



UNIVERSITE DE LILLE  
**FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG**  
Année : 2019

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT  
DE DOCTEUR EN MEDECINE

**Caractérisation moléculaire et chromosomique des gliomes diffus de la  
ligne médiane de l'enfant et du jeune adulte**

Présentée et soutenue publiquement le 18 mars 2019 à 16h  
au Pôle Recherche  
**Par Charlotte DUFOUR**

---

**JURY**

**Président :**

**Monsieur le Professeur Claude-Alain MAURAGE**

**Assesseurs :**

**Monsieur le Professeur Matthieu VINCHON**

**Monsieur le Docteur Pierre LEBLOND**

**Madame le Docteur Fabienne ESCANDE**

**Directeur de Thèse :**

**Madame le Docteur Florence RENAUD**

---

## **Avertissement**

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



## **Abréviations**

aCGH : Comparative Genomic Hybridization array (synonyme : ACPA)

ACPA : Analyse Comparative sur Puce à ADN

ADN : Acide Désoxyribonucléique

CNIL : Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés

CPP : Comité de Protection des Personnes

DLRS : Derivative Log Ratio Spread

dNTP : Désoxynucléotides triphosphates

EIQ : Ecart Inter-Quartile

FFPE : Formalin fixed paraffin embedded (Fixé par le formol et inclus en paraffine)

H3K27me3 : triméthylation de l'histone H3 sur le résidu lysine 27

HES : Hématoxyline, Eosine et Safran

IHC : Immunohistochimie

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

ISP : Ion Sphere Particles

NGS : Next-Generation Sequencing (séquençage haut-débit)

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PCR : Polymerase Chain Reaction (amplification en chaîne par polymérase)

SNC : Système Nerveux Central

SNP Arrays : Single Nucleotide Polymorphism Arrays

TDM : Tomodensitométrie

TMA : Tissue Microarray

## Tables des matières

<b>Résumé</b> .....	1
<b>Introduction</b> .....	3
<b>Matériel et méthodes</b> .....	13
1. Sélection de la cohorte et des échantillons tumoraux.....	13
2. Extraction de l'ADN et de l'ARN tumoral.....	14
3. Séquençage haut-débit.....	15
4. Comparative Genomic Hybridization array (aCGH) / Analyse Comparative sur Puce à ADN (ACPA).....	18
5. Transcrit de fusion <i>KIAA1549-BRAF</i> .....	20
6. Tissue microarrays (TMA) et étude immunohistochimique.....	20
7. Harmonisation des diagnostics histopathologiques selon la dernière classification OMS.....	23
8. Analyses statistiques.....	23
<b>Résultats</b> .....	25
1. Description des caractéristiques cliniques de la cohorte.....	25
2. Identification de deux sous-groupes moléculaires.....	27
3. Sous-groupe des gliomes diffus de la ligne médiane H3K27M-mutés.....	29
3.1. <i>Caractéristiques cliniques</i> .....	29
3.2. <i>Altérations moléculaires</i> .....	31
3.3. <i>Caractéristiques immunohistochimiques</i> .....	32
3.4. <i>Altérations chromosomiques</i> .....	34
3.5. <i>Comparaison gliomes H3F3A-mutés et HIST1H3B-mutés</i> .....	35
4. Sous-groupe des gliomes diffus de la ligne médiane histone non-mutés.....	36
5. Marqueurs pronostiques dans le sous-groupe des gliomes diffus H3K27M-mutés.....	37
<b>Discussion</b> .....	39
1. Caractérisation moléculaire et chromosomique des gliomes diffus de la ligne médiane H3K27M-mutés.....	40
2. Marqueurs pronostiques des gliomes diffus de la ligne médiane H3K27M-mutés.....	42
3. Gliomes diffus de la ligne médiane histone non mutés.....	44
4. Limites de l'étude.....	45
<b>Conclusion</b> .....	46
<b>Références</b> .....	47

## Résumé

**Contexte :** Les gliomes de la ligne médiane pédiatriques sont des pathologies rares, associées à un pronostic sombre. Les prélèvements dans cette région anatomique peu accessible ne sont pas systématiques. Ceci a longtemps limité la compréhension de leur biologie et les progrès thérapeutiques. En 2012, la découverte des mutations des gènes des histones H3 a révolutionné leur diagnostic. Ainsi, les gliomes diffus H3K27M-mutés sont associés à un pronostic encore plus péjoratif. Les résultats des essais cliniques restent aujourd'hui décevants. L'identification de marqueurs complémentaires dans ce sous-groupe apparaît nécessaire dans le but d'affiner leur pronostic et de proposer aux patients des traitements plus adaptés.

**Méthode :** Les patients inclus ont été opérés ou biopsiés entre 2001 et 2017. Les échantillons tumoraux ont été analysés par immunohistochimie (incluant H3K27me3, EGFR, c-MET et p53), séquençage haut-débit (panel à façon) et Comparative Genomic Hybridization array (aCGH). L'impact pronostique des altérations les plus fréquentes a été évalué par analyse univariée dans le sous-groupe des gliomes H3K27M-mutés.

**Résultats :** 49 patients ont été inclus dans l'étude. L'âge médian au diagnostic était de 9 ans et la médiane de survie globale de 9,4 mois. Les mutations de *H3F3A* et de *HIST1H3B* ont été identifiées dans 80% des tumeurs. Au sein du sous-groupe des gliomes H3K27M-mutés, la perte du 17p ( $p=0,008$ ), l'amplification de *PDGFRA* ( $p=0,010$ ) et un profil chromosomique complexe ( $p=0,044$ ) étaient significativement associés à une diminution de la survie globale.

**Conclusion :** cette étude a permis de décrire les altérations moléculaires et chromosomiques dans une cohorte de gliomes diffus de la ligne médiane, soulignant ainsi l'intérêt des biopsies pré-thérapeutiques. Trois marqueurs pronostiques ont été identifiés au sein du sous-groupe des gliomes diffus H3K27M-mutés : la perte du 17p, l'amplification de *PDGFRA* et un profil chromosomique complexe. Ces marqueurs sont détectés simplement par aCGH et pourraient présenter un intérêt dans le profil moléculaire de routine de ces gliomes.

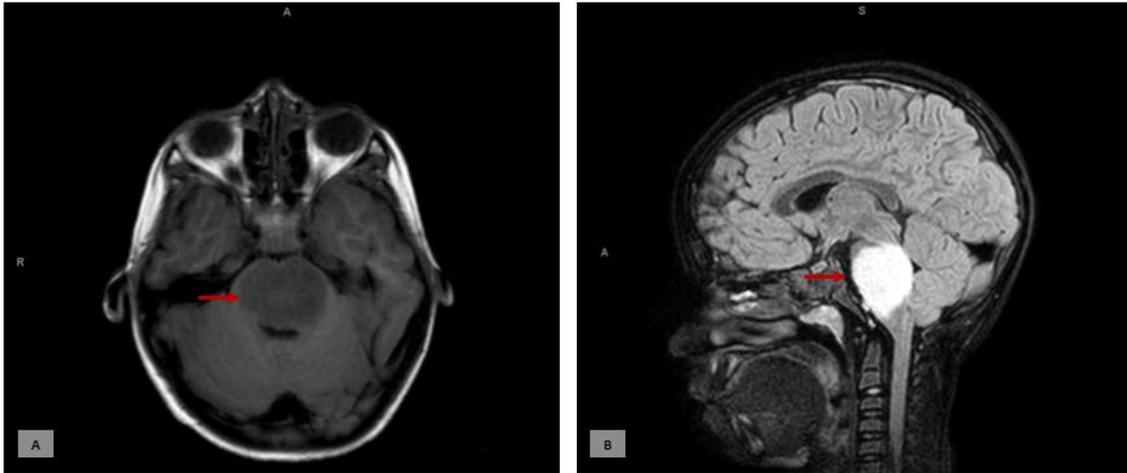
**Mots clés** : gliome de la ligne médiane pédiatrique ; profil moléculaire ; altérations chromosomiques ; mutations histones ; marqueurs pronostiques

## Introduction

Les tumeurs primitives du système nerveux central sont les secondes tumeurs les plus fréquentes de l'enfant et de l'adolescent (1). Tout âge confondu, les tumeurs gliales sont les plus fréquentes et 20% d'entre elles sont des gliomes de haut grade (2) (3). Plus de la moitié des gliomes de haut grade pédiatriques se situent sur la ligne médiane, essentiellement dans le tronc cérébral et le pont, mais également dans le cervelet, le thalamus, la glande pinéale ou la moelle épinière (4) (5). Ces lésions, définies comme les gliomes diffus de la ligne médiane, restent néanmoins rares avec une incidence annuelle de 2,32 cas pour 1 millions d'habitants (6) Elles concernent presque exclusivement les enfants et les jeunes adultes, avec un pic d'incidence entre 5 et 10 ans (4) (7) (8). Il s'agit de tumeurs extrêmement agressives dont la médiane de survie globale est estimée entre 9 et 12 mois (9).

Les gliomes diffus de la ligne médiane sont généralement révélés par des signes neurologiques d'aggravation rapide, développés en moins de quelques semaines (7) (10). Du fait de leur localisation, les gliomes diffus du pont associent classiquement une atteinte multiple des nerfs crâniens, un syndrome pyramidal ainsi qu'une ataxie (11). Le tableau clinique peut se compliquer par des signes d'hypertension intracrânienne liés à une hydrocéphalie par compression ventriculaire (7).

En imagerie, ces lésions sont le plus souvent volumineuses et peuvent infiltrer largement les structures environnantes. Les gliomes diffus du pont sont de localisation ventrale et envahissent typiquement plus de 50% du pont (10) (11). Leurs caractéristiques radiologiques sont illustrées figure 1.



**Figure 1. IRM cérébrale d'un enfant présentant des troubles de la marche et de l'oculomotricité depuis 1 mois.** Présence d'une volumineuse lésion pontique (flèche rouge), hétérogène et hypo-intense en séquence T1 (A, coupe axiale) et nettement hyper-intense en séquence T2 FLAIR (B, coupe sagittale).

La prise en charge thérapeutique de ces lésions est actuellement limitée. L'exérèse chirurgicale complète est en effet impossible en raison de leur caractère hautement infiltrant et de leur localisation critique sur la ligne médiane (8) (12). Les nombreux essais cliniques réalisés n'ont pas démontré la supériorité d'une chimiothérapie adjuvante ou néo-adjuvante, par rapport au traitement par radiothérapie seule (9) (11). Les patients sont donc essentiellement traités par radiothérapie, permettant d'améliorer leur symptomatologie dans trois quarts des cas (7). Cette prise en charge est palliative et ne prolonge la survie que de 3 à 4 mois (13).

Pendant de nombreuses années, le diagnostic a été uniquement porté sur l'association de critères clinico-radiologiques, sans preuve histologique formelle, compte tenu des risques inhérents au geste chirurgical et de l'issue invariablement fatale de la maladie (8) (14). De plus, les premières études ont été menées principalement sur des échantillons tumoraux post-mortem et post-thérapeutiques, possiblement remodelés par la radio-chimiothérapie (8) (14). Les caractéristiques

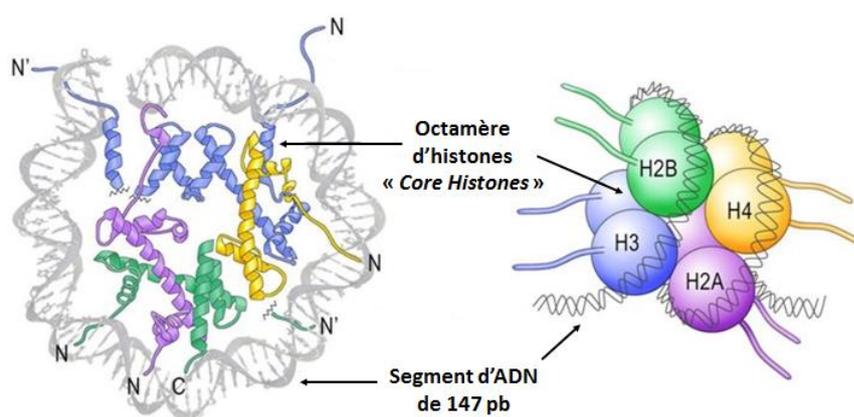
histologiques et moléculaires innées de ces lésions sont donc restées longtemps méconnues. Les progrès techniques d'imagerie et de neurochirurgie ont permis à plusieurs centres européens de mettre en place des protocoles de biopsies stéréotaxiques à partir des années 2000 (4) (7). Les biopsies stéréotaxiques sont désormais considérées comme un geste sûr, permettant d'obtenir dans la plupart des cas suffisamment de matériel tumoral pour étude anatomopathologique et caractérisation moléculaire complémentaires (7) (15).

Les gliomes diffus de la ligne médiane sont morphologiquement hétérogènes et ont été gradés de manière identique aux gliomes de l'adulte avant la mise à jour de la classification OMS des tumeurs du SNC en 2016. Plusieurs séries autopsiques ont décrit une prédominance de gliomes de haut grade, en particulier de glioblastomes (grade IV) (16) (17). Dans d'autres études menées sur échantillons biopsiques, les astrocytomes anaplasiques (grade III) étaient les lésions les plus fréquentes, suivis des glioblastomes (grade IV) et des astrocytomes de bas grade (grade II) (18) (19). Toutefois, contrairement aux lésions gliales de l'adulte, ces grades histologiques n'étaient corrélés ni à la clinique ni à la survie globale des patients (12) (16).

En 2012, l'identification d'une mutation récurrente K27M dans les gènes *H3F3A* et *HIST1H3B*, codant respectivement pour les variants H3.3 et H3.1 de la protéine histone H3 a été une avancée majeure dans la compréhension de cette pathologie (20) (21). Ces mutations surviennent de manière quasi-exclusive dans les gliomes diffus de la ligne médiane pédiatriques. Elles concernent jusqu'à 84% des gliomes diffus du pont et ont également été identifiées dans les gliomes diffus du thalamus, du cervelet, du troisième ventricule, de la glande pinéale et de la moelle

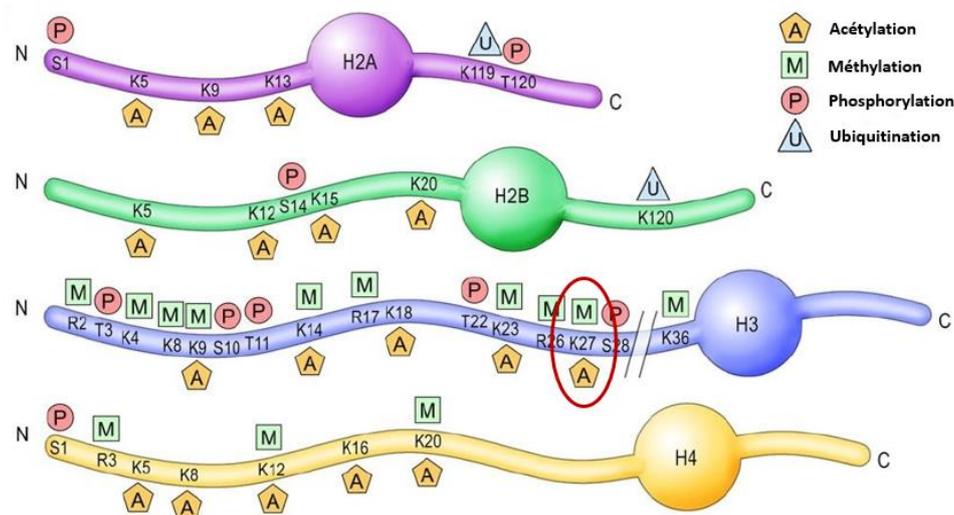
épinière (16) (22) (23) (24). Elles sont associées à un pronostic particulièrement défavorable et ont conduit à la définition d'une nouvelle entité correspondant aux « gliomes diffus de la ligne médiane, H3K27M-mutés », dans la nouvelle classification OMS 2016 des tumeurs du SNC (25). Ces lésions sont désormais d'emblée classées en gliome de grade IV, quel que soit leur aspect morphologique.

