



HAL
open science

Evolution et facteurs pronostiques de la Neurofibromatose 1

Émilie Sbidian

► **To cite this version:**

Émilie Sbidian. Evolution et facteurs pronostiques de la Neurofibromatose 1. Santé publique et épidémiologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA11T064 . tel-00853858

HAL Id: tel-00853858

<https://theses.hal.science/tel-00853858>

Submitted on 24 Aug 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS SUD XI
FACULTE DE MEDECINE PARIS SUD

ANNEE 2011-2012

N°

THESE

Pour obtenir le grade

DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS SUD XI

Champ disciplinaire : Santé Publique

Option : Recherche Clinique

Présentée et soutenue publiquement

Par **Emilie SBIDIAN-CROS**

Le 23 octobre 2012

**EVOLUTION ET FACTEURS PRONOSTIQUES DE LA
NEUROFIBROMATOSE 1**

Directeurs de thèse

Prs Sylvie BASTUJI-GARIN et Pierre WOLKENSTEIN

Composition du jury :

Mr Denis HEMON

Me Corinne ALBERTI

Mr Alain DUPUY

Me Marie –Aleth RICHARD

Mr Babak KHOSHNOOD

Me Sylvie BASTUJI-GARIN

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur

UNIVERSITE PARIS SUD XI
FACULTE DE MEDECINE PARIS SUD

ANNEE 2011-2012

N°

THESE

Pour obtenir le grade

DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS SUD XI

Champ disciplinaire : Santé Publique

Option : Recherche Clinique

Présentée et soutenue publiquement

Par **Emilie SBIDIAN-CROS**

Le 23 octobre 2012

**EVOLUTION ET FACTEURS PRONOSTIQUES DE LA
NEUROFIBROMATOSE 1**

Directeurs de thèse

Prs Sylvie BASTUJI-GARIN et Pierre WOLKENSTEIN

Composition du jury :

Mr Denis HEMON

Me Corinne ALBERTI

Mr Alain DUPUY

Me Marie –Aleth RICHARD

Mr Babak KHOSHNOOD

Me Sylvie BASTUJI-GARIN

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur

REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements s'adressent à Madame Sylvie Bastuji-Garin qui a dirigé cette thèse dans la continuité de mon stage de Master Recherche. Tout au long de ces 4 années, elle m'a fait découvrir l'intérêt mais aussi toute l'exigence de la Recherche Clinique. Merci pour sa très grande disponibilité, sa patience, la pertinence de ses remarques tout au long de la réalisation de cette thèse. Je ne sais comment lui exprimer ma gratitude autrement qu'en lui promettant d'agir comme elle avec des étudiants dans ma situation, si un jour l'occasion m'en est donnée.

Je remercie également très vivement Monsieur Pierre Wolkenstein qui a co-dirigé ce travail. Ses connaissances et son expérience ont été pour moi source d'estime et d'enseignement. Ses conseils d'expert dans la prise en charge des patients atteints de Neurofibromatose 1, au sein du Centre de Référence qu'il coordonne, m'ont permis de concrétiser ce travail.

Je remercie sincèrement Monsieur Denis Hémon qui me fait l'honneur de présider ce jury de thèse. Je remercie très vivement Madame Corinne Alberti et Monsieur Alain Dupuy mes deux rapporteurs, pour la rapidité avec laquelle ils ont lu mon manuscrit et l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail. Ils ont contribué par leurs nombreuses remarques et suggestions à améliorer la qualité de ce travail, je leur en suis très reconnaissante. Madame Marie-Aleth Richard et Monsieur Babak Khoshnood m'ont fait l'honneur de participer au Jury de soutenance, je les en remercie profondément.

Mes remerciements vont à l'équipe NF1 sans laquelle cette étude passionnante n'aurait jamais vu le jour. Je remercie le service de Dermatologie de l'hôpital Henri Mondor pour m'avoir permis de concrétiser ce travail. Merci à tous ceux qui par leur formation ou leur amitié ont contribué à la réalisation de cette thèse.

Enfin, et surtout, c'est à ma famille que j'adresse mes remerciements. Je les remercie tous affectueusement pour leur soutien infaillible, ils savent tout ce que je leur dois et combien ils me sont chers.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	17
LA NEUROFIBROMATOSE 1	17
1. <i>Une maladie autosomique dominante.....</i>	17
2. <i>Un diagnostic qui reste clinique.....</i>	20
3. <i>Complications et morbi-mortalité.....</i>	23
4. <i>Prise en charge : suivi, dépistage et traitement dans le cadre du réseau NF-France</i>	24
OBJECTIFS DE LA THESE.....	27
CHAPITRE 1	28
<i>Analyse de la mortalité au cours de la Neurofibromatose 1 : Cohorte historique française de 1895 patients.....</i>	28
1. Introduction	28
2. Méthodes et Patients	30
Population d'étude.....	30
Recueil de données.....	31
Statut vital et causes médicales de décès.....	31
Statut vital	31
Causes médicales de décès	32
Le suivi.....	32
Analyses statistiques	33
3. Résultats	34
Population d'étude.....	34
Les causes de mortalité.....	38
Les taux de mortalité standardisés.....	40
Analyses de sensibilité	42
4. Discussion	43
CHAPITRE 2	46
PHENOTYPE A RISQUE DE MORTALITE AU COURS DE LA NF1: RESULTATS D'UNE ETUDE CAS-TEMOINS MULTICENTRIQUE	46
1. Introduction	46
2. Patients et Méthode	47
Schéma d'étude	47
Population d'étude.....	47
Définitions.....	48
Les cas et témoins: critères d'inclusion et de non-inclusion.....	48
Nombre de sujets nécessaire.....	49
Recrutement	50

Recueil de l'information.....	50
Variables explicatives candidates.....	50
1. <i>Les Neurofibromes internes : Identification et caractérisation</i>	50
2. <i>Les neuropathies périphériques : étude électrophysiologique et caractérisation</i>	51
Facteurs de confusion analysés.....	52
Analyses statistiques.....	52
3. Résultats	53
4. Discussion	60
CHAPITRE 3	62
ELABORATION D'UN SCORE PREDICTIF DE LA PRESENCE DES NEUROFIBROMES INTERNES A PARTIR DES	
CARACTERISTIQUES PHENOTYPIQUES DES PATIENTS ADULTES NF1.....	
1. Introduction	62
2. Matériel et méthodes	62
Les patients.....	62
Classification des patients : Détermination de l'existence de neurofibromes internes.....	65
Analyse statistique.....	66
Construction du score.....	66
Validité Interne : Recalibration du Score.....	67
Validation Externe.....	68
3. Résultats	68
Caractéristiques de la population.....	68
Facteurs associés à la présence de Neurofibromes internes.....	73
Analyses univariées.....	73
Analyses multivariées.....	75
Construction du score.....	76
Validation du score.....	77
Validité Interne : Recalibration du Score.....	77
Validité externe du score.....	78
4. Discussion	78
CHAPITRE 4	83
NEUROFIBROMES INTERNES CHEZ LES ENFANTS NF1. ETUDE TRANSVERSALE FRANÇAISE ET NORD	
AMERICAINE DE 357 PATIENTS.....	
1. Introduction	83
2. Patients et Méthodes	84
Population d'étude.....	84
Recueil de Données.....	85
Données collectées.....	85
Examen des données manquantes.....	86
Définitions.....	87
Classification des patients: identification des neurofibromes internes.....	88

Analyses statistiques	88
Sélection des variables pour les modèles avec imputations	89
Construction du modèle d'imputation.....	90
Analyses des données imputées	91
3. Résultats	92
Population d'étude.....	92
Facteurs associés avec la présence de neurofibromes internes.	94
Imputation multiple	97
4. Discussion	100
CONCLUSION ET PERSPECTIVE	102
BIBLIOGRAPHIE	105
ANNEXES	111

TABLES DES FIGURES

FIGURE 1. VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUEES DANS LA PATHOGENECITE DE LA NEUROFIBROMATOSE 1	19
FIGURE 2. DIAGRAMME DE FLUX DU STATUT VITAL DE LA COHORTE DE PATIENTS NF1 SUIVIS ENTRE 1980 ET 2005	37
FIGURE 3. ODDS RATIOS (OR) ET LEURS INTERVALLES DE CONFIANCE A 95% DES DIFFERENTS TYPES DE NEUROFIBROMES INTERNES ET DES NEUROPATHIES PERIPHERIQUES CHEZ LES PATIENTS PRESENTANT 2 A 9 NEUROFIBROMES SOUS CUTANES (SC-NF) ET AU MOINS 10 SC-NF.	59
FIGURE 4. POPULATION DE VALIDATION, DIAGRAMME DE FLUX.	64
FIGURE 5. POPULATION D'ETUDE, DIAGRAMME DE FLUX	85
FIGURE 6. PROBABILITE D'AVOIR DES NEUROFIBROMES INTERNES EN FONCTION DE L'AGE (AVEC L'INTERVALLE DE CONFIANCE A 95%),	93
FIGURE 7. PROBABILITE D'AVOIR DES NEUROFIBROMES INTERNES SELON L'AGE STRATIFIEE SUR LE SEXE.	93

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1. CRITERES DIAGNOSTIQUES DE LA NEUROFIBROMATOSE 1	21
TABLEAU 2. FREQUENCE DES DIFFERENTS CRITERES DIAGNOSTIQUES DE LA NEUROFIBROMATOSE 1 EN FONCTION DE L'AGE MOYEN D'APPARITION (14).....	21
TABLEAU 3. EVALUATION D'UN MALADE ATTEINT DE NEUROFIBROMATOSE 1 (PINSON, 2002)	25
TABLEAU 4. CARACTERISTIQUES DES PATIENTS NF1 SELON LEUR STATUT VITAL CONNU OU INCONNU.	36
TABLEAU 5. CARACTERISTIQUES DES PATIENTS VIVANTS ET DECEDES A LA DATE DE POINT PARI MI LES 1 226 PATIENTS NF1 DONT LE STATUT VITAL ETAIT CONNU.	39
TABLEAU 6. NOMBRE DE PATIENTS DECEDES ET SMR PAR CATEGORIES D'AGE	40
TABLEAU 7. NOMBRE DE PATIENTS DECEDES ET SMR PAR CATEGORIES D'AGE ET PAR SEXE.	41
TABLEAU 8. NOMBRE DE PATIENTS DECEDES ET SMR PAR CATEGORIES D'AGE CHEZ LES PATIENTS NF1 NES APRES LE 01 JANVIER 1980 (N=633).	42
TABLEAU 9. CARACTERISTIQUES DES PATIENTS AVEC AU MOINS 2 NEUROFIBROMES SOUS CUTANES (CAS) ET DES TEMOINS.....	54
TABLEAU 10. PRESENCE DES NEUROFIBROMES INTERNES CHEZ LES CAS ET LES TEMOINS.	55
TABLEAU 11. PRESENCE DE TROUBLES ELECTROPHYSIOLOGIQUES CHEZ LES CAS ET LES TEMOINS.	56
TABLEAU 12. ASSOCIATION ENTRE LES NEUROFIBROMES SOUS CUTANES ET LES DIFFERENTS TYPES DE NEUROFIBROMES INTERNES ET LES NEUROPATHIES PERIPHERIQUES.....	58
TABLEAU 13. PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DES 208 PATIENTS DE L'ECHANTILLON DE CONSTRUCTION	70
TABLEAU 14. PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DES 191 PATIENTS DE LA POPULATION DE VALIDATION.....	71
TABLEAU 15. COMPARAISON DES PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DE LA POPULATION DE VALIDATION (N = 191) ET DES PATIENTS DE LA COHORTE NF-FRANCE DONT LE STATUT NEUROFIBROME INTERNE EST INCONNU (N=304).....	72
TABLEAU 16. FACTEURS ASSOCIES A LA PRESENCE DE NEUROFIBROMES INTERNES DANS L'ECHANTILLON DE CONSTRUCTION N=208 (ANALYSES UNIVARIEES)	74
TABLEAU 17. CRITERES D'AIC DES MODELES DE REGRESSION LOGISTIQUES	75
TABLEAU 18. MODELE FINAL CONTENANT LES 4 VARIABLES PERMETTANT LA CONSTRUCTION D'UN SCORE DE PREDICTION DE LA MASSE INTERNE TUMORALE (I.E. LA PRESENCE DE NEUROFIBROMES INTERNES).....	76
TABLEAU 19. ADEQUATION DU SCORE SUR L'ECHANTILLON DE VALIDATION.....	78
TABLEAU 20. DESCRIPTION DES VARIABLES DISPONIBLES DANS LA BASE DE DONNEES.....	87
TABLEAU 21. PRINCIPALES CARACTERISTIQUES CLINIQUES DES 357 ENFANTS ATTEINTS DE NF1.	92
TABLEAU 22. FACTEURS ASSOCIES A LA PRESENCE DE NEUROFIBROMES INTERNES DANS LA POPULATION DE 357 ENFANTS NF1 (ANALYSES UNIVARIEES).....	94
TABLEAU 23. ASSOCIATION ENTRE LA PRESENCE DE NEUROFIBROMES INTERNES ET CELLE DES NEUROFIBROMES PLEXIFORMES STRATIFIEE SUR LA PRESENCE DES NEUROFIBROMES SOUS CUTANES	95
TABLEAU 24. ODDS RATIOS DE LA PRESENCE DES NEUROFIBROMES INTERNES EN FONCTION DE LA PRESENCE OU DE L'ABSENCE DE 2 FACTEURS : LES NEUROFIBROMES SOUS CUTANES ET PLEXIFORMES.....	96

TABLEAU 25. RESULTATS COMPARES DE L'ANALYSE MULTIVARIEE ANALYSE CAS –COMPLET (N=184) ET
IMPUTATION MULTIPLE (N=357)..... 99

LISTE DES ABBREVIATIONS

AIC	Critère d'Information d'Akaike
CépiDC	Centre d'épidémiologie sur les causes médicales de décès
CIM	Classification Internationale des Maladies
CNIL	Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés
CPP	Comité de Protection des Personnes
IC95%	Intervalle de Confiance à 95%
INSEE	Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
NF1	Neurofibromatose 1
NF2	Neurofibromatose 2
NIH	National Institutes of Health
OBNI	Objets Brillants Non Identifiés
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OR	Odds Ratio
ORa	Odds Ratio ajusté
PHRC	Programme Hospitalier de Recherche Clinique
PMR	Ratio de Mortalité Proportionnel
PMSI	Programme de Médicalisation des Systèmes d'Information
ROC	Receiver Operating Characteristic
RR	Risque Relatif
SC-NF	Neurofibromes Sous Cutanés
SIR	Ratio d'Incidence Standardisé
SMR	Ratio Standardisé de Mortalité
TMGN	Tumeurs Malignes des Gains Nerveuses

RESUME

La Neurofibromatose 1 (NF1) est une maladie autosomique dominante dont l'évolutivité est inconnue. En effet, ni le type de mutation du gène, la gravité d'éventuels cas familiaux, ni une première complication ne permettent de prédire le pronostic de la maladie. L'objectif général de ce travail de thèse était de cibler les malades les plus à risque de morbi-mortalité au cours de la NF1.

Méthode. Les différents travaux se sont appuyés sur les données phénotypiques de patients NF1 suivis dans le Réseau NF-France labellisé par le ministère de la Santé. Il s'agit d'une filière nationale monothématique ayant pour mission la prise en charge des malades atteints de NF1. Une cohorte d'environ 2500 malades est actuellement suivie dans ce réseau.

Résultats. La mortalité des patients NF1 a tout d'abord été comparée à celle de la population générale française par l'estimation du rapport de mortalité standardisée (SMR). Entre 1980 et 2006, 1 895 patients NF1 ont été rétrospectivement inclus dans la cohorte. Un excès de mortalité était observé chez les [10-20[ans (SMR=5.2, IC95% : 2.6 – 9.3, $p < 10^{-4}$) et les [20-40[ans (SMR=4.1, IC95% : 2.8 – 5.8, $p < 10^{-4}$). Les principales causes de décès étaient la transformation de neurofibromes internes en tumeurs malignes des gaines nerveuses (TMGN). Une étude cas témoins portant sur 208 patients NF1 a permis d'expliquer le risque de mortalité accru chez les patients présentant des neurofibromes sous cutanés (SC-NF) en confirmant en IRM la présence chez ces patients de neurofibromes internes à fort risque de transformation en TMGN (OR=4.3, IC95% : 2.2 – 8.2). Cet effet était d'autant plus marqué que le nombre de SC-NF était important et notamment au-delà d'un seuil de 10 (OR=82, IC95% : 10.4 – 647.9) et que les neurofibromes internes étaient diffus (OR=14.7, IC95% : 3.8 – 57.3) et de taille ≥ 3 cm (OR=6.3, IC95% : 2.3 – 17.4). Les patients présentant des SC-NF représentent 20 à 30% de la population NF1. Afin d'identifier les patients à risque de développer une TMGN, nous avons élaboré un score prédictif de la présence des neurofibromes internes à partir des caractéristiques phénotypiques des patients. La présence de SC-NF (OR=4.7, IC95% : 2.1 – 10.5), l'absence de neurofibromes cutanés (OR=2.6, IC95% : 0.9 – 7.5), un âge inférieur ou égal à 30 ans (OR=3.1, IC95% : 1.4 – 6.8) et moins de 6 tâches café au lait (OR=2, IC95% : 0.9 – 4.6) étaient les variables qui constituaient le NF1Score. Le NF1Score = $10 * (\text{âge} \leq 30 \text{ ans}) + 10 * (\text{absence de neurofibromes cutanés}) + 5 * (\text{moins de 6 tâches café-au-lait}) + 15 * (\text{plus de 2 neurofibrome sous cutanés})$ avait une

excellente adéquation (test C de Hosmer-Lemeshow=4,53 avec 7ddl, $p>0,50$) et une capacité discriminante satisfaisante (aire sous la courbe ROC non paramétrique = 0,75 [0,68-0,82]). Enfin, l'expression phénotypique variant au cours du temps chez un même patient nous avons réalisé une étude spécifique chez l'enfant. Ainsi, l'âge (OR=1.1, IC95% : 1.0 – 1.2), la présence de xanthogranulomes (OR=4.5, IC95% : 0.9 – 21.7), celle de neurofibromes sous cutanés et plexiformes (OR=5.0, IC95% : 1.8 – 13.6) étaient indépendamment associés à celle des neurofibromes internes chez l'enfant NF1 de moins de 17 ans. Dans cette dernière étude, les neurofibromes internes se développaient de façon exponentielle pendant l'adolescence et plus précocement chez les femmes en accord avec les données de la littérature.

Conclusion. La période à risque de développer des neurofibromes internes semble donc se situer entre l'adolescence et l'âge de 30 ans. Les recommandations de suivi pourraient prendre en compte le phénotype à risque, mais également la période de survenue de ces complications en ré-évaluant l'intérêt dans ce contexte d'investigations complémentaires.

MOTS CLEFS

Neurofibromatose 1, Neurofibromes internes, Score prédictif, Régression logistique, Mortalité, Etude cas témoins

ABSTRACT

Neurofibromatosis-1 (NF1) is a common autosomal dominant condition which is a source of various multisystemic manifestations related either to the accumulation of neurofibromas or to specific developmental abnormalities. There are no obvious factors that predict disease progression. Thus, the aim of our project was to characterize the phenotype of NF1 patients with a severe prognosis. Patients were identified among adults with NF-1 followed up in the Réseau NF-France. The Réseau NF-France is a French medical network devoted to neurofibromatosis 1. It has elaborated recommendations for the management of the disease and recommended a coordinated follow-up in specialized multidisciplinary centres. About 2 500 patients were enrolled. We first evaluated the mortality in a large retrospective cohort of NF1 patients. The standardized mortality ratio (SMR) with its 95% confidence interval (CI) was calculated as the ratio of observed over expected numbers of deaths. Between 1980 and 2006, 1895 NF1 patients were seen. The excess mortality occurred among patients aged 10 to 20 years (SMR=5.2; CI, 2.6-9.3; $P<10^{-4}$) and 20 to 40 years (SMR, 4.1; 2.8-5.8; $P<10^{-4}$). The main cause of death was the malignant tumors of the nerve sheath (MPNSTs) developing from preexisting internal neurofibromas. Then, a case-control study including 208 patients with NF1 allowed us to explain the increased risk of mortality among NF1 patients harboring subcutaneous neurofibromas (SC-NF) by the presence of internal neurofibromas (NF) at risk of MPNSTs systematically investigated with imaging (MRI) (OR=4.3, IC95% : 2.2 – 8.2). The association with SC-NF was stronger for patients with ten or more SC-NFs (OR=82, IC95% : 10.4 – 647.9) and for diffuse (OR=14.7, IC95% : 3.8 – 57.3), and ≥ 3 cm (OR=6.3, IC95% : 2.3 – 17.4) internal neurofibromas. Patients with SC-NF constituted 20 to 30% of the NF1 population. So, to characterize patients at risk of developing MPNSTs, we developed and validated a clinical score for predicting internal neurofibromas in adults. Four variables were independently associated with internal neurofibromas: at least two subcutaneous neurofibromas (OR=4.7, IC95% : 2.1 – 10.5), age ≤ 30 years (OR=3.1, IC95% : 1.4 – 6.8), absence of cutaneous neurofibromas (OR=2.6, IC95% : 0.9 – 7.5), and fewer than six café-au-lait spots (OR=2, IC95% : 0.9 – 4.6). The NF1Score was computed as $10 \cdot [\text{age} \leq 30 \text{ years}] + 10 \cdot [\text{absence of cutaneous neurofibromas}] + 15 \cdot [\geq 2 \text{ subcutaneous neurofibromas}] + 5 \cdot [< 6 \text{ café-au-lait spots}]$. Calibration was excellent (Hosmer-Lemeshow statistic=4.53; degrees of freedom=7; $P>0.5$) and discrimination was good (AUC-ROC= 0.75; 95%CI, 0.7-0.8). Finally clinical expressivity is

variable and manifestations of NF1 change at different times in an individual's life. Consequently, a specific study was needed in pediatric patients. We identified easily recognizable clinical characteristics associated with internal neurofibromas in children with NF1. By multivariate analysis, age (OR=1.1, IC95% : 1.0 – 1.2), xanthogranulomas (OR=4.5, IC95% : 0.9 – 21.7), and presence of both subcutaneous and plexiform neurofibromas (OR=5.0, IC95% : 1.8 – 13.6) were independently associated with internal neurofibromas. Moreover internal neurofibromas increased during adolescence. Excess risk of developing internal neurofibromas seems to occur between the adolescence and the age of to 30 in NF1 patients. These clinical features in adults and children would define a new population at risk for complications that may need closer clinical and imaging follow-up.

KEY WORDS

Neurofibromatosis 1, Internal Neurofibroma, prediction score, Logistic regression, Mortality, Case-control study

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

Publications originales dans des revues à comité de lecture

1. **Sbidian E**, Hadj-Rabia S, Riccardi V, Valeyrie-Allanore L, Barbarot S, Chosidow O, Ferkal S, Rodriguez D, Wolkenstein P/Bastuji-Garin S. Clinical features predicting internal neurofibromas in 357 children with Neurofibromatosis-1: results from a cross-sectional study. *Orphanet Journal of rare diseases*, sous presse 2012. **IF=5.1; SIGAPS A**
2. **Sbidian E**/Bastuji-Garin S, Valeyrie-Allanore L, Ferkal S, Lefaucheur J-P, Drouet A, Brugière P, Combemale P, Barbarot S, Wolkenstein P. At-risk phenotype of NF-1 patients: a multicentre case-control study. *Orphanet Journal of rare diseases*, 2011, 13;6:51. **IF = 5.8 ; SIGAPS A**
3. Duong TA, **Sbidian E**, Valeyrie-Allanore L, Vialette C, Ferkal S, Hadj-Rabia S, Glorion C, Lyonnet S, Zerah M, Kemlin I, Rodriguez D, Bastuji-Garin S/Wolkenstein P. Mortality associated with Neurofibromatosis 1: a cohort study of 1895 patients in 1980-2006 in France. *Orphanet Journal of rare diseases*, 2011, 4:6-18. **IF = 5.8 ; SIGAPS A**
4. **Sbidian E**, Wolkenstein P, Allanore L, Pinson S, Rodriguez D, Hadj-Rabia S, Ferkal S, Lacour JP, Leonard JC, Taillandier L, Sportich S, Berbis P, Bastuji-Garin S, Members of the NF France Network. NF1Score: A Prediction Score for Internal Neurofibromas in Neurofibromatosis-1. *J Invest Dermatol* 2010, 130:2173-8. **IF = 5.5 ; SIGAPS A**

Communications orales

1. **Sbidian E**, Hadj-Rabia S, Riccardi VM, Valeyrie-Allanore L, Barbarot S, Chosidow O, Ferkal S, Rodriguez D, Wolkenstein P/Bastuji-Garin S. Neurofibromes internes chez les enfants NF1 : étude transversale française et nord américaine de 357 patients. *ESDR (European Society for Dermatological Research) 2012, Journal of Investigative Dermatology 2012 ; Journées Dermatologiques de Paris 2011, Annales de Dermatologie et de Vénérologie, 2011, 138 ; 12S :C47*
2. **Sbidian E**, Bastuji-Garin S, Ferkal S, Lefaucheur JP, Drouet A, Brugière P, Combemale P, Wolkenstein P. Phénotype à risque d'évolutivité au cours de la Neurofibromatose 1 : résultats d'une étude cas-témoins. *CARD (Congrès annuel de Recherche Dermatologique) 2010 et Journées Dermatologiques de Paris 2009, Annales de Dermatologie et de Vénérologie, 2010, 136 ; 12S :C137*
3. **Sbidian E**, Wolkenstein P, Pinson S, Rodriguez D, Hadj-Rabia S, Ferkal S, Lacour JP, Leonard JC, Chastagner P, Taillandier L, Sportich S, Berbis P, Bastuji-Garin S. NF1Score, un score prédictif de la masse tumorale interne au cours de la Neurofibromatose 1 : construction et validation sur deux échantillons indépendants.

Journées Dermatologiques de Paris 2009, Annales de Dermatologie et de Vénérologie, 2010, 136 ; 12S :C138

4. Duong TA, Valeyrie-Allanore L, Hadj-Rabia S, Glorion C, Lyonnet S, Zerah M, Kemlin I, Rodriguez D, **Sbidian E**, Bastuji-Garin S, Wolkenstein P. Mortalité au cours de la NF1 : étude d'une cohorte de 1781 patients. *Journées Dermatologiques de Paris 2009, Annales de Dermatologie et de Vénérologie, 2010, 136 ; 12S :C136*

Communications affichées

1. **Sbidian E**, Bastuji-Garin S, Ferkal S, Lefaucheur JP, Drouet A, Brugière P, Combemale P, Wolkenstein P. Phénotype à risque d'évolutivité au cours de la Neurofibromatose 1 : résultats d'une étude cas-témoins. *ESDR (European Society for Dermatological Research) 2011. Journal of Investigative Dermatology 2011, S65*
2. Duong TA, **Sbidian E**, Valeyrie-Allanore L, Hadj-Rabia S, Glorion C, Lyonnet S, Zerah M, Kemlin I, Rodriguez D, Bastuji-Garin S, Wolkenstein P. Mortalité au cours de la NF1 : étude d'une cohorte de 1781 patients. *ESDR (European Society for Dermatological Research) 2011. Journal of Investigative Dermatology 2011, S66*

INTRODUCTION

La Neurofibromatose 1

1. Une maladie autosomique dominante

La Neurofibromatose 1 (NF1) ou maladie de Recklinghausen est une maladie neuro-cutanée multisystémique héréditaire prédisposant au développement de tumeurs bénignes et malignes. Il s'agit de la plus fréquente des maladies autosomiques dominantes avec une incidence estimée à une naissance sur 3 à 4000 individus (1). Sa pénétrance est quasi-complète à l'âge de 5 ans. La fréquence des néo mutations est très élevée et près de la moitié des patients NF1 sont des cas sporadiques (1). Il existe une grande variabilité phénotypique, y compris au sein d'une même famille où la mutation est commune aux différents individus affectés pouvant ainsi faire méconnaître la présence de cas familiaux antérieurs.

Le gène NF1

Le gène impliqué, *NF1*, est localisé sur la région péricentromérique du bras long du chromosome 17 (17q11.2). C'est un grand gène formé de 60 exons qui s'étend sur 350 kb d'ADN génomique. Il a la particularité d'englober trois autres gènes: *EVI2A* (*ecotropic viral integration site*), *EVI2B* et *OMPG* (*Oligodendrocyte Myelin GlycoProtein*), localisés dans l'intron 27b et un pseudogène AK3 (Adenylate Kinase 3), situé dans l'intron 37. Aucune étude n'a démontré, à ce jour, un rôle quelconque de ces gènes dans la physiopathologie de la NF1 (2). Le gène *NF1* est un gène suppresseur de tumeur. Des mutations de ce gène sont observées chez 95% des patients remplissant les critères diagnostiques de la National Institutes of Health (NIH) (3-4).

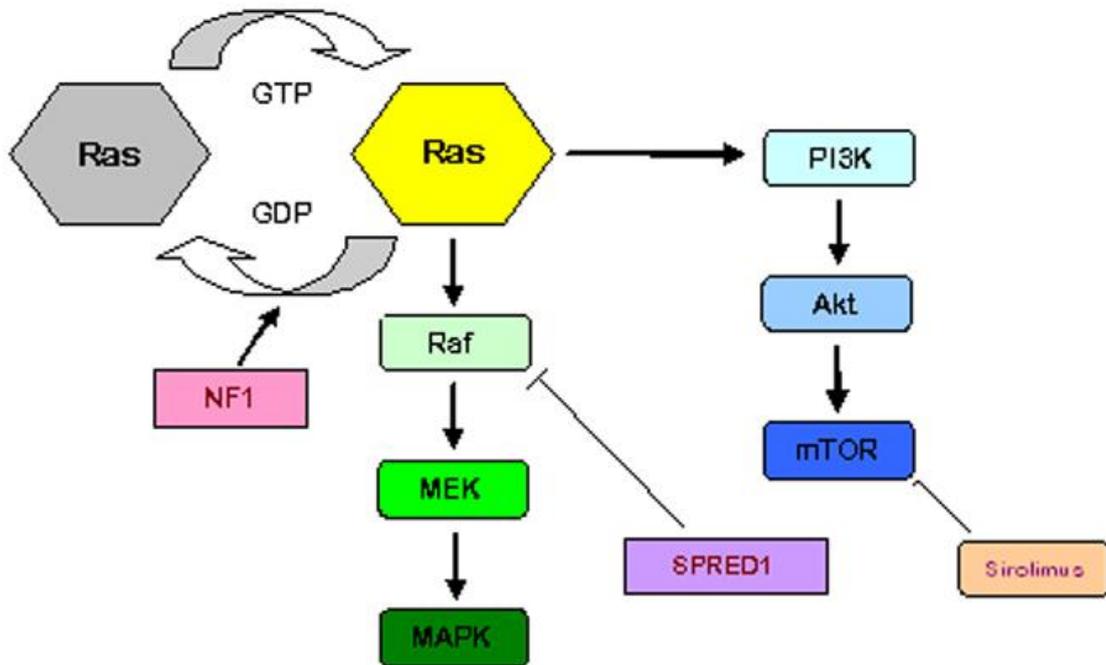
L'ARN messenger

Le gène *NF1* code pour des ARN messagers d'expression ubiquitaire mais dont le niveau d'expression varie considérablement en fonction des tissus. Différents ARN messagers sont synthétisés, leur expression est spécifique de certains tissus et semble évoluer au cours du développement.

La protéine

Le gène *NF1* code pour une protéine cytoplasmique, la neurofibromine. Il s'agit d'une protéine de 2818 acides aminés qui contient une région centrale particulière de 360 acides aminés (exons 21 à 27), la région NF1-GAP (GTPase Activating Protein) Related Domain. Cette dernière présente une homologie de séquence avec le domaine catalytique des protéines GAP et joue un rôle d'inhibiteur de la voie d'activation cellulaire Ras (Figure 1). La voie de signalisation Ras/MAPK joue un rôle majeur dans la régulation du cycle cellulaire, la prolifération, la différenciation, la survie et la mort cellulaire (5-6) ; toutes ces étapes sont critiques pour permettre un développement normal. Cette voie transduit les signaux extracellulaires, véhiculés sous la forme de facteurs de croissance, d'hormones ou de petites molécules, à l'environnement intracellulaire. La perte de cette fonction à travers une neurofibromine anormale ou absente, conduit à une activation permanente de cette voie de signalisation i.e., une perte de contrôle de la croissance et de la différenciation des cellules atteintes. Le mode de régulation de la croissance cellulaire à travers RAS et son contrôle par la neurofibromine font intervenir d'autres effecteurs (Figure 1).

Figure 1. Voies de signalisation impliquées dans la pathogénécité de la Neurofibromatose 1 (7).



MAPK = mitogen-activated protein kinase
 ERK = extracellular signal-regulated kinase
 MEK = MAPK/ERK kinase
 PI3K = phosphoinositide 3-kinase

Mutations du gène NF1

L'étude des mutations dans le gène *NF1* est difficile du fait de la grande taille de ce gène, la présence de nombreux pseudogènes homologues, et l'absence de «région chaude» dans laquelle des mutations seraient retrouvées avec une grande fréquence. Les mutations sont le plus souvent privées (décrites dans une seule famille) et se répartissent uniformément sur l'ensemble du gène. La plupart des mutations de *NF1* (90 à 95%) sont des mutations intragéniques soit non sens, soit des mutations avec un décalage du cadre de lecture entraînant souvent l'apparition d'un codon STOP prématuré et la synthèse d'une protéine défective tronquée (8-9). Les mutations restantes (5 à 10%) sont des microdélétions comportant le gène *NF1* et les gènes contigus (10).

Corrélations génotypes-phénotypes

A ce jour, il ne semble pas y avoir de lien entre une mutation donnée et une expression phénotypique unique. Cette absence de corrélation peut s'expliquer en partie par la recherche non systématique des mutations chez les patients NF1 et par le manque d'information clinique fiable et complète pour une partie des patients.

Actuellement, seuls les patients présentant une large délétion de la région contenant *NF1* ont un risque tumoral plus important, des difficultés d'apprentissage plus marquées et sont plus grands que les patients présentant des mutations intragéniques (11).

Ainsi, à l'exception de ces grandes délétions, il n'existe en pratique aucun élément moléculaire, clinique ou familial pour prédire la gravité de la maladie.

Existence de gènes modificateurs

L'étude de patients NF1 et de leur famille montre clairement la diminution des corrélations phénotype-génotype en fonction du degré de parenté. L'existence de gènes modificateurs modulant l'expression du gène *NF1* pourrait expliquer l'extrême variabilité de la maladie pour des patients issus d'une même famille (12). L'existence d'un tel gène modificateur (ANRIL) vient d'être mise en évidence pour la première fois, il influence le nombre de neurofibromes plexiformes (13).

2. Un diagnostic qui reste clinique

La conférence de consensus du National Institute of Health de Bethesda (USA) a permis, en 1988, de préciser sept critères cardinaux pour le diagnostic de la NF1. Ce diagnostic est posé si deux au moins de ces critères sont réunis chez un même individu : six tâches café au lait ou plus apparaissant durant les premiers mois de vie ; lentigines des plis cutanés ; neurofibromes (i.e. des tumeurs bénignes de la gaine des nerfs périphériques) rarement présents avant la puberté ; nodules de Lisch ou hamartomes iriens apparaissant durant l'enfance ; gliome des voies optiques ; lésion squelettique spécifique (scoliose, pseudarthrose...) ; et un parent atteint du premier degré (Conference, 1988) (tableau 1). L'expression de certains des signes dépend de l'âge (Tableau 2) (1, 14).

Tableau 1. Critères diagnostiques de la Neurofibromatose 1

- Six taches café au lait ou plus mesurant au moins 15 mm chez des individus pubères ou supérieurs à 5 mm chez les enfants
- Deux neurofibromes ou plus de n'importe quel type ou un neurofibrome plexiforme
- Des éphélides bilatérales des régions axillaires ou inguinales
- Au moins deux nodules de Lisch
- Un gliome des voies optiques
- Une lésion osseuse caractéristique comme une dysplasie sphénoïde, un amincissement de la corticale des os longs avec ou sans pseudarthrose
- Un parent du premier degré atteint de neurofibromatose selon les critères précédents

Tableau 2. Fréquence des différents critères diagnostiques de la Neurofibromatose 1 en fonction de l'âge moyen d'apparition (14)

Localisation	Fréquence (%)	Age
Peau		
Tâches café-au-lait	99 à 100	< 5 ans
Ephélides	50 à 80	< 6 ans
Neurofibromes cutanés	100	< 30 ans
Neurofibromes sous cutanés	15 à 24	Enfance, adulte
Neurofibromes plexiformes	30 à 39	< 5 ans
Œil		
Nodules de Lish	67 à 82	> 6 ans
Gliome des voies optiques	15	Petite enfance
Gliome symptomatiques	1 à 3	
Squelette		
Dysplasie sphénoïdale	1	Enfance
Pseudarthrose	3 à 4	Enfance
Scoliose nécessitant une chirurgie	2 à 4.4	Enfance, adolescence

Chez l'adulte, le diagnostic est généralement aisé sur les données de l'examen clinique. Chez l'enfant, les taches café-au-lait peuvent rester longtemps le seul signe. En l'absence d'antécédents familiaux, le diagnostic reste en suspens.

