



UNIVERSITE LILLE 2 DROIT ET SANTE
FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG

Année : 2015

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN MEDECINE

Evaluation de la valeur diagnostique et pronostique de l'identification des transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* chez les patients atteints d'un astrocytome pilocytique.

Caractérisation moléculaire et immunohistochimique d'une série de soixante-douze cas

Présentée et soutenue publiquement le 29 Mai 2015 à 18h
au Pôle Recherche

Par Vincent Cockenpot

JURY

Président :

Madame le Professeur Marie-Christine Copin

Assesseurs :

Monsieur le Professeur Matthieu Vinchon

Madame le Docteur Fabienne Escande

Monsieur le Docteur Pierre Leblond

Directeur de Thèse :

Monsieur le Professeur Claude-Alain Maurage

Avertissement

La Faculté n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses : celles-ci sont propres à leurs auteurs.

Liste des abréviations

ACPA	Analyse Comparative sur Puce à ADN
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AFAQAP Pathologique	Association Française d'Assurance Qualité en Anatomie
AGTRAP	Angiotensin II receptor-associated protein
AKAP9	A Kinase (PRKA) Anchor Protein 9
AKT	v-akt murine thymoma viral oncogene
ARN	Acide Ribonucléique
ATP	Adénosine-triphosphate
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BRAF	v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B
CBTRUS	Central Brain Tumor Registry of the United States
CCD	Charge-Coupled Device
CD34	Cluster de Différenciation 34
CGH	Comparative Genomic Hybridization
CHRU	Centre Hospitalier Régional Universitaire
CLCN6	Chloride channel, voltage-sensitive 6
ddATP	di-désoxyadénosine triphosphate
ddCTP	di-désoxycytosine triphosphate
ddGTP	di-désoxyguanosinetriphosphate
ddNTP	di-désoxynucléotide triphosphate
ddTTP	di-désoxythymidine triphosphate
DNAse	Désoxyribonucléase
DNET	Dysembryoplastic Neuro-épithélial Tumour
dNTP	désoxynucléotide triphosphate
EMA	Epithelial Membrane Antigen
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
ESRP1	Epithelial Splicing Regulatory Protein 1
FAM131B	Family with sequence similarity 131, member B
FFPE	Formalin Fixed and Paraffin Embedded

FGFR1	Fibroblast growth factor receptor 1
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
FXR1	Fragile X mental retardation, autosomal homolog 1
GENOP	Groupe d'Etude en NeuroOncologie Pédiatrique
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
H3F3A	H3 histone, family 3A
HES	Hémalun-Eosine-Safran
HIST1H3A	Histone cluster 1, H3a
HTIC	Hypertension intra crânienne
IDH1	Isocitrate dehydrogenase 1
IDH2	Isocitrate dehydrogenase 2
INSERM	Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
IRM	Imagerie par résonance magnétique
KRAS	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LCR	Liquide Céphalo-Rachidien
MACF1	Microtubule-actin crosslinking factor 1
MAPK	Mitogen activated protein kinase
mTOR	mammalian target of rapamycin (serine/threonine kinase)
NF1	Neurofibromatose de type 1
NGS	Next Generation Sequencing
Olig2	Oligodendrocyte transcription factor 2
OMS	Organisation mondiale de la santé
PAPSS1	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 1
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI3KCA	Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide
PPi	PyroPhosphate inositol
QKI	QKI, KH Domain Containing, RNA Binding
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
RAF1	V-Raf-1 Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1
RBPACP	Recommandations de Bonne Pratique en Anatomie et Cytologie Pathologiques
RFGNT	Rosette-forming glioneuronal tumor
RNAseq	Ribonucleic acid sequencing
RNF130	Ring finger protein 130

Rpm	Rotations par minute
RT-PCR	RetroTranscription and Polymerase Chain Reaction
SIOP	Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique
SLC45A3	Solute Carrier Family 45, Member 3
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SRGAP3	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 3
TMA	Tissu Micro Array
TRIM24	Tripartite Motif Containing 24
WGS	Whole Genome Sequencing
WHO	World Health Organization

Table des matières

Résumé	1
Introduction	2
I. Classification OMS des tumeurs du système nerveux central	2
II. Système de grade histopronostique	4
III. Epidémiologie	6
IV. L'astrocytome pilocytique.....	7
A. Définition	7
B. Localisation	7
C. Présentation clinique et radiologique	8
D. Caractéristiques histopathologiques	10
E. Signature moléculaire.....	14
F. Hypothèses de tumorigénèse de l'astrocytome pilocytique	18
G. Pronostic et traitement.....	20
H. Difficultés diagnostiques pour le Pathologiste	21
V. Techniques de biologie moléculaire mises en œuvre pour la recherche des anomalies associées aux astrocytomes pilocytiques	25
A. Principe du séquençage par méthode Sanger	25
B. Principe du pyroséquençage.....	27
VI. Objectif et phases de travail.....	29
Matériels et Méthodes	31
I. Constitution de la population	31
II. Techniques de biologie moléculaire	33
A. Préparation du matériel	33
1. Conditionnement des prélèvements	33
2. Sélection du matériel tumoral et contrôle morphologique.....	33
3. Réalisation de coupes épaisses et macrodissection	34
4. Extraction des acides nucléiques.....	35
a) Extraction des ARN à partir des tissus congelés	35
b) Extraction des ARN à partir de tissus inclus en paraffine	36
c) Extraction des ADN à partir de tissus inclus en paraffine	37
5. Quantification de la concentration et vérification de la pureté des acides nucléiques.....	38
6. Conversion des ARN en ADNc	39
7. Sensibilité des techniques de caractérisation et seuils d'interprétation	39
B. Détection des transcrits de fusion <i>KIAA1549-BRAF</i>	40
1. Principe et stratégie de détection.....	40
2. Evaluation de la qualité des ADNc	43
3. Détection des transcrits de fusion <i>KIAA1549-BRAF</i> par RT-PCR conventionnelle : conditions optimales	43
4. Séquençage des transcrits détectés.....	45
a) Amorces utilisées pour le séquençage	45
b) Réaction de séquence.....	45
C. Recherche de mutations ponctuelles des gènes <i>BRAF</i> , <i>KRAS</i> , <i>H3F3A</i> , <i>IDH1</i> et <i>IDH2</i>	47
1. Analyse par pyroséquençage du codon 600 du gène <i>BRAF</i> , des codons 12 et 13 du gène <i>KRAS</i> et des codons 27 et 34 du gène <i>H3F3A</i>	47

2. Analyse par séquençage « Sanger » de l'exon 4 du gène IDH1 et de l'exon 4 du gène IDH2.....	47
III. Etude immunohistochimique.....	49
A. Réalisation d'un tissu microarray (TMA).....	49
B. Etude immunohistochimique.....	51
IV. Analyses statistiques.....	53
Résultats.....	54
I. Caractéristiques de la population de patients atteints d'astrocytome pilocytaire.....	54
A. Caractéristiques démographiques.....	54
B. Circonstances de découverte.....	55
C. Localisation des astrocytomes pilocytiques.....	56
D. Caractéristiques histopathologiques.....	56
II. Recherche des transcrits de fusions <i>KIAA1549-BRAF</i>	57
A. Performances diagnostiques du test.....	57
B. Types de transcrits de fusion <i>KIAA1549-BRAF</i> identifiés.....	57
C. Transcrits de fusion, âge et localisation tumorale.....	59
D. Transcrits de fusion et caractéristiques histopathologiques.....	61
III. Recherche des anomalies moléculaires des gènes <i>BRAF</i> et <i>KRAS</i>	63
A. Recherche de mutations ponctuelles du gène <i>BRAF</i> par pyroséquençage du codon 600.....	63
B. Recherche de mutations ponctuelles du gène <i>KRAS</i> par pyroséquençage des codons 12 et 13.....	64
IV. Analyse immunohistochimique.....	65
A. Tissue microarray.....	65
B. Anticorps anti IDH1 muté R132H.....	65
C. Anticorps anti <i>BRAF</i> muté V600E.....	65
D. Anticorps anti-H3K27m3.....	66
V. Caractérisation moléculaire des astrocytomes pilocytiques.....	67
VI. Suivi et évolution.....	69
Discussion.....	70
I. Caractéristiques de la population étudiée.....	70
II. Performances globales du test.....	70
III. Fréquence de détection des transcrits de fusion et utilité du test dans les différents sous-groupes.....	72
IV. Spécificité du transcrit <i>KIAA1549-BRAF</i> dans l'astrocytome pilocytaire.....	75
V. Adéquation de la méthode utilisée dans notre étude pour la détection des transcrits de fusion.....	77
VI. Absence d'autre altération moléculaire.....	80
A. Activation et altérations de la voie MAPK.....	80
B. Absence de mutations IDH1 et IDH2 dans les astrocytomes pilocytiques.....	83
C. Absence de perte de triméthylation du codon K27 de l'histone H3.3 dans les astrocytomes pilocytiques.....	84
VII. Implication pronostique de la fusion <i>KIAA1549-BRAF</i>	85
Conclusions et perspectives.....	87
Références bibliographiques.....	89
Annexes.....	99

RESUME

Contexte : Le diagnostic de l'astrocytome pilocytique, tumeur de grade I du système nerveux central, intègre des données moléculaires récemment découvertes, en particulier la recherche de transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF*, activateur de la voie oncogénique MAPK.

Méthode : Nous avons utilisé une technique de RT-PCR conventionnelle pour la détection des transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* dans une population de 135 patients, enfants et adultes, atteints de tumeurs du système nerveux central, dont 72 cas d'astrocytome pilocytique, avec évaluation des performances diagnostiques du test, complétées par la recherche d'autres altérations moléculaires touchant la voie de signalisation MAPK.

Résultats : Nous avons identifié un transcrit de fusion *KIAA1549-BRAF* dans 46 cas, avec une valeur prédictive positive pour le diagnostic d'astrocytome pilocytique de 100%, une valeur prédictive négative de 70,5%, une sensibilité de 62% (IC à 95% [0.52 ; 0.74] et une spécificité de 100% (IC 95% [0.94 ; 1]). Un transcrit de fusion était plus fréquemment identifié dans les tumeurs atteignant les patients de moins de 20 ans (70%), dans les tumeurs localisées en fosse postérieure (69%), dans les formes d'architecture biphasique (76%) et dans les tumeurs comportant un contingent de morphologie oligodendrogliale (75%). Aucune autre anomalie moléculaire activant la voie de signalisation MAPK n'était mise en évidence dans les astrocytomes pilocytiques. Il était retrouvé un transcrit de fusion *KIAA1549-BRAF* dans le tissu tumoral de 9 des 14 cas d'astrocytome pilocytique évolutifs.

Conclusion : La valeur de la recherche de transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* par RT-PCR conventionnelle en tant que marqueur diagnostique des astrocytomes pilocytiques est confirmée dans notre cohorte, encourageant la poursuite de l'utilisation du test.

INTRODUCTION

I. Classification OMS des tumeurs du système nerveux central

Les tumeurs du système nerveux central sont classées par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en fonction du type cellulaire prédominant qui les compose et d'un grade pronostique à quatre niveaux (de I à IV). Cette classification définit ainsi des tumeurs gliales (astrocytaires, oligodendrocytaires, ou mixtes), glioneuronales, des tumeurs des plexus choroïdes, de la région pinéale, des méninges, de la région sellaire, des tumeurs embryonnaires, germinales, hématopoïétiques et des métastases (figure 1) (1).

L'avènement des techniques moléculaires dans le diagnostic et l'évaluation pronostique des gliomes bouleverse la classification histologique en vigueur, comme en témoigne le consensus de Haarlem de la société internationale de Neuropathologie paru en septembre 2014, et proposant des recommandations sur l'intégration des données moléculaires dans le diagnostic des tumeurs du système nerveux central (2). Ces recommandations visent à préparer la future 5^{ème} édition de la classification OMS s'annonçant comme un événement majeur dans le diagnostic, et donc la prise en charge, des tumeurs du système nerveux central.

WHO Classification of Tumours of the Nervous System

TUMOURS OF NEUROEPITHELIAL TISSUE		Neuronal and mixed neuronal-glial tumours	
Astrocytic tumours		Dysplastic gangliocytoma of cerebellum (Lhermitte-Duclos)	9493/0
Pilocytic astrocytoma	9421/1 ¹	Desmoplastic infantile astrocytoma/ganglioglioma	9412/1
Piloxyoid astrocytoma	9425/3*	Dysembryoplastic neuroepithelial tumour	9413/0
Subependymal giant cell astrocytoma	9384/1	Gangliocytoma	9492/0
Pleomorphic xanthoastrocytoma	9424/3	Ganglioglioma	9505/1
Diffuse astrocytoma	9400/3	Anaplastic ganglioglioma	9505/3
Fibrillary astrocytoma	9420/3	Central neurocytoma	9506/1
Gemistocytic astrocytoma	9411/3	Extraventricular neurocytoma	9506/1*
Protoplasmic astrocytoma	9410/3	Cerebellar liponeurocytoma	9506/1*
Anaplastic astrocytoma	9401/3	Papillary glioneuronal tumour	9509/1*
Glioblastoma	9440/3	Rosette-forming glioneuronal tumour of the fourth ventricle	9509/1*
Giant cell glioblastoma	9441/3	Paraganglioma	8680/1
Gliosarcoma	9442/3		
Gliomatosis cerebri	9381/3		
Oligodendroglial tumours		Tumours of the pineal region	
Oligodendroglioma	9450/3	Pineocytoma	9361/1
Anaplastic oligodendroglioma	9451/3	Pineal parenchymal tumour of intermediate differentiation	9362/3
Oligoastrocytic tumours		Pineoblastoma	9362/3
Oligoastrocytoma	9382/3	Papillary tumour of the pineal region	9395/3*
Anaplastic oligoastrocytoma	9382/3		
Ependymal tumours		Embryonal tumours	
Subependymoma	9383/1	Medulloblastoma	9470/3
Myxopapillary ependymoma	9394/1	Desmoplastic/nodular medulloblastoma	9471/3
Ependymoma	9391/3	Medulloblastoma with extensive nodularity	9471/3*
Cellular	9391/3	Anaplastic medulloblastoma	9474/3*
Papillary	9393/3	Large cell medulloblastoma	9474/3
Clear cell	9391/3	CNS primitive neuroectodermal tumour	9473/3
Tanycytic	9391/3	CNS Neuroblastoma	9500/3
Anaplastic ependymoma	9392/3	CNS Ganglioneuroblastoma	9490/3
Choroid plexus tumours		Medulloepithelioma	9501/3
Choroid plexus papilloma	9390/0	Ependymblastoma	9392/3
Atypical choroid plexus papilloma	9390/1*	Atypical teratoid / rhabdoid tumour	9508/3
Choroid plexus carcinoma	9390/3		
Other neuroepithelial tumours			
Astroblastoma	9430/3		
Chordoid glioma of the third ventricle	9444/1		
Angiocentric glioma	9431/1*		

Figure 1 : Classification OMS des tumeurs du système nerveux central, 4ème édition. (d'après WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System, Fourth Edition, Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., 2007, IARC: Lyon)

¹ Morphology code of the International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O) (614A) and the Systematized Nomenclature of Medicine (<http://snomed.org>). Behaviour is coded /0 for benign tumours, /3 for malignant tumours and /1 for borderline or uncertain behaviour.

* The italicised numbers are provisional codes proposed for the 4th edition of ICD-O. While they are expected to be incorporated into the next ICD-O edition, they currently remain subject to change.

II. Système de grade histopronostique

Le grade histopronostique des tumeurs du système nerveux central est un outil clé de la prise en charge thérapeutique qui détermine le choix du recours à la radiothérapie et à la chimiothérapie. Le système de l'OMS définit quatre niveaux, le grade I correspondant à des tumeurs de croissance lente associées à une chance élevée de survie à long terme du patient ; le grade II à des tumeurs de croissance relativement lente, mais pouvant récidiver et évoluer en tumeur de haut grade ; le grade III, à des tumeurs constamment fatales récidivant dans la première année et le grade IV, à des tumeurs très agressives d'évolution rapide. Le grade des différentes entités décrites dans la classification OMS des tumeurs du système nerveux central est rapporté ci-dessous (figure 2).

Quatre critères morphologiques (anisocaryose et nucléoles, nombre de mitoses, prolifération endothélio-capillaire et nécrose) sont pris en compte (3).

Les tumeurs gliales de grade I ou II de l'OMS sont réputées de bas grade, celles de grade III ou IV de haut grade. Les tumeurs gliales de grade I, dont l'astrocytome pilocytique, sont dites circonscrites, et les tumeurs à composante gliale infiltrantes ne sont jamais de grade I.

WHO grades of CNS tumours

	I	II	III	IV
Astrocytic tumours				
Subependymal giant cell astrocytoma	•			
Pilocytic astrocytoma	•			
Pilomyxoid astrocytoma		•		
Diffuse astrocytoma		•		
Pleomorphic xanthoastrocytoma		•		
Anaplastic astrocytoma			•	
Glioblastoma				•
Giant cell glioblastoma				•
Gliosarcoma				•
Oligodendroglial tumours				
Oligodendroglioma		•		
Anaplastic oligodendroglioma			•	
Oligoastrocytic tumours				
Oligoastrocytoma		•		
Anaplastic oligoastrocytoma			•	
Ependymal tumours				
Subependymoma	•			
Myxopapillary ependymoma	•			
Ependymoma		•		
Anaplastic ependymoma			•	
Choroid plexus tumours				
Choroid plexus papilloma	•			
Atypical choroid plexus papilloma		•		
Choroid plexus carcinoma			•	
Other neuroepithelial tumours				
Angiocentric glioma	•			
Chordoid glioma of the third ventricle		•		
Neuronal and mixed neuronal-glial tumours				
Gangliocytoma	•			
Ganglioglioma	•			
Anaplastic ganglioglioma			•	
Desmoplastic infantile astrocytoma and ganglioglioma	•			
Dysembryoplastic neuroepithelial tumour	•			
Central neurocytoma				
Central neurocytoma		•		
Extraventricular neurocytoma		•		
Cerebellar liponeurocytoma		•		
Paraganglioma of the spinal cord	•			
Papillary glioneuronal tumour	•			
Rosette-forming glioneuronal tumour of the fourth ventricle	•			
Pineal tumours				
Pineocytoma	•			
Pineal parenchymal tumour of intermediate differentiation		•	•	
Pineoblastoma				•
Papillary tumour of the pineal region		•	•	
Embryonal tumours				
Medulloblastoma				•
CNS primitive neuroectodermal tumour (PNET)				•
Atypical teratoid / rhabdoid tumour				•
Tumours of the cranial and paraspinal nerves				
Schwannoma	•			
Neurofibroma	•			
Perineurioma	•	•	•	
Malignant peripheral nerve sheath tumour (MPNST)		•	•	•
Meningeal tumours				
Meningioma	•			
Atypical meningioma		•		
Anaplastic / malignant meningioma			•	
Haemangiopericytoma		•		
Anaplastic haemangiopericytoma			•	
Haemangioblastoma	•			
Tumours of the sellar region				
Craniopharyngioma	•			
Granular cell tumour of the neurohypophysis	•			
Pituicytoma	•			
Spindle cell oncocytoma of the adenohypophysis	•			

Figure 2 : Grade OMS des tumeurs du système nerveux central (d'après WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System, Fourth Edition, Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., 2007, IARC: Lyon)

III. Epidémiologie

Les tumeurs primitives du système nerveux central, tous types histologiques confondus, ont en France un taux d'incidence globale estimé de 18 cas pour 100 000 habitants par an (données du recensement national histologique des tumeurs du système nerveux central, publiées en 2012) (4). Parmi ces tumeurs, 42% sont des gliomes, amenant le taux d'incidence pour ce type tumoral à 8 cas pour 100 000 habitants par an. Chez l'adulte, les tumeurs gliales représentent 2 à 3% de l'ensemble des cancers (5), mais cette proportion est nettement plus importante chez l'enfant et l'adolescent. Les gliomes font en effet partie des tumeurs pédiatriques les plus fréquentes, comptant pour 20% de l'ensemble des cancers de l'enfant (6).

L'astrocytome pilocytique est le plus fréquent des gliomes de l'enfant, comptant pour 23% de l'ensemble des tumeurs pédiatriques du système nerveux central, et 50% des gliomes, avec un taux d'incidence de 1 cas pour 100000 habitants par an avant 14 ans(6). Avec un âge médian de 13 ans, il survient plus fréquemment chez l'enfant(4), mais atteint aussi l'adulte, avec des taux d'incidence de 0.29 cas pour 100 000 habitants par an entre 15 et 39 ans, et de 0.09 cas pour 100 000 par an après 40 ans (6,7). Il n'y a pas de différence d'incidence entre les deux sexes.

Il n'existe pas de facteur de risque environnemental connu. La plupart des cas sont sporadiques, cependant, environ 5 à 7% des cas sont associés à la neurofibromatose de type 1, syndrome génétique de prédisposition au cancer (8–10). De très rares cas sont également rapportés chez des patients atteints de syndrome de Noonan, syndrome malformatif dû à des anomalies germinales de gènes impliqués dans la voie MAPK (mitogen activated protein kinase), associant des anomalies neurologiques, cardiologiques, cutanées et faciales (11,12).

IV. L'astrocytome pilocytique

A. Définition

Selon la classification OMS des tumeurs du système nerveux central l'astrocytome pilocytique est un astrocytome relativement bien circonscrit, de croissance lente, souvent kystique, touchant l'enfant et l'adulte jeune, caractérisé sur le plan histologique par une architecture biphasique, avec en proportions variées, des cellules bipolaires associées à des fibres de Rosenthal et des cellules multipolaires d'organisation lâche associées à des microkystes et à des corps granuleux éosinophiles.

B. Localisation

L'astrocytome pilocytique peut survenir sur l'ensemble du névraxe, mais les localisations diffèrent chez l'enfant et l'adulte. Chez l'enfant, la majorité des astrocytomes pilocytiques surviennent au niveau infratentorial (environ 2/3), particulièrement au niveau du cervelet (50%) et du tronc cérébral (13,14). Les formes médullaires représentent 11% de l'ensemble des tumeurs localisées à la moelle (1). En supratentorial, les régions les plus touchées sont le chiasma optique et le thalamus. Les formes liées à la neurofibromatose de type 1 ont une localisation particulière et siègent dans la majeure partie des cas au niveau des voies optiques et de l'hypothalamus (8,15).

Chez l'adulte, la majorité de ces tumeurs sont supratentorielles, au niveau des voies optiques et du thalamus (14).

C. Présentation clinique et radiologique

Les circonstances de découverte des astrocytomes pilocytiques sont très variées. Certaines formes sont de révélation très aiguë, en cas de saignement intra ou péri-tumoral. D'autres formes sont révélées par un déficit progressif ou une hypertension intracrânienne (HTIC) liés à un effet de masse ou à une obstruction sur les voies de circulation du LCR. Les crises comitiales sont rares (16). Certains signes permettent de suspecter la localisation de la lésion. Les formes de localisation cérébelleuse se présentent souvent par une ataxie, un déficit de nerf crânien ou une HTIC. Le diagnostic chez les patients atteints d'astrocytome pilocytique de localisation suprasellaire peut être suspecté en raison de troubles visuels ou lors du bilan d'une endocrinopathie par dysfonction hypothalamo-hypophysaire, liée à un effet de masse (17).

Sur le plan radiologique, les astrocytomes pilocytiques sont en règle générale des tumeurs bien limitées, iso ou hypo-intenses en IRM en séquence T1 et hyper-intenses en séquence T2, avec prise de contraste (18). Ces tumeurs sont très fréquemment kystiques, en particulier au niveau de la fosse postérieure (19). La prise de contraste de la paroi d'un kyste ou d'un nodule solide intrakystique est également un caractère évocateur, bien qu'inconstant. Plus rarement, ces tumeurs se présentent sous la forme d'une tumeur non kystique, pouvant alors poser des difficultés diagnostiques. L'imagerie ne dévoile que rarement des calcifications. Certaines formes sont mal limitées, rendant le diagnostic radiologique difficile (18,19). L'aspect radiologique d'astrocytomes pilocytiques de différentes localisations est illustré en figure 3.

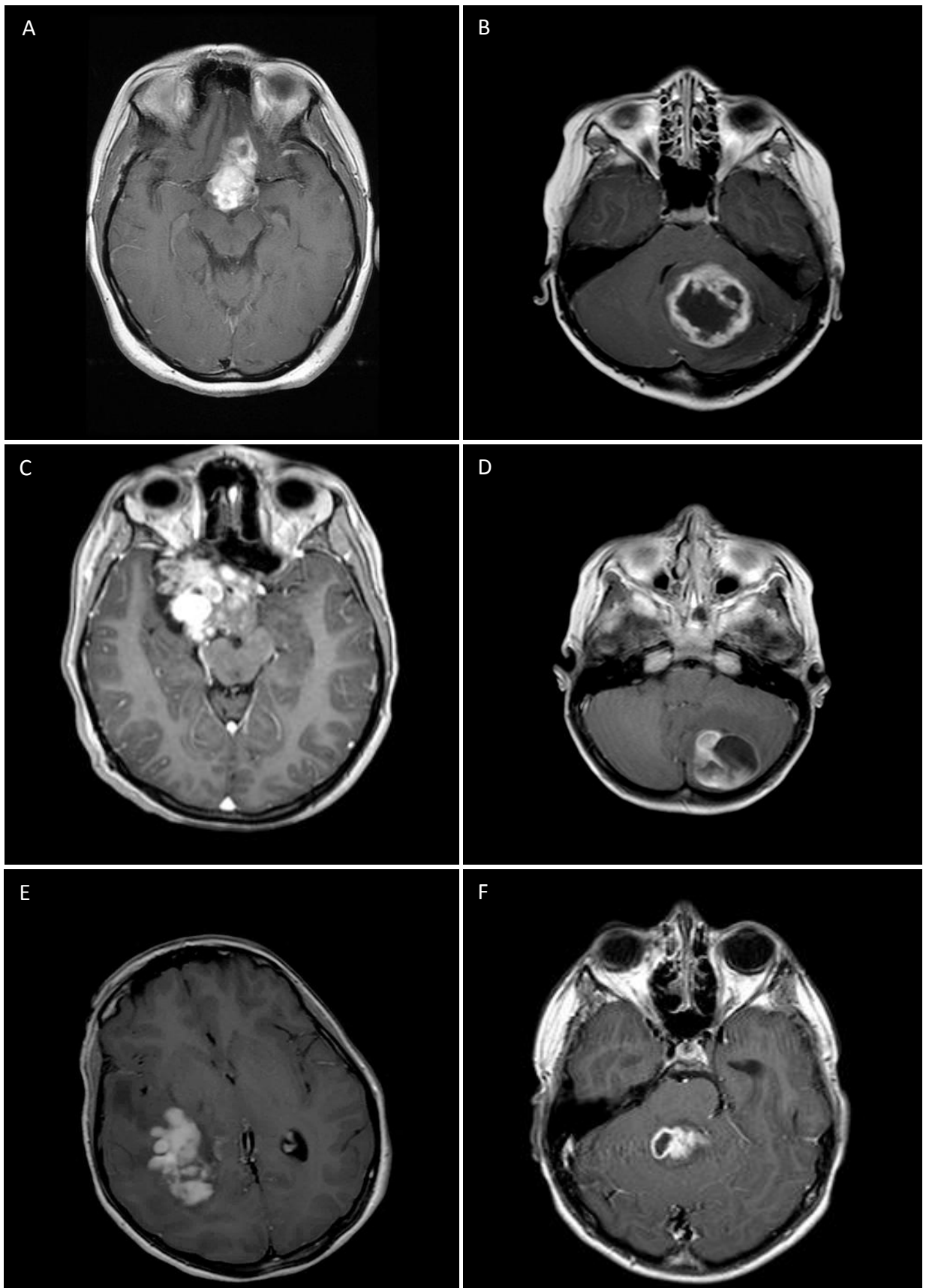


Figure 3 : Séquences IRM T1 avec injection de gadolinium de 6 astrocytomes pilocytiques de localisations variées (imagerie de patients inclus dans la série). Lésions plus ou moins kystiques avec prise de contraste A. Hypothalamo-chiasmatique B. Cérébelleux gauche C. Voie optique droite. D. Cérébelleux gauche. E. Hémisphère droit, ventricule latéral F. Tronc cérébral.

