose de 38 Gy, le temozolomide avait été prescrit en concomitant pendant le temps de la radiothérapie, le traitement de maintenance est actuellement en cours pour ce patient. Dans 4 cas, le traitement initial était arrêté en fin de radiothérapie concomitante pour progression de la maladie, et dans 8 cas, le traitement initial était arrêté pendant le traitement de maintenance, avant le 6^{ème} cycle de chimiothérapie prévue en raison d'une progression tumorale. Deux patients ont été traités dans le cadre d'études cliniques. Un patient n'a reçu qu'une radiothérapie accélérée (38 Gy en 15 fractions) en raison de son âge et de son état général. Un patient a refusé le traitement conventionnel par conviction personnelle et a opté pour un traitement par homéopathie.

Jusqu'à présent, une première progression tumorale a été observée chez 21 patients. La progression est survenue après un délai moyen de 233 jours (minimum 84 jours - maximum 444 jours) après la chirurgie du glioblastome. La progression était diagnostiquée immédiatement à la fin de la radiothérapie pour 4 patients et avant la fin du traitement de maintenance pour 8 patients. A progression, 16 patients ont reçu une nouvelle ligne de traitement, alors qu'une orientation en soins palliatifs était décidée pour 4 patients. Les informations sur la prise en charge à la première récurrence sont manquantes pour 4 patients. Les traitements à récurrence étaient les suivants : lomustine et bevacizumab pour 11 patients, chirurgie puis lomustine et bevacizumab pour 1 patient, fotemustine pour 2 patients et lomustine seule pour 1 patient.

Onze patients sont décédés, après une moyenne de 439 jours (minimum 150 -

maximum 750 jours) après la chirurgie du glioblastome.

2. Données de l'analyse en spectrométrie de masse

2.1 Analyse des lipides

- Préparation des échantillons

Des sections de 12 µm d'épaisseur de blocs congelés ont été déposées sur des lames conductrices. Une matrice était ensuite également déposée de façon homogène à l'aide d'un sprayer manuel en recouvrant l'ensemble de la surface. Les spectres de masse sont ensuite enregistrés pour chaque point de la coupe avec une résolution spatiale de 70 µm. Après réalisation de l'analyse, la matrice est retirée et une coloration HES est réalisée afin de permettre une annotation des échantillons par le Professeur Maurage, anatomopathologiste référent du projet. L'analyse réalisée à l'aide du logiciel Social Care Information and Learning Service (SCiLS) (Bremen, Germany) permet d'obtenir une segmentation spatiale en regroupant tous les spectres selon leur similarité.

- Analyse des premiers échantillons

Jusqu'à présent une analyse en imagerie MALDI a été réalisée sur 19 échantillons tumoraux de glioblastome afin de déterminer la composition en lipides. Les analyses statistiques ont été faites de façon non-supervisée dans un premier temps.

- **segmentation individuelle**

La segmentation individuelle correspond à l'analyse individuelle de chaque échantillon. Elle a pu être réalisée pour les 19 échantillons tumoraux. Tous les spectres lipidiques du tissu sont analysés et comparés, permettant de distinguer des régions de composition lipidique différentes.

A nouveau une hétérogénéité tumorale est retrouvée. Comme cela est illustré sur la **Figure 18**, pour chaque coupe, la région externe en bleu foncé correspond à la matrice.

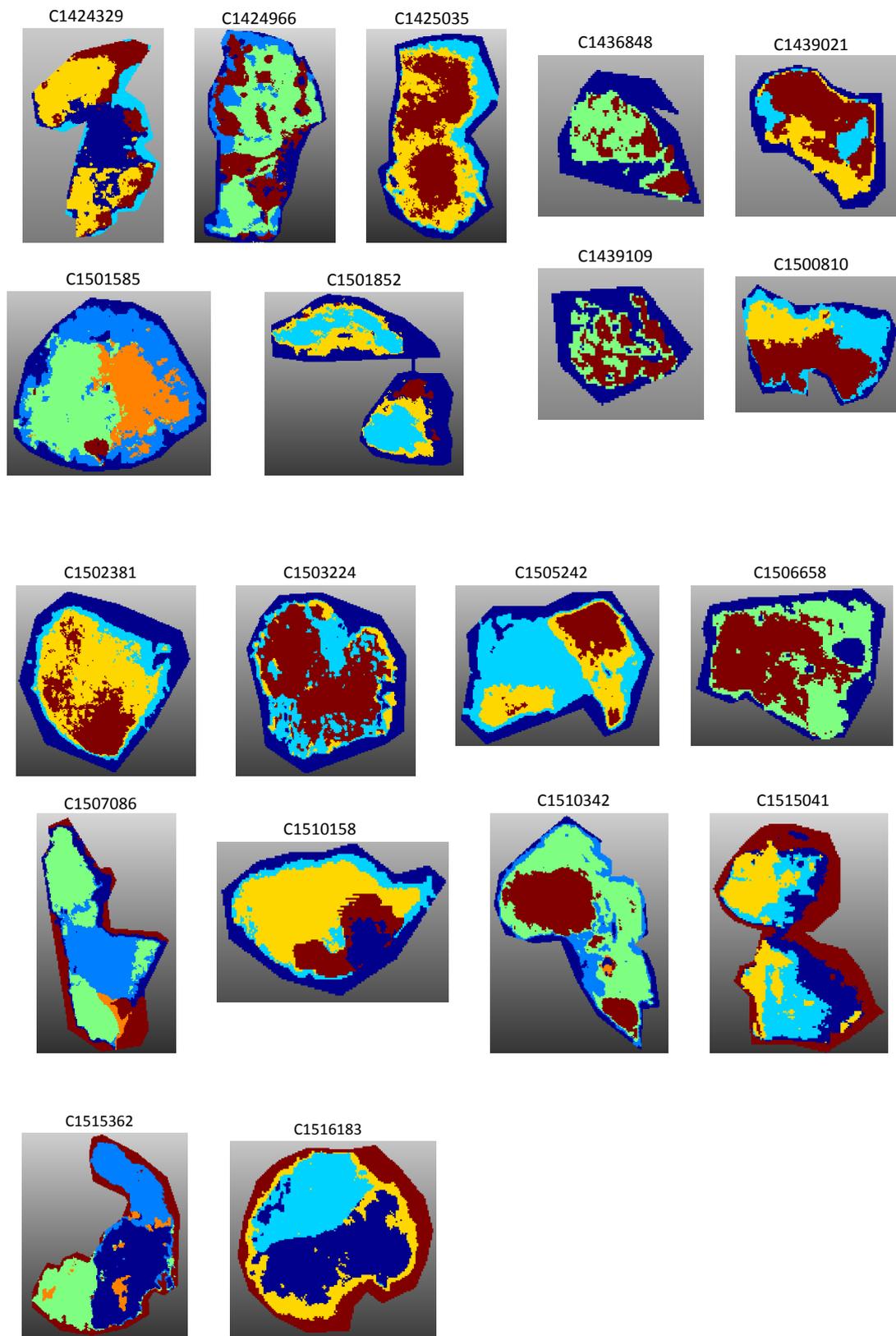


Figure 18 : Segmentation individuelle des 19 échantillons de glioblastome de l'étude GLIOMIC analysés en imagerie MSI des lipides

Les résultats obtenus après segmentation spatiale ont été comparés aux annotations histologiques pour 10 échantillons tumoraux. Des régions d'intérêt supplémentaires ont été mises en évidence après analyse en imagerie MALDI par rapport à l'analyse histologique morphologique classique (**Figure 19**). Par ailleurs une faible concordance était observée entre les annotations histologiques et les données de l'imagerie MALDI.

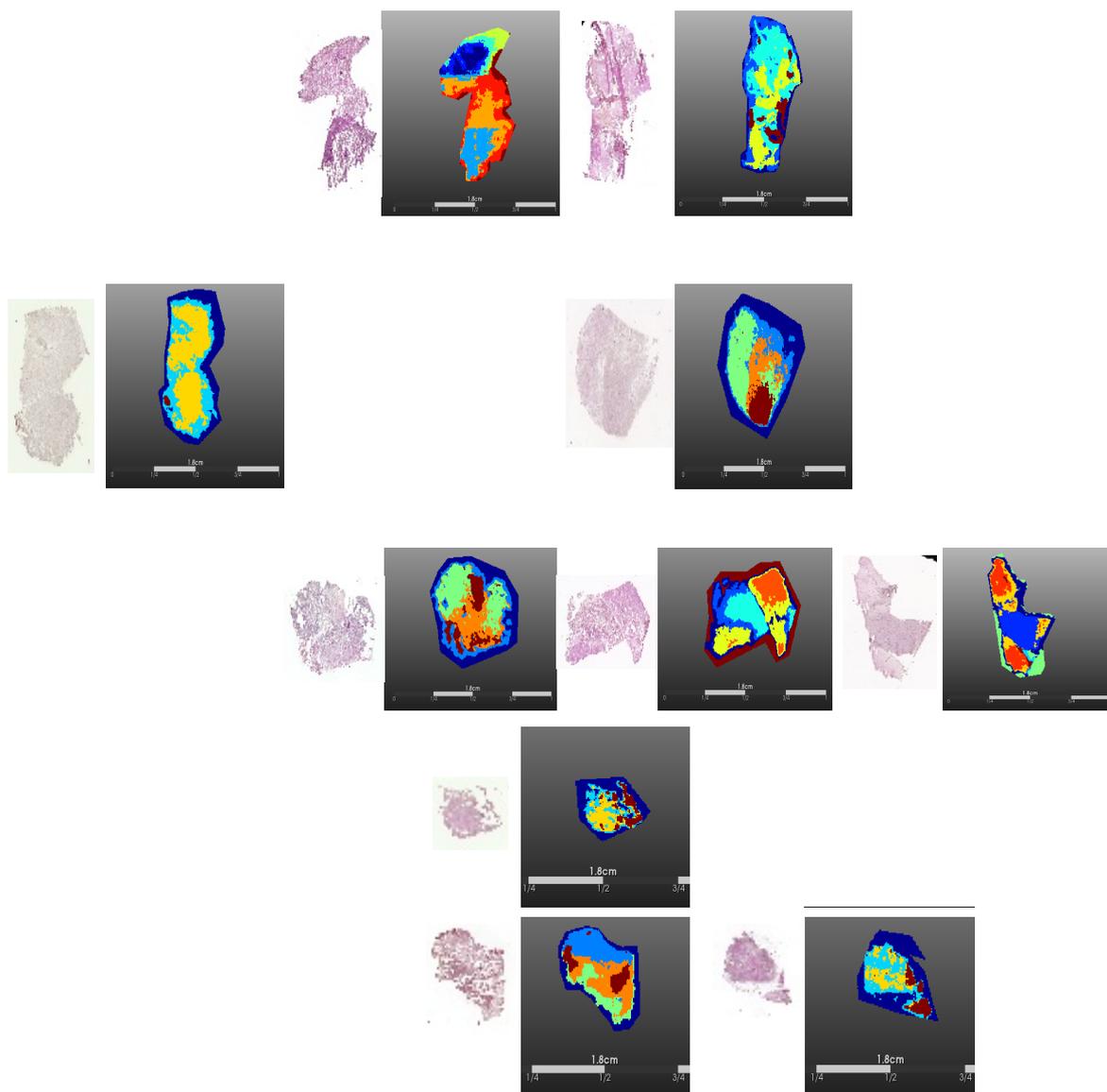
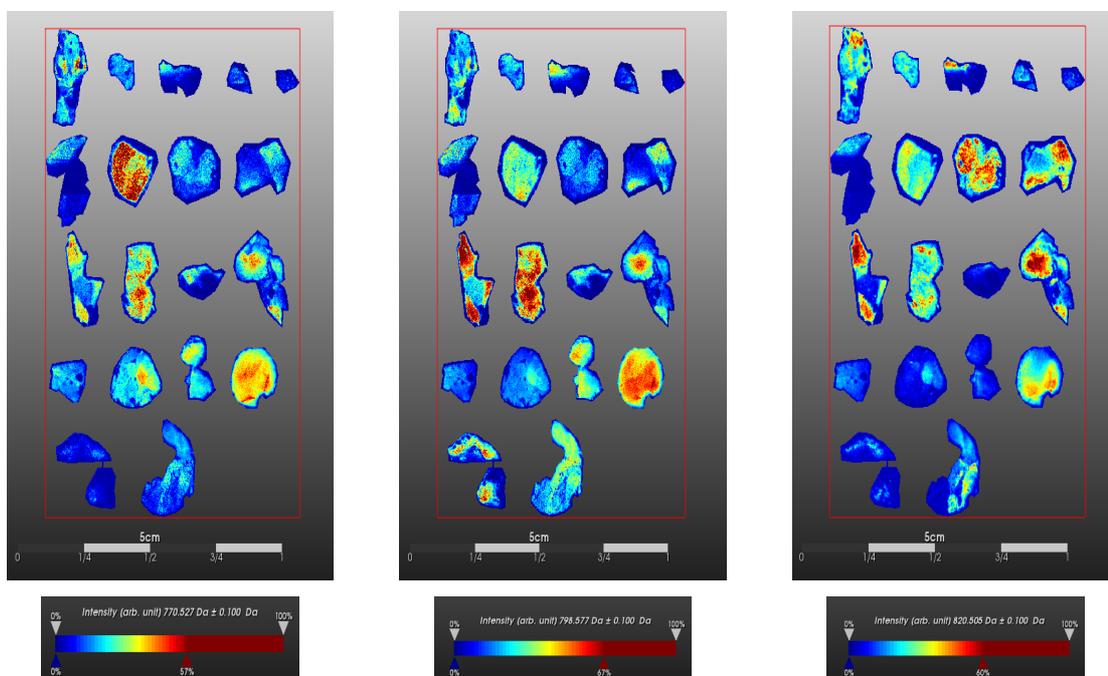


Figure 19 : Exemple de corrélation entre segmentation individuelle et lame histologique sur 10 échantillons de glioblastome de l'étude GLIOMIC analysés en imagerie MSI des lipides

Des analyses de co-localisations ont ensuite été réalisées, permettant de mettre en évidence des ions caractéristiques de chaque région. Lors de ces analyses (**Figure 20**), des ions de 3 masses différentes étaient retrouvés dans chaque région identifiée, confirmant ainsi les résultats de la segmentation.

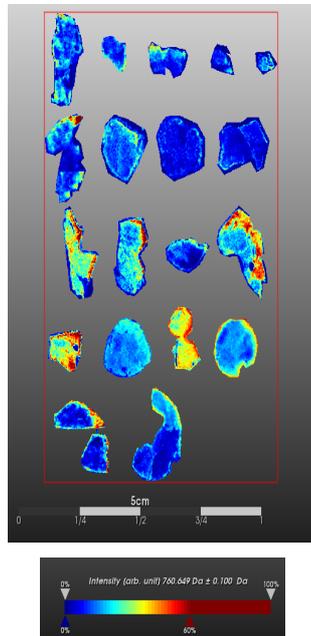
A

Co-localized with brown region



B

Co-localized with blue region



C

Co-localized with yellow region

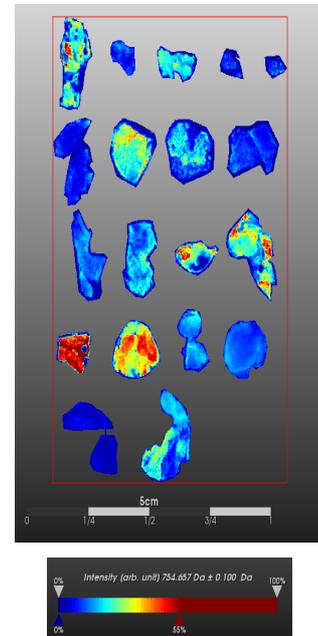


Figure 20 : Analyses de co-localisation des ions en segmentation individuelle
(A) Co-localisation des ions marrons sur les différents échantillons
(B) Co-localisation des ions bleus sur les différents échantillons
(C) Co-localisation des ions jaunes sur les différents échantillons

- **segmentation globale**

Elle est réalisée sur l'ensemble des échantillons et compare les échantillons entre eux, permettant de classer les différents échantillons. Cette analyse a pu être réalisée pour 10 échantillons tumoraux. Les segmentations globales générées après analyse de tous les tissus analysés ont révélé 3 groupes moléculaires différents alors que les annotations morphologiques étaient les mêmes pour les régions étudiées (**Figure 21**).