Sur le plan biologique, les protéines histones ont un rôle fondamental dans la compaction de l'ADN et l'organisation de la chromatine. Les histones H3, H2A, H2B et H4 (« core histones ») sont des protéines de petite taille (11 à 15 kDa), pouvant former un octamère autour duquel s'enroule un segment d'ADN d'environ 147 pb. Cette structure correspond au nucléosome, unité de base de la chromatine (26). Les histones ont un motif central « histone-fold », constitué de trois hélices  $\alpha$  reliées par deux boucles  $\beta$ , permettant la formation de l'octamère et la liaison à l'ADN. Les extrémités N-terminales des histones, dépourvues de conformation particulière, font protrusion à l'extérieur du nucléosome (figure 2) (26) (27).



**Figure 2. Structure du nucléosome.** Le nucléosome est constitué par un tétramère de H3-H4 et par deux dimères de H2A-H2B. Un segment d'ADN d'environ 147 pb s'enroule autour de cette structure. Les extrémités N-terminales des histones (N') font saillie à l'extérieur du nucléosome (d'après Gräff et Mansuy, Behavioural Brain Research, 2008 (28)).

Ces extrémités N-terminales, aussi appelées « queues » d'histones, sont riches en résidus lysine (K) et arginine (R). Elles sont soumises à de nombreuses modifications post-traductionnelles. En particulier, les résidus lysine peuvent être mono, bi ou triméthylés par des histones méthyltransférases (HMT) ou bien acétylés par des histones acétyltransférases (HAT). L'ensemble de ces modifications post-traductionnelles, détaillées figure 3, constitue le « code histone », impliqué dans la régulation épigénétique de l'expression des gènes (29).



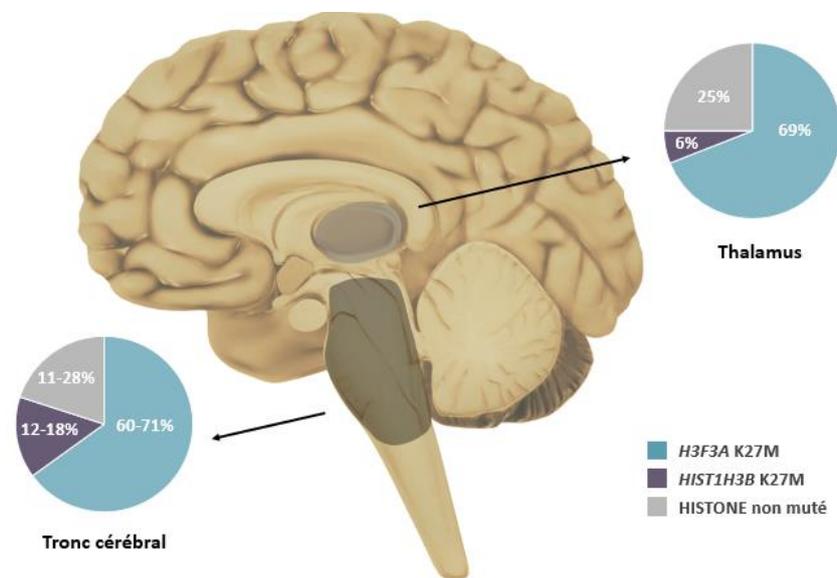
**Figure 3.** « Code histone ». Les extrémités N-terminales des histones peuvent subir des modifications post-traductionnelles sur les résidus lysine, arginine et sérine/thréonine. Ces modifications correspondent au code histone, lu par des protéines effectrices impliquées dans la régulation transcriptionnelle (d'après Gräff et Mansuy, Behavioural Brain Research, 2008 (28)).

L'histone H3 possède trois variants :

- L'histone H3.1 (forme canonique), codé par dix gènes regroupés en cluster, dont *HIST1H3B* et *HIST1H3C*
- L'histone H3.2 (forme canonique), codé entre autres par les gènes *HIST2H3A* et *HIST2H3C*
- Et l'histone H3.3, codé par les gènes *H3F3A* et *H3F3B* (16).

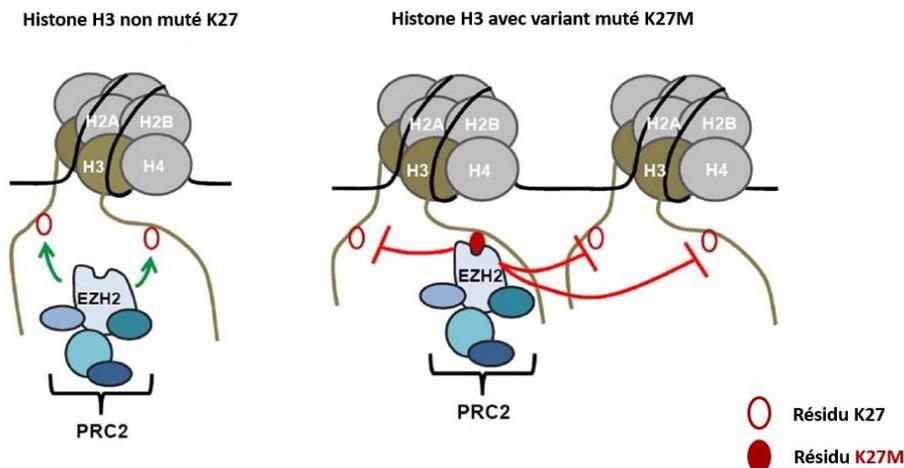
Ces trois variants, présents en quantité variable au sein des octamères d'histones, ont une séquence protéique extrêmement proche. Tous possèdent le résidu lysine 27 (K27) qui peut être bi ou triméthylé par la sous-unité méthyltransférase EZH2 (Enhancer of Zeste Homolog 2) du complexe PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2) (30) (31). Cette modification post-traductionnelle est associée à une répression transcriptionnelle dans la région génique ciblée (30) (32).

Les mutations entraînant la substitution de la lysine 27 par une méthionine (K27M) affectent essentiellement les gènes *H3F3A* et *HIST1H3B* (figure 5). Des mutations des gènes *HIST1H3C*, *HIST2H3A* et *HIST2H3C* ainsi que la substitution K27I du variant H3.3 ont été ponctuellement décrites (16) (22) (33).



**Figure 5. Répartition anatomique des mutations K27M des gènes *H3F3A* et *HIST1H3B*** (9) (34)  
Toute localisation confondue, les mutations d'*H3F3A* sont les plus fréquentes. La mutation du gène *HIST1H3B* est souvent associée aux lésions du tronc cérébral. Les autres localisations de la ligne médiane ne sont pas représentées en raison de la rareté des données dans la littérature.

Plusieurs études menées sur échantillons tumoraux et lignées cellulaires ont montré que la mutation K27M entraînait une diminution globale de la triméthylation du résidu K27 de l'histone H3 (H3K27me3) (30) (35) (36) (37). Bien que la mutation n'affecte qu'un seul variant d'H3 dans la cellule tumorale, la perte de triméthylation concerne l'ensemble des résidus H3K27, suggérant ainsi un effet dominant négatif. Le complexe PRC2 se lierait à la protéine histone H3 mutée, inhibant ainsi l'activité enzymatique de EZH2 figure 6 (36). Cette perte de H3K27me3 s'associe également à une hypométhylation globale de l'ADN. Ces deux marqueurs épigénétiques sont liés à une activation de l'expression génique et probablement à une activation des voies pro-tumorales dans les gliomes diffus de la ligne médiane (4) (36).



### Figure 6. Interactions entre l'histone H3 et l'enzyme EZH2

Le résidu K27 peut être bi ou triméthylé par EZH2. En cas de substitution de la lysine par une méthionine sur un des variants d'histone H3 de la cellule, EZH2 se lie au résidu méthionine. Son activité enzymatique est donc réduite, entraînant une perte de triméthylation sur l'ensemble des résidus H3K27 de la cellule (d'après Kallappagoudar et Yadav, Chromosoma, 2015 (38)).

Les mutations des histones n'expliquent pas à elles seules la tumorigenèse des gliomes diffus de la ligne médiane. Des mutations ponctuelles d'*ACVR1*, codant pour l'Activin A receptor type 1 ont aussi été identifiées dans 20 à 32% gliomes diffus du pont pédiatriques (39) (40). Elles sont significativement associées à la mutation

K27M de *HIST1H3B* et sont corrélées à un pronostic plus favorable. ACVR1 est un récepteur transmembranaire à activité sérine/thréonine kinase appartenant à la super famille des récepteurs TGF $\beta$ . Lorsqu'il est activé par liaison avec son ligand, il entraîne la phosphorylation des protéines SMAD et l'activation de la transcription de gènes cibles, impliqués notamment dans la prolifération cellulaire (4). Ces mutations, connues en pathologie constitutionnelle dans la fibrodysplasie ossifiante progressive, entraîneraient une activation constitutive du récepteur et une augmentation de la phosphorylation des protéines SMAD. Néanmoins, les conséquences exactes de ces modifications sont encore mal définies (4) (16).

Des mutations additionnelles de gènes plus souvent décrits en pathologie tumorale ont également été identifiées. Les gènes *TP53* ou *PPM1D* sont mutés dans respectivement 42 à 71% et 10 à 12% des gliomes diffus du pont et représentent conjointement la deuxième altération moléculaire la plus fréquente, juste après les mutations des gènes codant pour les histones H3 (9). *PPM1D* code pour la protéine Wip1 (Wild type p53-Induced Protein Phosphatase 1D) qui est capable d'inactiver p53 (41). L'étude de Zhang et al. a mis en évidence des mutations tronquantes récurrentes de l'exon 6, induisant un gain de fonction de la protéine dans les gliomes diffus thalamiques (42). Les altérations de *PPM1D*, en particulier des amplifications géniques ont été décrites dans le cancer du sein et les cancers colorectaux (41). *PPM1D* est donc considéré comme un très probable oncogène, dont les mutations sont équivalentes et mutuellement exclusives à celles de *TP53* (42). Des mutations de *PIK3CA/PIK3R1* sont quant à elles retrouvées dans environ 15% des gliomes diffus du pont (9) (43). *PIK3CA* et *PIK3R1* codent pour les deux sous-unités constituant la protéine kinase PI3K. *PIK3CA* est un oncogène connu de longue date, dont les mutations activatrices sont retrouvées dans de très nombreux types

tumoraux (44). *PIK3R1* serait en revanche considéré comme un gène suppresseur de tumeur, permettant de réguler l'activité de la sous-unité codée par *PIK3CA* (45).

Ainsi, autant le profil mutationnel de ces lésions a été largement décrit dans la littérature, autant les altérations chromosomiques ont été quelques peu délaissées. Avant 2012, plusieurs équipes ont tenté de caractériser les anomalies chromosomiques des gliomes pédiatriques de haut grade et en particulier des gliomes diffus du pont, par CGH ou SNP arrays (46) (47) (48) (49) (50). Elles ont mis en évidence des amplifications récurrentes de *PDGFRA* et d'*EGFR*, codant pour des récepteurs transmembranaires tyrosine kinase. Des anomalies de plus grande taille ont également été détectées telles que le +1q, le -10q, le -13q ou le -17p. Cependant, ces études ont été menées sur des cohortes hétérogènes. Une partie d'entre elles a regroupé les gliomes diffus du pont et les gliomes de haut grade hémisphériques. D'autres ont été exclusivement consacrées aux gliomes diffus du pont mais sans distinction entre les lésions histone H3 mutées ou non. A ce jour, il n'existe pas de données claires sur les altérations chromosomiques présentes dans le sous-groupe des gliomes diffus H3K27M-mutés, pourtant associés au pronostic le plus péjoratif dans les gliomes diffus de la ligne médiane.

De façon intéressante, Castel et al. ont montré en 2015 que parmi ces gliomes diffus H3K27M-mutés, ceux qui portaient la mutation d'*HIST1H3B* étaient moins agressifs et avaient une meilleure réponse aux traitements que les tumeurs avec mutation d'*H3F3A* (33). Cette étude suggère ainsi que le pronostic des gliomes H3K27M-mutés pourrait être modulé, d'autant qu'ils sont systématiquement classés en gliomes de grade IV selon l'OMS 2016. Cette perspective rejoindrait pleinement le

concept de « diagnostic intégré », introduit en 2016 par l'OMS et permettant de mieux caractériser une lésion en associant les données anatomo-pathologiques et moléculaires. L'identification de nouveaux marqueurs pronostiques, moléculaires ou chromosomiques au sein de ce sous-groupe pourrait donc permettre de mieux guider la prise en charge clinique des patients.

Les objectifs de cette étude étaient de :

- (i) Décrire les caractéristiques moléculaires, chromosomiques et immunohistochimiques d'une cohorte de gliomes diffus de la ligne médiane de l'enfant et du jeune adulte, naïfs de tout traitement
- (ii) De cibler plus précisément les gliomes diffus de la ligne médiane H3K27M-mutés et d'identifier de nouveaux marqueurs moléculaires ou chromosomiques permettant d'affiner leur pronostic.

## **Matériel et méthodes**

### **1. Sélection de la cohorte et des échantillons tumoraux**

Les patients ont été sélectionnés de manière rétrospective du 1<sup>er</sup> janvier 2001 au 31 mars 2017 sur des critères cliniques et radiologiques. Les patients inclus étaient des enfants ou des jeunes adultes ayant présenté une tumeur infiltrante de la ligne médiane (tronc cérébral, thalamus, cervelet, moelle épinière et glande pinéale), révélée par des signes neurologiques d'aggravation rapide et mise en évidence par l'imagerie cérébrale (IRM ou TDM cérébrale pour un des patients). Des prélèvements de la lésion par biopsie stéréotaxique ou exérèse chirurgicale ont été réalisés au Centre Hospitalier Universitaire de Lille (CHU de Lille), France, avant traitement par chimiothérapie et/ou radiothérapie. Le diagnostic anatomopathologique de gliome diffus (grade II à IV) a ensuite été établi, selon la classification OMS des tumeurs du SNC utilisée au moment du diagnostic.