D. Caractéristiques histopathologiques

L'astrocytome pilocytique est une tumeur biphasique qui associe en proportions variées des secteurs souvent compacts, fibrillaires, constitués de cellules allongées, bipolaires dont les prolongements se concentrent en fibres de Rosenthal (secteurs dits piloïdes) à des secteurs de cellules multipolaires d'organisation lâche regroupées autour de microkystes.

Les fibres de Rosenthal sont des prolongements cellulaires épais, fortement éosinophiles, présents dans les secteurs piloïdes. Leur présence est un argument en faveur du diagnostic, mais n'est ni nécessaire, ni suffisante. Ces fibres peuvent être retrouvées dans le gangliogliome, mais aussi en tissu glial réactionnel, non tumoral.

Les corps granuleux éosinophiles sont un autre élément régulièrement observé dans l'astrocytome pilocytique. Non spécifiques, ils sont retrouvés en plus grande abondance dans les tumeurs glioneurales et le xanthoastrocytome pléomorphe, ainsi que dans le tissu réactionnel (20).

L'astrocytome pilocytique est une tumeur très vascularisée, comme en témoigne la prise de contraste en imagerie. Histologiquement, cette vascularisation se présente souvent sous la forme de glomérules vasculaires, notamment dans la paroi des kystes.

Certains secteurs peuvent comporter des cellules ressemblant à des oligodendrocytes, posant des difficultés de diagnostic différentiel avec un oligodendrogliome, particulièrement sur échantillons peu volumineux.

L'astrocytome pilocytique est une lésion bien limitée. Sur le plan microscopique, cette limite nette avec le parenchyme nerveux adjacent n'est pas toujours bien définie, et certaines lésions, pourtant d'aspect typique, infiltrent le parenchyme (caractérisé par la présence de prolongements nerveux) sur quelques millimètres, et

jusqu'à plusieurs centimètres. Cet aspect est plus particulièrement rencontré dans les localisations supratentorielles, notamment au niveau des voies optiques et du chiasma (10).

Certaines formes rares, dites anaplasiques, associent des critères histologiques d'agressivité aux critères histopathologiques habituels des astrocytomes pilocytiques (21). Ces tumeurs présentent une activité mitotique d'au moins 4 mitoses pour 10 champs au grossissement x400, une hypercellularité, des atypies cytologiques modérées à sévères et des secteurs de nécrose tumorale. Elles sont associées à un moins bon pronostic (21).

Les astrocytomes pilocytiques expriment en immunohistochimie la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), la protéine S100, Olig2. Une expression immunohistochimique de la synaptophysine est possible. Il n'existe pas de marqueur immunohistochimique spécifique, mais cette tumeur n'exprime jamais l'EMA (Epithelial Membrane Antigen). L'anticorps anti-IDH1 muté R132H est toujours négatif, et l'immunoréactivité nucléaire pour l'anticorps anti H3K27me3, reflet de la méthylation des histones H3.3, est conservé.

Les différentes caractéristiques histopathologiques sont illustrées en figures 4 et 5.

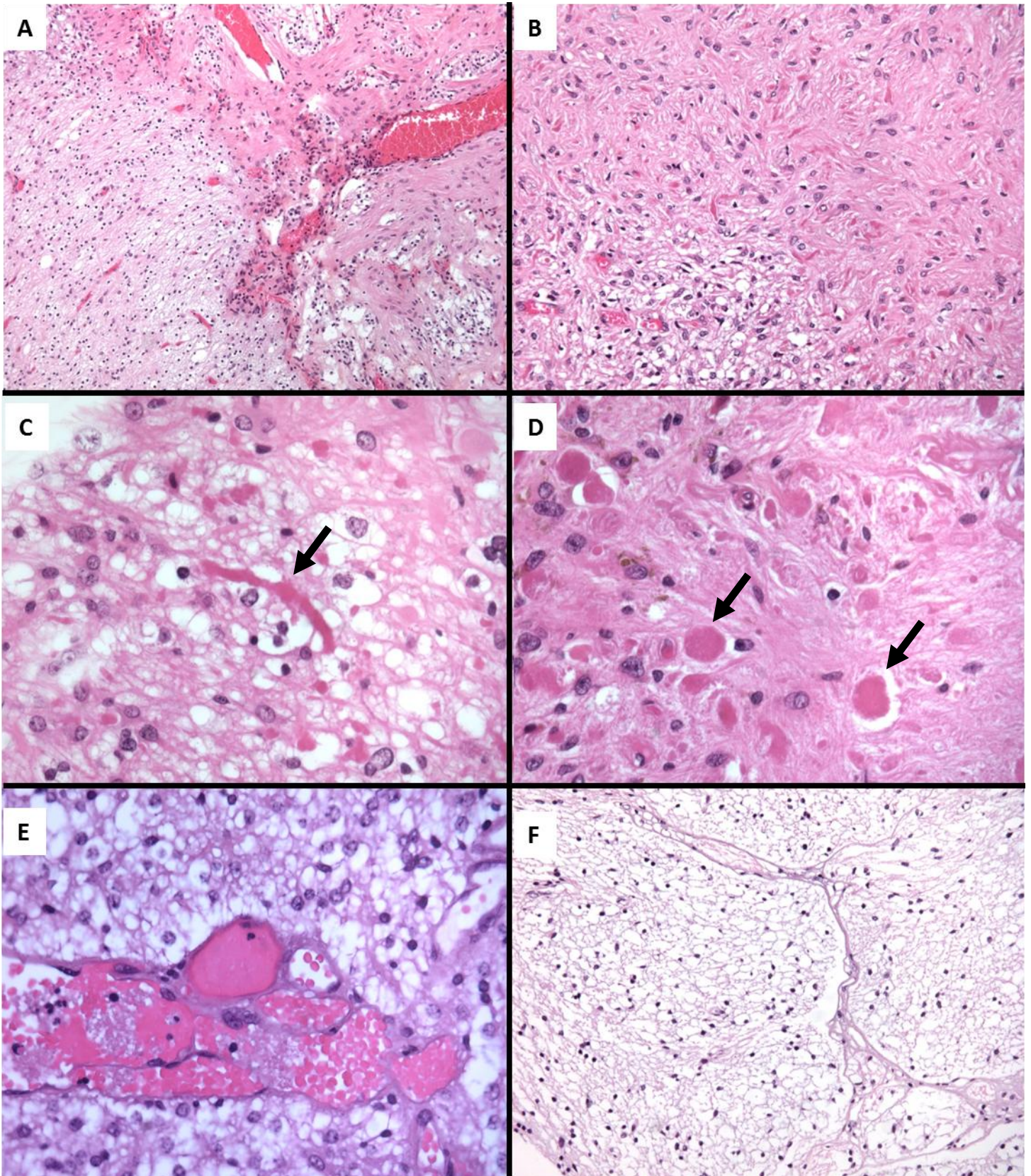


Figure 4 : Caractéristiques histopathologiques typiques de l'astrocytome pilocytaire (coloration par HES) : A (x100) et B (x200) : Architecture biphasique. A gauche, un contingent « oligo-like », à droite, un contingent plus fasciculé, fibrillaire. C. Fibre de Rosenthal (flèche noire) (x400) D. Corps granuleux éosinophiles (flèches noire) (x400) E. Vascularisation gloméruloïde (x400) F. Architecture microkystique (x200) (photos issues des cas inclus dans la série d'astrocytomes pilocytaires)

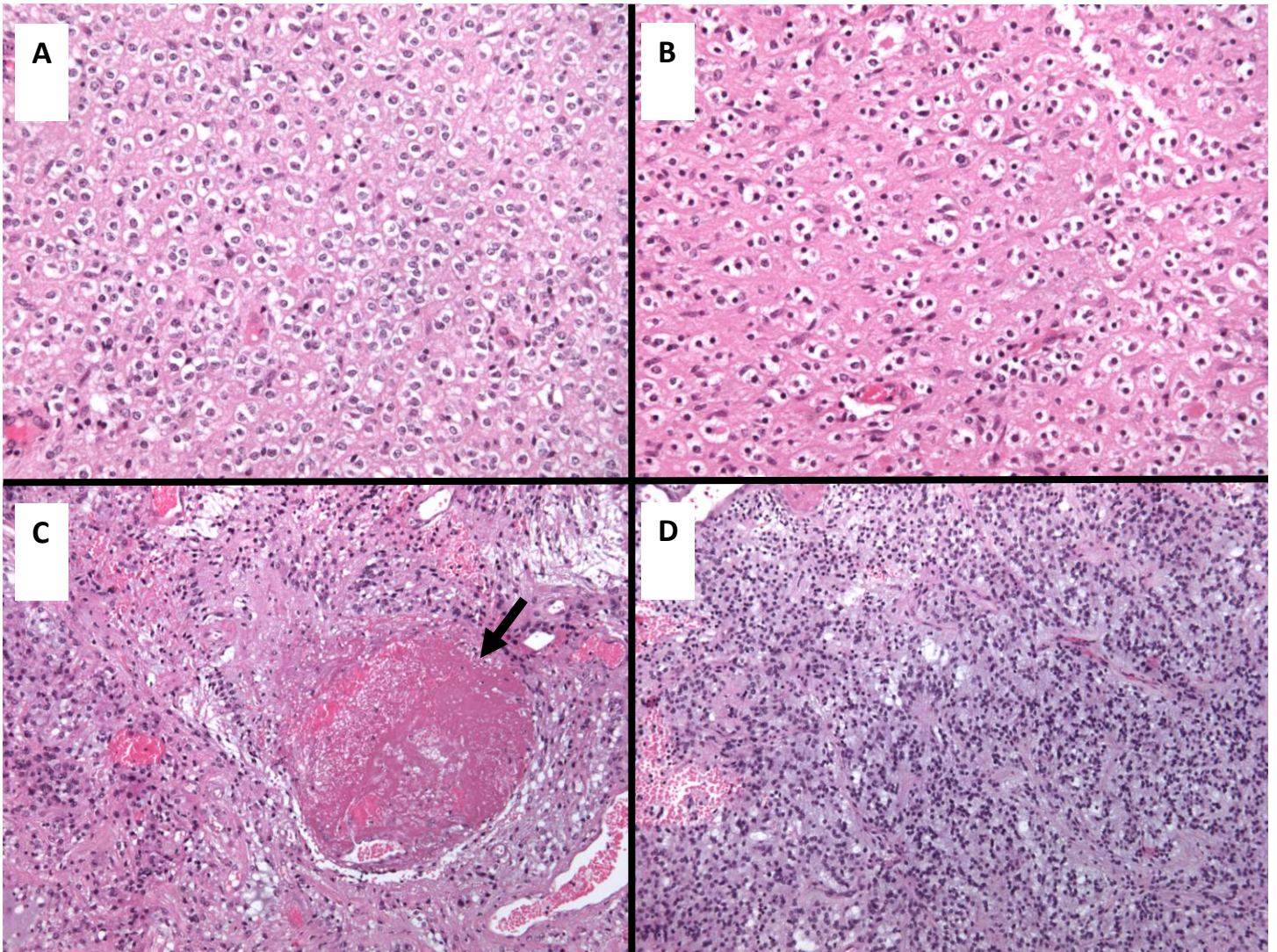


Figure 5 : Variantes histopathologiques de l'astrocytome pilocytaire (coloration par HES) : A et B : contingent de morphologie oligodendrogliale (x200). C. Nécrose tumorale (flèche) (x100). D. Cellularité élevée (x100) (photos issues des cas inclus dans la série d'astroctomes pilocytiques)

E. Signature moléculaire

L'association entre la neurofibromatose de type 1 et les astrocytomes pilocytiques est connue de longue date, des cas de patients atteints de neurofibromatose ayant développé des gliomes des voies optiques ont été rapportés dès 1939, puis de manière récurrente à partir des années 1950 (22–26). C'est en 2000 que le mécanisme de la perte de la neurofibromin (protéine suppresseur de tumeur encodée par le gène *NF1*) au sein des astrocytomes pilocytiques a été confirmée (27). Ce mécanisme est le même que pour la majorité des tumeurs liées à la *NF1*, sur le modèle d'inactivation bi-allélique du gène, dit « double hit », proposé par Alfred Knudson pour le rétinoblastome en 1971 (28). Ces patients atteints de *NF1* présentent une mutation germinale du gène *NF1*, et le développement tumoral de l'astrocytome pilocytique est lié à l'inactivation du second allèle du gène (27). Les astrocytomes pilocytiques affectant les patients atteints de *NF1* touchent plus souvent les voies optiques et sont plus fréquemment multiples ou bilatéraux (67%) que dans les formes sporadiques (19%) (29,30).

En 2008, d'autres anomalies moléculaires ont été identifiées chez les patients atteints d'astrocytomes pilocytiques sporadiques, hors *NF1*. La plus fréquente de ces altérations est un gain chromosomique partiel d'environ 1,9Mb sur le bras long du chromosome 7 (locus 7q34), correspondant à une duplication en tandem des gènes *KIAA1549* et *BRAF* avec création d'un gène de fusion (31–33) (figure 6).

Le gène *BRAF*, ou « B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase », situé sur le chromosome 7 (locus 7q34), encode une protéine à activité sérine/thréonine kinase jouant un rôle de régulation de la voie de signalisation intracellulaire des MAPK, affectant la division cellulaire et la différenciation. Des mutations du gène *BRAF* ont été retrouvées dans de très nombreux cancers, dont le mélanome, le

cancer colorectal, la leucémie à tricholeucocytes, les cancers thyroïdiens, pulmonaires, ovariens et les gliomes.

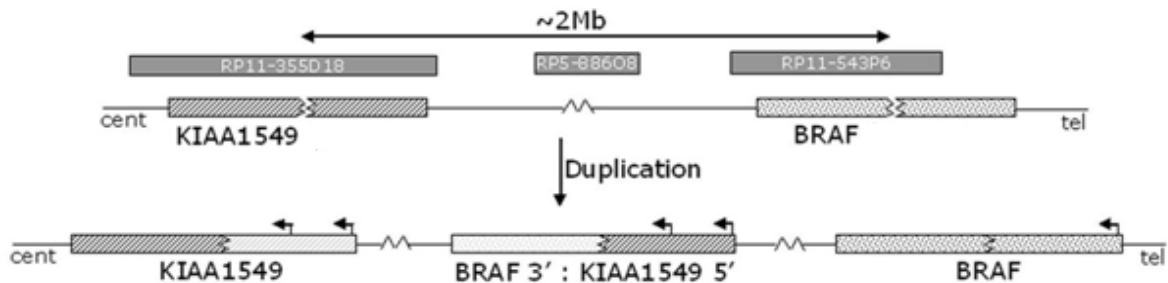


Figure 6 : Duplication en tandem et formation d'un gène de fusion *KIAA1549-BRAF* (D'après Jones & al.(33))

La fonction du gène *KIAA1549* n'est à ce jour pas connue. Le terme KIAA provient de la nomenclature utilisée dans un projet de séquence et d'analyse visant à identifier les longs ADNc humains (projet HUGO pour Human Unidentified Gene-Encoded large proteins), initié en 1997 et conduit par le Kazusa Institute au Japon. Chaque nouvel ADNc découvert, et le gène qui l'encodait, était nommé KIAA suivi de quatre chiffres (34). Ce programme a permis la caractérisation de plus de 2000 nouveaux gènes, dont *KIAA1549*, sans pouvoir en préciser la fonction (35). Son expression est ubiquitaire (36).

La fusion des gènes *KIAA1549* et *BRAF* entraîne une perte du domaine N-terminal de *BRAF* et conserve son domaine tyrosine kinase. L'expression du gène de fusion est conditionnée par son extrémité 3', identique aux premiers exons de *KIAA1549*. Le niveau d'expression de la protéine de fusion est faible et très proche de celui de la protéine *KIAA1549* (37). L'activité tyrosine kinase de la protéine de fusion devient indépendante des effecteurs et régulateurs de *BRAF* (32,33).

Sept transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* différents ont été décrits, impliquant les exons 15, 16, 18 ou 19 du gène *KIAA1549* et les exons 9, 10 ou 11 du gène *BRAF*. Le transcrit de fusion retrouvé avec la plus grande fréquence dans les astrocytomes pilocytiques implique les exons 1 à 16 du gène *KIAA1549* et les exons 9 à 18 du gène *BRAF* (*KIAA1549-E16_E9-BRAF*) (transcrit de fusion nommé 16_9 dans le reste de ce document). Il représente, selon les séries, 49 à 62% des transcrits détectés (37). Les autres transcrits de fusion impliquant ces deux gènes sont, par ordre de fréquence, les transcrits 15_9 (22 à 35%), 16_11 (8 à 12%), 15_11 (6%), 18_10 (<1%), 17_10 (<1%), 19_9 (<1%)(37). Une vision schématique des différents transcrits est reprise en figure 7.

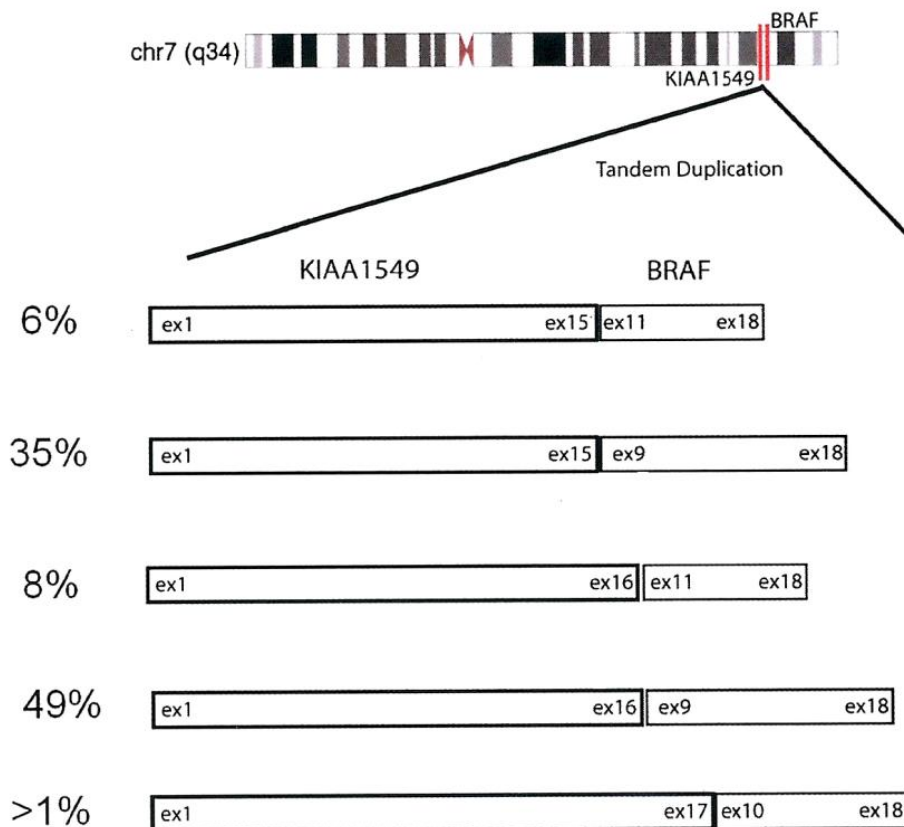


Figure 7 : Différents transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* et leur fréquence (d'après A. Lin & al. (37))

Des transcrits de fusion impliquant *BRAF* ou *RAS1* ont été décrits chez des patients atteints de mélanome (transcrits *PAPSS1-BRAF* et *TRIM24-BRAF*), de cancer papillaire de la thyroïde (*AKAP9-BRAF*), d'adénocarcinome prostatique (*SLC45A3-BRAF* et *ESRP1-RAF1*) et gastrique (*AGTRAP-BRAF*) (38–40). Cependant, dans ces cancers, ce mécanisme d'activation de la voie MAPK est marginal, représentant moins de 2% des anomalies moléculaires des mélanomes (41). L'astrocytome pilocytique est à ce jour la seule tumeur connue pour laquelle la fusion impliquant *BRAF* est le mécanisme oncogénique principal.

La fusion *KIAA1549-BRAF* est la plus fréquente des altérations moléculaires rencontrées dans les astrocytomes pilocytiques sporadiques (60 à 90% des cas suivant les séries) (32,33,42–44). D'autres altérations activant la voie MAPK ont été identifiées : d'autres gènes de fusion (*FAM131B-BRAF* ; *SRGAP3-RAF1* ; *CLCN6-BRAF* ; *RNF130-BRAF*, *FXR1-BRAF*, *QKI-BRAF*, *BRAF-MACF1*) (45–48), des mutations ponctuelles activatrices des gènes *BRAF* (codon 600,), *KRAS* (49) et *FGFR1*, récepteur membranaire activant la voie MAPK (50).

F. Hypothèses de tumorigénèse de l'astrocytome pilocytique

Les anomalies moléculaires identifiées dans les astrocytomes pilocytiques ont en commun une activation de la voie de signalisation MAPK.

Chez les patients atteints de neurofibromatose de type 1, l'inactivation du second allèle du gène *NF1* dans la tumeur entraîne la perte de la neurofibromin. L'absence de cette protéine régulatrice entraîne une activation permanente de la protéine RAS responsable de l'activation de la voie de signalisation intracellulaire de mTOR (mammalian Target Of Rapamycin), et dans une moindre mesure des MAPK (51,52). Ces deux voies sont impliquées dans la survie et la prolifération cellulaires (51).

Dans les formes sporadiques, l'activation de la voie MAPK proviendrait soit de l'activation constitutionnelle du récepteur membranaire (*FGFR1*), soit d'une mutation activatrice de *BRAF* ou de *KRAS*, soit de protéines de fusion impliquant *RAS1* ou *BRAF*. Dans ce mécanisme, il semblerait que le partenaire soit une protéine systématiquement exprimée au niveau du tissu cérébral. L'extrémité 3' du gène de fusion conditionne son expression, et l'extrémité 5' code, par le biais des exons 11 à 18 de *BRAF*, son domaine tyrosine kinase activant les effecteurs habituels de *BRAF*.

Bien que le mécanisme initial soit différent, les formes sporadiques comme celles liées à la NF1 semblent entraîner une activation conjointe des deux voies de signalisation MAPK et mTOR. En effet, l'augmentation des concentrations protéiques de ERK en présence d'un gène de fusion est également associée à une augmentation des niveaux de mTOR (par phosphorylation et inactivation de la tubérine et activation de Rheb) (53).

Les mécanismes moléculaires conduisant à la gliomagenèse de l'astrocytome pilocytique sont synthétisés dans la figure 8.

La cellule d'origine de l'astrocytome pilocytique n'est à ce jour pas connue. Les études portant sur des astrocytomes de haut grade et des médulloblastomes ont démontré l'importance de la cellule d'origine et de son stade de développement dans la tumorigénèse de ces tumeurs (54,55). Une étude récente retrouve, sur modèle murin, une capacité de tumorigénèse de la fusion *KIAA1549-BRAF* sur des cellules souches neurales cérébelleuses, mais pas sur les astrocytes (53). Ce phénomène n'est retrouvé que dans le modèle murin après implantation dans l'encéphale de cellules souches neurales cérébelleuses modifiées exprimant le transcrit de fusion. Les essais *in vitro* ne permettaient pas, dans cette étude, de retrouver cette capacité de tumorigénèse, il semble donc que des contraintes liées à la localisation de la tumeur et au microenvironnement tumoral participent à la gliomagenèse des astrocytomes pilocytiques (51).

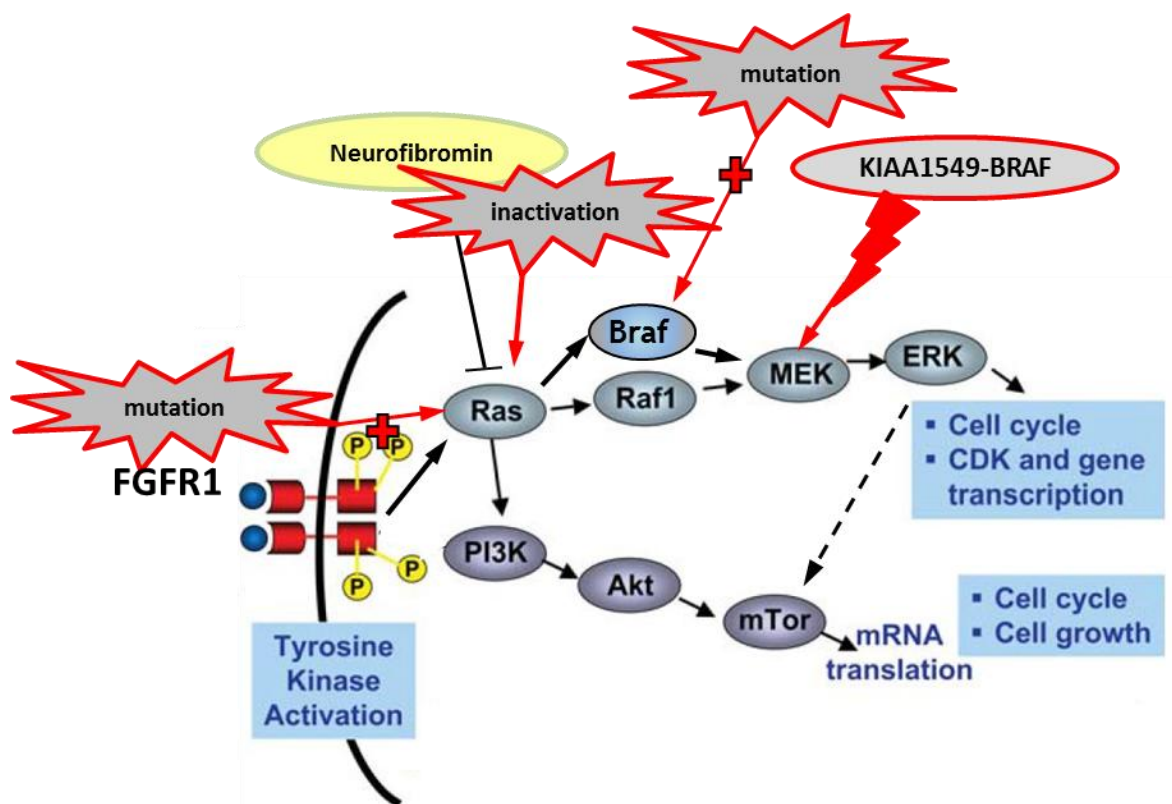


Figure 8 : Mécanismes d'activation des voies MAPK et mTOR dans la tumorigénèse de l'astrocytome pilocytique (Modifié d'après Maione et al. (56)).

G. Pronostic et traitement

La survie globale à 10 ans des patients atteints d'astrocytome pilocytique est supérieure à 90% (14). Cependant, le pronostic des patients atteints de tumeurs de localisation hypothalamo-chiasmatique, ou des patients n'ayant pas pu bénéficier d'une résection chirurgicale complète (par la localisation ou le caractère infiltrant de la lésion) ont une survie sans progression et une survie globale plus brèves (57). C'est aussi le cas des exceptionnels astrocytomes pilocytiques décrits avec dissémination leptoméningée (58). L'évolution est parfois rapide et peut être fatale, notamment dans les formes récidivantes, de localisation hémisphérique ou du tronc cérébral (59,60). La chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie sont les outils du traitement. En cas de chimiothérapie, un protocole européen (SIOP LGG 2004) utilise une combinaison de vincristine et carboplatine associé ou non à l'étoposide (recrutement terminé, données en cours d'analyse).