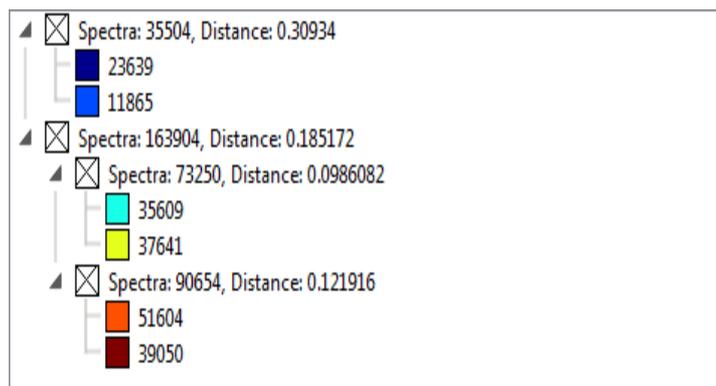
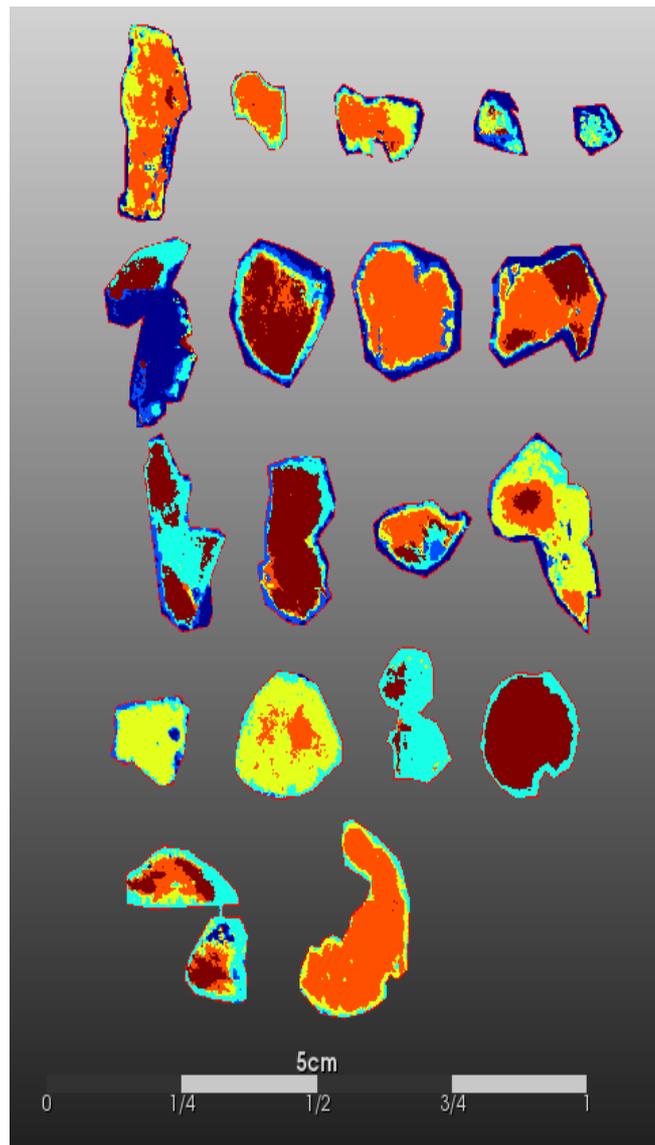


Figure 21: Segmentation globale des 10 échantillons de glioblastome de l'étude GLIOMIC analysés en imagerie MSI des lipides

Pour chaque coupe, la région externe en bleu foncé correspond à la matrice, la région orange correspond à de la nécrose et la région bleu à une faible infiltration tumorale.

Cette analyse démontre l'existence de différentes régions d'intérêt au sein des 10 premiers glioblastomes analysés. Après segmentation globale, les échantillons pouvaient être **répartis en 3 groupes principaux comprenant** :

- les échantillons 7, 10, 11 et 1 répartis en 2 sous-groupes : 7, 10, 11 vs. 1
- les échantillons 4 et 6 répartis en 2 sous-groupes : 4 vs. 6
- les échantillons 9, 12 et 13 répartis en 2 sous-groupes : 9, 12 vs. 13

Selon les annotations histologiques, on définissait

- des régions nécrotiques, apparaissant en orange sur les tissus 7, 10 et 11
- des régions faiblement infiltrées, apparaissant en bleu sur les tissus de l'échantillon 12
- des régions « pré-nécrotiques »

Les 2 types de régions d'intérêt (nécrose et infiltration tumorale faible, correspondant à du cortex infiltré) restent groupées après analyse par segmentation globale.

Les régions définies en tant que « pré-nécrotiques » sur l'annotation histologique sont réparties entre régions nécrotiques et régions tumorales.

Selon l'analyse de biologie moléculaire, les 10 premiers échantillons présentent les caractéristiques reportées dans le **Tableau 6**.

Tableau 6 : Données de biologie moléculaire des échantillons regroupés selon les caractéristiques des lipides en segmentation globale

N° inclusion	IDH1	codel 1p/19q	ATRAX	MGMTp meth	% MGMT	P53	EGFR score de Hirsch	ampli EGFR	délétion CDKN2A	chromosomes 7 et 10
01-19	négatif	non	conservé	négatif	5%	50%	120	non	non	pas d'anomalie
01-26	négatif	non	conservé	négatif	4%	<5%	100	oui	oui	perte 10, ampli 7
01-27	négatif	non	conservé	positif	11%	10%	120	non	non	pas d'anomalie
01-06	négatif	non	conservé	négatif	4%	3%	300	oui	oui	gain 7, perte 10
01-25	négatif	non	conservé	négatif	2%	70%	100	non	non	del partielle 7
01-12	négatif	non	conservé	négatif	3%	15%	200	non	oui	gain 7, perte 10
01-04	positif	non	perdu	négatif	6%	100%	170	non	non	gain10q, del partielle 10q
01-29	positif	non	perdu	positif	16%	<10%	200	non	non	gain partiel 7q
01-05	négatif	non	conservé	négatif	2%	75%	180	non	non	gain 7, perte 10
01-17	négatif	non	conservé	négatif	2%	<5%	300	non	non	gain 7, perte 10

- échantillons 7, 10, 11 et 1 répartis en 2 sous-groupes : 7, 10, 11 vs. 1
- échantillons 4 et 6 répartis en 2 sous-groupes : 4 vs. 6
- échantillons 9, 12 et 13 répartis en 2 sous-groupes : 9, 12 vs. 13

Il est à l'heure actuelle cependant trop tôt pour conclure sur la concordance avec les données de biologie moléculaire vu le faible nombre d'échantillons analysés et les données encore manquantes sur la biologie moléculaire. De plus, une analyse supervisée des lipides sera réalisée dans un second temps en fonction des catégories tumorales issues des données de la biologie moléculaire.

2.2 Analyse des protéines

Des analyses de micro-protéomiques ont ensuite été réalisées sur 9 échantillons tumoraux pour le moment. Ces analyses ont pour but d'identifier des protéines spécifiques dans les différentes régions d'intérêt, à partir des images générées après segmentation individuelle.

Les données de l'imagerie MALDI des lipides sont annotées par l'anatomopathologiste référent selon l'analyse histologique morphologique sur chaque lame (prolifération tumorale, prolifération endothélio-capillaire, nécrose...). Les régions d'intérêt ainsi définies sont ensuite analysées en micro-protéomique. Pour chaque point une digestion des protéines est réalisée. Les peptides seront micro-extraits puis analysés par chromatographie liquide et spectrométrie de masse (nano-LC/MS-MS). Cette approche doit permettre de définir une variabilité moléculaire en micro-protéomique. Les analyses des protéines viennent de débiter.

Pour le moment, les images de spectre MALDI et les analyses de segmentation ont été réalisées.

Les analyses de segmentation individuelle des 9 échantillons de glioblastome analysés mettent en évidence des ions spécifiques délimitant des régions d'intérêt spécifiques (**Figure 22**).

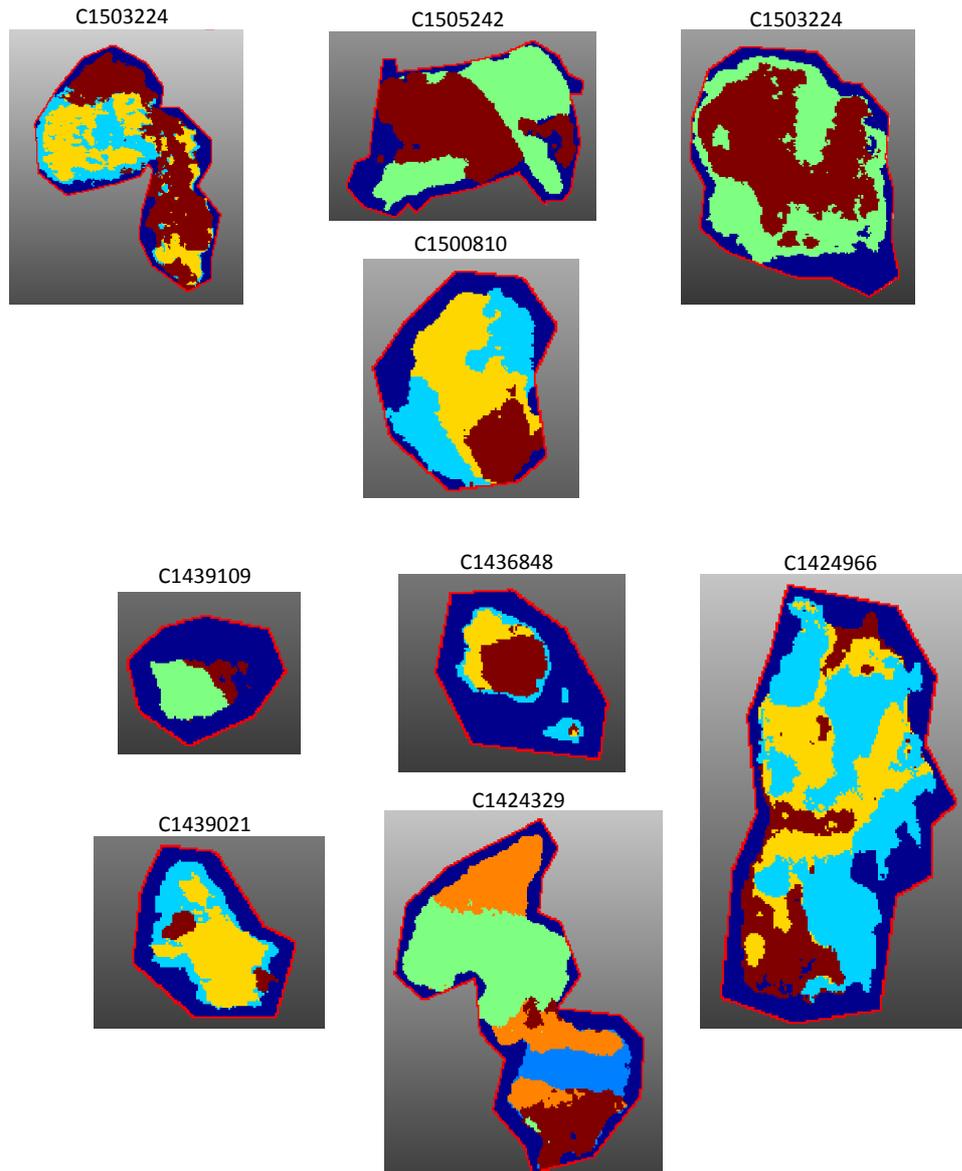


Figure 22 : Segmentation individuelle des peptides des 9 échantillons tumoraux de glioblastome

La segmentation globale en protéines met en évidence 3 groupes principaux partageant des caractéristiques communes sur le plan moléculaire (**Figure 23**).

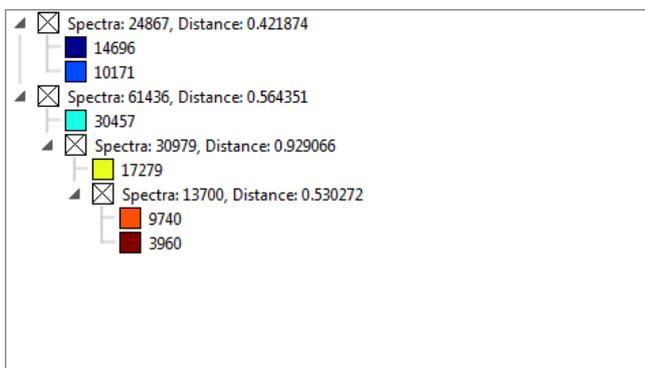
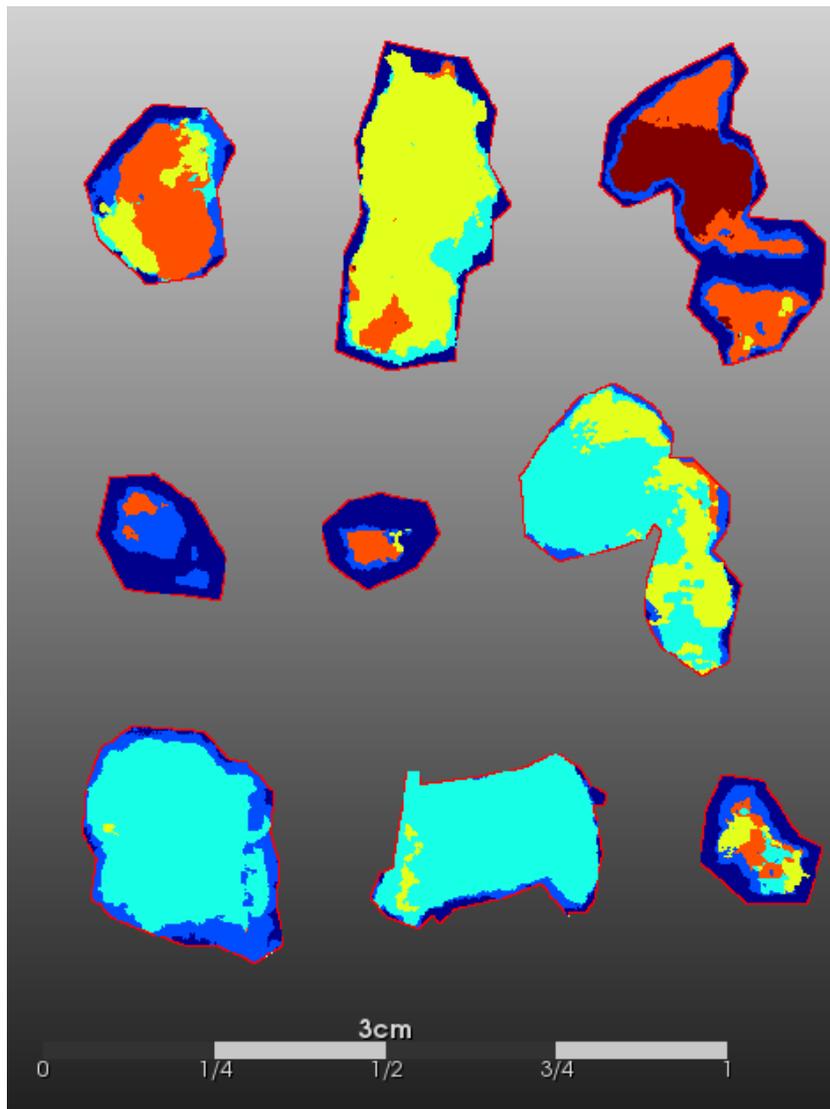


Figure 23 : Segmentation globale des peptides des 9 échantillons tumoraux de glioblastome

3. Conclusion

Ces résultats sur l'analyse des glioblastomes sont concordants avec ceux retrouvés lors de l'analyse des gliomes anaplasiques. L'analyse des premiers échantillons de glioblastome a également mis en évidence une hétérogénéité tumorale et des régions d'intérêt définies sur le plan moléculaire. A nouveau, des concordances et des discordances étaient observées pour les échantillons tumoraux lors des analyses pathologiques et des analyses de spectrométrie de masse.