Les données cliniques ont été recueillies pour chaque patient. Elles incluaient la date de naissance, le sexe, la date du diagnostic (considérée comme étant la date de biopsie stéréotaxique ou de chirurgie), la localisation tumorale ainsi que la date de décès ou la date des dernières nouvelles. Un consentement éclairé a été obtenu pour chaque patient. L'étude a été approuvée par le Comité de Protection des Personnes (CPP Nord-ouest). La base de données a fait l'objet d'une déclaration à la Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (CNIL).

Les échantillons tissulaires ont été pris en charge de façon standardisée : quand la quantité de matériel le permettait, une partie était congelée à -80° tandis que le reste de l'échantillon était fixé par le formol et inclus en paraffine.

Les blocs de paraffine ainsi que les lames colorées par l'HES et les lames d'IHC réalisées au moment du diagnostic ont été désarchivées. Les études immunohistochimiques ont été effectuées sur des prélèvements FFPE tandis que les études de biologie moléculaire ont été menées sur des échantillons congelés ou sur des échantillons FFPE. Les patients pour lesquels le matériel tumoral était insuffisant à la fois pour les analyses moléculaires et pour l'immunohistochimie (bloc épuisé, fragments trop exigus) ont été secondairement exclus de l'étude. De plus, un minimum de 50% de cellules tumorales par échantillon était requis pour réaliser les techniques de biologie moléculaire. Ce taux a été estimé pour chaque échantillon par un pathologiste sénior (FR) ou junior (CD) sur lame colorée par l'HES en évaluant le pourcentage total de tumeur dans l'échantillon, multiplié par le pourcentage de cellules tumorales au sein de la tumeur.

## **2. Extraction de l'ADN et de l'ARN tumoral**

Des copeaux de 10 à 30  $\mu\text{m}$  d'épaisseur ont été coupés à partir des blocs de paraffine ou des échantillons congelés. L'ADN génomique des échantillons tumoraux FFPE a été extrait à l'aide du kit QIAamp DNA FFPE Tissue (Qiagen, Courtabœuf, France) après une étape de déparaffinage par la Deparaffinization Solution (Qiagen). L'ADN des échantillons tumoraux congelés a été extrait à l'aide du kit Prepito DNA Cytosure (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis). La quantité d'ADN extraite a été dosée sur un spectrofluorimètre Xenius XC (Safas, Monaco) après marquage fluorescent des acides nucléiques par le kit Quant-it PicoGreen dsDNA assay (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis). L'ARN des échantillons tumoraux FFPE a été extrait à l'aide du kit RNeasy FFPE (Qiagen) et l'ARN des échantillons tumoraux congelés avec le kit Nucleospin RNA II (Macherey-

Nagel, Düren, Allemagne). La quantité d'ARN extraite a été évaluée sur un spectrophotomètre NanoDrop (ThermoFisher Scientific).

### 3. Séquençage haut-débit

Les gènes analysés en séquençage haut-débit ciblé, classés en fonction des caractéristiques fonctionnelles de la protéine codée sont détaillés dans le Tableau I.

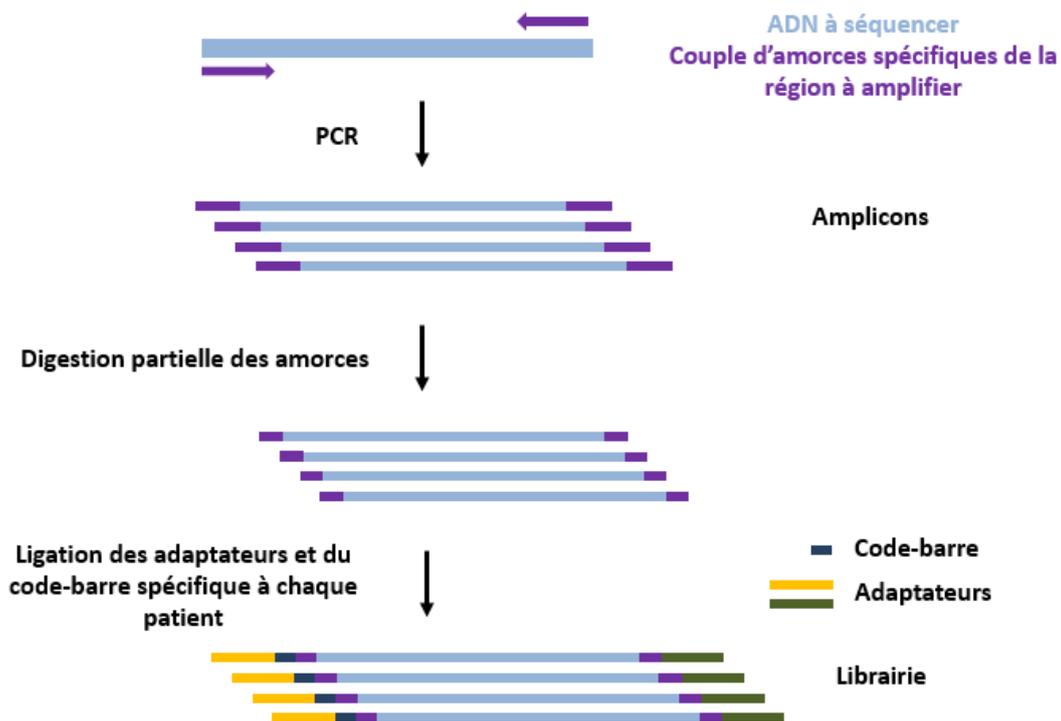
Fonctions / Voie activée	Gènes
<b>Remodelage de la chromatine</b>	<i>H3F3A, H3F3B, HIST1H3B, HIST1H3C, ATRX, ARID1A, ARID1B, ARID4A, ARID4B, SMARCA4, HIRA, UBN1, CABIN1, UTX, SETD2, SUZ12</i>
<b>IDH1/2</b>	<i>IDH1, IDH2</i>
<b>Récepteurs tyrosine kinase</b>	<i>ALK, DDR2, EGFR, ERBB2, ERBB4, FGFR1, FGFR2, FGFR3, KIT, MET, PDGFRA</i>
<b>Protéine G</b>	<i>GNA11, GNAQ, GNAS</i>
<b>Voie des MAP/kinases</b>	<i>AKT1, BRAF, HRAS, KRAS, NRAS, MAP2K1, PIK3CA, PIK3R1, PTEN</i>
<b>Voie du TGF</b>	<i>ACVR1, SMAD4</i>
<b>Voie NOTCH</b>	<i>NOTCH1, FBXW7</i>
<b>Cycle cellulaire et apoptose</b>	<i>ATM, CHEK2, DAXX, TP53, PPM1D</i>
<b>Facteurs de transcription</b>	<i>MYC, MYCN, MAX,</i>
<b>Autres</b>	<i>CTNNA2, CTNNB1, MED12, RECQL5, STK11</i>

**Tableau I. Liste des gènes ciblés en séquençage haut débit, classés selon les caractéristiques fonctionnelles de la protéine codée**

Les séquences des amorces permettant d'amplifier les régions d'intérêt ont été déterminées grâce au logiciel Ion AmpliSeq Designer (ThermoFisher Scientific).

Les bibliothèques pour chaque patient ont été réalisées à partir de 10 ng d'ADN, à l'aide du kit Ion Ampliseq Library 2.0 (ThermoFisher Scientific). Les régions d'intérêt

ont été amplifiées par PCR grâce aux couples d'amorces spécifiques préalablement conçues, permettant ainsi d'obtenir des amplicons. Après digestion des amorces, des adaptateurs ainsi qu'un code barre spécifique à chaque patient ont été ajoutés aux amplicons en utilisant le kit Ion Xpress Barcode Adapters (ThermoFisher Scientific). Ces différentes étapes sont schématisées figure 7.



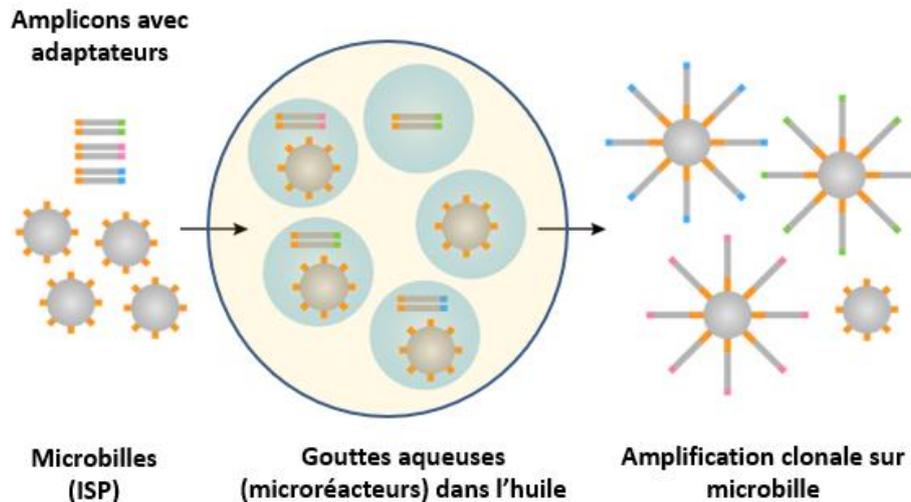
**Figure 7. Etapes initiales du séquençage haut-débit :** constitution de la librairie (ensemble des régions d'intérêt amplifiées) pour chaque patient

La qualité et la quantité d'ADN obtenu pour chaque librairie ont été évaluées sur la TapeStation 2200 (Agilent Technologies, Santa Clara, Californie, Etats-Unis) à l'aide du test High Sensitivity D1000 ScreenTape (Agilent Technologies). Après normalisation, les librairies ont été regroupées.

Les librairies ont ensuite subi une étape d'amplification clonale sur des microbilles (Ion Sphere Particles, ISP) par PCR en émulsion. Ce processus est

illustré figure 8. La PCR se déroule dans l'huile, au sein d'une microbille aqueuse renfermant idéalement un amplicon avec adaptateurs, une microbille ISP recouverte par des amorces complémentaires à la séquence de l'un des adaptateurs, une ADN polymérase ainsi que des dNTP. Les fragments d'ADN amplifiés, liés à la surface des microbilles ISP ont ensuite été chargés sur une puce de séquençage. L'ensemble de ces étapes a été effectué sur un Ion Chef Instrument (ThermoFisher Scientific) à l'aide des kits Ion 540 Kit-Chef ou Ion PI Hi-Q Chef. Le séquençage a été réalisé sur un séquenceur Ion S5 XL ou sur un séquenceur Ion Proton (ThermoFisher Scientific), capables de détecter des différences de potentiel, liées à l'émission de proton après incorporation d'un nucléotide donné.

Chaque run incluait un témoin positif, un témoin négatif ainsi qu'un témoin vide afin de contrôler la qualité de la technique et détecter une éventuelle contamination. Les données ont été analysées par le logiciel Torrent Suite v.5.2.2 (ThermoFisher Scientific). Les variants ont été identifiés à l'aide de paramètres optimisés puis annotés et classés grâce au Variant Effect Predictor. La profondeur minimale requise était de 300 lectures pour une région séquencée donnée. La qualité de la couverture a également été prise en compte dans l'interprétation des résultats. Seuls les variants présents avec une fréquence d'au moins 5% ont été retenus. Leur pathogénicité a été précisée grâce aux bases de données <http://www.cbioportal.org> ou <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>.



**Figure 8. Déroulement de la PCR en émulsion**

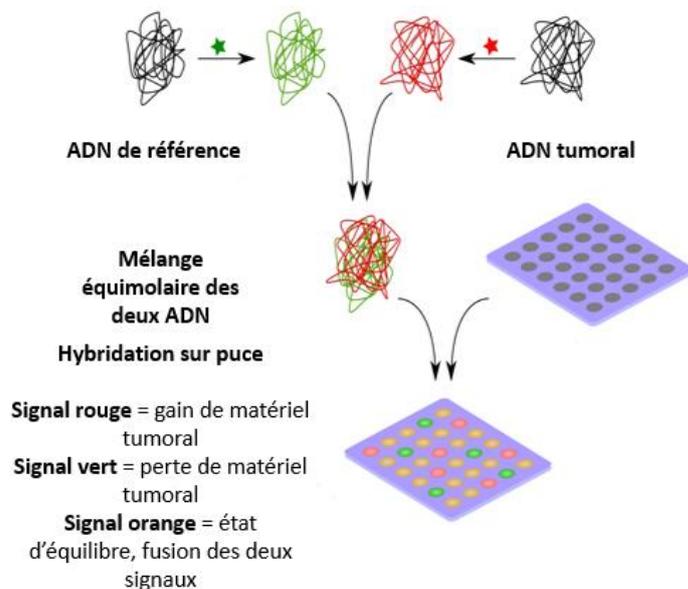
Chaque goutte aqueuse renferme idéalement un amplicon, amplifié de façon clonale sur une microbille (ISP) (d'après <https://www.atdbio.com>).

#### **4. Comparative Genomic Hybridization array (aCGH) / Analyse Comparative sur Puce à ADN (ACPA)**

L'ADN extrait des tissus tumoraux congelés ainsi que l'ADN de référence (Promega, Wisconsin, Etats-Unis) ont été digérés par des enzymes de restriction (Rsa1 et Alu1) à l'aide du kit SureTag DNA Labeling (Agilent Technologies, Californie, Etats-Unis). L'ADN extrait des tissus FFPE était déjà fragmenté et ne nécessitait pas de digestion enzymatique préalable.

L'ADN tumoral et l'ADN de référence ont été marqués par des fluorophores, respectivement par la cyanine 5-dUTP (signal rouge) et la cyanine 3-dUTP (signal vert). L'ADN marqué a été purifié afin d'éliminer les nucléotides fluorescents non incorporés. La qualité du marquage fluorescent a été évaluée avec un spectrophotomètre NanoDrop (ThermoFisher Scientific). Après mélange équimolaire (500 ng), l'ADN tumoral et l'ADN de référence ont été co-hybridés sur une puce SurePrint G3 Human CGH Microarrays 8 x 60 k (Agilent Technologies).

Le principe de l'hybridation sur puce est détaillé figure 9. Les puces utilisées renferment 60 000 sondes oligonucléotidiques différentes, correspondant chacune à un locus précis et couvrant de façon large l'intégralité du génome. Sur chaque puce, un ADN tumoral et un ADN de référence peuvent être testés. Les deux ADN s'hybrident de manière compétitive sur chaque sonde : en cas de gain de matériel tumoral dans une région donnée, l'ADN tumoral s'hybride de manière préférentielle avec les sondes. De la même façon, en cas de perte de matériel tumoral, l'ADN de référence s'hybride cette fois-ci préférentiellement avec les sondes. La couleur des signaux fluorescents émis varie donc en fonction de la quantité relative d'ADN tumoral et d'ADN de référence hybridé pour chaque sonde donnée.



**Figure 9. Principes généraux de la Comparative Genomic Hybridization array (aCGH)**

L'ADN de référence et l'ADN tumoral, présents en quantité équimolaire sont déposés sur puce et s'hybrident de manière compétitive sur chaque sonde oligonucléotidique.