Les manifestations majeures les plus fréquentes sont les taches café au lait multiples, les nodules de Lisch (hamartomes iriens), les lentigines, et les neurofibromes (15-16). Les taches café au lait se développent dans la prime enfance, les nodules de Lisch plus tard dans l'enfance, les neurofibromes durant l'adolescence et à l'âge adulte. Les neurofibromes quasi constants dans la NF1, sont des tumeurs bénignes de la gaine des nerfs périphériques ; ils se manifestent sous forme de lésions cutanées, sous-cutanées ou profondes. Les neurofibromes cutanés se présentent sous la forme de tumeurs molles, mobiles, de couleur chair, rosée ou violacée. Ils se développent durant l'adolescence et l'âge adulte (environ 90 p. 100 des adultes NF1 en sont porteurs) (17). Les neurofibromes sous-cutanés, palpables plus que visibles, sont présents à l'âge adulte dans 20 à 30 p. 100 des cas, ils se développent à partir de troncs nerveux plus importants et sont le plus souvent douloureux (paresthésie à la palpation) (17). Les neurofibromes plexiformes diffus, le plus souvent congénitaux, sont des neurofibromes cutanés et sous-cutanés de taille variable qui infiltrent les tissus voisins (muscles, os...) ; la peau en regard est toujours anormale. Les neurofibromes plexiformes sont observés dans 30 à 40 p. 100 des cas (17). Enfin, les neurofibromes plexiformes nodulaires sont moins fréquents ; ils ont l'aspect de multiples neurofibromes sous-cutanés, regroupés en grappe, en cordons disposés le long de tronc nerveux. Ils sont sensibles ou douloureux comme les simples neurofibromes sous-cutanés isolés dont ils constituent la forme majeure. Développés en réseau sous-cutané à partir des racines nerveuses, ces neurofibromes plexiformes nodulaires peuvent être superficiels ou profonds (appelés aussi neurofibromes internes), ils sont alors à risque de complications sévères selon leur localisation (neurofibrome intradural et compression médullaire, médiastinale...). Localisés près des structures osseuses, ils peuvent aussi entraîner des anomalies de croissance des os longs ou une ostéolyse en regard de la tumeur.

3. Complications et morbi-mortalité

Les principales manifestations cardinales (tâches café au lait multiples, lentigines, nodules de Lisch, neurofibromes cutanés) ne sont pas source de morbi-mortalité, mais leur impact sur la qualité de vie est important (18-19). En revanche, environ 30% des patients atteints de NF1 développent des complications multisystémiques : difficultés d'apprentissage (33%), neurofibromes plexiformes (30%), épilepsies (6%), tumeurs du système nerveux central (3%), cancers liés à la NF1 (Tumeurs malignes des gaines nerveuses –TMGN-, rhabdomyosarcomes et formes rares de leucémies) (4%), complications orthopédiques incluant scoliose (9%) et pseudarthrose (4%). Moins fréquents sont les neurofibromes gastro-intestinaux (2,2%), les sténoses de l'aqueduc de Sylvius (1,5%), le phéochromocytome (1%) et les tumeurs carcinoïdes (1,5%) (15-16, 20-21). L'espérance de vie des patients atteints de NF1 est diminuée de 15 ans par rapport à la population générale (22-23). Cette mortalité est liée principalement à la survenue de TMGN, de tumeurs du système nerveux central (SNC), et d'accidents vasculaires notamment cérébraux (23). Les TMGN constituent la principale complication de la NF1 à l'âge adulte et ainsi le principal risque de mortalité. L'apparition des TMGN au cours de la NF1 est plus précoce (environ 30 ans) que dans la population générale (65 ans) (24). Le risque pour un individu atteint de NF1 de développer une TMGN au cours d'une vie est d'environ 5 à 10 % (25). Dans plus de la moitié des cas, les TMGN sont de localisation axiale, rétropéritonéale et de la racine des membres (26). Le développement de TMGN est suspecté devant l'augmentation rapide de volume d'une tumeur, l'apparition de douleurs d'intensité croissante résistantes à un traitement antalgique bien conduit ou l'apparition de signes neurologiques (déficit moteur par exemple) (27). **Les TMGN proviennent essentiellement des neurofibromes plexiformes nodulaires profonds, ou neurofibromes internes** (25, 28). Le pronostic des TMGN est extrêmement péjoratif avec un taux de survie à 5 ans de l'ordre de 21% chez les patients NF1 alors qu'il est de 42% pour les TMGN survenant dans la population générale (21). Ce mauvais pronostic est plurifactoriel. Les résultats d'une prise en charge multidisciplinaire agressive des TMGN sont décevants sans doute en partie du fait d'un volume tumoral important et de la localisation axiale rendant les tumeurs inopérables (24, 29). L'intérêt de la chimiothérapie est faible : absence de réponse objective aux traitements produisant habituellement des taux de réponse de l'ordre de 40-50% dans les autres formes de sarcomes des tissus mous (29). Enfin, l'évaluation des thérapies ciblées de la voie de signalisation mTOR (figure 1) sont en cours dans

plusieurs essais thérapeutiques (30). Actuellement, les rares patients survivants à long terme sont ceux ayant eu une chirurgie complète sans reliquat microscopique (29).

4. Prise en charge : suivi, dépistage et traitement dans le cadre du réseau NF-France

La fréquence des complications justifie un suivi régulier des patients atteints de NF1. Un comité d'experts du Réseau NF-France a développé des recommandations de prise en charge (14). Le Réseau NF-France est une filière monothématique de soins ayant pour mission la prise en charge des malades atteints de NF1 en France. Ce Réseau est constitué de centres de compétences et coordonné par le Centre de Référence (Centre Hospitalier Universitaire d'Henri Mondor à Créteil) dirigé par le Pr Pierre Wolkenstein. L'objectif du Réseau NF-France est de donner aux malades une qualité de soins identiques dans les différents centres constituant le réseau. Les recommandations élaborées sont également un bon guide pour les médecins amenés à prendre en charge la NF1 en dehors de cette structure.

Le suivi des patients NF1 est essentiellement clinique (14), les examens effectués à titre systématique étant peu rentables pour le malade (16, 31). L'examen clinique peut facilement identifier des complications telles que scoliose, pseudarthrose, hypertension artérielle liée à une sténose de l'artère rénale ou à un phéochromocytome, ou encore difficultés d'apprentissage scolaire dont le dépistage doit être le plus précoce possible. Le tableau 3 résume les principaux points d'évaluation d'un malade atteint de NF1. Les examens complémentaires ne seront réalisés qu'à partir d'un point d'appel clinique (32).

Tableau 3. Evaluation d'un malade atteint de neurofibromatose 1 (PINSON, 2002)

A) Enfant
<i>Evaluation initiale :</i>
Interrogatoire et examen de la famille (arbre généalogique, recherche de sujets atteints)
Examen clinique complet :
Poids, taille, périmètre crânien, TA
Examen neurologique (mouvements anormaux)
Examen dermatologique : taches café au lait, éphélides, neurofibromes sous-cutanés, neurofibromes plexiformes (taille, évolutivité).
Examen orthopédique : cypho-scoliose
Examen endocrinologique : anomalies pubertaires,
Examen abdominal
Examen ophtalmologique (acuité visuelle, lampe à fente, fond d'oeil, champ visuel)
Evaluation des troubles de l'apprentissage
IRM cérébrale systématique avant 6 ans (dépistage du gliome optique).
Examens complémentaires si anomalie clinique
Information de la famille (pronostic, conseil génétique, éducation, résultats d'éventuels examens complémentaires)
<i>Evaluation annuelle systématique :</i>
Examen clinique complet (cf. supra)
Recherche de signes de complications selon l'âge du patient
Examen ophtalmologique.
Evaluation des troubles de l'apprentissage
B) Adulte
<i>Interrogatoire :</i>
Antécédents familiaux et enquête familiale (examen initial)
Céphalées
Gêne esthétique
Douleurs
<i>Examen clinique :</i>
Recherche des critères diagnostiques de neurofibromatose de type 1 (examen initial)
Mesure de la pression artérielle
Existence de neurofibromes plexiformes (taille, évolutivité)
Neurofibromes cutanés gênant esthétiquement
Existence de neurofibromes sous-cutanés (douleurs, taille, évolutivité)
Existence d'une masse évolutive (cutanée ou intra-abdominale)
Examen neurologique

Dialogue :

Explication répétée de la maladie, notamment en cas de prescription d'exams complémentaires

Réponses aux questions

Explications du résultat d'éventuels exams complémentaires

Conseil génétique

Visite annuelle ou à deux ans

Le suivi clinique des patients NF1 a pour but d'assurer le dépistage précoce des complications nécessitant un traitement.

Cependant, l'évolutivité de la NF1 est inconnue : ni le type de mutation du gène, ni la gravité d'éventuels cas familiaux, ni une première complication ne permettent de prédire le pronostic futur de la maladie. **Ainsi, un des objectifs « recherche » du Réseau NF-France a été d'identifier les patients les plus à risque de complications et/ou de mortalité.**

Le suivi de deux cohortes indépendantes (nord américaine et française) a permis d'identifier chez l'adulte NF1 un phénotype à risque de mortalité. Il s'agit de malades porteurs de neurofibromes sous-cutanés (SC-NF). Le risque relatif (RR) des décès chez les malades porteurs d'au moins 2 SC-NF était respectivement de 10,8 (Intervalle de Confiance à 95%, IC95% : 2.1 – 56.7) et de 3,6 (IC95% : 1.1-11,3) dans les deux études (33-34). Les causes de mortalité étaient la compression d'organes par des neurofibromes internes, notamment para-spinaux (compression médullaire), et leur transformation maligne en TMGN.

Notre hypothèse était que le phénotype à risque de mortalité caractérisé par la présence de neurofibromes sous-cutanés cliniquement décelables serait un reflet de la masse tumorale totale et notamment interne, masse tumorale à risque de transformation en TMGN, principale cause de mortalité chez le jeune adulte NF1.

Objectifs de la thèse

L'objectif général de ce travail de thèse était de confirmer et d'expliquer le phénotype à risque de morbi-mortalité au cours de la NF1, afin de cibler les malades les plus à risque de mortalité. L'identification d'un phénotype à risque évolutif d'une part et d'autre part d'une période à risque de mortalité permettraient de moduler le suivi clinique et radiologique de ces malades.

Les objectifs spécifiques étaient :

(i) Préciser la période à risque de mortalité et ses causes dans une grande cohorte de patients NF1.

Chez l'adulte NF1

(ii) Contribuer à une meilleure connaissance du phénotype à risque évolutif en étudiant l'association des neurofibromes sous-cutanés cliniquement décelables avec les neurofibromes internes à fort potentiel de complications.

(iii) Elaborer un score prédictif de la présence d'une masse tumorale interne à partir des caractéristiques phénotypiques des patients NF1 permettant de cibler cliniquement les malades à risque de complications.

Chez l'enfant NF1

(iv) Identifier les facteurs associés à la présence de neurofibromes internes. En effet, les caractéristiques cliniques des patients NF1 étant dépendantes de l'âge, il nous a semblé important de confirmer le phénotype à risque chez l'enfant.

CHAPITRE 1

Analyse de la mortalité au cours de la Neurofibromatose 1 : Cohorte historique française de 1895 patients.

1. Introduction

Les quelques études de mortalité au cours de la NF1 ont observé une diminution de l'espérance de vie d'environ 10 à 15 ans par rapport à la population générale (22-23, 35). Une des premières études s'est intéressée à une cohorte de 70 patients NF1 de la ville de Göteborg en Suède (suivi moyen de 12 ans) (22). La mortalité observée dans cette population était comparée à la mortalité attendue selon les données de la population générale suédoise. Vingt-deux morts ont été observés contre 5.1 attendus ($p < 0.001$). La moyenne d'âge des patients décédés était de 61.6 ans. Les causes de décès étaient principalement des tumeurs malignes ($n=12$, 55% ; TMGN $n=3$, carcinomes $n=9$). En 1986, une autre étude de mortalité concernait une population danoise constituée de 212 patients (probands et apparentés) atteints de NF1 dont le diagnostic avait été porté 42 ans plus tôt (36). Le suivi était disponible pour 99% des patients. Soixante-seize des 212 patients (les probands i.e. les personnes identifiées en premier dans la famille comme ayant la maladie génétique) avaient été initialement suivis à l'hôpital avec possiblement une atteinte phénotypique plus sévère. Dans le but d'éviter un biais de sélection, les auteurs avaient distingué les probands des apparentés. Toujours en comparaison avec la population générale, le taux de mortalité était significativement plus important dans la population NF1 avec un taux de mortalité croissant entre les apparentés, les probands et les femmes probantes. Les tumeurs malignes ou bénignes du système nerveux central étaient présentes chez 45% des probands (RR = 4.0, IC 95% : 2.8 - 5.6). Des cancers étaient présents chez 15 probands et 1 apparenté. Les hommes avaient un taux de cancer comparable à celui de la population générale alors que les femmes avaient un risque 2 fois plus important de développer un cancer (RR = 1.9, IC95% : 1.1 to 3.1). Plus récemment dans une cohorte de 448 patients anglais atteints de NF1 (5705 personnes-années), le sur-risque global de cancer était de 2.7 (IC 95% 1.9 – 3.7) par rapport à la population générale (37). Le risque cumulé de

cancer avant 50 ans était de 20% (IC 95% 14 – 29%), après 50 ans le risque de cancer n'était plus significativement différent de celui de la population générale anglaise ($p=0.27$). Les TMGN étaient la principale cause de mortalité (risque cumulé de 14% avant 70 ans, IC 95% 7.8 – 24%) suivi des tumeurs cérébrales (risque cumulé de 7.9%, IC 95% 3.9 – 16%). Une étude américaine de 2001 s'est également intéressée à la mortalité en s'appuyant sur les certificats de décès (23). Entre 1983 et 1997, les auteurs avaient identifié 3 770 cas présumés de NF1 parmi 32 722 122 décès aux Etats-Unis pendant la même période soit une fréquence de 1/8 700. L'âge moyen des patients NF1 décédés était de 59 ans comparé à 74 ans dans la population générale, soit une espérance de vie diminuée d'environ 15 ans. Les patients atteints de NF1 étaient plus à risque de développer un cancer que la population générale (Ratio de mortalité proportionnel, PMR = 1.21, IC 95% : 1.14 – 1.28) avec des risques plus importants chez les 10-19 ans (PMR = 6.07, IC 95% : 4.88 – 7.45) et les 20- 29 ans (PMR = 4.93, IC 95% : 4.14 – 5.82). Le risque de développer un cancer des tissus mous était encore plus élevé (PMR = 34.3, IC 95% : 30.8 – 38.0). De la même manière, les maladies vasculaires responsables de décès étaient significativement plus fréquentes chez les patients NF1 de moins de 30 ans (PMR = 3.26, IC 95% : 1.31–6.71 chez les moins de 10 ans, PMR = 2.68, IC 95% : 1.38–4.68 chez les 10-19 ans, et PMR = 2.25, IC 95% : 1.46–3.32 chez les 20-29 ans). Aucune différence significative n'était mise en évidence pour les patients plus âgés. Une autre étude basée sur les certificats de décès concernait une population italienne (38). Durant la période 1995-2006, 6.75 millions de décès étaient déclarés dont 632 étaient atteints de NF1. Les décès reliés à la NF1 précédaient d'environ 20 ans ceux de la population générale avec une surmortalité chez les femmes. Il existait un excès de cancers des tissus mous et cérébraux. Plus récemment, une étude anglaise a identifié à partir de registres génétiques 1 023 patients atteints de NF1 parmi les 4.1 millions de personnes vivant dans le Nord Ouest de l'Angleterre (35). Parmi les 131 patients décédés, les TMGN et les gliomes (tumeurs cérébrales) étaient les deux principales causes de mortalité. La survie médiane estimée par des analyses de Kaplan–Meier était de 71.5 ans, en moyenne 8 ans de moins que la population générale.

Toutes ces études convergent vers une diminution de l'espérance de vie avec une surmortalité en rapport avec un taux plus élevé de cancers. Néanmoins les données de mortalité au cours de la NF1 sont limitées en nombre et aucune étude n'a été réalisée en France.

Ainsi l'objectif de ce premier travail était de confirmer la surmortalité au sein d'une cohorte de patients atteints de NF1 suivis en France entre 1980 et 2006 et de préciser la période à risque de mortalité et ses causes.

2. Méthodes et Patients

Population d'étude

Il s'agissait d'une étude de cohorte hospitalière historique et dynamique. La population d'étude était constituée de patients NF1 ayant consulté entre le 1er janvier 1980 et le 31 décembre 2006 l'un des 3 centres parisiens du Réseau NF-France (AP-HP, Hôpital Henri-Mondor, Service de Dermatologie, Créteil ; Hôpital Necker-Enfants Malades, Service de Dermatologie, Paris, et Hôpital Trousseau, Service de Neuropédiatrie, Paris). Pour être éligibles, les patients devaient être atteints de NF1 selon la définition du NIH précédemment décrite (32).

Les patients ont été identifiés à partir de deux sources :

- Les bases de données de consultation de chacun des 3 sites qui enregistrent les données des patients atteints de NF1 consultant sur le site. Chacune de ces 3 bases, déclarée à la Commission Nationale Informatique et Liberté (CNIL), comporte l'identité du patient, sa date de naissance, son numéro d'identification permanent assigné par l'hôpital (NIP) et les caractéristiques cliniques principales relevées lors du premier examen.
- Le codage PMSI (Programme de Médicalisation des Systèmes d'Information) : le code Q850 utilisé pour le codage de la Neurofibromatose en diagnostic principal a été utilisé dans la base PMSI de chacun des 3 sites.

Les données entre les différentes sources ont ensuite été croisées. Les corrections relatives aux noms (nom de jeune fille, nom marital), aux numéros d'identification ont été réalisées, les doublons ont été éliminés. Le dossier clinique de chacun des patients issus de cette sélection (données consultation et PMSI) a été revu par un dermatologue, le Dr Tu-Anh Duong afin de confirmer le diagnostic de NF1 (32). Les données ont finalement été anonymisées.

L'étude a été approuvée par le Comité de Protection des Personnes (CPP) IX d'Ile de France.

Recueil de données

Une observation type a été réalisée (Annexe 5) afin de collecter pour chaque patient, à partir des dossiers cliniques et/ou bases de données de consultation des sites (Dr Tu-Anh Duong), les informations suivantes :

- Age à la première consultation, sexe
- Signes cardinaux de la NF1: présence de taches café-au-lait, de lentigines, de nodules de Lisch, de neurofibromes. Les neurofibromes plexiformes étaient renseignés, les types de neurofibromes cutanés et sous cutanés n'étaient pas distingués entre eux.
- Complications orthopédiques potentielles (scoliose et pseudarthrose), anomalies neurologiques (hydrocéphalie et objets brillants non identifiés ou OBNI qui correspondent à des hypersignaux T2 à l'imagerie par résonance magnétique –IRM-cérébrale), et sténose de l'artère rénale.
- Principales complications tumorales (tumeurs du système nerveux central, TMGN et phéochromocytome)
- Date de la dernière consultation
- Date de décès

Statut vital et causes médicales de décès

Statut vital

Le statut vital a été déterminé de 3 façons:

- Consultation des registres médicaux hospitaliers des 3 sites. Par exemple un patient ayant consulté sur le site après le 31 décembre 2006 était considéré comme vivant à cette même date de point.
- Consultation de la base de données nationale Inserm du Centre d'épidémiologie sur les causes médicales de décès (CépiDC) pour les patients dont le lieu de naissance était connu. Le CépiDc gère les données des certificats et des bulletins de tous les décès survenus en France depuis 1968. La commune de naissance avait alors été contactée et le statut vital renseigné.

- Enfin quand aucune de ces données n'était disponible, les patients étaient contactés par téléphone ou courrier.

Les patients dont le statut vital était toujours inconnu à la date de point après ces 3 étapes étaient classés comme ayant un « statut vital inconnu » en opposition aux patients avec « statut vital connu » (Figure 2).

Causes médicales de décès

Pour obtenir les causes médicales de décès, les informations incluant les dates et lieux de naissance et de décès ainsi que la commune et le département du domicile ont été envoyées au CépiDc. En effet, tous les certificats de décès français (partie médicale) sont rassemblés au CépiDc, où ils sont codés et où leur qualité est évaluée. En France, la certification de décès est obligatoire et doit être effectuée par un médecin. Le certificat est établi selon les recommandations de l'OMS et la partie médicale comporte elle-même deux parties. C'est la première partie qui est utilisée pour rapporter l'enchaînement causal des événements qui ont directement conduit au décès, allant de la cause immédiate rapportée sur la première ligne à la cause initiale mentionnée sur la dernière ligne remplie. La cause initiale constitue la cause de décès publiée en routine, il s'agissait de celle retenue pour l'étude. Les causes médicales de décès fournies par le CépiDc étaient codées selon la période du décès à l'aide des deux dernières révisions de la classification internationale des maladies de l'OMS (CIM9 entre 1979 et 1999 et CIM10 depuis 2000). Quand les informations relatives à l'état civil du patient n'étaient pas disponibles (dates et lieux de naissance et de décès), la cause de décès était cherchée dans le dossier clinique.

Le suivi

La date de formation de la cohorte était le 01 janvier 1980, la date de point le 31 décembre 2006.

La date de fin de suivi, pour chaque sujet était :

- la date de décès pour les sujets décédés

- la date des dernières nouvelles pour les sujets perdus de vue
- la date de point pour les autres sujets (31/12/2006)

Analyses statistiques

Une double saisie a été réalisée. Les analyses ont été réalisées avec le logiciel STATA software version 11 (Stata Corporation, College Station, TX). Les variables continues sont présentées par leur médiane (extrêmes), les variables discrètes sous forme d'effectifs (%).

Les principales caractéristiques phénotypiques des patients NF1 dont le statut vital était inconnu ont été comparées (tests du chi², exact de Fisher ou non paramétrique de Mann-Whitney) à celles des patients NF1 dont le statut vital était connu. L'expression de certains des signes étant dépendante de l'âge, des odds ratios (OR) ajustés sur l'âge avec leur IC 95% ont été estimés en régression logistique séparément pour chaque variable. L'âge pris en compte était celui de la date de point ou l'âge de décès pour les patients dont le statut vital était connu et celui de la date des dernières nouvelles pour les patients dont le statut vital était inconnu. De la même façon, les caractéristiques phénotypiques des patients NF1 décédés et vivants ont été comparées.

La mortalité dans notre cohorte (groupe « statut vital connu ») a été comparée à la mortalité de la population générale par standardisation indirecte en estimant des ratios standardisés de mortalité (SMR). Le SMR est le rapport entre le nombre de décès observé dans notre cohorte et le nombre de décès attendu dans la population générale. Un SMR supérieur à 1 avec un intervalle de confiance n'incluant pas 1 indique un excès de mortalité. L'âge a été divisé en 5 catégories : moins de 10 ans, [10-20[ans, [20-40[ans, [40-60[ans, au moins 60 ans. Les taux de mortalité toutes causes (1) globaux, (2) par tranche d'âge et (3) par sexe ont été estimés en utilisant les taux de mortalité par classe d'âge quinquennale et par année calendaire de la population générale française. Les données démographiques correspondantes fournies par l'Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques (INSEE) ont été utilisées comme source d'estimation du dénominateur, la population française de 2005 a été prise comme référence (une année de recensement national). La contribution individuelle de chaque sujet par classe d'âge quinquennale et par année calendaire a été déterminée en personnes-années. Cette contribution individuelle a été déterminée exactement en jours sur la base d'une

année civile de 365,25 jours. Le nombre de décès attendu a été déterminé en appliquant le taux de mortalité au nombre de personnes-années sommé par classe d'âge quinquennal et par année calendaire. Les IC95% bilatéraux ont été estimés sous l'hypothèse que le nombre décès suivait une loi de Poisson (39). En effet, l'expression de la loi de Poisson fait appel aux concepts d'événements (décès), de population exposée (personnes-années) et de taux, caractérisant son application à des données regroupées de cohorte. La régression de Poisson par rapport à d'autres modèles (modèle de Cox par exemple) permet une plus grande stabilité des estimations des risques relatifs (39).

Analyses de sensibilité.

- Dans le but d'éviter une surestimation de la mortalité, nous avons calculé les SMR toutes causes sur l'ensemble de la cohorte en considérant les patients avec un "statut vital inconnu" comme étant en vie à la date de point : le 31 décembre 2006.
- Pour minimiser un biais de survie, nous avons considéré la population née après le début de la formation de la cohorte dynamique : le 01 janvier 1980. En effet, parmi les patients nés avant le 01 janvier 1980, un certain nombre d'entre eux sont décédés et par voie de fait n'ont pas été enrôlés dans l'étude sous estimant ainsi la mortalité (notamment infantile).

3. Résultats

Population d'étude

Entre le 01 janvier 1980 et le 31 décembre 2006, 1 895 patients atteints de NF1 ont été inclus dans la cohorte. La durée médiane de suivi était de 6.8 ans [0.4-20.6]. A l'inclusion l'âge médian était de 17.7 ans [0-76], et 549 (44.8%) patients avaient moins de 18 ans (Tableau 4). A la date de point, l'âge médian était de 25.9 ans [2-82].

Le statut vital était connu pour 1 226 (65%) des 1 895 patients (Figure 2). Aux dernières nouvelles, les patients avec un "statut vital inconnu" avaient un âge médian de 25.4 ans [0.2-68] (Tableau 4). En comparaison avec le groupe "statut vital inconnu", le groupe "statut vital connu" avait significativement plus de lentigines ($OR_{\text{ajusté sur l'âge}}$, $ORa=1.7$; IC 95% : 1.3-2.2) et plus de TMGN ($ORa = 2.7$; IC 95% : 1.6-4.7) (Tableau 4). La fréquence des gliomes des

voies optiques n'était pas significativement plus importante dans le groupe « statut vital connu » (ORa = 1.3; IC 95% : 0.9-1.7; $P=0.11$).

Parmi les 1 226 patients au statut vital connu, 67 (5.5%) étaient décédés.

Tableau 4. Caractéristiques des patients NF1 selon leur statut vital connu ou inconnu.

Caractéristiques cliniques*	“Statut vital connu” n=1 226 N (%)	“Statut vital inconnu” n = 669 N (%)	OR (IC 95%) †	P (chi2)
Age, années (n=2, 0.1%)	25.9 [2-82]‡	25.4 [0.2-68]‡	-	0.19
Sexe Masculin (n=1, 0.05%)	579 (47)	304 (46)	0.9 (0.8-1.1)	0.57
Cas familiaux (n=513, 2.7%)	515 (57)	278 (57)	1.0 (0.8-1.3)	0.95
≥ 6 tâches café-au-lait (n=6, 0.3%)	1 046 (86)	584 (87)	0.9 (0.7-1.2)	0.56
Lentigines (n=24, 1.3%)	1 043 (86)	509 (78)	1.7 (1.3-2.2)	<10 ⁻⁴
Neurofibromes (n=16, 0.8%)	923 (76)	495 (75)	1.0 (0.8-1.3)	0.87
Neurofibromes Plexiformes (n=30, 1.6%)	361 (30)	175 (27)	1.2 (0.9-1.4)	0.20
Nodules de Lisch (n=433, 22.8%)	382 (40)	204 (40)	1.1 (0.8-1.2)	0.87
Sténose de l’artère rénale (n=534, 28.2%)	5 (1)	3 (1)	0.7 (0.2-3.1)	0.70
Scoliose (n=522, 27.5%)	231 (25)	104 (24)	1.1 (0.8-1.4)	0.72
Hydrocéphalie (n=68, 3.6%)	32 (3)	23 (4)	0.7 (0.4-1.2)	0.22
OBNI (n=1094, 57.7%)	210 (40)	105 (38)	1.0 (0.7-1.4)	0.96
Gliome des voies optiques (n=83, 4.4%)	161 (14)	69 (11)	1.3 (0.9-1.7)	0.11
TMGN (n=54, 2.8%)	80 (7)	16 (3)	2.7 (1.6-4.7)	<10 ⁻⁴
Phéochromocytome (n=59, 3.1%)	13 (1)	7 (1)	1.3 (0.5-3.7)	0.61

Abréviations: OR, odds ratios; IC 95%, intervalle de confiance à 95%; OBNI, hypersignaux T2 sur l’IRM cérébrale; TMGN, tumeur maligne des gaines nerveuses.

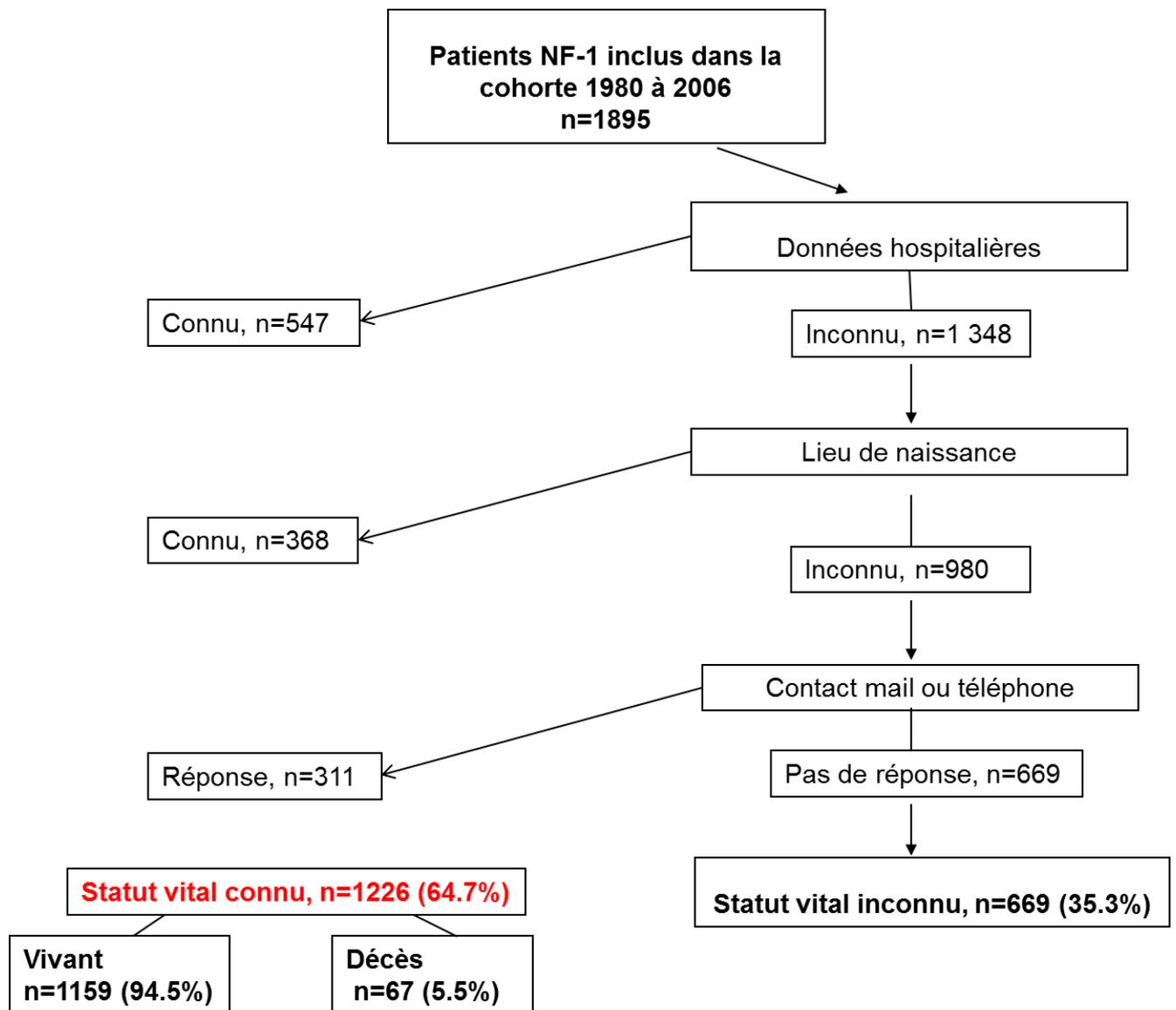
* les valeurs entre parenthèse correspondent au nombre de données manquantes (%).

‡Age à la date de point pour les patients dont le statut vital était connu et âge aux dernières nouvelles pour les patients dont le statut vital était inconnu.

†Les OR étaient ajustés sur l’âge à la date de point ou à la date de décès pour les patients dont le statut vital était connu, à la date des dernières nouvelles pour les patients dont le statut vital était inconnu. Ils étaient estimés par régression logistique.

Les données étaient présentées sous forme de nombre (%) ou par leur médiane [extrêmes].

Figure 2. Diagramme de flux du statut vital de la cohorte de patients NF1 suivis entre 1980 et 2005.



Les causes de mortalité

L'âge médian au moment du décès était de 31.7 ans [0-79.9], 46.3% des patients décédés étaient de sexe masculin. Aucun décès dans une même famille n'était rapporté. En comparaison avec les patients vivants à la date de point, les patients décédés avaient significativement moins de taches café-au-lait (ORa = 0.6; IC 95% : 0.3-1.1), plus de neurofibromes cutanés et sous cutanés (ORa = 3.1; IC 95% : 1.2-8.4), plus de neurofibromes plexiformes (ORa = 1.8; IC 95% : 1.1-3.0), de TMGN (ORa = 31.2; IC 95% : 17.4-55.9) et plus de phéochromocytomes (ORa = 4.3; IC 95% : 1.1-16.3 ; Tableau 5).

Parmi les 67 patients décédés, 26 (38.8%) avaient été identifiés par le CépiDC. Pour 22 des 26 patients (84.6%), les causes de décès étaient communiquées par le CépiDC. Les causes de décès étaient renseignées dans les dossiers cliniques pour 36 autres patients. Ainsi, les causes de décès étaient connues pour 58 (86.6%) patients et étaient liées à la NF1 pour 56 d'entre eux (96.6%). Les principales causes étaient: les TMGN (n=33, 60%), les tumeurs du système nerveux central (n=8, 14%), les compressions médullaires (n=2, 3%), les autres compressions d'organes (n=5, 9%), et les phéochromocytomes (n=2, 3%).

Tableau 5. Caractéristiques des patients vivants et décédés à la date de point parmi les 1 226 patients NF1 dont le statut vital était connu.

Caractéristiques cliniques*	Patients vivants	Patients décédés	OR	P
	n=1159 No (%)	n=67 No (%)	(IC 95%)†	(Chi2)
Age, années, médiane [extrêmes]	25.5 [2-74]	31.7 [0-80]	-	0.008
Sexe masculine	548 (47)	31 (46)	1.0 (0.6-1.7)	0.98
Cas familiaux (n=329, 26.8%)	498 (58)	17 (53)	0.7 (0.3-1.4)	0.62
≥ 6 taches café-au-lait (n=6, 4.9%)	998 (86)	48 (74)	0.6 (0.3-1.1)	0.07
Lentigines (n=9, 7.3%)	985 (86)	58 (88)	1.1 (0.5-2.4)	0.74
Neurofibromes ^x (n=11, 9%)	863 (75)	60 (90)	3.1 (1.2-8.4)	0.02
Neurofibromes plexiformes (n=17, 1.4%)	333 (29)	28 (42)	1.8 (1.1-3.0)	0.02
Nodules de Lisch (n=272, 22.1%)	366 (40)	16 (40)	0.9 (0.5-1.9)	0.89
Stenose de l'artère rénale (n=625, 51%)	5 (1)	0 (0)	-	0.60
Scoliose (n=292, 23.8%)	222 (25)	9 (18)	0.6 (0.3-1.3)	0.23
Hydrocéphalie (n=36, 2.9%)	31 (3)	1 (2)	0.6 (0.1-4.4)	0.60
OBNI (n=700, 57.2%)	202 (40)	8 (30)	0.6 (0.3-1.5)	0.30
Gliome des voies optiques (n=54, 4.4%)	151 (13)	11 (17)	1.2 (0.6-2.6)	0.58
TMGN (n=28, 2.3%)	44 (4)	36 (55)	31.2 (17.4-55.9)	<10 ⁻⁴
Phéochromocytome (n=33, 2.7%)	10 (1)	3 (5)	4.3 (1.1-16.3)	0.03

Abréviations: OR, odds ratio; IC 95%, intervalle de confiance à 95%; OBNI, hypersignaux T2 sur l'IRM cérébrale; TMGN, tumeur maligne des gaines nerveuse.

* les valeurs entre parenthèse correspondent au nombre de données manquantes (%).

†Les OR étaient ajustés sur l'âge à la date du décès pour les patients décédés, à la date de point pour les sujets vivants. Ils étaient estimés par régression logistique.

^xLa variable Neurofibromes ne distingue pas les cutanés des sous cutanés

Les données étaient présentées sous forme de nombre (%) ou par leur médiane [extrêmes].