Ces résultats suggèrent à nouveau que la technique MALDI MSI couplée à la protéomique apporte des informations supplémentaires et peut améliorer la connaissance des glioblastomes. L'analyse est en cours sur les autres prélèvements transmis au laboratoire.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'analyse préliminaire des gliomes anaplasiques a démontré la faisabilité du projet. Les premiers résultats de l'analyse des échantillons de glioblastomes confirment également la faisabilité et l'intérêt de cette approche. La cohorte des 50 échantillons de glioblastome nouvellement diagnostiqués devrait être prochainement complète. Seuls 2 patients restent à inclure à ce jour. Ces premiers résultats en protéomique confirment l'intérêt de l'identification des protéines dans cette pathologie.

Ainsi, au travers de cette thèse, nous avons pu mettre en évidence la possibilité de réaliser une classification non supervisée par imagerie par spectrométrie de masse couplée à l'analyse par microprotéomique. Les résultats ont montré l'apport de cette stratégie pour l'analyse de l'hétérogénéité tumorale, classiquement rapportée dans les glioblastomes. Ces analyses de protéomique apportent de nouvelles informations, notamment sur les mécanismes mis en jeu lors du processus de tumorigenèse. Des réseaux spécifiques ont pu ainsi être mis en évidence en lien avec les données génétiques et de protéogénomiques i.e. les protéines alternatives. Ces données, combinées aux données cliniques, IRM, pathologiques et génomiques actuellement utilisées dans la prise en charge des patients, pourraient améliorer la classification des gliomes et permettre l'identification de potentielles nouvelles cibles thérapeutiques. Dans le cadre de l'étude GLIOMIC, il faut également souligner que des analyses de biologie moléculaires plus poussées et non réalisées en routine, seront également effectuées, notamment au niveau des mutations du promoteur de TERT, des mutations de P53. Les analyses de bio-informatiques seront réalisées dès que les résultats des analyses en lipides et protéines auront été effectués et dès que la médiane de survie globale des patients aura été atteinte. Nous avons volontairement choisi cette option de recueil prospectif, connaissant les difficultés liées au recrutement, puis au suivi des patients et l'attente liée au délai entre chirurgie et décès des patients correspondant à la survie globale, qui nous semblait être le critère pronostique le plus fiable, afin d'obtenir des prélèvements d'une qualité optimale dans cette première approche et de proposer la classification la plus précise possible.

Au vu des premiers résultats obtenus, 50 autres patients avec diagnostic de glioblastome enregistrés dans la tumorothèque et correspondant aux critères d'inclusion de l'étude GLIOMIC seront inclus de façon rétrospective afin de valider les données de la classification après amendement du protocole. Une fois les résultats

validés sur la cohorte de 100 échantillons tumoraux, des analyses seront réalisées sur les échantillons sanguins prélevés de façon prospective dans le cadre de l'étude GLIOMIC afin de rechercher dans le sang une signature moléculaire concordante, correspondant à celle déjà identifiée au niveau des échantillons tumoraux. L'objectif est ici d'évaluer l'intérêt de marqueurs sanguins qui pourraient représenter une aide majeure pour le diagnostic et le suivi des patients. En effet, la chirurgie cérébrale reste invasive et il n'est pas envisageable de réaliser un suivi en temps réel de l'évolution des marqueurs retrouvés au niveau des échantillons tumoraux. Les indications de nouvelle chirurgie au cours de l'évolution d'un glioblastome restent très limitées. Ainsi, l'identification d'une signature moléculaire au niveau sanguin lors d'un prélèvement restant peu invasif et pouvant être facilement répété, aurait un intérêt évident pour les patients que ce soit au moment du diagnostic et tout au long du suivi de la maladie. Si une signature était validée au niveau sanguin, l'étude serait poursuivie par une évaluation prospective de nouveaux cas de tumeurs cérébrales avec des prélèvements sanguins réguliers dans le but d'évaluer leurs modifications au cours de la maladie et sous l'impact des différents traitements.

Par ailleurs, toujours au vu des premiers résultats encourageants de nouveaux projets sont en cours de développement au laboratoire.

Une fois l'étude sur les 100 cas de glioblastomes réalisée, il paraît intéressant de rechercher et de comparer les patterns de protéines obtenus par analyse en spectrométrie de masse MALDI couplée à la microprotéomique et les différents sous-groupes de gliomes classés selon le statut de la mutation IDH et le statut de la codélétion 1p19q. En effet, 3 grands groupes de tumeurs sont décrits dans la classification OMS 2016 : les tumeurs IDH mutées avec codélétion 1p19q, correspondant aux oligodendrogliomes moléculaires, les tumeurs IDH mutées sans codélétion 1p19q, correspondant aux astrocytomes moléculaires, les tumeurs IDH wild type (non mutées) et sans codélétion 1p19q, correspondant aux glioblastomes moléculaires. Les tumeurs IDH wild type (non mutées) avec codélétion 1p19q ne sont pas observées en pratique. L'étude GLIOMIC va être également amendée afin d'inclure les nouveaux cas de gliomes pour obtenir une cohorte prospective de 30 patients avec 10 tumeurs pour chacun des 3 grands groupes : tumeurs IDH mutées avec codélétion 1p19q, tumeurs IDH mutées sans codélétion 1p19q et les tumeurs IDH wild type - non mutées et sans codélétion 1p19q, quel que soit le diagnostic

histopathologique retenu. Les résultats seront ensuite validés sur une cohorte rétrospective de 10 tumeurs pour chacun des 3 grands groupes, soit à nouveau 30 patients au total. Des prélèvements sanguins seront également réalisés dans cette partie prospective de l'étude, afin de rechercher une éventuelle signature définie au niveau du tissu tumoral. Ce travail a l'intérêt d'évaluer l'ensemble des gliomes et de rechercher si les études de protéomiques confirment les résultats et la classification de l'analyse de biologie moléculaire telle que définie par la classification OMS 2016.

Dans le cadre du prochain amendement de l'étude GLIOMIC, une analyse complémentaire sera également réalisée afin de comparer les résultats obtenus en spectrométrie MALDI couplée à l'analyse microprotéomique sur 50 cas de glioblastomes pour lesquels une paire d'échantillons tumoraux au diagnostic initial et à la première récurrence sont disponibles. Cette étude sera réalisée de façon rétrospective étant donné que seuls 20 à 30% des patients sont ré-opérés au cours de l'évolution de la maladie. L'objectif est de rechercher des modifications entre les patterns de protéines identifiés au diagnostic et à la 1^{ère} récurrence afin de mieux comprendre les mécanismes de résistance aux traitements. En fonction des résultats, une analyse de paires de gliomes classés selon leurs statuts IDH et codéletion 1p19 sera également réalisée.

Enfin, toujours dans le cadre du protocole GLIOMIC, il nous paraît nécessaire de vérifier la faisabilité de l'analyse MALDI-MSI couplée à la protéomique sur des échantillons congelés après un délai de 2 heures afin de pouvoir élargir au mieux l'accès à ces analyses à tous les patients lors de la prise en charge quotidienne même si la congélation la plus rapide sera toujours recommandée. En effet, dans le cadre de l'étude GLIOMIC, 7 prélèvements sur les 88 proposés, soit 8%, initialement proposés pour l'étude GLIOMIC n'ont pu être inclus pour des problèmes techniques, principalement en raison d'un délai trop long entre résection chirurgicale et mise en congélation malgré le travail réalisé en collaboration avec l'équipe de Neurochirurgie pourtant très impliquée dans le protocole et son bon déroulement, et consciente des impératifs techniques. Nous vérifierons la reproductibilité de la signature retrouvée dans l'étude sur les 100 glioblastomes en recherchant cette signature sur une nouvelle cohorte de 20 patients : 10 pour lesquels une congélation du tissu tumoral sera obtenue dans les 2 heures après exérèse chirurgicale (condition optimale) et une

congélation sera réalisée entre 2 et 4 heures après chirurgie, et 10 pour lesquels une congélation du tissu tumoral sera obtenue dans les 2 heures après exérèse chirurgicale et une congélation sera réalisée entre 4 et 6 heures après chirurgie.

De nouvelles thématiques vont également être développées à partir de ce travail. Des facteurs psychologiques (émotion, cognitif) pourraient avoir un rôle sur le pronostic du cancer (Mainio et al., 2006 ; Chida et al., 2008). Un lien entre le risque de dépression et une augmentation du taux de IGF-I et IGFBP-3 a été retrouvé dans une étude sur 249 gliomes (Wang et al., 2014). Dans cette étude, la survie des patients avec une dépression était significativement plus mauvaise que celles des autres patients. Dans une autre étude sur 132 gliomes de haut grade, le risque de dépression était également corrélé avec des marqueurs de l'inflammation tels que la protéine C-réactive ou l'interleukine 6 et à nouveau les patients avec une dépression avaient un pronostic moins bon (Jiao et al., 2015). Le rôle pronostic de l'infiltration par des cellules immunitaires dans le cerveau lors des pathologies tumorales comme les gliomes n'est pas encore clairement établi (Beinkowski et Preusser, 2015). Quelques études ont cependant suggéré que le nerf vague pourrait moduler les cellules CD4 et CD8 (Antonica et al., 1996 ; Karimi et al., 2010 ; Mihaylova et al., 2014). Ces interactions potentielles restent ainsi mal connues à l'heure actuelle. Le projet Head Held High a pour objectif d'étudier le rôle pronostic des facteurs environnementaux, notamment psychologiques, et leur impact sur les cellules immunitaires exprimées au cours des gliomes. Dans ce projet, il est prévu dans une première analyse rétrospective d'identifier une combinaison de protéines impliquées dans la dépression et l'immunité dans les glioblastomes humains. Dans ce cadre le projet GLIOMIC servira de base à cette nouvelle étude. Une fois cette signature définie, une étude prospective pourra alors être initiée afin de valider son rôle pronostic dans une cohorte de glioblastomes nouvellement diagnostiqués et son éventuelle association à des facteurs physiologiques (rythme cardiaque, taux sanguins de marqueurs d'inflammation) ou à des facteurs psychologiques (échelles de dépression et de qualité de vie). En parallèle, de ce projet chez l'Homme, une étude prospective randomisée sera réalisée en collaboration avec le laboratoire du Professeur Terny sur des chiens présentant un gliome spontané afin d'évaluer l'impact sur la survie globale des stimulations du nerf vague associé aux traitements oncologiques de référence.

Ainsi l'analyse protéomique, telle que réalisée avec les outils de microprotéomique dont dispose le laboratoire, devrait permettre d'améliorer le pronostic des gliomes. Ces travaux réalisés en parallèle avec des études d'onco-immunologie au laboratoire focalisées sur la réactivation des macrophages au sein du micro-environnement tumoral en prenant en compte l'hétérogénéité, ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques en vue d'une médecine de précision.

REFERENCES

Aldape K, Zadeh G, Mansouri S, Reifenberger G, von Deimling A. Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol.* 2015 Jun;129(6):829-48.

Addona TA, Abbatiello SE, Schilling B, Skates SJ, Mani DR, Bunk DM, Spiegelman CH, Zimmerman LJ, Ham AJ, Keshishian H, Hall SC, Allen S, Blackman RK, Borchers CH, Buck C, Cardasis HL, Cusack MP, Dodder NG, Gibson BW, Held JM, Hiltke T, Jackson A, Johansen EB, Kinsinger CR, Li J, Mesri M, Neubert TA, Niles RK, Pulsipher TC, Ransohoff D, Rodriguez H, Rudnick PA, Smith D, Tabb DL, Tegeler TJ, Variyath AM, Vega-Montoto LJ, Wahlander A, Waldemarson S, Wang M, Whiteaker JR, Zhao L, Anderson NL, Fisher SJ, Liebler DC, Paulovich AG, Regnier FE, Tempst P, Carr SA. Multi-site assessment of the precision and reproducibility of multiple reaction monitoring-based measurements of proteins in plasma. *Nat Biotechnol.* 2009 Jul;27(7):633-41.

Ait-Belkacem R, Berenguer C, Villard C, Ouafik L, Figarella-Branger D, Chinot O, Lafitte D. MALDI imaging and in-source decay for top-down characterization of glioblastoma. *Proteomics.* 2014 May;14(10):1290-301.

Albert NL, Weller M, Suchorska B, Galldiks N, Soffietti R, Kim MM, la Fougère C, Pope W, Law I, Arbizu J, Chamberlain MC, Vogelbaum M, Ellingson BM, Tonn JC. Response Assessment in Neuro-Oncology working group and European Association for Neuro-Oncology recommendations for the clinical use of PET imaging in gliomas. *Neuro Oncol.* 2016 Sep;18(9):1199-208.

Alentorn A, Dehais C, Ducray F, Carpentier C, Mokhtari K, Figarella-Branger D, Chinot O, Cohen-Moyal E, Ramirez C, Loiseau H, Elouahdani-Hamdi S, Beauchesne P, Langlois O, Desenclos C, Guillamo JS, Dam-Hieu P, Ghiringhelli F, Colin P, Godard J, Parker F, Dhermain F, Carpentier AF, Frenel JS, Menei P, Bauchet L, Faillot T, Fesneau M, Fontaine D, Motuo-Fotso MJ, Vauleon E, Gaultier C, Le Guerinel C, Gueye EM, Noel G, Desse N, Durando X, Barrascout E, Wager M, Ricard D, Carpiuc I, Delattre JY, Idhahbi A; POLA Network. Allelic loss of 9p21.3 is a

prognostic factor in 1p/19q codeleted anaplastic gliomas. *Neurology*. 2015 Oct 13;85(15):1325-31.

An JH, Lee SY, Jeon JY, Cho KG, Kim SU, Lee MA. Identification of gliotropic factors that induce human stem cell migration to malignant tumor. *J Proteome Res*. 2009 Jun;8(6):2873-81.

Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics*. 2002 Nov;1(11):845-67.

Angel PM, Caprioli RM. Matrix-assisted laser desorption ionization imaging mass spectrometry: in situ molecular mapping. *Biochemistry*. 2013 Jun 4;52(22):3818-28.

Antonica A, Ayroldi E, Magni F, Paolocci N. Lymphocyte traffic changes induced by monolateral vagal denervation in mouse thymus and peripheral lymphoid organs. *J Neuroimmunol*. 1996 Feb;64(2):115-22.