Après 40h d'incubation, les lames ont été lavées puis scannées sur un scanner Agilent SureScan Microarray (Agilent Technologies), capable de détecter la fluorescence émise au niveau de chaque sonde oligonucléotidique. Les images scannées ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel CytoGenomics v.3.0.2.11

(Agilent Technologies) avec un algorithme ADM-2, un filtre à 0,25 et un seuil de détection de fluorescence à 6. Les résultats étaient exprimés en ratio selon un logarithme de base 2. En cas d'hybridation en quantité égale d'ADN tumoral et d'ADN de référence, soit un ratio égal à 1, l'utilisation du log 2 permet d'obtenir une valeur de référence égale à 0. La DLRS (derivative log ratio spread) est une variable statistique calculée pour chaque échantillon, correspondant à la dispersion des sondes. La difficulté d'interprétation des données augmente avec la valeur de la DLRS. Un compte-rendu d'aCGH avec une valeur de DLRS > 0,6 a de ce fait été considéré comme non interprétable.

#### **5. Transcrit de fusion *KIAA1549-BRAF***

Une recherche de transcrit de fusion *KIAA1549-BRAF* a été menée pour les cas initialement diagnostiqués en gliome de grade II dont l'un des diagnostics différentiels est l'astrocytome pilocytique. Après extraction d'ARN, l'ADN complémentaire a été synthétisé à l'aide du kit SuperScript VILO cDNA Synthesis (ThermoFisher Scientific). Les potentiels variants du transcrit de fusion *KIAA1549-BRAF* ont été amplifiés par PCR avec des paires d'amorces encadrant les différents points de fusion possible des gènes *KIAA1549* et *BRAF*. Les produits de PCR ont ensuite été analysés après dépôt sur gel d'agarose à 2% et électrophorèse.

#### **6. Tissue microarrays (TMA) et étude immunohistochimique**

Les blocs de TMA ont été conçus à l'aide d'un tissue arrayer automatique (MiniCore, Excilone, France) prélevant des carottes de 1 mm de diamètre à partir des blocs d'intérêt. Les blocs de TMA contenaient une à six carottes des zones tumorales les plus représentatives de vingt-neuf cas de gliomes diffus de la ligne médiane. Ces

blocs comportaient également des témoins externes : deux échantillons de tissu cérébral non tumoral, deux échantillons de gliomes diffus hémisphériques pédiatriques, huit échantillons d'astrocytomes pilocytiques ou de gangliogliomes ainsi qu'un échantillon de gliome de haut grade de l'adulte. Une lame colorée par l'HES a été réalisée pour chaque bloc de TMA afin d'évaluer la qualité des carottes. Quand le matériel était insuffisant pour carottage et inclusion en TMA, l'immunohistochimie était réalisée sur lames entières.

L'expression des marqueurs suivants a été étudiée : la triméthylation de l'histone H3 sur le résidu lysine 27 (H3K27me3), IDH1<sup>R132H</sup>, p53, EGFR, c-MET, Olig2, INI1 et BRG1.

L'ensemble des réactions immunohistochimiques a été réalisé sur un automate Benchmark Ultra (Ventana Roche, Etats-Unis). Les prélèvements, coupés à 5 µm d'épaisseur à partir des blocs de paraffine, ont été étalés sur lame et ont subi une première étape de déparaffinage au xylène. Les sites antigéniques, modifiés par la fixation par le formol par formation de ponts méthylènes, ont ensuite été démasqués, soit par méthode enzymatique (Protéase 2 : P2), soit par la chaleur dans un tampon (CC1 ou CC2). Les lames ont été incubées à 37°C avec l'anticorps primaire pendant 32 ou 16 minutes puis les réactions ont été détectées à l'aide des kits de révélation Ultra View (Ventana Roche), colorant en marron les sites antigéniques ayant fixé l'anticorps primaire par dépôt de diaminobenzidine (DAB). Enfin, les lames ont été contre-colorées à l'hématoxyline afin de pouvoir apprécier la morphologie du prélèvement.

Les différentes caractéristiques des anticorps utilisés ainsi que les modalités techniques des réactions immunohistochimiques sont détaillées dans le tableau II.

Anticorps	Fabricant	Clone	Dilution	Hôte	Démasquage	Incubation
<b>H3K27me3</b>	Diagenode	Polyclonal	1:750	Lapin	CC1	32 minutes
<b>IDH1 R132H</b>	Dianova	H09	1:40	Souris	CC1	32 minutes
<b>p53</b>	Dako	DO-7	1:100	Souris	CC1	32 minutes
<b>EGFR</b>	Invitrogen	31G7	1:20	Souris	P2	32 minutes
<b>c-MET</b>	Ventana Roche	SP44	Prédilué	Lapin	CC1	16 minutes
<b>INI1</b>	Biosciences	25/BAF47	1:50	Souris	CC2	32 minutes
<b>BRG1</b>	Abcam	EPNCIR111A	1:100	Lapin	CC2	32 minutes

**Tableau II. Caractéristiques techniques des anticorps utilisés**

Pour chaque réaction immunohistochimique réalisée, un témoin externe a été ajouté sur la lame.

Un marquage nucléaire était considéré comme positif pour Olig2 et un marquage cytoplasmique comme positif pour IDH1<sup>R132H</sup>. Pour p53, un marquage nucléaire d'intensité faible à modérée de quelques cellules tumorales correspondait à un marquage normal tandis qu'une absence totale de marquage ou un marquage nucléaire d'intensité forte et diffus des cellules tumorales correspondaient à une expression anormale de la protéine. L'expression d'EGFR et de c-MET a été évaluée comme négative ou positive en utilisant le score suivant, avec un seuil de positivité à 150 : 1 x (% de cellules 1+) + 2 x (% de cellules 2+) + 3 x (% de cellules 3+). Les scores 1+, 2+ et 3+ correspondaient à l'intensité du marquage membranaire, respectivement faible, modérée et intense. L'expression nucléaire de H3K27me3,

INI1 et BRG1 a été évaluée comme maintenue ou perdue.

Un pathologiste sénior (FR) et un pathologiste junior (CD) ont analysé de manière indépendante les lames d'immunohistochimie. En cas de divergence ou de difficultés d'interprétation, les cas étaient revus au microscope multi-tête et discutés avec un troisième pathologiste (CAM) afin d'établir un consensus.

## **7. Harmonisation des diagnostics histopathologiques selon la dernière classification OMS**

Les diagnostics initiaux ont été revus en intégrant les données moléculaires du séquençage haut-débit (statut *IDH* mutant ou *H3F3A/HIST1H3B* mutant) et la présence ou non d'un transcrite de fusion *KIAA1549-BRAF*, en accord avec la classification OMS 2016 des tumeurs du SNC. Les patients ont ainsi été secondairement exclus si leur tumeur était reclassée en astrocytome pilocytique ou en gliome diffus *IDH*-muté.

## **8. Analyses statistiques**

Les variables catégorielles ont été exprimées en fréquence (pourcentage) et les variables continues en médiane (étendue). La survie globale a été estimée avec la méthode de Kaplan-Meier. Au sein du sous-groupe des gliomes diffus H3K27M-mutés, la distribution des altérations chromosomiques et moléculaires entre les gliomes mutés *H3F3A* et ceux mutés *HIST1H3B* a été comparée avec un test exact de Fisher. Le test exact de Fisher a également été utilisé pour comparer les altérations moléculaires et chromosomiques entre les sous-groupes des gliomes H3K27M-mutés et histone non mutés. Dans le sous-groupe des gliomes H3K27M-mutés, l'association des altérations chromosomiques et moléculaires avec la survie

globale a été évaluée avec un test du Log rank. Aucune comparaison statistique n'a été effectuée pour les variables dont la fréquence était inférieure à cinq évènements. Il n'a pas pu être réalisé d'analyse multivariée compte-tenu de l'effectif. Pour l'ensemble des tests statistiques, une valeur du p strictement inférieure à 0,05 a été considérée comme statistiquement significative. Les données statistiques ont été traitées avec le logiciel SAS software package, v. 9.4 (SAS Institute, Cary, Caroline du Nord, Etats-Unis).

## Résultats

### 1. Description des caractéristiques cliniques de la cohorte

Parmi les soixante-cinq patients initialement éligibles, quarante-neuf patients ont été finalement inclus (figure 10). La mise en évidence d'une mutation d'*IDH1*<sup>R132H</sup> ou d'*IDH2*<sup>R172S</sup> dans trois tumeurs a permis de les reclasser en gliomes diffus *IDH*-mutés. Un transcrite de fusion *KIAA1549-BRAF* a été détecté dans deux échantillons, permettant ainsi de poser le diagnostic d'astrocytome pilocytique.

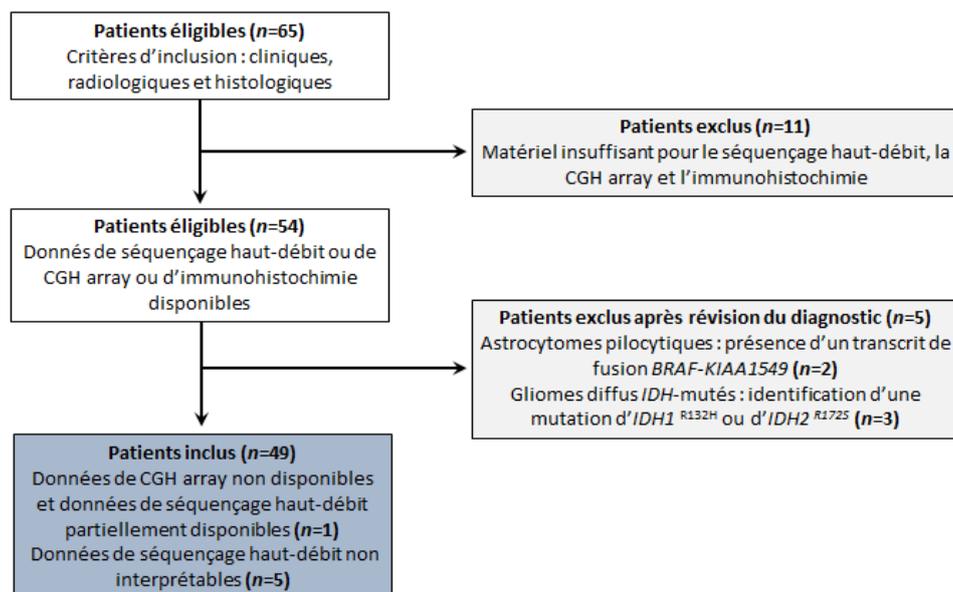


Figure 10. Diagramme de flux de l'étude

La cohorte comprenait vingt-huit sujets de sexe masculin (57,1%) et vingt-et-un sujets de sexe féminin (42,9%), correspondant à un sex-ratio (H/F) de 1,3. L'âge médian au diagnostic était de 9 ans (1 à 22 ans). A la fin de l'étude, 89,6% des patients étaient décédés (n=43). La médiane de survie globale était de 9,4 mois (EIQ 4,6 ; 17).

Trente-trois tumeurs (67,3%) étaient exclusivement localisées dans le tronc cérébral. Onze autres tumeurs (22,5%) étaient situées sur la ligne médiane hors tronc cérébral et intéressaient le thalamus, le troisième ventricule, le cervelet, la moelle épinière ou bien la glande pinéale. Enfin, cinq tumeurs (10,2%) infiltraient à la fois le tronc cérébral et le thalamus.

Avant harmonisation du diagnostic histopathologique à l'aide des données de séquençage haut-débit, quatorze tumeurs avaient initialement été classées en gliome diffus de grade IV (28,6%), vingt-quatre tumeurs en gliome diffus de grade III (49,0%), une tumeur en gliome diffus de grade III-IV (2,0%) et dix tumeurs en gliome diffus de grade II (20,4%).

Ces données sont résumées dans le tableau III.

<b>Caractéristiques cliniques (n=49)</b>		
<b>Sexe</b>	<b>Masculin</b>	28 (57,1%)
	<b>Féminin</b>	21 (42,9%)
<b>Localisation</b>	<b>Tronc cérébral exclusivement</b>	33 (67,3%)
	<b>Ligne médiane (autres)</b>	11 (22,5%)
	<b>Tronc cérébral et thalamus</b>	5 (10,2%)
<b>Grade histologique</b>	<b>IV</b>	14 (28,6%) 1 tumeur grade III-IV (2,0%)
	<b>III</b>	24 (49,0%)
	<b>II</b>	10 (20,4%)
<b>Age au diagnostic (année)</b>		9 (1 à 22)

**Tableau III. Caractéristiques clinico-pathologiques des 49 patients inclus dans l'étude** : les données sont exprimées en fréquence (pourcentage) ou en médiane (écart).

## 2. Identification de deux sous-groupes moléculaires

Les résultats des études moléculaire, chromosomique et immunohistochimique sont détaillés pour chaque patient dans la figure 11. Les données de NGS n'étaient pas interprétables pour cinq patients. Pour un autre patient, les données de séquençage n'étaient que partiellement disponibles et l'ACPA n'a pas pu être réalisée par manque de matériel tumoral.

La mutation du gène *H3F3A* K27M a été identifiée dans vingt-huit tumeurs (63,6%) et la mutation du gène *HIST1H3B* K27M dans sept autres tumeurs (15,9%). Ces tumeurs ont donc été reclassées en **gliomes diffus de la ligne médiane H3K27M-mutés**, selon la classification OMS 2016 des tumeurs du SNC. De plus, il n'a pas été mis en évidence de mutation des gènes *H3F3B* ni *HIST1H3C*.

Neuf tumeurs (20,5%) ne présentaient pas de mutation des gènes codant pour les histones. Par conséquent, elles ont été définies comme les **gliomes diffus histones non mutés**. Une perte de H3K27me3 en immunohistochimie sans mise en évidence d'une mutation de *H3F3A* ou de *HIST1H3B* n'a pas été considérée comme un argument suffisant pour poser le diagnostic de gliome diffus de la ligne médiane H3K27M-muté. En effet, selon la classification OMS 2016, cette entité est strictement définie par la présence d'une mutation d'un des gènes codant pour les histones H3.



**Figure 11. Altérations moléculaires, chromosomiques et immunohistochimiques des 49 tumeurs étudiées.** La première catégorie correspond à la localisation tumorale, la suivante aux altérations des gènes histones H3 suivie des différentes mutations détectées, des anomalies immunohistochimiques et des altérations chromosomiques. Les cases grises correspondent aux données non disponibles ou non interprétables.