Les taux de mortalité standardisés

En comparaison avec la population générale, la mortalité toutes causes était significativement plus élevée dans la cohorte de patients NF1 avec un SMR = 2.02, IC 95% : 1.6-2.6; $p < 10^{-4}$. L'excès de mortalité était observé dans deux catégories d'âge, les [10-20[ans (SMR = 5.2; IC 95% : 2.6-9.3; $p < 10^{-4}$) et les [20-40[ans (SMR = 4.1; IC 95% : 2.8-5.8; $p < 10^{-4}$; Tableau 6). L'excès de mortalité était observé à la fois chez les hommes (SMR = 1.8; IC 95% : 1.2-2.5; $p = 0.01$) et les femmes (SMR = 2.9; IC 95% : 2.0-4.0; $p < 10^{-4}$; Tableau 7). Dans la catégorie [10-20[ans, la mortalité semblait plus importante chez les femmes (SMR = 12.6; IC 95% : 5.7-23.9) que chez les hommes (SMR = 1.8; IC 95% : 0.2-6.4).

Tableau 6. Nombre de patients décédés et SMR par catégories d'âge

Age, années	Personnes-années	Décès observés	Décès attendus	SMR	IC 95%
<10	11 905.5	4	4.2	0.95	0.3-2.4
[10 – 20[8 875	11	2.1	5.2	2.6-9.3
[20 - 40[10 395	31	7.6	4.1	2.8-5.8
[40 – 60[3 657.5	11	11.6	0.9	0.5-1.7
≥60	480	10	7.7	1.3	0.6-2.4

Abréviations: SMR, taux de mortalité standardisé ; IC 95%, intervalle de confiance 95%

Tableau 7. Nombre de patients décédés et SMR par catégories d'âge et par sexe.

Age, années	Sexe masculin					Sexe féminin				
	Personnes années	Décès observés	Décès attendus	SMR	IC 95%	Personnes années	Décès observés	Décès attendus	SMR	IC 95%
<10	5 569.5	1	1.8	0.6	0.01-3.1	6 336	3	1.8	1.7	0.3-4.8
[10 – 20[4 000	2	1.1	1.8	0.2-6.4	4 875	9	0.7	12.6	5.7-23.9
[20 – 40[4 262.5	19	4.4	4.3	2.6-6.7	6 132.5	12	2.6	4.7	2.4-8.2
[40 – 60[1 272.5	5	5.5	0.9	0.3-2.1	2 385	6	4.8	1.3	0.5-2.7
≥60	162.5	4	4.8	0.8	0.2-2.1	317.5	6	2.7	2.3	0.8-4.9

Abréviations: SMR, taux de mortalité standardisé ; IC 95%, intervalle de confiance 95%

Analyses de sensibilité

Un excès de mortalité était également observé chez les [10-20[ans (SMR = 3.3; IC 95% : 1.6-5.8; $p=0.01$) et les [20-40[ans (SMR = 2.4; IC 95% : 1.6-3.4; $p=0.001$) quand les patients au statut vital inconnu étaient considérés comme vivants à la date de point.

En analysant les patients nés après la date de formation de la cohorte ($n=633$), l'excès de mortalité toutes causes persistait (SMR = 3.9; IC 95% : 2.3-6.3; $p<10^{-4}$) avec un excès plus important toujours chez les 10-30 ans (Tableau 8).

Tableau 8. Nombre de patients décédés et SMR par catégories d'âge chez les patients NF1 nés après le 01 janvier 1980 ($n=633$).

Age, années	Personnes-années	Décès observés	Décès attendus	SMR	IC 95%
<10	5 719	4	2.1	1.9	0.5-4.9
[10 – 20[2 990	9	0.7	13.9	6.3-26.3
[20 – 30[680	3	0.4	7.4	1.5-21.5

Abréviations: SMR, taux de mortalité standardisé ; IC 95%, intervalle de confiance 95%

4. Discussion

Une surmortalité significative a été observée chez les patients NF1 par rapport à la population générale, particulièrement chez les 10-40 ans. Chez les plus de 40 ans aucun excès de mortalité n'a été observé possiblement lié à un manque de puissance (nombre limité de patients de plus de 60 ans au sein de la cohorte). Cette surmortalité était présente dans les deux sexes mais significativement plus importante chez les femmes de 10 – 20 ans. Les décès étaient principalement liés à la survenue de cancers (et notamment les TMGN) et des autres complications liées à la NF1.

Forces et limites de l'étude.

La cohorte a été constituée de façon rétrospective à partir de patients suivis dans les 3 centres parisiens du Réseau NF-France. Une des forces de notre étude réside dans la certitude du diagnostic, en effet tous les patients avaient au moins 2 des critères diagnostiques définis par le NIH (32) et le diagnostic avait été validé à partir du dossier patient par un dermatologue. Ce qui n'était pas le cas des études antérieures où le diagnostic principal pouvait être erroné (certificats de décès (23, 38) ou registre (35)). Les autres études de cohorte ne concernaient pas plus de 500 patients (22, 36-37). Par ailleurs, la fréquence des caractéristiques phénotypiques des patients analysés ici (caractéristiques dermatologiques, orthopédiques, endocriniennes, neurologiques...) était en très grande partie similaire à celle des données de la littérature (17). Une bonne représentativité de la cohorte a donc été assurée minimisant ainsi un biais de sélection. Plusieurs sources d'information ont été utilisées pour déterminer le statut vital de la population. Le statut vital restait cependant inconnu pour environ un tiers de la cohorte pouvant entraîner un biais d'information. L'excès de mortalité chez les 10-40 ans restait significatif quand les patients dont le statut vital était inconnu étaient considérés vivants à la date de point. Une autre limite de l'étude est liée au caractère historique de la cohorte pouvant être à l'origine d'un biais de survie. En effet, un certain nombre de patients nés avant le 01 janvier 1980 sont décédés et par voie de fait n'ont pas été enrôlés dans l'étude. Là encore des analyses de sensibilité ont été réalisées en ne considérant que la population née après le 01 janvier 1980, soit après la date de formation de la cohorte. Un excès de mortalité significatif était mis en évidence chez les 10-30 ans possiblement plus important que celui de la cohorte globale. Le recrutement hospitalier peut également être à l'origine d'un biais de sélection en recrutant des patients ayant une forme plus sévère de NF1.

Cependant, les résultats de cette étude sont similaires à ceux des études de mortalité précédentes dont certaines sont basées sur des certificats de décès (n'incluant donc pas qu'une population hospitalière) (22-23, 35-37). Nous avons choisi une méthode de standardisation indirecte pour calculer le taux de mortalité. Cette méthode nous semblait appropriée devant les effectifs de certaines classes d'âge. Contrairement à une méthode de standardisation directe, le calcul du SMR ne nécessite pas de connaître les taux spécifiques de mortalité (par âge) des populations à comparer, ceci est important car dans de petites populations comme pour notre étude, dont les effectifs par classe d'âge sont faibles, ces taux spécifiques ne sont pas fiables, car trop instables.

Comparabilité des résultats par rapport aux données de la littérature.

Parmi les 58 patients décédés dont l'étiologie du décès était renseignée, 56 sont morts de complications liées à la NF1, principalement de cancers (TMGN 60% et tumeurs cérébrales 14%). Ces résultats sont similaires aux données de la littérature précédemment décrites. Parmi une cohorte de 448 patients NF1 anglais, le sur-risque global de cancer était de 2.7 (IC 95% 1.9 – 3.7) par rapport à la population générale (37). Les causes de décès étaient, comme pour notre étude, les tumeurs du système nerveux central et les cancers des tissus mous ; l'incidence du cancer du sein chez les femmes de moins de 50 ans était plus important que pour la population générale (Ratio d'Incidence Standardisé SIR = 4; IC 95% : 1.1-10.3). Les données d'incidence de cancers n'étaient pas disponibles dans notre étude, cependant aucun cas de décès par cancer du sein n'était rapporté. De la même manière, l'étude de Rasmussen et al, à partir de certificat de décès, retrouvait un risque 34 fois plus important pour la population NF1 de décéder d'un cancer des tissus mous par rapport à la population générale (23). Les PMR tous cancers confondus étaient de 6.1 pour les patients décédés entre 10 et 19 ans et de 4.9 chez les 20 – 29 ans. Les PMR des tumeurs du système nerveux central et des maladies vasculaires étaient significativement plus élevés dans la population NF1. Les auteurs concluaient que les complications carcinologiques et vasculaires semblaient concerner les patients NF1 de moins de 40 ans. Dans notre étude, aucun décès lié à une cause cardiovasculaire n'était rapporté.

Dans notre étude, l'âge médian au décès était de 31.7 ans [0-77.9], beaucoup plus jeune que dans les études précédentes. Notre population d'étude était initialement jeune avec un âge médian à la date de point de 25.9 ans. Dans une étude japonaise, la moyenne d'âge au décès

était de 43 ans, cependant il s'agissait d'une étude portant sur des certificats de décès où les patients NF1 et NF2 (dont l'espérance de vie est d'environ 50 ans) n'étaient pas séparés (40). Dans l'étude de Rasmussen, la moyenne d'âge au décès était de 54.4 ans soit 15.7 années plus jeunes que la moyenne d'âge de décès de la population générale (23). Dans notre étude, les femmes décédaient plus précocement que les hommes en accord avec certaines données de la littérature (36). Les femmes âgées de 10 à 20 ans étaient aussi plus à risque de décéder que les hommes. Une des hypothèses serait que les hormones stéroïdiennes affectent le phénotype NF1. Des études immunohistochimiques ont identifié des récepteurs à la progestérone sur les neurofibromes (41). Des souris femelles immunodéprimées ont développé des TMGN après xénogreffes orthotopiques dans leurs nerfs sciatiques de lignées cellulaires NF1 immortalisées dérivées de culture primaire de cellules de Schwann (cellules du système nerveux périphériques). La prolifération tumorale décroissait après l'ovariectomie de ces souris et était restaurée par une hormothérapie substitutive par œstrogène et progestérone (42). D'autres études fondamentales réalisées par la même équipe ont mis en évidence un rôle des oestrogènes et de la progestérone sur la croissance des TMGN (43).

En conclusion, cette étude confirme l'excès de mortalité des patients atteints de NF1 par rapport à la population générale. Il existe une période à risque de mortalité chez les 10-40 ans, les femmes âgées de 10 à 20 ans sont plus à risque de décéder que les hommes. Malgré le caractère rétrospectif et le recrutement hospitalier qui sont des limites à notre étude, les résultats sont similaires aux études antérieures et retrouvent une surmortalité liée à un excès de cancers dans la population NF1.

CHAPITRE 2

Phénotype à risque de mortalité au cours de la NF1: résultats d'une étude cas-témoins multicentrique

1. Introduction

L'étude précédente a permis de confirmer l'existence d'une surmortalité des patients NF1 par rapport à la population générale, mais également d'identifier **une période à plus fort risque de sur-mortalité entre 10 et 40 ans**. Par ailleurs, le suivi de deux cohortes indépendantes (nord américaine et française) avait permis d'identifier chez l'adulte NF1 **un phénotype à risque de morbi-mortalité** caractérisé par la présence de SC-NF (33-34). Le RR de décès chez les malades porteurs de SC-NF était respectivement de 10.8 (IC95% : 2.1 – 56.7) et de 3.6 (IC95% : 1.1-11.3) dans ces deux études (33-34). Les causes de mortalité étaient celles retrouvées dans notre précédent travail i.e., la compression d'organes par des neurofibromes internes, notamment para-spinaux (compression médullaire) et leur transformation en TMGN. L'hypothèse résultante de ces 2 études était que la présence de SC-NF cliniquement décelables pourrait refléter la masse tumorale interne à risque de complications. L'analyse rétrospective de la file active de patients suivis dans le centre de Référence des Neurofibromatoses au CHU Henri Mondor, Créteil, a conforté cette hypothèse (25). Cette étude portait sur 476 patients NF1 (probands) vus en consultation dans le centre entre 1988 et 2004. En analyses univariées ajustées sur l'âge, les TMGN étaient liées à la présence de SC-NF (OR = 2.8, IC 95% : 1.1 - 6.9) et celle des neurofibromes internes (OR = 20.5, IC 95% : 5.3 -79.5). Par ailleurs, il existait un lien très fort entre les SC-NF et les neurofibromes internes (OR= 3.6, IC 95% : 1.7 - 7.6) (25). Les neurofibromes internes sont diagnostiqués à l'aide d'examens para-cliniques dont l'IRM est l'examen de référence. Ils se développent aux dépens des branches principales des nerfs spinaux et crâniens et forment un réseau tumoral qui s'insinue dans les tissus adjacents profonds. La plupart des neurofibromes internes sont asymptomatiques ; cependant, certains, de par leur localisation, peuvent entraîner des compressions viscérales sévères (compression médullaire, médiastinale ou des voies aéro-digestives supérieures). Par ailleurs, ils sont à risque de transformation en TMGN

dans 5 à 10 p. 100 (25). Ces neurofibromes internes à fort potentiel de transformation en TMGN apparaissent à l'IRM sous la forme d'un épaissement diffus, irrégulier et le plus souvent étagé des racines des nerfs spinaux (44-45). D'autre part, dans une précédente étude portant sur 668 patients NF1 suivis dans 2 sites du Réseau NF-France (Créteil et Lyon), la présence d'une neuropathie périphérique était liée à celle de SC-NF ($p < 0.0001$) (45-46). Notre hypothèse était que cette association était liée à la présence de neurofibromes internes localisés le long des gros nerfs des membres inférieurs (sciatiques par exemple).

Ainsi, l'objectif principal de cette étude était de contribuer à une meilleure connaissance du phénotype à risque évolutif (présence de SC-NF) en caractérisant finement l'association entre les SC-NF et les neurofibromes internes à fort potentiel de complications détectés en IRM et ainsi d'évaluer leurs caractéristiques (type, distribution, localisation, taille). L'objectif secondaire était de déterminer si les neuropathies périphériques détectées par un électromyogramme étaient associées à la présence de neurofibromes internes le long des troncs nerveux.

2. Patients et Méthode

Schéma d'étude

Nous avons donc comparé les patients NF1 ayant des SC-NF (cas) à des patients n'en ayant pas (témoins). Cette étude cas-témoins multicentrique a été réalisée dans 3 hôpitaux du Réseau NF-France (Hôpital Henri Mondor, Créteil ; Centre Hospitalier Universitaire Hôtel Dieu, Nantes ; Centre hospitalier Universitaire Léon Bérard, Lyon) avec une inclusion prospective de février 2005 à décembre 2008. L'étude a été approuvée par le CPP IX d'Ile de France. Tous les cas et tous les témoins ont donné leur consentement pour participer à l'étude. Cette étude a reçu un financement du Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC 2005).

Population d'étude

Définitions

Nous nous sommes appuyés sur la classification proposée par Riccardi pour définir les 4 types de neurofibromes (47) :

- Les neurofibromes cutanés sont des tumeurs exophytiques mobiles par rapport au plan sous cutané,
- Les neurofibromes sous-cutanés sont des tumeurs adhérentes au plan sous-cutané profond, ferme à la palpation plus ou moins sensible,
- Les neurofibromes internes ou profonds ou neurofibromes plexiformes nodulaires profonds sont diagnostiqués en imagerie et peuvent se développer à partir de n'importe quelle racine nerveuse.
- Les neurofibromes plexiformes superficiels sont des neurofibromes cutanés et sous-cutanés de taille variable qui infiltrent les tissus voisins (muscles, os...) avec la peau en regard toujours anormale (hyperpigmentation, hypertrichose...).

Cette classification était validée par les centres participants. Le diagnostic de neurofibromes sous-cutanés était donc posé après un examen clinique réalisé par un médecin expert de la NF1 dans chacun des 3 centres.

Les cas et témoins: critères d'inclusion et de non-inclusion

Les cas ou « phénotypes à risque évolutif » ont été recrutés parmi les patients NF1 consultants l'un des 3 centres cités ci-dessus du Réseau NF-France. Pour chaque cas, un témoin atteint de NF1 apparié sur l'âge \pm 5 ans, le sexe et le centre était recruté.

Les critères d'inclusion étaient :

- Les patients ayant au moins deux des sept critères diagnostiques définis par le NIH (32),
- de 17 ans et plus,
- Etant soit un cas sporadique ou le cas index dans les formes familiales,

- N'ayant pas été inclus dans les 2 études rapportées précédemment dans les centres de Créteil et de Lyon (25, 45),
- **Présentant pour les cas au moins deux SC-NF répondant à la définition clinique présentée au paragraphe précédent et pour les témoins aucun SC-NF.** Le seuil d'au moins 2 SC-NF a été choisi pour les cas dans le but d'éviter un biais de classement. En effet, un neurofibrome cutané pourrait être pris à tort pour un neurofibrome sous-cutané, au moins 2 neurofibromes sous-cutanés par patient limitaient une erreur de classement.
- Ayant consenti à participer au protocole de recherche.

Les critères de non inclusion étaient :

- Les malades de moins de 17 ans ou majeurs sous tutelle,
- Les femmes enceintes,
- Les malades ayant un seul neurofibrome sous-cutané,
- Les malades chez lesquels l'IRM était contre-indiquée,
- Les malades refusant de participer au protocole de recherche.

Nombre de sujets nécessaires

La prévalence des neurofibromes internes a été estimée à environ 20% de la population générale NF1 (48). L'inclusion de 100 malades dans chaque groupe (cas et témoins) permettait de confirmer une association entre l'existence du phénotype à risque et celle de neurofibromes internes et de mettre en évidence un odd ratio (OR) ≥ 3 pour un risque α de 0.05 et un risque β de 0.10. Il avait été prévu d'inclure 10% de patients en plus afin de disposer de suffisamment d'observations au total, en cas de retrait de consentement. L'inclusion d'un total de 220 patients était prévue.

Recrutement

Tous les patients répondant aux critères d'inclusion et qui avaient au moins 2 (phénotypes à risque) ou aucun NF sous-cutané (phénotypes à faible risque) ont été sélectionnés à partir de la base de données du réseau NF-France (environ 2 500 malades). Cent vingt malades ont été sélectionnés de manière aléatoire parmi les patients ayant au moins deux neurofibromes sous-cutanés (cas potentiels). L'inclusion définitive dans le groupe Phénotype à risque évolutif a été arrêtée quand 110 malades remplissant tous les critères d'inclusion ont accepté de participer à la recherche. Pour chaque cas inclus, deux témoins de même âge (± 5 ans), sexe et centre ont été sélectionnés de manière aléatoire dans la base et répartis en deux listes afin de constituer le groupe à faible risque évolutif. Les patients figurant dans la seconde liste n'étaient contactés que si le premier témoin refusait de participer à l'étude.

Recueil de l'information

Les conditions du recueil de l'ensemble des informations (facteurs étudiés, facteurs de confusion) étaient identiques chez les cas et les témoins.

Variables explicatives candidates

1. Les Neurofibromes internes : Identification et caractérisation

Tous les cas et témoins ont réalisé un examen d'imagerie standardisé. Il s'agissait d'une IRM effectuée en un temps en séquences pondérées en T2 avec effacement de graisse, sans injection de produit de contraste avec coupes coronales sur l'ensemble du rachis (nécessitant 2 centrages, lombaire et cervico-dorsal) et coupes coronales sur les cuisses (1 centrage). Les paramètres de séquences suivants étaient réalisés dans chacun des 3 centres : (i) coupes coronales jointives de 4 mm d'épaisseur couvrant la totalité du rachis, (ii) technique de turbo-spin-écho avec un facteur d'accélération ≥ 20 , (iii) TR /TE (ms) = 4500-5000 /95-140, (iv) acquisition parallèle avec un facteur d'accélération maximum de 2 (technique SENSE ou SMASH ou variantes de ces deux techniques), (v) FOV = 380 à 400 mm et matrice de 512, (vi) saturation de graisse par une technique STIR ou apparentée. Trois acquisitions coronales

successives (cervico-dorsale, dorso-lombo-sacrée et bassin/cuisses) couvraient l'ensemble du champ de vue utile.

Une relecture centralisée de toutes les IRM a été réalisée au CHU Henri Mondor en insu des caractéristiques phénotypiques des patients (Dr Pierre Brugière). Les résultats de l'imagerie étaient classés selon la présence ou l'absence de neurofibromes internes. Étaient renseignés leur type (paraspinaux ou au niveau des gros nerfs des membres inférieurs), leur localisation (intra ou extraduraux pour les neurofibromes internes paraspinaux), leur distribution (diffus ou segmentaire), leur taille (<3 cm ou ≥ 3 cm).

2. Les neuropathies périphériques : étude électrophysiologique et caractérisation

Tous les cas et témoins ont effectué un électromyogramme pour déterminer la présence ou non d'une neuropathie périphérique. L'exploration de différents troncs nerveux par électroneuromyogramme de surface a été effectuée (sciatique poplité externe, sciatique poplité interne, nerf sural et tibial aux deux membres inférieurs). En cas d'anomalies un électroneuromyogramme de détection complétait le précédent examen. Le rendu des résultats était standardisé et relu de façon centralisée au CHU Henri Mondor par un physiologiste, également en insu du phénotype clinique (Pr Jean-Pascal Lefaucheur).

Un premier classement des polyneuropathies en 3 catégories exclusives a été réalisé:

- (1) absence de polyneuropathie : tracé électrophysiologique normal.
- (2) présence d'une polyneuropathie axonale à prédominance sensitive: neuropathie axonale, symétrique et distale, qui au début est à prédominance sensitive avec une diminution des amplitudes sensibles et une conservation des vitesses de conduction. Plus tardivement, l'atteinte axonale intéresse les fibres motrices et sensibles.
- (3) présence d'une polyneuropathie axonale à vitesse de conduction lente : vitesses de conduction motrices uniformément diminuées sans dispersion temporelle ou blocs de conduction. Ce dernier type de neuropathies semble plus sévère.

Les patients ont également été classés selon la présence ou non d'une radiculopathie, la catégorie « radiculopathie » étant indépendante des polyneuropathies. La radiculopathie est une atteinte proximale d'un nerf définie d'un point de vue électrophysiologique par une

altération du réflexe H ou un temps de latence allongé des ondes F.

Facteurs de confusion analysés

Des données socio-démographiques (sexe, âge à l'inclusion, caractère sporadique ou non de la maladie) et cliniques (tension artérielle ; neurofibromes cutanés, sous cutanés, plexiformes ; dysmorphie faciale...) de chacun des patients étaient prospectivement recueillies au cours d'une consultation spécialisée dans chacun des 3 centres à l'aide d'un questionnaire standardisé validé dans le cadre NF-France (annexe 6). Les caractéristiques dermatologiques ont été détaillées : nombre de taches café-au-lait (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, ≥ 7) ; localisations des lentignes (axillaires uni ou bilatérales, inguinales) ; nombre de neurofibromes cutanés (0, 1, 2-9, 10-99, ≥ 100) ; nombre de neurofibromes sous-cutanés (0, 1, 2-9, 10-99, ≥ 100) ; présence de taches violines ; nombre de neurofibromes plexiformes et leur localisation (orbito-palpébrale, visage, tête et cou, tronc face dorsale et face ventrale, membres supérieurs et inférieurs). La plupart des autres items ont été codés absents/présents. Des anomalies neuropsychiatriques ont été recherchées : céphalées, antécédent d'épilepsie, difficultés d'apprentissage ainsi que des complications orthopédiques (scoliose) et endocriniennes (hypertension artérielle).

Analyses statistiques

Une double saisie a été réalisée. Les analyses ont été réalisées avec le logiciel STATA software version 11 (Stata Corporation, College Station, TX). Les variables continues sont présentées par leur médiane (extrêmes) ou leur moyenne (\pm déviation standard), les variables discrètes sous forme d'effectifs (%). Tous les tests étaient bilatéraux, $p < 0.05$ était considéré comme significatif.

Après vérification des critères d'appariement, les caractéristiques des cas et des témoins ont été comparées en analyses univariées (test du χ^2 , exact de Fisher ou non paramétrique de Mann-Whitney). Des ORa sur les variables d'appariement (âge, sexe et centre) avec leur IC 95% ont été estimés en régression logistique séparément pour les neurofibromes internes paraspinaux et les neurofibromes internes des gros nerfs des membres inférieurs. Des analyses

en sous groupes ont été réalisées selon la localisation (intra ou extradural), la distribution (diffus ou segmentaire), et la taille des neurofibromes internes ($<$ ou ≥ 3 cm) en appliquant une correction de Bonferroni. De la même façon, des ORa avec IC 95% ont été estimés séparément pour chaque type de neuropathies ou radiculopathies.

Pour tester l'hypothèse que l'association entre les neurofibromes sous cutanés et les neuropathies était liée à la présence de neurofibromes internes le long des gros nerfs, des analyses bivariées incluant les neurofibromes internes et les neuropathies ont été réalisées. Les liens entre ces variables ont été analysés, les facteurs de confusion potentiels ont été recherchés de même que les interactions. Finalement pour évaluer un éventuel "effet dose" du nombre de neurofibromes sous-cutanés, la présence de neurofibromes internes paraspinaux ou le long des gros nerfs des membres inférieurs et celle de neuropathies ainsi que leurs caractéristiques ont été comparées entre les cas présentant (1) 2 à 9 neurofibromes sous cutanés, (2) au moins 10 neurofibromes sous-cutanés et (3) les témoins. Les RR et leur IC95% ont été estimés par des modèles de régression multinomiale systématiquement ajustés sur l'âge, le sexe et le centre, le groupe témoin étant la catégorie de référence. Les analyses en sous groupes ont été réalisées avec une correction de Bonferroni.

3. Résultats

Entre 2005 et 2008, 110 cas ont été inclus et appariés à 110 témoins. Quatre cas et 8 témoins ont été secondairement exclus en raison d'une IRM ininterprétable. Les caractéristiques cliniques des 106 cas et 102 témoins sont rapportées dans le tableau 9. Les cas étaient âgés en moyenne de 41 (± 13) ans, 62 (59%) étaient des femmes, 85 (80%) avaient 2 à 9 SC-NF et 21 (20%) au moins 10. Il n'y avait pas de différence significative entre les cas et les témoins concernant le sexe et l'âge (variables d'appariement) et les autres caractéristiques cliniques (caractéristiques dermatologiques, complications orthopédiques, et anomalies neurologiques) à l'exception des neurofibromes cutanés et plexiformes. Par rapport aux témoins, les cas avaient significativement moins souvent de neurofibromes cutanés ($p=0.03$) et plus souvent des neurofibromes plexiformes ($p=0.04$). Enfin, les cas semblaient présenter moins de taches café au lait que les témoins mais cela était non significatif ($p=0.07$).

Tableau 9. Caractéristiques des patients avec au moins 2 neurofibromes sous-cutanés (cas) et des témoins.

Caractéristiques cliniques	Cas n=106	Témoins n=102	p*
Variabiles d'appariement			
Sexe féminin	62 (59)	62 (61)	
Age (années)	41 (\pm 13)	41 (\pm 14)	
Centres			
- Henri Mondor, Créteil	98 (89)	90 (83)	
- Léon Bérard, Lyon	10 (9)	12 (11)	
- Hôtel Dieu, Nantes	2 (2)	7 (6)	
Variabiles cliniques			
Cas familial	56 (47)	56 (45)	0.76
Aucun neurofibrome cutané	13 (12)	4 (4)	0.03
Neurofibromes plexiformes	66 (62)	49 (48)	0.04
Taches café-au-lait (nombre)	8.6 (\pm 4.8)	10.1 (\pm 10.1)	0.07
Absence de lentigines	21 (20)	12 (12)	0.11
Nodules de Lisch	48 (81)	45 (80)	0.89
Scoliose	46 (43)	42 (41)	0.75
Céphalées	38 (36)	41 (40)	0.52
Epilepsie	2 (2)	2 (2)	0.97
Troubles de l'apprentissage	58 (57)	52 (49)	0.26

*p était obtenu par un test de chi² ou la statistique exacte de Fisher selon les effectifs ou le test non paramétrique de Mann-Whitney selon le codage des variables.

Les données étaient présentées sous forme de nombre (%) ou par leur moyenne (déviatiion standard).

Les résultats des analyses univariées sont présentés dans le tableau 10. La présence de SC-NF était significativement associée à celle de neurofibromes internes paraspinaux (ORa = 4.3, IC 95% : 2.2 - 8.2) et le long des gros nerfs des membres inférieurs (ORa = 6.1, IC 95% : 2.9 - 13). Cette association était fortement significative pour les neurofibromes internes paraspinaux diffus (vs segmentaires, chi² d'homogénéité = 29.0, p<10⁻⁴), intraduraux (vs extraduraux, chi² d'homogénéité = 22.5, p<10⁻⁴) et de taille \geq 3 cm (vs < 3cm, chi² d'homogénéité = 23.2, p<10⁻⁴). De la même façon, les neurofibromes le long des gros nerfs

des membres inférieurs diffus ou de taille ≥ 3 cm étaient plus fortement associés aux SC-NF que ceux segmentaires (χ^2 d'homogénéité = 31.7, $p < 10^{-4}$) ou de taille < 3 cm (χ^2 d'homogénéité = 29.0, $p < 10^{-4}$).

Tableau 10. Présence des neurofibromes internes chez les cas et les témoins.

	Cas, n=106 (%)	Témoins, n=102 (%)	OR* (95%IC)	P
Neurofibromes paraspinaux	54 (51)	20 (20)	4.3 (2.2 – 8.2)	$< 10^{-4}$
Distribution				
Aucun	52 (49)	82 (81)	1	$< 10^{-4**}$
Segmentaire	26 (25)	16 (15)	2.6 (1.2 – 5.3)	
Diffus	28 (26)	4 (4)	14.7 (3.8 – 57.3)	
Localisation				
Aucun	52 (49)	82 (81)	1	$< 10^{-4**}$
Extradural	37 (35)	17 (16)	3.2 (1.6 – 6.4)	
Intradural	17 (16)	3 (3)	8.8 (2.3 – 33.9)	
Taille				
Aucun	52 (49)	82 (81)	1	$< 10^{-4**}$
< 3 cm	30 (28)	14 (14)	3.4 (1.6 – 7.2)	
≥ 3 cm	24 (23)	6 (5)	6.3 (2.3 – 17.4)	
Neurofibromes sciatiques	50 (47)	13 (13)	6.1 (2.9 – 13.0)	$< 10^{-4}$
Distribution				
Aucun	63 (60)	90 (88)	1	$< 10^{-4**}$
Segmentaire	15 (14)	9 (9)	2.7 (1.1 – 6.8)	
Diffus	28 (26)	3 (3)	15.4 (4.0 – 59.7)	
Taille				
Aucun	56 (53)	89 (88)	1	$< 10^{-4**}$
< 3 cm	33 (31)	9 (9)	5.8 (2.5 – 13.8)	
≥ 3 cm	17 (16)	4 (4)	6.8 (2.1 – 22.2)	

* Odds Ratio (OR) et Intervalle de Confiance à 95% (IC 95%) ajustés sur l'âge, le sexe et le centre (facteurs d'appariement)

** $p < 0.01$ correction de Bonferroni

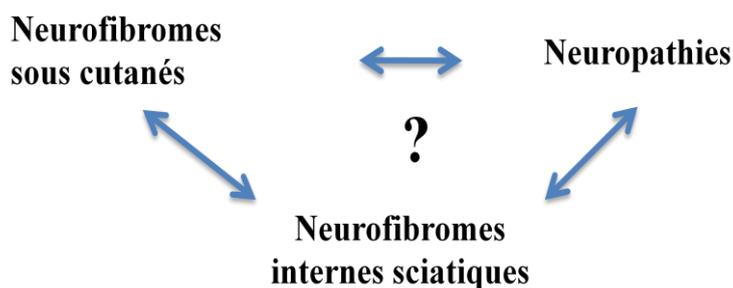
Finalement, la présence d'une polyneuropathie à vitesse de conduction lente était significativement associée à la présence de SC-NF (ORa = 7.7, IC 95% : 1.6 - 36.6) alors qu'aucun lien n'était observé pour les neuropathies axonales (Tableau 11). Les radiculopathies étaient plus fréquentes chez les cas, sans que la différence ne soit significative (Tableau 11).

Tableau 11. Présence de troubles électrophysiologiques chez les cas et les témoins.

Caractéristiques	Cas, n=106 Nb (%)	Témoins, n=102 Nb (%)	OR IC 95%	p (chi2)
Neuropathies				
- Aucune	85 (80)	94 (92)	1	0.009
- Axonales	7 (7)	6 (6)	1.3 (0.4 – 4.0)	
- À vitesse lente	14 (13)	2 (2)	7.7 (1.6 – 36.6)	
Radiculopathies				
	24 (23)	14 (14)	1.8 (0.9 – 3.8)	0.09

*Odds Ratio (OR) et Intervalle de Confiance à 95% (IC 95%) ajustés sur l'âge, le sexe et le centre

Association neurofibromes sous-cutanés et neuropathies



Aucune interaction n'était mise en évidence entre les SC-NF, les neurofibromes internes le long des gros nerfs des membres inférieurs (ou sciatiques) et les neuropathies. Une association significative était observée entre la présence de neurofibromes internes le long des gros nerfs des membres inférieurs et la neuropathie à vitesse de conduction lente (ORa=22.1,

IC 95 : 4.2 - 115.3). Dans les analyses bivariées incluant la variable « neurofibromes internes le long des gros nerfs des membres inférieurs », l'association entre la neuropathie à vitesse lente et la présence de SC-NF ne persistait plus (ORa = 3.0, IC 95% : 0.6 - 15.1; $p=0.18$). En analyse stratifiée, l'association entre la neuropathie à vitesse lente et la présence de SC-NF était significative dans le groupe « neurofibromes internes le long des gros nerfs des membres inférieurs » (ORa = 2.00, IC 95% : 1.01 - 4.12) alors qu'aucun lien n'était observé parmi les patients de l'autre groupe (« sans neurofibromes internes le long des gros nerfs des membres inférieurs », ORa = 0.69, IC 95% : 0.24 - 4.12). Ainsi, l'association entre les SC-NF et les neuropathies était due à la présence de neurofibromes internes le long des gros nerfs.

Dans les modèles de régression logistique multinomiale, les patients avec au moins 10 SC-NF avaient significativement plus de neurofibromes internes paraspinaux (ORa = 82, IC 95% : 10.4 - 647.9) que les patients avec 2 à 9 SC-NF (ORa = 2.7, IC 95% : 1.4 - 5.3) (Tableau 12, Figure 3). Ce gradient « dose-effet » était observé pour la distribution, la localisation et la taille des neurofibromes internes paraspinaux (Tableau 12, Figure 3). De la même façon, le gradient « dose-effet » était observé pour les neurofibromes internes le long des gros nerfs des membres inférieurs particulièrement pour les caractères diffus et de taille \geq à 3 cm (Tableau 12, Figure 3). Enfin, les neuropathies à vitesse de conduction lente étaient plus fréquentes chez les patients avec au moins 10 SC-NF (ORa = 29.9, IC 95% : 5.5 - 162.3) que chez les patients avec 2 à 9 SC-NF (ORa = 4.4, IC 95% : 0.9 - 22.0) (Tableau 12, Figure 3).

Tableau 12. Association entre les neurofibromes sous-cutanés et les différents types de neurofibromes internes et les neuropathies périphériques.