Asklund T, Malmström A, Bergqvist M, Björ O, Henriksson R. Brain tumors in Sweden: data from a population-based registry 1999-2012. *Acta Oncol*. 2015 Mar;54(3):377-84.

Autelitano F, Loyaux D, Roudières S, Déon C, Guette F, Fabre P, Ping Q, Wang S, Auvergne R, Badarinarayana V, Smith M, Guillemot JC, Goldman SA, Natesan S, Ferrara P, August P. Identification of novel tumor-associated cell surface sialoglycoproteins in human glioblastoma tumors using quantitative proteomics. *PLoS One*. 2014 Oct 31;9(10):e110316.

Balluff B, Rauser S, Meding S, Elsner M, Schöne C, Feuchtinger A, Schuhmacher C, Novotny A, Jütting U, Maccarrone G, Sarioglu H, Ueffing M, Braselmann H, Zitzelsberger H, Schmid RM, Höfler H, Ebert MP, Walch A. MALDI imaging identifies prognostic seven-protein signature of novel tissue markers in intestinal-type gastric cancer. *Am J Pathol*. 2011 Dec;179(6):2720-9.

Batchelor TT, Mulholland P, Neyns B, Nabors LB, Campone M, Wick A, Mason W, Mikkelsen T, Phuphanich S, Ashby LS, Degroot J, Gattamaneni R, Cher L, Rosenthal M, Payer F, Jürgensmeier JM, Jain RK, Sorensen AG, Xu J, Liu Q, van den Bent M. Phase III randomized trial comparing the efficacy of cediranib as monotherapy, and in combination with lomustine, versus lomustine alone in patients with recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol*. 2013 Sep 10;31(26):3212-8.

Bauchet L, Rigau V, Mathieu-Daudé H, Figarella-Branger D, Hugues D, Palusseau L, Bauchet F, Fabbro M, Campello C, Capelle L, Durand A, Trétarre B, Frappaz D, Henin D, Menei P, Honnorat J, Segnarbieux F. French brain tumor data bank: methodology and first results on 10,000 cases. *J Neurooncol*. 2007 Sep;84(2):189-99.

Baumert BG, Hegi ME, van den Bent MJ, von Deimling A, Gorlia T, Hoang-Xuan K, Brandes AA, Kantor G, Taphoorn MJ, Hassel MB, Hartmann C, Ryan G, Capper D4, Kros JM, Kurscheid S, Wick W, Enting R, Reni M, Thiessen B, Dhermain F, Bromberg JE, Feuvret L, Reijneveld JC, Chinot O, Gijtenbeek JM, Rossiter JP, Dif N, Balana C, Bravo-Marques J, Clement PM24, Marosi C, Tzuk-Shina T, Nordal RA, Rees J, Lacombe D, Mason WP, Stupp R. Temozolomide chemotherapy versus radiotherapy in high-risk low-grade glioma (EORTC 22033-26033): a randomised, open-label, phase 3 intergroup study. *Lancet Oncol*. 2016 Nov;17(11):1521-1532.

Bieńkowski M, Preusser M. Prognostic role of tumour-infiltrating inflammatory cells in brain tumours: literature review. *Curr Opin Neurol*. 2015 Dec;28(6):647-58.

Bernard-Arnoux F, Lamure M, Ducray F, Aulagner G, Honnorat J, Armoiry X. The cost-effectiveness of tumor-treating fields therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma. *Neuro Oncol*. 2016 Aug;18(8):1129-36.

Bettegowda C, Agrawal N, Jiao Y, Sausen M, Wood LD, Hruban RH, Rodriguez FJ, Cahill DP, McLendon R, Riggins G, Velculescu VE, Oba-Shinjo SM, Marie SK, Vogelstein B, Bigner D, Yan H, Papadopoulos N, Kinzler KW. Mutations in CIC and FUBP1 contribute to human oligodendroglioma. *Science*. 2011 Sep;333(6048):1453-5.

Bhat KP, Balasubramaniyan V, Vaillant B, Ezhilarasan R, Hummelink K, Hollingsworth F, Wani K, Heathcock L, James JD, Goodman LD, Conroy S, Long L, Lelic N, Wang S, Gumin J, Raj D, Kodama Y, Raghunathan A, Olar A, Joshi K, Pelloski CE, Heimberger A, Kim SH, Cahill DP, Rao G, Den Dunnen WF, Boddeke HW, Phillips HS, Nakano I, Lang FF, Colman H, Sulman EP, Aldape K. Mesenchymal differentiation mediated by NF- κ B promotes radiation resistance in glioblastoma. *Cancer Cell*. 2013 Sep 9;24(3):331-46.

Bleau AM, Hambardzumyan D, Ozawa T, Fomchenko EI, Huse JT, Brennan CW, Holland EC. PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells. *Cell Stem Cell*. 2009 Mar 6;4(3):226-35.

Blumenthal D, Stupp R, Zhang P, Kim MM, Gilbert MR, Nabors LB, Mason WP, van den Bent MJ, Hegi M, Golfopoulos V, Erridge S, Perry J, Fink KL, Brown P, Corn BW, Karlovits S, Schultz C, Weller M, Mehta MP, Gorlia T. The impact of extended adjuvant temozolomide in newly-diagnosed glioblastoma: a secondary analysis of EORTC and NRG Oncology/RTOG. *Neuro Oncol* 2015; 17(Suppl 5): v2

Bock T, Moest H, Omasits U, Dolski S, Lundberg E, Frei A, Hofmann A, Bausch-Fluck D, Jacobs A, Krayenbuehl N, Uhlen M, Aebersold R, Frei K, Wollscheid B. Proteomic analysis reveals drug accessible cell surface N-glycoproteins of primary and established glioblastoma cell lines. *J Proteome Res*. 2012 Oct 5;11(10):4885-93.

Bonnel D, Longuespee R, Franck J, Roudbaraki M, Gosset P, Day R, Salzet M, Fournier I. Multivariate analyses for biomarkers hunting and validation through on-tissue bottom-up or in-source decay in MALDI-MSI: application to prostate cancer. *Anal Bioanal Chem*. 2011 Jul;401(1):149-65.

Bouslimani A, Bec N, Glueckmann M, Hirtz C, Larroque C. Matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry of oxaliplatin derivatives in heated intraoperative chemotherapy (HIPEC)-like treated rat kidney. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2010 Feb;24(4):415-21.

Brada M, Stenning S, Gabe R, Thompson LC, Levy D, Rampling R, Erridge S, Saran F, Gattamaneni R, Hopkins K, Beall S, Collins VP, Lee SM. Temozolomide versus procarbazine, lomustine, and vincristine in recurrent high-grade glioma. *J Clin Oncol*. 2010 Oct 20;28(30):4601-8.

Bregy A, Shah AH, Diaz MV, Pierce HE, Ames PL, Diaz D, Komotar RJ. The role of Gliadel wafers in the treatment of high-grade gliomas. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2013 Dec;13(12):1453-61.

Brennan CW, Verhaak RG, McKenna A, Campos B, Noushmehr H, Salama SR, Zheng S, Chakravarty D, Sanborn JZ, Berman SH, Beroukhim R, Bernard B, Wu CJ, Genovese G, Shmulevich I, Barnholtz-Sloan J, Zou L, Vegesna R, Shukla SA, Ciriello G, Yung WK, Zhang W, Sougnez C, Mikkelsen T, Aldape K, Bigner DD, Van Meir EG, Prados M, Sloan A, Black KL, Eschbacher J, Finocchiaro G, Friedman W, Andrews DW, Guha A, Iacocca M, O'Neill BP, Foltz G, Myers J, Weisenberger DJ, Penny R, Kucherlapati R, Perou CM, Hayes DN, Gibbs R, Marra M, Mills GB, Lander E, Spellman P, Wilson R, Sander C, Weinstein J, Meyerson M, Gabriel S, Laird PW, Haussler D, Getz G, Chin L; TCGA Research Network. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell*. 2013 Oct 10;155(2):462-77.

Buckner JC, Shaw EG, Pugh SL, Chakravarti A, Gilbert MR, Barger GR, Coons S, Ricci P, Bullard D, Brown PD, Stelzer K, Brachman D, Suh JH, Schultz CJ, Bahary JP, Fisher BJ, Kim H, Murtha AD, Bell EH, Won M, Mehta MP, Curran WJ Jr. Radiation plus Procarbazine, CCNU, and Vincristine in Low-Grade Glioma. *N Engl J Med*. 2016 Apr 7;374(14):1344-55.

Cairncross G, Wang M, Shaw E, Jenkins R, Brachman D, Buckner J, Fink K, Souhami L, Laperriere N, Curran W, Mehta M. Phase III trial of chemoradiotherapy for anaplastic oligodendroglioma: long-term results of RTOG 9402. *J Clin Oncol*. 2013 Jan 20;31(3):337-43.

Cancer Genome Atlas Research Network, Brat DJ, Verhaak RG, Aldape KD, Yung WK, Salama SR, Cooper LA, Rheinbay E, Miller CR, Vitucci M, Morozova O,

Robertson AG, Noushmehr H, Laird PW, Cherniack AD, Akbani R, Huse JT, Ciriello G, Poisson LM, Barnholtz-Sloan JS, Berger MS, Brennan C, Colen RR, Colman H, Flanders AE, Giannini C, Grifford M, Iavarone A, Jain R, Joseph I, Kim J, Kasaian K, Mikkelsen T, Murray BA, O'Neill BP, Pachter L, Parsons DW, Sougnez C, Sulman EP, Vandenberg SR, Van Meir EG, von Deimling A, Zhang H, Crain D, Lau K, Mallery D, Morris S, Paulauskis J, Penny R, Shelton T, Sherman M, Yena P, Black A, Bowen J, Dicostanzo K, Gastier-Foster J, Leraas KM, Lichtenberg TM, Pierson CR, Ramirez NC, Taylor C, Weaver S, Wise L, Zmuda E, Davidsen T, Demchok JA, Eley G, Ferguson ML, Hutter CM, Mills Shaw KR, Ozenberger BA, Sheth M, Sofia HJ, Tarnuzzer R, Wang Z, Yang L, Zenklusen JC, Ayala B, Baboud J, Chudamani S, Jensen MA, Liu J, Pihl T, Raman R, Wan Y, Wu Y, Ally A, Auman JT, Balasundaram M, Balu S, Baylin SB, Beroukhir R, Bootwalla MS, Bowlby R, Bristow CA, Brooks D, Butterfield Y, Carlsen R, Carter S, Chin L, Chu A, Chuah E, Cibulskis K, Clarke A, Coetzee SG, Dhalla N, Fennell T, Fisher S, Gabriel S, Getz G, Gibbs R, Guin R, Hadjipanayis A, Hayes DN, Hinoue T, Hoadley K, Holt RA, Hoyle AP, Jefferys SR, Jones S, Jones CD, Kucherlapati R, Lai PH, Lander E, Lee S, Lichtenstein L, Ma Y, Maglinte DT, Mahadeshwar HS, Marra MA, Mayo M, Meng S, Meyerson ML, Mieczkowski PA, Moore RA, Mose LE, Mungall AJ, Pantazi A, Parfenov M, Park PJ, Parker JS, Perou CM, Protopopov A, Ren X, Roach J, Sabedot TS, Schein J, Schumacher SE, Seidman JG, Seth S, Shen H, Simons JV, Sipahimalani P, Soloway MG, Song X, Sun H, Tabak B, Tam A, Tan D, Tang J, Thiessen N, Triche T Jr, Van Den Berg DJ, Veluvolu U, Waring S, Weisenberger DJ, Wilkerson MD, Wong T, Wu J, Xi L, Xu AW, Yang L, Zack TI, Zhang J, Aksoy BA, Arachchi H, Benz C, Bernard B, Carlin D, Cho J, DiCara D, Frazer S, Fuller GN, Gao J, Gehlenborg N, Haussler D, Heiman DI, Iype L, Jacobsen A, Ju Z, Katzman S, Kim H, Knijnenburg T, Kreisberg RB, Lawrence MS, Lee W, Leinonen K, Lin P, Ling S, Liu W, Liu Y, Liu Y, Lu Y, Mills G, Ng S, Noble MS, Paull E, Rao A, Reynolds S, Saksena G, Sanborn Z, Sander C, Schultz N, Senbabaoglu Y, Shen R, Shmulevich I, Sinha R, Stuart J, Sumer SO, Sun Y, Tasman N, Taylor BS, Voet D, Weinhold N, Weinstein JN, Yang D, Yoshihara K, Zheng S, Zhang W, Zou L, Abel T, Sadeghi S, Cohen ML, Eschbacher J, Hattab EM, Raghunathan A, Schniederjan MJ, Aziz D, Barnett G, Barrett W, Bigner DD, Boice L, Brewer C, Calatozzolo C, Campos B, Carlotti CG Jr, Chan TA, Cuppini L, Curley E, Cuzzubbo S, Devine K, DiMeco F, Duell R, Elder JB, Fehrenbach A, Finocchiaro G, Friedman W, Fulop J, Gardner J, Hermes B, Herold-Mende C, Jungk C, Kendler A, Lehman NL, Lipp

E, Liu O, Mandt R, McGraw M, McLendon R, McPherson C, Neder L, Nguyen P, Noss A, Nunziata R, Ostrom QT, Palmer C, Perin A, Pollo B, Potapov A, Potapova O, Rathmell WK, Rotin D, Scarpace L, Schilero C, Senecal K, Shimmel K, Shurkhay V, Sifri S, Singh R, Sloan AE, Smolenski K, Staugaitis SM, Steele R, Thorne L, Tirapelli DP, Unterberg A, Vallurupalli M, Wang Y, Warnick R, Williams F, Wolinsky Y, Bell S, Rosenberg M, Stewart C, Huang F, Grimsby JL, Radenbaugh AJ, Zhang J. Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *N Engl J Med*. 2015 Jun 25;372(26):2481-98.

Castellino S, Groseclose MR, Wagner D. MALDI imaging mass spectrometry: bridging biology and chemistry in drug development. *Bioanalysis*. 2011 Nov;3(21):2427-41.

Ceccarelli M, Barthel FP, Malta TM, Sabedot TS, Salama SR, Murray BA, Morozova O, Newton Y, Radenbaugh A, Pagnotta SM, Anjum S, Wang J, Manyam G, Zoppoli P, Ling S, Rao AA, Grifford M, Cherniack AD, Zhang H, Poisson L, Carlotti CG Jr, Tirapelli DP, Rao A, Mikkelsen T, Lau CC, Yung WK, Rabadan R, Huse J, Brat DJ, Lehman NL, Barnholtz-Sloan JS, Zheng S, Hess K, Rao G, Meyerson M, Beroukhi R, Cooper L, Akbani R, Wrensch M, Haussler D, Aldape KD, Laird PW, Gutmann DH; TCGA Research Network, Nounshmehr H, Iavarone A, Verhaak RG. Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma. *Cell*. 2016 Jan 28;164(3):550-63.

Chamberlain MC, Johnston S. Salvage chemotherapy with bevacizumab for recurrent alkylator-refractory anaplastic astrocytoma. *J Neurooncol*. 2009 Feb;91(3):359-67.

Chamberlain MC, Johnston S. Bevacizumab for recurrent alkylator-refractory anaplastic oligodendroglioma. *Cancer*. 2009 Apr 15;115(8):1734-43.

Chantaravisoot N, Wongkongkathep P, Loo JA, Mischel PS, Tamanoi F. Significance of filamin A in mTORC2 function in glioblastoma. *Mol Cancer*. 2015 Jul 2;14:127.

Chen R, Hui L, Sturm RM, Li L. Three dimensional mapping of neuropeptides and lipids in crustacean brain by mass spectral imaging. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2009 Jun;20(6):1068-77.