L'astrocytome pilocytique n'évolue que de manière exceptionnelle vers une forme maligne, et tend à conserver sa morphologie et son grade OMS même en cas de récurrences multiples (21,61).

Chez quelques patients traités par soretinib, un inhibiteur de *BRAF*, il a été observé une accélération de la croissance tumorale, aussi bien dans des cas sporadiques que dans d'autres liés à la NF1. Ces données ont été confirmées *in vitro*, le traitement par soretinib augmentant de manière paradoxale l'activation de ERK (62). Une autre étude utilisant un analogue du vémurafenib (molécule ciblant *BRAF* muté V600E) montrait *in vitro* une activation paradoxale de la voie MAPK en cas de présence de transcrit de fusion *KIAA1549-BRAF*. Cette activation n'était pas retrouvée lors de l'utilisation de certains nouveaux inhibiteurs de *BRAF*, dits de deuxième génération (63).

H. Difficultés diagnostiques pour le Pathologiste

L'astrocytome pilocytique ne pose souvent pas de difficulté diagnostique majeure, ce dès l'analyse extemporanée.

Les diagnostics différentiels principaux sont les suivants :

- Le gangliogliome est une tumeur constituée de cellules ganglionnaires dysplasiques associées à une composante gliale piloïde. Le diagnostic différentiel est difficile dans les formes à cellules ganglionnaires peu représentées. La connaissance de la localisation de la tumeur entre dans la démarche diagnostique, les astrocytomes pilocytiques n'ayant pas la même localisation que les gangliogliomes, ceux-ci étant plutôt hémisphériques et rarement centraux. L'expression de certains marqueurs immunohistochimiques, tels que le CD34 et la synaptophysine, bien que peu spécifiques, aident également le diagnostic. Sur le plan moléculaire, l'anomalie la plus fréquente est la mutation V600E du gène *BRAF*, retrouvée dans 18 à 58% des cas, mais qui a également été rapportée dans l'astrocytome pilocytique, et dans d'autres tumeurs cérébrales (64–71).
- Les tumeurs dysembryoplasiques neuroépithéliales ou DNET ressemblent beaucoup aux astrocytomes pilocytiques, et peuvent sur prélèvements restreints poser des difficultés diagnostiques, pas toujours résolues par la biologie moléculaire (10,72).
- Les tumeurs glioneurales du quatrième ventricule avec formation de rosettes (RFGNT) sont très rares, mais partagent des similarités histologiques et de localisation avec les astrocytomes pilocytiques. Il n'a jamais été retrouvé

d'altération moléculaire de *BRAF* dans ces tumeurs. Des mutations de *FGFR1*, récepteur activant la voie MAPK aussi retrouvées dans de rares astrocytomes pilocytiques, ont été décrites (73).

- Le xanthoastrocytome pléomorphe, tumeur supratentorielle de moins bon pronostic, peut également être difficile à distinguer de certaines formes d'astrocytomes pilocytiques de cellularité élevée et de pléomorphisme cellulaire marqué (74).

- Les gliomes infiltrants, de grade II ou III selon l'OMS ont sur le plan morphologique des caractéristiques pouvant être communes avec l'astrocytome pilocytique quand il a un aspect homogène de type astrocytaire ou oligodendrogial sans caractéristique distinctive ni architecture biphasique. L'astrocytome pilocytique peut également comporter des remaniements hémorragiques aigus rendant l'aspect radiologique inquiétant. Ces formes remaniées posent des difficultés diagnostiques, en particulier lorsqu'elles surviennent chez l'adulte et en localisation supratentorielle. Les marqueurs moléculaires des gliomes infiltrants, notamment la présence de mutations IDH1 ou IDH2 et/ou la co-délétion 1p19q sont particulièrement utiles, puisque toujours absents dans les astrocytomes pilocytiques (75,76). Chez l'enfant, cette situation reste plus problématique puisque ces marqueurs sont généralement négatifs dans les gliomes de grade II ou III, et il peut être impossible de faire un diagnostic précis sur la pièce d'exérèse (77). Dans ces gliomes infiltrants de l'enfant, on utilisera comme marqueur diagnostique les mutations des histones H3.3 et H3.1, présentes dans 70 à 80% des cas et absentes des astrocytomes pilocytiques (78).

- Le glioblastome est difficile à distinguer de l'astrocytome pilocytique quand ce dernier présente des caractéristiques histopathologiques mimant une tumeur agressive, telles que la nécrose, la présence de nombreux glomérules vasculaires et de remaniements hémorragiques. Les mitoses, l'anisocaryose, les marqueurs immunohistochimiques de prolifération cellulaire (anticorps anti Ki67) et d'altération des histones (anticorps anti H3K27me3) permettent d'orienter vers le diagnostic de tumeur de grade IV.
- La gliose réactionnelle, non tumorale, est capitale à distinguer de l'astrocytome pilocytique. Cette gliose peut prendre une forme piloïde, et comporter des fibres de Rosenthal. Elle est rencontrée au contact de tumeurs gliales et non gliales d'évolution lente, particulièrement le craniopharyngiome, ou au niveau de la paroi de kystes non tumoraux, comme ceux de la région pinéale (79). La distinction avec une tumeur de bas grade de morphologie piloïde peut rester impossible.

Dans toutes ces situations, l'utilisation de marqueurs moléculaires (fusion *KIAA1549-BRAF*, mutations de *BRAF*, d'*IDH1* et *IDH2*, des gènes codant les histones H3.1 et H3.3) est essentielle pour un centre de référence en neurochirurgie et neuropathologie.

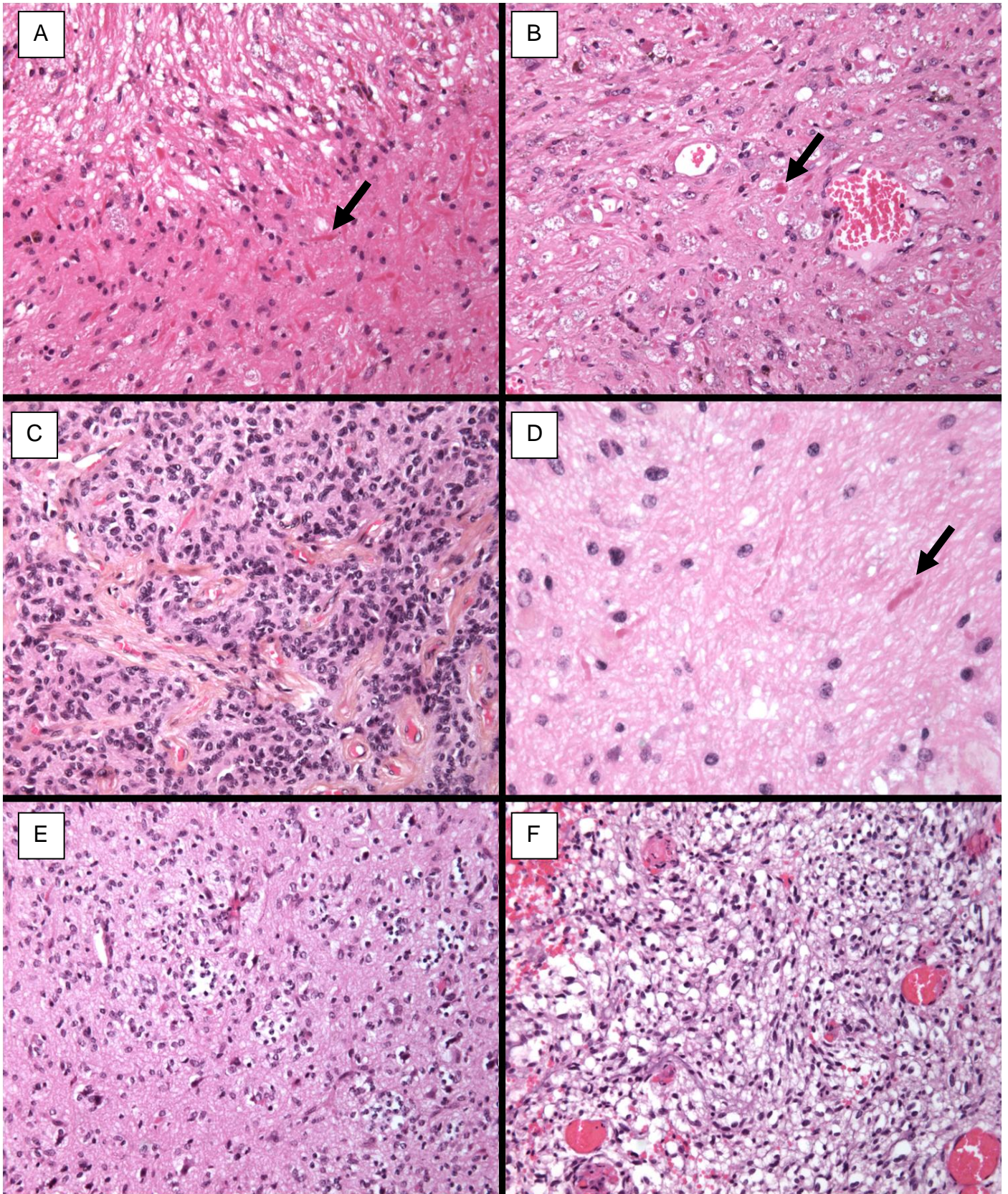


Figure 9 : Lésions du diagnostic différentiel de l'astrocytome pilocytaire : A et B : Gliose piloïde (ici au contact d'une malformation vasculaire) avec fibres de Rosenthal (A, flèche) et corps granuleux éosinophiles (B, flèche). C et D : Xanthoastrocytome pléomorphe, avec fibre de Rosenthal (D, flèche). E. Gangliogliome. F. Glioblastome, secteur d'aspect microkystique.

V. Techniques de biologie moléculaire mises en œuvre pour la recherche des anomalies associées aux astrocytomes pilocytiques

Les techniques de caractérisation des anomalies moléculaires utilisées dans ce travail, permettant d'établir la séquence d'ADN des cibles étudiées, sont le séquençage par méthode Sanger, et le pyroséquençage.

A. Principe du séquençage par méthode Sanger

La méthode Sanger est une méthode de séquençage mise au point en 1977 sur un principe de synthèse enzymatique de multiples brins d'ADN et terminaison de séquence. La réaction de synthèse se poursuit jusqu'à l'insertion au hasard d'un didésoxynucléotide « terminateur de chaîne » ddNTP, stoppant lors de son incorporation la synthèse du brin (figure 9). Utilisant initialement des marqueurs radioactifs pour chaque ddNTP, la technique a été modifiée en 1986 grâce à l'utilisation de marqueurs fluorescents, permettant son automatisation (80).

Les quatre ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP et ddTTP) sont marqués par un fluorophore (bleu, rouge, jaune ou vert, une couleur pour chacune des bases). Les brins ainsi synthétisés, de tailles variables, seront séparés par électrophorèse (au sein d'un capillaire du séquenceur). La détection du signal lumineux terminant chaque fragment de taille différente permet au séquenceur de produire un électrophorégramme dont on déduit la séquence génomique (figure 10).

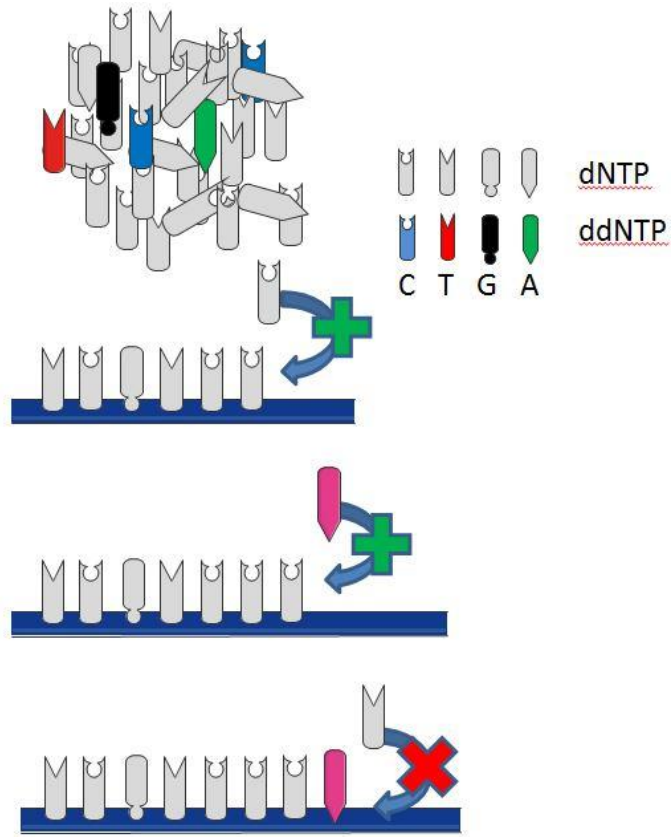


Figure 9. Principe de la terminaison de séquence

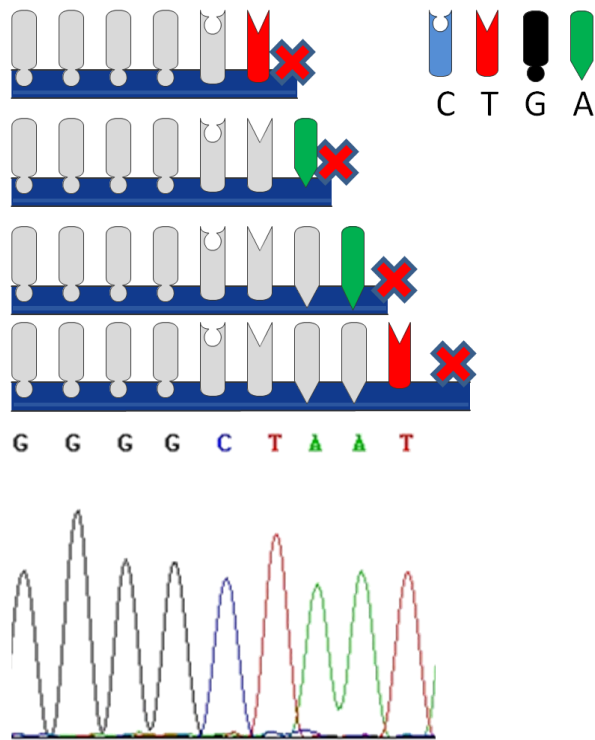


Figure 10 : Création d'un électrophorégramme

B. Principe du pyroséquençage

Le pyroséquençage est une technique basée sur un principe de séquence par synthèse. La séquence est définie lors de l'incorporation de chaque nucléotide, durant la synthèse d'un brin d'ADN de la séquence cible préalablement amplifiée. La technique utilise une distribution consécutive de différents nucléotides, suivant une séquence prédéfinie. Si le nucléotide ajouté dans le milieu réactionnel correspond à celui attendu par la polymérase, il est incorporé dans le brin en cours de synthèse en libérant un pyrophosphate (PPi). Grâce à une ATP sulfurylase, ce pyrophosphate est transformé en ATP qui est utilisé, couplé à la luciférine, par une luciférase pour émettre un signal lumineux associé à la production d'une oxyluciférine. C'est ce signal lumineux qui est capté par le capteur CCD (Charge-Coupled Device) du séquenceur qui le reproduit sous la forme d'un pic sur un pyrogramme (figures 11 et 12).



Figure 11 : Pyroséquenceur PyroMark MD™ (Qiagen)

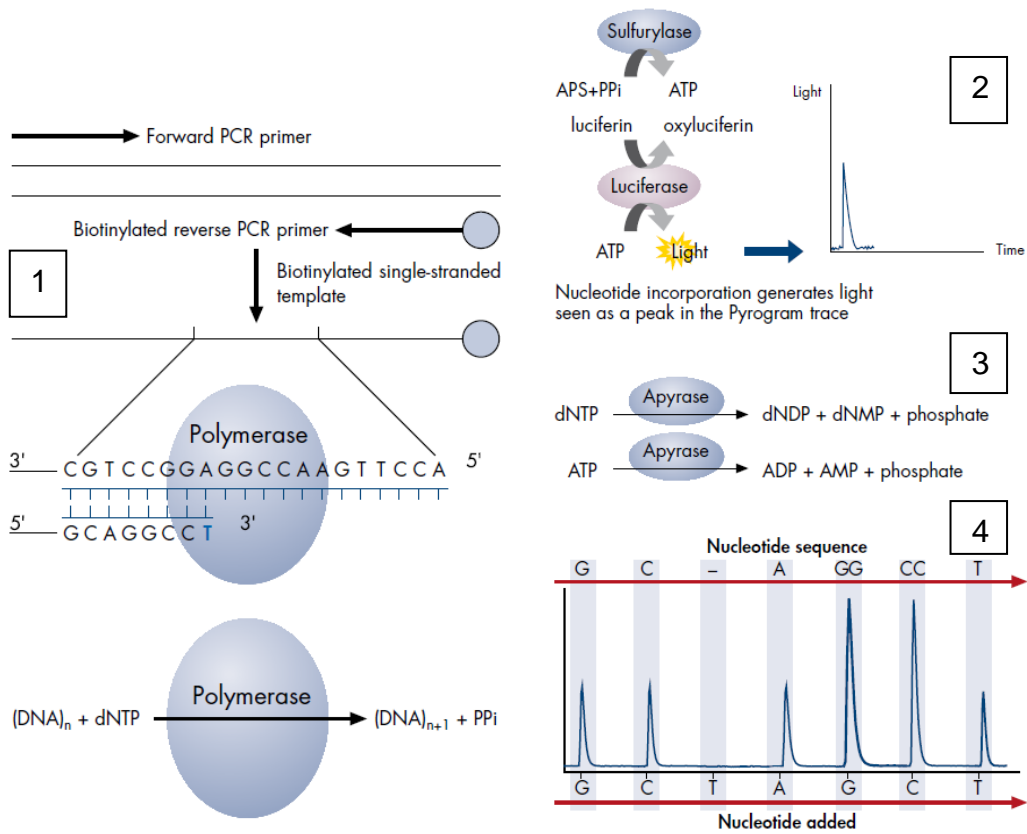


Figure 12: Principe du pyroséquenceur (d'après la documentation du pyroséquenceur Pyromark™ (QIAGEN)) 1. Elongation du brin séquencé par la polymérase, avec distribution consécutive de dNTP. 2.Génération d'un signal lumineux 3. Dégradation des nucléotides non incorporés par l'apyrase. 4. Création d'un pyrogramme.

VI. Objectif et phases de travail

L'objectif principal de notre étude est de vérifier rétrospectivement, dans les conditions d'un centre hospitalier universitaire centré sur une région de 4,5 millions d'habitants, la valeur du test de détection des transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* pour le diagnostic des patients atteints d'astrocytome pilocytique, avec établissement des performances du test et calcul des valeurs prédictives positives et négatives, sensibilité et spécificité dans une population de patients atteints de tumeur cérébrale.

Les données de la littérature mettaient en avant, en 2012, la recherche des transcrits *KIAA1549-BRAF*, alors considérés comme très spécifiques, comme un élément d'aide au diagnostic de ces tumeurs cérébrales. Cette analyse n'étant, à l'échelle nationale, alors pas réalisée en analyse de routine, une première phase de ce travail a été la création puis la mise au point d'un protocole de détection de ces anomalies moléculaires, au sein de la plateforme de Biologie Moléculaire du CHRU de Lille, qui a été réalisée entre Juillet et Novembre 2012. La technique a pu être mise en place en tant qu'analyse de routine fin Novembre 2012.

La deuxième phase de ce travail correspondait à l'évaluation rétrospective de la pertinence en terme diagnostique du test, utilisant l'analyse des données de deux ans d'utilisation en routine. Nous avons étudiées la proportion de transcrits de fusion au sein de la population d'astrocytomes pilocytiques, dans les sous-groupes pédiatriques (<20 ans, âge limite des formes pédiatriques selon le CBTRUS, utilisé dans la plupart des études sur les gliomes de bas grade de l'enfant) et de l'adulte, et

en différenciant les formes localisées en supratentorielle des cas localisés en fosse postérieure.

Afin de caractériser la cohorte de patients, les données moléculaires d'une partie des tumeurs étaient complétées, d'une part en analyses de biologie moléculaire ciblant les gènes *BRAF* et *KRAS*, et d'autre part par des données immunohistochimiques obtenues à l'aide de la création d'un tissu micro array (TMA). Cette analyse permettait l'étude d'autres marqueurs pouvant participer au diagnostic, tels que la mutation V600E du gène *BRAF*, la mutation ponctuelle la plus fréquente du gène *IDH1* (R132H), la perte de triméthylation sur le codon 27 de l'histone H3 (H3K27m3), conséquence de la mutation du gène *H3F3A* codant pour l'histone H3.3 (ou du gène *HIST1H3A*, codant pour l'histone H3.1).

MATERIELS ET METHODES

I. Constitution de la population

Vingt et un échantillons tumoraux de patients atteints d'astrocytome pilocytique étaient retenus pour les tests sur tissu congelé et les tests sur tissu inclus en paraffine. Dix échantillons tumoraux de patients atteints de glioblastome ont également été sélectionnés afin de disposer de contrôles négatifs, aucun transcrite de fusion *KIAA1549-BRAF* n'ayant été décrit dans ce type de tumeur.

Entre le 22 novembre 2012 et le 31 décembre 2014, 110 échantillons tumoraux de patients atteints de tumeurs cérébrales ont été testés pour la recherche de transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* dans le laboratoire de biologie moléculaire du CHRU de Lille (Pr N. Porchet).

Au total, les tumeurs cérébrales de 135 patients, tous types histologiques confondus, ont été testées à la recherche de transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF*. L'âge moyen au diagnostic était de 18,45 ans, avec une médiane de 14 ans. Les patients étaient répartis en 63 hommes et 65 femmes. Parmi les tumeurs testées, le diagnostic anatomopathologique différenciait 72 astrocytomes pilocytiques, 14 gangliogliomes, 4 tumeurs neuroépithéliales dysembryoplasiques (DNET), 10 glioblastomes, 1 schwannome, 1 gliosarcome, 1 tumeur glioneuronale papillaire, 3 épendymomes, 5 gliomes de haut grade non classés, 15 gliomes de bas grade non classés, 2 gliomes astrocytaires « de type NF1 » et 7 prélèvements non tumoraux.

Les données administratives, cliniques, biologiques et anatomopathologiques des patients suivis au CHRU de Lille ont été recueillies à l'aide des bases de données informatiques locales puis complétées si nécessaire par consultation des dossiers médicaux physiques. Une partie des données clinico-biologiques des patients dont la demande a été transmise par le Groupe d'Etude de Neuropathologie Oncologique Pédiatrique (GENOP) ont été obtenues grâce à Mlle Karen Silva, Assistante de Recherche Clinique au GENOP (Service d'Anatomie et Cytologie Pathologique, Hôpital Bron, Hospices Civils de Lyon).

Les données recueillies comprenaient la date de naissance, la date de diagnostic initial, le diagnostic radiologique initial, la localisation de la tumeur, le diagnostic histopathologique final (après relecture collégiale par le GENOP si elle avait lieu), les résultats des analyses moléculaires, incluant les recherches de transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF*, de mutations ponctuelles des gènes *BRAF*, *IDH1*, *IDH2* et *H3F3A*, les résultats de l'analyse immunohistochimique (anticorps anti -IDH1-R132H, -BRAFFV600E, -H3K27me3), le traitement réalisé, la présence d'une ou plusieurs récives et leurs dates, la survenue d'un décès et sa date, le Pathologiste demandeur et sa ville d'origine.

II. Techniques de biologie moléculaire

A. Préparation du matériel

1. Conditionnement des prélèvements

Les prélèvements issus du bloc de neurochirurgie du CHRU de Lille ont été pour partie congelés (plongés dans l'isopentane à -80°C dans le système de congélation rapide SnapFrost™2 – ALPHELYS, puis stockés en congélateur à -80°C). Le reste était fixé dans une solution de formol à 4% tamponné, pour une durée minimale de 12 heures, puis inclus en paraffine en utilisant l'automate d'inclusion Shandon Excelsior ES™ (THERMO SCIENTIFIC). Les blocs de tissus inclus en paraffine utilisés dans ce travail proviennent des services d'Anatomie et Cytologie Pathologiques des centres hospitaliers de Lille (CHRU), Lyon (CH Bron), Toulouse (CHU), Paris (CH Lariboisière, CH Pitié-Salpêtrière), Bordeaux (CHU), Marseille (CHU La Timone) et Angers (CHU). Le matériel congelé ou fixé dans le formol puis inclus en paraffine a pu être utilisé, au choix du Pathologiste demandeur.

2. Sélection du matériel tumoral et contrôle morphologique

Un bloc tumoral était sélectionné et une évaluation du pourcentage de cellules tumorales était réalisée par le Pathologiste demandeur suivant le point 8.7.7 de l'annexe 7 des Recommandations de Bonnes Pratiques en Anatomie et Cytologie Pathologiques (RBPACPv2) de l'AFAQAP (Association Française d'Assurance Qualité en Anatomie Pathologique) (81). D'après ces recommandations, il convient de différencier les prélèvements de cellularité infime (<1%), de cellularité faible à

intermédiaire (<30%) avec 6 sous-groupes (1-4%, 5-9%, 10-14%, 15-19%, 20-24%, 25-29%) et de cellularité forte (\geq 30%) avec 3 sous-groupes : 30%, 50% ou 80%. Les larges zones de nécrose doivent être évitées et être mentionnées et évaluées lorsqu'elles sont présentes. Sur matériel biopsique avec peu de cellules tumorales, il convient de fournir le nombre approximatif de cellules (< ou >100 cellules tumorales) en plus de la cellularité tumorale (81).

Lorsque le bloc avait été utilisé pour la réalisation d'autres techniques entre le contrôle morphologique initial et la réalisation de coupes épaisses, une lame colorée par HES était réalisée, permettant une meilleure concordance entre le matériel observé et celui utilisé pour les analyses moléculaires.

3. Réalisation de coupes épaisses et macrodissection

Deux à cinq coupes de 10 μ m (copeaux) étaient réalisées au microtome ou au cryotome (pour les prélèvements congelés).

Le Pathologiste pouvait enrichir le prélèvement en cellules tumorales en sélectionnant sur lame une zone pour macrodissection. Cette zone était alors découpée sur bloc par le technicien au scalpel avant la réalisation des coupes. Le contrôle morphologique prenait alors en compte ce zonage.