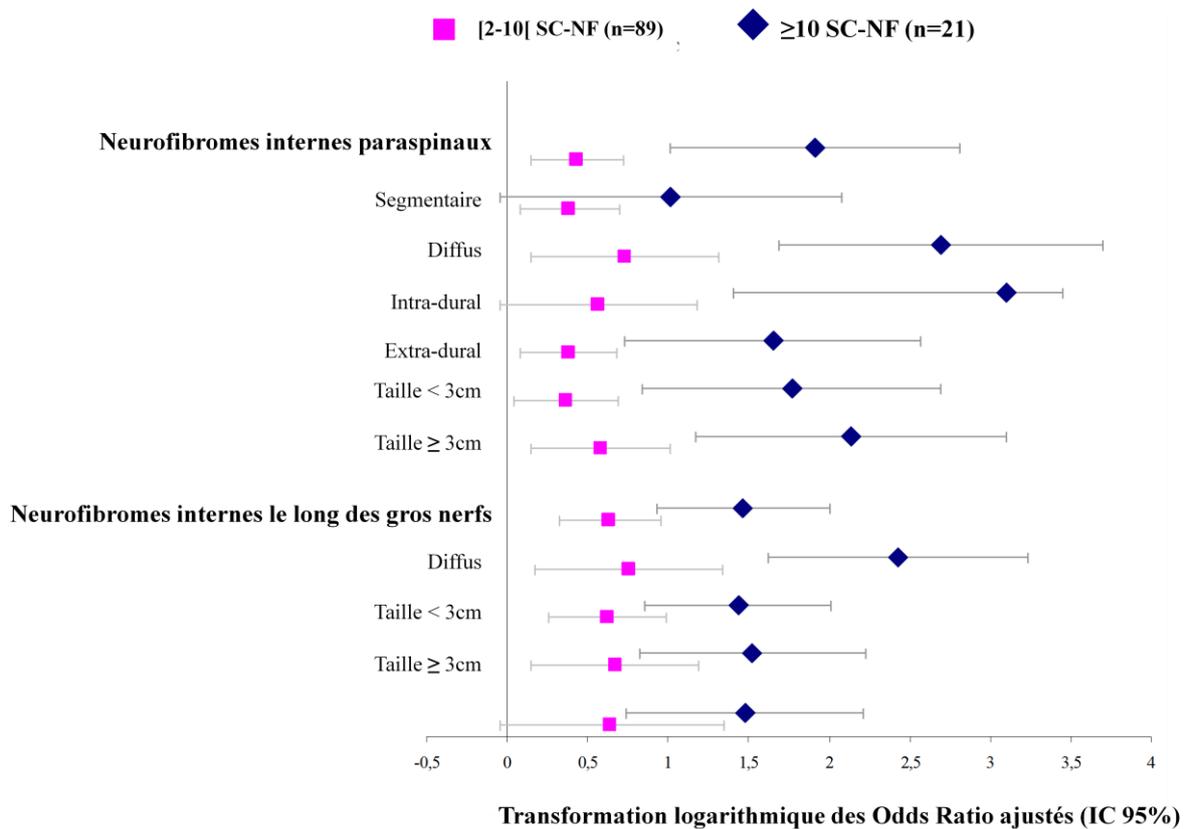
	Aucun SC-NF (n=102) Témoins*	2-9 SC-NF (n=85) OR** (IC 95%)	≥10 SC-NF (n=21) OR** (IC 95%)
Neurofibromes internes paraspinaux	1	2.7 (1.4 -5.3)	82 (10.4 – 647.9)
Distribution			
Aucun	-	1	1
Segmentaire	1	2.4 (1.2 – 5.0)	10.3 (0.9 – 120.0)
Diffus	1	5.4 (1.4 – 20.4)	492.0 (48.4 – 5006.2)
Localisation			
Aucun	-	1	1
Intradural	1	3.7 (0.9 – 15.0)	1270.0 (25.6 – 2849.8)
Extradural	1	2.4 (1.2 – 4.8)	45.0 (5.4 – 374.2)
Taille			
Aucun	-	1	1
<3 cm	1	2.3 (1.1 – 4.9)	58.6 (6.9 – 494.0)
≥3 cm	1	3.8 (1.4 – 10.4)	136.7 (14.9 – 1253.9)
Neurofibromes internes le long des gros nerfs	1	4.3 (2.1 – 9.0)	29.1 (8.5 – 100.0)
Distribution			
Aucun	-	1	1
Segmentaire	1	2.9 (1.2 – 7.0)	-
Diffus	1	5.7 (1.5 – 21.7)	266.8 (41.6 – 1712.7)
Taille			
Aucun	-	1	1
<3 cm	1	4.2 (1.8 – 9.8)	27.2 (7.2 – 103.2)
≥3 cm	1	4.7 (1.4 – 15.5)	33.4 (6.6 – 167.6)
Neuropathies à vitesse de conduction lente	1	4.4 (0.9 – 22)	29.9 (5.5 – 162.3)

Abréviations: SC-NF, neurofibromes sous-cutanés

*Catégories de référence, **Odds ratios ajustés sur les variables d'appariement (âge, sexe, hôpital) avec leur intervalle de confiance à 95% (95% CI) estimés par régression logistique multinomiale. Le groupe contrôle (absence de neurofibromes sous-cutanés, n = 102) était la catégorie de référence.

Figure 3. Odds ratios (OR) et leurs intervalles de confiance à 95% des différents types de neurofibromes internes et des neuropathies périphériques chez les patients présentant 2 à 9 neurofibromes sous-cutanés (SC-NF) et au moins 10 SC-NF.

Les OR étaient estimés par un modèle de régression logistique multinomiale et ajustés sur les variables d'appariement (sexe, âge et hôpital). Le groupe contrôle (aucun SC-NF) était le groupe de référence, les OR sont présentés après transformation logarithmique.



4. Discussion

Cette étude confirme que le phénotype à risque évolutif au cours de la NF1 caractérisé par la présence de SC-NF multiples décelables cliniquement est associé à la présence de neurofibromes internes à fort potentiel de complications. La force de l'association est d'autant plus importante que les neurofibromes internes sont diffus, de localisation intradurale pour les paraspinaux, et de taille supérieure ou égale à 3 cm. Cet effet est d'autant plus marqué que le nombre de SC-NF est important et notamment au-delà d'un seuil de 10. Enfin, l'association entre les SC-NF et les neuropathies est due à la présence de neurofibromes internes le long des gros nerfs.

Le choix du schéma d'étude s'est porté sur une étude cas-témoins nichée dans la cohorte de patients NF1 du Réseau NF-France pour limiter le coût des examens d'imagerie et électrophysiologiques réalisés à chacun des patients. Cependant, ce type de schéma respectait la construction de la cohorte initiale, les cas et les témoins étant issus de la même population source. Les témoins étaient représentatifs de la population dont étaient issus les cas minimisant un biais de sélection. La validité interne de cette étude dépend également de l'exactitude de l'information obtenue concernant la présence ou non des neurofibromes internes. La réalisation d'une IRM de l'ensemble du rachis et du bassin/cuisses pour chacun des cas et des témoins permettait de déterminer avec certitude la présence ou non des neurofibromes internes. L'IRM représente une méthode fiable, reproductible et valide pour évaluer la présence des neurofibromes internes. La relecture centralisée de l'ensemble des IRM par un sénior radiologue spécialisé dans la NF1 et en insu du statut cas ou témoins et du phénotype clinique minimisait un biais d'évaluation. De même, la relecture centralisée des données électrophysiologiques par un sénior physiologiste spécialisé dans la NF1 en insu du phénotype clinique et des données radiologiques minimisait un biais d'évaluation. Aucun patient de l'étude n'avait reçu une évaluation neurologique détaillée. Cependant en s'appuyant sur l'expérience du centre de Référence les neuropathies axonales sont peu ou non symptomatiques (manifestations sensibles minimales) (45). Comme toutes les études hospitalières, un biais de sélection ne peut être exclu (recrutement de patients les plus graves). Cependant, la fréquence des principales caractéristiques cliniques de nos patients était similaire à celle rapportée dans la littérature à l'exception des neurofibromes cutanés qui étaient moins significativement moins fréquents chez les cas (17). Douze pour cent des cas

n'avaient aucun neurofibrome cutané versus 4% chez les témoins ($p=0.03$). Notre population d'étude était ainsi représentative d'une population générale de NF1. Concernant les neurofibromes cutanés, l'association entre l'absence de neurofibromes cutanés et la présence de SC-NF est en accord avec une étude précédente où les patients ne présentant pas de neurofibromes cutanés étaient significativement plus à risque de décès, la présence de SC-NF était l'autre variable indépendamment liée au décès dans cette étude (34).

Cette étude a permis d'expliquer le risque de mortalité accru au cours de la NF1 chez les patients présentant des SC-NF (33-34) en confirmant en IRM la présence chez ces patients de neurofibromes internes à fort risque de transformation en TMGN. Récemment, l'association SC-NF et neurofibromes internes a été confirmée dans une population de 141 patients NF1 d'origine allemande et nord américaine (49). Identifier les patients ayant des neurofibromes internes a un intérêt pour inclure ou stratifier les patients les plus à risque dans les essais cliniques, mais également en pratique clinique. En effet, la réalisation d'IRM de dépistage chez les patients les plus à risque pourrait permettre de diagnostiquer précocement la transformation en TMGN. Le seul traitement actuel curatif des TMGN est la chirurgie qui a le plus de chance de réussite si les TMGN sont de petites tailles et de localisation accessible à une résection.

CHAPITRE 3

Elaboration d'un score prédictif de la présence des neurofibromes internes à partir des caractéristiques phénotypiques des patients adultes NF1

1. Introduction

Les patients NF1 présentant des SC-NF représentent 20 à 30% de la population NF1 (17). Nous avons souhaité construire un outil facilement utilisable en pratique clinique permettant de cibler les malades les plus à risque de développer une TMGN. L'objectif de ce travail était d'élaborer un score prédictif de la présence de la masse tumorale interne à partir des caractéristiques phénotypiques des patients NF1.

2. Matériel et méthodes

Les patients

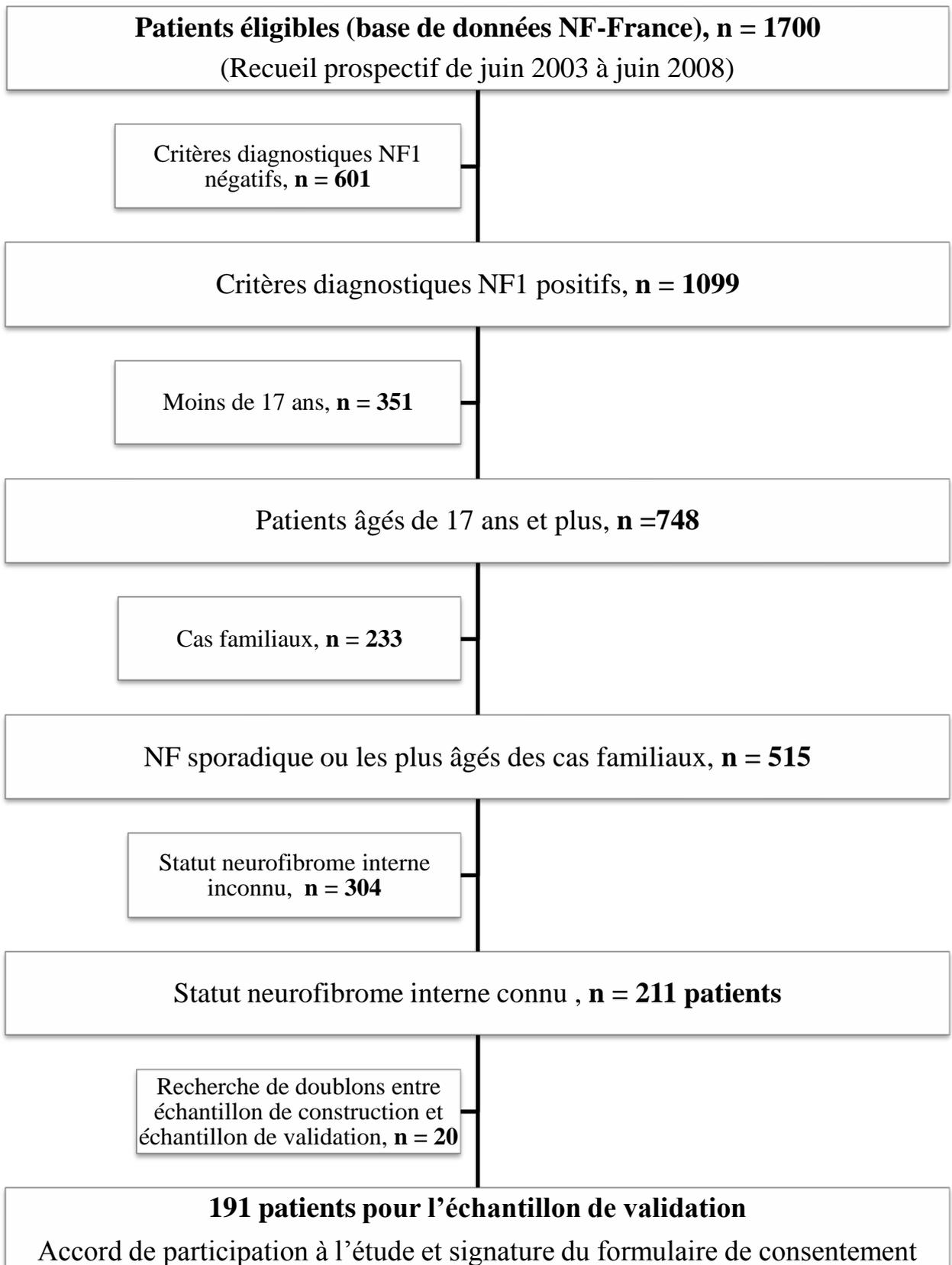
L'étude a été réalisée à partir des patients suivis dans le Réseau NF-France. Deux populations ont été considérées, un échantillon de construction et un échantillon de validation.

Pour l'échantillon de construction, les données phénotypiques ont été obtenues à partir de la population de 219 patients atteints de NF1 recrutés dans le cadre du PHRC 2005, population utilisée pour l'étude cas témoins. Dans cette étude, les adultes (≥ 17 ans) ayant au moins 2 SC-NF étaient appariés sur l'âge (± 5 ans), le sexe et le centre à un témoin n'en ayant aucun. Il s'agissait de cas sporadiques ou de cas index dans les formes familiales. La présence ou non de neurofibromes internes était déterminée par la réalisation d'une IRM (gold standard). Ces 208 patients ont constitué l'échantillon de construction.

Le score obtenu à partir de l'échantillon de construction a été validé sur une population issue d'un autre PHRC (2002) dont l'objectif principal était l'établissement d'une banque de données phénotypiques et génotypiques dédiée à la NF1 en promouvant une collection coordonnée et l'investigation génétique d'un grand nombre de malades atteints de NF1 ainsi

que leur famille. Au total, 594 familles comportant 1700 sujets (parents du premier degré, autre(s) sujet(s) atteint(s) dans la fratrie) ont été recrutées entre 2003 et 2006 à partir des centres du Réseau NF-France, dont 1 099 étaient atteints de NF1. A partir de cette base de données, 748 adultes NF1 (≥ 17 ans) ont été sélectionnés. Dans les formes familiales, seul l'aîné a été considéré et cela pour conserver l'indépendance des individus dans la population. Par ailleurs, il était nécessaire que la variable à expliquer « neurofibrome interne » soit renseignée. Enfin, l'absence de doublons entre les deux bases a été vérifiée. Finalement, 191 patients ont été analysés (Figure 4).

Figure 4. Population de validation, diagramme de flux.



Recueil des données

Des données socio-démographiques (sexe, âge à l'inclusion, caractère sporadique ou non de la maladie) et cliniques (tension artérielle ; neurofibromes cutanés, sous-cutanés, plexiformes ; dysmorphie faciale...) de chacun des 208 patients de l'échantillon de calcul et des 191 patients de l'échantillon de validation étaient prospectivement recueillies au cours d'une consultation spécialisée à l'aide d'un questionnaire standardisé validé dans le cadre du Réseau NF-France. Pour les 2 échantillons, les caractéristiques dermatologiques ont été particulièrement détaillées : nombre de taches café-au-lait (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, ≥ 7) ; localisations des lentigines (axillaires uni ou bilatérales, inguinales) ; nombre de neurofibromes cutanés (0, 1, 2-9, 10-99, ≥ 100) ; nombre de neurofibromes sous-cutanés (0, 1, 2-9, 10-99, ≥ 100) ; présence de taches violines ; nombre de neurofibromes plexiformes et leur localisation (orbito-palpébrale, visage, tête et cou, tronc face dorsale et face ventrale, membres supérieurs et inférieurs). La plupart des autres items ont été codés absents/présents. Des anomalies neuropsychiatriques ont été recherchées : céphalées, antécédent d'épilepsie, difficultés d'apprentissage. Une dysmorphie faciale, une hypertension artérielle, une sténose des artères rénales constituaient les anomalies endocriniennes. La présence de pseudarthrose, et/ou d'une scoliose constituaient les anomalies orthopédiques.

Classification des patients : Détermination de l'existence de neurofibromes internes.

Dans l'échantillon de construction, une IRM était systématiquement réalisée pour détecter la présence des neurofibromes internes. Les neurofibromes internes à fort potentiel de transformation en TMGN ont été décrits à l'IRM comme un épaississement diffus, irrégulier et le plus souvent étagé des racines des nerfs spinaux (44-45).

Ainsi, les patients ont été classés comme :

- (1) ayant des neurofibromes internes devant la présence à l'IRM de neurofibromes internes paraspinaux étagés et/ou d'au moins un neurofibrome interne paraspinal de plus de 3 centimètres,
- (2) n'ayant pas de neurofibromes internes sinon.

Dans l'échantillon de validation, les neurofibromes internes étaient diagnostiqués selon les procédures usuelles de chaque centre avec différents examens d'imagerie. Une IRM ou un scanner du rachis complet n'était réalisé qu'en présence d'anomalies radiologiques (radiographie thoracique ou échographie abdominale) ou cliniques (douleur, déficit neurologique...) évocatrices de neurofibromes internes. Ainsi, l'exploration de ces neurofibromes internes n'était pas systématique et leurs caractéristiques sémiologiques (taille, localisation segmentaire ou diffuse...) n'étaient pas disponibles. Par conséquent, la classification n'a pas pu être réalisée à l'identique pour la population de validation. Les 191 patients ont été classés en fonction de l'existence ou non de neurofibromes internes à partir de la variable neurofibromes internes paraspinaux codée 0/1 dans la base de données.

Analyse statistique

Une double saisie a été réalisée. Les analyses ont été réalisées avec le logiciel STATA software version 11 (Stata Corporation, College Station, TX). Tous les tests étaient bilatéraux, $p < 0.05$ était considéré comme significatif.

Les variables continues ont été catégorisées pour simplifier au maximum l'utilisation du score en pratique clinique. Ainsi, l'âge a été codé ≤ 30 ou > 30 ans en fonction du pic d'incidence des TMGN dans la population NF1 (21). Les taches café-au-lait ont été codées < 6 , ≥ 6 selon la définition du critère diagnostique de NF1 (Conference 1988). Les variables discrètes sont présentées sous forme d'effectifs (%).

Les caractéristiques des populations de construction et de validation ont été décrites. Les principales caractéristiques phénotypiques des 191 patients de la population de validation ont été comparées (test du chi² ou test exact de Fisher selon les effectifs) à celles des 304 patients NF1 issus de la même cohorte NF-France qui avaient été exclus en raison du statut inconnu neurofibromes internes.

Construction du score

Les facteurs potentiellement associés à l'existence de neurofibromes internes ont, tout d'abord, été analysés par des analyses univariées. Les variables ont été comparées par le test du Chi² ou le test exact de Fisher. Les OR avec IC 95% ont été estimés en régression logistique. Les variables associées au seuil $p \leq 0.15$ ont été considérées pour les analyses multivariées. Les liens entre ces variables ont ensuite été analysés, les facteurs de confusion

potentiels ont été recherchés par des analyses bi-variées, de même que des interactions. Les facteurs issus de cette sélection ont été analysés par des modèles de régression logistique multivariée. Le critère d'information d'Akaike (AIC) a été utilisé pour le choix du modèle final. L'AIC est un indicateur tenant compte de la complexité du modèle, il est défini comme suit : $AIC = -2\text{Log}(L) + 2p$ où L est la vraisemblance maximale et p est le nombre de paramètres du modèle. Il représente un compromis entre le biais (qui diminue avec le nombre de paramètres) et la parcimonie (nécessite de décrire les données avec le plus petit nombre de paramètres possibles). Le modèle « optimal » est donc celui qui mène à un bon compromis entre déviance et degrés de liberté. L'AIC a été calculé pour tous les sous modèles du modèle complet. Le modèle final retenu était celui dont l'AIC était le plus petit.

Un score de risque a ensuite été élaboré par une combinaison linéaire des coefficients des variables indépendamment associées à l'existence de neurofibromes internes dans le modèle final. Les coefficients ont été arrondis manuellement pour faciliter le calcul en pratique clinique. L'équation de risque $p = \exp(-\alpha + \beta * \text{SCORE}) / (1 + \exp[-\alpha + \beta * \text{SCORE}])$ a permis d'estimer le risque de masse tumorale interne.

L'adéquation, ou la calibration du score, (écart entre les valeurs prédites et les valeurs observées) a été évaluée par le test d'Hosmer-Lemeshow (50). Le test d'Hosmer-Lemeshow est basé sur un regroupement des probabilités prédites soit par déciles de risque, i.e. en divisant le total de la population par 10 (test C), soit par dixième de risque ($[0 - 0.1 [$, $[0.1 - 0.2 [\dots$) (test H). Le nombre observé de réponses positives et négatives est calculé pour chacun des groupes et comparé au nombre prédit par le modèle. Une distance entre les fréquences observées et prédites est déterminée au moyen d'une statistique du χ^2 à $(g-2)$ ddl pour l'échantillon de construction et g ddl pour l'échantillon de validation où g est le nombre de groupe (50). Lorsque cette distance est petite ($p > 0.05$), on considère que le modèle est bien calibré. La capacité discriminante du modèle, i.e. sa capacité à affecter correctement les sujets à leur classe respective (existence ou non de neurofibromes internes), a été analysée par l'indice c de Harrel (51) équivalent à l'aire sous courbe ROC « Receiver Operating Characteristic » (52).

Validité Interne : Recalibration du Score

Un facteur de rétrécissement a été appliqué aux paramètres de l'équation de risque (α et β) dans le but d'anticiper un phénomène de régression vers la moyenne et ceci d'autant que l'échantillon test était de taille réduite ($n=208$) (53). La méthode Bootstrap a été utilisée

comme estimation de l'erreur de prédiction à minimiser pour optimiser le modèle et estimer ainsi une erreur de prévision quasi non biaisée (54-55). La méthode de Bootstrap est une technique d'inférence statistique par stimulation destinée à combler l'absence de solutions analytiques ou la faiblesse de l'échantillon. Soit un échantillon X de N valeurs (dans notre cas, variables à expliquer et explicatives de l'équation de risque) et $f(X)$ une statistique (coefficients de régression) calculée sur ces valeurs. On tire au hasard avec remise K échantillons de N valeurs de l'échantillon initial. Chaque réplique ou « échantillon bootstrap » contient autant de valeurs que l'échantillon de base, ces valeurs étant les mêmes, mais avec des fréquences potentiellement différentes. A l'issue de ces 2 étapes (génération des K échantillons bootstrap et calcul de la statistique $f(X)$), on dispose d'une distribution empirique dont on extrait une moyenne et un intervalle de confiance bootstrap avec la propriété que la moyenne_{bootstrap} ($f_{\text{bootstrap}}(X)/K$) tend vers $f(X)$ quand K tend vers l'infini. Ainsi, 1000 tirages aléatoires avec remise de 208 patients ont été effectués à partir de l'échantillon initial (208 patients). Les paramètres de l'équation de risque α et β ont été estimés pour chacun des échantillons aléatoires. Un coefficient de rétrécissement a été déterminé pour chacun des 2 paramètres à partir des percentiles de la distribution des 1000 paramètres de l'équation de risque.

Validation Externe

Les performances du modèle finalement obtenu (calibration et discrimination) ont été évaluées sur le deuxième échantillon (191 patients).

3. Résultats

Caractéristiques de la population

Les principales caractéristiques de l'échantillon de construction (n=208) sont résumées dans le tableau 13. La population de patients en moyenne âgés de 41 ans (± 13) était constituée de 122 femmes (58.7%) et de 86 hommes ; 46 patients (22.1%) avaient des neurofibromes internes. Les principales caractéristiques de l'échantillon de validation (n=191) sont résumées dans le tableau 14. Cette population de patients en moyenne âgés de 40 ans (± 13) était constituée de 108 femmes (56.5%) et 83 hommes ; 40 patients (20.9% de la population de validation) avaient des neurofibromes internes paraspinaux.

Les caractéristiques phénotypiques de la population de validation étaient similaires à celles des 304 patients exclus en raison d'un statut inconnu des neurofibromes internes, à l'exception du caractère familial de la NF1 et de la présence d'au moins 2 neurofibromes sous-cutanés (tableau 15). En effet, les patients exclus de l'échantillon de validation avaient plus souvent une forme familiale (75.6% vs 66.5%) et moins souvent plus de 2 neurofibromes sous-cutanés (61.3% versus 49.8%). Les difficultés d'apprentissage avaient tendance ($p=0.09$) à être plus importantes chez les patients exclus de l'échantillon de validation.

Tableau 13. Principales caractéristiques des 208 patients de l'échantillon de construction

Caractéristiques	Nb patients atteints/total (%)
Sexe Féminin	122 (58.7)
Age \leq 30	48 (23.1)
Forme Familiale	112 (53.9)
Neurofibromes internes	46 (22.1)
Neurofibromes sous-cutanés	
- Aucun	102 (49)
- 2-9	85 (40.9)
- \geq 10	21 (10.1)
Absence de neurofibromes cutanés	19 (9.1)
Présence de neurofibromes plexiformes	114 (54.8)
< 6 Taches café-au-lait	43 (20.7)
Absence de lentigines	39 (18.8)
Présence de taches violines	17 (8.2)
Scoliose	87 (41.8)
Pseudarthrose	6 (2.9)
Céphalées	79 (38.0)
Epilepsie	4 (1.9)
Hydrocéphalie	3 (1.4)
Difficultés d'apprentissage	109 (52.4)
Dysmorphie	20 (9.6)
Hypertension artérielle	17 (8.2)

Tableau 14. Principales caractéristiques des 191 patients de la population de validation

Caractéristiques	Nb de patients atteintes/total (%)
Sexe Féminin	108 (56.5)
Age \leq 30	46 (24.1)
Forme Familiale	127 (66.5)
Neurofibromes internes	40 (20.9)
Neurofibromes sous-cutanés	
- Aucun	74 (38.7)
- 2-9	71 (37.2)
- \geq 10	46 (24.1)
Absence de neurofibromes cutanés	36 (18.9)
Présence de neurofibromes plexiformes	95 (49.7)
< 6 Taches café-au-lait	58 (30.4)
Absence de lentigines	31 (16.2)
Présence de taches violines	32 (16.8)
Scoliose	90 (47.1)
Pseudarthrose	6 (3.1)
Céphalées	77 (40.3)
Epilepsie	8 (4.2)
Difficultés d'apprentissage	98 (51.3)
Hydrocéphalie	7 (3.7)
Dysmorphie	13* (7.2)
Hypertension artérielle	23 (12.0)

* n = 180

Tableau 15. Comparaison des principales caractéristiques de la population de validation (n = 191) et des patients de la cohorte NF-France dont le statut neurofibrome interne est inconnu (n=304)

Caractéristiques	Statut neurofibrome interne connu, n (%)	Statut neurofibrome interne inconnu, n (%)	P (chi2)
Sexe Féminin	108 (56.5)	184 (58.4)	0.68
Age ≤ 30	46 (24.1)	69 (21.9)	0.57
Forme Familiale	127 (66.5)	238 (75.6)	0.03
≥ 2 Neurofibromes sous-cutanés	117 (61.3)	157 (49.8)	0.01
Absence de neurofibromes cutanés	36 (18.9)	56 (17.8)	0.76
Présence de neurofibromes plexiformes	95 (49.7)	144 (45.7)	0.38
< 6 Taches café-au-lait	58 (30.4)	80 (25.4)	0.22
Présence de lentigines	31 (16.2)	44 (14.0)	0.48
Présence de taches violines	32 (16.8)	62 (19.7)	0.41
Scoliose	90 (47.1)	127 (40.3)	0.13
Pseudarthrose	6 (3.1)	10 (3.2)	0.98
Céphalées	77 (40.3)	112 (35.6)	0.28
Epilepsie	8 (4.2)	14 (4.4)	0.89
Difficultés d'apprentissage	98 (51.3)	137 (43.5)	0.09
Hydrocéphalie	7 (3.7)	11 (3.5)	0.92
Dysmorphie	13* (7.2)	27** (9.1)	0.48
Hypertension artérielle	23 (12.0)	(13.0)	0.75

*n=180, **n=298

Facteurs associés à la présence de Neurofibromes internes.

Analyses univariées

Les résultats des analyses univariées sont présentés dans le tableau 16. Des associations significatives ou proches de la significativité ont été observées avec cinq variables : l'âge inférieur ou égal à 30 ans (OR=2.8 [1.4-5.9]), l'absence de neurofibromes cutanés (OR=4.7 [1.7-12.8]), la présence d'au moins 2 neurofibromes sous-cutanés (OR=4.7 [2.1-10.6]), l'absence de lentigines (OR=2,1 [0.9-2.5]) et celle de moins de 6 taches café-au-lait (OR=2.3 [1.1-4.9]).

Les associations entre ces cinq variables ont été étudiées chez les patients n'ayant pas de neurofibromes internes. Dans les modèles bivariés, aucune interaction significative ou proche de la signification n'a été observée entre ces variables. L'absence de lentigines était fortement liée à la présence de moins de 6 taches café-au-lait (OR=4.2 [1.9-9.1] ; $p=0.0001$). L'analyse d'un modèle avec interaction comprenant ces 2 variables ne montrait pas d'interaction significative ni d'effet propre de la variable « absence de lentigines » (OR=1.8 [0.6-5.0] ; $p=0.279$) mais un effet propre de la variable « moins de 6 taches café-au-lait » (OR=2.0 [0.9-4.4] ; $p=0.075$). L'absence de lentigines n'était plus significativement associée à la présence de neurofibromes internes après ajustement sur la présence de moins 6 taches café-au-lait (OR de l'absence de lentigines ajusté sur la présence de moins de 6 taches café-au-lait = 1.7 ([0.8-3.8] ; $p=0.202$). La présence de lentigines était un facteur de confusion ; il n'a pas été pris en compte dans le modèle final.

Tableau 16. Facteurs associés à la présence de neurofibromes internes dans l'échantillon de construction n=208 (analyses univariées)

Caractéristiques	Neurofibromes	Neurofibromes	OR (95%)	p (chi2 ou test exact de Fischer)
	internes absents (n=162) Nb (%)	internes présents (n=46) Nb (%)		
Sexe Féminin	97 (60)	25 (58)	1.3 (0.6-2.4)	0.502
Age ≤ 30	30 (18)	18 (39)	2,8 (1,4-5,9)	0.004
Forme Familiale	88 (54)	24 (52)	0.9 (0.5-1.8)	0.800
≥ 2 Neurofibromes sous-cutanés	70 (43)	36 (78)	4.7 (2.1-10.6)	<10 ⁻⁴
Pas de neurofibromes cutanés	9 (6)	10 (22)	4.7 (1.7-12.8)	0.001
Neurofibromes plexiformes	90 (56)	24 (52)	0.9 (0.5-1.7)	0.684
Taches café-au-lait < 6	28 (17)	15 (33)	2.3 (1.1-4.9)	0.024
Absence de lentigines	26 (16)	13 (28)	2.1 (0.9-4.5)	0.061
Présence de taches violines	12 (7)	5 (11)	1.5 (0.5-4.6)	0.451
Scoliose	68 (42)	19 (41)	1.0 (0.5-1.9)	0.935
Pseudarthrose	4 (2)	2 (4)	1.8 (0.3-10.2)	0.502
Céphalées	59 (36)	20 (43)	1.3 (0.7-2.6)	0.385
Epilepsie	2 (1)	2 (4)	3.6 (0.5-26.9)	0.175
Hydrocéphalie	3 (2)	0	0	0.353
Difficultés d'apprentissage	83 (51)	26 (57)	1.2 (0.6-2.4)	0.527
Dysmorphie	12/122 (10)	5/78 (6)	0.6 (0.2-1.9)	0.397
Hypertension artérielle	13 (8)	4 (9)	1.1 (0.3-3.5)	0.883

Analyses multivariées

Ont été analysées par des modèles de régression logistique multivariées, les variables suivantes : âge inférieur ou égal à 30 ans, l'absence de neurofibromes cutanés, au moins 2 neurofibromes sous cutanés, moins de 6 tâches café-au-lait.

Le modèle complet [4] i.e. à 4 variables a été comparé aux modèles à 3 ([3.1] âge inférieur ou égal à 30 ans, au moins 2 neurofibromes sous cutanés, absence de neurofibromes cutanés, et [3.2] âge inférieur ou égal à 30 ans, au moins 2 neurofibromes sous cutanés, moins de 6 tâches café-au-lait) et 2 variables ([2] âge inférieur ou égal à 30 ans, au moins 2 neurofibromes sous cutanés). Le modèle complet [4] était retenu (critère AIC le plus faible, Tableau 17).

Tableau 17. Critères d'AIC des modèles de régression logistiques

Modèle	degré de liberté	Critère AIC
[4]	5	195,2
[3.1]	4	196,0
[3.2]	4	196,3
[2]	3	198,2

L'âge inférieur ou égal à 30 ans (OR=3.1 [1.4-6.8]), l'absence de neurofibromes cutanés (OR=2.6 [0.9-7.5]), au moins 2 neurofibromes sous cutanés (OR=4.7 [2.1-10.5]), moins de 6 tâches café-au-lait (OR=2,0 [0.9-4.6]) étaient indépendamment associés à un risque plus élevé d'avoir des neurofibromes internes (Tableau 18).

Tableau 18. Modèle final contenant les 4 variables permettant la construction d'un score de prédiction de la masse interne tumorale (i.e. la présence de neurofibromes internes).

208 patients	OR	IC _{95%}	P	Coefficients	Points
Age inférieur à 30 ans	3.1	1.4-6.8	0.006	1.12	10
Absence de neurofibromes cutanés	2.6	0.9-7.5	0.08	0.95	10
≥ 2 neurofibromes sous-cutanés	4.7	2.1-10.5	< 10 ⁻⁴	1.55	15
< 6 taches café-au-lait	2.0	0.9-4.6	0.08	0.71	5

OR : odds ratio, IC 95% intervalle de confiance 95% , p estimé par régression logistique

Construction du score

A partir du modèle final et dans le but d'obtenir une estimation du risque de neurofibromes internes facile à calculer en pratique clinique, les coefficients des 4 variables ont été multipliés par 10 puis arrondis manuellement (tableau 18).

Ainsi, le SCORE suivant a été obtenu:

$$\begin{aligned}
 \text{NF1Score} = & \mathbf{10} * \text{âge inférieur à 30 ans (1/0)} \\
 & + \mathbf{10} * \text{moins de 2 neurofibromes cutanés (1/0)} \\
 & + \mathbf{15} * \text{plus de 2 neurofibromes sous-cutanés (1/0)} \\
 & + \mathbf{5} * \text{moins de 6 taches café-au-lait (1/0)}
 \end{aligned}$$

Le score obtenu (score moyen = 11.8 ± 10.0 extrêmes 0 à 40) a permis d'estimer le risque de masse tumorale interne à partir de l'équation suivante :

$$p = \exp (-2.80 + 0.11 * \text{NF1Score}) / (1 + \exp [-2.80 + 0.11 * \text{NF1Score}])$$

L'adéquation du Score (utilisation des coefficients arrondis) était excellente (test C de Hosmer-Lemeshow=4.53 avec 7ddl, $p>0.50$) et sa capacité discriminante satisfaisante (aire sous la courbe ROC non paramétrique = 0.75 [0.68-0.82]).

Validation du score

Validité Interne : Recalibration du Score

Un facteur de rétrécissement a été obtenu à partir des 1000 répliques bootstrap pour chacun des 2 paramètres de l'équation de risque : $\alpha'=\alpha \times 1.05$ et $\beta'=\beta \times 0.98$. Ces coefficients de rétrécissements modifiaient très peu l'équation de risque. L'équation finale retenue était la suivante :

RISQUE de masse tumorale interne :

$$p = \exp (-2.94 + 0.11*\text{SCORE}) / (1 + \exp [-2.93 + 0.11*\text{SCORE}])$$

La probabilité d'une masse tumorale interne et les qualités intrinsèques du score selon le seuil sont résumées dans le tableau 19. Par exemple, la probabilité de neurofibromes internes était de 0.05 pour un score de 0 et de 0.79 pour un score de 40.

Tableau 19. Score de masse tumorale interne

Score	0	5	10	15	20	25	30	35	40
N	64	12	19	62	18	18	9	5	1
n	4	2	3	14	4	7	7	4	1
Probabilité masse tumorale interne	0.05	0.08	0.13	0.21	0.31	0.43	0.56	0.69	0.79
Sensibilité (%)	100	91.3	87.0	80.4	50.0	41.3	26.1	10.9	2.2
Spécificité (%)	0	37.0	43.2	53.1	82.7	91.4	98.2	99.4	100
Classement correct (%)	22	49	52	59	75	80	82	80	79

N : nombre total de patients, n : nombre de patients ayant des neurofibromes internes

Validité externe du score

Le score de prédiction a été évalué sur le deuxième échantillon issu de la cohorte NF-France. Les statistiques d'adéquation (test C d'Hosmer-Lemeshow =12,57 avec 9 ddl, p=0,20) (tableau 20) et la capacité discriminante du score restaient satisfaisantes (aire sous la courbe ROC = 0,73 [0.61 – 0.85]).

Tableau 19. Adéquation du score sur l'échantillon de validation

Probabilité masse tumorale interne	Score	NF présents (n=40)		NF absents (n=151)	
		Observés	Prédits	Observés	Prédits
0,05	0	3	2,0	36	37,0
0,08	5	2	1,1	11	11,9
0,13	10	3	1,7	10	11,3
0,21	15	6	11,6	50	44,4
0,31	20	8	8,0	18	18,0
0,43	25	7	9,5	15	12,5
0,56	30	3	5,1	6	4,0
0,69	35	2	4,1	4	1,9
0,79	40	5	5,5	2	1,5

*test C d'Hosmer-Lemeshow=12.57 ; ddl=9 ; p=0.20

4. Discussion

Cette étude a permis de caractériser le phénotype des patients adultes NF1 à risque de développer des neurofibromes internes. La présence d'au moins 2 neurofibromes sous-cutanés, l'absence de neurofibromes cutanés, un âge inférieur ou égal à 30 ans et moins de 6 taches café-au-lait étaient indépendamment associés à un risque plus élevé de neurofibromes internes. Le score obtenu à partir de l'équation de la régression logistique (**NF1Score = 10*(âge ≤ 30 ans) + 10*(absence de neurofibromes cutanés) + 5*(moins de 6 taches café-au-lait) + 15*(plus de 2 neurofibrome sous-cutanés)**) avait une excellente adéquation (test

C de Hosmer-Lemeshow=4,53 avec 7ddl, $p>0,50$) et une capacité discriminante satisfaisante (aire sous la courbe ROC non paramétrique = 0,75 [0,68-0,82]).