Chen R, Jiang X, Conaway MC, Mohtashemi I, Hui L, Viner R, Li L. Mass spectral analysis of neuropeptide expression and distribution in the nervous system of the lobster *Homarus americanus*. *J Proteome Res.* 2010 Feb 5;9(2):818-32.

Chida Y, Hamer M, Wardle J, Steptoe A. Do stress-related psychosocial factors contribute to cancer incidence and survival? *Nat Clin Pract Oncol.* 2008 Aug;5(8):466-75.

Chinot OL, Wick W, Mason W, Henriksson R, Saran F, Nishikawa R, Carpentier AF, Hoang-Xuan K, Kavan P, Cernea D, Brandes AA, Hilton M, Abrey L, Cloughesy T. Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med.* 2014 Feb 20;370(8):709-22.

Chumbalkar VC, Subhashini C, Dhople VM, Sundaram CS, Jagannadham MV, Kumar KN, Srinivas PN, Mythili R, Rao MK, Kulkarni MJ, Hegde S, Hegde AS, Samual C, Santosh V, Singh L, Sirdeshmukh R. Differential protein expression in human gliomas and molecular insights. *Proteomics.* 2005 Mar;5(4):1167-77.

Collet B, Guitton N, Saïkali S, Avril T, Pineau C, Hamlat A, Mosser J, Quillien V. Differential analysis of glioblastoma multiforme proteome by a 2D-DIGE approach. *Proteome Sci.* 2011 Apr 6;9(1):16.

Colsch B, Jackson SN, Dutta S, Woods AS. Molecular Microscopy of Brain Gangliosides: Illustrating their Distribution in Hippocampal Cell Layers. *ACS Chem Neurosci.* 2011 Feb 21;2(4):213-222.

de Aquino PF, Carvalho PC, Nogueira FC, da Fonseca CO, de Souza Silva JC, Carvalho Mda G, Domont GB, Zanchin NI, Fischer Jde S. A Time-Based and

Intratumoral Proteomic Assessment of a Recurrent Glioblastoma Multiforme. *Front Oncol.* 2016 Aug 22;6:183.

Deighton RF, Le Bihan T, Martin SF, Gerth AM, McCulloch M, Edgar JM, Kerr LE, Whittle IR, McCulloch J. Interactions among mitochondrial proteins altered in glioblastoma. *J Neurooncol.* 2014 Jun;118(2):247-56.

Dekker TJ, Balluff BD, Jones EA, Schöne CD, Schmitt M, Aubele M, Kroep JR, Smit VT, Tollenaar RA, Mesker WE, Walch A, McDonnell LA. Multicenter matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging (MALDI MSI) identifies proteomic differences in breast-cancer-associated stroma. *J Proteome Res.* 2014 Nov 7;13(11):4730-8.

Delvolve AM, Colsch B, Woods AS. Highlighting anatomical sub-structures in rat brain tissue using lipid imaging. *Anal Methods.* 2011 Aug 1;3(8):1729-1736.

Demeure K, Fack F, Duriez E, Tiemann K, Bernard A, Golebiewska A, Bougnaud S, Bjerkvig R, Domon B, Niclou SP. Targeted Proteomics to Assess the Response to Anti-Angiogenic Treatment in Human Glioblastoma (GBM). *Mol Cell Proteomics.* 2016 Feb;15(2):481-92.

Desjardins A, Reardon DA, Herndon JE 2nd, Marcello J, Quinn JA, Rich JN, Sathornsumetee S, Gururangan S, Sampson J, Bailey L, Bigner DD, Friedman AH, Friedman HS, Vredenburgh JJ. Bevacizumab plus irinotecan in recurrent WHO grade 3 malignant gliomas. *Clin Cancer Res.* 2008 Nov 1;14(21):7068-73.

Djidja MC, Francese S, Loadman PM, Sutton CW, Scriven P, Claude E, Snel MF, Franck J, Salzet M, Clench MR. Detergent addition to tryptic digests and ion mobility separation prior to MS/MS improves peptide yield and protein identification for in situ proteomic investigation of frozen and formalin-fixed paraffin-embedded adenocarcinoma tissue sections. *Proteomics.* 2009 May;9(10):2750-63.

Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro Oncol*. 2012 Nov;14 Suppl 5:v1-49.

Doll S, Urisman A, Oses-Prieto JA, Arnott D, Burlingame AL. Quantitative Proteomics Reveals Fundamental Regulatory Differences in Oncogenic HRAS and Isocitrate Dehydrogenase (IDH1) Driven Astrocytoma. *Mol Cell Proteomics*. 2017 Jan;16(1):39-56.

El Ayed M, Bonnel D, Longuespée R, Castelier C, Franck J, Vergara D, Desmons A, Tasiemski A, Kenani A, Vinatier D, Day R, Fournier I, Salzet M. MALDI imaging mass spectrometry in ovarian cancer for tracking, identifying, and validating biomarkers. *Med Sci Monit*. 2010 Aug;16(8):BR233-45.

Ellingson BM, Bendszus M, Boxerman J, Barboriak D, Erickson BJ, Smits M, Nelson SJ, Gerstner E, Alexander B, Goldmacher G, Wick W, Vogelbaum M, Weller M, Galanis E, Kalpathy-Cramer J, Shankar L, Jacobs P, Pope WB, Yang D, Chung C, Knopp MV, Cha S, van den Bent MJ, Chang S, Yung WK, Cloughesy TF, Wen PY, Gilbert MR; Jumpstarting Brain Tumor Drug Development Coalition Imaging Standardization Steering Committee. Consensus recommendations for a standardized Brain Tumor Imaging Protocol in clinical trials. *Neuro Oncol*. 2015 Sep;17(9):1188-98.

Esquenazi E, Coates C, Simmons L, Gonzalez D, Gerwick WH, Dorrestein PC. Visualizing the spatial distribution of secondary metabolites produced by marine cyanobacteria and sponges via MALDI-TOF imaging. *Mol Biosyst*. 2008 Jun;4(6):562-70.

Fournier I, Day R, Salzet M. Direct analysis of neuropeptides by in situ MALDI-TOF mass spectrometry in the rat brain. *Neuro Endocrinol Lett*. 2003 Feb-Apr;24(1-2):9-14.

Fang X, Wang C, Balgley BM, Zhao K, Wang W, He F, Weil RJ, Lee CS. Targeted tissue proteomic analysis of human astrocytomas. *J Proteome Res.* 2012 Aug 3;11(8):3937-46.

Fournier I, Wisztorski M, Salzet M. Tissue imaging using MALDI-MS: a new frontier of histopathology proteomics. *Expert Rev Proteomics.* 2008 Jun;5(3):413-24.

Franck J, Arafah K, Elayed M, Bonnel D, Vergara D, Jacquet A, Vinatier D, Wisztorski M, Day R, Fournier I, Salzet M. MALDI imaging mass spectrometry: state of the art technology in clinical proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 2009 Sep;8(9):2023-33.

Franck J, Longuespée R, Wisztorski M, Van Remoortere A, Van Zeijl R, Deelder A, Salzet M, McDonnell L, Fournier I. MALDI mass spectrometry imaging of proteins exceeding 30,000 daltons. *Med Sci Monit.* 2010 Sep;16(9):BR293-9.

Friedman HS, Prados MD, Wen PY, Mikkelsen T, Schiff D, Abrey LE, Yung WK, Paleologos N, Nicholas MK, Jensen R, Vredenburgh J, Huang J, Zheng M, Cloughesy T. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol.* 2009 Oct 1;27(28):4733-40.

Furuta M, Weil RJ, Vortmeyer AO, Huang S, Lei J, Huang TN, Lee YS, Bhowmick DA, Lubensky IA, Oldfield EH, Zhuang Z. Protein patterns and proteins that identify subtypes of glioblastoma multiforme. *Oncogene.* 2004 Sep 2;23(40):6806-14.

Gagnon H, Franck J, Wisztorski M, Day R, Fournier I, Salzet M. Targeted mass spectrometry imaging: specific targeting mass spectrometry imaging technologies from history to perspective. *Prog Histochem Cytochem.* 2012 Oct;47(3):133-74.

Gautam P, Nair SC, Gupta MK, Sharma R, Polisetty RV, Uppin MS, Sundaram C, Puligopu AK, Ankathi P, Purohit AK, Chandak GR, Harsha HC, Sirdeshmukh R. Proteins with altered levels in plasma from glioblastoma patients as revealed by iTRAQ-based quantitative proteomic analysis. *PLoS One.* 2012;7(9):e46153.

Gilbert MR, Wang M, Aldape KD, Stupp R, Hegi ME, Jaeckle KA, Armstrong TS, Wefel JS, Won M, Blumenthal DT, Mahajan A, Schultz CJ, Erridge S, Baumert B, Hopkins KI, Tzuk-Shina T, Brown PD, Chakravarti A, Curran WJ Jr, Mehta MP. Dose-dense temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: a randomized phase III clinical trial. *J Clin Oncol*. 2013 Nov 10;31(32):4085-91.

Gilbert MR, Dignam JJ, Armstrong TS, Wefel JS, Blumenthal DT, Vogelbaum MA, Colman H, Chakravarti A, Pugh S, Won M, Jeraj R, Brown PD, Jaeckle KA, Schiff D, Stieber VW, Brachman DG, Werner-Wasik M, Tremont-Lukats IW, Sulman EP, Aldape KD, Curran WJ Jr, Mehta MP. A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med*. 2014 Feb 20;370(8):699-708.

Gimenez M, Marie SK, Oba-Shinjo S, Uno M, Izumi C, Oliveira JB, Rosa JC. Quantitative proteomic analysis shows differentially expressed HSPB1 in glioblastoma as a discriminating short from long survival factor and NOVA1 as a differentiation factor between low-grade astrocytoma and oligodendroglioma. *BMC Cancer*. 2015 Jun 25;15:481.

Gollapalli K, Ray S, Srivastava R, Renu D, Singh P, Dhali S, Bajpai Dikshit J, Srikanth R, Moiyadi A, Srivastava S. Investigation of serum proteome alterations in human glioblastoma multiforme. *Proteomics*. 2012 Aug;12(14):2378-90.

Goodwin RJ, Macintyre L, Watson DG, Scullion SP, Pitt AR. A solvent-free matrix application method for matrix-assisted laser desorption/ionization imaging of small molecules. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2010 Jun 15;24(11):1682-6.

Goodwin RJ, Scullion P, Macintyre L, Watson DG, Pitt AR. Use of a solvent-free dry matrix coating for quantitative matrix-assisted laser desorption ionization imaging of 4-bromophenyl-1,4-diazabicyclo(3.2.2)nonane-4-carboxylate in rat brain and quantitative analysis of the drug from laser microdissected tissue regions. *Anal Chem*. 2010 May 1;82(9):3868-73.

Goodwin RJ, Mackay CL, Nilsson A, Harrison DJ, Farde L, Andren PE, Iverson SL.

Qualitative and quantitative MALDI imaging of the positron emission tomography ligands raclopride (a D2 dopamine antagonist) and SCH 23390 (a D1 dopamine antagonist) in rat brain tissue sections using a solvent-free dry matrix application method. *Anal Chem.* 2011 Dec 15;83(24):9694-701.

Goplen D, Wang J, Enger PØ, Tysnes BB, Terzis AJ, Laerum OD, Bjerkvig R. Protein disulfide isomerase expression is related to the invasive properties of malignant glioma. *Cancer Res.* 2006 Oct 15;66(20):9895-902.

Gramatzki D, Kickingreder P, Hentschel B, Felsberg J, Herrlinger U, Schackert G, Tonn JC, Westphal M, Sabel M, Schlegel U, Wick W, Pietsch T, Reifenberger G, Loeffler M, Bendszus M, Weller M. Limited role for extended maintenance temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *Neurology* in press

Guo T, Wang X, Li M, Yang H, Li L, Peng F, Zhan X. Identification of Glioblastoma Phosphotyrosine-Containing Proteins with Two-Dimensional Western Blotting and Tandem Mass Spectrometry. *Biomed Res Int.* 2015;2015:134050.

Gupta MK, Jayaram S, Reddy DN, Polisetty RV, Sirdeshmukh R. Transcriptomic and Proteomic Data Integration and Two-Dimensional Molecular Maps with Regulatory and Functional Linkages: Application to Cell Proliferation and Invasion Networks in Glioblastoma. *J Proteome Res.* 2015 Dec 4;14(12):5017-27.

Han C, Alkhatir R, Froukh T, Minassian AG, Galati M, Liu RH, Fotouhi M, Sommerfeld J, Alfrook AJ, Marshall C, Walker S, Bauer P, Scherer SW, Riess O, Buchert R, Minassian BA, McPherson PS. Epileptic Encephalopathy Caused by Mutations in the Guanine Nucleotide Exchange Factor DENND5A. *Am J Hum Genet.* 2016 Dec 1;99(6):1359-1367.

Hanash SM, Bobek MP, Rickman DS, Williams T, Rouillard JM, Kuick R, Puravs E. Integrating cancer genomics and proteomics in the post-genome era. *Proteomics.* 2002 Jan;2(1):69-75.

Hanrieder J, Ljungdahl A, Fälth M, Mammo SE, Bergquist J, Andersson M.

L-DOPA-induced dyskinesia is associated with regional increase of striatal dynorphin peptides as elucidated by imaging mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 2011 Oct;10(10):M111.009308.

Hart MG, Garside R, Rogers G, Stein K, Grant R. Temozolomide for high grade glioma. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013 Apr 30;(4):CD007415.

He J, Reifenberger G, Liu L, Collins VP, James CD. Analysis of glioma cell lines for amplification and overexpression of MDM2. *Genes Chromosomes Cancer*. 1994 Oct;11(2):91-6.

Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005 Mar 10;352(10):997-1003.

Hemminki K, Tretli S, Sundquist J, Johannesen TB, Granström C. Familial risks in nervous-system tumours: a histology-specific analysis from Sweden and Norway. *Lancet Oncol*. 2009 May;10(5):481-8.

Herrlinger U, Jones DT, Glas M, Hattingen E, Gramatzki D, Stuplich M, Felsberg J, Bähr O, Gielen GH, Simon M, Wiewrodt D, Schabet M, Hovestadt V, Capper D, Steinbach JP, von Deimling A, Lichter P, Pfister SM, Weller M, Reifenberger G. Gliomatosis cerebri: no evidence for a separate brain tumor entity. *Acta Neuropathol*. 2016 Feb;131(2):309-19.

Heroux MS, Chesnik MA, Halligan BD, Al-Gizawiy M, Connelly JM, Mueller WM, Rand SD, Cochran EJ, LaViolette PS, Malkin MG, Schmainda KM, Mirza SP. Comprehensive characterization of glioblastoma tumor tissues for biomarker identification using mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *Physiol Genomics*. 2014 Jul 1;46(13):467-81.

Hiratsuka M, Inoue T, Toda T, Kimura N, Shirayoshi Y, Kamitani H, Watanabe T, Ohama E, Tahimic CG, Kurimasa A, Oshimura M. Proteomics-based identification of

differentially expressed genes in human gliomas: down-regulation of SIRT2 gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Sep 26;309(3):558-66.

Hobbs SK, Shi G, Homer R, Harsh G, Atlas SW, Bednarski MD. Magnetic resonance image-guided proteomics of human glioblastoma multiforme. *J Magn Reson Imaging.* 2003 Nov;18(5):530-6.