4. Extraction des acides nucléiques

Les ARN totaux étaient extraits de tissus congelés avec des kits différents des tissus inclus en paraffine. Les ADN totaux étaient extraits uniquement de tissus inclus en paraffine.

a) Extraction des ARN à partir des tissus congelés

Les ARN des tissus congelés étaient extraits à l'aide du kit Nucleospin RNA II[®] (Macherey Nagel). Ce kit permet les étapes de :

- lyse des tissus avec 3,5 µL de β-mercapto-ethanol et 350 µL de tampon RA1, transfert du mélange sur colonne, puis centrifugation 1 minute à 14000 rpm.
- Fixation de l'ARN sur colonne en présence de 350 µL d'éthanol suivi d'une centrifugation de 45 secondes à 10100 rpm. Sont ajoutés 350 µL de tampon MDB sur la colonne.
- Purification par 10 µL de DNase préalablement reconstituée et 90 µL de tampon RXN Buffer rDNase, sur la colonne, en incubant 15 minutes à température ambiante.
- Elution de l'ARN par lavages consécutifs de la colonne :
 - 200 µL de tampon RA2 puis centrifugation 45 secondes à 10100 rpm
 - 600 µL de tampon RA3 puis centrifugation 45 secondes à 10100 rpm.
 - 250 µL de tampon RA3 puis centrifugation 2 minutes à 14000 rpm.
 - Elution par 50 µL d'eau RNase free et centrifugation 2 minutes à 11000 rpm.

b) Extraction des ARN à partir de tissus inclus en paraffine

Les ARN des tissus inclus en paraffine étaient extraits à l'aide du kit RNeasy FFPE® (Qiagen), en suivant des étapes de :

- Déparaffinage par 1 mL de xylène sous hotte et centrifugation 2 minutes à 11000 rpm, puis ajout d'1 mL d'éthanol et centrifugation 2 minutes à 11000 rpm.
- Lyse des tissus par 10 µL de protéinase K associés à 240 µL de tampon PKD, avant incubation sur thermobloc 15 minutes à 55°C puis 15 minutes à 80°C.
- Fixation des ARN sur colonne gDNA Eliminator: ajout de 500 µL de tampon RBC au mélange puis centrifugation 45 secondes à 10000 rpm.
- Ajout de 1200 µL d'éthanol absolu sur le filtrat.
- Elution de l'ARN sur colonne RNeasy MinElute:
 - Transfert de 600 µL d'échantillon puis centrifugation 30 secondes à 10000 rpm,
 - Deux lavages avec 500 µL de tampon RPE et centrifugation 2 minutes à 10000 rpm.
 - « séchage » de la membrane de la colonne par centrifugation 5 minutes à 14000 rpm
 - Elution par 20 µL d'eau RNase free et centrifugation 1 minute à 14000 rpm.

c) Extraction des ADN à partir de tissus inclus en paraffine

Les ADN totaux étaient extraits en utilisant le kit QiaAmp® FFPE tissue kit (Qiagen) selon le protocole suivant :

- Déparaffinage par 160 μ L de solution de déparaffinage du kit, mélange par vortex, centrifugation 10 secondes à 14000 rpm puis incubation à 56°C pendant 3 minutes
- Ajout de 180 μ L de tampon ATL puis centrifugation 1 minute à 10000 rpm.
- Lyse avec 20 μ L de protéinase K déposée en phase inférieure, suivi d'une incubation sur thermoblock de 3h à 56°C puis 1h à 90°C.
- Extraction de l'ADN :
 - Préparation d'un tube de 2 ml contenant un mélange de 200 μ L d'éthanol et 200 μ L de tampon AL. Ajout de la phase inférieure du tube échantillon à ce mélange.
 - Dépôt du mélange sur colonne puis centrifugation 1 minute à 5000 rpm.
 - 2 lavages de la colonne avec 500 μ L de tampon AW1, centrifugation à 5000 rpm pendant 1 minute, puis 500 μ L de tampon AW2 et centrifugation à 5000 rpm pendant 1 minute.
 - « séchage » de la membrane de la colonne par centrifugation pendant 3 minutes à 14000 rpm.
 - Elution par dépôt de 50 μ L de tampon ATE sur la colonne, incubation pendant 5 minutes et centrifugation 1 minute à 14000 rpm.

5. Quantification de la concentration et vérification de la pureté des acides nucléiques

La quantification de la quantité d'acides nucléiques extraits et la vérification de leur pureté (évaluation de la contamination par des protéines ou des sels) étaient réalisées par spectrophotométrie en microvolume Nanodrop™ (Thermo Fisher Scientific), permettant l'évaluation du spectre d'absorbance des acides nucléiques. La concentration en acides nucléiques est donnée par l'absorbance à 260 nm (A_{260}), la pureté en protéines est évaluée par les rapports entre absorbance à 260 nm et 280 nm (A_{260}/A_{280}) et la pureté en sels est évaluée par le rapport entre absorbance à 260 nm et absorbance à 230 nm (A_{260}/A_{230})

L'utilisation du Nanodrop nécessite des étapes :

- D'établissement d'un contrôle dit « blanc » (tampon d'élution des acides nucléiques lors de l'extraction).
- De mesure de l'échantillon par dépôt d'1,5 μ L d'échantillon sur la cellule de mesure.
- D'interprétation des résultats :
 - Une unité d'absorbance à 260 nm correspond à 50 μ g/ml pour l'ADN (double brin) et 40 μ g/ml pour l'ARN.
 - Le rapport A_{260}/A_{280} indique un échantillon non contaminé par les protéines entre 1,8 et 2, une contamination quand il est $<1,8$, et une dégradation des acides nucléiques quand >2 .
 - Le rapport A_{260}/A_{230} indique une contamination par des sels quand il est inférieur à 1,3.

6. Conversion des ARN en ADNc

La rétro-transcription de l'ARN en ADNc était réalisée par une technique de multi-amorçage au hasard, en utilisant le kit ADNc SuperScript Vilo[®] (Invitrogen) suivant le protocole suivant :

- Réalisation d'un mélange réactionnel contenant 4 µL de Reaction Mix VILO 5x, 2 µL de 10x SuperScript Enzyme Mix, de 1 à 14 µL d'ARN extrait de tissu et d'une quantité suffisante d'eau RNase free pour obtenir un volume de mélange réactionnel de 20 µL.
- Conversion par incubation 60 minutes à 42°C puis 5 minutes à 85°C.

Les différents acides nucléiques étaient stockés à -80°C.

7. Sensibilité des techniques de caractérisation et seuils d'interprétation

Pour la technique de pyroséquençage (détaillée ci-après), pour lesquelles la sensibilité est d'environ 1 à 3% d'allèle muté, le seuil d'interprétation était défini à 10% de cellules tumorales au sein du prélèvement. Pour la technique de séquençage Sanger, moins sensible (~15% d'allèle muté), le seuil était défini à 40% de cellules tumorales. Ces seuils sont utilisés en analyse de routine au sein du laboratoire de Biologie Moléculaire du CHRU de Lille, et ont été définis par les Biologistes (Dr Fabienne Escande, Dr Clotilde Descarpentries).

B. Détection des transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF*

1. Principe et stratégie de détection

La détection de transcrits de fusion se fait par réaction de polymérase en chaîne après rétro-transcription de l'ARN extrait du tissu tumoral (RT-PCR). La dégradation de l'ARN étant très rapide après dévitalisation des tissus, le temps d'ischémie froide (temps entre la dévitalisation et la fixation du prélèvement) doit être le plus court possible, et la durée de fixation du prélèvement dans le formol doit être maîtrisée (durée maximale optimale de 24h).

Une des difficultés de la recherche des transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* par RT-PCR est l'existence de multiples points de cassure, formant des transcrits différents. Chacun de ces transcrits *KIAA1549-BRAF* doit être amplifié par un couple d'amorce respectant certaines contraintes techniques :

- taille des produits d'amplification : la taille des fragments doit être compatible avec l'analyse sur tissu congelé aussi bien que fixé et inclus en paraffine, nécessitant des fragments amplifiés de petites tailles (dégradation des ARN avant et lors de la fixation dans le formol).

- Homogénéisation des températures de fusion (T_m) des amorces.

- Identification des différents transcrits, y compris les moins fréquents.

- Absence de polymorphismes nucléotidiques au sein des sites d'hybridation : vérifiée à l'aide de l'outil informatique SNPCheck V.3 (National Genetics Reference Laboratory, Manchester, UK) (<https://secure.ngrl.org.uk/SNPCheck/snpcheck>).

- Absence d'hybridation aspécifique des amorces : vérifiée en utilisant l'outil d'alignement au génome en ligne primer-BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Cinq amorces ont été utilisées, trois amorces sens situées en 5' des points de cassure du gène *KIAA1549* (exons 15, 16 et 18), et deux amorces anti-sens en 3' des points de cassure du gène *BRAF* (exons 9 et 11). Les amorces utilisées sont inspirées de celles utilisées par l'équipe de Tian & al., développées pour la détection de ces transcrits de fusion par technique de RT-PCR quantitative (qPCR), sur tissus fixés et inclus en paraffine (82). Ces amorces ont été modifiées afin d'améliorer la spécificité des réactions d'amplification et d'homogénéiser les températures de fusion. L'amorce localisée dans l'exon 18 du gène *KIAA1549* a été ajoutée afin de permettre la mise en évidence des 3 transcrits de fusion les plus rares.

Parallèlement, deux autres amorces ont été choisies afin de disposer d'une évaluation du niveau d'expression du transcrit *KIAA1549*, décrit comme proche de celui des transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* (32). Ces amorces sont situées dans les exons 12 (amorce sens) et 13 (amorce antisens) du gène *KIAA1549*, et ont été conçues à l'aide du logiciel Primer3 (version en ligne, <http://primer3.wi.mit.edu/>).

Les séquences des amorces utilisées sont consignées dans le tableau 1

Nom de l'amorce	Brin	Séquence	Longueur	Tm
KIAA1549-E16F	Sens	5'-GCCCAGACGGCCAACA-3'	16pb	54
KIAA1549-E15F	Sens	5'-CGTCCACCACTCAGCCTACA-3'	20pb	62
KIAA1549-E18F	Sens	5'-ATCTACTCGGAGGAGATGCC-3'	20pb	62
BRAF-E9R	Antisens	5'-CCTCCATCACCACGAAATCCTT-3'	22pb	66
BRAF-E11R	Antisens	5'-ACTCGAGTCCCGTCTACCAA-3'	20pb	62
KIAA1549-E16Fb	Sens	5'-GCCCAGACGGCCAACAATCC-3'	20pb	62
BRAF-E9Rb	Antisens	5'-CCTCCATCACCACGAAATCC-3'	20pb	62
KIAA1549-E12F	Sens	5'-GATGGCAGGTCCCACAGAG-3'	19pb	62
KIAA1549-E13R	Antisens	5'-CTGTCCACGTGCTCGAAGAT-5'	20pb	62

Tableau 1 : caractéristiques des amorces utilisées pour la détection des transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF*. Tm = température de fusion, en °C, calculées approximativement par la formule suivante : $Tm=(A+T)x2+(G+C)x4$.

En associant cinq amorces en cinq couples, il est possible de détecter les sept transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF*, avec pour chaque fragment amplifié une taille compatible avec l'utilisation d'ADN dégradé issu de tissu FFPE (figure 13):

- KIAA1549-E15F / BRAF-E9Rb : ce couple d'amorce permet la détection des transcrits 15_9 (70 paires de bases), et 16_9 (387 pb).

- KIAA1549-E15F / BRAF-E11R : détection des transcrits 15_11 (58 pb), 15_9 (232 pb), 16_11 (376 pb), 16_9 (550 pb), 17_10 (560 pb), 18_10 (718 pb).

- KIAA1549-E16Fb / BRAF-E9R : détection du transcrit 16_9 (65 pb)

- KIAA1549-E16Fb / BRAF-E11R : détection des transcrits 16_9 (228 pb), 16_11 (54 pb), 17_10 (238 pb), 18_10 (396 pb).

- KIAA1549-E18F / BRAF-E11R : détection des transcrits 18_10 (222 pb) et 19_9 (405 pb).

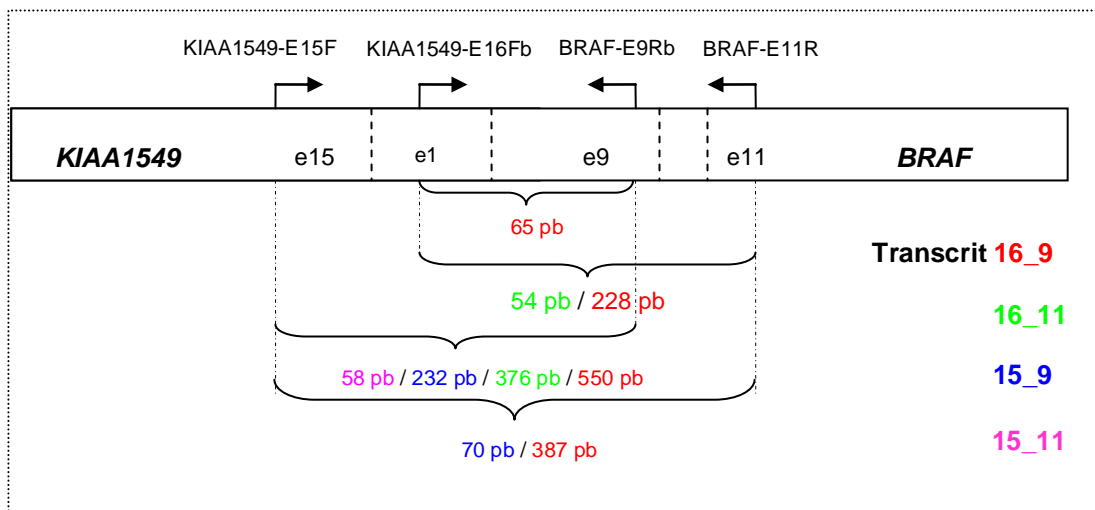


Figure 13: stratégie de détection des 4 transcrits les plus fréquents, et taille des fragments amplifiés en paires de bases. Chaque transcrit est détecté par un couple d'amorce permettant d'obtenir un fragment de petite taille. Il peut également être détecté par d'autres couples à une taille plus importante.

2. Evaluation de la qualité des ADNc

L'évaluation de la qualité des ADNc était réalisée en évaluant le niveau d'expression de transcrits de référence *EWSR1* (Ewing sarcoma breakpoint region 1, exprimé à niveau constant et de manière ubiquitaire dans toutes les cellules (83)) et du transcrit *KIAA1549*, par comparaison de l'intensité des bandes après amplification et dépôt sur gel. Ces amplifications étaient réalisées simultanément et dans les mêmes conditions que celles visant à détecter les transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF*.

3. Détection des transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* par RT-PCR conventionnelle : conditions optimales

Différents kits commerciaux (Taq PCR Master Mix[®] de Qiagen et AmpliTaq Gold[®] d'Applied Biosystems), différentes températures d'hybridation, ainsi que différentes concentrations de MgCl₂ ont été testés. Ces différentes conditions sont reprises dans le tableau 2.

	Master Mix [®] (Qiagen)	AmpliTaq Gold [®] (Applied Biosystems)
ADNc	50 ng	50 ng
Tampon (10X)	12,5 µL	2,5 µL
dNTP	Prédéfinie (Master Mix)	2,5 µM
Amorces sens (10pM/ µL)	0,5 µL	0,5 µL
Amorces antisens (10pM/ µL)	0,5 µL	0,5 µL
Taq polymérase (1u/ µL)	Prédéfinie (Master Mix)	0,25 µL
MgCl₂ (25mM/L)	Prédéfinie (Master Mix)	Concentrations testées : 1,5 et 2,5 mM
Eau qsp	25 µL	25 µL

Tableau 2 : conditions des différentes réactions d'amplifications utilisées durant les essais sur tissus congelés.

Au terme de la mise au point, les conditions de PCR optimales retenues pour l'amplification des transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* étaient :

- 2,5 µL de tampon,
- 1,5 µL de MgCl₂ à 25 mM,
- 2,5 µL de dNTP, 0,5 µL d'amorce sens,
- 2,5 µL d'amorce antisens,
- 0,25 µL de Taq polymérase AmpliTaq Gold® (Applied Biosystem),
- 15,25 µL d'eau
- 2 µL d'ADNc.

Pour chaque patient, six mélanges réactionnels (5 couples d'amorces pour la mise en évidence des transcrits de fusion, et un couple pour le transcrit *KIAA1549* de référence) étaient réalisés.

Les amplifications étaient réalisées dans un thermocycleur Veriti III® 96 puits (Applied Biosystems) suivant les paramètres suivants : un cycle de dénaturation de 10 minutes à 95°, suivi de 35 cycles comprenant chacun une étape de dénaturation à 95°C (45 secondes), une étape d'hybridation à une température variée (58 à 64°C) (45 secondes), puis une étape d'extension à 72°C (1min30). Le tout était complété par une extension finale à 72°C pendant 15 minutes.

Les produits de PCR étaient déposés pour chaque amplification en présence d'un marqueur de taille (DNA Molecular Weight Marker XIV®, Roche) sur gel d'agarose à 2%, réalisé manuellement, contenant un marqueur fluorescent (Gel Red® Nucleic Acid Stain, Biotium), avant électrophorèse à 100V.

La révélation était effectuée en utilisant le système d'imagerie de lecture de gel d'électrophorèse Gel Doc™ XR+ System (BIO-RAD), utilisant la fluorescence (mode trans-UV, 302nm).

4. Séquençage des transcrits détectés

Afin de confirmer les points de fusion des transcrits identifiés, les produits d'amplification par PCR des cas positifs ont été séquencés par méthode Sanger.

a) Amorces utilisées pour le séquençage

Les amorces utilisées pour la réaction de séquence des transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* étaient les mêmes que celles utilisées pour l'amplification des transcrits.

Le séquençage des transcrits 16_9 et 17_10 utilisait le fragment amplifié par le couple d'amorces KIAA1549-E16Fb / BRAF-E11R (produits de 228 et 238pb).

Le séquençage des transcrits 16_11 et 15_9 utilisait les fragments amplifiés par le couple d'amorces KIAA1549-E15F / BRAF-E11R (respectivement 376 et 232 pb).

Le séquençage du transcrit 18_10 utilisait le fragment amplifié par le couple d'amorces KIAA1549-E18F / BRAF-E11R (produit de 222 pb).

b) Réaction de séquence

Le séquençage des transcrits de fusion comprenait des étapes de :

- Purification exonucléasique et par phosphatases alcalines (exo-SAP) éliminant respectivement les amorces et les dNTP en excès :
 - Réalisation d'un mélange réactionnel contenant par échantillon 2,5 µL de tampon TSAP, 1 µL de TSAP (à 1 U/µL) et 0,5 µL d'exonucléase I (à 10 U/µL).
 - Distribution de 4 µL de ce mélange réactionnel dans chacun des échantillons à purifier.

- Incubation en utilisant un thermocycleur, avec le programme suivant : 1x37°C 30 minutes, 1x74°C pendant 15 minutes.
- Extension de type terminaison de séquence à l'aide du kit Big Dye® Terminator Sequencing v3.1 cycle kit 5000 RxN (APPLIED BIOSYSTEMS), contenant les dNTP et ddNTP:
 - Réalisation d'un mélange réactionnel contenant par échantillon 13 µL d'eau, 1 µL de matrice (soit 100 à 150ng d'ADN par sens), 1 µL d'amorces (à 5 pmoles/µL), 2 µL de Ready Reaction Mix 2,5x (BigDye®) et 3 µL de tampon Big Dye® Sequencing 5x Buffer.
 - Extension sur thermocycleur avec le programme suivant : 1 minute à 96°C, puis 25 cycles de [10 secondes à 96°C, 5 secondes à 50°C, 4 minutes à 60°C].
- Purification par polymère P-10 du produit d'extension:
 - Réalisation du polymère sur plaque par dépôt à 2 reprises du bio-gel P10 sur plaque dédiée et centrifugation à 3000 rpm pendant 3 minutes.
 - Dépôt de 20 µL de produit d'extension sur le polymère et centrifugation 1 minute à 3000 rpm.
- Détection par migration dans un polymère POP7 dans le séquenceur 48 capillaire 3730 Genetic Analyser® (Applied Biosystems).
- Analyse du fichier de séquence généré en utilisant le logiciel Sequence Scanner v1.0®.

C. Recherche de mutations ponctuelles des gènes *BRAF*, *KRAS*, *H3F3A*, *IDH1* et *IDH2*

1. Analyse par pyroséquençage du codon 600 du gène *BRAF*, des codons 12 et 13 du gène *KRAS* et des codons 27 et 34 du gène *H3F3A*

La réaction de séquence nécessite des étapes préalables de :

- fixation des brins d'ADN biotinylés à des billes de Sépharose-Streptavidine,
- Purification des brins d'ADN à l'aide d'une solution de lavage.
- Hybridation des amorces de pyroséquençage.

La réaction de séquence a lieu par distribution successive des différents nucléotides au sein du pyroséquenceur Pyromark™ (Qiagen), puis analysée par le logiciel couplé au séquenceur Pyromark™ MD (Qiagen). Les données sont disponibles sous forme de pyrogramme. Les amorces utilisées sont consignées dans le tableau 3.

2. Analyse par séquençage « Sanger » de l'exon 4 du gène *IDH1* et de l'exon 4 du gène *IDH2*.

Le séquençage de ces cibles était réalisé suivant le même protocole technique que pour le séquençage des transcrits de fusions *KIAA1549-BRAF*. Les hot-spots de mutation des gènes *IDH1* (codon Arg132) et *IDH2* (codons Arg140 et Arg172) sont tous situés dans leur exon 4. Les amorces utilisées sont consignées dans le tableau 3.

Nom de l'amorce	Brin	Séquence	Longueur	Tm
KRAS2AF*	sens	5'-ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTT-3'	24	62
KRASPy2AR*	antisens	5'-Bio-CTCTATTGTTGGATCATATTCGTC-3'	24	66
KRAS2pyro**	Sens	5'-CTTGTGGTAGTTGGAGCT-3'	18	54
BRAF-Fbis*	Sens	5'-GTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAG-3'	25	64
BRAF-R7*	antisens	5'-Bio-CAGTGGAAAAATAGCCTCAATTCTT-3'	25	64
pyroBRAFFV600E**	Sens	5'-TGATTTTGGTCTAGCTACA-3'	19	52
H3F3A-2F*	Sens	5'-GTGGTAAAGCACCCAGGAAG-3'	20	62
H3F3A-2R*	Antisens	5'-Bio- TGGATACATACAAGAGAGACTTTG-3'	24	66
H3F3A-ex2Pys27**	Sens	5'-CAAAAGCCGCTCGCA-3'	15	48
H3F3A-ex2Pys34**	Antisens	5'-GCGCCCTCTACTGGA-3'	15	50
IDH1F	Sens	5'-GTGGCACGGTCTTCAGAGA-3'	19	60
IDH1Rbis	antisens	5'-GCAAAATCACATTATTGCCAAC-3'	22	60
IDH2F	Sens	5'-CCCATCATCTGCAAAAACAT-3'	20	56
IDH2R	antisens	5'-GGGTGAAGACATTTTGA-3'	17	48

Tableau 3 : amorces utilisées pour le pyroséquençage des gènes *BRAF*, *KRAS*, et *H3F3A*, et pour le séquençage par technique Sanger d'*IDH1* et *IDH2*. * : amorce d'amplification. ** : amorce de pyroséquençage. *Bio* : amorce biotinylée. Tm = température de fusion, en °C, calculées approximativement par la formule suivante : $Tm=(A+T) \times 2 + (G+C) \times 4$.

III. Etude immunohistochimique

A. Réalisation d'un tissu microarray (TMA)

La technique de Tissue MicroArray (TMA), ou puce tissulaire, permet l'analyse rapide et simultanée sur un même support de multiples échantillons tissulaires. Elle regroupe sur un bloc de paraffine accepteur jusqu'à plusieurs centaines d'échantillons prélevés sur des dizaines à des centaines de blocs donneurs.

Deux à trois zones d'intérêt ont été sélectionnées lors de la relecture de l'ensemble des cas. La sélection de plusieurs prélèvements par échantillon tumoral permettait de pallier à l'hétérogénéité tumorale liée à des phénomènes de mosaïque. Les zones étaient choisies en fonction de leur caractère tumoral et de leur représentativité. Pour les tumeurs biphasiques, notamment une partie des astrocytomes pilocytiques, les deux contingents étaient sélectionnés.

Un plan de chaque bloc TMA était réalisé sur support informatique, préalablement à la création d'une matrice à l'aide du logiciel de construction de TMA (EXCILONE TMA Designer® 2).

La construction des blocs TMA était réalisée à l'aide du tissu-arrayer EXCILONE Minicore® 3 équipé d'une aiguille de 1mm de diamètre (figure 15). Des échantillons contrôles de tissu hépatique et cérébral étaient placés sur le bloc afin de l'orienter et de disposer de tissus différents pour l'étude immunohistochimique.



Figure 14 : tissu arrayer EXCILONE Minicore® 3

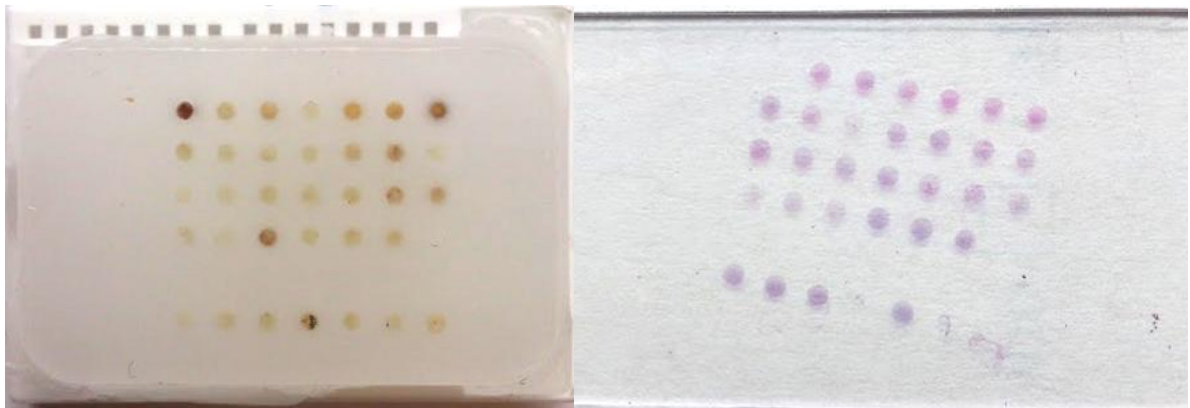


Figure15 : bloc et lame TMA (coloration par HES).

B. Etude immunohistochimique

Des coupes tissulaires de 4µm étaient réalisées au microtome à partir des blocs TMA, et étalées sur lames préparées.

La technique d'immunohistochimie était automatisée (automate Benchmark XT™, VENTANA) pour les anticorps IDH1 muté R132H, BRAF muté V600E et H3K27m3 et suivait des étapes de :

- déparaffinage par action combinée de la chaleur (75°C) et d'une solution détergente (EZ Prep, VENTANA).

- pré-traitement en EDTA pour démasquage antigénique : utilisation du tampon CC1 (VENTANA) basique permettant l'hydrolyse des liaisons covalentes (ponts méthylènes) créées lors de la fixation dans le formol, puis blocage de l'activité peroxydase endogène à l'eau oxygénée.

- incubation avec l'anticorps primaire (tableau 4).

- amplification et révélation : détection des anticorps primaires par anticorps secondaires multimères marqués à la peroxydase (UltraView™ Ventana), puis, en présence d' H₂O₂, hydrolyse par la peroxydase du diaminobenzidine (DAB) formant un précipité brun.

- contre-coloration : utilise l'hématoxyline (Bluing Reagent™ Ventana) pour une coloration bleu pâle des tissus, contrastant avec le précipité brun de la révélation.

Une dernière étape est la déshydratation et le montage des lames.

Les anticorps utilisés, leur dilution, le prétraitement appliqué et la durée d'incubation sont consignés dans le tableau 4.