Pour la construction du score, nous avons choisi une population où le diagnostic de neurofibromes internes à risque était certain puisqu'une IRM avait été systématiquement réalisée. Les interprétations de l'IRM ont été effectuées par un groupe d'experts à l'insu de la connaissance du phénotype clinique limitant ainsi un éventuel biais de classement. La fréquence des caractéristiques phénotypiques (dermatologiques, orthopédiques, endocriniennes, neurologiques...) était en très grande partie similaire à celle des données de la littérature (17). Une bonne représentativité de l'échantillon de calcul a donc été assurée. Toutefois, le score pronostique a été établi sur la base d'une étude cas témoins multicentrique et de recueil prospectif alors que les cohortes longitudinales sont généralement préférées pour réaliser des études pronostiques. Alors que de nombreuses études analysent les biais liés au choix d'une étude cas témoins pour les études diagnostiques, peu de données existent pour les études pronostiques (56). La population de l'échantillon de construction a été sélectionnée sur la présence ou non d'au moins deux neurofibromes sous-cutanés et non pas sur la présence ou non de neurofibromes internes (variable à expliquer). Cependant, il existe une association forte entre ces deux variables. La prévalence des neurofibromes sous-cutanés est vraisemblablement artificielle, surestimant ainsi l'efficacité du score. Par ailleurs, il n'est pas habituel de choisir un échantillon de construction postérieur à l'échantillon de validation. Cependant, la NF1 est une maladie rare (prévalence estimée à 1/4000 naissances) et l'IRM ne fait pas partie des investigations para-cliniques systématiques des sujets atteints (14). Nous avons donc le choix entre une population où l'IRM systématique permettait un diagnostic de certitude de neurofibromes internes ainsi que leurs typologies mais de recrutement cas témoins et une population « générale » de NF1 où le diagnostic de neurofibromes internes était moins bien établi et reposait sur l'existence préalable de signes potentiellement évocateurs. Ainsi, nous avons préféré un diagnostic de certitude pour construire le score. La sélection des variables à inclure dans le modèle final s'est déroulée en plusieurs étapes : des liaisons ont été systématiquement recherchées par des analyses bivariées entre les variables sélectionnées à partir de l'analyse univariée ; devant l'absence d'interaction et le nombre limité de variables ainsi obtenues, l'ensemble de ces facteurs a été inclus dans des modèles logistiques multivariés. Cette méthode a été préférée à la procédure pas à pas habituellement utilisée dans les modèles pronostiques. En effet, la procédure pas à pas, fondée uniquement

sur des critères statistiques sans considération épidémiologique ou clinique peut conduire à des estimations biaisées des coefficients (57). Bien que le critère de simplicité (plus petit nombre de variables prédictives) puisse être établi comme étant le choix systématique du modèle final, le critère AIC a permis de sélectionner un modèle final à 4 variables et non 2 ou 3 en dépit même du fait que 2 de ces 4 variables étaient dites « non significatives » ($p > 0.05$) au vue de la limite annoncée. Le prix à payer pour l'avantage apparent du modèle ($p < 0.05$) qui ajuste bien les données serait une perte de la reproductibilité et une impossibilité d'aboutir à une extension des résultats au-delà des individus étudiés. Ce phénomène a été décrit notamment dans les échantillons de petites tailles (57). Enfin, une analyse cas-complet était justifiée devant une proportion faible de cas incomplets : seule la variable « dysmorphie » était concernée et n'était pas associée aux neurofibromes internes en analyse univariée. Ainsi, la perte de puissance et de précision était limitée. La population de validation est très représentative puisqu'elle est issue de la cohorte NF-France qui regroupe plus de 1000 patients, mais 304 patients en ont été exclus. Néanmoins, les caractéristiques phénotypiques de cette population exclue étaient similaires à celles des patients analysés, minimisant ainsi un biais de sélection. L'exploration des neurofibromes internes dans cette population de validation est une limite de l'étude. En effet, l'existence ou non de neurofibromes internes repose sur le résultat d'exams variés (scanner, échographie...) prescrits souvent en fonction des signes cliniques entraînant ainsi un biais de vérification. De plus, les caractéristiques sémiologiques des neurofibromes internes (taille, localisation segmentaire ou diffuse...) n'étaient pas disponibles.

La validation du score est robuste et comprend à la fois une validation interne et externe. La validation interne a permis la recalibration du score. L'estimation d'un facteur de rétrécissement et son application aux paramètres de l'équation de risque (α et β) a permis d'anticiper un phénomène de régression vers la moyenne (55). Les facteurs de rétrécissement obtenus par la méthode de Bootstrapping (54-55) modifiaient peu l'équation de risque, indiquant ainsi une validité intrinsèque correcte. La régression logistique a ensuite été appliquée sur une population externe indépendante. Malgré la classification moins précise des neurofibromes internes, les performances du score appliquées à l'échantillon de validation sont restées satisfaisantes : adéquation, test C d'Hosmer-Lemeshow = 12,32 avec 9 ddl, $p = 0,20$ et capacité discriminante du score, aire sous la courbe ROC = 0,73.

Dans notre étude, les neurofibromes sous-cutanés étaient indépendamment liés à l'existence de neurofibromes internes en accord avec les données de la littérature (25). La présence d'au moins deux neurofibromes sous-cutanés a par ailleurs été associée à un risque accru de mortalité dans deux populations indépendantes d'adultes NF1 i.e. une cohorte Nord-américaine (33) et une cohorte française (34). Aucun des trois autres facteurs identifiés n'avait été associé avec les neurofibromes internes au moment de ce travail. Cependant, l'association absence de neurofibromes cutanés et présence de neurofibromes internes était attendue : un risque de mortalité accru a été rapporté chez des adultes NF1 sans neurofibrome cutané (34). L'association entre la présence de neurofibromes internes et un âge inférieur ou égal à 30 ans était cohérente : les TMGN se développent principalement à partir des neurofibromes internes avec un pic d'incidence aux environs de 30 ans (21). D'autre part, bien que l'association moins de 6 taches café-au-lait et neurofibromes internes n'ait jamais été rapportée, quatre patients présentant de multiples tumeurs paraspinales sans taches café-au-lait ont été identifiés comme porteur d'une mutation *NF1* (58). Très récemment, Plotkin et al ont réalisé une étude dont l'objectif était de quantifier la masse tumorale interne des patients atteints de NF1 et de NF2 à l'aide d'une IRM corps entier avec reconstruction 3 Dimensions (IRM3D) et de déterminer les facteurs cliniques associés à la présence de la masse tumorale interne mais aussi au volume tumoral interne (49). Chez les patients NF1, une diminution du nombre de taches café au lait était associée à la présence d'une masse tumorale interne ($p=0.003$). Toujours chez les patients NF1, le sexe féminin ($p=0.05$) et une augmentation du nombre de neurofibromes sous-cutanés ($p=0.03$) étaient associés à un volume tumoral interne plus important. Cette étude récente confirme les résultats de ce travail à l'exception du sexe féminin qui n'a pas été observé comme facteur de risque dans notre étude.

Deux des quatre caractéristiques du score, absence de neurofibromes cutanés et moins de six taches café-au-lait, sont inhabituelles chez les patients NF1. En effet, la présence d'au moins deux neurofibromes quelque soit leur type et la présence d'au moins six taches café-au-lait sont des critères diagnostiques de la NF1 (32). Cependant, tous les patients de l'étude avaient un diagnostic de NF1 certain. Chez les patients âgés de moins de 30 ans, l'association de deux neurofibromes sous cutanés, moins de six taches café-au-lait et aucun neurofibrome cutané constituent un phénotype à la fois distinct du phénotype classique et particulièrement sévère.

Cette étude a permis d'élaborer un score prédictif de la masse tumorale interne au cours de la NF1 et ainsi de cibler cliniquement les malades à risque de complications. Un suivi clinique et radiologique (IRM du rachis complet) peut être modulé ; selon l'objectif différents seuils pourront être considérés.

CHAPITRE 4

Neurofibromes internes chez les enfants NF1. Etude transversale française et nord américaine de 357 patients

1. Introduction

La période à risque de surmortalité dans la NF1 est de 10 - 40 ans. Le NF1Score permet d'identifier les adultes NF1 les plus à risque de développer des neurofibromes internes à risque de TMGN. Ce score développé et validé dans une population de patients de 17 ans et plus n'est pas extrapolable aux patients de moins de 17 ans. Cela est d'autant plus vrai que l'expression phénotypique varie au cours du temps chez un même patient (31, 59). Par exemple, les taches café au lait sont présentes les premières années de vie et ont tendance à diminuer en nombre et en taille à l'âge adulte ; les neurofibromes cutanés et sous-cutanés apparaissent au moment de la puberté. Les TMGN se développent volontiers chez les moins de 30 ans (21, 60-62). L'étude de registres d'une population anglaise de 4.1 millions d'habitants sur une période de 13 ans a identifié 58 cas incidents de TMGN, l'âge médian était de 26 ans chez les patients ayant une NF1 (n=21) et de 62 ans chez les sujets indemnes de l'affection (n=37, $p<0.001$) (21). Dans une étude monocentrique allemande, 52 patients NF1 avaient développé une TMGN entre 1985 et 2005 (61). Huit de ces patients étaient des enfants âgés de 1 à 17 ans au moment du diagnostic (âge moyen de 12 ans). Le pronostic était aussi mauvais que celui des adultes avec un délai médian de survie globale de 30.5 mois. Le délai au diagnostic était plus long chez les enfants, ceci était lié principalement à une absence ou une mauvaise verbalisation des symptômes physiques. Enfin, les neurofibromes internes grossissent plus vite chez l'enfant que chez l'adulte (63). Une étude récente a mesuré la cinétique d'augmentation de taille des neurofibromes internes de 49 patients NF1 par une IRM 3D. L'âge médian des patients était de 8.3 ans (extrêmes, 3.3 – 25) avec un suivi médian de 34 mois. L'augmentation de taille des neurofibromes internes était significativement plus importante chez les plus jeunes (i.e. âge < 8.3 ans, âge médian, 21.1% d'augmentation versus 8.4%, $p=0.001$). Ainsi, devant (1) la présence de neurofibromes internes se développant plus rapidement chez l'enfant, (2) un risque de transformation en TMGN possible chez les plus

jeunes et (3) un score prédictif des neurofibromes internes développé dans une population adulte, une étude spécifique sur une population pédiatrique semblait nécessaire.

L'objectif de ce travail était d'identifier les caractéristiques cliniques associées à la présence de neurofibromes internes chez les enfants atteints de NF1.

2. Patients et Méthodes

Population d'étude

Compte tenu du faible nombre d'enfants, nous avons réuni deux populations, l'une française, l'autre nord américaine pour constituer notre population d'étude.

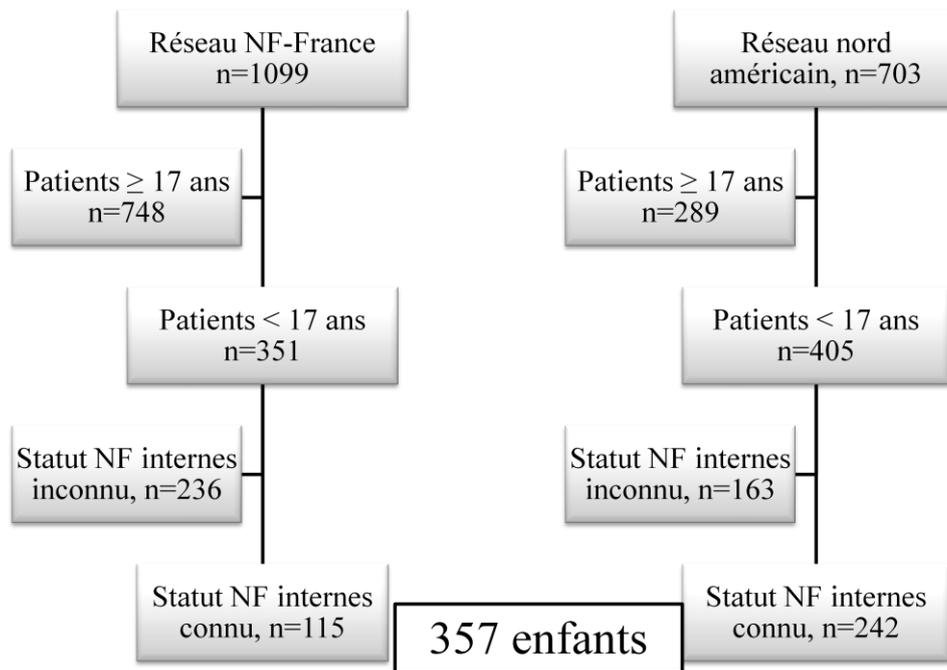
Les données de la population française ont été extraites de la base du Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC 2002) précédemment décrit. Il s'agissait d'une base de données incluant prospectivement 594 familles comportant 1 700 sujets (patients NF1 et leurs apparentés malades ou non) dont 1 099 étaient atteints de NF1.

Les données de la population Nord-Américaine ont été extraites d'une population de 703 patients NF1 inclus prospectivement de 1977 à 1996 dans la Neurofibromatosis Institute Database (NFID) (47). La NFID est un système collaboratif recueillant les symptômes cliniques, les données socio-démographiques, les données psychologiques des patients NF1 et de leurs apparentés.

Étaient éligibles les patients atteints de NF1 (32), âgés de moins de 17 ans avec un statut "neurofibromes internes" renseigné (Figure 5). Au total, 357 enfants constituaient notre population d'étude.

L'étude a été approuvée par le CPP IX d'Ile de France. Les consentements des représentants légaux ont été obtenus pour tous les patients mineurs qui ont participé à l'étude.

Figure 5. Population d'étude, diagramme de flux



NF : Neurofibromes

Recueil de Données

Données collectées

Les données démographiques (âge, sexe, cas familiaux ou sporadiques) et cliniques étaient prospectivement recueillies au cours d'une consultation spécialisée à l'aide d'un questionnaire standardisé.

Variables d'intérêt

Nous avons sélectionné les variables significativement associées à la mortalité chez les patients NF1 (neurofibromes plexiformes) ou avec une tendance à l'association ($p < 0.10$) (neurofibromes sous-cutanés, absence de neurofibromes cutanés, petite taille) (33). Les variables indépendamment associées à la présence de neurofibromes internes chez l'adulte NF1 étaient également étudiées (moins de 6 taches café au lait, neurofibromes sous-cutanés et absence de neurofibromes cutanés). La plupart des caractéristiques cliniques étaient facilement identifiables à l'examen clinique à l'exception des nodules de Lisch nécessitant un examen ophtalmologique à la lampe à fente. Des informations détaillées concernant les

caractéristiques dermatologiques étaient disponibles: présence ou absence de lentigines, de neurofibromes plexiformes, de xanthogranulomes. Les critères suivants étaient codés présents ou absents : asymétrie faciale, complications orthopédiques (pseudarthrose, dysplasie osseuse), hypertension, et macrocéphalie (Tableau 22).

Examen des données manquantes

La variable d'intérêt étudiée était la présence ou non de neurofibromes internes. Il a été choisi de ne retenir que les patients pour lesquels cette information était disponible (critère de sélection). La variable d'intérêt était donc complète. A l'exception des variables âge, sexe, cas familiaux, neurofibromes cutanés, taches café au lait, pseudarthrose, toutes les variables étaient incomplètes : 3 avaient moins de 5% de données manquantes, 3 de 5 à 9%, 3 de 10 – 24%, une plus de 25% (Tableau 21).

Tableau 20. Description des variables disponibles dans la base de données

Variabiles	Codage	Données manquantes (n, %)
Sexe	Homme/Femme	0
Age	En continue	0
Neurofibromes internes	oui/non	0
Cas familiaux	oui/non	0
Neurofibromes cutanés	oui/non	0
Taches Café-au-lait	oui/non	0
Pseudarthrose	oui/non	0
Dysplasie osseuse	oui/non	8 (2.2)
Lentigines	oui/non	11 (3.1)
Neurofibromes sous-cutanés	oui/non	17 (4.8)
Macrocéphalie	oui/non	21 (5.9)
Hypertension	oui/non	28 (7.8)
Petite taille	oui/non	32 (9)
Xanthogranulomes	oui/non	68 (19)
Asymétrie faciale	oui/non	72 (20.2)
Lisch nodules	oui/non	84 (23.5)
Neurofibromes plexiformes	oui/non	184 (51.5)

Définitions

Les définitions de 4 différents types de neurofibromes sont identiques à celles proposées dans le Chapitre 4 s'appuyant sur la classification de Riccardi (47). Brièvement, les xanthogranulomes sont définis comme des papules ou nodules bien limités, fermes, ronds ou ovales dont le diamètre varie entre 0,5 et 2 cm et la couleur entre le rose et le rouge, parfois brun-jaunâtre. Ils sont généralement asymptomatiques, et uniques dans plus de 60% des cas. Les zones de prédilection sont la tête et le cou puis le tronc et les membres. La macrocéphalie est définie par un périmètre crânien supérieur de 2 écarts types à la valeur donnée par la courbe de croissance normale établie en fonction de l'âge et du sexe ; et la petite taille par une taille inférieure de 2 écarts types à la valeur de la courbe de croissance.

Classification des patients: identification des neurofibromes internes

Tous les patients sélectionnés pour cette étude avaient eu un examen d'imagerie (scanner ou IRM) permettant de déterminer avec exactitude la présence ou non de neurofibromes internes. Ces examens d'imagerie n'étant pas recommandés en pratique clinique (14), leur réalisation était guidée par des symptômes cliniques (douleur, déficit neurologique) ou un doute diagnostique sur un autre examen d'imagerie.

Analyses statistiques

Une double saisie a été réalisée. Les analyses ont été réalisées avec le logiciel STATA software version 11 (Stata Corporation, College Station, TX) et LogXact-8 software (2007, CYTEL Inc. Cambridge, MA, USA). Tous les tests étaient bilatéraux, $p < 0.05$ était considéré comme significatif. L'âge a été gardé en variable continue. En effet, il existait une relation linéaire entre l'âge en variable continue et la discrétisation de l'âge en quartile (le nombre de catégories a été limité à 4 devant l'effectif faible de la population présentant des neurofibromes internes). Les variables discrètes sont présentées sous forme d'effectifs (%).

Les caractéristiques des patients avec ou sans neurofibromes internes ont, tout d'abord, été comparées en analyses univariées. Les ORs étaient estimés avec leur IC 95% par des modèles de régression logistique. L'expression de certains signes étant dépendante de l'âge, les ORs ont systématiquement été ajustés sur l'âge. Les variables associées au seuil $p \leq 0.15$ ont été considérées pour les analyses multivariées. Les liens entre ces variables ont été analysés, les facteurs de confusion potentiels ont été recherchés par des analyses bi-variées, de même que des interactions. Les facteurs issus de cette sélection ont été analysés par des modèles de régression logistique multivariée. Ces analyses ont, tout d'abord, été réalisées sur un jeu de données complètes i.e. ne concernant que les individus pour lesquels l'ensemble des variables était entièrement renseigné.

Cependant, compte tenu du nombre important de variables avec données manquantes (Tableau 21) potentiellement source de biais, nous avons secondairement réalisé des imputations multiples. En effet, l'analyse de type cas-complet, ne retenant que les individus pour lesquels les informations sont complètes, peut conduire à (1) une perte systématique de puissance statistique, (2) des estimations biaisées (OR, RR, ...), et à (3) un mauvais choix des

variables pour les analyses multivariées, au profit des variables les mieux renseignées. Ainsi pour évaluer l'influence des données manquantes sur nos analyses, nous avons utilisé la technique d'imputations multiples. Le principe général de cette méthode consiste à remplacer plusieurs fois les données manquantes par des données déduites d'informations existantes, puis à analyser les jeux de données ainsi complétés. L'imputation multiple a pour objectif de prendre en compte l'incertitude sur la prédiction de la valeur de remplacement et sur les estimateurs des paramètres du modèle d'imputation. On constitue M échantillons en tirant au sort successivement M jeux de paramètres du modèle d'imputation dans la distribution de leurs estimateurs et en simulant chaque valeur manquante en fonction de ces paramètres (phase d'imputation). Chaque échantillon complété est analysé comme s'il s'agissait d'un échantillon sans données manquantes (phase d'analyse séparée). Les paramètres d'intérêt sont estimés par la moyenne des estimations obtenues sur les M échantillons complétés et leurs variances sont calculées en fonction des variances intra et inter échantillon (phase d'analyse combinée) (64).

Sélection des variables pour les modèles avec imputations

Les variables retenues pour être incluses dans le modèle d'imputation étaient les variables associées à la présence de neurofibromes internes dans les analyses univariées cas complets (variables principales) (65), mais également les variables liées aux variables incomplètes (66-67). Ces variables dites auxiliaires permettent d'améliorer les capacités prédictives du modèle d'imputation (68) même si elles ne sont pas retenues dans les analyses finales des données imputées. La proportion de données manquantes n'était pas une condition restrictive à l'inclusion des variables, i.e. que les variables avec une proportion de données manquantes supérieures à 25% étaient imputées (69).

Le mécanisme de données manquantes a été estimé. Historiquement, 3 mécanismes sont décrits : le Manquant Au hasard (MAR) lorsque la probabilité qu'une observation soit incomplète ne dépend que des valeurs observées, le Manquant Complètement Au hasard (MCAR) lorsque la probabilité d'avoir des observations manquantes est une constante i.e indépendante des autres variables à analyser et le Manquant non au hasard (MNAR) lorsque

la probabilité d'avoir des observations manquantes sur X dépend des valeurs non observées de X elle-même. Pour identifier le mécanisme des données manquantes, une indicatrice de données manquantes iR binaire a été créée pour chaque variable incomplète iV . Chaque indicatrice iR (codée 1 si iV n'est pas renseignée et 0 sinon) a été croisée avec, d'une part la variable à expliquer M , d'autre part chacune des variables explicatives. Le lien statistique recherché est un test du Chi2 significatif ($p < 0.05$) pour des variables binaires ou catégorielles, ou bien un coefficient de corrélation supérieur à 0.15 pour des variables continues (67). Cette analyse permet généralement d'exclure un mécanisme MCAR pour une variable donnée si au moins un des croisements avec la variable à expliquer (maladie) ou une des variables explicatives (expositions) est significatif. Le mécanisme de données manquantes n'est alors pas complètement aléatoire car il dépend au moins d'une autre variable de la base de données. Il faut noter que l'on ne peut exclure un mécanisme de type MNAR si des liens existent entre des indicatrices de données manquantes et des variables incomplètes, car le mécanisme de données manquantes peut aussi dépendre des valeurs non-observées de ces variables. L'importance du mécanisme des données manquantes est liée à l'hypothèse MAR qui doit être plausible dans les modèles d'imputation multiple afin d'obtenir des inférences valides après imputation. L'hypothèse de données MAR garantit que les données imputées préservent la structure générale des données (moyennes et variance des distributions marginales, corrélation entre variables), sans la nécessité de définir le mécanisme de réponse. L'ajout de variables auxiliaires permet de capturer au mieux le mécanisme de données manquantes et ainsi de rendre l'hypothèse MAR plus plausible, puisque la modélisation des variables incomplètes dépend davantage de valeurs observées et donc dans une moindre mesure de valeurs non-observées (70).

Construction du modèle d'imputation

Les variables avec données manquantes étaient toutes binaires (Tableau 22), elles ont été imputées par régression logistique. Sous l'hypothèse MAR, une méthode d'imputation multiple par équations chaînées a été utilisée (67, 71). Il s'agit d'une méthode flexible où une distribution est spécifiée pour chaque variable incomplète conditionnellement à toutes les autres variables incluses dans le modèle d'imputation. Concrètement, cette méthode permet de ramener un problème multivarié de dimension k , en k problèmes univariés successifs conditionnant à chaque pas une variable imputée sur les valeurs observées et sur les valeurs

les plus récentes générées des autres variables (72). L'hypothèse de normalité n'est pas requise pour les variables binaires ou catégorielles. Dix imputations ont été réalisées.

Analyses des données imputées

Les 10 bases de données imputées ont été analysées automatiquement de façon séparée puis combinée selon les règles de Rubin qui stipulent qu'un nombre restreint d'imputations, c'est-à-dire de 3 à 5, est suffisant (73). Cet argument standard est basé sur la notion d'efficacité statistique relative des estimateurs dépendante de la fraction d'information manquante. La fraction d'information manquante dépend forcément de la proportion de données manquantes initiale de cette variable, aussi Bodner a proposé d'approximer la fraction d'information manquante par cette proportion (74). Il suffit d'imputer 5 bases pour obtenir une efficacité statistique relative de 95% si la variable incomplète a une fraction d'information manquante de 25% (73). Pour une même efficacité statistique, il suffit d'imputer 10 bases pour prendre en compte une fraction d'information manquante de 50%.

Le modèle utilisé pour les analyses après imputation multiple est un modèle de régression logistique incluant les variables binaires complétées ainsi que les variables auxiliaires. Une stratégie d'analyse manuelle pas à pas descendante a été menée.

3. Résultats

Population d'étude

Les principales caractéristiques phénotypiques des 357 enfants NF1 sont rapportées dans le tableau 22. La moyenne d'âge était de 7.7 (± 5.0) ans (extrêmes, 1.1-16.9), et 192 (53.8%) étaient de sexe masculin. Les neurofibromes internes étaient présents chez 35 (9.8%) enfants. La fréquence des neurofibromes internes augmentait durant l'adolescence (Figure 6), les neurofibromes internes semblaient se développer plus précocement chez les patients de sexe féminin (Figures 7). Cependant, la comparaison des courbes de « survie » selon le sexe par le test de Wilcoxon ne montrait pas de différence significative ($\chi^2=0.02$, $p=0.9$) même en se limitant aux patients de moins de 14 ans (avant que les courbes se croisent) (test de Logrank : $\chi^2=0.9$, $p=0.4$).

Tableau 21. Principales caractéristiques cliniques des 357 enfants atteints de NF1.

Caractéristiques cliniques (n=données manquantes)	n (%)
Sexe masculin	192 (53.8)
Age à la 1ère visite (années, moyenne \pm SD) (extrêmes)	7.7 \pm 5.0 (1.1-16.9)
Cas familiaux	183 (51.3)
Neurofibromes internes	35 (9.8)
Neurofibromes sous-cutanés (n=17)	72 (20.2)
Neurofibromes cutanés	153 (42.9)
Neurofibromes plexiformes (n=184)	83 (23.3)
Taches Café-au-lait	354 (99.2)
Lentigines (n=11)	219 (61.3)
Lisch nodules (n=84)	160 (44.8)
Xanthogranulomes (n=68)	14 (3.9)
Patite taille (n=32)	36 (10.1)
Macrocéphalie (n=21)	85 (23.8)
Pseudarthrose	13 (3.6)
Dysplasie osseuse (n=8)	31 (8.7)
Asymétrie faciale (n=72)	23 (6.4)
Hypertension (n=28)	3 (0.8)

Les données sont présentées sous forme d'effectifs (%).

Figure 6. Probabilité d’avoir des neurofibromes internes en fonction de l’âge (avec l’intervalle de confiance à 95%).

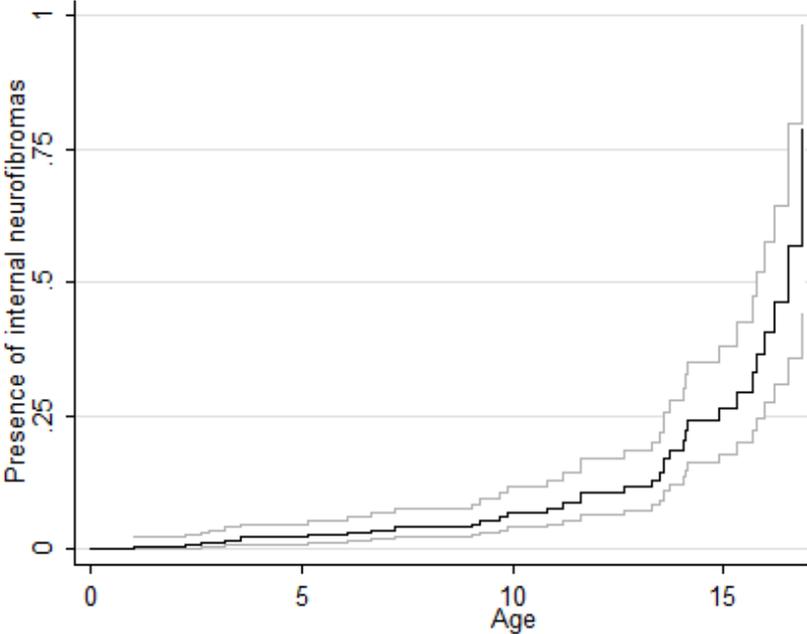
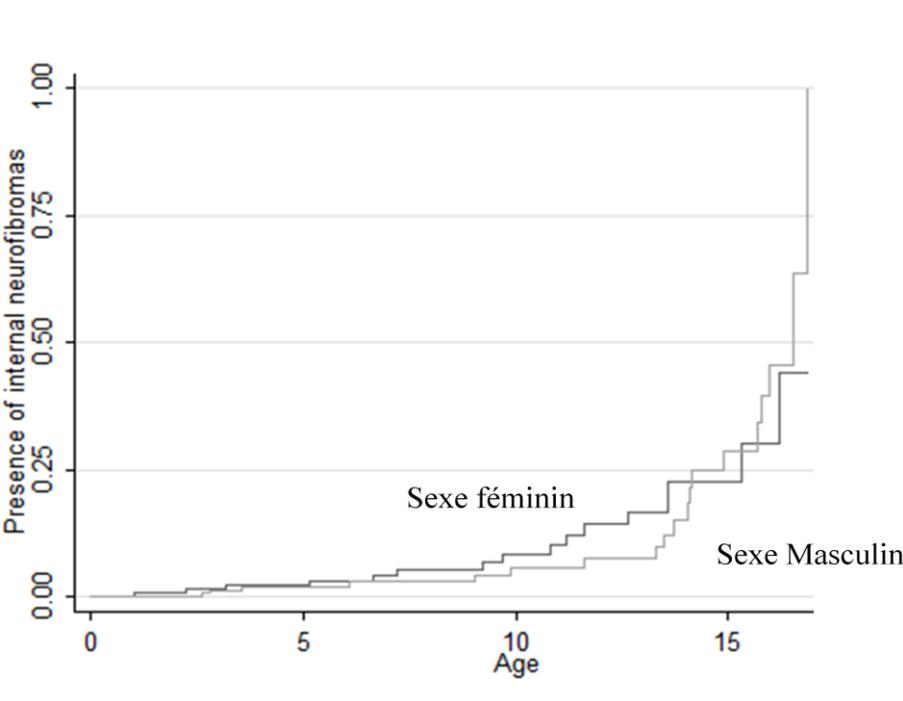


Figure 7. Probabilité d’avoir des neurofibromes internes selon l’âge stratifiée sur le sexe.



Facteurs associés avec la présence de neurofibromes internes.

Les résultats des analyses univariées sont présentés dans le tableau 23. Des associations significatives ou proches de la significativité ont été observées avec 5 variables : l'âge (variable continue), la présence de neurofibromes sous-cutanés, de neurofibromes plexiformes, de nodules de Lisch, et de xanthogranulomes.

Tableau 22. Facteurs associés à la présence de Neurofibromes internes dans la population de 357 enfants NF1 (analyses univariées)

	Neurofibromes internes		Odds Ratio (IC 95%) [†]	<i>p</i> [‡]
	Non n=322	Oui n=35		
Sexe masculin	148 (46)	16 (46)	1.01 (0.49-2.07)	0.98
Age (années)	7.35 ± 4.87	10.67 ± 4.81	1.14* (1.07-1.23)	<10⁻⁴
Cas familiaux	166 (51)	17 (49)	0.61 (0.29-1.27)	0.18
Neurofibromes sous-cutanés (n=305/35)	53 (17)	19 (54)	4.51 (2.13-9.55)	<10⁻⁴
Neurofibromes cutanés	139 (43)	14 (40)	0.78 (0.37-1.64)	0.51
Neurofibromes plexiformes (n=140/33)	60 (43)	19 (70)	3.60 (1.55-8.34)	0.003
Taches café-au-lait	319 (99)	35 (100)	0.81 (0.04 - ∞)	1.00
lentigines (n=312/34)	194 (56)	13 (28)	1.09 (0.47-2.52)	0.84
Nodules de Lisch (n=250/23)	151 (60)	9 (39)	0.35 (0.14-0.86)	0.05
Xanthogranulomes (n=257/32)	10 (4)	4 (13)	6.60 (1.69-25.74)	0.007
Petite taille (n=293/32)	32 (11)	4 (13)	1.00 (0.32-3.13)	1
Macrocéphalie (n=302/34)	12 (35)	73 (24)	1.65 (0.76-3.54)	0.20
Pseudarthrose	1 (3)	12 (4)	1.8 (0.3-10.2)	0.68
Dysplasie osseuse (=314/35)	27 (9)	4 (11)	1.06 (0.34-3.35)	0.91
Asymétrie faciale (n=261/24)	20 (8)	3 (12)	1.23 (0.45-6.93)	0.42
Hypertension (n=298/31)	2 (1)	1 (3)	5.41 (0.40-73.93)	0.21

[†]Odds ratio et son intervalle de confiance à 95% (IC 95%) estimés par regression logistique, ajustés sur l'âge;

*OR et son IC 95% pour une année supplémentaire ;

[‡] *p* estimé par regression logistique ;

Les données sont présentées sous forme d'effectifs (%) ou de moyenne ± 1 déviation standard.

La présence de nodules de Lisch était liée à celle de neurofibromes plexiformes (OR=2.9 [1.3-6.2] ; p=0.007). L'analyse d'un modèle avec interaction comprenant ces 2 variables ne montrait pas d'interaction significative ni d'effet propre de la variable « présence de nodules de Lisch » (OR=1.9 [0.5-7.7] ; p=0.4) mais un effet propre de la variable « neurofibromes plexiformes » (OR=3.8 [1.2-12.8] ; p=0.03). La présence de nodules de Lisch n'était plus significativement associée à la présence de neurofibromes internes après ajustement sur la présence de neurofibromes plexiformes (ORa = 0.8 ([0.3-2.1] ; p=0.7). La présence de nodules de Lisch était un facteur de confusion ; il n'a pas été pris en compte dans le modèle final.

Une interaction a été observée entre les neurofibromes plexiformes et les neurofibromes sous-cutanés. En effet, l'association entre la présence des neurofibromes internes et celle des neurofibromes plexiformes n'était pas la même en stratifiant sur les neurofibromes sous cutanés et inversement (Tableau 24). Il s'agissait donc d'un écart à l'hypothèse d'indépendance. Le test d'interaction n'était pas significatif (p=0.105) mais il s'agit d'un test de faible puissance et nos effectifs étaient limités.

Tableau 23. Association entre la présence de Neurofibromes internes et celle des neurofibromes plexiformes stratifiée sur la présence des neurofibromes sous-cutanés

		Présence de NF internes	Absence de NF internes	Odds Ratio et IC 95%
Absence de NF sous-cutanés	Présence de NF plexiformes	7 (44)	33 (33)	1.6 (0.5 – 4.6)
	Absence de NF plexiformes	9 (56)	66 (67)	
Présence de NF sous-cutanés	Présence de NF plexiformes	16 (94)	20 (59)	11.2 (1.1 – 113.2)
	Absence de NF plexiformes	1 (6)	14 (41)	

NF : neurofibromes, IC 95% : intervalle de confiance à 95%

L'effet modificateur a été quantifié par un terme d'interaction mesurant l'écart par rapport à un modèle de risque multiplicatif. Le choix s'est porté sur un modèle multiplicatif, l'objectif principal de cette étude étant de mettre en évidence le rôle étiologique de ces facteurs (75).

Tableau 24. Odds ratios de la présence des neurofibromes internes en fonction de la présence ou de l'absence de 2 facteurs : les neurofibromes sous-cutanés et plexiformes.

	Absence de NF sous cutanés	Présence de NF sous cutanés
Absence de NF plexiformes	1	0.5
Présence de NF sous plexiformes	1.6	5.9

*Odds ratios obtenus par rapport à un risque de 1 pour les patients n'ayant ni neurofibromes sous-cutanés ni plexiformes

L'effet observé en présence des deux facteurs de risque ($OR_{\text{sous cutanés et plexiformes}} = 5.9$) était supérieur à celui attendu sous l'hypothèse d'indépendance des effets ($OR_{\text{sous cutanés}} \times OR_{\text{plexiformes}} = 0.8$), ainsi l'interaction à l'échelle multiplicative était quantitative (Tableau 25).