Howley R, Kinsella P, Buckley PG, Alcock L, Jansen M, Heffernan J, Stallings RL, Brett FM, Amberger-Murphy V, Farrell MA. Comparative genomic and proteomic analysis of high grade glioma primary cultures and matched tumor in situ. *Exp Cell Res.* 2012 Oct 15;318(17):2245-56.

Huamani J, Willey C, Thotala D, Niermann KJ, Reyzer M, Leavitt L, Jones C, Fleishcher A, Caprioli R, Hallahan DE, Kim DW. Differential efficacy of combined therapy with radiation and AEE788 in high and low EGFR-expressing androgen-independent prostate tumor models. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2008 May 1;71(1):237-46.

Huse JT, Brennan C, Hambardzumyan D, Wee B, Pena J, Rouhanifard SH, Sohn-Lee C, le Sage C, Agami R, Tuschl T, Holland EC. The PTEN-regulating microRNA miR-26a is amplified in high-grade glioma and facilitates gliomagenesis in vivo. *Genes Dev.* 2009 Jun 1;23(11):1327-37.

Huse JT, Diamond EL, Wang L, Rosenblum MK. Mixed glioma with molecular features of composite oligodendroglioma and astrocytoma: a true "oligoastrocytoma"? *Acta Neuropathol.* 2015 Jan;129(1):151-3

Iwadate Y, Sakaida T, Hiwasa T, Nagai Y, Ishikura H, Takiguchi M, Yamaura A. Molecular classification and survival prediction in human gliomas based on proteome analysis. *Cancer Res.* 2004 Apr 1;64(7):2496-501.

Iwadate Y, Sakaida T, Saegusa T, Hiwasa T, Takiguchi M, Fujimoto S, Yamaura A. Proteome-based identification of molecular markers predicting chemosensitivity to

each category of anticancer agents in human gliomas. *Int J Oncol*. 2005 Apr;26(4):993-8.

Jain R, Atak A, Yeola A, Srivastava S. Proteomic level changes associated with S3I201 treated U87 glioma cells. *J Proteomics*. 2017 Jan 6;150:341-350.

Jiang R, Mircean C, Shmulevich I, Cogdell D, Jia Y, Tabus I, Aldape K, Sawaya R, Bruner JM, Fuller GN, Zhang W. Pathway alterations during glioma progression revealed by reverse phase protein lysate arrays. *Proteomics*. 2006 May;6(10):2964-71.

Jiao JT, Sun J, Ma JF, Dai MC, Huang J, Jiang C, Wang C, Cheng C, Shao JF. Relationship between inflammatory cytokines and risk of depression, and effect of depression on the prognosis of high grade glioma patients. *J Neurooncol*. 2015 Sep;124(3):475-84.

Jones EA, Deisinger SO, Hogendoorn PC, Deelder AM, McDonnell LA. Imaging mass spectrometry statistical analysis. *J Proteomics*. 2012 Aug 30;75(16):4962-89.

Kalinina J, Peng J, Ritchie JC, Van Meir EG. Proteomics of gliomas: initial biomarker discovery and evolution of technology. *Neuro Oncol*. 2011 Sep;13(9):926-42.

Kamoun A, Idbaih A, Dehais C, Elarouci N, Carpentier C, Letouzé E, Colin C, Mokhtari K, Jouvet A, Uro-Coste E, Martin-Duverneuil N, Sanson M, Delattre JY, Figarella-Branger D, de Reyniès A, Ducray F; POLA network. Integrated multi-omics analysis of oligodendroglial tumours identifies three subgroups of 1p/19q co-deleted gliomas. *Nat Commun*. 2016 Apr 19;7:11263.

Karimi K, Bienenstock J, Wang L, Forsythe P. The vagus nerve modulates CD4+ T cell activity. *Brain Behav Immun*. 2010 Feb;24(2):316-23.

Khaghani-Razi-Abad S, Hashemi M, Pooladi M, Entezari M, Kazemi E. Proteomics analysis of human oligodendrogloma proteome. *Gene*. 2015 Sep 10;569(1):77-82.

Khalil AA. Biomarker discovery: a proteomic approach for brain cancer profiling. *Cancer Sci.* 2007 Feb;98(2):201-13.

Khatib-Shahidi S, Andersson M, Herman JL, Gillespie TA, Caprioli RM. Direct molecular analysis of whole-body animal tissue sections by imaging MALDI mass spectrometry. *Anal Chem.* 2006 Sep 15;78(18):6448-56.

Kleinschmidt-DeMasters BK, Aisner DL, Birks DK, Foreman NK. Epithelioid GBMs show a high percentage of BRAF V600E mutation. *Am J Surg Pathol.* 2013 May;37(5):685-98.

Korshunov A, Ryzhova M, Hovestadt V, Bender S, Sturm D, Capper D, Meyer J, Schrimpf D, Kool M, Northcott PA, Zheludkova O, Milde T, Witt O, Kulozik AE, Reifenberger G, Jabado N, Perry A, Lichter P, von Deimling A, Pfister SM, Jones DT. Integrated analysis of pediatric glioblastoma reveals a subset of biologically favorable tumors with associated molecular prognostic markers. *Acta Neuropathol.* 2015 May;129(5):669-78.

Kreth FW, Muacevic A, Medele R, Bise K, Meyer T, Reulen HJ. The risk of haemorrhage after image guided stereotactic biopsy of intra-axial brain tumours--a prospective study. *Acta Neurochir (Wien).* 2001;143(6):539-45; discussion 545-6.

Kreth FW, Thon N, Simon M, Westphal M, Schackert G, Nikkhah G, Hentschel B, Reifenberger G, Pietsch T, Weller M, Tonn JC; German Glioma Network. Gross total but not incomplete resection of glioblastoma prolongs survival in the era of radiochemotherapy. *Ann Oncol.* 2013 Dec;24(12):3117-23.

Krex D, Klink B, Hartmann C, von Deimling A, Pietsch T, Simon M, Sabel M, Steinbach JP, Heese O, Reifenberger G, Weller M, Schackert G; German Glioma Network. Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain.* 2007 Oct;130(Pt 10):2596-606.

Laperriere N, Zuraw L, Cairncross G; Cancer Care Ontario Practice Guidelines Initiative Neuro-Oncology Disease Site Group. Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. *Radiother Oncol*. 2002 Sep;64(3):259-73.

Lassman AB, Iwamoto FM, Cloughesy TF, Aldape KD, Rivera AL, Eichler AF, Louis DN, Paleologos NA, Fisher BJ, Ashby LS, Cairncross JG, Roldán GB, Wen PY, Ligon KL, Schiff D, Robins HI, Rocque BG, Chamberlain MC, Mason WP, Weaver SA, Green RM, Kamar FG, Abrey LE, DeAngelis LM, Jhanwar SC, Rosenblum MK, Panageas KS. International retrospective study of over 1000 adults with anaplastic oligodendroglial tumors. *Neuro Oncol*. 2011 Jun;13(6):649-59.

Lee YJ, Perdian DC, Song Z, Yeung ES, Nikolau BJ. Use of mass spectrometry for imaging metabolites in plants. *Plant J*. 2012 Apr;70(1):81-95.

Lemaire R, Menguellet SA, Stauber J, Marchaudon V, Lucot JP, Collinet P, Farine MO, Vinatier D, Day R, Ducoroy P, Salzet M, Fournier I. Specific MALDI imaging and profiling for biomarker hunting and validation: fragment of the 11S proteasome activator complex, Reg alpha fragment, is a new potential ovary cancer biomarker. *J Proteome Res*. 2007 Nov;6(11):4127-34.

Lemée JM, Com E, Clavreul A, Avril T, Quillien V, de Tayrac M, Pineau C, Menei P. Proteomic analysis of glioblastomas: what is the best brain control sample? *J Proteomics*. 2013 Jun 24;85:165-73.

Leon LA, Antón-Aparicio LM. Treatment Of Sunitinib-Induced Hypertension In Solid Tumors By Nitric Oxid Donors. *Redox Biol*. 2015 Aug;5:422.

Li J, Zhuang Z, Okamoto H, Vortmeyer AO, Park DM, Furuta M, Lee YS, Oldfield EH, Zeng W, Weil RJ. Proteomic profiling distinguishes astrocytomas and identifies differential tumor markers. *Neurology*. 2006 Mar 14;66(5):733-6.

Li J, Yin C, Okamoto H, Mushlin H, Balgley BM, Lee CS, Yuan K, Ikejiri B, Glasker S, Vortmeyer AO, Oldfield EH, Weil RJ, Zhuang Z. Identification of a novel proliferation-related protein, WHSC1 4a, in human gliomas. *Neuro Oncol.* 2008 Feb;10(1):45-51.

Longuespée R, Boyon C, Castellier C, Jacquet A, Desmons A, Kerdraon O, Vinatier D, Fournier I, Day R, Salzet M. The C-terminal fragment of the immunoproteasome PA28S (Reg alpha) as an early diagnosis and tumor-relapse biomarker: evidence from mass spectrometry profiling. *Histochem Cell Biol.* 2012 Jul;138(1):141-54.

Lou S, Balluff B, Cleven AH, Bovée JV, McDonnell LA. Prognostic Metabolite Biomarkers for Soft Tissue Sarcomas Discovered by Mass Spectrometry Imaging. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2017 Feb;28(2):376-383.

Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016 Jun;131(6):803-20.

Mainio A, Tuunanen S, Hakko H, Niemelä A, Koivukangas J, Räsänen P. Decreased quality of life and depression as predictors for shorter survival among patients with low-grade gliomas: a follow-up from 1990 to 2003. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2006 Dec;256(8):516-21.

Mallawaaratchy DM, Buckland ME, McDonald KL, Li CC, Ly L, Sykes EK, Christopherson RI, Kaufman KL. Membrane proteome analysis of glioblastoma cell invasion. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2015 May;74(5):425-41.

Maruo T, Ichikawa T, Kanzaki H, Inoue S, Kurozumi K, Onishi M, Yoshida K, Kambara H, Ouchida M, Shimizu K, Tamaru S, Chiocca EA, Date I. Proteomics-based analysis of invasion-related proteins in malignant gliomas. *Neuropathology.* 2013 Jun;33(3):264-75.

Melchior K, Tholey A, Heisel S, Keller A, Lenhof HP, Meese E, Huber CG. Proteomic study of human glioblastoma multiforme tissue employing complementary two-dimensional liquid chromatography- and mass spectrometry-based approaches. *J Proteome Res.* 2009 Oct;8(10):4604-14.

Meriaux C, Franck J, Wisztorski M, Salzet M, Fournier I. Liquid ionic matrixes for MALDI mass spectrometry imaging of lipids. *J Proteomics.* 2010 Apr 18;73(6):1204-18.

Meriaux C, Arafah K, Tasiemski A, Wisztorski M, Bruand J, Boidin-Wichlacz C, Desmons A, Debois D, Lapr evote O, Brunelle A, Gaasterland T, Macagno E, Fournier I, Salzet M. Multiple changes in peptide and lipid expression associated with regeneration in the nervous system of the medicinal leech. *PLoS One.* 2011 Apr 22;6(4):e18359.

M eriaux C1, Franck J, Park DB, Quanico J, Kim YH, Chung CK, Park YM, Steinbusch H, Salzet M, Fournier I. Human temporal lobe epilepsy analyses by tissue proteomics. *Hippocampus.* 2014 Jun;24(6):628-42.

Mihaylova S, Schweigh ofer H, Hackstein H, Rosengarten B. Effects of anti-inflammatory vagus nerve stimulation in endotoxemic rats on blood and spleen lymphocyte subsets. *Inflamm Res.* 2014 Aug;63(8):683-90.

Minerva L, Boonen K, Menschaert G, Landuyt B, Baggerman G, Arckens L. Linking mass spectrometric imaging and traditional peptidomics: a validation in the obese mouse model. *Anal Chem.* 2011 Oct 15;83(20):7682-91

Miura D, Fujimura Y, Yamato M, Hyodo F, Utsumi H, Tachibana H, Wariishi H. Ultrahighly sensitive in situ metabolomic imaging for visualizing spatiotemporal metabolic behaviors. *Anal Chem.* 2010 Dec 1;82(23):9789-96.

Mueller C, deCarvalho AC, Mikkelsen T, Lehman NL, Calvert V, Espina V, Liotta LA, Petricoin EF 3rd. Glioblastoma cell enrichment is critical for analysis of

phosphorylated drug targets and proteomic-genomic correlations. *Cancer Res.* 2014 Feb 1;74(3):818-28.

Mustafa DA, Burgers PC, Dekker LJ, Charif H, Titulaer MK, Smitt PA, Luider TM, Kros JM. Identification of glioma neovascularization-related proteins by using MALDI-FTMS and nano-LC fractionation to microdissected tumor vessels. *Mol Cell Proteomics.* 2007 Jul;6(7):1147-57.

Niclou SP, Fack F, Rajcevic U. Glioma proteomics: status and perspectives. *J Proteomics.* 2010 Sep 10;73(10):1823-38.

Nicolaidis S. Biomarkers of glioblastoma multiforme. *Metabolism.* 2015 Mar;64(3 Suppl 1):S22-7.

Nijaguna MB, Schröder C, Patil V, Shwetha SD, Hegde AS, Chandramouli BA, Arivazhagan A, Santosh V, Hoheisel JD, Somasundaram K. Definition of a serum marker panel for glioblastoma discrimination and identification of Interleukin 1 β in the microglial secretome as a novel mediator of endothelial cell survival induced by C-reactive protein. *J Proteomics.* 2015 Oct 14;128:251-61

Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, Phillips HS, Pujara K, Berman BP, Pan F, Pelloski CE, Sulman EP, Bhat KP, Verhaak RG, Hoadley KA, Hayes DN, Perou CM, Schmidt HK, Ding L, Wilson RK, Van Den Berg D, Shen H, Bengtsson H, Neuvial P, Cope LM, Buckley J, Herman JG, Baylin SB, Laird PW, Aldape K; Cancer Genome Atlas Research Network. Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell.* 2010 May 18;17(5):510-22.

Odreman F, Vindigni M, Gonzales ML, Niccolini B, Candiano G, Zanotti B, Skrap M, Pizzolitto S, Stanta G, Vindigni A. Proteomic studies on low- and high-grade human brain astrocytomas. *J Proteome Res.* 2005 May-Jun;4(3):698-708.

Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 2013 Feb 15;19(4):764-72.

Okamoto H, Li J, Gläsker S, Vortmeyer AO, Jaffe H, Robison RA, Bogler O, Mikkelsen T, Lubensky IA, Oldfield EH, Zhuang Z. Proteomic comparison of oligodendrogliomas with and without 1pLOH. *Cancer Biol Ther*. 2007 Mar;6(3):391-6.

Okawa S, Gagrica S, Blin C, Ender C, Pollard SM, Krijgsveld J. Proteome and Secretome Characterization of Glioblastoma-Derived Neural Stem Cells. *Stem Cells*. 2016 Nov 21.

Oppenheimer SR, Mi D, Sanders ME, Caprioli RM. Molecular analysis of tumor margins by MALDI mass spectrometry in renal carcinoma. *J Proteome Res*. 2010 May 7;9(5):2182-90.

Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, Liu M, Blanda R, Kromer C, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro Oncol*. 2015 Oct;17 Suppl 4:iv1-iv62.

Park CK, Jung JH, Park SH, Jung HW, Cho BK. Multifarious proteomic signatures and regional heterogeneity in glioblastomas. *J Neurooncol*. 2009 Aug;94(1):31-9.

Patel VN, Gokulrangan G, Chowdhury SA, Chen Y, Sloan AE, Koyutürk M, Barnholtz-Sloan J, Chance MR. Network signatures of survival in glioblastoma multiforme. *PLoS Comput Biol*. 2013;9(9):e1003237.

Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, Shalek AK, Gillespie SM, Wakimoto H, Cahill DP, Nahed BV, Curry WT, Martuza RL, Louis DN, Rozenblatt-Rosen O, Suvà ML, Regev A, Bernstein BE. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science*. 2014 Jun 20;344(6190):1396-401.

Perry JR, Bélanger K, Mason WP, Fulton D, Kavan P, Easaw J, Shields C, Kirby S, Macdonald DR, Eisenstat DD, Thiessen B, Forsyth P, Pouliot JF. Phase II trial of continuous dose-intense temozolomide in recurrent malignant glioma: RESCUE study. *J Clin Oncol*. 2010 Apr 20;28(12):2051-7.

Perry JR, Laperriere N, O'Callaghan CJ, Brandes AA, Menten J, Phillips C, Fay MF, Ryo Nishikawa, Cairncross JG, Roa W, Osoba D, Sahgal A, Hirte HW, Wick W, Laigle-Donadey F, Franceschi E, Chinot OL, Winch C, K, Mason WP. A phase III randomized controlled trial of short-course radiotherapy with or without concomitant and adjuvant temozolomide in elderly patients with glioblastoma (CCTG CE.6, EORTC 26062-22061, TROG 08.02, NCT00482677). *J Clin Oncol* 34, 2016. *J Clin Oncol* 2016; 34: suppl; abstr LBA2

Polisetty RV, Gautam P, Sharma R, Harsha HC, Nair SC, Gupta MK, Uppin MS, Challa S, Puligopu AK, Ankathi P, Purohit AK, Chandak GR, Pandey A, Sirdeshmukh R. LC-MS/MS analysis of differentially expressed glioblastoma membrane proteome reveals altered calcium signaling and other protein groups of regulatory functions. *Mol Cell Proteomics*. 2012 Jun;11(6):M111.013565.

Polisetty RV, Gautam P, Gupta MK, Sharma R, Uppin MS, Challa S, Ankathi P, Purohit AK, Renu D, Harsha HC, Pandey A, Sirdeshmukh R. Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins and their interactors are a major class of deregulated proteins in anaplastic astrocytoma: a grade III malignant glioma. *J Proteome Res*. 2013 Jul 5;12(7):3128-38.

Popescu ID, Codrici E, Albuлесcu L, Mihai S, Enciu AM, Albuлесcu R, Tanase CP. Potential serum biomarkers for glioblastoma diagnostic assessed by proteomic approaches. *Proteome Sci*. 2014 Sep 24;12(1):47.

Porta T, Grivet C, Kraemer T, Varesio E, Hopfgartner G. Single hair cocaine consumption monitoring by mass spectrometric imaging. *Anal Chem*. 2011 Jun 1;83(11):4266-72.

Poschmann G, Grzendowski M, Stefanski A, Bruns E, Meyer HE, Stühler K. Redox proteomics reveal stress responsive proteins linking peroxiredoxin-1 status in glioma to chemosensitivity and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Jun;1854(6):624-31.

Prideaux B, Dartois V, Staab D, Weiner DM, Goh A, Via LE, Barry CE 3rd, Stoeckli M. High-sensitivity MALDI-MRM-MS imaging of moxifloxacin distribution in tuberculosis-infected rabbit lungs and granulomatous lesions. *Anal Chem*. 2011 Mar 15;83(6):2112-8.

Quanico J, Franck J, Dauly C, Strupat K, Dupuy J, Day R, Salzet M, Fournier I, Wisztorski M. Development of liquid microjunction extraction strategy for improving protein identification from tissue sections. *J Proteomics*. 2013 Feb 21;79:200-18

Rajcevic U, Petersen K, Knol JC, Loos M, Bougnaud S, Klychnikov O, Li KW, Pham TV, Wang J, Miletic H, Peng Z, Bjerkvig R, Jimenez CR, Niclou SP. iTRAQ-based proteomics profiling reveals increased metabolic activity and cellular cross-talk in angiogenic compared with invasive glioblastoma phenotype. *Mol Cell Proteomics*. 2009 Nov;8(11):2595-612.

Redzic JS, Gomez JD, Hellwinkel JE, Anchordoquy TJ, Graner MW. Proteomic analyses of brain tumor cell lines amidst the unfolded protein response. *Oncotarget*. 2016 Jul 26;7(30):47831-47847.

Reifenberger G, Wirsching HG, Knobbe-Thomsen CB, Weller M. Advances in the molecular genetics of gliomas - implications for classification and therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016 Dec 29.

Ren T, Lin S, Wang Z, Shang A. Differential proteomics analysis of low- and high-grade of astrocytoma using iTRAQ quantification. *Onco Targets Ther*. 2016 Sep 27;9:5883-5895. eCollection 2016.

Reuss DE, Kratz A, Sahm F, Capper D, Schrimpf D, Koelsche C, Hovestadt V, Bewerunge-Hudler M, Jones DT, Schittenhelm J, Mittelbronn M, Rushing E, Simon M, Westphal M, Unterberg A, Platten M, Paulus W, Reifenberger G, Tonn JC, Aldape K, Pfister SM, Korshunov A, Weller M, Herold-Mende C, Wick W, Brandner S, von Deimling A. Adult IDH wild type astrocytomas biologically and clinically resolve into other tumor entities. *Acta Neuropathol*. 2015 Sep;130(3):407-17.

Roa W, Kepka L, Kumar N, Sinaika V, Matiello J, Lomidze D, Hentati D, Guedes de Castro D, Dytus-Cebulok K, Drodge S, Ghosh S, Jeremić B, Rosenblatt E, Fidarova E. International Atomic Energy Agency Randomized Phase III Study of Radiation Therapy in Elderly and/or Frail Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma Multiforme. *J Clin Oncol*. 2015 Dec 10;33(35):4145-50.

Robertson E, Perry C, Doherty R, Madhusudan S. Transcriptomic profiling of Forkhead box transcription factors in adult glioblastoma multiforme. *Cancer Genomics Proteomics*. 2015 May-Jun;12(3):103-12.

Römpf A, Guenther S, Schober Y, Schulz O, Takats Z, Kummer W, Spengler B. Histology by mass spectrometry: label-free tissue characterization obtained from high-accuracy bioanalytical imaging. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2010 May 17;49(22):3834-8.

Rostomily RC, Born DE, Beyer RP, Jin J, Alvord EC Jr, Mikheev AM, Matthews RT, Pan C, Khorasani L, Sonnen JA, Montine TJ, Shi M, Zhang J. Quantitative proteomic analysis of oligodendrogliomas with and without 1p/19q deletion. *J Proteome Res*. 2010 May 7;9(5):2610-8.

Sahm F, Reuss D, Koelsche C, Capper D, Schittenhelm J, Heim S, Jones DT, Pfister SM, Herold-Mende C, Wick W, Mueller W, Hartmann C, Paulus W, von Deimling A. Farewell to oligoastrocytoma: in situ molecular genetics favor classification as either oligodendroglioma or astrocytoma. *Acta Neuropathol*. 2014 Oct;128(4):551-9.

Sandmann T, Bourgon R, Garcia J, Li C, Cloughesy T, Chinot OL, Wick W, Nishikawa R, Mason W, Henriksson R, Saran F, Lai A1, Moore N, Kharbanda S, Peale F, Hegde P, Abrey LE, Phillips HS, Bais C. Patients With Proneural Glioblastoma May Derive Overall Survival Benefit From the Addition of Bevacizumab to First-Line Radiotherapy and Temozolomide: Retrospective Analysis of the AVAglio Trial. *J Clin Oncol*. 2015 Sep 1;33(25):2735-44.

Sangar V, Funk CC, Kusebauch U, Campbell DS, Moritz RL, Price ND.

Quantitative proteomic analysis reveals effects of epidermal growth factor receptor (EGFR) on invasion-promoting proteins secreted by glioblastoma cells. *Mol Cell Proteomics*. 2014 Oct;13(10):2618-31.

Sarsby J, Towers MW, Stain C, Cramer R, Koroleva OA. Mass spectrometry imaging of glucosinolates in *Arabidopsis* flowers and siliques. *Phytochemistry*. 2012 May;77:110-8.

Sasaki M, Knobbe CB, Munger JC, Lind EF, Brenner D, Brüstle A, Harris IS, Holmes R, Wakeham A, Haight J, You-Ten A, Li WY, Schalm S, Su SM, Virtanen C, Reifenberger G, Ohashi PS, Barber DL, Figueroa ME, Melnick A, Zúñiga-Pflücker JC, Mak TW. IDH1(R132H) mutation increases murine haematopoietic progenitors and alters epigenetics. *Nature*. 2012 Aug 30;488(7413):656-9.

Schwartz SA, Weil RJ, Thompson RC, Shyr Y, Moore JH, Toms SA, Johnson MD, Caprioli RM. Proteomic-based prognosis of brain tumor patients using direct-tissue matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Cancer Res*. 2005 Sep 1;65(17):7674-81.

Seeley EH, Caprioli RM. Molecular imaging of proteins in tissues by mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Nov 25;105(47):18126-31.

Shen G, Liang S, Xu Z, Zhou L, Xiao S, Xia X, Li R, Liao Y, You C, Wei Y. Downregulated expression of HSP27 in human low-grade glioma tissues discovered by a quantitative proteomic analysis. *Proteome Sci*. 2010 Mar 26;8:17.

Simeone P, Trerotola M, Urbanella A, Lattanzio R, Ciavardelli D, Di Giuseppe F, Eleuterio E, Sulpizio M, Eusebi V, Pession A6, Piantelli M, Alberti S. A unique four-hub protein cluster associates to glioblastoma progression. *PLoS One*. 2014 Jul 22;9(7):e103030.

Solon EG, Schweitzer A, Stoeckli M, Prideaux B. Autoradiography, MALDI-MS, and SIMS-MS imaging in pharmaceutical discovery and development. *AAPS J*. 2010 Mar;12(1):11-26.

Stauber J, Lemaire R, Franck J, Bonnel D, Croix D, Day R, Wisztorski M, Fournier I, Salzet M. MALDI imaging of formalin-fixed paraffin-embedded tissues: application to model animals of Parkinson disease for biomarker hunting. *J Proteome Res.* 2008 Mar;7(3):969-78.

Steinbach JP, Blaicher HP, Herrlinger U, Wick W, Nägele T, Meyermann R, Tatagiba M, Bamberg M, Dichgans J, Karnath HO, Weller M. Surviving glioblastoma for more than 5 years: the patient's perspective. *Neurology.* 2006 Jan 24;66(2):239-42.

Stetson LC, Dazard JE, Barnholtz-Sloan JS. Protein Markers Predict Survival in Glioma Patients. *Mol Cell Proteomics.* 2016 Jul;15(7):2356-65.

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups.; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005 Mar 10;352(10):987-96.

Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht CJ, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross JG, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumour and Radiation Oncology Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. 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.* 2009 May;10(5):459-66.

Stupp R, Wong ET, Kanner AA, Steinberg D, Engelhard H, Heidecke V, Kirson ED, Taillibert S, Liebermann F, Dbalý V, Ram Z, Villano JL, Rainov N, Weinberg U, Schiff D, Kunschner L, Raizer J, Honnorat J, Sloan A, Malkin M, Landolfi JC, Payer F,

Mehdorn M, Weil RJ, Pannullo SC, Westphal M, Smrcka M, Chin L, Kostron H, Hofer S, Bruce J, Cosgrove R, Paleologous N, Palti Y, Gutin PH. NovoTTF-100A versus physician's choice chemotherapy in recurrent glioblastoma: a randomised phase III trial of a novel treatment modality. *Eur J Cancer*. 2012 Sep;48(14):2192-202.

Stupp R, Taillibert S, Kanner AA, Kesari S, Steinberg DM, Toms SA, Taylor LP, Lieberman F, Silvani A, Fink KL, Barnett GH, Zhu JJ, Henson JW, Engelhard HH, Chen TC, Tran DD, Sroubek J, Tran ND, Hottinger AF, Landolfi J, Desai R, Caroli M, Kew Y, Honnorat J, Idbaih A, Kirson ED, Weinberg U, Palti Y, Hegi ME, Ram Z.

Maintenance Therapy With Tumor-Treating Fields Plus Temozolomide vs Temozolomide Alone for Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2015 Dec 15;314(23):2535-43.

Sturm D, Witt H, Hovestadt V, Khuong-Quang DA, Jones DT, Konermann C, Pfaff E, Tönjes M, Sill M, Bender S, Kool M, Zapatka M, Becker N, Zucknick M, Hielscher T, Liu XY, Fontebasso AM, Ryzhova M, Albrecht S, Jacob K, Wolter M, Ebinger M, Schuhmann MU, van Meter T, Frühwald MC, Hauch H, Pekrun A, Radlwimmer B, Niehues T, von Komorowski G, Dürken M, Kulozik AE, Madden J, Donson A, Foreman NK, Drissi R, Fouladi M, Scheurlen W, von Deimling A, Monoranu C, Roggendorf W, Herold-Mende C, Unterberg A, Kramm CM, Felsberg J, Hartmann C, Wiestler B, Wick W, Milde T, Witt O, Lindroth AM, Schwartzentruber J, Faury D, Fleming A, Zakrzewska M, Liberski PP, Zakrzewski K, Hauser P, Garami M, Klekner A, Bogner L, Morrissy S, Cavalli F, Taylor MD, van Sluis P, Koster J, Versteeg R, Volckmann R, Mikkelsen T, Aldape K, Reifenberger G, Collins VP, Majewski J, Korshunov A, Lichter P, Plass C, Jabado N, Pfister SM. Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer Cell*. 2012 Oct 16;22(4):425-37.

Suzuki H, Aoki K, Chiba K, Sato Y, Shiozawa Y, Shiraishi Y, Shimamura T, Niida A, Motomura K, Ohka F, Yamamoto T, Tanahashi K, Ranjit M, Wakabayashi T, Yoshizato T, Kataoka K, Yoshida K, Nagata Y, Sato-Otsubo A, Tanaka H, Sanada M, Kondo Y, Nakamura H, Mizoguchi M, Abe T, Muragaki Y, Watanabe R, Ito I, Miyano S, Natsume A, Ogawa S. Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas. *Nat Genet*. 2015 May;47(5):458-68.

Syed P, Gupta S, Choudhary S, Pandala NG, Atak A, Richharia A, K P M, Zhu H, Epari S, Noronha SB, Moiyadi A, Srivastava S. Autoantibody Profiling of Glioma Serum Samples to Identify Biomarkers Using Human Proteome Arrays. *Sci Rep*. 2015 Sep 15;5:13895.

Taal W, Oosterkamp HM, Walenkamp AM, Dubbink HJ, Beerepoot LV, Hanse MC, Buter J, Honkoop AH, Boerman D, de Vos FY, Dinjens WN, Enting RH, Taphoorn MJ, van den Berkmortel FW, Jansen RL, Brandsma D, Bromberg JE, van Heuvel I, Vernhout RM, van der Holt B, van den Bent MJ. Single-agent bevacizumab or lomustine versus a combination of bevacizumab plus lomustine in patients with recurrent glioblastoma (BELOB trial): a randomised controlled phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2014 Aug;15(9):943-53.

Taillibert S, Vincent LA, Granger B, Marie Y, Carpentier C, Guillevin R, Bellanger A, Mokhtari K, Rousseau A, Psimaras D, Dehais C, Sierra del Rio M, Meng Y, Laigle-Donadey F, Hoang-Xuan K, Sanson M, Delattre JY. Bevacizumab and irinotecan for recurrent oligodendroglial tumors. *Neurology*. 2009 May 5;72(18):1601-6.