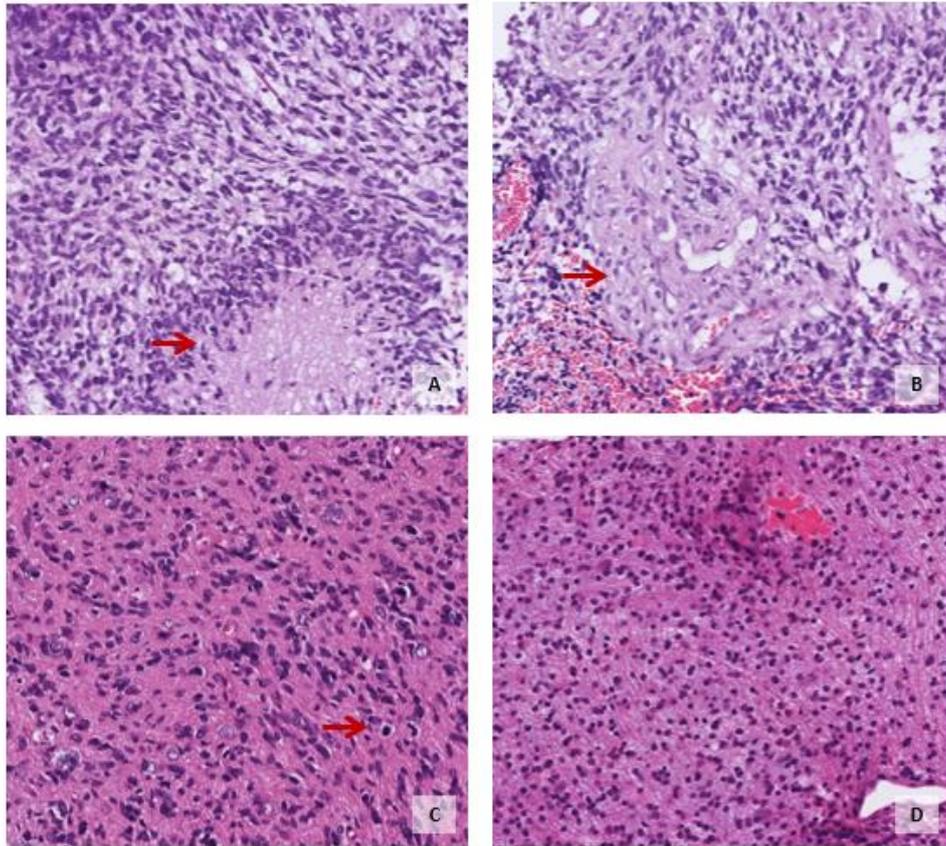
### **3. Sous-groupe des gliomes diffus de la ligne médiane H3K27M-mutés**

Au total, trente-cinq tumeurs (79,5%) présentaient une mutation des gènes *H3F3A* ou *HIST1H3B* (figure 11).

#### **3.1. Caractéristiques cliniques**

Dans ce sous-groupe, l'âge médian au diagnostic était de 9 ans (3 à 22 ans) et la médiane de survie globale de 7,9 mois (EIQ 3,8 ; 13,9). Vingt-trois tumeurs (65,7%) étaient exclusivement localisées au tronc cérébral tandis que huit autres tumeurs (22,9%) intéressaient d'autres structures de la ligne médiane. Quatre tumeurs (11,4%) s'étendaient à la fois au tronc cérébral et au thalamus.

Avant harmonisation du diagnostic histopathologique, douze tumeurs avaient initialement été classées en gliome diffus de grade IV (34,3%), dix-huit tumeurs en gliome diffus de grade III (51,4%) et cinq autres tumeurs en gliome diffus de grade II (14,3%). La figure 12 illustre l'aspect microscopique des gliomes diffus H3K27M-mutés inclus dans l'étude.



**Figure 12. Gliomes diffus de la ligne médiane, H3K27M-mutés, selon l'OMS 2016**

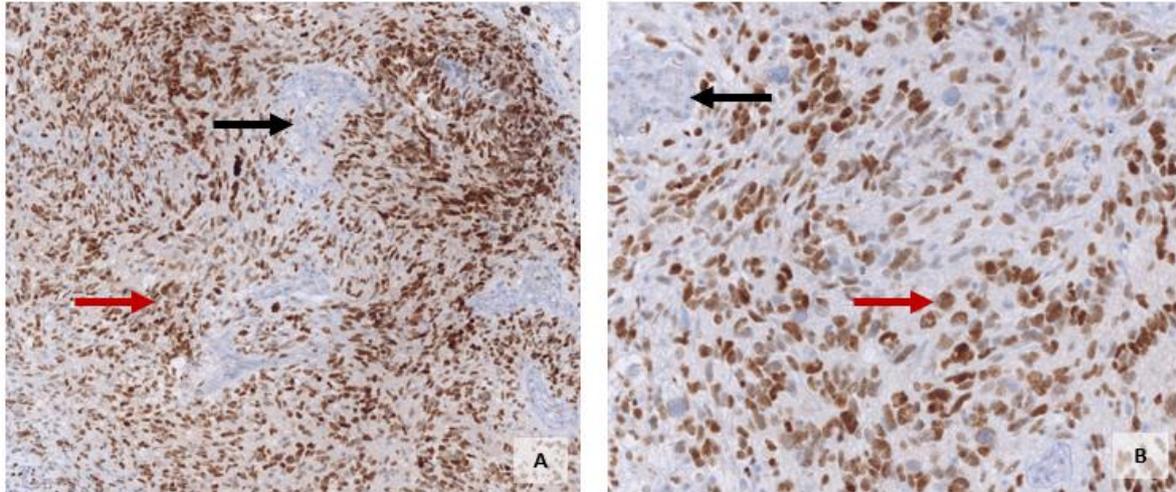
**A et B.** Gliome diffus avec une cellularité élevée et des cellules tumorales au noyau volumineux, hyperchromatique et irrégulier. La flèche rouge indique un foyer de nécrose palissadique (HES, 200x). **B.** Prolifération endothéliocapillaire d'aspect gloméruloïde (flèche rouge) (HES, 200x). Cette tumeur a les caractéristiques morphologiques d'un glioblastome (grade IV) mais la présence d'une mutation H3K27M la classe en gliome diffus de la ligne médiane, H3K27M-muté, grade IV.

**C.** Gliome diffus avec une cellularité élevée et des cellules tumorales atypiques. Des mitoses sont visibles (flèche rouge). Absence de nécrose palissadique et de prolifération endothéliocapillaire (HES, 200x). Cette tumeur a les caractéristiques morphologiques d'un astrocytome anaplasique (grade III) mais la présence d'une mutation H3K27M la classe en gliome diffus de la ligne médiane, H3K27M-muté, grade IV.

**D.** Gliome diffus modérément cellulaire. Les cellules tumorales sont discrètement atypiques. Absence de mitose, de nécrose et de prolifération endothéliocapillaire (HES, 200x). Cette tumeur a les caractéristiques morphologiques d'un astrocytome diffus (grade II) mais la présence d'une mutation H3K27M la classe en gliome diffus de la ligne médiane, H3K27M-muté, grade IV.

### 3.2. Altérations moléculaires

Vingt-trois tumeurs (65,7%) étaient caractérisées par une altération de la voie de p53, définie par une mutation de *TP53* ou de *PPM1D* ou par une expression anormale de la protéine p53 en IHC (figure 13).



**Figure 13. Expression immunohistochimique anormale de p53**

**A.** (IHC, 100x) et **B.** (IHC, 200x) : marquage nucléaire intense et diffus des cellules tumorales (flèches rouges). Les cellules endothéliales, non marquées, sont considérées comme des témoins internes négatifs (flèches noires).

Des mutations de *PIK3CA* et de *PIK3R1* ont été mises en évidence dans cinq tumeurs (14,3%) et des mutations d'*ACVR1* dans quatre tumeurs (11,8%).

D'autres mutations plus rares ont été détectées. Une mutation de *BRAF* (V600E) a été identifiée dans deux tumeurs (5,7%), associée dans les deux cas à une mutation de *H3F3A* K27M. Des mutations de gènes codant pour des récepteurs tyrosine kinase ont également été mises en évidence : *FGFR1* (n=2 ; 5,7%), *PDGFRA* (n=1 ; 2,9%), *EGFR* (n=1 ; 2,9%), sans surexpression d'EGFR en immunohistochimie et *KIT* et *MET*, conjointement dans la même tumeur (n=1 ; 2,9%).

Une mutation de *MED12* a été identifiée dans deux tumeurs (5,7%), avec pour l'une

d'entre elles une mutation de *MAX* supplémentaire (2,9%). Le détail de ces résultats figure dans le tableau IV.

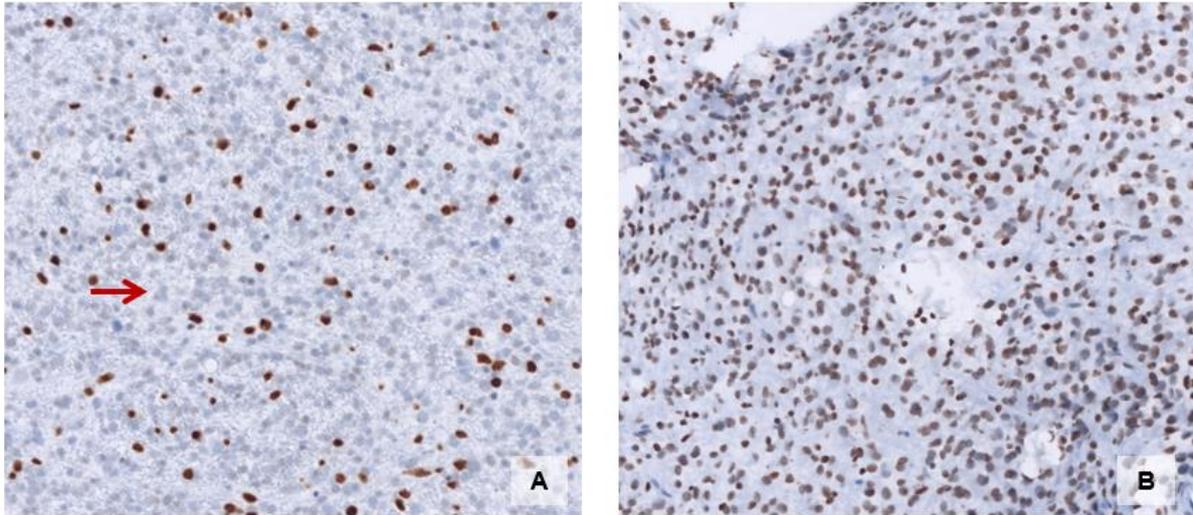
Gène	Transcrit	Variant nucléotidique	Variant protéique	Fréquence allélique
<i>FGFR1</i>	NM_023110	C.1638C>A	p.Asn546Lys	33,55%
<i>FGFR1</i>	NM_023110	c.1966A>G	p.Lys656Glu	68,18%
<i>PDGFRA</i>	NM_006206	c.704G>T	p.Cys235Phe	69,59%
<i>EGFR</i>	NM_005228	c.1793G>T	p.Gly598Val	6,86%
<i>KIT</i>	NM_000222	c.1727T>C	p.Leu576Pro	17,84%
<i>MET</i>	NM_001127500	c.3683G>A	p.Cys1228Tyr	8,72%
<i>MED12</i>	NM_005120	c.107T>G	p.Leu36Arg	21,85%
<i>MED12</i>	NM_005120	c.4282G>A	p.Val1428Met	5,52%
<i>MAX</i>	NM_002382	c.179G>A	p.Arg60Gln	14,16%

Tableau IV. Liste des variants rares identifiés par séquençage haut-débit

### 3.3. Caractéristiques immunohistochimiques

L'expression des protéines INI1 et BRG1 était conservée pour l'ensemble des tumeurs testées, éliminant ainsi un diagnostic éventuel de tumeur rhabdoïde térétoïde atypique (ATRT). De plus, toutes ces lésions, sauf deux, présentaient une expression nucléaire diffuse de la protéine Olig2, apportant un argument supplémentaire pour le diagnostic de gliome diffus.

Tous les gliomes avec mutation de *H3F3A* et de *HIST1H3B* étaient caractérisés par une perte de H3K27me3 en IHC (figure 14).

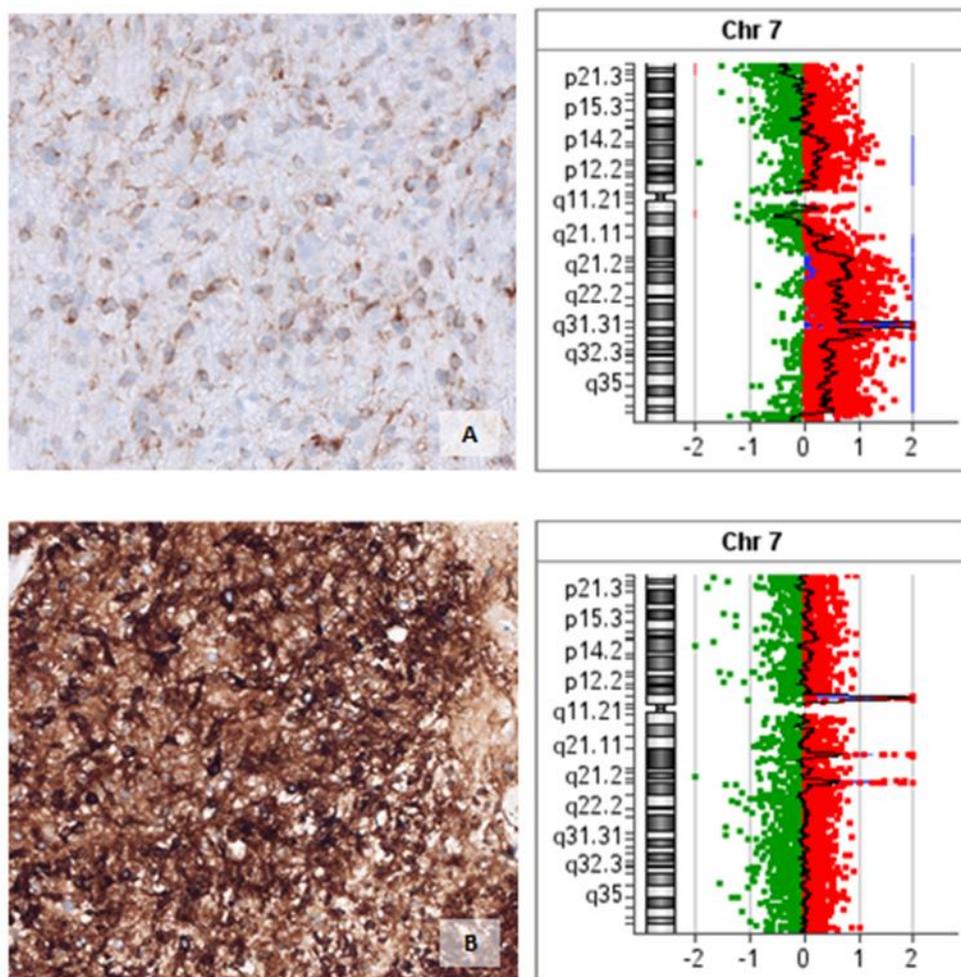


**Figure 14. Exemples représentatifs d'immunohistochimie H3K27me**

**A. Perte de H3K27me3 :** perte d'expression de H3K27me3 dans les noyaux des cellules tumorales (flèche rouge). Les noyaux marqués correspondent à des lymphocytes non tumoraux (IHC, 200x).