Dans le but de faciliter l'interprétation du modèle et de prendre en compte cette interaction, une variable composite a été créée (76) : (1) absence de neurofibromes sous-cutanés et plexiformes (catégorie de référence), (2) l'un ou l'autre et (3) présence des 2. Cette « catégorisation » s'est fondée sur le poids identique des 2 variables dans les analyses univariées (Tableau 23).

L'âge, la présence à la fois des neurofibromes sous-cutanés et plexiformes, de xanthogranulomes étaient indépendamment associés à un risque plus élevé d'avoir des neurofibromes internes en analyse multivariée cas complets (Tableau 27).

Imputation multiple

Les variables entrées dans le modèle d'imputation multiples étaient :

- Les variables associées à la présence des neurofibromes internes en analyses univariées sur cas complets i.e. l'âge (variable continue), la présence de neurofibromes sous-cutanés, de neurofibromes plexiformes, de nodules de Lisch, et de xanthogranulomes. Compte tenu de l'interaction entre la présence de neurofibromes sous-cutanés et plexiformes dans l'analyse cas-complet, nous avons conservé la variable composite Neurofibromes sous-cutanés/Neurofibromes plexiformes : ni l'un ni l'autre, l'un ou l'autre, les 2. Cette variable composite a été décomposée en un jeu de variables indicatrices binaires avant d'être incluses dans le modèle d'imputation. Seul l'âge était complètement renseigné.
- Les variables corrélées aux variables incomplètes : le sexe, la présence de lentigines, le caractère familial, les neurofibromes cutanés et la dysmorphie faciale.

Il existait pour chacune de ces variables incomplètes un lien entre elles et avec la variable à expliquer, les autres variables (complètes et incomplètes) ou les 2. Ainsi un mécanisme de MCAR pouvait être exclu. Un mécanisme MNAR ne pouvait être totalement exclu puisque certaines indicatrices de données manquantes étaient liées à des variables incomplètes. Cependant, la base de données pour l'analyse imputée contenait 11 variables dont 6 auxiliaires qui ont pu être ajoutées au modèle d'imputation afin d'améliorer ses capacités prédictives. Ainsi, nous en avons conclu que le risque d'avoir des données MNAR était limité, ou que le modèle était suffisamment riche en variables prédictives pour rendre l'hypothèse MAR plausible. Ces variables auxiliaires n'intervenaient que dans le processus d'estimation des données manquantes. Plusieurs d'entre elles étaient partiellement renseignées (présence de lentigines, neurofibromes cutanés et dysmorphie faciale). Elles se sont révélées faiblement prédictives i.e. que l'on a observé des relations non significatives entre ces variables et la plupart des indicatrices de données manquantes des variables à imputer. Au total, le modèle incluant l'âge, la variable composite neurofibromes sous-cutanés/plexiformes, la présence de nodules de Lisch et la présence de xanthogranulomes (ne contenant donc aucune variable auxiliaire) a été retenu pour les analyses de données imputées.

Les variables retenues dans les modèles finaux des 2 analyses sont similaires (Tableau 26). Les Odds Ratios ne différaient pas significativement entre les deux analyses puisque les OR en analyse cas-complet appartenaient aux intervalles de confiance à 95% des OR après imputation. Les écarts –types étaient globalement réduits après imputation, les effectifs étant restaurés par l'imputation. Le p était plus petit pour chacune des 3 variables ainsi le risque d'erreur minimal pour lequel on pouvait conclure à tort à une association était plus petit. Enfin les intervalles de confiance étaient plus étroits permettant une précision de l'estimation de la taille de l'effet. Ces résultats sont issus d'une imputation multiple utilisant un modèle simple, c'est-à-dire n'incluant pas de variables auxiliaires. Des modèles d'imputation plus complexes, incluant les variables auxiliaires, n'ont pas apporté de changements dans les estimations.

Tableau 25. Résultats comparés de l'analyse multivariée analyse cas –complet (n=184) et imputation multiple (n=357).

	Données complètes ^a , n=184			Données imputées ^b , n=357		
	Odds Ratios	IC 95% †	p‡	Odds Ratios	IC 95%*	p**
Age	1.12^x	1.02-1.23	0.012	1.17^x	1.08-1.28	0.001
NF plexiformes/sous-cutanés						
- Aucun	1	-	-	1	-	-
- L'un ou l'autre	1.15	0.42-3.15	0.781	0.94	0.36-2.43	0.90
- Les deux	4.95	1.80-13.64	0.002	3.92	1.50-10.22	0.006
Xanthogranulomes	4.51	0.94-21.73	0.06	4.77	1.00-23.00	0.05

^aExclusion des patients avec données manquantes, ^bDonnées manquantes imputées par imputation multiple

†Odds ratio avec leur intervalle de confiance à 95% (IC 95%) estimés par régression logistique, ‡ p estimé par régression logistique

^xOR et IC 95% pour 1 année supplémentaire

*OR et IC 95% estimé par régression logistique avec imputation multiple, ** p estimé par régression logistique avec imputation multiple

NF, neurofibrome

4. Discussion

Cette étude a permis d'identifier des caractéristiques cliniques facilement reconnaissables associées à la présence de neurofibromes internes chez l'enfant NF1. L'âge, la présence de xanthogranulomes, celle de neurofibromes sous-cutanés et plexiformes étaient indépendamment associés à un risque plus élevé de neurofibromes internes.

La validité interne de cette étude repose sur plusieurs critères. Premièrement tous les patients avaient un diagnostic de NF1 certain établi par des médecins experts à partir de la définition du NIH (32). Un biais de sélection paraît peu probable, la fréquence des caractéristiques cliniques de la population d'étude étant celle rapportée dans des études antérieures (77-78). Une autre force de l'étude réside dans la certitude diagnostique du critère à évaluer i.e. la présence ou non des neurofibromes internes identifiés à partir de données de l'imagerie. Cependant, l'absence d'imagerie en routine pour tous les patients NF1 est une limite de l'étude. L'IRM ou le scanner n'étaient réalisés qu'en présence d'anomalies cliniques (douleur, déficit moteur...) ou radiologiques. Un biais de vérification ne peut donc être éliminé. L'analyse cas-complet a induit une perte importante d'effectifs, d'environ 50%. Cette analyse était potentiellement biaisée puisque le mécanisme de données manquantes semblait dépendre de la variable à expliquer (79). Une analyse réalisée par imputation multiple était donc préférable. Les OR ne différaient pas significativement entre les deux analyses puisque les OR analyse cas-complet appartenaient aux intervalles de confiance à 95% des OR après imputation. Les écarts-types étaient globalement réduits après imputation, puisque les effectifs étaient restaurés par l'imputation (184 à 357), et ce malgré la prise en compte dans le calcul de la variance de la variabilité entre les bases imputées. La similarité des résultats des analyses cas-complet et imputation multiple laisse supposer que les deux analyses sont valides (car non-biaisées). Par ailleurs, la taille de l'échantillon semblait suffisante, la règle empirique de 10 observations minimales par variable indépendante était respectée (50). Enfin, une bonne validité externe semblait assurée puisque les analyses avaient été réalisées sur 2 populations NF1, l'une européenne, l'autre nord américaine. Cependant, le recrutement hospitalier peut être à l'origine d'un biais de sélection en recrutant les patients les plus sévères.

Les neurofibromes internes étaient présents chez 35 patients soit environ 10% de la population d'étude. Ceci est cohérent avec une précédente étude portant sur 53 enfants NF1

dont 7 (13.2%) avaient des neurofibromes paraspinaux identifiés par une IRM du rachis entier (80). Comme nous l'avons rapporté dans l'introduction, les neurofibromes internes se développent plus rapidement chez les enfants NF1 (63). Par ailleurs, les thérapies ciblées sembleraient plus efficaces dans l'arrêt du développement plutôt que dans la réduction de la masse tumorale (81). Ainsi, les enfants/adolescents NF1 chez qui la masse tumorale interne croît le plus rapidement auraient un intérêt particulier à recevoir ces nouvelles thérapies ciblées. Les facteurs de risque identifiés dans cette étude pourraient donc aider à cibler les patients de moins de 17 ans les plus à risque d'avoir des neurofibromes internes. Dans notre étude, un âge élevé était indépendamment lié à la présence de neurofibromes internes. La période à risque de développer des neurofibromes internes semble se situer entre l'adolescence et l'âge de 30 ans (cf Chapitre 3). En effet, dans notre étude les neurofibromes internes se développent de façon exponentielle pendant l'adolescence et plus précocement chez les femmes en accord avec les données de la littérature (63, 82). Comme nous l'avons évoqué dans le Chapitre 1 (Etude de mortalité), une des hypothèses serait que les hormones stéroïdiennes affectent le phénotype NF1. La présence de neurofibromes sous-cutanés et plexiformes était également indépendamment associée à celle de neurofibromes internes toujours en accord avec les données de la littérature (25). Dans l'étude de KHONG, la scoliose (71.4% vs. 30.4%), les neurofibromes sous-cutanés (71.4% vs. 39.1%) et plexiformes (28.6% vs. 8.7%) étaient plus fréquemment présents chez les enfants présentant les neurofibromes internes (n=7 versus n=46) (80). Aucune de ces différences n'était significativement possiblement en rapport avec un manque de puissance (respectivement, p=0.08, p=0.22, et p=0.17). Les xanthogranulomes étaient indépendamment liés à la présence de neurofibromes internes. Cette association est rapportée pour la première fois. Enfin, la validation externe de cette étude est nécessaire.

Conclusion et Perspective

Les différents travaux entrepris dans le cadre de cette thèse ont permis d'identifier les patients NF1 les plus à risque de complications et/ou de morbidité.

Nous avons, tout d'abord, confirmé une sur-mortalité des patients NF1 français et déterminé une période à risque de mortalité entre 10 et 40 ans. Cette surmortalité était présente dans les deux sexes mais significativement plus importante chez les femmes de 10 à 20 ans. Les décès étaient secondaires à des tumeurs malignes des gaines nerveuses dont on sait qu'elles se développent aux dépens des neurofibromes internes. Nous avons alors contribué à l'objectif général de recherche du réseau NF-France, celui de cibler les malades les plus à risque de mortalité i.e., ceux présentant ces neurofibromes internes à fort potentiel de complications. Ainsi, nous avons confirmé et caractérisé le lien entre le phénotype à risque de mortalité, défini par la présence de neurofibromes sous-cutanés (précédentes études), et la présence de neurofibromes internes. Nous avons montré que cet effet était d'autant plus marqué que le nombre de neurofibromes sous cutanés était important et notamment au-delà d'un seuil de 10. Nous avons ensuite élaboré un score prédictif de la présence de ces neurofibromes internes à partir des caractéristiques phénotypiques des patients. La présence de neurofibromes sous-cutanés, l'absence de neurofibromes cutanés, un âge inférieur ou égal à 30 ans et moins de 6 taches café au lait étaient les variables qui constituaient le NF1Score. Enfin, l'expression phénotypique variant au cours du temps chez un même patient (puberté, grossesse...) et les neurofibromes internes se développant plus rapidement chez le sujet jeune, une étude spécifique a été réalisée sur une population pédiatrique. Ainsi, l'âge, la présence de xanthogranulomes, celle de neurofibromes sous-cutanés et plexiformes étaient indépendamment associés à celle des neurofibromes internes chez l'enfant NF1 de moins de 17 ans. Dans cette dernière étude, les neurofibromes internes se développaient de façon exponentielle pendant l'adolescence et plus précocement chez les femmes, ce qui est en accord avec les données de la littérature. La période à risque de développer des neurofibromes internes semble donc se situer entre l'adolescence et l'âge de 30 ans.

Identifier les patients ayant des neurofibromes internes par un simple examen clinique permettrait de sélectionner une population chez qui l'IRM serait pratiquée afin de diagnostiquer précocement une transformation en TMGN et ainsi permettre une chirurgie curative, seul traitement actuellement efficace. Il est nécessaire d'évaluer rapidement l'intérêt pour cette population d'un suivi régulier par IRM. Une façon d'appréhender cette question serait une étude de cohorte où une mesure régulière de la masse tumorale interne serait réalisée par une IRM 3D au cours du temps. Ainsi, des informations sur la cinétique de grossissement des masses internes, et sur un possible seuil volumétrique de transformation en TMGN seraient disponibles. Plus que le volume tumoral, l'activité métabolique des neurofibromes internes, évaluée par le TEP-Scanner, semble prometteur. Nous étudions actuellement l'association entre la présence de SC-NF et l'activité métabolique des neurofibromes internes, l'objectif étant de déterminer un seuil métabolique de risque de transformation en TMGN. Identifier les patients ayant des neurofibromes internes a également un intérêt en Recherche Clinique. L'efficacité de nouvelles molécules dans la réduction de la masse tumorale interne est en cours d'évaluation. Il s'agit de thérapeutiques ciblées notamment de la voie de signalisation de mTOR (évérolimus, sirolimus, ranibizumab, niltotinib...). Une dizaine d'essais de phases II/III (dont un au niveau du centre de référence d'Henri Mondor) sont en cours. L'autorisation de mise sur le marché de nouvelles thérapeutiques s'appuie notamment sur des études de niveau de preuve A, comme les essais cliniques. Au moment de la mise en place de tels essais, la sélection des patients basée notamment sur la sévérité de la maladie est primordiale. Ainsi, les essais thérapeutiques dans le cadre des adultes NF1 devraient cibler les patients présentant des neurofibromes internes. En effet, il semblerait que les thérapeutiques ciblées soient plus efficaces sur les neurofibromes internes non transformés en TMGN. Les patients avec un risque élevé d'avoir des neurofibromes internes, i.e. avec un phénotype à risque évolutif défini par la présence de neurofibromes sous-cutanés, seraient identifiés et participeraient aux essais testant de nouvelles thérapeutiques. Enfin, l'identification des variants génétiques responsables de la variabilité d'expression de la NF1 fournira probablement la clé de la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la maladie et notamment l'extrême variabilité phénotypique. L'existence de gènes modifiant l'expression phénotypique au cours de la NF1 a été démontrée (83). Au sein de cette composante génétique, le gène NF1 a un rôle mineur puisque ni la nature de la mutation responsable de la maladie ni des variations polymorphes

du gène ne semblent expliquer la grande variabilité d'expression clinique de la NF1. Ces résultats suggèrent donc l'implication de facteurs génétiques, non liés au gène NF1. L'identification de ces variants dits « modificateurs » du phénotype est aujourd'hui possible grâce à la vaste collection de patients recrutés dans le cadre du réseau Nf-France. Ainsi, le gène ANRIL a récemment été identifié comme influençant le nombre de neurofibromes plexiformes. Ces gènes « modificateurs » permettront d'identifier de nouvelles voies de signalisation et donc de nouvelles cibles thérapeutiques. Ainsi, de nouvelles stratégies thérapeutiques inexistantes à ce jour pourront être mises en oeuvre.

En cas de nouvelles thérapeutiques identifiées et efficaces, les recommandations de suivi devront prendre en compte outre le phénotype à risque (NF1Score, présence de neurofibromes sous-cutanés), la période de survenue de ces complications en réévaluant l'intérêt dans ce contexte d'investigations complémentaires.

Bibliographie

1. Rasmussen SA, Friedman JM. NF1 gene and neurofibromatosis 1. *Am J Epidemiol.* 2000 Jan 1;151(1):33-40.
2. Bernardis A. Neurofibromatosis type 1 and Ras-mediated signaling: filling in the GAPS. *Biochim Biophys Acta.* 1995 Jul 28;1242(1):43-59.
3. Messiaen LM, Callens T, Mortier G, Beysen D, Vandenbroucke I, Van Roy N, et al. Exhaustive mutation analysis of the NF1 gene allows identification of 95% of mutations and reveals a high frequency of unusual splicing defects. *Hum Mutat.* 2000;15(6):541-55.
4. Ferner RE, Huson SM, Thomas N, Moss C, Willshaw H, Evans DG, et al. Guidelines for the diagnosis and management of individuals with neurofibromatosis 1. *J Med Genet.* 2007 Feb;44(2):81-8.
5. Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer.* 2003 Jun;3(6):459-65.
6. Giehl K. Oncogenic Ras in tumour progression and metastasis. *Biol Chem.* 2005 Mar;386(3):193-205.
7. Boyd KP, Korf BR, Theos A. Neurofibromatosis type 1. *J Am Acad Dermatol.* 2009 Jul;61(1):1-14; quiz 5-6.
8. Wallace MR, Andersen LB, Fountain JW, Odeh HM, Viskochil D, Marchuk DA, et al. A chromosome jump crosses a translocation breakpoint in the von Recklinghausen neurofibromatosis region. *Genes Chromosomes Cancer.* 1990 Nov;2(4):271-7.
9. Upadhyaya M, Ruggieri M, Maynard J, Osborn M, Hartog C, Mudd S, et al. Gross deletions of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene are predominantly of maternal origin and commonly associated with a learning disability, dysmorphic features and developmental delay. *Hum Genet.* 1998 May;102(5):591-7.
10. Kluwe L, Siebert R, Gesk S, Friedrich RE, Tinschert S, Kehrer-Sawatzki H, et al. Screening 500 unselected neurofibromatosis 1 patients for deletions of the NF1 gene. *Hum Mutat.* 2004 Feb;23(2):111-6.
11. De Raedt T, Maertens O, Chmara M, Brems H, Heyns I, Sciot R, et al. Somatic loss of wild type NF1 allele in neurofibromas: Comparison of NF1 microdeletion and non-microdeletion patients. *Genes Chromosomes Cancer.* 2006 Oct;45(10):893-904.
12. Easton DF, Ponder MA, Huson SM, Ponder BA. An analysis of variation in expression of neurofibromatosis (NF) type 1 (NF1): evidence for modifying genes. *Am J Hum Genet.* 1993 Aug;53(2):305-13.
13. Pasmant E, Sabbagh A, Masliah-Planchon J, Ortonne N, Laurendeau I, Melin L, et al. Role of noncoding RNA ANRIL in genesis of plexiform neurofibromas in neurofibromatosis type 1. *J Natl Cancer Inst.* 2011 Nov 16;103(22):1713-22.
14. Pinson S, Creange A, Barbarot S, Stalder JF, Chaix Y, Rodriguez D, et al. [Neurofibromatosis 1: recommendations for management]. *Ann Dermatol Venereol.* 2001 Apr;128(4):567-75.
15. Huson SM, Compston DA, Clark P, Harper PS. A genetic study of von Recklinghausen neurofibromatosis in south east Wales. I. Prevalence, fitness, mutation rate, and effect of parental transmission on severity. *J Med Genet.* 1989 Nov;26(11):704-11.
16. Wolkenstein P, Freche B, Zeller J, Revuz J. Usefulness of screening investigations in neurofibromatosis type 1. A study of 152 patients. *Arch Dermatol.* 1996 Nov;132(11):1333-6.

17. Friedman JM, Birch PH. Type 1 neurofibromatosis: a descriptive analysis of the disorder in 1,728 patients. *Am J Med Genet.* 1997 May 16;70(2):138-43.
18. Wolkenstein P, Zeller J, Revuz J, Ecosse E, Leplege A. Quality-of-life impairment in neurofibromatosis type 1: a cross-sectional study of 128 cases. *Arch Dermatol.* 2001 Nov;137(11):1421-5.
19. Wolkenstein P, Rodriguez D, Ferkal S, Gravier H, Buret V, Algans N, et al. Impact of neurofibromatosis 1 upon quality of life in childhood: a cross-sectional study of 79 cases. *Br J Dermatol.* 2009 Apr;160(4):844-8.
20. Creange A, Zeller J, Rostaing-Rigattieri S, Brugieres P, Degos JD, Revuz J, et al. Neurological complications of neurofibromatosis type 1 in adulthood. *Brain.* 1999 Mar;122 (Pt 3):473-81.
21. Evans DG, Baser ME, McGaughan J, Sharif S, Howard E, Moran A. Malignant peripheral nerve sheath tumours in neurofibromatosis 1. *J Med Genet.* 2002 May;39(5):311-4.
22. Zoller M, Rembeck B, Akesson HO, Angervall L. Life expectancy, mortality and prognostic factors in neurofibromatosis type 1. A twelve-year follow-up of an epidemiological study in Goteborg, Sweden. *Acta Derm Venereol.* 1995 Mar;75(2):136-40.
23. Rasmussen SA, Yang Q, Friedman JM. Mortality in neurofibromatosis 1: an analysis using U.S. death certificates. *Am J Hum Genet.* 2001 May;68(5):1110-8.
24. Doorn PF, Molenaar WM, Buter J, Hoekstra HJ. Malignant peripheral nerve sheath tumors in patients with and without neurofibromatosis. *Eur J Surg Oncol.* 1995 Feb;21(1):78-82.
25. Tucker T, Wolkenstein P, Revuz J, Zeller J, Friedman JM. Association between benign and malignant peripheral nerve sheath tumors in NF1. *Neurology.* 2005 Jul 26;65(2):205-11.
26. Leroy K, Dumas V, Martin-Garcia N, Falzone MC, Voisin MC, Wechsler J, et al. Malignant peripheral nerve sheath tumors associated with neurofibromatosis type 1: a clinicopathologic and molecular study of 17 patients. *Arch Dermatol.* 2001 Jul;137(7):908-13.
27. Valeyrie-Allanore L, Ismaili N, Bastuji-Garin S, Zeller J, Wechsler J, Revuz J, et al. Symptoms associated with malignancy of peripheral nerve sheath tumours: a retrospective study of 69 patients with neurofibromatosis 1. *Br J Dermatol.* 2005 Jul;153(1):79-82.
28. Ducatman BS, Scheithauer BW, Piepgras DG, Reiman HM, Ilstrup DM. Malignant peripheral nerve sheath tumors. A clinicopathologic study of 120 cases. *Cancer.* 1986 May 15;57(10):2006-21.
29. Valeyrie-Allanore LF-GE, Zelek L, Lantieri L, Wolkenstein P, editor. Inefficacit  de la chimioth rapie conventionnelle dans les tumeurs malignes des gaines des nerfs de la neurofibromatose 1. *Journ e Dermatologiques de Paris*; 2006.
30. *Trials.gov* C. Available from: <http://clinicaltrials.gov/>.
31. Gutmann DH, Aylsworth A, Carey JC, Korf B, Marks J, Pyeritz RE, et al. The diagnostic evaluation and multidisciplinary management of neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2. *JAMA.* 1997 Jul 2;278(1):51-7.
32. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: neurofibromatosis. Bethesda, Md., USA, July 13-15, 1987. *Neurofibromatosis.* 1988;1(3):172-8.
33. Khosrotehrani K, Bastuji-Garin S, Riccardi VM, Birch P, Friedman JM, Wolkenstein P. Subcutaneous neurofibromas are associated with mortality in neurofibromatosis 1: a cohort study of 703 patients. *Am J Med Genet A.* 2005 Jan 1;132A(1):49-53.

34. Khosrotehrani K, Bastuji-Garin S, Zeller J, Revuz J, Wolkenstein P. Clinical risk factors for mortality in patients with neurofibromatosis 1: a cohort study of 378 patients. *Arch Dermatol.* 2003 Feb;139(2):187-91.
35. Evans DG, O'Hara C, Wilding A, Ingham SL, Howard E, Dawson J, et al. Mortality in neurofibromatosis 1: in North West England: an assessment of actuarial survival in a region of the UK since 1989. *Eur J Hum Genet.* 2011 Nov;19(11):1187-91.
36. Sorensen SA MJ, Nielsen A. Long-term follow-up of von Recklinghausen neurofibromatosis. Survival and malignant neoplasms. *N England J Med.* 1986;17(314):1010-5.
37. Walker L TD, Easton D, Ponder B, Ponder M, Frayling I, Baralle D. A prospective study of neurofibromatosis type 1 cancer incidence in the UK. *Br J Cancer.* 2006;17(95):233-8.
38. Masocco M, Kodra Y, Vichi M, Conti S, Kanieff M, Pace M, et al. Mortality associated with neurofibromatosis type 1: a study based on Italian death certificates (1995-2006). *Orphanet J Rare Dis.* 2011;6:11.
39. Breslow NE, Day NE. Statistical methods in cancer research. Volume II--The design and analysis of cohort studies. *IARC Sci Publ.* 1987(82):1-406.
40. Imaizumi Y. Mortality of neurofibromatosis in Japan, 1968-1992. *J Dermatol.* 1995 Mar;22(3):191-5.
41. Overdiek A, Winner U, Mayatepek E, Rosenbaum T. Schwann cells from human neurofibromas show increased proliferation rates under the influence of progesterone. *Pediatr Res.* 2008 Jul;64(1):40-3.
42. Perrin GQ LH, Fishbein L, Thomson SA, Hwang MS, Scarborough MT, Yachnis AT, Wallace MR, Mareci TH, Muir D. An orthotopic xenograft model of intraneural NF1 MPNST suggests a potential association between steroid hormones and tumor cell proliferation. *Lab Invest.* 2007;87(11):1092-102.
43. Li H, Zhang X, Fishbein L, Kweh F, Campbell-Thompson M, Perrin GQ, et al. Analysis of steroid hormone effects on xenografted human NF1 tumor schwann cells. *Cancer Biol Ther.* 2010 Oct 15;10(8):758-64.
44. Mautner VF, Hartmann M, Kluwe L, Friedrich RE, Funsterer C. MRI growth patterns of plexiform neurofibromas in patients with neurofibromatosis type 1. *Neuroradiology.* 2006 Mar;48(3):160-5.
45. Drouet A, Wolkenstein P, Lefaucheur JP, Pinson S, Combemale P, Gherardi RK, et al. Neurofibromatosis 1-associated neuropathies: a reappraisal. *Brain.* 2004 Sep;127(Pt 9):1993-2009.
46. Ferner RE, Hughes RA, Hall SM, Upadhyaya M, Johnson MR. Neurofibromatous neuropathy in neurofibromatosis 1 (NF1). *J Med Genet.* 2004 Nov;41(11):837-41.
47. Riccardi VM. Neurofibromatosis: phenotype, natural history, and pathogenesis: Johns Hopkins University Press; 1992.
48. Korf BR. Plexiform neurofibromas. *Am J Med Genet.* 1999 Mar 26;89(1):31-7.
49. Plotkin SR, Bredella MA, Cai W, Kassarian A, Harris GJ, Esparza S, et al. Quantitative assessment of whole-body tumor burden in adult patients with neurofibromatosis. *PLoS One.* 2012;7(4):e35711.
50. Hosmer DWLS. Applied logistic regression. Wiley, editor. New-York 1989.
51. Harrell FE, Jr., Lee KL, Califf RM, Pryor DB, Rosati RA. Regression modelling strategies for improved prognostic prediction. *Stat Med.* 1984 Apr-Jun;3(2):143-52.
52. Hanley JA, McNeil BJ. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology.* 1982 Apr;143(1):29-36.

53. Harrell FE, Jr., Lee KL, Mark DB. Multivariable prognostic models: issues in developing models, evaluating assumptions and adequacy, and measuring and reducing errors. *Stat Med.* 1996 Feb 28;15(4):361-87.
54. Van Houwelingen JC, Le Cessie S. Predictive value of statistical models. *Stat Med.* 1990 Nov;9(11):1303-25.
55. Miller ME, Hui SL, Tierney WM. Validation techniques for logistic regression models. *Stat Med.* 1991 Aug;10(8):1213-26.
56. van Houwelingen HC. The future of biostatistics: expecting the unexpected. *Stat Med.* 1997 Dec 30;16(24):2773-84.
57. Steyerberg EW, Eijkemans MJ, Harrell FE, Jr., Habbema JD. Prognostic modelling with logistic regression analysis: a comparison of selection and estimation methods in small data sets. *Stat Med.* 2000 Apr 30;19(8):1059-79.
58. Kaufmann D, Muller R, Bartelt B, Wolf M, Kunzi-Rapp K, Hanemann CO, et al. Spinal neurofibromatosis without cafe-au-lait macules in two families with null mutations of the NF1 gene. *Am J Hum Genet.* 2001 Dec;69(6):1395-400.
59. Duong TA, Bastuji-Garin S, Valeyrie-Allanore L, Sbidian E, Ferkal S, Wolkenstein P. Evolving pattern with age of cutaneous signs in neurofibromatosis type 1: a cross-sectional study of 728 patients. *Dermatology.* 2011;222(3):269-73.
60. Hagem C, Zils U, Peiper M, Kluwe L, Gotthard S, Friedrich RE, et al. Histopathology and clinical outcome of NF1-associated vs. sporadic malignant peripheral nerve sheath tumors. *J Neurooncol.* 2007 Apr;82(2):187-92.
61. Friedrich RE, Hartmann M, Mautner VF. Malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNST) in NF1-affected children. *Anticancer Res.* 2007 Jul-Aug;27(4A):1957-60.
62. McCaughan JA, Holloway SM, Davidson R, Lam WW. Further evidence of the increased risk for malignant peripheral nerve sheath tumour from a Scottish cohort of patients with neurofibromatosis type 1. *J Med Genet.* 2007 Jul;44(7):463-6.
63. Dombi E, Solomon J, Gillespie AJ, Fox E, Balis FM, Patronas N, et al. NF1 plexiform neurofibroma growth rate by volumetric MRI: relationship to age and body weight. *Neurology.* 2007 Feb 27;68(9):643-7.
64. Little RJA RD. Statistical analysis with missing data. 2nd ed. . Statistics. WsiPa, editor. New York2002.
65. Wood AM, White IR, Royston P. How should variable selection be performed with multiply imputed data? *Stat Med.* 2008 Jul 30;27(17):3227-46.
66. Rubin DB, Schenker N. Multiple imputation in health-care databases: an overview and some applications. *Stat Med.* 1991 Apr;10(4):585-98.
67. van Buuren S, Boshuizen HC, Knook DL. Multiple imputation of missing blood pressure covariates in survival analysis. *Stat Med.* 1999 Mar 30;18(6):681-94.
68. Schafer JL. Multiple imputation: a primer. *Stat Methods Med Res.* 1999 Mar;8(1):3-15.
69. Sterne JA, White IR, Carlin JB, Spratt M, Royston P, Kenward MG, et al. Multiple imputation for missing data in epidemiological and clinical research: potential and pitfalls. *BMJ.* 2009;338:b2393.
70. Collins LM, Schafer JL, Kam CM. A comparison of inclusive and restrictive strategies in modern missing data procedures. *Psychol Methods.* 2001 Dec;6(4):330-51.
71. Kenward MG, Carpenter J. Multiple imputation: current perspectives. *Stat Methods Med Res.* 2007 Jun;16(3):199-218.

72. Cottrell G, Cot M, Mary JY. [Multiple imputation of missing at random data: General points and presentation of a Monte-Carlo method]. *Rev Epidemiol Sante Publique*. 2009 Oct;57(5):361-72.
73. Little RJA, & Rubin, D. B. *Statistical analysis with missing data*. . New York: John Wiley & Sons; 1987.
74. TE B. What Improves with Increased Missing Data Imputations ? *Structural Equation Modeling*. 2008;15:651-75.
75. Rothman KJ, Greenland S, Walker AM. Concepts of interaction. *Am J Epidemiol*. 1980 Oct;112(4):467-70.
76. Schumacker RE MG. Interaction and Non-linear effects in structural Equation 1998.
77. DeBella K, Poskitt K, Szudek J, Friedman JM. Use of "unidentified bright objects" on MRI for diagnosis of neurofibromatosis 1 in children. *Neurology*. 2000 Apr 25;54(8):1646-51.
78. Cnossen MH, Moons KG, Garssen MP, Pasmans NM, de Goede-Bolder A, Niermeijer MF, et al. Minor disease features in neurofibromatosis type 1 (NF1) and their possible value in diagnosis of NF1 in children < or = 6 years and clinically suspected of having NF1. Neurofibromatosis team of Sophia Children's Hospital. *J Med Genet*. 1998 Aug;35(8):624-7.
79. Spratt M, Carpenter J, Sterne JA, Carlin JB, Heron J, Henderson J, et al. Strategies for multiple imputation in longitudinal studies. *Am J Epidemiol*. 2010 Aug 15;172(4):478-87.
80. Khong PL, Goh WH, Wong VC, Fung CW, Ooi GC. MR imaging of spinal tumors in children with neurofibromatosis 1. *AJR Am J Roentgenol*. 2003 Feb;180(2):413-7.
81. Kim A, Gillespie A, Dombi E, Goodwin A, Goodspeed W, Fox E, et al. Characteristics of children enrolled in treatment trials for NF1-related plexiform neurofibromas. *Neurology*. 2009 Oct 20;73(16):1273-9.
82. Tucker T, Friedman JM, Friedrich RE, Wenzel R, Funsterer C, Mautner VF. Longitudinal study of neurofibromatosis 1 associated plexiform neurofibromas. *J Med Genet*. 2009 Feb;46(2):81-5.
83. Sabbagh A, Pasmant E, Laurendeau I, Parfait B, Barbarot S, Guillot B, et al. Unravelling the genetic basis of variable clinical expression in neurofibromatosis 1. *Hum Mol Genet*. 2009 Aug 1;18(15):2768-78.
84. Duong TA, Sbidian E, Valeyrie-Allanore L, Vialette C, Ferkal S, Hadj-Rabia S, et al. Mortality associated with neurofibromatosis 1: a cohort study of 1895 patients in 1980-2006 in France. *Orphanet J Rare Dis*. 2011;6:18.
85. Tucker T, Riccardi VM, Brown C, Fee J, Sutcliffe M, Vielkind J, et al. S100B and neurofibromin immunostaining and X-inactivation patterns of laser-microdissected cells indicate a multicellular origin of some NF1-associated neurofibromas. *J Neurosci Res*. 2011 Sep;89(9):1451-60.
86. Tucker T, Riccardi VM, Sutcliffe M, Vielkind J, Wechsler J, Wolkenstein P, et al. Different patterns of mast cells distinguish diffuse from encapsulated neurofibromas in patients with neurofibromatosis 1. *J Histochem Cytochem*. 2011 Jun;59(6):584-90.
87. Sbidian E, Wolkenstein P, Valeyrie-Allanore L, Rodriguez D, Hadj-Rabia S, Ferkal S, et al. NF-1Score: a prediction score for internal neurofibromas in neurofibromatosis-1. *J Invest Dermatol*. 2010 Sep;130(9):2173-8.
88. Neurofibromatosis. Conference statement. National Institutes of Health Consensus Development Conference. *Arch Neurol*. 1988 May;45(5):575-8.
89. DeBella K, Szudek J, Friedman JM. Use of the national institutes of health criteria for diagnosis of neurofibromatosis 1 in children. *Pediatrics*. 2000 Mar;105(3 Pt 1):608-14.

90. Cnossen MH, de Goede-Bolder A, van den Broek KM, Waasdorp CM, Oranje AP, Stroink H, et al. A prospective 10 year follow up study of patients with neurofibromatosis type 1. *Arch Dis Child*. 1998 May;78(5):408-12.
91. Sbidian E, Bastuji-Garin S, Valeyrie-Allanore L, Ferkal S, Lefaucheur JP, Drouet A, et al. At-Risk Phenotype of Neurofibromatose-1 Patients: A Multicentre Case-Control Study. *Orphanet J Rare Dis*. 2011 Jul 13;6(1):51.
92. Zvulunov A, Barak Y, Metzker A. Juvenile xanthogranuloma, neurofibromatosis, and juvenile chronic myelogenous leukemia. World statistical analysis. *Arch Dermatol*. 1995 Aug;131(8):904-8.

Annexes

ANNEXE 1

Duong TA, **Sbidian E**, Valeyrie-Allanore L, Vialette C, Ferkal S, Hadj-Rabia S, Glorion C, Lyonnet S, Zerah M, Kemlin I, Rodriguez D, Bastuji-Garin S/Wolkenstein P. **Mortality associated with Neurofibromatosis 1: a cohort study of 1895 patients in 1980-2006 in France.** *Orphanet Journal of rare diseases*, 2011, 4:6-18

RESEARCH

Open Access

Mortality Associated with Neurofibromatosis 1: A Cohort Study of 1895 Patients in 1980-2006 in France

Tu Anh Duong^{1,2}, Emilie Sbidian^{1,3,5}, Laurence Valeyrie-Allanore^{1,4,5}, Cédric Valette⁶, Salah Ferka^{3,4,7}, Smail Hadj-Rabia⁸, Christophe Glorion⁹, Stanislas Lyonnet¹⁰, Michel Zerah¹¹, Isabelle Kemlin¹², Diana Rodriguez^{12,13}, Sylvie Bastuji-Garin^{3,4,5†} and Pierre Wolkenstein^{1,4,5†}

Abstract

Background: Neurofibromatosis 1 (NF1), a common autosomal dominant disorder, was shown in one study to be associated with a 15-year decrease in life expectancy. However, data on mortality in NF1 are limited. Our aim was to evaluate mortality in a large retrospective cohort of NF1 patients seen in France between 1980 and 2006.

Methods: Consecutive NF1 patients referred to the National French Referral Center for Neurofibromatoses were included. The standardized mortality ratio (SMR) with its 95% confidence interval (CI) was calculated as the ratio of observed over expected numbers of deaths. We studied factors associated with death and causes of death.