Thirant C, Galan-Moya EM, Dubois LG, Pinte S, Chafey P, Broussard C, Varlet P, Devaux B, Soncin F, Gavard J, Junier MP, Chneiweiss H. Differential proteomic analysis of human glioblastoma and neural stem cells reveals HDGF as a novel angiogenic secreted factor. *Stem Cells*. 2012 May;30(5):845-53.

Turtoi A, Blomme A, Bianchi E, Maris P, Vannozzi R, Naccarato AG, Delvenne P, De Pauw E, Bevilacqua G, Castronovo V. Accessibilome of human glioblastoma: collagen-VI-alpha-1 is a new target and a marker of poor outcome. *J Proteome Res*. 2014 Dec 5;13(12):5660-9.

Underhill HR, Rostomily RC, Mikheev AM, Yuan C, Yarnykh VL. Fast bound pool fraction imaging of the in vivo rat brain: association with myelin content and validation in the C6 glioma model. *Neuroimage*. 2011 Feb 1;54(3):2052-65.

van den Bent MJ, Afra D, de Witte O, Ben Hassel M, Schraub S, Hoang-Xuan K, Malmström PO, Collette L, Piérart M, Mirimanoff R, Karim AB; EORTC Radiotherapy and Brain Tumor Groups and the UK Medical Research Council. Long-term efficacy of early versus delayed radiotherapy for low-grade astrocytoma and oligodendroglioma in adults: the EORTC 22845 randomised trial. *Lancet*. 2005 Sep 17-23;366(9490):985-90.

van den Bent MJ. Interobserver variation of the histopathological diagnosis in clinical trials on glioma: a clinician's perspective. *Acta Neuropathol*. 2010 Sep;120(3):297-304.

van den Bent MJ, Brandes AA, Taphoorn MJ, Kros JM, Kouwenhoven MC, Delattre JY, Bernsen HJ, Frenay M, Tijssen CC, Grisold W, Sipos L, Enting RH, French PJ, Dinjens WN, Vecht CJ, Allgeier A, Lacombe D, Gorlia T, Hoang-Xuan K. Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy in newly diagnosed anaplastic oligodendroglioma: long-term follow-up of EORTC brain tumor group study 26951. *J Clin Oncol*. 2013 Jan 20;31(3):344-50.

Van Den Bent, Erridge S, Vogelbaum MA, Nowak AK, Sanson M, Brandes AA, Wick W, Clement PM, Baurain JF, Mason WP, Wheeler H, Chinot OL, Weller M, Golfopoulos V, Aldape K, Dinjens WNM, Wesseling P, Gorlia T, Kros JM, Baumert BG. Results of the interim analysis of the EORTC randomized phase III CATNON trial on concurrent and adjuvant temozolomide in anaplastic glioma without 1p/19q co-deletion, an intergroup trial. *J Clin Oncol* 2016; 34: suppl; abstr LBA2000.

Van Dyck S, Flammang P, Meriaux C, Bonnel D, Salzet M, Fournier I, Wisztorski M. Localization of secondary metabolites in marine invertebrates: contribution of MALDI MSI for the study of saponins in Cuvierian tubules of *H. forskali*. *PLoS One*. 2010 Nov 10;5(11):e13923.

Veloso A, Astigarraga E, Barreda-Gómez G, Manuel I, Ferrer I, Giralt MT, Ochoa B, Fresnedo O, Rodríguez-Puertas R, Fernández JA. Anatomical distribution of lipids in human brain cortex by imaging mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2011 Feb;22(2):329-38.

Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, Tamayo P, Weir BA, Gabriel S, Winckler W, Gupta S, Jakkula L, Feiler HS, Hodgson JG, James CD, Sarkaria JN, Brennan C, Kahn A, Spellman PT, Wilson RK, Speed TP, Gray JW, Meyerson M, Getz G, Perou CM, Hayes DN; Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 2010 Jan 19;17(1):98-110.

Viegas C, Moritz-Gasser S, Rigau V, Duffau H. Occipital WHO grade II gliomas: oncological, surgical and functional considerations. *Acta Neurochir (Wien)*. 2011 Oct;153(10):1907-17; discussion 1917.

Vogel TW, Zhuang Z, Li J, Okamoto H, Furuta M, Lee YS, Zeng W, Oldfield EH, Vortmeyer AO, Weil RJ. Proteins and protein pattern differences between glioma cell lines and glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res*. 2005 May 15;11(10):3624-32.

Vuorinen V, Hinkka S, Färkkilä M, Jääskeläinen J. Debulking or biopsy of malignant glioma in elderly people - a randomised study. *Acta Neurochir (Wien)*. 2003 Jan;145(1):5-10.

Wang Y, Rudnick PA, Evans EL, Li J, Zhuang Z, Devoe DL, Lee CS, Balgley BM. Proteome analysis of microdissected tumor tissue using a capillary isoelectric focusing-based multidimensional separation platform coupled with ESI-tandem MS. *Anal Chem*. 2005 Oct 15;77(20):6549-56.

Wang Y, Huang M, Jiao JT, Wu YL, Ouyang TH, Huang J, Liu SS, Li CL. Relationship between concentrations of IGF-1 and IGFBP-3 and preoperative depression risk, and effect of psychological intervention on outcomes of high-grade glioma patients with preoperative depression in a 2-year prospective study. *Med Oncol*. 2014 May;31(5):921.

Watson LA, Goldberg H, Bérubé NG. Emerging roles of ATRX in cancer. *Epigenomics*. 2015;7(8):1365-78.

Weller M, Stupp R, Reifenberger G, Brandes AA, van den Bent MJ, Wick W, Hegi ME. MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nat Rev Neurol*. 2010 Jan;6(1):39-51.

Weller M, Stupp R, Wick W. Epilepsy meets cancer: when, why, and what to do about it? *Lancet Oncol*. 2012 Sep;13(9):e375-82.

Weller M, Pfister SM, Wick W, Hegi ME, Reifenberger G, Stupp R. Molecular neuro-oncology in clinical practice: a new horizon. *Lancet Oncol*. 2013 Aug;14(9):e370-9.

Weller M, Kaulich K, Hentschel B, Felsberg J, Gramatzki D, Pietsch T, Simon M, Westphal M, Schackert G, Tonn JC, von Deimling A, Davis T, Weiss WA, Loeffler M, Reifenberger G; German Glioma Network. Assessment and prognostic significance of the epidermal growth factor receptor vIII mutation in glioblastoma patients treated with concurrent and adjuvant temozolomide radiochemotherapy. *Int J Cancer*. 2014 May 15;134(10):2437-47.

Weller M, Weber RG, Willscher E, Riehmer V, Hentschel B, Kreuz M, Felsberg J, Beyer U, Löffler-Wirth H, Kaulich K, Steinbach JP, Hartmann C, Gramatzki D, Schramm J, Westphal M, Schackert G, Simon M, Martens T, Boström J, Hagel C, Sabel M, Krex D, Tonn JC, Wick W, Noell S, Schlegel U, Radlwimmer B, Pietsch T, Loeffler M, von Deimling A, Binder H, Reifenberger G. Molecular classification of diffuse cerebral WHO grade II/III gliomas using genome- and transcriptome-wide profiling improves stratification of prognostically distinct patient groups. *Acta Neuropathol*. 2015 May;129(5):679-93. doi: 10.1007/s00401-015-1409-0. Epub 2015 Mar 18.

Weller M, Wick W, Aldape K, Brada M, Berger M, Pfister SM, Nishikawa R, Rosenthal M, Wen PY, Stupp R, Reifenberger G. Glioma. *Nat Rev Dis Primers*. 2015 Jul 16;1:15017.

Weller M, van den Bent M, Tonn JC, Stupp R, Preusser M, Cohen-Jonathan-Moyal E, Henriksson R, Le Rhun E, Balana C, Chinot O, Bendszus M, Reijneveld JC,

Dhermain F, French P, Marosi C, Watts C, Oberg I, Pilkington G, Baumert BG, Taphoorn MJB, Hegi M, Westphal M, Reifenberger G, Soffiatti R, Wick W. EANO guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. (In press Lancet Oncology)

Wen PY, Macdonald DR, Reardon DA, Cloughesy TF, Sorensen AG, Galanis E, Degrout J, Wick W, Gilbert MR, Lassman AB, Tsien C, Mikkelsen T, Wong ET, Chamberlain MC, Stupp R, Lamborn KR, Vogelbaum MA, van den Bent MJ, Chang SM. Updated response assessment criteria for high-grade gliomas: response assessment in neuro-oncology working group. *J Clin Oncol*. 2010 Apr 10;28(11):1963-72.

Westphal M, Hilt DC, Bortey E, Delavault P, Olivares R, Warnke PC, Whittle IR, Jääskeläinen J, Ram Z. A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro Oncol*. 2003 Apr;5(2):79-88.

Westphal M, Ram Z, Riddle V, Hilt D, Bortey E; Executive Committee of the Gliadel Study Group. Gliadel wafer in initial surgery for malignant glioma: long-term follow-up of a multicenter controlled trial. *Acta Neurochir (Wien)*. 2006 Mar;148(3):269-75; discussion 275.

Wibom C, Pettersson F, Sjöström M, Henriksson R, Johansson M, Bergenheim AT. Protein expression in experimental malignant glioma varies over time and is altered by radiotherapy treatment. *Br J Cancer*. 2006 Jun 19;94(12):1853-63.

Wick W, Hartmann C, Engel C, Stoffels M, Felsberg J, Stockhammer F, Sabel MC, Koeppen S, Ketter R, Meyermann R, Rapp M, Meisner C, Kortmann RD, Pietsch T, Wiestler OD, Ernemann U, Bamberg M, Reifenberger G, von Deimling A, Weller M. NOA-04 randomized phase III trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with procarbazine, lomustine, and vincristine or temozolomide. *J Clin Oncol*. 2009 Dec 10;27(35):5874-80.

Wick W, Platten M, Meisner C, Felsberg J, Tabatabai G, Simon M, Nikkhah G, Papsdorf K, Steinbach JP, Sabel M, Combs SE, Vesper J, Braun C, Meixensberger J, Ketter R, Mayer-Steinacker R, Reifenberger G, Weller M; NOA-08 Study Group of Neuro-oncology Working Group (NOA) of German Cancer Society. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2012 Jul;13(7):707-15.

Wick W, Meisner C, Hentschel B, Platten M, Schilling A, Wiestler B, Sabel MC, Koeppen S, Ketter R, Weiler M, Tabatabai G, von Deimling A, Gramatzki D, Westphal M, Schackert G, Loeffler M, Simon M, Reifenberger G, Weller M. Prognostic or predictive value of MGMT promoter methylation in gliomas depends on IDH1 mutation. *Neurology*. 2013 Oct 22;81(17):1515-22.

Wick W. TTFIELDS: where does all the skepticism come from? *Neuro Oncol*. 2016 Mar;18(3):303-5.

Wick W, Brandes AA, Gorlia T, Bendszus M, Sahm F, Taal W, Taphoorn M, Domont J, Idbaih A, Campone M, Clement PM, Stupp R, Fabbro M, Le Rhun E, Dubois F, Musmeci D, Klein M, Platten M, Weller M, Golfopoulou V, van den Bent M. Phase III trial exploring the combination of bevacizumab and lomustine in patients with first recurrence of a glioblastoma: the EORTC 26101 trial. *Neuro Oncol* 2015; 17: suppl 5(LB05).

Wick W, Roth P, Hartmann C, Hau P, Nakamura M, Stockhammer F, Sabel MC, Wick A, Koeppen S, Ketter R, Vajkoczy P, Eyupoglu I, Kalff R, Pietsch T, Happold C, Galldiks N, Schmidt-Graf F, Bamberg M, Reifenberger G, Platten M, von Deimling A, Meisner C, Wiestler B, Weller M; Neurooncology Working Group (NOA) of the German Cancer Society. Long-term analysis of the NOA-04 randomized phase III trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with PCV or temozolomide. *Neuro Oncol*. 2016 Nov;18(11):1529-1537.

Wiestler B, Capper D, Sill M, Jones DT, Hovestadt V, Sturm D, Koelsche C, Bertoni A, Schweizer L, Korshunov A, Weiß EK, Schliesser MG, Radbruch A, Herold-Mende C, Roth P, Unterberg A, Hartmann C, Pietsch T, Reifenberger G, Lichter P, Radlwimmer

B, Platten M, Pfister SM, von Deimling A, Weller M, Wick W. Integrated DNA methylation and copy-number profiling identify three clinically and biologically relevant groups of anaplastic glioma. *Acta Neuropathol.* 2014 Oct;128(4):561-71.

Williams M, Treasure P, Greenberg D, Brodbelt A, Collins P. Surgeon volume and 30 day mortality for brain tumours in England. *Br J Cancer.* 2016 Nov 22;115(11):1379-1382.

Wisztorski M, Fatou B, Franck J, Desmons A, Farré I, Leblanc E, Fournier I, Salzet M. Microproteomics by liquid extraction surface analysis: application to FFPE tissue to study the fimbria region of tubo-ovarian cancer. *Proteomics Clin Appl.* 2013 Apr;7(3-4):234-40.

Wisztorski M, Desmons A, Quanico J, Fatou B, Gimeno JP, Franck J, Salzet M, Fournier I. Spatially-resolved protein surface microsampling from tissue sections using liquid extraction surface analysis. *Proteomics.* 2016 Jun;16(11-12):1622-32.

Xu W, Yang H, Liu Y, Yang Y, Wang P, Kim SH, Ito S, Yang C, Wang P, Xiao MT, Liu LX, Jiang WQ, Liu J, Zhang JY, Wang B, Frye S, Zhang Y, Xu YH, Lei QY, Guan KL, Zhao SM, Xiong Y. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell.* 2011 Jan 18;19(1):17-30.

Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, Friedman H, Friedman A, Reardon D, Herndon J, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B, Bigner DD. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med.* 2009 Feb 19;360(8):765-73.

Yang LS, Xu XE, Liu XP, Jin H, Chen ZQ, Liu XH, Wang Y, Huang FP, Shi Q. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis for identification of oligodendroglioma biomarkers related with loss of heterozygosity on chromosomal arm 1p. *J Proteomics.* 2012 Dec 21;77:480-91.

Yang B, Wang S, Zeng J, Zhang Y, Ruan X, Han W, Yin B, Yuan J, Qiang B, Ying W, Qian X, Peng X. Proteomic screening and identification of microRNA-128 targets in glioma cells. *Proteomics*. 2015 Aug;15(15):2602-17.

Yoon JH, Kim KL, Kim DH, Jung SJ, Lee H, Ghim J, Kim D, Park JB, Ryu SH, Lee TG. Proteomic analysis of hypoxia-induced U373MG glioma secretome reveals novel hypoxia-dependent migration factors. *J Proteomics*. 2014 Jun;14(12):1494-502. doi: 10.1002/pmic.201300554. Epub 2014 May 16.

Yoshimura Y, Zaima N, Moriyama T, Kawamura Y. Different localization patterns of anthocyanin species in the pericarp of black rice revealed by imaging mass spectrometry. *PLoS One*. 2012;7(2):e31285.

Yung WK, Prados MD, Yaya-Tur R, Rosenfeld SS, Brada M, Friedman HS, Albright R, Olson J, Chang SM, O'Neill AM, Friedman AH, Bruner J, Yue N, Dugan M, Zaknoen S, Levin VA. Multicenter phase II trial of temozolomide in patients with anaplastic astrocytoma or anaplastic oligoastrocytoma at first relapse. *Temodal Brain Tumor Group. J Clin Oncol*. 1999 Sep;17(9):2762-71.