Anticorps	Clone	Fournisseur	Dilution	Prétraitement	Incubation
IDH1 R132H	H09	Dianova®	1/40	CC1 60 minutes	32 minutes
BRAF V600E	VE1	Spring Bioscience®	1/50	CC1 60 minutes	20 minutes
H3K27m3	polyclonal	Diagenode®	1/750	CC1 60 minutes	32 minutes

Tableau 4: caractéristiques des anticorps utilisés pour l'analyse immunohistochimique

IV. Analyses statistiques

Les performances du test étaient établies après réalisation d'un tableau de contingence, permettant le calcul de la sensibilité, de la spécificité et des valeurs prédictives positives et négatives. Les comparaisons de fréquences d'expression du transcrit *KIAA1549-BRAF* dans les différents groupes étaient réalisées en utilisant un test du Chi² à deux modalités permettant de tester l'indépendance d'un paramètre à la présence d'un transcrit. Quand les effectifs de certains sous-groupes étaient de taille trop petite pour l'application du test du Chi² ($n < 5$), un test exact de Fisher était appliqué.

Les statistiques ont été réalisées grâce à l'outil BiostaTGV de l'institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique UMR S 1136, affilié à l'Université Pierre et Marie Curie, utilisant le logiciel de statistiques R (84).

RESULTATS

I. Caractéristiques de la population de patients atteints d'astrocytome pilocytique

A. Caractéristiques démographiques

Soixante-douze patients étaient atteints d'un astrocytome pilocytique, dont 37 de sexe féminin, et 35 de sexe masculin.

L'âge médian au diagnostic était de 10 ans (moyenne de 14,1 ans). La répartition de l'âge de diagnostic est représentée en figure 16. Cinquante-quatre cas (75%) étaient des formes dites pédiatriques (<20 ans au diagnostic).

Quarante-neuf patients ont été diagnostiqués à Lille, et y sont suivis. Les autres étaient suivis à Lyon, Marseille, Toulouse, Paris, Bordeaux et Nice.

Quatre patients (5%) étaient atteints d'une neurofibromatose de type 1.

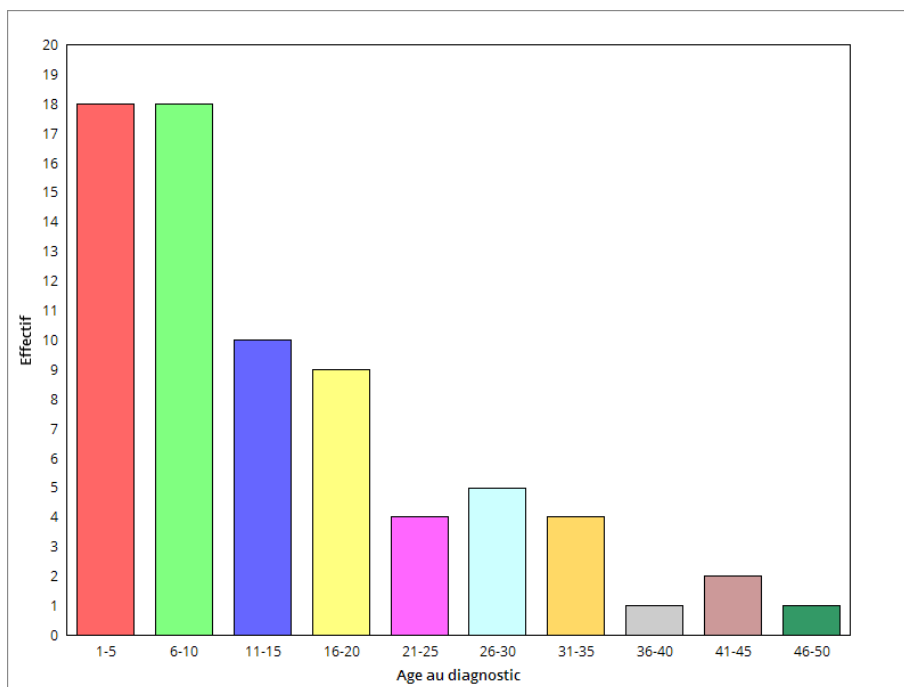


Figure 16 : Répartition de l'âge au diagnostic des astrocytomes pilocytiques, par tranches d'âge.

B. Circonstances de découverte

Les données cliniques incluant les circonstances de découverte, le traitement utilisé et le suivi étaient disponibles pour 47 patients atteints d'astrocytome pilocytique.

Vingt et un patients présentaient au diagnostic des symptômes d'hypertension intracrânienne (association minimale de céphalées et vomissements), 18 des signes neurologiques localisateurs, trois des céphalées isolées, trois des crises convulsives et trois tumeurs étaient de découverte « fortuite » lors d'examen d'imagerie réalisés hors suspicion clinique (dont deux dans le cadre d'un bilan systématique de NF1).

C. Localisation des astrocytomes pilocytiques

Quarante-sept tumeurs étaient localisées en fosse postérieure (65%), et 25 tumeurs étaient de localisation supratentorielle (35%), dont neuf tumeurs de la région hypothalamo-chiasmatique ou des voies optiques.

La fréquence des localisations infratentorielles était similaire dans les groupes pédiatriques et adultes, représentant 67% des cas.

D. Caractéristiques histopathologiques

La relecture des 49 cas lillois a permis de confirmer le diagnostic initial dans tous les cas. 31 cas (63%) avaient une architecture biphasique. 24 cas (49%) comportaient des corps granuleux éosinophiles, 28 cas (57%) des fibres de Rosenthal, 29 cas (59%) comportaient au moins un secteur microkystique, 41 cas (84%) des vaisseaux glomérulés et 25 cas (51%) comportaient un contingent de type oligo-like, même minoritaire. Un cas comportait des zones de nécrose tumorale, et aucun des cas ne présentait de critère d'anaplasie. Seize cas étaient des formes « typiques », associant une vascularisation gloméruloïde à une architecture biphasique avec secteurs fibrillaires astrocytaires contenant des fibres de Rosenthal et secteurs microkystiques avec corps granuleux éosinophiles. Douze cas ne présentaient ni architecture biphasique, ni fibre de Rosenthal, ni corps granuleux éosinophiles et étaient considérés comme astrocytomes pilocytiques sans critère typique. Trois cas ne répondaient à aucun des critères sélectionnés et correspondaient à des tumeurs monophasiques fibrillaires avec cellules polarisées. Les caractéristiques histopathologiques des 72 cas sont disponibles en annexe 2.

II. Recherche des transcrits de fusions *KIAA1549-BRAF*

A. Performances diagnostiques du test

Au total, des transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* ont été identifiés dans les échantillons tumoraux de 46 des 135 patients testés. Les 46 cas positifs étaient considérés comme astrocytomes pilocytiques lors de l'analyse histopathologique, soit une valeur prédictive positive de 100%, et une valeur prédictive négative de 70,5%. La sensibilité du test dans la population testée était de 62% (IC à 95% [0.52 ; 0.74], pour une spécificité de 100% (IC 95% [0.94 ; 1])).

Les figures 17 et 18 illustrent l'identification d'un transcrit de fusion 16_9.

B. Types de transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* identifiés

Quatre transcrits différents ont été identifiés. Le transcrit de fusion *KIAA1549-BRAF* le plus fréquent était le transcrit 16_9 (n=32), représentant 70% des transcrits de fusion. Par ordre de fréquence, les autres transcrits retrouvés étaient les transcrits 15_9 (15%), 16_11 (11%) et 15_11 (4%). La fréquence des différents transcrits était répartie de manière similaire dans les différents sous-groupes.

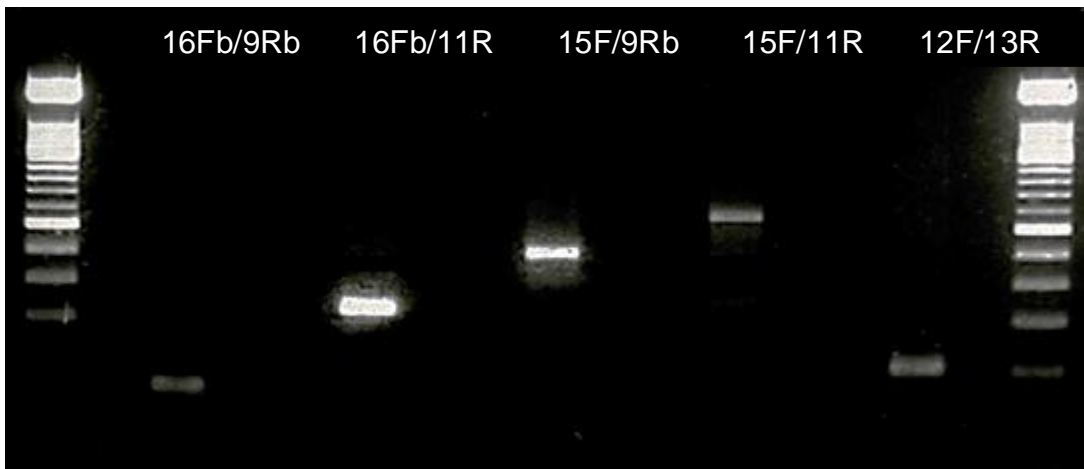


Figure 17 : Identification d'un transcrite de fusion *KIAA1549-BRAF* de type 16_9, détecté par les quatre couples d'amorces 16Fb/9Rb, 16Fb/11R, 15F/11R, 15F/9Rb aux tailles attendues. Témoin de réaction 12F/13R à droite.

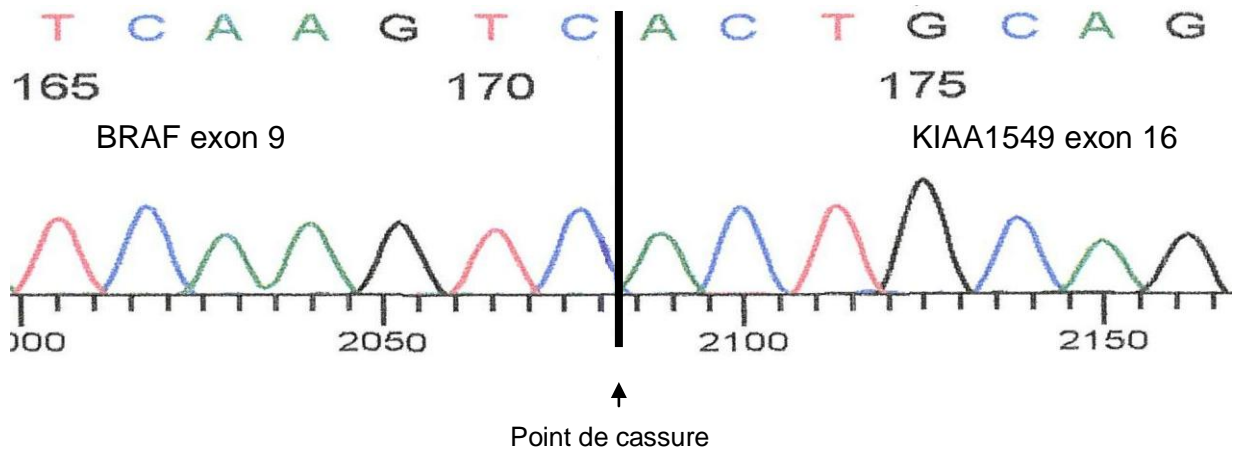


Figure 18: séquence d'un transcrite de fusion de type 16_9, brin anti-sens (amorce BRAf-11R). Le point de cassure correspond à la jonction exon-exon.

C. Transcrits de fusion, âge et localisation tumorale

Il a été retrouvé un transcrit de fusion *KIAA1549-BRAF* dans 46 des 72 astrocytomes pilocytiques, soit 64% des cas. Les effectifs et pourcentages de mutation dans les différents groupes sont consignés dans le tableau 4. Les transcrits étaient plus fréquents au sein des tumeurs de la fosse postérieure (70% des cas) que dans les tumeurs supratentorielles (52% des cas) ($p=0,08$). Les formes pédiatriques étaient également plus fréquemment associées à un transcrit de fusion que les formes de l'adulte (respectivement 69 et 50%, $p=0,15$). Ainsi, le taux de mutation atteignait 75% chez l'enfant et pour des tumeurs localisées en fosse postérieure, alors qu'il n'était que de 33% chez l'adulte, en localisation supratentorielle.

La localisation de la tumeur des 72 patients atteints d'astrocytome pilocytique est disponible en annexe 2.

Tableau 5 : Présence de transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF*, et détail du type de transcrit, dans les différents sous-groupes d'astrocytomes pilocytiques répartis en fonction de l'âge de diagnostic et de la localisation de la tumeur.

	Total (n)	%	transcrits + (n)	%	16_9 (n)	%	16_11 (n)	%	15_9 (n)	%	15_11 (n)	%
Astrocytome pilocytiques	72		46	64%	32	70%	5	11%	7	15%	2	4%
AP en fosse postérieure	48	67%	34	71%	25	74%	4	12%	4	12%	1	3%
AP supratentoriels	24	33%	12	50%	7	58%	1	8%	3	25%	1	8%
AP pédiatriques (<19 ans)	54	75%	37	69%	25	68%	5	14%	5	14%	2	5%
AP pédiatriques en fosse postérieure	36	67%	27	75%	19	70%	4	15%	3	11%	1	4%
AP pédiatriques supratentoriels	18	33%	10	56%	6	60%	1	10%	2	20%	1	10%
AP adultes	18	25%	9	50%	7	78%	0	0%	2	22%	0	0%
AP adultes en fosse postérieure	12	67%	7	58%	6	86%	0	0%	1	14%	0	0%
AP adultes supratentoriels	6	33%	2	33%	1	50%		0%	1	50%		0%
AP homme	35	49%	23	66%	17	74%	1	4%	3	13%	2	9%
AP femme	37	51%	23	62%	15	65%	4	17%	4	17%	0	0%

AP : Astrocytome pilocytique

D. Transcrits de fusion et caractéristiques histopathologiques

23 des 31 cas (74%) d'architecture biphasique comportaient un transcrit de fusion *KIAA1549-BRAF*, contre 8 des 18 cas (44%) monophasiques ($p = 0,037$).

19 des 25 (76%) cas d'astrocytomes pilocytiques qui présentaient un contingent oligo-like possédaient un transcrit de fusion *KIAA1549-BRAF*, alors qu'un transcrit était identifié dans 60% des cas ne comportant pas un tel contingent ($p = 0,059$).

12 des 16 cas (75%) « typiques » associant une vascularisation gloméruloïde à une architecture biphasique avec secteurs fibrillaires astrocytaires contenant des fibres de Rosenthal, secteurs microkystiques et corps granuleux éosinophiles comportaient un transcrit de fusion. A l'inverse les cas ne présentant ni architecture biphasique, ni fibre de Rosenthal, ni corps granuleux éosinophiles, comportaient un transcrit dans 6 des 12 cas (50%). La différence entre ces deux groupes n'était pas significative ($p = 0,24$).

La présence de transcrit de fusion en fonction des différentes caractéristiques histopathologiques est consignée dans le tableau 6.

Tableau 6 : Présence de transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF*, et détail du type de transcrit, en fonction des différentes caractéristiques histopathologiques des astrocytomes pilocytiques.

	Total (n)	%	transcrits + (n)	%	transcrits - (n)	%	16_9 (n)	%	16_11 (n)	%	15_9 (n)	%	15_11 (n)	%
Astrocytome pilocytaire	49		31	63%	18	37%	22	71%	4	13%	3	10%	2	6%
Architecture biphasique	31	63%	23	74%	8	26%	19	83%	2	9%	1	4%	1	4%
Fibres de Rosenthal	28	57%	19	68%	9	32%	15	79%	2	11%	1	5%	1	5%
Corps granuleux éosinophiles	24	49%	17	71%	7	29%	14	82%	2	12%	0	0%	1	6%
Contingent oligodendrocyte-like	25	51%	19	76%	6	24%	14	74%	1	5%	2	11%	2	11%
Contingent microkystique	29	59%	19	66%	10	34%	16	84%	2	11%	0	0%	1	5%
Vaisseaux glomérulés	41	84%	28	68%	13	32%	15	54%	2	7%	0	0%	1	4%
Nécrose	1	2%	1		0		0		0	0%	0		1	
Anaplasie	0	0%												
Aspect "typique"	16	33%	12	75%	4	25%	9	75%	2	17%	0	0%	1	8%
Aucun des critères "typiques"	12	24%	6	50%	6	50%	1	17%	2	33%	2	33%	1	17%

III. Recherche des anomalies moléculaires des gènes *BRAF* et *KRAS*

A. Recherche de mutations ponctuelles du gène *BRAF* par pyroséquençage du codon 600.

La recherche de mutation ponctuelle du gène *BRAF* a pu être réalisée sur 50 des 74 astrocytomes pilocytiques. Les 24 cas non réalisés l'étaient par absence de matériel disponible (blocs extérieurs ou matériel épuisé). Tous les cas testés étaient interprétables. 4 cas extérieurs ont été testés dans les laboratoires de leur ville d'origine, au moment du diagnostic.

Aucune mutation ponctuelle touchant le codon 600 du gène *BRAF* n'a été mise en évidence.

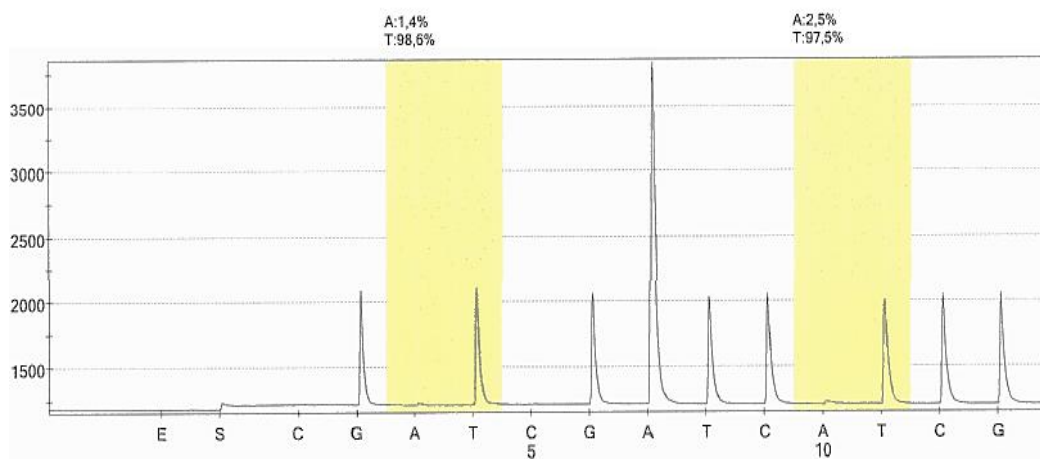


Figure 19 : Pyrogramme d'un gène *BRAF* sauvage pour le codon 600

B. Recherche de mutations ponctuelles du gène KRAS par pyroséquençage des codons 12 et 13

La recherche de mutation ponctuelle du gène *KRAS* a également été réalisée sur 46 cas, la technique étant réalisée pour les cas lillois simultanément et dans les mêmes conditions que la recherche de mutation du gène *BRAF*.

Aucune mutation ponctuelle touchant les codons 12 et 13 du gène *KRAS* n'a été mise en évidence.

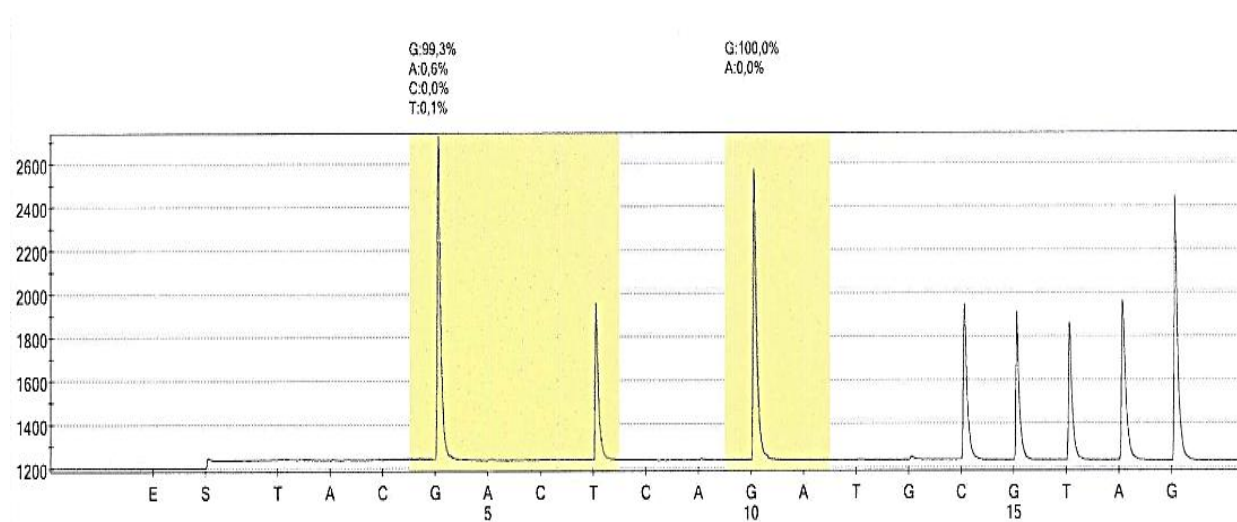


Figure 20 : Pyrogramme d'un gène *KRAS* sauvage pour les codons 12 et 13.

IV. Analyse immunohistochimique

A. Tissue microarray

La construction du TMA a permis la réalisation de 4 blocs, soit un total de 38 astrocytomes pilocytiques, avec 1 à 3 prélèvements par cas. Un contrôle morphologique sur coloration par HES de chaque bloc a été réalisé. Les lames d'immunohistochimie étaient lues de manière qualitative par un Pathologiste.

B. Anticorps anti IDH1 muté R132H

L'analyse immunohistochimique avec l'anticorps anti-IDH1 muté R132H a été réalisée sur un total de 47 cas, dont 38 sur TMA et 9 lors du diagnostic initial. Aucun cas n'était immunoréactif pour cet anticorps (figure 21).

C. Anticorps anti BRAF muté V600E

L'analyse immunohistochimique avec l'anticorps anti-BRAF muté V600E (clone VE1) a été réalisée sur les 38 cas du TMA.

Aucun cas n'était immunoréactif pour cet anticorps (figure 21).

L'ensemble des cas ayant été testés en immunohistochimie avec l'anticorps anti-BRAF muté V600E ont bénéficié de la recherche de mutations ponctuelles du codon 600 du gène *BRAF*, avec une concordance de 100%.

D. Anticorps anti-H3K27m3

L'analyse immunohistochimique réalisée avec l'anticorps anti-H3K27m3 a été réalisée sur 40 cas, dont les 38 cas du TMA et 2 cas lors du diagnostic initial. L'ensemble des cas présentait une conservation de l'immunoréactivité nucléaire normale (figure 21).

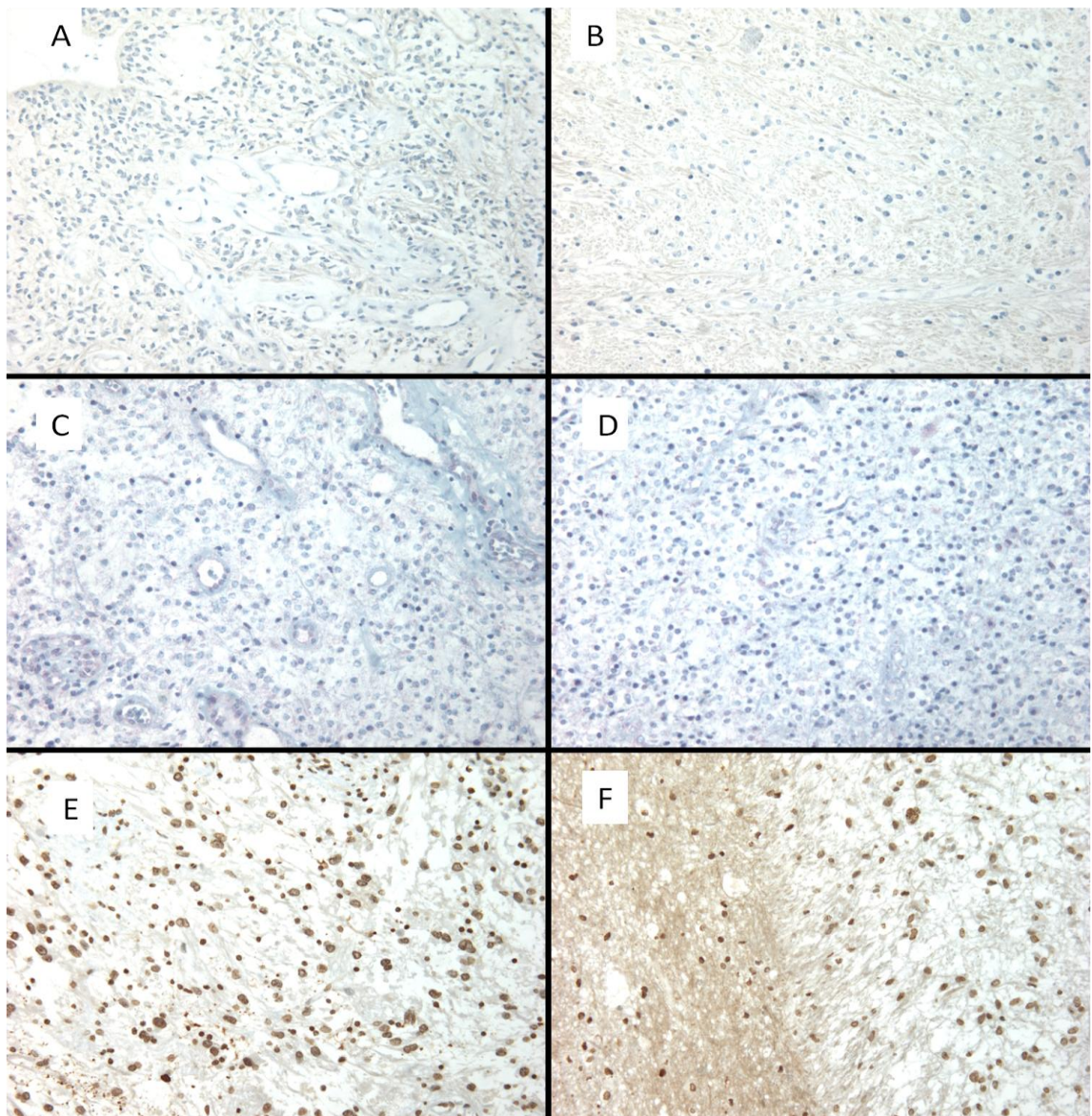


Figure 21 : analyse immunohistochimique réalisée sur TMA : A et B : absence d'immunoreactivité pour l'anticorps anti IDH1-mutéR132H (x200). C et D : absence d'immunoréactivité pour l'anticorps anti BRAF V600E (x200). E et F : conservation de l'immunoréactivité nucléaire normale de l'anticorps anti-H3K27me3 (x200).

V. Caractérisation moléculaire des astrocytomes pilocytiques

Au total, la seule anomalie moléculaire retrouvée dans les échantillons tumoraux issus de la population de 72 patients atteints d'astrocytome pilocytique était la présence de transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF*. Il n'a été retrouvé aucune mutation ponctuelle des gènes *BRAF* et *KRAS* sur les codons les plus fréquemment mutés. Aucun patient ne présentait plus d'une anomalie moléculaire recherchée. Aucune anomalie n'était détectée chez les quatre patients atteints de neurofibromatose de type 1. Au total, dans 32% des cas, aucune anomalie moléculaire n'était retrouvée (figure 22).