Results: Between 1980 and 2006, 1895 NF1 patients were seen. Median follow-up was 6.8 years (range, 0.4-20.6). Vital status was available for 1226 (65%) patients, of whom 1159 (94.5%) survived and 67 (5.5%) died. Overall mortality was significantly increased in the NF1 cohort (SMR 2.02; CI, 1.6-2.6; $P < 10^{-4}$). The excess mortality occurred among patients aged 10 to 20 years (SMR 5.2; CI, 2.6-9.3; $P < 10^{-4}$) and 20 to 40 years (SMR 4.1; 2.8-5.8; $P < 10^{-4}$). Significant excess mortality was found in both males and females. In the 10-20 year age group, females had a significant increase in mortality compared to males (SMR 12.6; CI, 5.7-23.9; and SMR 1.8; CI, 0.2-6.4; respectively). The cause of death was available for 58 (86.6%) patients; malignant nerve sheath tumor was the main cause of death (60%).

Conclusions: We found significantly increased SMRs indicating excess mortality in NF1 patients compared to the general population. The definitive diagnosis of NF1 in all patients is a strength of our study, and the high rate of death related to malignant transformation is consistent with previous work. The retrospective design and hospital-based recruitment are limitations of our study. Mortality was significantly increased in NF1 patients aged 10 to 40 years and tended to be higher in females than in males.

Background

Neurofibromatosis 1 (NF1; MIM#162200) is an inherited autosomal dominant disorder with an incidence of 1 in 2500-3000 births [1]. NF1 is fully penetrant by 8 years of age. According to the National Institutes of Health (NIH), the diagnosis of NF1 requires at least two of the following seven criteria: six or more café-au-lait spots measuring at least 5 mm in prepubertal patients and 15

mm in postpubertal patients, multiple axillary freckles, two or more neurofibromas (NFs) of any type or one plexiform neurofibroma, Lisch hamartomas, optic pathway glioma, bone dysplasia, and at least one affected first-degree relative [2]. The phenotype of NF1 varies substantially across patients.

The NF1 gene on chromosome 17q11.2 encodes the tumor suppressor protein neurofibromin. Loss of this protein is associated with an increased risk of developing tumors [3]. In a 12-year follow-up study of 70 adult NF1 patients in Sweden, life expectancy was decreased by 15 years compared to the general population, and

* Correspondence: pierre.wolkenstein@hmn.aphp.fr

† Contributed equally

¹AP-HP, Hôpital Henri-Mondor, Service de Dermatologie, F-94010 Créteil, France

Full list of author information is available at the end of the article

malignancy was the main cause of death [4]. A 1986 study in a Danish cohort of 212 patients diagnosed 42 years earlier showed excess mortality with an increase in malignancies in the males but not in the females, compared to the general population [5]. Several clinical features such as internal or subcutaneous NFs have been shown to predict mortality in NF1 patients [6,7]. In a cohort of 448 NF1 patients in the UK, the overall risk of cancer was increased 2.7-fold compared to the general population, and malignant peripheral nerve sheath tumor (MPNST) was the leading cause of death [8]. A proportional mortality study based on death certificate data in the US from 1983 to 1997 demonstrated that NF1 patients were 34 times more likely to have a malignant connective or soft tissue neoplasm listed on their death certificate than individuals without NF1 persons (proportional mortality rate, 34.3; 95% confidence interval [95%CI], 30.8-38) [9]. This study also showed an about 15-year decrease in life expectancy in NF1 patients [9].

Nevertheless, data on mortality in NF1 are limited. Our aim was to evaluate mortality in a large cohort of patients with NF1 seen in France between 1980 and 2006. We computed standardized mortality ratios (SMRs). We evaluated risk factors for death and causes of death.

Patients and Methods

Definitions and study cohort

The study cohort was composed of consecutive patients meeting NIH criteria for NF1 [2] who were referred to the hospital departments of the Paris conurbation that constitute the National French Referral Center for Neurofibromatosis (dermatology departments at the Henri Mondor and Necker-Enfants Malades hospitals and neuropsychiatric department at the Trousseau hospital). We identified NF1 patients referred to these departments between January 1, 1980, and December 31, 2006, in the NF1 Network Database maintained by the National French Hospital Database (PMSI). Data from all sources were linked and compared to eliminate duplications and resolve discrepancies.

The study was approved by the Ile-de-France IX ethics committee, Paris, France. The study complied with Helsinki guidelines.

Data collection

For each patient, age at the beginning of the study period, sex, and clinical features were abstracted from the medical charts and/or database. Detailed information was available on the cardinal dermatological features of NF1 (café-au-lait spots, freckles, Lisch nodules, and cutaneous and plexiform neurofibromas). We also recorded the following features as present or absent:

orthopedic complications (scoliosis and pseudoarthrosis), neurological abnormalities (hydrocephalus and high T2 signal intensity lesions on magnetic resonance imaging of the brain), and renal artery stenosis. We recorded all available data on tumors known to occur frequently in NF1 patients (central nervous systems tumors, MPNSTs, and pheochromocytomas).

Mortality assessment

Our goal was to determine vital status as of December 31, 2006. We first consulted the medical records and network database. Then, we searched the National French Mortality Database (INSERM CépiDC) for information on patients whose place of birth was known; we checked this information by calling the town hall of the place of birth. Finally, we sought to contact patients by phone and mail. Patients whose vital status was still unknown after these three steps were classified as having an unknown vital status (unknownVS group) and other patients as having a known vital status (knownVS group) (Figure 1).

Statistical analysis

Data were double entered and analyzed using STATA software version 11 (Stata Corporation, College Station, TX). Quantitative variables are reported as median (range) and qualitative variables as number (%).

We compared the unknownVS and knownVS groups using univariate analysis (chi-square test, or Fisher exact test where appropriate, and nonparametric Mann-Whitney test). Because age influences the prevalence and number of NF1 features as café-au-lait spots and neurofibromas, we computed age-adjusted odds ratios (aORs) with their 95% confidence intervals (95%CI) separately for each variable. In the knownVS group, we computed the standardized mortality ratio (SMR) as the ratio of observed over expected deaths. SMR values greater than 1 with a CI that does not include 1 indicate excess mortality. The expected number of deaths was obtained by applying the mortality rates in France from 1980 to 2006 (by 5-year age groups and 5-year calendar periods, separately in females and males) to the appropriate person-years in the cohort. We considered the following age groups: younger than 10 years, 10-20 years, 20-40 years, 40-60 years, and 60 years or older. The 95%CI of the SMR was computed assuming a Poisson distribution [10]. The chi-square test of dispersion of the Poisson distribution was calculated. Sensitivity analyses were performed. First, to avoid overestimation of mortality, we computed the SMR for the overall cohort, assuming that patients in the unknownVS group were alive on December 31, 2006. Second, to minimize survivorship bias (bias related to underestimation of mortality in childhood due to patient attrition), we computed the

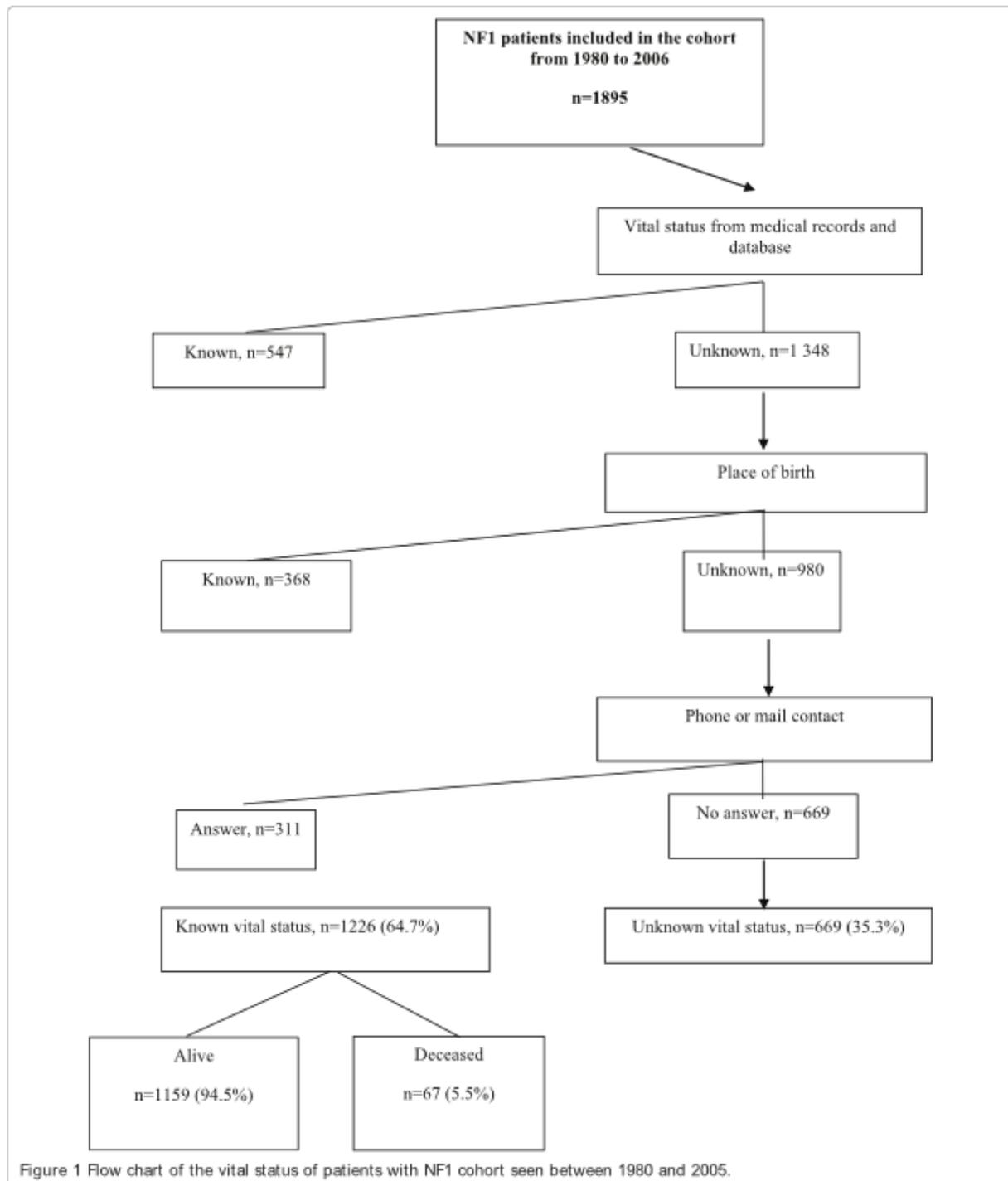


Figure 1 Flow chart of the vital status of patients with NF1 cohort seen between 1980 and 2005.

SMR for patients who were born after January 1, 1980, the beginning of our study period.

Results

Study cohort

Between January 1, 1980, and December 31, 2006, 1895 NF1 patients were seen at the National French Referral Center for Neurofibromatosis. Their median follow-up was 6.8 years [0.4-20.6]. At inclusion, median age was 17.7 [0-76] years, and 549 (44.8%) patients were younger than 18 years (Table 1). At the end of the study period, median age was 25.9 years [2-82].

Vital status was known for 1226 (65%) of the 1895 patients (Figure 1). At last follow-up, patients in the unknownVS group had a median age of 25.4 years [0.2-68] (Table 1). Compared to the unknownVS group, the knownVS group had significantly higher prevalence of freckles (aOR, 1.7; 95%CI, 1.3-2.2) and MPNSTs (aOR, 2.7; 95%CI, 1.6-4.7) (Table 1). The prevalence of optic pathway gliomas was nonsignificantly higher in the knownVS group (OR, 1.3; 95% CI, 0.9-1.7; P = 0.11).

Of the 1226 patients in the knownVS group, 1 159 (94.5%) survived and 67 (5.5%) died.

Causes of death

The median age at death was 31.7 years [0-79.9], and 46.3% of patients who died were males. We did not reported any death from the same family. Compared to

survivors, nonsurvivors had non significantly fewer café-au-lait spots (aOR, 0.6; 95%CI, 0.3-1.1) and significantly more neurofibromas (aOR, 3.1; 95%CI, 1.2-8.4), plexiform neurofibromas (aOR, 1.8; 95%CI, 1.1-3.0), MPNSTs (aOR, 31.2; 95%CI, 17.4-55.9) and pheochromocytomas (aOR, 4.3; 95%CI, 1.1-16.3; Table 2).

The cause of death was known for 58 (86.6%) patients and was related to NF1 in 56 (96.6%) of them. These fatal complications of NF1 included MPNSTs (n = 33, 60%), central nervous system tumors (n = 8, 14%), spinal cord compression by neurofibromas (n = 2, 3%), organ compression by neurofibromas (n = 5, 9%), and pheochromocytomas (n = 2, 3%).

Standardized mortality ratios

Compared to the general population, overall mortality was significantly increased in the NF1 cohort (SMR, 2.02; 95%CI, 1.6-2.6; P < 10⁻⁴). The excess mortality was found in two age groups, 10-20 years (SMR, 5.2; 95%CI, 2.6-9.3; P < 10⁻⁴) and 20-40 years (SMR, 4.1; 95%CI, 2.8-5.8; P < 10⁻⁴; Table 3). Significant excess mortality was observed in both males (SMR, 1.8; 95% CI, 1.2-2.5; P = 0.01) and females (SMR, 2.9; 95%CI: 2.0-4.0; P < 10⁻⁴; Table 4). In the 10-20 year age group, mortality is higher in females (SMR, 12.6; 95%CI, 5.7-23.9) than in males (SMR, 1.8; 95%CI: 0.2-6.4).

Assuming that patients in the unknownVS group were alive at last follow-up did not substantially change the

Table 1 Characteristics of the NF1 patients according to whether their vital status was known or unknown

Clinical features*	KnownVS group n = 1226	UnknownVS group	OR (95%CI) ‡	P value
	No (%)†	No (%)†		
Age, years (n = 1893)	25.9 [2-82]□	25.4 [0.2-68]□	-	0.19
Male gender (n = 1 894)	579 (47)	304 (46)	0.9 (0.8-1.1)	0.57
Familial case (n = 1382)	515 (57)	278 (57)	1.0 (0.8-1.3)	0.95
At least 6 café-au-lait spots (n = 1889)	1 046 (86)	584 (87)	0.9 (0.7-1.2)	0.56
Freckles (n = 1 871)	1 043 (86)	509 (78)	1.7 (1.3-2.2)	<10 ⁻⁴
Neurofibromas (n = 1879)	923 (76)	495 (75)	1.0 (0.8-1.3)	0.87
Plexiform neurofibromas (n = 1865)	361 (30)	175 (27)	1.2 (0.9-1.4)	0.20
Lisch nodules (n = 1463)	382 (40)	204 (40)	1.1 (0.8-1.2)	0.87
Renal artery stenosis (n = 1361)	5 (1)	3 (1)	0.7 (0.2-3.1)	0.70
Scoliosis (n = 1373)	231 (25)	104 (24)	1.1 (0.8-1.4)	0.72
Nonunion (n = 1835)	45 (4)	20 (3)	1.2 (0.7-2.0)	0.57
Hydrocephalus (n = 1827)	32 (3)	23 (4)	0.7 (0.4-1.2)	0.22
OBNI (n = 801)	210 (40)	105 (38)	1.0 (0.7-1.4)	0.96
Optic pathway glioma (n = 1812)	161 (14)	69 (11)	1.3 (0.9-1.7)	0.11
MPNSTs (n = 1842)	80 (7)	16 (3)	2.7 (1.6-4.7)	<10 ⁻⁴
Pheochromocytoma (n = 1836)	13 (1)	7 (1)	1.3 (0.5-3.7)	0.61

Abbreviations: VS, vital status; OR, odds ratio; 95%CI, 95% confidence interval; OBNI, high T2-signal intensity lesions on magnetic resonance imaging of the brain; MPNST, malignant peripheral nerve sheath tumor.

* Values in parentheses are the numbers of patients for whom data were available.

□ Age at the end of the study period in patients whose vital status was known and age at last follow-up in those whose vital status was unknown status

† Percentages may not total 100, because of missing data.

‡ The ORs were adjusted for age.

Data are numbers (%) or median [range].

Table 2 Characteristics of the survivors and nonsurvivors among the 1226 NF1 patients whose vital status was known

Clinical features*	Survivors	Nonsurvivors	OR (95%CI)‡	P value*
	n = 1159 No (%)†	n = 67 No (%)†		
Age, years, median [range]	25.5 [2-74]	31.7 [0-80]	-	0.008
Male gender	548 (47)	31 (46)	1.0 (0.6-1.7)	0.98
Familial case (n = 897)	498 (58)	17 (53)	0.7 (0.3-1.4)	0.62
At least 6 café-au-lait spots (1220)	998 (86)	48 (74)	0.6 (0.3-1.1)	0.07
Freckles (n = 1217)	985 (86)	58 (88)	1.1 (0.5-2.4)	0.74
Neurofibromas (n = 1215)	863 (75)	60 (90)	3.1 (1.2-8.4)	0.02
Plexiform neurofibromas (n = 1209)	333 (29)	28 (42)	1.8 (1.1-3.0)	0.02
Lisch nodules (n = 954)	366 (40)	16 (40)	0.9 (0.5-1.9)	0.89
Renal artery stenosis (n = 601)	5 (1)	0 (0)	-	0.60
Scoliosis (n = 934)	222 (25)	9 (18)	0.6 (0.3-1.3)	0.23
Nonunion (n = 1 194)	43 (4)	2 (3)	0.7 (0.2-3.2)	0.70
Hydrocephalus (n = 1 190)	31 (3)	1 (2)	0.6 (0.1-4.4)	0.60
OENI (n = 526)	202 (40)	8 (30)	0.6 (0.3-1.5)	0.30
Optic pathway glioma (n = 1 172)	151 (13)	11 (17)	1.2 (0.6-2.6)	0.58
MPNST (n = 1198)	44 (4)	36 (55)	31.2 (17.4-55.9)	<10 ⁻⁴
Pheochromocytoma (n = 1193)	10 (1)	3 (5)	4.3 (1.1-16.3)	0.03

Abbreviations: OR, odds ratio; 95%CI, 95% confidence interval; OENI, high T2-signal intensity lesions on magnetic resonance imaging of the brain; MPNST, malignant peripheral nerve sheath tumor.

*Values in parentheses are the numbers of patients for whom data were available.

†Percentages may not total 100, because of missing data.

‡The ORs were adjusted for age.

Data are numbers (%) or median [range].

excess mortality in patients aged 10 to 20 years (SMR, 3.3; 95%CI, 1.6-5.8; $P = 0.01$) or 20 to 40 years (SMR, 2.4; 95%CI, 1.6-3.4; $P = 0.001$). When we confined the analysis to the 633 patients born after January 1, 1980, we found excess mortality in patients aged 10 to 30 years (SMR, 3.9; 95%CI, 2.3-6.3; $P < 10^{-4}$). The excess mortality in this subgroup seemed higher than in the overall cohort.

Discussion

Significant excess mortality was found in our overall cohort and in the subgroups aged 10 to 20 and 20 to 40 years. We did not find excess mortality in the subgroups aged more than 40. It could be related to lack of power due to a very low number of persons over 60. Excess mortality was significant in both females and males; in the 10-20 year age group, excess mortality was significantly higher in the females than in the males. The vast

majority of deaths were due to malignancies and other complications of NF1.

We retrospectively identified consecutive NF1 patients referred to the French National Referral Center for Neurofibromatoses. An important strength of our study is that all patients had a definitive diagnosis of NF1. Furthermore, the overall prevalence of NF1 manifestations in our cohort was consistent with previous reports, [11] indicating that our cohort was representative of the NF1 population. We used multiple sources of information to determine vital status. Nevertheless, vital status was known for only about two-thirds of the patients, which may have resulted in information bias. However, to avoid overestimating mortality, we conducted an analysis assuming that all patients whose vital status was unknown were alive at last follow-up. We again found significant excess mortality among NF1 patients aged 10 to 40 years compared to the general population.

Table 3 Number of deaths (n) and SMRs among the NF1 patients by age group

Age, years	Person- Years	Observed Deaths	Expected Deaths	SMR	95%CI
<10	11 905.5	4	4.2	0.95	0.3-2.4
10 to <20	8875	11	2.1	5.2	2.6-9.3
20 to <40	10 395	31	7.6	4.1	2.8-5.8
40 to <60	3657.5	11	11.6	0.9	0.5-1.7
≥60	480	10	7.7	1.3	0.6-2.4

SMR, standardized mortality ratio (observed deaths/expected deaths); 95%CI, 95% confidence interval.

Table 4 Number of deaths (n) and SMRs among the NF1 patients, by age categories (years), by sex

Age, years	Person-Years	Male				Female				
		Observed Deaths	Expected Deaths	SMR	95%CI	Person-Years	Observed Deaths	Expected Deaths	SMR	95%CI
<10	5569.5	1	1.8	0.6	0.01-3.1	6336	3	1.8	1.7	0.3-4.8
10 to <20	4000	2	1.1	1.8	0.2-6.4	4875	9	0.7	12.6	5.7-23.9
20 to <40	4262.5	19	4.4	4.3	2.6-6.7	6132.5	12	2.6	4.7	2.4-8.2
40 to <60	1272.5	5	5.5	0.9	0.3-2.1	2385	6	4.8	1.3	0.5-2.7
≥60	162.5	4	4.8	0.8	0.2-2.1	317.5	6	2.7	2.3	0.8-4.9

Another limitation of our study is the retrospective design, which may have resulted in survivorship bias with underestimation of mortality due to higher values for both patient attrition and mortality in the older patients. However, when we conducted an analysis confined to patients born after the beginning of our study period, we still found significant excess mortality compared to the general population. Finally, our hospital-based recruitment may have led to a bias toward patients with more severe forms of NF1 and, therefore, to overestimation of the SMR. However, our findings are consistent with previous reports [4,5,9].

Among the 58 patients who died and in whom the cause of death was known, 56 died from NF1 complications, chiefly malignancies (MPNSTs in 60% and cerebral tumors in 14%). Our results are consistent with those of a prospective study of the incidence of cancer in NF1 patients in the UK [8]. In this study, the overall risk of cancer was 2.7 times higher in NF1 patients than in the general population, and increases were found in central nervous system tumors and connective tissue tumors, as well as in breast cancer in women younger than 50 years (standardized incidence ratio, 4; 95%CI, 1.1-10.3). The risk of mortality related to breast cancer was not reported. In our study, we did not assess the prevalence of breast cancer, which was not the reported cause of death in any of the patients. Similarly, in a death certificate study done in the US, NF1 patients were 34 times more likely to have a malignant connective or other soft tissue neoplasm listed on their death certificate than patients without NF1 [9]. The proportionate mortality ratios for malignancies were 6.07 for patients who died between 10 and 19 years of age and 4.93 for those who died between 20 and 29 years of age. Proportionate mortality ratios were also increased for central nervous system tumors and vascular disease. The authors concluded that the impact of NF1 on mortality from malignancies and vascular disease was focused on patients younger than 40 years of age [9]. In our cohort, cardiovascular disease was not reported as a cause of death. Our chart review did not assess cardiovascular morbidity and we also did not estimate the cardiovascular risk in NF1 patients.

In our study, MPNSTs were the leading cause of death (n = 33, 60%). NF1 is widely recognized as a risk factor for MPNSTs, and the lifetime risk of MPNSTs in NF1 patients has been estimated at 8%-13% [1,12]. In an earlier study, we also found that MPNST was the main cause of death and that risk factors for MPNST were the absence of cutaneous neurofibromas, presence of at least two subcutaneous neurofibromas, and facial asymmetry [6]. Further studies confirmed that subcutaneous neurofibromas predicted mortality (OR, 3.6; 95%CI, 1.2-11.3) [7] and that internal plexiform neurofibromas were strongly associated with MPNST (OR, 18.06; 95% CI, 4.55-73.4) [13]. We did not have detailed information on these features in our patients and were therefore unable to assess their potential relationship to mortality. Nonsurvivors had fewer café-au-lait spots than did survivors. Furthermore, excess mortality was confined to patients aged 10 to 40 years. These two variables are among the four used in the NF1 score for predicting internal neurofibromas (age ≤30 years, fewer than six café-au-lait spots, no cutaneous neurofibromas, and two or more subcutaneous neurofibromas) [14]. Internal neurofibromas are strongly associated with MPNSTs [14].

In our study, median age at death was 31.7 years [0-77.9], that is, considerably younger than in previous studies. However, our patients were young, with a median age of 25.9 years at the time of the analysis. In a Japanese death certificate study, mean age at death from neurofibromatosis was 43 years, but NF1 and NF-2 were not clearly separated [15]. In a death certificate study done in the US, mean age at death in NF1 patients was 54.4 years, that is, 15.7 years younger than in the general population [9]. In this study, the authors used multiple-cause mortality files compiled from US death certificates and identified 3770 cases of presumed NF1 among the 32 722 122 deaths recorded from 1983 to 1997 [9].

Mean age at death in our study was lower in females than males, in keeping with an earlier study [5]. We also found that excess mortality was significantly greater in females than in males between 10 and 20 years of age. Sex hormones may affect the NF1 phenotype. Immunostaining

studies identified the progesterone receptor in neurofibromas [16]. Furthermore, orthotopic xenografts of an immortal human NF1-derived Schwann cell line into the sciatic nerves of female mice with severe combined immunodeficiency produced MPNSTs, and tumor cell proliferation was decreased in ovariectomized mice and restored by estrogen or progesterone replacement therapy [17]. Additional experiments by the same group supported a role for estrogen and progesterone on the growth of MPNST obtained by xenografting [18]. Finally, in vitro and in vivo studies on MPNST cell lines or MPNST xenografts showed that tamoxifen inhibited malignant cell growth in an estrogen-receptor-independent manner [1,19].

In conclusion, our evaluation of SMRs indicates significant excess mortality in NF1 patients compared to the general population. Although the retrospective design and hospital-based recruitment are limitations of our study, the predominance of cancer among causes of death is consistent with earlier work. We found that excess mortality was confined to the 10-40 year age group and that females in the 10-20 year age group had significantly greater excess mortality than males. Additional studies following our cohort ageing might accurately assess mortality above 40 years in NF1 patients.

Abbreviations

NF1: Neurofibromatosis 1; NF2: Neurofibromatosis 2; NFs: Neurofibromas; MPNST: Malignant peripheral Nerve sheath tumor; CI: Confident Interval; aOR adjusted Odds Ratio; SMR Standardized mortality ratios

Acknowledgements

We thank « Association Neurofibromatoses et Recklinghausen » and « Ligue française de lutte contre les Neurofibromatoses » for their support for this study. We are grateful Françoise Tailhardat for her help in the collection of the data. The authors are indebted to Inserm CapiDC for their help in the collection of death. The authors are indebted to Antoinette Wolfe for her helpful review of the manuscript.

Author details

¹APHP, Hôpital Henri-Mondor, Service de Dermatologie, F-94010 Créteil, France. ²Université Paris Est, F-94010 Créteil, France. ³APHP, Hôpital Henri-Mondor, Pôle Recherche Clinique-Santé Publique, F-94010 Créteil, France. ⁴APHP, Hôpital Henri-Mondor, Centre de référence des Neurofibromatoses, F-94010 Créteil, F-94010, France. ⁵Université Paris Est, LIC EM4393 (Laboratoire d'Investigation Clinique), F-94010 Créteil, France. ⁶Unité Recherche Clinique, APHP, Hôpital Henri-Mondor, F-94010 Créteil, France. ⁷Université Paris Est, INSERM, Centre d'Investigation Clinique 006, F-94010 Créteil, France. ⁸APHP, Hôpital Necker-Enfants Malades, Service de Dermatologie, Centre de référence des Maladies Génétiques à Expression Cutanée F-75743 Paris, Université Paris-Descartes, France. ⁹APHP, Hôpital Necker-Enfants Malades, Service d'Orthopédie, F-75743 Paris, France. ¹⁰APHP, Hôpital Necker-Enfants Malades, Service de Génétique, F-75743 Paris, France. ¹¹APHP, Hôpital Necker-Enfants Malades, Service de Neurochirurgie, Paris F-75743, France. ¹²APHP, Hôpital Trousseau, Service de Neuropédiatrie, Paris F-75571, France. ¹³Université Pierre et Marie Curie, Paris, France.

Authors' contributions

SBG, PW and LA have made substantial contributions to conception and design. SBG, PW, TAD, SF, CV and ES have made substantial contributions to acquisition of data, or analysis and interpretation of data. SBG, PW, TAD and ES have been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content. All the authors have given final approval of the version submitted for publication.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 10 March 2011 Accepted: 4 May 2011 Published: 4 May 2011

References

- Huson SM, Compston DA, Clark P, Harper PS: A genetic study of von Recklinghausen neurofibromatosis in south east Wales Prevalence, fitness, mutation rate, and effect of parental transmission on severity. *J Med Genet* 1989, 26:704-11.
- National Institutes of Health: Consensus Development Conference Statement: neurofibromatosis. Bethesda, Md., USA, July 13-15, 1987. *Neurofibromatosis* 1988, 1:172-8.
- Shen MH, Harper PS, Upadhyaya M: Molecular genetics of neurofibromatosis type 1 (NF1). *J Med Genet* 1996, 33:2-17.
- Zoller M, Rembeck B, Akesson HO, Angervall L: Life expectancy, mortality and prognostic factors in neurofibromatosis type 1. A twelve-year follow-up of an epidemiological study in Goteborg, Sweden. *Acta Derm Venereol* 1995, 75:136-40.
- Sorensen SAMJ, Nielsen A: Long-term follow-up of von Recklinghausen neurofibromatosis. Survival and malignant neoplasms. *N England J Med* 1986, 17:1010-5.
- Khosrotehrani K, Bastuji-Garin S, Zeller J, Revuz J, Wolkenstein P: Clinical risk factors for mortality in patients with neurofibromatosis 1: a cohort study of 378 patients. *Arch Dermatol* 2003, 139:187-91.
- Khosrotehrani K, Bastuji-Garin S, Riccardi VM, Birch P, Friedman JM, Wolkenstein P: Subcutaneous neurofibromas are associated with mortality in neurofibromatosis 1: a cohort study of 703 patients. *Am J Med Genet A* 2005, 132A:49-53.
- Walker LTD, Easton D, Ponder B, Ponder M, Fraying I, Baralle D: A prospective study of neurofibromatosis type 1 cancer incidence in the UK. *Br J Cancer* 2006, 17:233-8.
- Rasmussen SA, Yang Q, Friedman JM: Mortality in neurofibromatosis 1: an analysis using U.S. death certificates. *Am J Hum Genet* 2001, 68:1110-8.
- Breslow NE, Day NE: Statistical methods in cancer research Volume II—The design and analysis of cohort studies. *IARC Sci Publ* 1987, 82:1-406.
- Friedman JM, Birch PH: Type 1 neurofibromatosis: a descriptive analysis of the disorder in 1,728 patients. *Am J Med Genet* 1997, 70:138-43.
- Evans DG, Baser ME, McLaughran J, Sharif S, Howard E, Moran A: Malignant peripheral nerve sheath tumours in neurofibromatosis 1. *J Med Genet* 2002, 39:311-4.
- Tucker T, Wolkenstein P, Revuz J, Zeller J, Friedman JM: Association between benign and malignant peripheral nerve sheath tumors in NF1. *Neurology* 2005, 65:205-11.
- Sbidian BMP, Valeyrie-Allanore L, Rodriguez D, Hadj-Rabia S, Ferlat S, Lacour JP, Leanoard JC, Taillandier L, Sportich S, Berbis P, Bastuji-Garin S: NF-1Score: a prediction score for internal neurofibromas in neurofibromatosis-1. *J Invest Dermatol* 2010, 130:2173-8.
- Imazumi Y: Mortality of neurofibromatosis in Japan, 1968-1992. *J Dermatol* 1995, 22:191-5.
- Overdiek AWJ, Mayatepek E, Rosenbaum T: Schwann cells from human neurofibromas show increased proliferation rates under the influence of progesterone. *Pediatr Res* 2008, 64:340-3.
- Perrin GQLH, Fishbein L, Thomson SA, Hwang MS, Scarborough MT, Yachnis AT, Wallace MR, Mared TH, Muir D: An orthotopic xenograft model of intraneural NF1 MPNST suggests a potential association

- between steroid hormones and tumor cell proliferation. *Lab Invest* 2007, 87:1092-102.
18. Li HZX, Fishbein L, Kweh F, Campbell-Thompson M, Ferrin GQ, Muir D, Wallace M: Analysis of steroid hormone effects on xenografted human NF1 tumor schwann cells. *Cancer Biol Ther* 2010, 15:758-64.
 19. Byer SJE, Brossier NM, Godfelder-Miller BJ, Turk AN, Carroll AJ, Kappes JC, Zinn KR, Prasain JK, Carroll SL: Tamoxifen inhibits malignant peripheral nerve sheath tumor growth in an estrogen receptor-independent manner. *Neuro Oncol* 2011, 13:28-41.

doi:10.1186/1750-1172-6-18

Cite this article as: Duong et al.: Mortality Associated with Neurofibromatosis 1: A Cohort Study of 1895 Patients in 1980-2006 in France. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2011 6:18.

Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



ANNEXE 2

Sbidian E/Bastuji-Garin S, Valeyrie-Allanore L, Ferkal S, Lefaucheur J-P, Drouet A, Brugière P, Combemale P, Barbarot S, Wolkenstein P. **At-risk phenotype of NF-1 patients: a multicentre case-control study.** *Orphanet Journal of rare diseases*, 2011, 13;6:51.

RESEARCH

Open Access

At-Risk Phenotype of Neurofibromatose-1 Patients: A Multicentre Case-Control Study

Emilie Sbidian^{1,2,3†}, Sylvie Bastuji-Garin^{1,2,4*†}, Laurence Valeyrie-Allanore^{1,3,4}, Salah Ferka^{2,5}, Jean P Lefaucheur^{6,7}, Alain Drouet^{8,11}, Pierre Brugière⁹, Cédric Valette¹⁰, Patrick Combemale^{11,12}, Sébastien Barbarot¹³, Pierre Wolkenstein^{1,3,4} and for NF France Network¹

Abstract

Objectives: To assess associations between subcutaneous neurofibromas (SC-NFs) and internal neurofibromas in patients with neurofibromatosis type 1 (NF-1) and to determine whether the association between SC-NFs and peripheral neuropathy was ascribable to internal neurofibromas.

Patients and methods: Prospective multicentre case-control study. Between 2005 and 2008, 110 NF-1 adults having two or more SC-NFs were individually matched for age, sex and hospital with 110 controls who had no SC-NF. Patients underwent standardized MRI of the spinal cord, nerve roots and sciatic nerves and an electrophysiological study. Analyses used adjusted multinomial logistic regression (ORa) to estimate the risk of the presence of internal neurofibromas or peripheral neuropathies associated with patients presented 2 to 9 SC-NFs, at least 10 SC-NFs as compared to patients without any (referential category).

Results: Cases had a mean age of 41 (\pm 13) years; 85 (80%) had two to nine SC-NFs and 21 (19%) at least ten SC-NFs. SC-NFs were more strongly associated with internal neurofibromas in patients with ten or more SC-NFs than in patients with fewer NF-SCs (e.g., sciatic nerve, aOR = 29.1 [8.5 to 100] vs. 4.3 [2.1 to 9.0]). The association with SC-NFs was stronger for diffuse, intradural, and > 3 cm internal neurofibromas than with other internal neurofibromas. Axonal neuropathy with slowed conduction velocities (SCV) was more strongly associated with having at least ten SC-NFs (aOR = 29.9, 5.5 to 162.3) than with having fewer SC-NFs (aOR = 4.4, 0.9 to 22.0). Bivariate analyses showed that the association between axonal neuropathy with SCV and sciatic neurofibromas was mediated by the association between SC-NFs and sciatic neurofibromas.

Conclusion: The at-risk phenotype of NF-1 patients (i.e. NF-1 patients with SC-NFs) is ascribable to associations linking SC-NFs to internal neurofibromas at risk for malignant transformation and to axonal neuropathies with slowed conduction velocities. Axonal neuropathies with SCV are particularly common in patients with at least ten SC-NFs.

Registration details: ORPHA86301

Introduction

Neurofibromatosis type 1 (NF-1 [MIM 162200]) is a common autosomal dominant disorder associated with increased morbidity and mortality[1]. Neurofibromas are the hallmark of NF1. They are benign tumors that arise from connective tissue of nerve sheaths, especially the

endoneurium. We used the classification proposed by Riccardi which defines four categories of neurofibromas [2]: (i) cutaneous neurofibromas, presenting as an exophytic tumor moving with the skin on examination, (ii) subcutaneous neurofibromas that lie deeper in the skin, do not move with it, are firm to palpation and may be tender (iii) internal or deep neurofibromas may involve any nerve anywhere along its length and are not palpated. They are therefore identified later in their course of growth (iv) plexiform neurofibromas may involve multiple fascicles and branches, and extend into

* Correspondence: sylvie.bastuji-garin@mn.aphp.fr

† Contributed equally

¹Université Paris Est (UPEC), LIC EA4393 (Laboratoire d'Investigation Clinique), F-94010 Créteil, France

Full list of author information is available at the end of the article



surrounding structures. Clinical investigation identifies thickened hypertrophic skin, hyperpigmentation of tissue and subcutaneous tumor [2,3].