**B. Conservation de H3K27me3 :** à titre de comparaison, conservation de l'expression de H3K27me3 par les cellules tumorales d'un gliome diffus de la ligne médiane, histone non muté (IHC, 200x).

Une surexpression d'EGFR a été mise en évidence dans huit tumeurs (22,9%) avec une amplification d'*EGFR* pour l'une d'entre elles (figure 15). Une surexpression de c-MET a été détectée dans deux autres tumeurs (5,7%). Cette surexpression était en lien avec une amplification de *MET* pour l'une des deux tumeurs (figure 15).



**Figure 15. Surexpression de c-MET et d'EGFR et corrélation avec les données d'aCGH**

**A.** Surexpression de c-MET (IHC 200x) avec un score de 160 (80% de cellules marquées x 2+ en intensité) et amplification de *MET* en 7q31.2 (aCGH, DLRS = 0,36)

**B.** Surexpression d'EGFR (IHC, 200x) avec un score de 300 (100% de cellules tumorales marquées x 3+ en intensité) et amplification d'*EGFR* en 7p11.2 (aCGH, DLRS = 0,34)

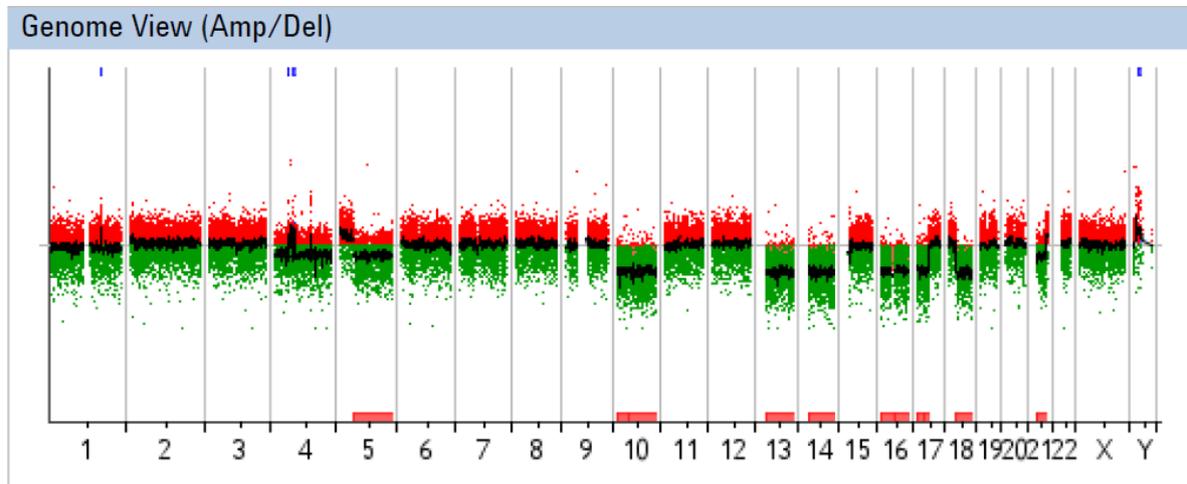
### 3.4. Altérations chromosomiques

Les altérations chromosomiques les plus fréquentes étaient : le +1q (44,1%), le -5q (29,4%), le -10q (44,1%), le -11q (26,5%), le -13 (41,2%), le -14 (52,9%), le -16q (35,3%) et le -17p (26,5%). De manière intéressante, un profil chromosomique complexe (avec au moins cinq chromosomes présentant des anomalies du nombre de copies) était mis en évidence dans vingt-quatre tumeurs (70,6%). Un exemple de profil chromosomique complexe est présenté figure 16.

Par ailleurs, toutes les tumeurs avec perte du 17p (incluant le locus de *TP53*)

présentaient également une mutation de *TP53*.

Enfin, une amplification de *PDGFRA* a été détectée dans sept tumeurs (20,6%).



**Figure 16. Profil d'aCGH (DLRS = 0,28) : profil chromosomique complexe avec plus de cinq chromosomes présentant des anomalies du nombre de copie.** Perte du chromosome 4 avec amplification de *PDGFRA*, perte du bras long du chromosome 5, pertes des chromosomes 10, 13, 14, 16, perte du bras court du chromosome 17, perte partielle du bras long du chromosome 17, perte du bras long du chromosome 18, perte du chromosome 21.

### 3.5. Comparaison gliomes *H3F3A*-mutés et *HIST1H3B*-mutés

L'âge médian au diagnostic pour les patients avec mutation de *HIST1H3B* était de 5 ans (3 à 13) contre 11 ans (4 à 22) pour les patients avec mutation de *H3F3A*. La survie globale des patients avec mutation de *H3F3A* était plus courte avec une médiane de survie de 7,9 mois (EIQ 2,6 ; 13,9) contre 12,1 mois (EIQ 4,6 ; 14,5) pour les patients avec mutation de *HIST1H3B* ( $p=0,99$ ). Il n'a pas été mis en évidence d'association préférentielle entre la localisation tumorale (tronc cérébral ou autre localisation de la ligne médiane) et l'une ou l'autre des mutations *H3F3A* ou *HIST1H3B* (respectivement 72% versus 83,3%,  $p=1$ ).

Les mutations d'*ACVR1* étaient statistiquement associées à la mutation de *HIST1H3B* (57,1% vs 0%,  $p=0,001$ ). En revanche, les altérations de la voie de p53

étaient statistiquement associées à la mutation de *H3F3A* (75% versus 28,6%,  $p=0,033$ ). Par ailleurs, l'amplification de *PDGFRA* a été mise en évidence uniquement dans des échantillons tumoraux présentant une mutation de *H3F3A* (25,9% vs 0%,  $p=0,30$ ).

#### **4. Sous-groupe des gliomes diffus de la ligne médiane histone non-mutés**

Dans ce sous-groupe de neuf patients, l'âge médian au diagnostic était de 11 ans (1 à 19) et la médiane de survie globale de 27,3 mois (EIQ 13,2 ; -). Avant révision du diagnostic histopathologique, il n'était pas mis en évidence de différence de grade histologique (bas grade versus haut grade) entre les gliomes reclassés en gliomes diffus H3K27M-mutés et les gliomes diffus histone non-mutés ( $p=0,619$ ). En effet, deux tumeurs avaient initialement été classées en gliome diffus de grade IV (22,2%), cinq tumeurs en gliome diffus de grade III (55,6%) et deux tumeurs en gliome diffus de grade II (22,2%).

Ces lésions ont ensuite été reclassées en fonction des critères diagnostiques établis par la classification OMS 2016 des tumeurs du SNC. Ces tumeurs ne présentaient pas de mutation des gènes *IDH1* et 2 ni des gènes codant pour les histones. Les deux gliomes diffus de grade IV ont donc été reclassés en glioblastome *IDH* non-mutés, les cinq gliomes diffus de grade III en astrocytome anaplasique *IDH* non-mutés et les deux gliomes diffus de grade II en astrocytome diffus *IDH* non-mutés.

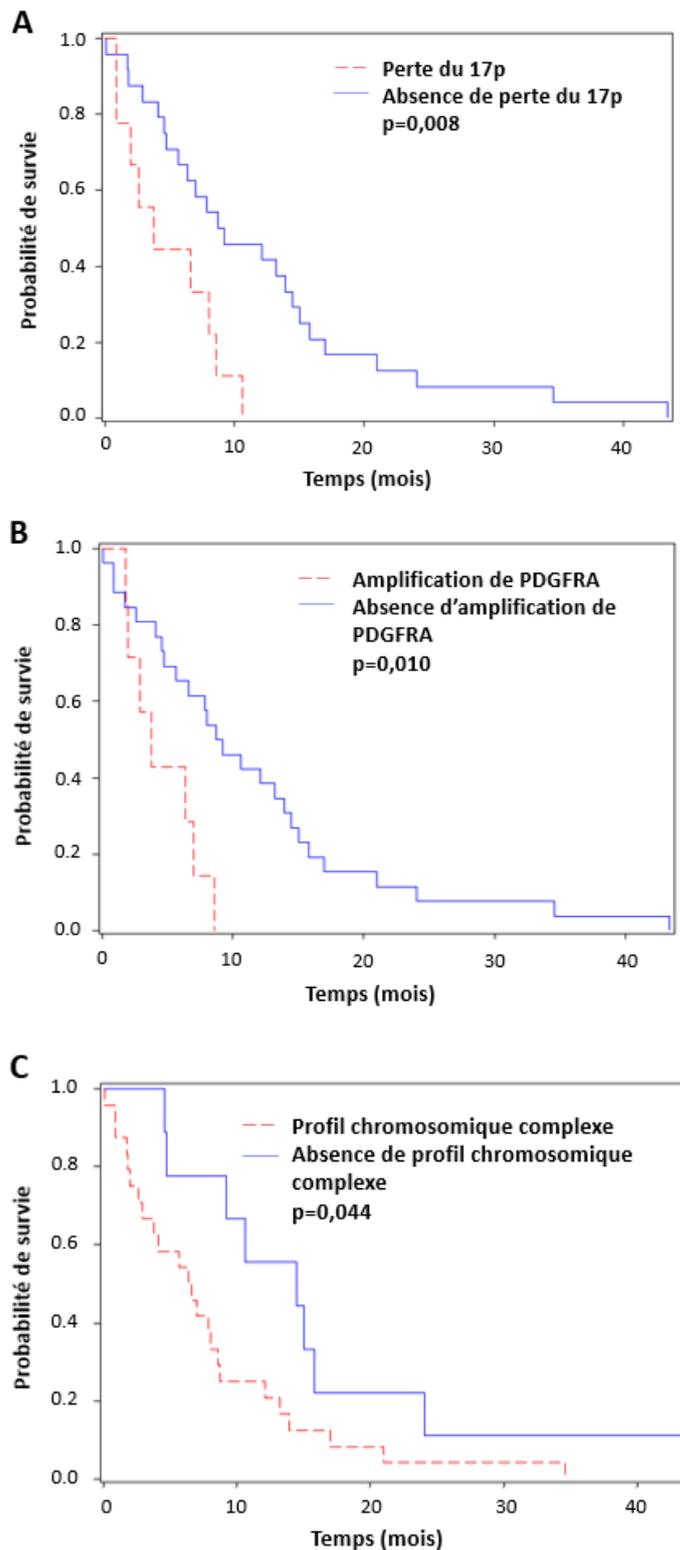
Une perte de H3K27me3 a été mise en évidence dans cinq tumeurs (55,6%). Trois d'entre elles présentaient une mutation d'*ACVR1* et les deux autres une mutation de *TP53* (figure 11).

L'aCGH a permis d'identifier une délétion homozygote de *CDKN2A* dans une tumeur, associée par ailleurs à une perte de H3K27me3. La perte du 17p a été uniquement détectée dans une tumeur et aucune amplification de *PDGFRA* n'a été observée. La perte du chromosome 13 était la seule altération chromosomique significativement associée avec le sous-groupe des gliomes diffus H3K27M-mutés (41,2% versus 0%,  $p=0,020$ ). De façon intéressante, les gliomes diffus H3K27M-mutés présentaient plus d'altérations chromosomiques que les gliomes diffus histone non mutés (figure 11). Cependant, en retenant un seuil d'au moins cinq chromosomes altérés (profil chromosomique complexe), cette association n'était pas statistiquement significative (70,6 % versus 33,3%,  $p=0,058$ ).

#### **5. Marqueurs pronostiques dans le sous-groupe des gliomes diffus H3K27M- mutés**

Dans ce sous-groupe, la perte du 17p ( $p=0,008$ ), l'amplification de *PDGFRA* ( $p=0,010$ ) ainsi qu'un profil chromosomique complexe ( $p=0,044$ ) étaient significativement associés à une survie globale plus courte (figure 17).

En revanche, la localisation de la tumeur n'était pas corrélée au pronostic des patients ( $p=0,879$ ). Les marqueurs suivants n'avaient pas non plus d'impact péjoratif sur la survie globale : surexpression d'EGFR ( $p=0,782$ ), mutation d'*ACVR1* ( $p=0,689$ ), +1q ( $p=0,215$ ), +2 ( $p=0,296$ ), -5q ( $p=0,675$ ), -10q ( $p=0,695$ ), -13 ( $p=0,559$ ), -14 ( $p=0,468$ ) et -15q ( $p=0,458$ ).



**Figure 17. Marqueurs tumoraux pronostiques dans le sous-groupe des gliomes diffus de la ligne médiane H3K27M-mutés (survie globale)**

**A.** Groupe avec perte du 17p et groupe sans perte du 17p

**B.** Groupe avec amplification de *PDGFRA* et groupe sans amplification de *PDGFRA*

**C.** Groupe avec profil chromosomique complexe et groupe sans profil chromosomique complexe

## Discussion

Les gliomes diffus de la ligne médiane pédiatriques restent associés à un pronostic particulièrement péjoratif en dépit des récentes avancées dans la compréhension des mécanismes biologiques qui les régulent. Les prélèvements pré-thérapeutiques sont rares et constituent une véritable opportunité pour mieux décrypter ces lésions et identifier de nouveaux marqueurs pronostiques. Dans ce travail, nous avons pu décrire les caractéristiques biologiques d'une série de gliomes diffus de la ligne médiane, en particulier des gliomes diffus H3K27M-mutés, à l'aide de l'immunohistochimie, du séquençage haut-débit et de l'aCGH. Nous avons identifié de nouveaux marqueurs associés aux gliomes H3K27M-mutés et en particulier trois marqueurs pronostiques, facile à mettre en évidence en routine diagnostique. Ces marqueurs, identifiés par aCGH sont la perte du 17p, l'amplification de *PDGFRA* et de façon encore plus intéressante, un profil chromosomique complexe.

Un parti pris a été ici adopté en regroupant dans les analyses l'ensemble des tumeurs H3K27M-mutés, quelle que soit leur localisation sur la ligne médiane. La classification OMS 2016 les définit en effet comme les gliomes diffus de la ligne médiane, H3K27M-mutés. Ces lésions ont été étudiées séparément pendant de nombreuses années. En particulier, les gliomes diffus du pont ont fait l'objet d'une abondante littérature à l'inverse des autres gliomes diffus de la ligne médiane, y compris les gliomes diffus du thalamus (51) (52). Ces tumeurs partagent pourtant une véritable signature moléculaire en présentant le même type de mutation des gènes codant pour les histones H3. Une étude très récente de Karremann et al. définit d'ailleurs les gliomes diffus de la ligne médiane H3K27M-mutés comme une

entité unique et bien distincte, associée à un pronostic péjoratif et ce indépendamment de la localisation tumorale (34). D'un point de vue plus pratique, la partie proximale du tronc et le thalamus sont anatomiquement proches. En imagerie, il est donc parfois difficile d'évaluer de façon précise la localisation d'une lésion dans cette région anatomique, d'autant que les gliomes diffus du pont peuvent être très infiltrants. Plus d'un quart d'entre eux envahissent en effet le thalamus ou la moelle cervicale proximale (8) (12).