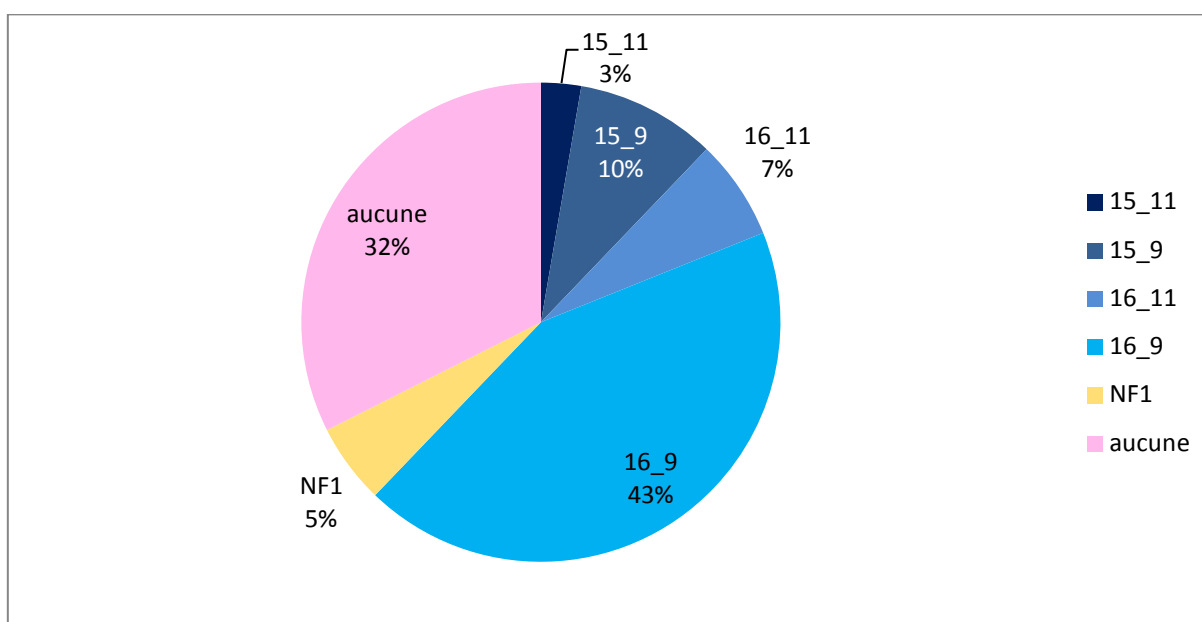


Figure 22 : représentation graphique des différentes anomalies moléculaires au sein des astrocytomes pilocytiques testés.

Les cas localisés à la fosse postérieure présentaient plus fréquemment un transcrit de fusion *KIAA1549-BRAF* que les cas de localisation supratentorielle (figure 23). Les cas liés à la NF1 étaient majoritairement (3 cas sur 4) de localisation supratentorielle (hors chiasma et voies optiques).

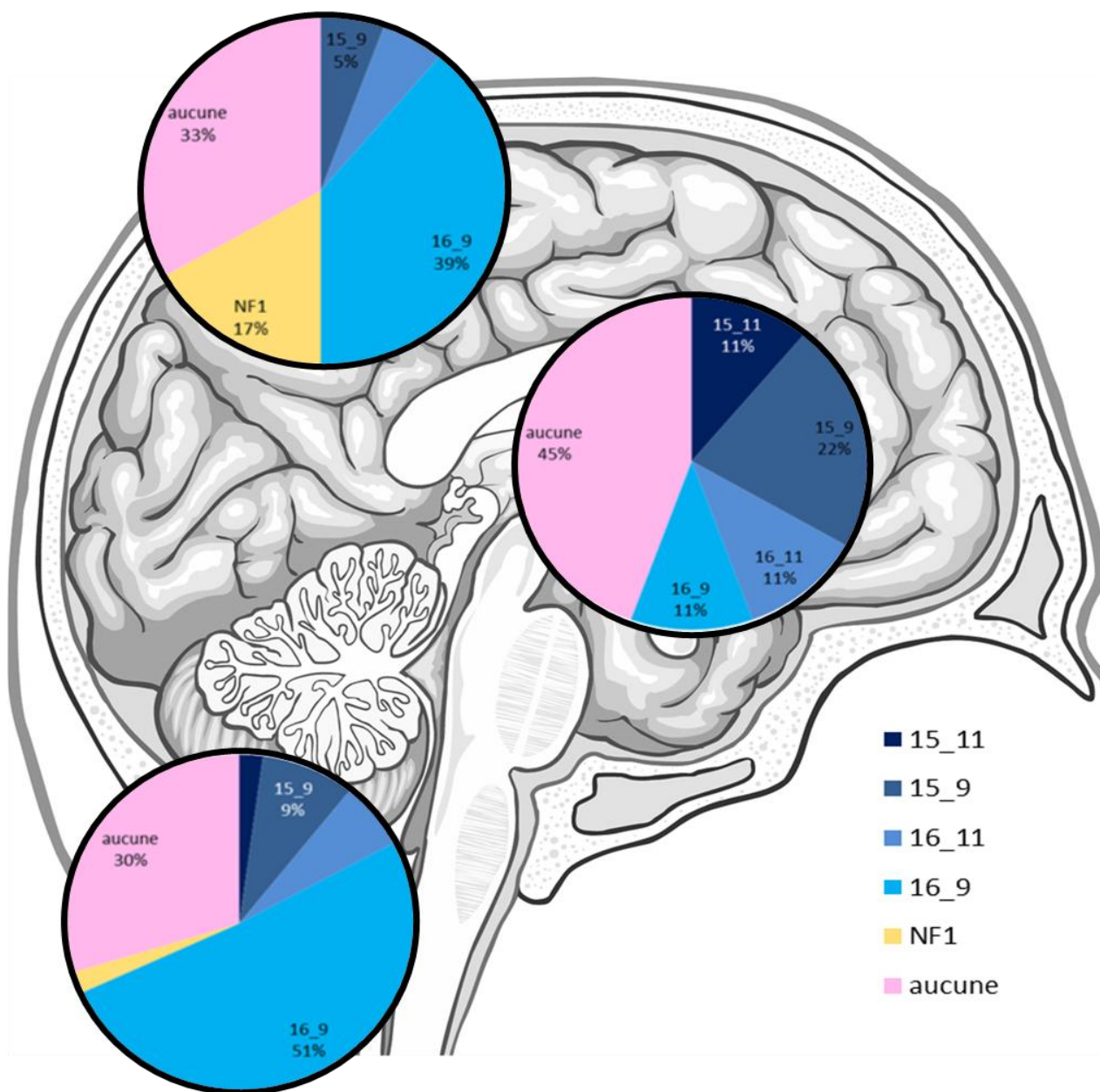


Figure 23 : représentation graphique de la fréquence des anomalies moléculaires des astrocytomes pilocytiques, en fonction de leur localisation (fosse postérieure, supratentorielle (hors voies optiques et chiasma) et hypothalamo-chiasmatique et voies optiques). (fond d'image d'après (85))

VI. Suivi et évolution

Les données de suivi et d'évolution étaient disponibles pour 47 cas. La durée moyenne de suivi était de 47,6 mois (durée médiane de suivi 27 mois) après le diagnostic anatomopathologique initial.

14 patients (29%) ont présenté une évolution locale. Pour l'ensemble de ces patients, il s'agissait de l'évolution d'un reliquat tumoral post-opératoire, liée à des localisations pour lesquelles l'exérèse chirurgicale est difficile, ou à un caractère infiltrant de la lésion. Quatre des 9 cas de localisation hypothalamo-chiasmatique ou des voies optiques ont récidivé.

La progression du reliquat survenait au plus tôt 4 mois après le diagnostic initial, avec une médiane à 22 mois. 3 cas ont progressé dans la première année de suivi, 4 dans la deuxième année et deux dans la troisième.

Un patient est décédé de l'apparition d'un ostéosarcome vertébral. Il avait bénéficié d'un traitement par radiothérapie suite à l'évolution multirécidivante de l'astrocytome pilocytique de localisation médullaire. Le décès est survenu un peu plus de 9 ans après la première exérèse chirurgicale, et 6 ans après la radiothérapie.

Un transcrite de fusion *KIAA1549-BRAF* a été identifié dans les tissus tumoraux de 9 patients parmi les 14 cas récidivants, soit une fréquence similaire au reste de la population (64%).

DISCUSSION

I. Caractéristiques de la population étudiée

Avec un âge médian de 10 ans et un sex-ratio proche de 1, les caractéristiques démographiques de la population d'astrocytomes pilocytiques étaient proches des données épidémiologiques (6,7,14).

De la même façon, avec 67% des cas localisés en infratentorial, la répartition de la localisation des tumeurs pédiatriques était concordante avec les données de la littérature, qui estime ces formes à environ 2/3 des cas (13,14,86). Chez l'adulte en revanche, notre série comportait également 67% des cas en fosse postérieure, taux supérieur aux données habituelles sur les astrocytome pilocytiques de l'adulte, avec environ 50% de formes supratentorielles. Le faible effectif d'astrocytomes pilocytiques de l'adulte (n=18), et donc un intervalle de confiance large sur cette fréquence (IC 95% [0,45 ; 0.88]) peut expliquer cette différence, potentiellement due au hasard.

II. Performances globales du test

Les performances diagnostiques du test, particulièrement l'absence de faux positif responsable d'une spécificité et une valeur prédictive positive de 100%, confirment son intérêt dans la confirmation d'un diagnostic préétabli, visant à augmenter sa force. Il faut cependant prendre en compte les risques de biais liés à la sélection initiale de patients pour la mise au point, pouvant surestimer les

performances du test. Ces patients représentent 28 cas sur les 135 patients testés, dont 20 cas d'astrocytomes pilocytiques et 8 cas de glioblastomes.

Les paramètres de performance diagnostique du test sont également à relativiser au vu de la population étudiée, et d'un fort risque de biais de vérification, l'examen de référence (« gold standard ») utilisé étant le diagnostic posé par le Pathologiste, après relecture par le GENOP si nécessaire. Il s'est avéré que dans certains cas, même si la relecture des lames par le GENOP était réalisée à l'aveugle des résultats de biologie moléculaire, le diagnostic finalement retenu incorporait les caractéristiques moléculaires de la tumeur, y compris la présence de transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF*, induisant un risque important de biais d'incorporation des résultats, pouvant surestimer les performances du test.

La recherche de ces transcrits de fusion n'était également pas réalisée de manière systématique pour tous les astrocytomes pilocytiques diagnostiqués, en particulier pour les cas testés issus des centres extérieurs et du GENOP, qui effectuaient essentiellement la demande de recherche des transcrits en situation de difficulté diagnostique, pouvant induire un biais de sélection. La fréquence des transcrits de fusion identifiés dans les astrocytomes pilocytiques de la population lilloise (63%) était néanmoins très proche de celle des cas extérieurs (66%).

III. Fréquence de détection des transcrits de fusion et utilité du test dans les différents sous-groupes

Un transcrit de fusion *KIAA1549-BRAF* était détecté dans notre série dans 64% des cas d'astrocytome pilocytique, et 69% chez l'enfant. En avril 2008, Sievert et al. publiaient la découverte de ces transcrits de fusion, identifiés dans 77% de leur série de 20 astrocytomes pilocytiques pédiatriques, après la détection de gains chromosomiques partiels (en SNP-array) sur le locus 7q34 (87). En novembre 2008, Jones et al. ont publié une série similaire, identifiant un transcrit *KIAA1549-BRAF* dans 66% des astrocytomes pilocytiques (33).

Le transcrit le plus fréquemment retrouvé était dans notre série celui impliquant les exons 1 à 16 de *KIAA1549* et 9 à 18 de *BRAF* (transcrit 16_9) (70% des transcrits identifiés). Suivaient par ordre de fréquence les transcrits 15_9 (15%), 16_11 (11%) et 15_11 (4%). Ces fréquences sont proches de celles retrouvées dans la littérature (68% de transcrits 16_9 dans l'étude de T. Forsheew et al, 69% dans l'étude de Jones et al. 69%), confirmant la large majorité de transcrits 16_9 (33,88).

La fréquence de ces transcrits semble également corrélée à la localisation des tumeurs, Forsheew et al. identifiaient début 2009, 90% de transcrits *KIAA1549-BRAF* en fosse postérieure (série pédiatrique) (88), et K.Jacob & al. (2009), identifiaient 80% de transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* dans cette même population (42). C'est dans cette population pédiatrique, particulièrement en fosse postérieure, que la sensibilité du test est la plus élevée. Dans notre série, si l'on considère la même

population, un transcrit était retrouvé dans 75% des cas. Le taux est légèrement plus faible que dans ces publications de référence, pouvant s'expliquer par le hasard sur une population de petite taille mais aussi par le mode d'inclusion des patients, et notamment la possibilité du Pathologiste d'utiliser le test uniquement en situation de diagnostic difficile. Or nos données semblent indiquer la possibilité d'une fréquence plus élevée du transcrit dans les formes de morphologie « typique » que dans les formes sans critère typique (tendance statistiquement non significative pour un risque α à 5%).

A notre connaissance, aucune étude n'a mis en relation la présence de transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* et les différentes caractéristiques histopathologiques. Notre série retrouve une fréquence significativement plus élevée dans les astrocytomes pilocytiques biphasiques que dans les formes monophasiques et une tendance à la présence d'un transcrit de fusion pour les formes à contingent oligo-like. Cette observation suggère l'hypothèse qu'une partie de ces tumeurs monophasiques ne sont pas des astrocytomes pilocytiques. Comme en témoigne le consensus de Haarlem, cette intégration des données moléculaires dans le diagnostic des tumeurs du système nerveux central est au centre des discussions actuelles sur la classification des gliomes, amenant une remise en cause de certaines entités nosologiques (2). D.Reuss et al. ont ainsi récemment reclassé 405 cas de gliome diffus de l'adulte en intégrant les mutations d'ATRX et IDH1 et les remaniements chromosomiques en tant que marqueurs diagnostics (89). 152 astrocytomes, 61 oligodendrogliomes, 63 oligoastrocytomes et 129 glioblastomes diagnostiqués selon la classification OMS ont ainsi été reclassés en 155 astrocytomes, 100 oligodendrogliomes et 150 glioblastomes.

Une autre hypothèse expliquant cette différence entre les formes typiques et atypiques pourrait être l'association entre la présence du transcrite et un phénotype particulier, proche des caractéristiques histopathologiques habituellement associées à l'astrocytome pilocytique. Les études de Kaul et al. sur l'effet oncogénique de la protéine de fusion ont révélé que sa présence avait pour conséquence une prolifération de cellules neurales cérébelleuses, mais pas des astrocytes matures (53). Cette étude montrait également que l'injection de cellules souches neurales cérébelleuses exprimant le transcrite de fusion dans le système nerveux central de souris était suffisante pour induire une lésion gliale, sans pour autant préjuger d'un phénotype particulier.

Chez l'adulte, Hasselblatt & al. retrouvaient en 2011 une fréquence du transcrite *KIAA1549-BRAF* de 51%, avec une fréquence plus élevée en fosse postérieure (67%) qu'en supratentorial (29%) (111). Malgré des effectifs faibles chez l'adulte, la fréquence des transcrits dans ces sous-groupes était proche de ces chiffres dans notre cohorte. Ainsi, chez l'adulte, la sensibilité de l'outil diagnostique est diminuée, affaiblissant l'utilité du test dans cette population.

IV. Spécificité du transcrit *KIAA1549-BRAF* dans l'astrocytome pilocytique

En l'absence de faux positif, la sensibilité de la détection de transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* dans les astrocytomes pilocytiques était dans notre série de 100%. Sur le plan méthodologique, le biais d'incorporation du test remet en question ce chiffre élevé, puisqu'une partie des diagnostics finaux ont été modifiés par le résultat de la recherche de transcrits de fusion.

Les données de la littérature disponibles lors de la mise au point de la technique en 2012 mettaient en avant la très forte spécificité de la présence de transcrits *KIAA1549-BRAF* pour le diagnostic des astrocytomes pilocytiques. Les premières publications retrouvaient ainsi une spécificité proche de 100%. Jones et al. en 2008 ne retrouvaient aucun transcrit chez les patients atteints de gliomes de haut grade (184 cas de glioblastomes et 60 cas d'astrocytomes anaplasiques), et 6 transcrits parmi 118 cas de gliomes de grade II (oligodendrogliomes, astrocytomes, oligoastrocytomes) pour lesquels le diagnostic de lésion de grade II était remis en question par l'absence totale de récurrence à long terme (suivi supérieur à 12 ans pour tous les cas) (33). Forshever et al. en 2009 identifiaient un transcrit de fusion dans le tissu tumoral de 3 patients atteints de gliome de bas grade hors astrocytomes pilocytiques (au sein d'une population de 18 patients), dont deux cas d'astrocytome pilomyxoïde, tumeur apparentée à l'astrocytome pilocytique, et un cas d'astrocytome diffus, dont le diagnostic anatomopathologique était discuté (88). En novembre 2011, l'équipe de Tian et al., utilisant une technique de RT-PCR en temps réel, ne retrouvait aucun transcrit dans 30 tumeurs du système nerveux central hors astrocytome pilocytique (82).

La spécificité de ces transcrits de fusion a été remise en question fin 2012, avec la publication par M.Badiali et al. de transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* dans 17 cas parmi 180 gliomes diffus de l'adulte, dont 11 cas avec également mutation d'IDH1, et 6 une co-délétion 1p/19q. Quinze de ces 17 gliomes diffus étaient des oligodendrogliomes (90). De manière intéressante, dans notre série, les astrocytomes pilocytiques comportant un contingent de type oligodendrogliome étaient plus fréquemment associés à un transcrit de fusion *KIAA1549-BRAF*.

Antonelli et al., en 2015, retrouvaient un transcrit *KIAA1549-BRAF* dans 64% des cas d'astrocytomes pilocytiques, mais également dans 14% des tumeurs non pilocytiques (1 glioblastome, 1 astrocytome anaplasique, 1 xanthoastrocytome pléomorphe anaplasique, 1 épendymome et 1 tumeur rhabdoïde térétoïde atypique) (91).

Dans notre série, il n'était mis en évidence de transcrit dans aucune tumeur non pilocytique de bas ou de haut grade.

V. Adéquation de la méthode utilisée dans notre étude pour la détection des transcrits de fusion

Outre la RT-PCR conventionnelle utilisée dans ce travail, d'autres techniques de détection des remaniements impliquant le gène *BRAF* auraient pu être utilisées.

En premier lieu, la RT-PCR en temps réel (ou PCR quantitative, qPCR) est une technique largement utilisée pour la détection de transcrits de fusion en situation diagnostique en pathologie osseuse et des tissus mous (fibrosarcome congénital et transcrit *ETV6-NTRK3*, liposarcome myxoïde impliquant le gène *CHOP*, rhabdomyosarcome alvéolaire impliquant *FKHR*, sarcome d'Ewing impliquant *EWSR1*, sarcome fibromyxoïde impliquant *FUS*, synoviosarcome impliquant *SYT*). Elle repose sur un principe proche de la RT-PCR conventionnelle. Cette technique a été utilisée par l'équipe de Tian et al. (novembre 2012), sur tissus inclus en paraffine. La fréquence de transcrit *KIAA15-BRAF* était élevée (87,5% des cas d'astrocytomes pilocytiques dans une population pédiatrique), légèrement supérieure aux autres études, et à notre série (82). Dans leur série, la concordance entre la qRT-PCR et la détection de réarrangements de la région 7q34 (par CGH et FISH) était de 95%. Cette technique est séduisante en vue d'une utilisation en routine, le coût et temps technique sont comparables à la RT-PCR conventionnelle, mais la mise au point est difficile, comme en témoignent les essais infructueux que nous avons réalisés en 2012 dans l'optique d'utiliser cette méthode de caractérisation des transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF*.

L'hybridation *in situ* avec révélation en fluorescence (FISH), réalisée sur coupes en paraffine, a l'avantage d'associer le contrôle morphologique et la détection d'un réarrangement. Korshunov et al. ont identifié par FISH un transcrite de fusion dans 70% des cas d'astrocytomes pilocytiques. Les gènes partenaires *KIAA1549* et *BRAF* sont localisés sur le même locus chromosomique, en 7q34, et sont distants d'environ 1,9Mb. Les sondes de fusion aussi bien que les sondes de type break-apart posent le problème de la difficulté d'interprétation liée au mécanisme de duplication en tandem, et à la concertation des cibles sur une région d'un peu moins de 2Mb. Récemment, d'autres mécanismes que la duplication en tandem pour la formation de ces transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* ont été décrits, notamment des délétions interstitielles multiples responsables de la fusion, rendant la FISH inapplicable dans ces situations (47). L'équipe de Tian et al. a également discuté la possibilité d'une hétérogénéité tumorale pour la présence de transcrits de fusion, diminuant le nombre de noyaux présentant l'anomalie (82). Dans leur série, deux cas positifs en qRT-PCR étaient ainsi interprétés en FISH comme négatif car porteurs de l'anomalie sur 8 et 11% des noyaux, alors que le seuil de positivité était fixé à 15%.

L'analyse chromosomique sur puces à ADN (ACPA, ou CGH-array) et leur variante SNP-array ciblant des polymorphismes nucléotidiques, permettent de visualiser les réarrangements chromosomiques induisant des gènes de fusion impliquant *BRAF*, quel que soit le gène partenaire, à condition que le réarrangement soit déséquilibré. En revanche, une délétion sur un chromosome équilibré par un gain sur son chromosome homologue, ne peut être détectée (47,92). Ainsi, les fusions de *BRAF* impliquant *RNF130*, *CLCN6*, *GNA11*, *FXR1* et *MACF1* ne peuvent

pas être identifiées, car elles ne sont pas associées à une anomalie du nombre de copies (48,50). Cette technique a été utilisée pour dépister les anomalies situées en 7q34 dans les trois articles de référence, ayant identifié les transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* en 2008 (33,87,88). L'identification d'un gain chromosomique en 7q34 ne suffit pas au diagnostic de transcrit de fusion, qui nécessite une technique complémentaire pour caractériser l'anomalie moléculaire. Ces techniques sur puce à ADN, particulièrement celles de haute résolution, sont coûteuses et nécessitent une quantité importante de matériel, de préférence congelé. Elles n'étaient pas utilisées en 2012 dans le laboratoire d'Oncologie Moléculaire.

Les dernières techniques, plus puissantes, utilisent les technologies de séquençage à haut débit (NGS, Next Generation Sequencing), et leurs variantes transcriptomique (RNA-seq) et génomique (WHS Whole Genome Sequencing). Elles permettent l'identification en une seule analyse de l'ensemble des anomalies moléculaires, aussi bien les mutations ponctuelles, que des remaniements plus complexes, y compris les gènes ou transcrits de fusion. La principale difficulté liée à cette technique est le très important volume de données générées par ces séquenceurs de nouvelle génération, devant être analysées. Un tel volume exige une expertise et des moyens techniques, bioinformatiques et biologiques avancés. Ces techniques pourraient être le futur proche des analyses de biologie moléculaire. Elles ont récemment permis la découverte de nouveaux transcrits de fusion (48,50). Dans le cas particulier du transcrit *KIAA1549-BRAF*, son faible niveau d'expression est toutefois à prendre en compte et le transcrit pourrait dans certaines situations ne pas être détecté avec ces techniques (si la profondeur de couverture de l'amplicon n'est pas suffisante) (10).

A l'heure actuelle, le coût en réactifs de ces techniques est la principale limitation à leur utilisation à grande échelle, une analyse RNAseq coûte environ 1000€ par échantillon, une analyse de SNP-array (Oncoscan® AFFYMETRIX) 500€, la CGH-array de plus basse résolution environ 150€, à comparer aux 20€ par échantillon pour la RT-PCR conventionnelle (11€ pour la rétrotranscription + 1€ par puits de PCR) et à la qRT-PCR (11€ pour la rétrotranscription + 3€ par puits de PCR).

VI. Absence d'autre altération moléculaire

A. Activation et altérations de la voie MAPK

La seule altération conduisant à une activation de la voie MAPK retrouvée dans nos conditions est la présence de transcrits *KIAA1549-BRAF*. Quatre astrocytomes pilocytiques entraînent dans le cadre d'une neurofibromatose de type 1. Ces 4 tumeurs n'exprimaient pas de transcrit. A notre connaissance, il n'a jamais été rapporté d'expression d'un transcrit de fusion *KIAA1549-BRAF* dans la tumeur d'un patient atteint de NF1. Dans les cas d'astrocytomes pilocytiques liés à la NF1 et comme pour la majorité des tumeurs liées à cette pathologie, Gutmann et al. ont confirmé que le mécanisme oncogénique d'activation de la voie MAPK (et de la voie mTOR) est lié à l'inactivation de la neurofibromin par inactivation biallélique du gène (93). Nous n'avons pas recherché en biologie moléculaire cette inactivation biallélique du gène, mais on peut suspecter que chez les quatre patients atteints de NF1, cette altération moléculaire active la voie MAPK. Aucune des tumeurs de

localisation hypothalamo-chiasmatique ou des voies optiques de notre série n'était associée à une neurofibromatose de type 1, alors qu'environ 75% des gliomes associés à la NF1 surviennent dans ces localisations (94). Il est possible qu'une partie des quatre cas sans anomalie moléculaire identifiée dans cette localisation entre dans le cadre d'une NF1 non diagnostiquée. Une autre explication pourrait être que, devant le caractère parfois asymptomatique de ces tumeurs, ou devant un caractère infiltrant, certains cas ne soient pas pris en charge en chirurgie (95).

Nous n'avons identifié aucune mutation par substitution ponctuelle du codon 600 du gène *BRAF* et des codons 12 et 13 du gène *KRAS*.

Dans une vaste cohorte de tumeurs du système nerveux central, l'équipe de JK. Myung et al. ont identifié une mutation V600E de *BRAF* dans 15.6% des 48 cas d'astrocytome pilocytique étudiés (70). Ohgaki et al., sur une population de 1300 tumeurs du système nerveux central, retrouvaient cette mutation dans 9% des astrocytomes pilocytiques extra cérébelleux (96). Dans une série de 14 astrocytomes pilocytiques présentant des caractéristiques infiltrantes, Kandala et al. ont identifié une mutation V600E dans 5 cas (97). Dans une revue de la littérature, Penman et al. posent la question du classement de ces tumeurs en authentiques astrocytomes pilocytiques(98). La mutation *BRAF* V600E et la fusion *KIAA1549-BRAF* sont généralement mutuellement exclusives, mais d'exceptionnels cas ont été rapportés comme présentant les deux altérations (45,99).

Les mutations du gène *KRAS* sont moins fréquentes. En 2007, Janzarik et al. ont identifié un cas d'astrocytome pilocytique avec mutation du codon 12 du gène *KRAS* (G12A) (49). Jones et al. ont identifié deux patients dont les tumeurs étaient doublement mutées sur le gène *KRAS* (50).

Au total, 50 des 72 cas d'astrocytomes pilocytiques de notre série, soit 69%, présentaient donc une altération activatrice de la voie MAPK. Cette proportion est nettement plus faible que celle retrouvée en utilisant des techniques de séquençage à haut débit et étudiant de très nombreuses cibles. En utilisant une technique de RNA-seq, Jones et al. ont mis en évidence une altération activatrice de la voie MAPK dans l'ensemble des cas d'une série de 96 astrocytomes pilocytiques, répartis en 70 cas avec fusion *KIAA1549-BRAF*, six autres fusion impliquant *BRAF* (1 cas avec fusion *FAM131B-BRAF*, 2 cas avec fusion *RNF130-BRAF*, un cas avec fusion *CLCN6-BRAF*, un cas avec fusion *MKRN1-BRAF*, un cas avec fusion *GNAI1-BRAF*), six cas de mutations du gène *BRAF* (4 cas avec mutation V600E, 1 cas avec mutation ins599T, 1 cas avec mutation R506insVLR), 3 cas avec inactivation biallélique de *NF1*, deux cas avec double mutation de *KRAS* (p.[Glu63Lys]+[Arg73Met] et p.[Leu19Phe]+ [Gln22Lys]), 6 cas avec mutation de *FGFR1* (codons 546 ou 656), et trois cas avec fusion impliquant *NTRK2* (2 *QKI-NTRK2* et *NACC2-NTRK2*). L'activation constitutionnelle de *NTRK2* induit, au moins partiellement, l'activation de la voie MAPK (50). Zhang et al., dans un travail associant techniques de WGS et de RNA-seq, ont retrouvé une anomalie activant la voie MAPK dans 96% des cas d'astrocytomes pilocytiques (dont des transcrits *KIAA1549-BRAF*, *SRGAP3-RAF1*, *ST6GAL1-WHSC1*, *QKI-RAF1*, des mutations de *BRAF*, *KRAS* et *FGFR1*).