### **1. Caractérisation moléculaire et chromosomique des gliomes diffus de la ligne médiane H3K27M-mutés**

Environ 80% des tumeurs présentaient une mutation de *H3F3A* ou de *HIST1H3B*. Ce taux est en accord avec les différentes études publiées (9). Aucune mutation d'*HIST1H3C* n'a été identifiée, très probablement en raison de sa rareté (22). La médiane de survie globale des patients présentant une tumeur H3K27M-mutée était de 7,9 mois. Cette donnée est également cohérente avec les données de la littérature (53). Comme attendu, les altérations de la voie de p53 étaient les anomalies les plus fréquemment détectées au sein du sous-groupe H3K27M-muté (65,7%), suivies par les mutations de *PIK3CA/PIK3R1* (14,3%) (9) (43). Les mutations d'*ACVR1* ont été identifiées dans 11,8% des tumeurs H3K27M-mutés, uniquement associées à la mutation d'*HIST1H3B*.

Cette observation confirme l'association systématique des mutations des gènes codant pour les histones H3 et de ses partenaires (*TP53/PPM1D*, *ACVR1* et *PIK3R1*), décrite par Nikbakht et al et très probablement essentielle dans la tumorigenèse des gliomes diffus de la ligne médiane (54). Les mutations de *PIK3CA* ne sont en revanche pas considérées comme des mutations drivers mais plutôt

comme des mutations additionnelles, non indispensables au développement tumoral. Cette association de mutations est présente dès le début de la maladie et semble être constante dans le temps et l'espace, quelle que soit la progression de la tumeur (54)

De manière intéressante, une mutation R60Q du gène MAX a été détectée dans un échantillon tumoral. MAX (Myc Associated factor X) est un facteur de transcription pouvant former un homodimère ainsi qu'un hétérodimère avec la protéine oncogénique MYC (55). R60Q semble être une mutation hotspot étant donné qu'elle a été décrite dans de nombreux types de cancer, y compris dans les gliomes diffus du pont (40) (56). Une étude *in silico* a montré l'importance du résidu arginine 60 dans l'homodimérisation de la protéine et dans son interaction avec l'ADN (55). Cependant, les conséquences de la substitution de l'arginine 60 par la glutamine sur l'hétérodimerisation de MAX avec MYC sont encore inconnues. Ce même échantillon tumoral présentait également une mutation L36R du gène *MED12*. Cette mutation n'a encore été jamais décrite dans les gliomes diffus de la ligne médiane pédiatriques. Le gène *MED12* (Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 12 homolog) code pour une sous-unité du complexe multiprotéique Mediator. Ce complexe interagit avec l'ARN polymérase II et peut activer ou réprimer la transcription de gènes cibles (57). Les mutations de *MED12* sont décrites dans les léiomyomes utérins, les tumeurs fibro-épithéliales du sein, les cancers de prostate et les cancers thyroïdiens (58). *MED12* est considéré comme un gène driver en cancérogenèse (59). La mutation L36R est une mutation hotspot concernant un acide aminé hautement conservé (58). Plus de données sont néanmoins nécessaires afin d'évaluer son rôle dans la tumorigénèse des gliomes diffus de la ligne médiane

pédiatriques.

Les altérations chromosomiques les plus fréquentes dans le sous-groupe des gliomes H3K27M-mutés étaient le -14, le +1q, le -10q, le -13, le -16q, le -5q, le -11q et le -17p. Ces anomalies ont déjà été décrites dans les gliomes pédiatriques de haut grade (22) (48), incluant les gliomes diffus de la ligne médiane et les gliomes diffus du pont (33) (47) (49). Cependant elles n'ont jamais été analysées de façon spécifique dans le sous-groupe des gliomes H3K27M-mutés. Dans notre étude, à l'exception du +1q, ces altérations étaient plus fréquemment observées dans le sous-groupe des gliomes H3K27M-mutés que dans le sous-groupe des gliomes histone non mutés (figure 11). Notamment, la perte du chromosome 13 était significativement associée au sous-groupe des gliomes H3K27M-mutés. Cette association d'anomalies pourrait ainsi représenter une signature chromosomique potentielle pour les gliomes H3K27M-mutés. Il conviendrait de valider cette hypothèse dans une cohorte de plus grande taille.

## **2. Marqueurs pronostiques des gliomes diffus de la ligne médiane H3K27M-mutés**

L'aCGH, réalisée sur échantillons FFPE ou congelés, a permis d'identifier trois marqueurs pronostiques au sein du sous-groupe des gliomes H3K27M-mutés.

Tout d'abord, la perte du 17p a été mise en évidence dans 26,5% des gliomes H3K27M-mutés. Le bras court du chromosome 17 contient le locus de *TP53* (17p13.1). Ainsi, toutes les tumeurs avec perte du 17p présentaient également une mutation de *TP53*. Ce phénomène conduit à une perte d'expression ou à une expression anormale de ce gène suppresseur de tumeur, impliqué dans la vaste majorité des cancers solides. Dans notre étude, la perte du 17p était

significativement associée à un pronostic plus péjoratif dans le sous-groupe des gliomes H3K27M-mutés ( $p=0,008$ ). Ce marqueur pronostique a déjà été décrit dans les gliomes de haut grade pédiatriques ainsi que dans les gliomes diffus de la ligne médiane mais jamais dans le sous-groupe spécifique des gliomes H3K27M-mutés (22) (60).

Nous avons également mis en évidence une amplification récurrente du gène *PDGFRA* (20,6%). De façon notable, cette anomalie a été uniquement détectée dans les gliomes diffus présentant une mutation de *H3F3A*. Les amplifications de *PDGFRA* sont associées à un pronostic défavorable dans les gliomes pédiatriques de haut grade et les gliomes diffus du pont (22) (60). Dans notre étude, l'amplification de *PDGFRA* est également associée à un pronostic plus sombre dans le sous-groupe des gliomes H3K27M-mutés ( $p=0,010$ ). Il a été montré par ailleurs que la voie de signalisation de *PDGFRA* était souvent activée dans les gliomes diffus du pont (61) (62). Dans ce contexte, *PDGFRA* apparaît donc comme une cible thérapeutique potentielle (47) (60). Une étude a ainsi démontré l'efficacité *in vitro* du dasatinib (inhibiteur de protéines à activité tyrosine kinase) sur des lignées cellulaires humaines de gliomes diffus du pont (62). Bien que deux essais cliniques de phase I aient rapporté des effets secondaires significatifs de l'imatinib (inhibiteur de protéines à activité tyrosine kinase) (63) et du dasatinib combiné au crizotinib (64), un essai clinique de phase II est actuellement en cours en Europe (BIOMEDE).

Un profil chromosomique complexe a été défini par la présence d'au moins cinq chromosomes présentant des anomalies du nombre de copie. Ce seuil, déjà utilisé par d'autres équipes dans la caractérisation des glioblastomes de l'adulte (65), est

facile à appliquer aux données d'aCGH. Avant l'identification des mutations des gènes codant pour les histones H3, plusieurs études ont décrit un nombre important d'anomalies du nombre de copies dans les gliomes diffus du pont (47) (48) et les gliomes pédiatriques de haut grade (46). De manière intéressante, Warren et al. ont constaté que les tumeurs qui étaient les plus agressives morphologiquement étaient également celles qui présentaient le plus grand nombre d'altérations chromosomiques (49). Plus récemment, une étude de Buczkowicz et al., montraient que les gliomes H3K27M-mutés étaient caractérisés par une grande instabilité génomique avec un nombre d'anomalies chromosomiques bien plus important que les gliomes histone non mutés (39). Dans notre étude, un profil chromosomique complexe était associé à un pronostic péjoratif dans le sous-groupe des gliomes H3K27M-mutés ( $p=0,044$ ). A notre connaissance, ce marqueur, facilement détectable sur aCGH, même en cas d'analyse sur FFPE, n'a encore jamais été décrit dans ces gliomes.

### **3. Gliomes diffus de la ligne médiane histone non mutés**

Parmi les quarante-neuf tumeurs analysées, il n'a pas été mis en évidence de mutation des gènes *H3F3A*, *HIST1H3B* et *HIST1H3C* dans neuf tumeurs. Cependant, parmi elles, cinq étaient caractérisées par une perte de H3K27me3 en immunohistochimie avec des mutations d'*ACVR1* ou de *TP53*, normalement associées aux mutations des gènes codant pour les histones H3. Il est donc hautement probable que ces tumeurs présentent une mutation d'un des gènes *HIST2H3A* ou *HIST2H3C*, rare et non détectée par notre panel de séquençage haut-débit.

Quatre autres tumeurs ne présentaient pas de perte de H3K27me3 en immunohistochimie. Deux patients étaient toujours en vie à la fin du recueil de données tandis que deux autres étaient décédés. En l'état actuel des connaissances, il semble difficile de caractériser avec précision ces lésions.

#### **4. Limites de l'étude**

Enfin, notre étude a quelques limites concernant le faible nombre de patients inclus, reflétant l'épidémiologie de cette pathologie et la rareté des échantillons tumoraux pré-thérapeutiques. Les marqueurs pronostiques dans le sous-groupe des gliomes H3K27M-mutés n'ont ainsi pas pu être évalués en analyse multivariée. Par ailleurs, une cohorte de plus grande taille pourrait également permettre de mieux comprendre les gliomes diffus histone non mutés et éventuellement de prédire leur évolution clinique selon les anomalies biologiques identifiées.

## Conclusion

Cette étude a permis de décrire une cohorte rare de gliomes diffus de la ligne médiane pédiatriques, en particulier de gliomes H3K27M-mutés, naïfs de tout traitement. Au sein de ce sous-groupe, les mutations les plus fréquemment détectées concernaient les gènes *TP53/PPM1D*, *PIK3CA/PIK3R1* et *ACVR1*. L'équipe de Nikbakht et al. a montré que ces mutations drivers étaient homogènes dans le temps puisqu'elles sont présentes dès le début de la maladie, et l'espace, quelle que soit la progression tumorale. Cette observation souligne donc une fois de plus l'intérêt majeur des biopsies stéréotaxiques pré-thérapeutiques, à réaliser le plus précocement possible afin de guider la prise en charge clinique et thérapeutique des patients.

De manière intéressante, nous avons identifié trois marqueurs pronostiques au sein du sous-groupe des gliomes H3K27M-mutés : la perte du 17p, l'amplification de *PDGFRA* et un profil chromosomique complexe. Ces anomalies, facilement détectables même sur des prélèvements FFPE, mettent en avant la place de l'aCGH en routine diagnostique. Cet outil, lorsqu'il est maîtrisé par les plates-formes de biologie moléculaire, pourrait permettre d'affiner et de redéfinir plus précisément le pronostic des gliomes H3K27M-mutés. En perspective, il pourrait être intéressant de mettre au point un anticorps anti-*PDGFRA* permettant de repérer en immunohistochimie, rapidement et à moindre coût, une éventuelle amplification du gène.

## Références

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin.* janv 2017;67(1):7-30.
2. Ostrom QT, Gittleman H, Truitt G, Boscia A, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011-2015. *Neuro-oncology.* 1 oct 2018;20(suppl\_4):iv1-86.
3. Braunstein S, Raleigh D, Bindra R, Mueller S, Haas-Kogan D. Pediatric high-grade glioma: current molecular landscape and therapeutic approaches. *Journal of Neuro-Oncology.* sept 2017;134(3):541-9.
4. Jones C, Baker SJ. Unique genetic and epigenetic mechanisms driving paediatric diffuse high-grade glioma. *Nat Rev Cancer.* oct 2014;14(10).
5. Jones C, Perryman L, Hargrave D. Paediatric and adult malignant glioma: close relatives or distant cousins? *Nat Rev Clin Oncol.* 29 mai 2012;9(7):400-13.
6. Veldhuijzen van Zanten SEM, Baugh J, Chaney B, De Jongh D, Sanchez Aliaga E, Barkhof F, et al. Development of the SIOPE DIPG network, registry and imaging repository: a collaborative effort to optimize research into a rare and lethal disease. *J Neurooncol.* 2017;132(2):255-66.
7. Warren KE. Diffuse intrinsic pontine glioma: poised for progress. *Front Oncol.* 2012;2:205.
8. Barrow J, Adamowicz-Brice M, Cartmill M, MacArthur D, Lowe J, Robson K, et al. Homozygous loss of ADAM3A revealed by genome-wide analysis of pediatric high-grade glioma and diffuse intrinsic pontine gliomas. *Neuro-oncology.* févr 2011;13(2):212-22.
9. Lapin DH, Tsoi M, Ziegler DS. Genomic Insights into Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Front Oncol.* 2017;7:57.
10. Cohen KJ, Jabado N, Grill J. Diffuse intrinsic pontine gliomas-current management and new biologic insights. Is there a glimmer of hope? *Neuro-oncology.* 1 août 2017;19(8):1025-34.
11. Robison NJ, Kieran MW. Diffuse intrinsic pontine glioma: a reassessment. *J Neurooncol.* août 2014;119(1):7-15.
12. Buczkowicz P, Bartels U, Bouffet E, Becher O, Hawkins C. Histopathological spectrum of paediatric diffuse intrinsic pontine glioma: diagnostic and therapeutic implications. *Acta Neuropathol.* oct 2014;128(4):573-81.
13. Hoffman LM, Veldhuijzen van Zanten SEM, Colditz N, Baugh J, Chaney B, Hoffmann M, et al. Clinical, Radiologic, Pathologic, and Molecular Characteristics of Long-Term Survivors of Diffuse Intrinsic Pontine Glioma

(DIPG): A Collaborative Report From the International and European Society for Pediatric Oncology DIPG Registries. *Journal of Clinical Oncology*. juill 2018;36(19):1963-72.

14. Plessier A, Le Dret L, Varlet P, Beccaria K, Lacombe J, Mériaux S, et al. New in vivo avatars of diffuse intrinsic pontine gliomas (DIPG) from stereotactic biopsies performed at diagnosis. *Oncotarget*. 8 août 2017;8(32):52543-59.
15. Puget S, Beccaria K, Blauwblomme T, Roujeau T, James S, Grill J, et al. Biopsy in a series of 130 pediatric diffuse intrinsic Pontine gliomas. *Childs Nerv Syst*. oct 2015;31(10):1773-80.
16. Buczkowicz P, Hawkins C. Pathology, Molecular Genetics, and Epigenetics of Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Front Oncol*. 2015;5:147.
17. Yoshimura J, Onda K, Tanaka R, Takahashi H. Clinicopathological study of diffuse type brainstem gliomas: analysis of 40 autopsy cases. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. août 2003;43(8):375-82; discussion 382.
18. Jansen MHA, van Vuurden DG, Vandertop WP, Kaspers GJL. Diffuse intrinsic pontine gliomas: a systematic update on clinical trials and biology. *Cancer Treat Rev*. févr 2012;38(1):27-35.
19. Pérez-Gómez JL, Rodríguez-Alvarez CA, Marhx-Bracho A, Rueda-Franco F. Stereotactic biopsy for brainstem tumors in pediatric patients. *Childs Nerv Syst*. janv 2010;26(1):29-34.
20. Schwartzentruber J, Korshunov A, Liu X-Y, Jones DTW, Pfaff E, Jacob K, et al. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature*. 29 janv 2012;482(7384):226-31.
21. Wu G, Broniscer A, McEachron TA, Lu C, Paugh BS, Becksfors J, et al. Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas. *Nat Genet*. 29 janv 2012;44(3):251-3.
22. Mackay A, Burford A, Carvalho D, Izquierdo E, Fazal-Salom J, Taylor KR, et al. Integrated Molecular Meta-Analysis of 1,000 Pediatric High-Grade and Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Cancer Cell*. 09 2017;32(4):520-537.e5.
23. Solomon DA, Wood MD, Tihan T, Bollen AW, Gupta N, Phillips JJJ, et al. Diffuse Midline Gliomas with Histone H3-K27M Mutation: A Series of 47 Cases Assessing the Spectrum of Morphologic Variation and Associated Genetic Alterations. *Brain Pathol*. 2016;26(5):569-80.
24. Gilbert AR, Zaky W, Gokden M, Fuller CE, Ocal E, Leeds NE, et al. Extending the Neuroanatomic Territory of Diffuse Midline Glioma, K27M Mutant: Pineal Region Origin. *Pediatr Neurosurg*. 2018;53(1):59-63.
25. Weltgesundheitsorganisation. WHO classification of tumours of the central nervous system. Revised 4th edition. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, éditeurs. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2016. 408 p. (World Health Organization classification of tumours).

26. Cutter AR, Hayes JJ. A brief review of nucleosome structure. *FEBS Lett.* 7 oct 2015;589(20 Pt A):2914-22.
27. Koyama M, Kurumizaka H. Structural diversity of the nucleosome. *J Biochem.* 1 févr 2018;163(2):85-95.
28. Gräff J, Mansuy IM. Epigenetic codes in cognition and behaviour. *Behav Brain Res.* 1 sept 2008;192(1):70-87.
29. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature.* 6 janv 2000;403(6765):41-5.
30. Chan K-M, Fang D, Gan H, Hashizume R, Yu C, Schroeder M, et al. The histone H3.3K27M mutation in pediatric glioma reprograms H3K27 methylation and gene expression. *Genes Dev.* 1 mai 2013;27(9):985-90.
31. Margueron R, Reinberg D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature.* 20 janv 2011;469(7330):343-9.
32. Silveira AB, Kasper LH, Fan Y, Jin H, Wu G, Shaw TI, et al. H3.3 K27M depletion increases differentiation and extends latency of diffuse intrinsic pontine glioma growth in vivo. *Acta Neuropathol.* 15 févr 2019;
33. Castel D, Philippe C, Calmon R, Le Dret L, Truffaux N, Boddaert N, et al. Histone H3F3A and HIST1H3B K27M mutations define two subgroups of diffuse intrinsic pontine gliomas with different prognosis and phenotypes. *Acta Neuropathol.* déc 2015;130(6):815-27.
34. Karremann M, Gielen GH, Hoffmann M, Wiese M, Colditz N, Warmuth-Metz M, et al. Diffuse high-grade gliomas with H3 K27M mutations carry a dismal prognosis independent of tumor location. *Neuro-oncology.* 10 2018;20(1):123-31.
35. Lewis PW, Müller MM, Koletsky MS, Cordero F, Lin S, Banaszynski LA, et al. Inhibition of PRC2 activity by a gain-of-function H3 mutation found in pediatric glioblastoma. *Science.* 17 mai 2013;340(6134):857-61.
36. Bender S, Tang Y, Lindroth AM, Hovestadt V, Jones DTW, Kool M, et al. Reduced H3K27me3 and DNA hypomethylation are major drivers of gene expression in K27M mutant pediatric high-grade gliomas. *Cancer Cell.* 11 nov 2013;24(5):660-72.
37. Venneti S, Garimella MT, Sullivan LM, Martinez D, Huse JT, Heguy A, et al. Evaluation of histone 3 lysine 27 trimethylation (H3K27me3) and enhancer of Zest 2 (EZH2) in pediatric glial and glioneuronal tumors shows decreased H3K27me3 in H3F3A K27M mutant glioblastomas. *Brain Pathol.* sept 2013;23(5):558-64.
38. Kallappagoudar S, Yadav RK, Lowe BR, Partridge JF. Histone H3 mutations--a special role for H3.3 in tumorigenesis? *Chromosoma.* juin 2015;124(2):177-89.

39. Buczkowicz P, Hoeman C, Rakopoulos P, Pajovic S, Letourneau L, Dzamba M, et al. Genomic analysis of diffuse intrinsic pontine gliomas identifies three molecular subgroups and recurrent activating ACVR1 mutations. *Nat Genet.* mai 2014;46(5):451-6.
40. Taylor KR, Mackay A, Truffaux N, Butterfield Y, Morozova O, Philippe C, et al. Recurrent activating ACVR1 mutations in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat Genet.* mai 2014;46(5):457-61.
41. Kleiblova P, Shaltiel IA, Benada J, Ševčík J, Pecháčková S, Pohlreich P, et al. Gain-of-function mutations of PPM1D/Wip1 impair the p53-dependent G1 checkpoint. *J Cell Biol.* 13 mai 2013;201(4):511-21.
42. Zhang L, Chen LH, Wan H, Yang R, Wang Z, Feng J, et al. Exome sequencing identifies somatic gain-of-function PPM1D mutations in brainstem gliomas. *Nat Genet.* juill 2014;46(7):726-30.
43. Panditharatna E, Yaeger K, Kilburn LB, Packer RJ, Nazarian J. Clinicopathology of diffuse intrinsic pontine glioma and its redefined genomic and epigenomic landscape. *Cancer Genet.* août 2015;208(7-8):367-73.
44. Karakas B, Bachman KE, Park BH. Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers. *Br J Cancer.* 27 févr 2006;94(4):455-9.
45. Cizkova M, Vacher S, Meseure D, Trassard M, Susini A, Mlcuchova D, et al. PIK3R1 underexpression is an independent prognostic marker in breast cancer. *BMC Cancer.* 14 nov 2013;13:545.
46. Bax DA, Mackay A, Little SE, Carvalho D, Viana-Pereira M, Tamber N, et al. A distinct spectrum of copy number aberrations in pediatric high-grade gliomas. *Clin Cancer Res.* 1 juill 2010;16(13):3368-77.
47. Zarghooni M, Bartels U, Lee E, Buczkowicz P, Morrison A, Huang A, et al. Whole-genome profiling of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas highlights platelet-derived growth factor receptor alpha and poly (ADP-ribose) polymerase as potential therapeutic targets. *J Clin Oncol.* 10 mars 2010;28(8):1337-44.
48. Paugh BS, Qu C, Jones C, Liu Z, Adamowicz-Brice M, Zhang J, et al. Integrated molecular genetic profiling of pediatric high-grade gliomas reveals key differences with the adult disease. *J Clin Oncol.* 20 juin 2010;28(18):3061-8.
49. Warren KE, Killian K, Suuriniemi M, Wang Y, Quezado M, Meltzer PS. Genomic aberrations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *Neuro-oncology.* mars 2012;14(3):326-32.
50. Paugh BS, Broniscer A, Qu C, Miller CP, Zhang J, Tatevossian RG, et al. Genome-wide analyses identify recurrent amplifications of receptor tyrosine kinases and cell-cycle regulatory genes in diffuse intrinsic pontine glioma. *J Clin Oncol.* 20 oct 2011;29(30):3999-4006.

51. Porkholm M, Raunio A, Vainionpää R, Salonen T, Hernesniemi J, Valanne L, et al. Molecular alterations in pediatric brainstem gliomas. *Pediatr Blood Cancer*. janv 2018;65(1).
52. Ryall S, Krishnatry R, Arnaldo A, Buczkowicz P, Mistry M, Siddaway R, et al. Targeted detection of genetic alterations reveal the prognostic impact of H3K27M and MAPK pathway aberrations in paediatric thalamic glioma. *Acta Neuropathol Commun*. 31 2016;4(1):93.
53. Khuong-Quang D-A, Buczkowicz P, Rakopoulos P, Liu X-Y, Fontebasso AM, Bouffet E, et al. K27M mutation in histone H3.3 defines clinically and biologically distinct subgroups of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *Acta Neuropathol*. sept 2012;124(3):439-47.
54. Nikbakht H, Panditharatna E, Mikael LG, Li R, Gayden T, Osmond M, et al. Spatial and temporal homogeneity of driver mutations in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat Commun*. 6 avr 2016;7:11185.
55. Dela Cruz FS, Diolaiti D, Turk AT, Rainey AR, Ambesi-Impiombato A, Andrews SJ, et al. A case study of an integrative genomic and experimental therapeutic approach for rare tumors: identification of vulnerabilities in a pediatric poorly differentiated carcinoma. *Genome Med*. 31 2016;8(1):116.
56. Koschmann C, Farooqui Z, Kasaiian K, Cao X, Zamler D, Stallard S, et al. Multifocal sequencing of a diffuse intrinsic pontine glioma establishes PTEN loss as an early event. *NPJ Precis Oncol*. 2017;1(1):32.
57. Ding N, Zhou H, Esteve P-O, Chin HG, Kim S, Xu X, et al. Mediator links epigenetic silencing of neuronal gene expression with x-linked mental retardation. *Mol Cell*. 8 août 2008;31(3):347-59.
58. Ibrahimasic T, Xu B, Landa I, Dogan S, Middha S, Seshan V, et al. Genomic Alterations in Fatal Forms of Non-Anaplastic Thyroid Cancer: Identification of MED12 and RBM10 as Novel Thyroid Cancer Genes Associated with Tumor Virulence. *Clin Cancer Res*. 1 oct 2017;23(19):5970-80.
59. Clark AD, Oldenbroek M, Boyer TG. Mediator kinase module and human tumorigenesis. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2015;50(5):393-426.
60. Puget S, Philippe C, Bax DA, Job B, Varlet P, Junier M-P, et al. Mesenchymal Transition and PDGFRA Amplification/Mutation Are Key Distinct Oncogenic Events in Pediatric Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas. *Lesniak MS, éditeur. PLoS ONE*. 28 févr 2012;7(2):e30313.
61. Hoeman C, Shen C, Becher OJ. CDK4/6 and PDGFRA Signaling as Therapeutic Targets in Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Front Oncol*. 2018;8:191.
62. Truffaux N, Philippe C, Paulsson J, Andreiuolo F, Guerrini-Rousseau L, Cornilleau G, et al. Preclinical evaluation of dasatinib alone and in combination with cabozantinib for the treatment of diffuse intrinsic pontine glioma. *Neuro-oncology*. juill 2015;17(7):953-64.

63. Pollack IF, Jakacki RI, Blaney SM, Hancock ML, Kieran MW, Phillips P, et al. Phase I trial of imatinib in children with newly diagnosed brainstem and recurrent malignant gliomas: a Pediatric Brain Tumor Consortium report. *Neuro-oncology*. avr 2007;9(2):145-60.
64. Broniscer A, Jia S, Mandrell B, Hamideh D, Huang J, Onar-Thomas A, et al. Phase 1 trial, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of dasatinib combined with crizotinib in children with recurrent or progressive high-grade and diffuse intrinsic pontine glioma. *Pediatr Blood Cancer*. juill 2018;65(7):e27035.
65. Dahlback H-SS, Brandal P, Meling TR, Gorunova L, Scheie D, Heim S. Genomic aberrations in 80 cases of primary glioblastoma multiforme: Pathogenetic heterogeneity and putative cytogenetic pathways. *Genes Chromosomes Cancer*. oct 2009;48(10):908-24.

**AUTEUR : Nom : DUFOUR**

**Prénom : Charlotte**

**Date de Soutenance : Lundi 18 mars 2019**

**Titre de la Thèse : Caractérisation moléculaire et chromosomique des gliomes diffus de la ligne médiane de l'enfant et du jeune adulte**

**Thèse - Médecine - Lille 2019**

**Cadre de classement : Anatomie et Cytologie Pathologiques**

**DES + spécialité : Anatomie et Cytologie Pathologiques**

**Mots-clés : gliome de la ligne médiane pédiatrique ; profil moléculaire ; altérations chromosomiques ; mutations histones ; marqueurs pronostiques**

**Résumé :**

**Contexte :** Les gliomes de la ligne médiane pédiatriques sont des pathologies rares, associées à un pronostic sombre. Les prélèvements dans cette région anatomique peu accessible ne sont pas systématiques. Ceci a longtemps limité la compréhension de leur biologie et les progrès thérapeutiques. En 2012, la découverte des mutations des gènes des histones H3 a révolutionné leur diagnostic. Ainsi, les gliomes diffus H3K27M-mutés sont associés à un pronostic encore plus péjoratif. Les résultats des essais cliniques restent aujourd'hui décevants. L'identification de marqueurs complémentaires dans ce sous-groupe apparaît nécessaire dans le but d'affiner leur pronostic et de proposer aux patients des traitements plus adaptés.

**Méthode :** Les patients inclus ont été opérés ou biopsiés entre 2001 et 2017. Les échantillons tumoraux ont été analysés par immunohistochimie (incluant H3K27me3, EGFR, c-MET et p53), séquençage haut-débit (panel à façon) et Comparative Genomic Hybridization array (aCGH). L'impact pronostique des altérations les plus fréquentes a été évalué par analyse univariée dans le sous-groupe des gliomes H3K27M-mutés.

**Résultats :** 49 patients ont été inclus dans l'étude. L'âge médian au diagnostic était de 9 ans et la médiane de survie globale de 9,4 mois. Les mutations de *H3F3A* et de *HIST1H3B* ont été identifiées dans 80% des tumeurs. Au sein du sous-groupe des gliomes H3K27M-mutés, la perte du 17p ( $p=0,008$ ), l'amplification de *PDGFRA* ( $p=0,010$ ) et un profil chromosomique complexe ( $p=0,044$ ) étaient significativement associés à une diminution de la survie globale.

**Conclusion :** cette étude a permis de décrire les altérations moléculaires et chromosomiques dans une cohorte de gliomes diffus de la ligne médiane, soulignant ainsi l'intérêt des biopsies pré-thérapeutiques. Trois marqueurs pronostiques ont été identifiés au sein du sous-groupe des gliomes diffus H3K27M-mutés : la perte du 17p, l'amplification de *PDGFRA* et un profil chromosomique complexe. Ces marqueurs sont détectés simplement par aCGH et pourraient présenter un intérêt dans le profil moléculaire de routine de ces gliomes.

**Composition du Jury :**

**Président :** Monsieur le Professeur Claude-Alain MAURAGE

**Assesseurs :** Monsieur le Professeur Matthieu VINCHON, Monsieur le Docteur Pierre LEBLOND, Madame le Docteur Fabienne ESCANDE,

**Directeur de thèse :** Madame le Docteur Florence RENAUD