Dans ces deux études, la proportion de transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* était plus importante dans les tumeurs localisées en fosse postérieure, alors que les formes supratentorielles présentaient plus fréquemment d'autres transcrits de fusion ou des mutations de *FGFR1* ou de *BRAF* (48). Ces deux études confirment la faible

spécificité des altérations de FGFR1 et des mutations de *BRAF*, retrouvées régulièrement dans les autres gliomes de bas grade. Les deux études confirment également le très faible taux d'altérations moléculaires par tumeur des astrocytomes pilocytiques, à mettre en relation avec leur évolution relativement lente.

Si ces deux études ne remettent pas en question l'utilité diagnostique de la détection de transcrit de fusion *KIAA1549-BRAF*, qui reste l'altération la plus fréquente et la plus spécifique retrouvée dans les astrocytomes pilocytiques, elles permettent d'expliquer, par l'existence de nombreuses autres mutations, et par la meilleure sensibilité de la technique utilisée, le plus faible taux de mutation retrouvé dans notre étude.

B. Absence de mutations IDH1 et IDH2 dans les astrocytomes pilocytiques

Dans notre étude, l'étude immunohistochimique utilisant l'anticorps IDH1 muté R132H n'a révélé aucune expression de la protéine mutée sur l'ensemble des cas testés. La recherche de mutations ponctuelles d'IDH1 et IDH2 n'a pas été entreprise de manière systématique, mais avait été réalisée lors du diagnostic initial pour 11 astrocytomes pilocytiques, majoritairement chez l'adulte, afin d'éliminer un gliome infiltrant. Aucune mutation n'était retrouvée.

Une mutation d'IDH1 ou d'IDH2 est identifiée dans 70 à 80% des gliomes infiltrant de l'adulte (100,101). Korshunov et al. ont étudié la présence d'un transcrit de fusion *KIAA1549-BRAF* par FISH et d'une mutation IDH1 ou IDH2 dans une série de tumeurs de bas grade. Les deux anomalies étaient mutuellement exclusives et l'utilisation combinée des deux tests pour le diagnostic différentiel d'astrocytome

pilocytique ou de gliome de grade II avait une sensibilité de 73%, et une spécificité de 100% (102). Plus récemment, Badiali et al. ont cependant remis en cause l'exclusion mutuelle, notamment dans les gliomes de l'adulte, en retrouvant 10 cas associant les deux anomalies sur une série de 170 gliomes de bas grade (90). Six de ces dix cas avaient également une perte d'hétérozygotie 1p/19q, et étaient des tumeurs oligodendrogiales.

Ces données diminuent la spécificité de l'association mutation des gènes IDH et fusion *KIAA1549-BRAF* dans le diagnostic différentiel des tumeurs gliales de bas grade, et incitent le Pathologiste à la prudence, notamment pour ne pas poser à tort un diagnostic d'astrocytome pilocytique au sein d'une tumeur comportant un contingent de morphologie oligodendrogiale, pour laquelle on aurait retrouvé un transcrit de fusion. L'interprétation des résultats des analyses de biologie moléculaire doit être nuancée par l'Oncologue lors de l'élaboration d'une stratégie thérapeutique.

C. Absence de perte de triméthylation du codon K27 de l'histone H3.3 dans les astrocytomes pilocytiques

Aucune perte d'immunoréactivité nucléaire pour l'anticorps H3K27me3 n'a été détectée dans notre série, ni aucune mutation du gène *H3F3A* codant l'histone H3.3.

Des mutations des gènes codant les histones sont retrouvées dans de très nombreux cancers (103). Ainsi, 70 à 80% des gliomes de haut grade de l'enfant, (gliomes infiltrants du tronc ou glioblastomes) sont associés à une mutation des gènes codant les histones H3.3 ou H3.1, dans la quasi-totalité des cas sur le codon K27 (104). Le diagnostic différentiel avec une lésion de bas grade pouvant poser des difficultés au Pathologiste, notamment en cas de prélèvements biopsiques (toute

exérèse étant exclue pour les tumeurs infiltrantes du tronc), l'utilisation d'un anticorps dirigé contre H3K27me3 en immunohistochimie permet de réorienter le diagnostic vers une lésion de haut grade en cas de perte d'expression, et d'écartier l'astrocytome pilocytique, jusqu'à l'obtention de la confirmation par la biologie moléculaire.

VII. Implication pronostique de la fusion

KIAA1549-BRAF

Dans notre population, la durée médiane de suivi après le traitement initial, de 27 mois, est courte en comparaison de durée de survie sans progression des gliomes de grade I de l'OMS. 29% des patients présentaient tout de même une progression tumorale. Dans tous les cas, il s'agissait de l'évolution d'un reliquat post-opératoire, lié à une localisation rendant l'exérèse chirurgicale difficile. Le comportement de ce reliquat tumoral, surveillé cliniquement et à l'imagerie, est très variable, et l'évolution est survenue, dans notre série, au plus tôt 3 mois après la résection initiale, au plus tard presque 24 ans après. Ce dernier patient, atteint d'un astrocytome pilocytique de localisation cérébello-bulbaire dont l'exérèse initiale était partielle, avait reçu un traitement complémentaire par radiothérapie. Le résidu tumoral était stable tout au long de la surveillance, jusqu'à une évolution marquée par une crise convulsive, et qui a nécessité une nouvelle exérèse. Nous ne connaissons pas le statut moléculaire de la tumeur initiale, mais un transcrite de fusion a été identifié à la récurrence en 2014.

Aucune donnée de la littérature ne permet de préjuger du caractère stable, ou évolutif, de ces anomalies moléculaires dans les astrocytomes pilocytiques. La durée du suivi après diagnostic moléculaire dans notre série était courte, et le diagnostic moléculaire était régulièrement réalisé lors de la progression, le statut mutationnel de la tumeur initiale étant inconnu. Pour ces raisons, une analyse de survie sans progression en fonction de la présence ou non du transcrit n'était pas réalisable. On ne peut que constater une fréquence similaire de la présence d'un transcrit de fusion chez les patients ayant une maladie évolutive, par rapport aux cas stables.

Les données de la littérature sur une éventuelle corrélation de la fusion *KIAA1549-BRAF* avec le pronostic sont discordantes (105). Selon Hawkins et al., le pronostic serait meilleur chez les patients avec transcrit, avec une survie sans progression à 5 ans de 65% chez les patients avec transcrit de fusion, contre 17% sans transcrit, dans une série de 70 patients. Cette étude mettait également en évidence une différence de survie globale à 5 ans (100% vs 88%) (106). En 2012, les études de Lin et al. et d'Horbinski et al. ne mettaient en évidence aucune incidence pronostique de la présence d'un transcrit (37,99). A l'inverse, Tihan et al., dans une étude multicentrique, ont retrouvé un pronostic significativement moins bon chez des patients atteints d'un gliome avec transcrit de fusion *KIAA1549-BRAF* (107).

Même si les cas rapportés ici n'ont, à une exception près, pas entraîné de décès, l'expérience clinique lilloise rappelle le caractère potentiellement fatal de l'astrocytome pilocytique, malgré son bon pronostic habituel (environ 90% de survie globale à 10 ans (14,19,57,108,109)) et sa classification en grade I de l'OMS.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail avait pour objectif l'évaluation des performances de la recherche de transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* dans le diagnostic des astrocytomes pilocytiques. Nos résultats (en particulier la spécificité et la valeur prédictive positive du test) confirment le bien fondé de son utilisation.

Nous avons identifié un transcrit de fusion *KIAA1549-BRAF* dans 64% des cas d'astrocytome pilocytique, en accord avec les données de la littérature. Nous confirmons également la plus grande fréquence de ces transcrits dans les tumeurs localisées à la fosse postérieure et dans la population pédiatrique.

Pour la première fois, nos résultats suggèrent une association entre la présence d'un transcrit de fusion *KIAA1549-BRAF* et la présence d'une architecture biphasique, mais aussi avec la présence d'un contingent de morphologie oligodendrocytaire.

En revanche, en dehors des patients atteints d'une NF1, nous n'avons identifié dans les tissus tumoraux aucune autre altération de la voie MAPK. Dans les suites de ce travail, afin de mettre en évidence d'autres anomalies de cette voie de signalisation, nous souhaitons étudier en immunohistochimie l'expression de phosphoERK (pERK, forme activée de ERK), effecteur de la voie MAPK. Ceci permettrait de dépister, parmi les tumeurs sans transcrit de fusion identifié, l'activation de la voie MAPK et d'orienter le diagnostic moléculaire vers la recherche de transcrits de fusion plus rares ou vers des mutations ponctuelles de *BRAF*, *KRAS* et *FGFR1*.

Au vu des données récentes sur les altérations moléculaires des gliomes, il semble que l'on s'oriente progressivement vers la distinction de deux grandes

catégories de gliomes. D'une part les gliomes infiltrants, de grade II à IV, associés à des désordres de type épigénétique, des altérations des voies de métabolisme cellulaire et des anomalies du remodelage de la chromatine, et d'autre part des gliomes de meilleur pronostic associés à des altérations de la voie MAPK. Nous souhaitons étudier au sein des astrocytomes pilocytiques de notre série l'expression de certains marqueurs de remodelage de la chromatine, à notre connaissance jamais étudiés dans les gliomes circonscrits, afin d'explorer un possible lien entre ces deux modèles de gliomagenèse.

Il sera intéressant de poursuivre le suivi de la cohorte, afin d'évaluer avec un recul suffisant l'éventuelle signification pronostique de la présence de ces transcrits de fusion, en termes de survie globale, de survie sans progression, de pronostic fonctionnel et de morbidité.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol (Berl)*. août 2007;114(2):97-109.
2. Louis DN, Perry A, Burger P, Ellison DW, Reifenberger G, von Deimling A, et al. International Society of Neuropathology-Haarlem Consensus Guidelines for Nervous System Tumor Classification and Grading. *Brain Pathol*. 1 sept 2014;24(5):429-35.
3. Daumas-Duport C, Scheithauer B, O'Fallon J, Kelly P. Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method. *Cancer*. 15 nov 1988;62(10):2152-65.
4. Zouaoui S, Rigau V, Mathieu-Daudé H, Darlix A, Bessaoud F, Fabbro-Peray P, et al. Recensement national histologique des tumeurs primitives du système nerveux central : résultats généraux sur 40 000 cas, principales applications actuelles et perspectives. *Neurochirurgie*. févr 2012;58(1):4-13.
5. UK CR. Brain, other CNS and intracranial tumours incidence statistics [Internet]. 2014 Disponible sur: <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-info/cancerstats/types/brain/incidence/uk-brain-and-central-nervous-system-cancer-incidence-statistics>
6. Bauchet L, Rigau V, Mathieu-Daudé H, Fabbro-Peray P, Palenzuela G, Figarella-Branger D, et al. Clinical epidemiology for childhood primary central nervous system tumors. *J Neurooncol*. mars 2009;92(1):87-98.
7. Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Rouse C, Chen Y, Dowling J, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2007–2011. *Neuro-Oncol*. 10 janv 2014;16(suppl 4):iv1-63.
8. Rodriguez FJ, Perry A, Gutmann DH, O'Neill BP, Leonard J, Bryant S, et al. Gliomas in Neurofibromatosis Type 1: A Clinicopathologic Study of 100 Patients. *J Neuropathol Exp Neurol*. mars 2008;67(3):240-9.
9. Rodriguez FJ, Lim KS, Bowers D, Eberhart CG. Pathological and Molecular Advances in Pediatric Low-Grade Astrocytoma. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2013;8(1):361-79.

10. Collins VP, Jones DTW, Giannini C. Pilocytic astrocytoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol (Berl)*. 20 mars 2015;1-14.
11. Fryssira H, Leventopoulos G, Psoni S, Kitsiou-Tzeli S, Stavrianeas N, Kanavakis E. Tumor development in three patients with Noonan syndrome. *Eur J Pediatr*. 5 déc 2007;167(9):1025-31.
12. Schuettpelez LG, McDonald S, Whitesell K, Desruisseau DM, Grange DK, Gurnett CA, et al. Pilocytic astrocytoma in a child with Noonan syndrome. *Pediatr Blood Cancer*. 1 déc 2009;53(6):1147-9.
13. Rosemberg S, Fujiwara D. Epidemiology of pediatric tumors of the nervous system according to the WHO 2000 classification: a report of 1,195 cases from a single institution. *Childs Nerv Syst*. 26 juill 2005;21(11):940-4.
14. Burkhard C, Di Patre P-L, Schüler D, Schüler G, Yaşargil MG, Yonekawa Y, et al. A population-based study of the incidence and survival rates in patients with pilocytic astrocytoma. *J Neurosurg*. juin 2003;98(6):1170-4.
15. Listernick R, Darling C, Greenwald M, Strauss L, Charrow J. Optic pathway tumors in children: the effect of neurofibromatosis type 1 on clinical manifestations and natural history. *J Pediatr*. nov 1995;127(5):718-22.
16. Forsyth PA, Shaw EG, Scheithauer BW, O'Fallon JR, Layton DD, Katzmann JA. Supratentorial pilocytic astrocytomas. A clinicopathologic, prognostic, and flow cytometric study of 51 patients. *Cancer*. 15 août 1993;72(4):1335-42.
17. Rodriguez LA, Edwards MS, Levin VA. Management of hypothalamic gliomas in children: an analysis of 33 cases. *Neurosurgery*. févr 1990;26(2):242-6; discussion 246-7.
18. Lee Y, Van Tassel P, Bruner J, Moser R, Share J. Juvenile pilocytic astrocytomas: CT and MR characteristics. *Am J Roentgenol*. 1 juin 1989;152(6):1263-70.
19. Pencalet P, Maixner W, Sainte-Rose C, Lellouch-Tubiana A, Cinalli G, Zerah M, et al. Benign cerebellar astrocytomas in children. *J Neurosurg*. 1 févr 1999;90(2):265-73.
20. Brown DF, Rushing EJ. Rosenthal fibers and eosinophilic granular bodies in a classic acoustic schwannoma. *Arch Pathol Lab Med*. nov 1997;121(11):1207-9.
21. Rodriguez FJ, Scheithauer BW, Burger PC, Jenkins S, Giannini C. Anaplasia in pilocytic astrocytoma predicts aggressive behavior. *Am J Surg Pathol*. févr 2010;34(2):147-60.
22. Davis FA. Plexiform Neurofibromatosis (von Recklinghausen's Disease) of the Orbit and Globe, with Associated Glioma of the Optic Nerve and Brain: Report of a Case. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1939;37:250-71.

23. Pugh RJ, Schlesinger B. Tumour of the optic chiasm and nerve sheaths in a girl aged 2 years 9 months, showing some manifestations of neurofibromatosis. *Proc R Soc Med.* sept 1946;39(11):695.
24. Marshall D. Glioma of the Optic Nerve as a Manifestation of von Recklinghausen's Disease. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1953;51:117-55.
25. Manschot WA. Primary tumours of the optic nerve in von Recklinghausen's disease. *Br J Ophthalmol.* mai 1954;38(5):285-9.
26. Berg TH. Glioma of the optic nerve in neurofibromatosis. *Acta Ophthalmol (Copenh).* 1955;33(1):23-32.
27. Gutmann DH, Donahoe J, Brown T, James CD, Perry A. Loss of neurofibromatosis 1 (NF1) gene expression in NF1-associated pilocytic astrocytomas. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1 août 2000;26(4):361-7.
28. Knudson AG. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci.* 4 janv 1971;68(4):820-3.
29. Lewis RA, Gerson LP, Axelson KA, Riccardi VM, Whitford RP. von Recklinghausen neurofibromatosis. II. Incidence of optic gliomata. *Ophthalmology.* août 1984;91(8):929-35.
30. Czyzyk E, Józwiak S, Roszkowski M, Schwartz RA. Optic Pathway Gliomas in Children With and Without Neurofibromatosis 1. *J Child Neurol.* 7 janv 2003;18(7):471-8.
31. Bar EE, Lin A, Tihan T, Burger PC, Eberhart CG. Frequent Gains at Chromosome 7q34 Involving BRAF in Pilocytic Astrocytoma: *J Neuropathol Exp Neurol.* sept 2008;67(9):878-87.
32. Pfister S, Janzarik WG, Remke M, Ernst A, Werft W, Becker N, et al. BRAF gene duplication constitutes a mechanism of MAPK pathway activation in low-grade astrocytomas. *J Clin Invest.* 1 mai 2008;118(5):1739-49.
33. Jones DTW, Kocialkowski S, Liu L, Pearson DM, Bäcklund LM, Ichimura K, et al. Tandem Duplication Producing a Novel Oncogenic BRAF Fusion Gene Defines the Majority of Pilocytic Astrocytomas. *Cancer Res.* 11 janv 2008;68(21):8673-7.
34. Suyama M, Nagase T, Ohara O. HUGE: a database for human large proteins identified by Kazusa cDNA sequencing project. *Nucleic Acids Res.* 1 janv 1999;27(1):338-9.
35. Kikuno R, Nagase T, Nakayama M, Koga H, Okazaki N, Nakajima D, et al. HUGE: a database for human KIAA proteins, a 2004 update integrating HUGEppi and ROUGE. *Nucleic Acids Res.* 1 janv 2004;32(Database issue):D502-4.

36. Gene/Protein Characteristic Table for KIAA1549 [Internet]. Disponible sur: <http://www.kazusa.or.jp/huge/gfpage/KIAA1549/>
37. Lin A, Rodriguez FJ, Karajannis MA, Williams SC, Legault G, Zagzag D, et al. BRAF alterations in primary glial and glioneuronal neoplasms of the central nervous system with identification of 2 novel KIAA1549:BRAF fusion variants. *J Neuropathol Exp Neurol.* janv 2012;71(1):66-72.
38. Hutchinson KE, Ross JS, Stephens PJ, Miller VA, Sosman JA, Pao W. Melanoma BRAF Fusions—Response. *Clin Cancer Res.* 15 déc 2014;20(24):6632-6632.
39. Ciampi R, Knauf JA, Kerler R, Gandhi M, Zhu Z, Nikiforova MN, et al. Oncogenic AKAP9-BRAF fusion is a novel mechanism of MAPK pathway activation in thyroid cancer. *J Clin Invest.* 3 janv 2005;115(1):94-101.
40. Palanisamy N, Ateeq B, Kalyana-Sundaram S, Pflueger D, Ramnarayanan K, Shankar S, et al. Rearrangements of the RAF kinase pathway in prostate cancer, gastric cancer and melanoma. *Nat Med.* 2010;16(7):793-8.
41. Hutchinson KE, Lipson D, Stephens PJ, Otto G, Lehmann BD, Lyle PL, et al. BRAF Fusions Define a Distinct Molecular Subset of Melanomas with Potential Sensitivity to MEK Inhibition. *Clin Cancer Res.* 15 déc 2013;19(24):6696-702.
42. Jacob K, Albrecht S, Sollier C, Faury D, Sader E, Montpetit A, et al. Duplication of 7q34 is specific to juvenile pilocytic astrocytomas and a hallmark of cerebellar and optic pathway tumours. *Br J Cancer.* 14 juill 2009;101(4):722-33.
43. Rodriguez FJ, Ligon AH, Horkayne-Szakaly I, Rushing EJ, Ligon KL, Vena N, et al. BRAF Duplications and MAPK Pathway Activation Are Frequent in Gliomas of the Optic Nerve Proper: *J Neuropathol Exp Neurol.* sept 2012;71(9):789-94.
44. Yu J, Deshmukh H, Gutmann RJ, Emmett RJ, Rodriguez FJ, Watson MA, et al. Alterations of BRAF and HIPK2 loci predominate in sporadic pilocytic astrocytoma. *Neurology.* 10 nov 2009;73(19):1526-31.
45. Cin H, Meyer C, Herr R, Janzarik WG, Lambert S, Jones DTW, et al. Oncogenic FAM131B–BRAF fusion resulting from 7q34 deletion comprises an alternative mechanism of MAPK pathway activation in pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol (Berl).* 20 mars 2011;121(6):763-74.
46. Jones DTW, Kocialkowski S, Liu L, Pearson DM, Ichimura K, Collins VP. Oncogenic RAF1 rearrangement and a novel BRAF mutation as alternatives to KIAA1549:BRAF fusion in activating the MAPK pathway in pilocytic astrocytoma. *Oncogene.* 13 avr 2009;28(20):2119-23.

47. Roth JJ, Santi M, Pollock AN, Harding BN, Rorke-Adams LB, Tooke LS, et al. Chromosome Band 7q34 Deletions Resulting in KIAA1549-BRAF and FAM131B-BRAF Fusions in Pediatric Low-Grade Gliomas. *Brain Pathol.* 1 mars 2015;25(2):182-92.
48. Zhang J, Wu G, Miller CP, Tatevossian RG, Dalton JD, Tang B, et al. Whole-genome sequencing identifies genetic alterations in pediatric low-grade gliomas. *Nat Genet.* 14 avr 2013;45(6):602-12.
49. Janzarik WG, Kratz CP, Loges NT, Olbrich H, Klein C, Schäfer T, et al. Further evidence for a somatic KRAS mutation in a pilocytic astrocytoma. *Neuropediatrics.* avr 2007;38(2):61-3.
50. Jones DTW, Hutter B, Jäger N, Korshunov A, Kool M, Warnatz H-J, et al. Recurrent somatic alterations of FGFR1 and NTRK2 in pilocytic astrocytoma. *Nat Genet.* 30 juin 2013;45(8):927-32.
51. Chen Y-H, Gutmann DH. The molecular and cell biology of pediatric low-grade gliomas. *Oncogene.* 17 avr 2014;33(16):2019-26.
52. Dasgupta B, Yi Y, Chen DY, Weber JD, Gutmann DH. Proteomic Analysis Reveals Hyperactivation of the Mammalian Target of Rapamycin Pathway in Neurofibromatosis 1–Associated Human and Mouse Brain Tumors. *Cancer Res.* 4 janv 2005;65(7):2755-60.
53. Kaul A, Chen Y-H, Emnett RJ, Dahiya S, Gutmann DH. Pediatric glioma-associated KIAA1549:BRAF expression regulates neuroglial cell growth in a cell type-specific and mTOR-dependent manner. *Genes Dev.* 12 janv 2012;26(23):2561-6.
54. Alcantara Llaguno S, Chen J, Kwon C-H, Jackson EL, Li Y, Burns DK, et al. Malignant Astrocytomas Originate from Neural Stem/Progenitor Cells in a Somatic Tumor Suppressor Mouse Model. *Cancer Cell.* 6 janv 2009;15(1):45-56.
55. Gibson P, Tong Y, Robinson G, Thompson MC, Currie DS, Eden C, et al. Subtypes of medulloblastoma have distinct developmental origins. *Nature.* 23 déc 2010;468(7327):1095-9.
56. Maione P, Gridelli C, Troiani T, Ciardiello F. Combining Targeted Therapies and Drugs with Multiple Targets in the Treatment of NSCLC. *The Oncologist.* 3 janv 2006;11(3):274-84.
57. Colin C, Padovani L, Chappé C, Mercurio S, Scavarda D, Loundou A, et al. Outcome analysis of childhood pilocytic astrocytomas: a retrospective study of 148 cases at a single institution. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1 oct 2013;39(6):693-705.

58. Hukin J, Siffert J, Velasquez L, Zagzag D, Allen J. Leptomeningeal dissemination in children with progressive low-grade neuroepithelial tumors. *Neuro-Oncol.* oct 2002;4(4):253-60.
59. Fisher PG, Breiter SN, Carson BS, Wharam MD, Williams JA, Weingart JD, et al. A clinicopathologic reappraisal of brain stem tumor classification. Identification of pilocystic astrocytoma and fibrillary astrocytoma as distinct entities. *Cancer.* 1 oct 2000;89(7):1569-76.
60. Klimo P, Pai Panandiker AS, Thompson CJ, Boop FA, Qaddoumi I, Gajjar A, et al. Management and outcome of focal low-grade brainstem tumors in pediatric patients: the St. Jude experience. *J Neurosurg Pediatr.* mars 2013;11(3):274-81.
61. Hochart A, Escande F, Rocourt N, Grill J, Koubi-Pick V, Beaujot J, et al. Long survival in a child with a mutated K27M-H3.3 pilocytic astrocytoma. *Ann Clin Transl Neurol.* avr 2015;2(4):439-43.
62. Wu J, Dombi E, Jousma E, Scott Dunn R, Lindquist D, Schnell BM, et al. Preclinical testing of Sorafenib and RAD001 in the Nfflox/flox;DhhCre mouse model of plexiform neurofibroma using magnetic resonance imaging. *Pediatr Blood Cancer.* 1 févr 2012;58(2):173-80.
63. Sievert AJ, Lang S-S, Boucher KL, Madsen PJ, Slaunwhite E, Choudhari N, et al. Paradoxical activation and RAF inhibitor resistance of BRAF protein kinase fusions characterizing pediatric astrocytomas. *Proc Natl Acad Sci.* 4 sept 2013;110(15):5957-62.
64. Chappé C, Padovani L, Scavarda D, Forest F, Nanni-Metellus I, Loundou A, et al. Dysembryoplastic Neuroepithelial Tumors Share with Pleomorphic Xanthoastrocytomas and Gangliogliomas BRAFV600E Mutation and Expression. *Brain Pathol.* 1 sept 2013;23(5):574-83.
65. Dahiya S, Haydon DH, Alvarado D, Gurnett CA, Gutmann DH, Leonard JR. BRAFV600E mutation is a negative prognosticator in pediatric ganglioglioma. *Acta Neuropathol (Berl).* 23 avr 2013;125(6):901-10.
66. Donson AM, Kleinschmidt-DeMasters BK, Aisner DL, Bemis LT, Birks DK, Levy JMM, et al. Pediatric Brainstem Gangliogliomas Show BRAFV600E Mutation in a High Percentage of Cases. *Brain Pathol.* 1 mars 2014;24(2):173-83.
67. Dougherty MJ, Santi M, Brose MS, Ma C, Resnick AC, Sievert AJ, et al. Activating mutations in BRAF characterize a spectrum of pediatric low-grade gliomas. *Neuro-Oncol.* 7 janv 2010;12(7):621-30.
68. Koelsche C, Wöhrer A, Jeibmann A, Schittenhelm J, Schindler G, Preusser M, et al. Mutant BRAF V600E protein in ganglioglioma is predominantly expressed by neuronal tumor cells. *Acta Neuropathol (Berl).* 24 févr 2013;125(6):891-900.

69. MacConaill LE, Campbell CD, Kehoe SM, Bass AJ, Hatton C, Niu L, et al. Profiling Critical Cancer Gene Mutations in Clinical Tumor Samples. PLoS ONE [Internet]. 18 nov 2009;4(11). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2774511/>
70. Myung JK, Cho H, Park C-K, Kim S-K, Lee S-H, Park S-H. Analysis of the BRAFV600E Mutation in Central Nervous System Tumors. Transl Oncol. 1 déc 2012;5(6):430-6.
71. Schindler G, Capper D, Meyer J, Janzarik W, Omran H, Herold-Mende C, et al. Analysis of BRAF V600E mutation in 1,320 nervous system tumors reveals high mutation frequencies in pleomorphic xanthoastrocytoma, ganglioglioma and extra-cerebellar pilocytic astrocytoma. Acta Neuropathol (Berl). 29 janv 2011;121(3):397-405.
72. Daumas-Duport C, Varlet P, Bacha S, Beuvon F, Cervera-Pierot P, Chodkiewicz JP. Dysembryoplastic neuroepithelial tumors: nonspecific histological forms -- a study of 40 cases. J Neurooncol. févr 1999;41(3):267-80.
73. Gessi M, Moneim YA, Hammes J, Goschzik T, Scholz M, Denkhaus D, et al. FGFR1 Mutations in Rosette-Forming Glioneuronal Tumors of the Fourth Ventricle: J Neuropathol Exp Neurol. juin 2014;73(6):580-4.
74. Ida CM, Rodriguez FJ, Burger PC, Caron AA, Jenkins SM, Spears GM, et al. Pleomorphic Xanthoastrocytoma: Natural History and Long-Term Follow-Up. Brain Pathol. 1 déc 2014;n/a - n/a.
75. Sipayya V, Sharma I, Sharma KC, Singh A. Immunohistochemical expression of IDH1 in gliomas: a tissue microarray-based approach. J Cancer Res Ther. déc 2012;8(4):598-601.
76. Cykowski MD, Allen RA, Kanaly AC, Fung K-M, Marshall R, Perry A, et al. The differential diagnosis of pilocytic astrocytoma with atypical features and malignant glioma: an analysis of 16 cases with emphasis on distinguishing molecular features. J Neurooncol. 21 sept 2013;115(3):477-86.
77. Cruz GR, Oliveira ID, Moraes L, Paniago MDG, Alves MT de S, Capellano AM, et al. Analysis of KIAA1549–BRAF fusion gene expression and IDH1/IDH2 mutations in low grade pediatric astrocytomas. J Neurooncol. 17 févr 2014;117(2):235-42.
78. Kim YZ. Altered Histone Modifications in Gliomas. Brain Tumor Res Treat. 30 avr 2014;2(1):7-21.
79. Rivera-Zengotita M, Yachnis AT. Gliosis versus glioma?: don't grade until you know. Adv Anat Pathol. juill 2012;19(4):239-49.

80. Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, et al. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*. 12 juin 1986;321(6071):674-9.
81. RBPACP V2 [Internet]. Disponible sur: <https://www.afaqap.fr/documentation/documents-afaqap/rbpacp>
82. Tian Y, Rich BE, Vena N, Craig JM, MacConaill LE, Rajaram V, et al. Detection of KIAA1549-BRAF Fusion Transcripts in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Pediatric Low-Grade Gliomas. *J Mol Diagn JMD*. nov 2011;13(6):669-77.
83. Huang L, Kuwahara I, Matsumoto K. EWS represses cofilin 1 expression by inducing nuclear retention of cofilin 1 mRNA. *Oncogene*. 5 juin 2014;33(23):2995-3003.
84. BiostaTGV - Statistiques en ligne [Internet]. Disponible sur: <http://marne.u707.jussieu.fr/biostatgv/>
85. The Nervous System Archives - Page 3 of 5 - Interactive Biology, with Leslie Samuel [Internet]. Disponible sur: <http://www.interactive-biology.com/category/posts/the-nervous-system-posts/page/3/>
86. Chourmouzi D, Papadopoulou E, Konstantinidis M, Syrris V, Kouskouras K, Haritanti A, et al. Manifestations of pilocytic astrocytoma: a pictorial review. *Insights Imaging*. 2 mai 2014;5(3):387-402.
87. Sievert AJ, Jackson EM, Gai X, Hakonarson H, Judkins AR, Resnick AC, et al. Duplication of 7q34 in Pediatric Low-Grade Astrocytomas Detected by High-Density Single-Nucleotide Polymorphism-Based Genotype Arrays Results in a Novel BRAF Fusion Gene. *Brain Pathol*. 1 juill 2009;19(3):449-58.
88. Forshew T, Tatevossian RG, Lawson AR, Ma J, Neale G, Ogunkolade BW, et al. Activation of the ERK/MAPK pathway: a signature genetic defect in posterior fossa pilocytic astrocytomas. *J Pathol*. 1 juin 2009;218(2):172-81.
89. Reuss DE, Sahm F, Schrimpf D, Wiestler B, Capper D, Koelsche C, et al. ATRX and IDH1-R132H immunohistochemistry with subsequent copy number analysis and IDH sequencing as a basis for an « integrated » diagnostic approach for adult astrocytoma, oligodendroglioma and glioblastoma. *Acta Neuropathol (Berl)*. 27 nov 2014;129(1):133-46.
90. Badiali M, Gleize V, Paris S, Moi L, Elhouadani S, Arcella A, et al. KIAA1549-BRAF Fusions and IDH Mutations Can Coexist in Diffuse Gliomas of Adults. *Brain Pathol*. 1 nov 2012;22(6):841-7.
91. Antonelli M, Badiali M, Moi L, Buttarelli FR, Baldi C, Massimino M, et al. KIAA1549:BRAF fusion gene in pediatric brain tumors of various histogenesis. *Pediatr Blood Cancer*. 1 avr 2015;62(4):724-7.

92. Andrieux J. Puces à ADN (CGH-array) : application pour le diagnostic de déséquilibres cytogénétiques cryptiques. *Pathol Biol.* sept 2008;56(6):368-74.
93. Gutmann DH, McLellan MD, Hussain I, Wallis JW, Fulton LL, Fulton RS, et al. Somatic neurofibromatosis type 1 (NF1) inactivation characterizes NF1-associated pilocytic astrocytoma. *Genome Res.* 3 janv 2013;23(3):431-9.
94. Guillamo J-S, Créange A, Kalifa C, Grill J, Rodriguez D, Doz F, et al. Prognostic factors of CNS tumours in Neurofibromatosis 1 (NF1). *Brain.* 1 janv 2003;126(1):152-60.
95. Thomas RP, Gibbs IC, Xu LW, Recht L. Treatment options for optic pathway gliomas. *Curr Treat Options Neurol.* févr 2015;17(2):333.
96. Ohgaki H, Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol (Berl).* janv 2005;109(1):93-108.
97. Kandala G, Bannykh S, Fan S, Baden K, Pau A, Baden L, et al. Pilocytic astrocytomas with infiltrating patterns of growth carry a high rate of BRAF V600E mutation. *Modern Pathology*(2012)25:428–38
98. Penman CL, Faulkner C, Lowis SP, Kurian KM. Current Understanding of BRAF Alterations in Diagnosis, Prognosis, and Therapeutic Targeting in Pediatric Low-Grade Gliomas. *Front Oncol.* 2015;5:54.
99. Horbinski C, Hamilton RL, Nikiforov Y, Pollack IF. Association of molecular alterations, including BRAF, with biology and outcome in pilocytic astrocytomas. *Acta Neuropathol (Berl).* 1 janv 2010;119(5):641-9.
100. Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 Mutations Are Early Events in the Development of Astrocytomas and Oligodendrogliomas. *Am J Pathol.* avr 2009;174(4):1149-53.
101. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *N Engl J Med.* 19 févr 2009;360(8):765-73.
102. Korshunov A, Meyer J, Capper D, Christians A, Remke M, Witt H, et al. Combined molecular analysis of BRAF and IDH1 distinguishes pilocytic astrocytoma from diffuse astrocytoma. *Acta Neuropathol (Berl).* 19 juin 2009;118(3):401-5.
103. Dawson MA, Kouzarides T. Cancer Epigenetics: From Mechanism to Therapy. *Cell.* 6 juill 2012;150(1):12-27.
104. Yuen BTK, Knoepfler PS. Histone H3.3 Mutations: A Variant Path to Cancer. *Cancer Cell.* 11 nov 2013;24(5):567-74.
105. Sadighi Z, Slopis J. Pilocytic Astrocytoma A Disease With Evolving Molecular Heterogeneity. *J Child Neurol.* 1 mai 2013;28(5):625-32.

106. Hawkins C, Walker E, Mohamed N, Zhang C, Jacob K, Shirinian M, et al. BRAF-KIAA1549 fusion predicts better clinical outcome in pediatric low-grade astrocytoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 juill 2011;17(14):4790-8.
107. Tihan T, Ersen A, Qaddoumi I, Sughayer MA, Tolunay S, Al-Hussaini M, et al. Pathologic characteristics of pediatric intracranial pilocytic astrocytomas and their impact on outcome in 3 countries: a multi-institutional study. *Am J Surg Pathol.* janv 2012;36(1):43-55.
108. Hayostek CJ, Shaw EG, Scheithauer B, O'Fallon JR, Weiland TL, Schomberg PJ, et al. Astrocytomas of the cerebellum. A comparative clinicopathologic study of pilocytic and diffuse astrocytomas. *Cancer.* 1 août 1993;72(3):856-69.
109. Morreale VM, Ebersold MJ, Quast LM, Parisi JE. Cerebellar astrocytoma: experience with 54 cases surgically treated at the Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, from 1978 to 1990. *J Neurosurg.* août 1997;87(2):257-61.
110. Armstrong GT, Conklin HM, Huang S, Srivastava D, Sanford R, Ellison DW, et al. Survival and long-term health and cognitive outcomes after low-grade glioma. *Neuro-Oncol.* 2 janv 2011;13(2):223-34.
111. Hasselblatt M, Riesmeier B, Lechtape B, Brentrup A, Stummer W, Albert FK, et al. BRAF-KIAA1549 fusion transcripts are less frequent in pilocytic astrocytomas diagnosed in adults. *Neuropathol Appl Neurobiol.* déc 2011;37(7):803-6.

ANNEXES

Annexe 1 : Tableau détaillé des caractéristiques moléculaires des 72 astrocytomes pilocytiques.

Cas	Origine	Age (diagnostic)	Contrôle morpho	KIAA1549-BRAF	Substitution BRAF (V600)	IHC BRAF	Substitution KRAS	IHC IDH1	mutation IDH1-2	IHC H3.3K273m	Mutation histones	Circonstances de découverte
AP 1	Lille	9	95,00%	16_9	NON	négatif	NON	Négatif		Conservé		HTIC
AP 2	Lille	15	55,00%	négatif	NON	négatif	NON	Négatif		Conservé		HTIC
AP 3	Lille	1	80,00%	16_11	NON		NON	Négatif				Signes localisateurs
AP 4	Lille	13	80,00%	16_9	NON	négatif	NON	Négatif		Conservé		Signes localisateurs
AP 5	Lille	7	70,00%	16_9	NON	négatif	NON	Négatif		Conservé		
AP 6	Lille	6	95,00%	négatif	NON	négatif	NON	Négatif	Négatif	Conservé	Négatif	Signes localisateurs
AP 7	Lille	4	70,00%	16_9	NON	négatif	NON	Négatif		Conservé		HTIC
AP 8	Lille	15	80,00%	16_9	NON	négatif	NON	Négatif		Conservé		HTIC
AP 9	Lille	12	80,00%	négatif	NON	négatif	NON	Négatif		Conservé		Fortuite (bilan NF1)
AP 10	Lille	5	65,00%	15_9	NON	négatif	NON	Négatif		Conservé		Signes localisateurs
AP 11	Lille	33	60,00%	négatif	NON		NON	Négatif	Négatif			HTIC + signes loc.
AP 12	Bordeaux	7	20,00%	négatif				Négatif				
AP 13	Lille	8	70,00%	16_9	NON	négatif	NON	Négatif		Conservé		HTIC
AP 14	Lille	7	50,00%	négatif	NON	négatif	NON	Négatif		Conservé		HTIC
AP 15	Lille	8	65,00%	16_9	NON	négatif	NON	Négatif		Conservé	Négatif	HTIC
AP 16	Lille	4	90,00%	NI	NON	négatif	NON	Négatif		Conservé		
AP 17	Lille	26	70,00%	16_9	NON	négatif	NON	Négatif		Conservé		HTIC
AP 18	Lille	28	80,00%	négatif	NON	négatif	NON	Négatif		Conservé		Fortuite (bilan NF1)
AP 19	Lille	20	70,00%	16_9	NON	négatif	NON	Négatif		Conservé		
AP 20	Lille	2	30,00%	15_9	NON	négatif	NON	Négatif		Conservé		HTIC
AP 21	Lille	8	70,00%	15_11	NON		NON					Signes localisateurs
AP 22	Lille	31	50,00%	négatif	NON	négatif	NON	Négatif	Négatif	Conservé		
AP 23	Lille	11	30,00%	16_9	NON	négatif	NON	Négatif		Conservé		Signes localisateurs
AP 24	Lille	16	80,00%	négatif	NON		NON	Négatif				
AP 25	Lille	14	90,00%	15_11	NON	négatif	NON	Négatif		Conservé		HTIC
AP 26	Lille	3	95,00%	16_9	NON	négatif	NON	Négatif		Conservé		Fortuite (bilan neuropsych)
AP 27	Lille	14	90,00%	16_9	NON	négatif	NON	Négatif		Conservé		HTIC
AP 28	Lyon - GENOP	17	90,00%	16_9	NON							
AP 29	Lyon - GENOP	21	80,00%	négatif								
AP 30	Lyon - GENOP	4	95,00%	15_9	NON			Négatif				
AP 31	Lille	3	70,00%	négatif	NON	négatif	NON	Négatif		Conservé		HTIC
AP 32	Lille	1	95,00%	négatif	NON		NON	Négatif	Négatif		Négatif	HTIC
AP 33	Lille	44	80,00%	négatif	NON		NON	Négatif	Négatif			Signes localisateurs

AP 34	Lille	26	65,00%	négatif	NON	négatif	NON	Négatif	Négatif	Conservé		
AP 35	Lille	15	20,00%	16_9	NON	négatif	NON	Négatif		Conservé		HTIC
AP 36	Toulouse -GENOP	2	80,00%	15_9								
AP 37	Lille	32	70,00%	16_9	NON	négatif	NON	Négatif		Conservé		Signes localisateurs
AP 38	Lille	17	60,00%	négatif	NON	négatif	NON	Négatif	Négatif	Conservé		
AP 39	Lille	9	80,00%	16_9	NON	négatif	NON	Négatif		Conservé		Céphalées
AP 40	Lille	3	95,00%	16_11	NON	négatif	NON	Négatif		Conservé		HTIC
AP 41	Nice - GENOP	18	nc	16_9								
AP 42	Paris - GENOP	2	nc	16_9	NON			Négatif	Négatif		Négatif	
AP 43	Lille	37	75,00%	négatif	NON		NON		Négatif			Crises convulsives
AP 44	Lille	13	nc	16_9	NON	négatif	NON	Négatif		Conservé		HTIC
AP 45	Lille	3	70,00%	négatif	NON	négatif	NON	Négatif		Conservé		Signes localisateurs
AP 46	Lille	7	70,00%	16_9	NON	négatif	NON	Négatif		Conservé		Signes loc. + Céphalées
AP 47	Lyon - GENOP	8	70,00%	16_9	NON			Négatif				
AP 48	Lyon - GENOP	16	35,00%	16_9				Négatif				
AP 49	Lyon - GENOP	5	80,00%	16_9	NON							HTIC
AP 50	Lyon - GENOP	19	60,00%	négatif								
AP 51	Lille	6	70,00%	16_9	NON	négatif	NON	Négatif		Conservé		HTIC
AP 52	Lille	9	75,00%	16_9	NON	négatif	NON	Négatif		Conservé		HTIC
AP 53	Lille	24	100,00%	16_9	NON		NON	Négatif	Négatif		Négatif	Crises convulsives
AP 54	Lille	4	90,00%	16_9	NON		NON				Négatif	Signes localisateurs
AP 55	Bordeaux	34	90,00%	16_9	NON							
AP 56	Lille	49	75,00%	négatif				Négatif	Négatif			Signes localisateurs
AP 57	Paris	26	90,00%	16_9								
AP 58	Paris	45	90,00%	négatif								
AP 59	Paris	23	90,00%	16_9								
AP 60	Lille	16	90,00%	négatif	NON	négatif	NON	Négatif		Conservé	Négatif	Signes localisateurs
AP 61	Lille	22	90,00%	15_9	NON		NON					Crises convulsives
AP 62	Lille	7	45,00%	16_11						Conservé	Négatif	Signes localisateurs
AP 63	Lyon - GENOP	28	95,00%	15_9	NON				Négatif		Négatif	Signes localisateurs
AP 64	Lille	19	75,00%	16_11	NON	négatif	NON	Négatif		Conservé		HTIC + signes focaux
AP 65	Lille	13	90,00%	négatif	NON	négatif	NON	Négatif	Négatif	Conservé	Négatif	Signes localisateurs
AP 66	Toulouse	7	70,00%	négatif				Négatif		Conservé		
AP 67	Paris Lariboisière	1	80,00%	NI								
AP 68	Lille	10	90,00%	16_9				Négatif		Conservé		Céphalées
AP 69	Toulouse	10	80,00%	16_11	NON						Négatif	
AP 70	Toulouse	4	85,00%	15_9								

AP 71	Toulouse	7	70,00%	négatif							
AP 72	Lille	3	90,00%	16_9	négatif		Négatif		Conservé		Signes loc. et céphalées

Annexe 2 : Tableau listant les caractéristiques histopathologiques, la localisation et l'anomalie moléculaire des 72 astrocytomes pilocytiques

Cas	Age (diagnostic)	Localisation	Architecture Biphasique	Corps granuleux éosinophiles	Fibres de Rosenthal	Microkystes	Vaisseaux glomérulés	contingent Oligo-like	Nécrose	Anaplasie	Anomalie moléculaire
AP 1	9	Fosse postérieure – cérébello-bulbaire	OUI	NON	NON	OUI	OUI	NON	NON	NON	16_9
AP 2	15	3ème Ventricule	NON	NON	OUI	NON	NON	NON	NON	NON	NF1
AP 3	1	Hypothalamo-chiasmatique	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	NON	NON	NON	16_11
AP 4	13	Chiasmato-ventriculaire	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	NON	NON	NON	16_9
AP 5	7	3ème Ventricule	NON	OUI	OUI	NON	OUI	NON	NON	NON	16_9
AP 6	6	Chiasmato-ventriculaire	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	NON	NON	aucune
AP 7	4	Fosse postérieure - Cervelet	OUI	NON	OUI	OUI	NON	OUI	NON	NON	16_9
AP 8	15	Diencéphale - pariéto-temporale	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	NON	NON	16_9
AP 9	12	Fosse postérieure	NON	NON	NON	NON	NON	NON	NON	NON	NF1
AP 10	5	Fosse postérieure - Intra-médullaire	OUI	NON	OUI	NON	NON	OUI	NON	NON	15_9
AP 11	33	Fosse postérieure - 4ème ventricule	OUI	NON	OUI	OUI	OUI	OUI	NON	NON	aucune
AP 12	7	Thalamus									aucune
AP 13	8	Fosse postérieure - Pédoncules cérébelleux inférieur et moyen gauches	NON	NON	NON	NON	OUI	NON	NON	NON	16_9
AP 14	7	Fosse postérieure - Tronc cérébral	NON	NON	NON	OUI	OUI	OUI	NON	NON	aucune

AP 15	8	Fosse postérieure - Cervelet	NON	OUI	OUI	OUI	OUI	NON	NON	NON	16_9
AP 16	4	Fosse postérieure - Latéro-bulbaire	OUI	NON	NON	OUI	OUI	NON	NON	NON	aucune
AP 17	26	Fosse postérieure - Vermis cérébelleux	OUI	OUI	OUI	NON	OUI	OUI	NON	NON	16_9
AP 18	28	Para-ventriculaire / temporale gauche	OUI	OUI	NON	OUI	NON	NON	NON	non	NF1
AP 19	20	Fosse postérieure - Cervelet	OUI	OUI	NON	OUI	OUI	NON	NON	NON	16_9
AP 20	2	Fosse postérieure - Cervelet	NON	NON	NON	NON	OUI	OUI	NON	NON	15_9
AP 21	8	Chiasmato-ventriculaire	NON	NON	NON	NON	OUI	OUI	NON	NON	15_11
AP 22	31	Intraventriculaire frontale G	OUI	OUI	NON	OUI	OUI	NON	NON	NON	NF1
AP 23	11	Fosse postérieure - ponto-cérébelleux	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	NON	NON	16_9
AP 24	16	Voies optiques	NON	NON	OUI	NON	OUI	NON	NON	NON	aucune
AP 25	14	Fosse postérieure - vermis 4ème ventricule	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	NON	15_11
AP 26	3	Fosse postérieure - cérébelleux droit	OUI	NON	NON	OUI	OUI	OUI	NON	NON	16_9
AP 27	14	Fosse postérieure	OUI	NON	NON	OUI	OUI	OUI	NON	NON	16_9
AP 28	17	Temporo-pariétale gauche									16_9
AP 29	21	Fosse postérieure - cérébelleux droit									aucune
AP 30	4	Voies optiques									15_9
AP 31	3	Fosse postérieure - vermis cérébelleux	NON	NON	NON	NON	OUI	OUI	NON	NON	aucune
AP 32	1	Chiasmato-ventriculaire	NON	NON	NON	NON	OUI	OUI	NON	NON	aucune
AP 33	44	Fosse postérieure - cérébelleux droit	NON	NON	NON	OUI	OUI	NON	OUI	NON	aucune
AP 34	26	Fosse postérieure - cérébelleux droit	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	NON	NON	NON	aucune

AP 35	15	Fosse postérieure	OUI	NON	OUI	OUI	OUI	OUI	NON	NON	16_9
AP 36	2	Fosse postérieure - cérébelleux droit									15_9
AP 37	32	Fosse postérieure	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	NON	NON	16_9
AP 38	17	Lobe frontal									aucune
AP 39	9	Fosse postérieure - vermis cérébelleux	OUI	OUI	OUI	NON	OUI	OUI	NON	NON	16_9
AP 40	3	Fosse postérieure - cérébelleux gauche	NON	NON	NON	NON	OUI	OUI	NON	NON	16_11
AP 41	18	Fosse postérieure - vermis cérébelleux									16_9
AP 42	2	Fosse postérieure - tronc cérébral									16_9
AP 43	37	Fronto-basale olfactive	NON	OUI	OUI	NON	NON	NON	NON	NON	aucune
AP 44	13	Fosse postérieure - 4ème ventricule	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	NON	NON	16_9
AP 45	3	Fosse postérieure	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	NON	NON	NON	aucune
AP 46	7	Fosse postérieure - vermis cérébelleux	OUI	NON	NON	OUI	OUI	OUI	NON	NON	16_9
AP 47	8	Ventriculaire									16_9
AP 48	16	Fosse postérieure									16_9
AP 49	5	Fosse postérieure									aucune
AP 50	19	Thalamus droit									16_9
AP 51	6	Fosse postérieure - hémisphère cérébelleux gauche	OUI	OUI	OUI	NON	OUI	OUI	NON	NON	16_9
AP 52	9	Fosse postérieure - 4ème ventricule	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	NON	NON	NON	16_9
AP 53	24	3ème Ventricule									16_9

AP 54	4	Thalamus	OUI	NON	NON	NON	OUI	OUI	NON	NON	16_9
AP 55	34	Fosse postérieure - Cervelet									16_9
AP 56	49	Frontocalluse, lat. à Gauche + V3 (intraventriculaire)	NON	NON	NON	NON	NON	NON	NON	NON	aucune
AP 57	26	Fosse postérieure - tumeur intramédullaire infiltrante									16_9
AP 58	45	Fosse postérieure - Intramédullaire D11 D12									aucune
AP 59	23	Fosse postérieure - tumeur kystique V4									16_9
AP 60	16	Fosse postérieure - Hémisphère cérébelleux	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	NON	NON	NON	aucune
AP 61	22	tumeur temporale (hippocampe G)	NON	NON	NON	NON	NON	NON	NON	NON	15_9
AP 62	7	Fosse postérieure - protubérance	NON	NON	NON	NON	OUI	NON	NON	NON	16_11
AP 63	28	Fosse postérieure - tumeur intramédullaire									15_9
AP 64	19	Fosse postérieure - Cervelet	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	NON	NON	NON	16_11
AP 65	13	Fosse postérieure - tumeur V4	NON	NON	OUI	NON	OUI	OUI	NON	NON	aucune
AP 66	7	Fosse postérieure - hémisphère cérébelleux gauche									aucune
AP 67	1	Voies optiques									aucune
AP 68	10	Fosse postérieure - tente du cervelet	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	NON	NON	16_9
AP 69	10	Fosse postérieure - hémisphères cérébelleux									16_11
AP 70	4	Voies optiques									15_9

AP 71	7	fosse postérieure - 4ème ventricule									aucune
AP 72	3	Fosse postérieure - cervelet	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	NON	NON	NON	16_9

AUTEUR : Nom : COCKENPOT

Prénom : Vincent

Date de Soutenance : 29 Mai 2015

Titre de la Thèse : Intérêt diagnostique et pronostique de l'identification des transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* dans les astrocytomes pilocytiques. Caractérisation moléculaire et immunohistochimique d'une série de 72 cas

Thèse - Médecine - Lille 2015

Cadre de classement : Anatomie et Cytologie Pathologiques

DES + spécialité : Anatomie et Cytologie Pathologiques

Mots-clés : Astrocytome pilocytique, fusion *KIAA1549-BRAF*, gliome de bas grade, biologie moléculaire, voie de signalisation MAPK.

Résumé :

Contexte : Le diagnostic de l'astrocytome pilocytique, tumeur de grade I du système nerveux central, intègre des données moléculaires récemment découvertes, en particulier la recherche de transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF*, activateur de la voie oncogénique MAPK.

Méthode : Nous avons utilisé une technique de RT-PCR conventionnelle pour la détection des transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* dans une population de 135 patients, enfants et adultes, atteints de tumeurs du système nerveux central, dont 72 cas d'astrocytome pilocytique, avec évaluation des performances diagnostiques du test, complétées par la recherche d'autres altérations moléculaires touchant la voie de signalisation MAPK.

Résultats : Nous avons identifié un transcrit de fusion *KIAA1549-BRAF* dans 46 cas, avec une valeur prédictive positive pour le diagnostic d'astrocytome pilocytique de 100%, une valeur prédictive négative de 70,5%, une sensibilité de 62% (IC à 95% [0.52 ; 0.74] et une spécificité de 100% (IC 95% [0.94 ; 1]). Un transcrit de fusion était plus fréquemment identifié dans les tumeurs atteignant les patients de moins de 20 ans (70%), dans les tumeurs localisées en fosse postérieure (69%), dans les formes d'architecture biphasique (76%) et dans les tumeurs comportant un contingent de morphologie oligodendrogliale (75%). Aucune autre anomalie moléculaire activant la voie de signalisation MAPK n'était mise en évidence dans les astrocytomes pilocytiques. Il était retrouvé un transcrit de fusion *KIAA1549-BRAF* dans le tissu tumoral de 9 des 14 cas d'astrocytome pilocytique évolutifs.

Conclusion : La valeur de la recherche de transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* par RT-PCR conventionnelle en tant que marqueur diagnostique des astrocytomes pilocytiques est confirmée dans notre cohorte, encourageant la poursuite de l'utilisation du test.

Composition du Jury :

Président : Mme le Professeur Marie-Christine Copin

Assesseurs :

Mr le Professeur Claude-Alain Maurage (directeur de thèse)

Mr le Professeur Matthieu Vinchon

Mme le Dr Fabienne Escande

Mr le Dr Pierre Leblond