Subcutaneous neurofibromas (SC-NFs) were independently associated with mortality among adults with NF-1 in two independent populations from France [4] and North America [5]. The main causes of death were spinal cord compression by internal neurofibromas and malignant peripheral nerve-sheath tumours (MPNSTs) developed from pre-existing internal neurofibromas [4,5]. A recent study demonstrated that having at least two SC-NFs was independently associated with having internal neurofibromas [6]. However, this association needs to be characterised in detail. Furthermore, a strong association between peripheral neuropathy and SC-NFs has been reported [7]. We hypothesized that this association was related to an association between SC-NFs and internal neurofibromas located along the nerve roots.

The primary objective of this prospective matched case-control study was to characterise the association between SC-NFs and internal neurofibromas in patients routinely investigated with magnetic resonance imaging (MRI), the most sensitive method for detecting internal neurofibromas and assessing their features (e.g., type, distribution, location, and size). The secondary objective was to determine whether peripheral neuropathy was associated with having internal neurofibromas along the nerve roots. Peripheral neuropathy was detected using a routine electrophysiological study.

Patients And Methods

Study design

This case-control study was conducted prospectively from February 2005 to December 2008 in three hospital centres in France. For a type 1 error of 0.05, 100 cases and 100 controls provided 90% power for detecting odds ratios (ORs) greater than 3 for factors having a 20% prevalence in the general population of adults with NF-1. We decided to select 110 cases and 110 controls to allow for some patients being excluded secondarily (e.g., because of contraindications to MRI). Controls were matched individually to cases on age (± 3 years), sex, and hospital. The study was approved by the Ile-de-France IX (Paris, France) ethics committee, and all cases and controls gave their informed consent.

Cases

The cases were identified among adults with NF-1 in our NF-network database. They met diagnostic criteria for NF-1 established at the National Institutes of Health Consensus Development Conference ($n = 1\ 099$) [8]. Among patients aged 17 years or older ($n = 748$), we included probands and patients with sporadic disease ($n = 515$) who had at least two SC-NFs ($n = 192$), defined as palpable nodules along peripheral nerves under the skin. We did not include patients having less than two SC-NFs ($n = 259$), pregnant women, and patients with contraindications to MRI (e.g., cardiac pacemaker, ferromagnetic or electronically operated stapedial implant, haemostatic clip, or metallic splinters) ($n = 64$).

Among these 192 potential cases, 110 cases were selected at random for study inclusion.

Controls

For each case, we looked for a control individually matched on age, sex, and centre in the NF-network database. Potential controls were probands or sporadic NF-1 patients who were at least 17 years old and had no SC-NFs and no contraindications to MRI. When we found several controls appropriate for the same case, we selected one at random. Thus, 110 controls were selected.

Data collection

Data, including demographic information (age, sex and body mass index) and clinical features were collected during routine clinical assessments at the neurofibromatosis clinics by one dermatologist at each centre (SF, PC, SB) (Table 1). The skin lesions were described in detail: number of café-au-lait spots, cutaneous neurofibromas (0, 1, 2-9, 10-99, ≥ 100), and SC-NFs (0, 2-9, 10-99, ≥ 100); and count and location of plexiform neurofibromas defined as benign peripheral nerve-sheath tumours involving multiple nerve fascicles or branches

Table 1 Characteristics of adults with at least two subcutaneous neurofibromas (cases) and controls

Clinical features	Cases n = 106	Controls n = 102	p value*
Matching variables			
Female gender	62 (59)	62 (61)	
Age (years)	41 (± 13)	41 (± 14)	
Clinical variables			
Familial case	56 (47)	56 (45)	0.76
No cutaneous neurofibromas	13 (12)	4 (4)	0.03
Plexiform neurofibromas	66 (62)	49 (48)	0.04
Large café-au-lait spots (number)	8.6 (± 4.8)	10.1 (± 10.1)	0.07
No freckles	21 (20)	12 (12)	0.11
Lisch nodules	48 (81)	45 (80)	0.89
Scoliosis	46 (43)	42 (41)	0.75
Headache	38 (36)	41 (40)	0.52
Epilepsy	2 (2)	2 (2)	0.97
Learning disabilities	58 (57)	52 (49)	0.26

*p value obtained using chi-square test or Fisher exact or non-parametric Kruskal-Wallis test as appropriate

Data are numbers (%) or means ± 1 standard deviation

of major peripheral nerves. Most of the plexiform neurofibromas were cutaneous or subcutaneous and were identified clinically. Other items were coded as present or absent. Orthopaedic complications (scoliosis), neurological abnormalities (headache, epilepsy, learning disabilities), and endocrinological disorders (hypertension) were also recorded.

Identification and characterisation of internal neurofibromas

All cases and controls had a standardized MRI study of the spinal cord, nerve roots, and sciatic nerve. MRI was performed using a field strength of 1.5-T. T1- and T2-weighted nonenhanced sequences (coronal plane) including short-tau inversion-recovery (STIR) sequences were acquired using a slice thickness of 4 mm with no gap. The image matrix was 512/256. Three coronal images (cervico-thoracic spine, thoraco-lumbo-sacral spine, and pelvis/thighs) were acquired to characterize the internal neurofibromas. MRI data were reviewed by a senior radiologist (PB) who was unaware of the clinical features. We recorded the presence of internal neurofibromas, their type (along the spinal cord or sciatic nerve roots), their distribution (focal or diffuse), their size (< 3 cm or ≥3 cm), and their location (intradural or extradural).

Electrophysiological study

All cases and controls underwent a standardized electrophysiological study to look for peripheral neuropathy. The investigation included sensory/motor nerve conduction study for the superficial/deep peroneal nerves and the sural/tibial nerves at both lower limbs and for the median and ulnar nerves at one upper limb. The electrophysiological data were reviewed by a senior physiologist (JPL) who was unaware of the clinical features. Patients were classified as having either no neuropathy (normal nerve conduction study) or an axonal distal, sensory-predominant polyneuropathy (characterized by a bilateral and symmetric reduction of sensory nerve action potential amplitude at the lower limbs with less marked abnormalities regarding motor nerve conduction parameters and upper limb results). Among axonal neuropathies, we differentiated those with and without slowed conduction velocities (SCVs). Neuropathies with and without SCVs shared the same presentation in terms of action potential amplitude reduction, but neuropathies with SCVs additionally showed moderate but diffuse decrease of motor nerve conduction velocities, very homogeneously, without any increased temporal dispersion or conduction block. Therefore, we assumed that neuropathies with SCVs were primarily axonal because they did not present any relevant criteria in favour of a demyelinating process [9]. We also determined the presence of proximal/nerve root involvement ("radiculopathy") according to a selective alteration (absence or

prolonged latency) of the F-waves and H-reflexes at the lower limbs.

Statistical analysis

Data were double-keyboarded and analysed using STATA software version 11 (Stata Corporation, College Station, TX, USA). All tests were two-tailed and p values < 0.05 were considered statistically significant. Quantitative variables are reported as mean ± standard deviation (SD) and qualitative variables as number (%).

First, we compared cases and controls using univariate analysis (chi-square test or Fisher exact test as appropriate). Then, logistic regression models were used to estimate ORs adjusted for matching variables (aORs) with their 95% confidence intervals (95% CIs) for each characteristic of internal neurofibromas (spinal cord or sciatic nerve root, intra or extradural, diffuse or focal, size, and size category < 3 cm or ≥3 cm). Similarly, we estimated aORs with their 95% CIs separately for each type of peripheral neuropathy and radiculopathy. Then, to test our hypothesis that the association between SC-NFs and peripheral neuropathy was related to internal neurofibromas along the nerve roots, bivariate analyses including peripheral neuropathies and internal neurofibromas were performed. Finally, to assess whether the number of SC-NFs was associated with internal neurofibromas and/or peripheral neuropathy, cases were classified into two groups based on whether they had two to nine SC-NFs or at least ten SC-NFs. The risk associated with each of these categories versus the controls (no SC-NFs) was estimated using adjusted multinomial logistic regression (aOR). Control patients were the referential category.

Results

Between 2005 and 2008, 110 cases were matched for age, sex, and hospital to 110 NF-1 controls. Four cases and eight controls were excluded secondarily because their MRI scans were not interpretable. Table 1 reports the characteristics of the 106 cases and 102 controls. The cases had a mean age of 41 (± 13) years; 59% were females, 85 (80%) had two to nine SC-NFs and 21 (19%) at least ten SC-NFs. There were no significant differences between cases and controls for age and sex (matching variables) or clinical features (e.g., dermatological characteristics, orthopaedic complications, and neurological abnormalities) except the cutaneous and plexiform neurofibromas. Significantly greater proportions of cases than controls had no cutaneous neurofibromas (p = 0.03) and at least one plexiform neurofibroma (p = 0.04). Cases had fewer large café-au-lait spots compared to controls but the difference was not statistically significant (p = 0.07).

Table 2 summarises the results of the univariate analysis. The presence of SC-NFs was strongly associated

Table 2 Presence of internal neurofibromas in cases and controls

	Cases, n = 106 (%)	Controls, n = 102 (%)	Odds Ratio* (95%CI)	p value**
Paraspinal neurofibromas	54 (51)	20 (20)	4.3 (2.2 - 8.2)	< 10 ⁻⁴
Distribution				
None	52 (49)	82 (81)	1	
Focal	26 (25)	16 (15)	2.6 (1.2 - 5.3)	
Diffuse	28 (26)	4 (4)	14.7 (3.8 - 57.3)	< 10 ⁻⁴
Location				
None	52 (49)	82 (81)	1	
Extradural	37 (35)	17 (16)	3.2 (1.6 - 6.4)	
Intradural	17 (16)	3 (3)	8.8 (2.3 - 33.9)	< 10 ⁻⁴
Size				
None	52 (49)	82 (81)	1	
< 3 cm	30 (28)	14 (14)	3.4 (1.6 - 7.2)	
≥3 cm	24 (23)	6 (5)	6.3 (2.3 - 17.4)	< 10 ⁻⁴
Sciatic neurofibromas	50 (47)	13(13)	6.1 (2.9 - 13.0)	< 10 ⁻⁴
Distribution				
None	63 (60)	90 (88)	1	
Focal	15 (14)	9 (9)	2.7 (1.1 - 6.8)	
Diffuse	28 (26)	3 (3)	15.4 (4.0 - 59.7)	< 10 ⁻⁴
Size				
None	56 (53)	89 (88)	1	
< 3 cm	33 (31)	9 (9)	5.8 (2.5 - 13.8)	
≥3 cm	17 (16)	4 (4)	6.8 (2.1 - 22.2)	< 10 ⁻⁴

* Odds ratio with 95% confidence interval (95% CI) by logistic regression adjusted for matching variables (age, sex, hospital)

**p value from logistic regression

with having paraspinal neurofibromas (aOR, 4.3; 95%CI, 2.2 to 8.2) and sciatic neurofibromas (aOR, 6.1; 95%CI, 2.9 to 13). The associations tended to be stronger for diffuse vs. focal paraspinal neurofibromas, intradural vs. extradural neurofibromas, and internal neurofibromas measuring at least 3 cm vs. less than 3 cm. Similarly, for sciatic neurofibromas, diffuse distribution and tumour size of at least 3 cm showed trends toward stronger associations with SC-NFs than focal distribution and size smaller than 3 cm, respectively. Finally, the presence of axonal neuropathy with SCVs was significantly associated with having SC-NFs (aOR, 7.7; 95%CI, 1.6 to 36.6) (Table 3).

Radiculopathies were not significantly associated with the presence of SC-NFs (Table 3).

The joint analysis identified no interactions between variables associated with the presence of SC-NFs. A strong association was found between the presence of sciatic neurofibromas and that of axonal neuropathy with SCVs (aOR = 22.1; 95% CI, 4.2 to 115.3). In the bivariate analysis including axonal neuropathy with SCVs and sciatic neurofibromas, axonal neuropathy with SCVs was no longer associated with SC-NFs (aOR, 3.0; 95%CI, 0.6 to 15.1; p = 0.18). The association between axonal neuropathy with SCVs and SC-NFs persisted only in the subgroup with sciatic neurofibromas (aOR, 2.00; 95%CI, 1.01 to 4.12; vs. aOR, 0.69; 95%CI, 0.24 to 4.12 in the subgroup without sciatic neurofibromas). Thus, the association between SC-NF and axonal neuropathy with SCVs was due to the presence of internal sciatic neurofibromas.

Table 3 Presence of peripheral neuropathies in cases and controls

	Cases n = 106 (%)	Controls n = 102 (%)	Odds Ratio* (95%CI)	p (chi ²)
Peripheral Neuropathies				
none	85 (80)	94 (92)	1	0.009
axonal	7 (7)	6 (6)	1.3 (0.4 - 4.0)	
axonal with SCVs**	14 (13)	2 (2)	7.7 (1.6 - 36.6)	
Radiculopathies	24 (23)	14 (14)	1.8 (0.9 - 3.8)	0.09

*Odds ratio with 95% confidence interval (95% CI) by logistic regression adjusted for matching variables (age, sex, hospital)

** slowed conduction velocities

In the multinomial logistic regression analysis, patients with at least ten SC-NFs had a significantly higher risk of paraspinal neurofibromas (aOR, 82; 95%CI, 10.4 to 647.9) compared to patients with two to nine SC-NFs (aOR, 2.7; 95%CI, 1.4 to 5.3) (Figure 1). This dose-effect relationship was observed for distribution, location, and size (Figure 1, Table 4). Similar dose-effect relationships were found for sciatic neurofibromas, particularly regarding distribution, location, size (Figure 1, Table 4). Finally, axonal neuropathies with SCVs were more common in patients with at least ten SC-NFs (aOR, 29.9; 95%CI, 5.5 to 162.3) than in patients with two to nine SC-NFs (aOR, 4.4; 95%CI, 0.9 to 22.0) (Figure 1).

Discussion

This study shows that sub-cutaneous neurofibromas were significantly associated with having paraspinal and sciatic neurofibromas detected by routine MRI. The strength of the association tended to be higher when the paraspinal and sciatic neurofibromas were diffuse, intra-dural, and at least 3 cm in diameter. Moreover, paraspinal and sciatic neurofibromas were significantly more common in patients having at least ten SC-NFs than in patients having two to nine SC-NFs. A dose-effect relationship was also found for distribution, location, and size of the internal neurofibromas. Finally, our data indicate that the strong association between SC-NFs and

axonal neuropathy with SCVs is due to the association between SC-NFs and internal neurofibromas.

Neurofibromatosis-1 (NF1) is a common disease with an increased propensity for developing both benign and malignant tumors [10]. NF1 has been reported to be associated with a 15-year decrease in life expectancy [1]. One of the aims of the Réseau NF-France was to identify clinical predictive factors for mortality, in order to better adjust the follow up and propose new treatments for eligible patients. We previously demonstrated in two different NF1 populations, from France [4] and North America [5], that the presence of at least 2 subcutaneous neurofibromas was associated with a higher risk of death. The main causes of death were compression of neighboring organs due to internal neurofibromas, and malignant peripheral nerve-sheath tumours developing from preexisting internal neurofibromas.

The main concern in the long-term clinical management of adults with NF-1 is the identification of patients at high risk for MPNSTs developed from pre-existing internal neurofibromas. At present, no effective treatment is available for MPNST untreatable by surgery. New treatments are usually approved based on proof of efficacy in a controlled trial. When conducting controlled trials, an important consideration is patient selection based on severity of illness. Controlled trials in adults with NF-1 should target patients who have a

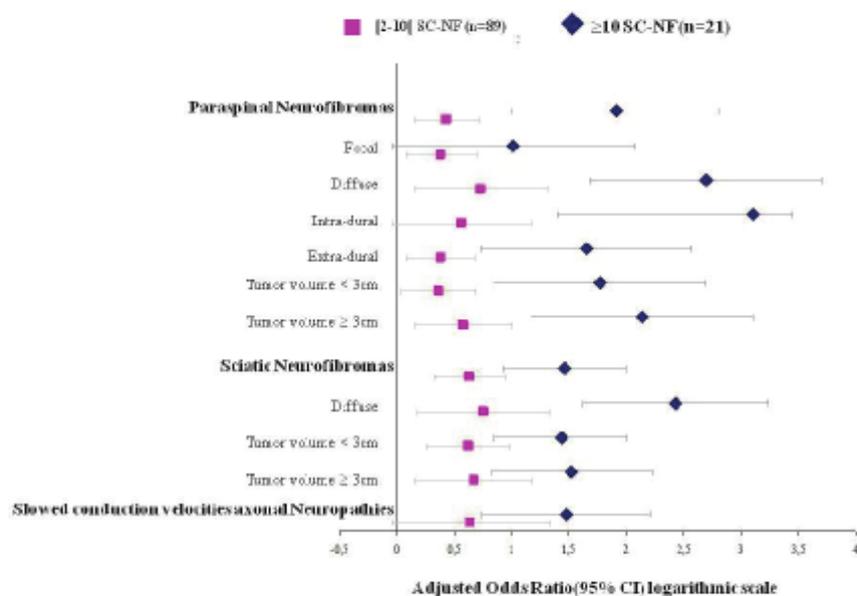


Figure 1 Odds ratios (ORs) with their 95% confidence intervals for several types of internal neurofibromas and peripheral neuropathies in patients with two to nine subcutaneous neurofibromas (SC-NFs) or at least ten SC-NFs. The ORs associated with each type of internal neurofibroma and peripheral neuropathy were estimated using multinomial logistic regression adjusted for the matching variables (age, sex, and centre), using the control group of patients with neurofibromatosis type 1 and no SC-NFs (n = 102) as the reference category. ORs were log-transformed.

Table 4 Association between subcutaneous neurofibromas (SC-NFs) and several types of internal neurofibromas and peripheral neurofibromas

	No SC-NFs (n = 102) Controls	2-9 SC-NFs (n = 85) OR** (95%CI)	≥10 SC-NFs (n = 21) OR** (95%CI)
Paraspinal neurofibromas	1	2.7 (1.4 - 5.3)	82 (10.4 - 647.9)
Distribution			
None	-	1	1
Focal	1	2.4 (1.2 - 5.0)	10.3 (0.9 - 120.0)
Diffuse	1	5.4 (1.4 - 20.4)	492.0 (48.4 - 5006.2)
Location			
None	-	1	1
Intradural	1	3.7 (0.9 - 15.0)	1270.0 (25.6 - 2849.8)
Extradural	1	2.4 (1.2 - 4.8)	45.0 (5.4 - 374.2)
Size			
None	-	1	1
< 3 cm	1	2.3 (1.1 - 4.9)	58.6 (6.9 - 494.0)
≥3 cm	1	3.8 (1.4 - 10.4)	136.7 (14.9 - 1253.9)
Sciatic neurofibromas	1	4.3 (2.1 - 9.0)	29.1 (8.5 - 100.0)
Distribution			
None	-	1	1
Focal	1	2.9 (1.2 - 7.0)	-
Diffuse	1	5.7 (1.5 - 21.7)	266.8 (41.6 - 1712.7)
Size			
None	-	1	1
< 3 cm	1	4.2 (1.8 - 9.8)	27.2 (7.2 - 103.2)
≥3 cm	1	4.7 (1.4 - 15.5)	33.4 (6.6 - 167.6)
Neuropathies with SCV***	1	4.4 (0.9 - 22)	29.9 (5.5 - 162.3)

*Reference category

**Odds ratio with 95% confidence interval (95%CI) by multinomial logistic regression adjusted for matching variables (age, sex, hospital), using the control group of patients with neurofibromatosis type 1 and no SC-NFs (n = 102) as the reference category.

*** Slowed conduction velocities

high-risk phenotype defined by the presence of SC-NF. Patients with a high risk of internal neurofibromas must be therefore identified as potential new therapies are being developed. For instance, there are at least seven phase II/III trials in which the internal neurofibromas are being treated by targeted therapy such as ranibizumab, niltotinib... (clinicaltrials.gov). In addition, we believe that targeted therapy will be of greater efficacy on non-transformed internal neurofibromas. At present time, an annual careful clinical examination is recommended for all patients with NF1 in order to detect clinical symptoms associated with MPNSTs such as pain, neurological deficit and enlargement of a pre-existing peripheral nerve sheath tumour [11]. Routine MRI screening, which is highly reliable for detecting internal neurofibromas, is not recommended in patients without the alarming clinical signs mentioned above [12]. It is therefore critical to precisely clinically identify the patients with the maximum likelihood of having internal neurofibromas and to closely follow them by it iterating MRI. The first step is to assess recognizable clinical features as potential predictors of morbidity and mortality in order to further improve the clinical management of

NF1. We recently developed a clinical score for predicting the presence of internal neurofibromas in adults with NF1. The NF1Score, computed via a linear combination of four variables (age ≤ 30 years, fewer than six café-au-lait spots, no cutaneous neurofibromas, and two or more SC-NFs), can be used to accurately predict the presence of internal neurofibromas in NF-1 patients and help target patients for now emerging clinical trial [6]. The high point scoring of the NF1Score is the presence of SC-NFs. SC-NFs were highly associated with having internal neurofibromas (OR, 4.7; 95%CI, 2.1-10.5) [6]. The second step, our present work, was to confirm and explain a detailed and unbiased characterisation of the links between internal neurofibromas and SC-NFs. To our knowledge, this was the first controlled study involving a detailed characterization of the relationship between SC-NFs, internal neurofibromas, and peripheral neuropathies in adults with NF-1.

The internal validity of this study depends on many factors, including the unbiased recruitment of cases and controls and the accuracy of the information obtained about the presence of internal neurofibromas. MRI, an extremely reliable method for detecting internal

neurofibromas, was performed routinely in all our cases and controls. Assessment bias was minimized by having the MRI data reviewed by senior radiologist (PB) who was unaware of the clinical data. Assessment bias was minimized by having the electrophysiological data reviewed by senior physiologist (JPL) who was unaware of the MRI data. Clinical information regarding the neuropathy was not available. However, according to our experience the diffuse symmetric peripheral neuropathies related to NF-1 are asymptomatic or pauci-symptomatic with minor sensory manifestations [7].

As with all hospital-based case-control studies, selection bias cannot be excluded. However, the prevalence of the various clinical features in the cases were similar to those in the controls (except for the number of cutaneous neurofibromas) and to those reported previously in NF-1 patients, indicating that our study population was representative of NF-1 patients [13]. Regarding the number of cutaneous neurofibromas, the association linking the absence of cutaneous neurofibromas to the presence of SC-NF is in agreement with a previous study showing higher mortality among NF-1 patients who had no cutaneous neurofibromas [4].

In summary, this study shows a strong association between the presence of internal neurofibromas and the presence of SC-NF. The increased risk in NF-1 patients with subcutaneous neurofibromas (high risk phenotype) can be ascribed in part to the associations between SC-NFs and internal neurofibromas (prone to transformation to MPNSTs) and the presence of a neuropathy with SCVs. The prevalence of neuropathy with SCVs is particularly high in patients with at least ten SC-NFs. To better understand the patho-physiological processes in the high risk phenotype of NF-1 patients, the next step would be to perform genotype-phenotype correlation studies. A more severe clinical phenotype has been reported in NF1 patients carrying genomic microdeletions involving NF1 and surrounding gene compare to patients with mutations restricted to the NF1 genes. A recent study confirmed in a large cohort that NF1 microdeletion patients have a significantly higher incidence of learning disabilities and facial dysmorphism than patients with intragenic NF1 mutation [14]. However no association were found between SC-NFs and MPNSTs and NF1 microdeletion patients.

Further studies are therefore needed to find others genes beside NF1 implied in the internal NF development. One of the major aims of such studies would be to identify key targets for novel drugs' development.

List of Abbreviations

aOR adjusted Odds Ratio; CI: Confident Interval; MPNST: Malignant peripheral Nerve sheath tumor; MRI: magnetic resonance imaging; NF-1:

Neurofibromatosis 1; SC-NF(s): Sub-Cutaneous Neurofibroma(s); SCVs: Slow Conduction Velocities; SD: standard deviation

Acknowledgements and funding

Grant from the Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC, AOM05116/P051014), Ministry of Health. We thank the sponsor of the study "le Département de la Recherche Clinique et du Développement" (Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, AP-HP). We thank « Association Neurofibromatoses et Recklinghausen » and « Ligue française de lutte contre les Neurofibromatoses » for them support for this study. We are grateful to Dr Stéphane Finson and Dr Jean Christophe Moreno for undertaking clinical assessments; Dr Pierre Salamand, Dr Florence Caillon, Dr Marie Gatet for providing valuable input in the interpretation of the RMI study; Dr Armelle Magot, Dr Redhi Ahdab, Dr Samar S Ayache, Dr Amine Nineb for undertaking electrophysiological assessments. The authors are indebted to Antoinette Wolfe for her helpful review of the manuscript. We express our gratitude to NF-France Network for its precious collaboration: H. Adamski, C. Baumann-Morel, C. Bellanne, E. Bieth, P. Bousquet, C. Brandt, X. Balguerie, L. Boudali, P. Berbis, P. Castelnaud, Y. Chaix, J. Chevrant-Breton, E. Collet, J.F. Cuny, P. Chastagner, M.L. Chandeclerc, E. Cheuret, P. Cintas, H. Dollfus, C. Derancourt, V. Drouin-Garraud, M. D'Incan, H. De Leersnyder, O. Dereure, D. Doumar, N. Fabre, V. Ferraro, C. Francannet, L. Faivre, F. Fellmann, N. Feugier, D. Gaillard, A. Goldenberg, L. Guyant-Maréchal, JS Guillamo, S. Hadj-Rabia, D. Hamel Teillac, I. Kemlin, JP. Lacour, V. Lathier, JC. Leonard, N. Lesavre, S. Lyonnet, K. Maincent, S. Maradeix, L. Machel, E. Mansat, N. Meyer, M. Mozelle, JC. Moreno, O. Montagne, C. Moret, E. Ruzanet, S. Finson, D. Rodriguez, S. Sportich, J.F. Salder, E. Schweitzer, C. Thalamas, C. Thauvin, L. Tallandier, A. Verloes and J. Zeller.

Author details

¹Université Paris Est (UPEC), LIC EA4393 (Laboratoire d'Investigation Clinique), F-94010 Créteil, France. ²Assistance Publique-Hôpital Paris (AP-HP), Hôpital Henri-Mondor, Pôle Recherche Clinique-Santé Publique, F-94010 Créteil, France. ³Assistance Publique-Hôpital Paris (AP-HP), Hôpital Henri-Mondor, Service de Dermatologie, F-94010 Créteil, France. ⁴Assistance Publique-Hôpital Paris (AP-HP), Hôpital Henri-Mondor, Centre de référence des Neurofibromatoses, F-94010 Créteil, France. ⁵INSERM, Centre d'Investigation Clinique 006, F-94010 Créteil, France. ⁶Assistance Publique-Hôpital Paris (AP-HP), Hôpital Henri-Mondor, Service de Physiologie-Explorations fonctionnelles, F-94010 Créteil, France. ⁷UPEC, EA 4391 (Excitabilité Nerveuse et Thérapeutique), F-94010 Créteil, France. ⁸Service de Neurologie, Hôpital d'Instruction des armées, Lyon, F-69000, France. ⁹Assistance Publique-Hôpital Paris (AP-HP), Hôpital Henri-Mondor, Service de Neuroradiologie, Créteil, F-94010, France. ¹⁰Assistance Publique - Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Henri Mondor, Unité de Recherche Clinique. ¹¹Service de Dermatologie, Centre Léon Bérard, Lyon, F-69000, France. ¹²Réseau NF-Rhône-Alpin, Centre Léon Bérard, Lyon, F-69000, France. ¹³Service de Dermatologie, CHU Hôtel Dieu, Nantes, F-44200, France.

Authors' contributions

PW conceived and designed the study, and is guarantor for the study. SBG contributed to the concept and design, and supervised analysis and interpretation of the data. ES performed the data analyses and wrote the initial draft of the article, to which all the authors contributed. All authors had full access to the data in the study and can take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. All authors have given final approval for the final version to be published. The NF-France network contributed to the patients' inclusion.

Competing interests

ES, SBG, LVA, SF, JPL, AD, FB, PC, SB, PW have non-financial interests that may be relevant to the submitted work.

Received: 28 April 2011 Accepted: 13 July 2011 Published: 13 July 2011

References

1. Reemussen SA, Yang Q, Friedman JM: Mortality in neurofibromatosis 1: an analysis using U.S. death certificates. *Am J Hum Genet* 2001, 68(5):1110-8.
2. Riccardi VM: Neurofibromatosis: phenotype, natural history, and pathogenesis. Johns Hopkins University Press; 1992.

3. Woodruff JM: Pathology of tumors of the peripheral nerve sheath in type 1 neurofibromatosis. *Am J Med Genet* 1999, 26(89):23-30.
4. Khosrotehrani K, Bastuji-Garin S, Zeller J, Revuz J, Wolkenstein P: Clinical risk factors for mortality in patients with neurofibromatosis 1: a cohort study of 378 patients. *Arch Dermatol* 2003, 139(2):187-91.
5. Khosrotehrani K, Bastuji-Garin S, Riccardi VM, Birch P, Friedman JM, Wolkenstein P: Subcutaneous neurofibromas are associated with mortality in neurofibromatosis 1: a cohort study of 703 patients. *Am J Med Genet A* 2005, 132A(1):49-53.
6. Sbidian E, Wolkenstein P, Valeyrie-Allanore L, Rodriguez D, Hadj-Rabia S, Ferkal S, Lacour JP, Leanoard JC, Taillandier L, Sportich S, Barbis P, Bastuji-Garin S: NF-1Score: a prediction score for internal neurofibromas in neurofibromatosis-1. *J Invest Dermatol* 2010, 130(9):2173-8.
7. Drouot A, Wolkenstein P, Lefaucheur JP, Pinson S, Combemale P, Gherardi RK, et al: Neurofibromatosis 1-associated neuropathies: a reappraisal. *Brain* 2004, 127(Pt 9):1993-2009.
8. Neurofibromatosis. Conference statement. National Institutes of Health Consensus Development Conference. *Arch Neurol* 1988, 45(5):575-8.
9. Research criteria for diagnosis of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP). *Neurology* 1991, 41:617-18, Report from an Ad Hoc Subcommittee of the American Academy of Neurology AIDS Task Force.
10. Rasmussen SA, Friedman JM: NF1 gene and neurofibromatosis 1. *Am J Epidemiol* 2000, 151(1):33-40.
11. Valeyrie-Allanore L, Ismaili N, Bastuji-Garin S, Zeller J, Wechsler J, Revuz J, Wolkenstein P: Symptoms associated with malignancy of peripheral nerve sheath tumours: a retrospective study of 69 patients with neurofibromatosis 1. *Br J Dermatol* 2005, 153(1):79-82.
12. Pinson S, Creange A, Barbarot S, Salder JF, Chaix Y, Rodriguez D, Sanson M, Bernheim A, Dincan M, Doz F, Stoll C, Combemale P, Kalfa C, Zeller J, Teillac-Hamel D, Lyonnet S, Zerah M, Jacour JP, Guillot B, Wolkenstein P: Neurofibromatosis 1: recommendations for management. *Ann Dermatol Venerol* 2001, 128(4):567-75.
13. Friedman JM, Birch PH: Type 1 neurofibromatosis: a descriptive analysis of the disorder in 1,728 patients. *Am J Med Genet* 1997, 70(2):138-43.
14. Pasmant EM-PJ, Lévy P, Laurendeau I, Ortonne N, Parfait B, Valeyrie-Allanore L, Leroy K, Wolkenstein P, Vdaud M, Vdaud D, Bèche E: Identification of genes potentially involved in the increased risk of malignancy in NF1-microdeleted patients. *Mol Med* 2011, 17:79-87.

doi:10.1186/1750-1172-6-51

Cite this article as: Sbidian et al: At-Risk Phenotype of Neurofibromatose-1 Patients: A Multicentre Case-Control Study. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2011 6:51.

Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



ANNEXE 3

Sbidian E, Wolkenstein P, Allanore L, Pinson S, Rodriguez D, Hadj-Rabia S, Ferkal S, Lacour JP, Leonard JC, Taillandier L, Sportich S, Berbis P, Bastuji-Garin S, Members of the NF France Network. **NF1Score: A Prediction Score for Internal Neurofibromas in Neurofibromatosis-1.** *J Invest Dermatol* 2010, 130:2173-8.

NF-1Score: A Prediction Score for Internal Neurofibromas in Neurofibromatosis-1

Emilie Sbidian^{1,2}, Pierre Wolkenstein^{1,3,4}, Laurence Valeyrie-Allanore^{1,3,4}, Diana Rodriguez^{4,5,6,7}, Smail Hadj-Rabia^{5,8,9}, Salah Ferkal^{2,10}, Jean-Philippe Lacour¹¹, Jean-Claude Leonard¹², Luc Taillandier¹³, Stéphanie Sportich¹⁴, Philippe Berbis¹⁴ and Sylvie Bastuji-Garin^{1,2,4}, Members of the NF France Network

NF-1 is associated with a 15-year decrease in life expectancy. Internal neurofibromas are associated with increased morbidity and mortality through malignant transformation and compression of neighboring organs. Our purpose was to develop and to validate a clinical score for predicting internal neurofibromas in adults. The development sample comprised 208 patients and the validation sample 191 patients. The score was developed using logistic regression. Discrimination and calibration of the model were evaluated. Four variables were independently associated with internal neurofibromas: at least two subcutaneous neurofibromas (odds ratio (OR) 4.7, [2.1–10.5]), age \geq 30 years (OR 3.1, [1.4–6.8]), absence of cutaneous neurofibromas (OR 2.6, [0.9–7.5]), and fewer than six café-au-lait spots (OR 2.0 [0.9–4.6]). The score computed by linear combination of the rounded coefficients of these four variables ranged from 0 to 40 (mean, 12.8 \pm 10.8). The probability of internal neurofibromas was computed as $\exp(\Delta 2.93 \times 0.11 \text{Score}) / \exp(1 + \Delta 2.93 \times 0.11 \text{Score})$. Probabilities agreed well with the observed frequencies indicating good calibration, and discrimination was adequate (AUC-ROC, 0.75) in both data sets. The presence of internal neurofibromas can be accurately predicted using a simple clinical score. Further work will establish the score threshold that identifies patients at high risk for complications.

JD JOURNAL CLUB ARTICLE For questions, answers, and open discussion about this article, please go to <http://www.nature.com/jid/journalclub>

Journal of Investigative Dermatology (2010) 130, 2173–2178; doi:10.1038/jid.2010.100; published online 29 April 2010

INTRODUCTION

Neurofibromatosis-1 (NF-1 [MIM 162,200]) is a common autosomal dominant disorder that is associated with both morbidity and mortality (Rasmussen et al., 2001). Internal neurofibromas are among the main causes of adverse outcomes (Tucker et al., 2005). These tumors may cause spinal cord compression, and about 10% of them undergo transformation to malignant peripheral nerve-sheath tumors

(MPNSTs), which are among the main causes of death in adults with NF-1 (Rasmussen et al., 2001). Internal neurofibromas arise from the spinal nerve roots and may extend into surrounding structures to involve multiple fascicles and branches. They are generally asymptomatic (Tongard et al., 1998), being identified only upon imaging studies. Accurate data can be obtained using magnetic resonance imaging (MRI), which shows large diffuse paraspinous tumors with high signal intensity on T2-weighted and T2 fat-saturation images contrasting with normal or, more often, low signal intensity on T1-weighted images (Drouet et al., 2004; Mautner et al., 2006). Clinical indicators of malignancy are persistent or increasing pain, enlargement of the tumor, and neurological deficiencies (Valeyrie-Allanore et al., 2005). MPNSTs carry a poor prognosis. Diagnosis is often delayed, as imaging studies are not performed routinely as part of the follow-up of patients with NF-1. Consequently, metastatic spread is common and survival is limited. The main prognostic factor may be tumor size, which governs the chances of curative surgery (Doorn et al., 1995). Therefore, an early diagnosis is a principal objective. As MPNSTs develop from internal neurofibromas, a score predicting the presence of internal neurofibromas might improve the early diagnosis of MPNSTs, as close monitoring could be offered to patients with high-risk score values.

The purpose of this study was to develop a clinical score for predicting the presence of internal neurofibromas in patients with NF-1 and to assess its performance by evaluating discrimination and calibration.

¹Université Paris 12, LIC EA4393 (Laboratoire d'Investigation Clinique), Créteil, France; ²Pôle Recherche Clinique-Santé Publique, AP-HP, Hôpital Henri Mondor, Créteil, France; ³Service de Dermatologie, AP-HP, Hôpital Henri Mondor, Créteil, France; ⁴Centre de Référence des Neurofibromatoses, AP-HP, Hôpital Henri Mondor, Créteil, France; ⁵Réseau NF-Ile-de-France, France; ⁶Service de Neuropédiatrie, AP-HP, Hôpital Armand Trousseau, Paris, France; ⁷UPMC Université Paris 06, Paris, France; ⁸Service de Dermatologie, Centre MAGEC, AP-HP, Hôpital Necker—Enfants Malades, Paris, France; ⁹Faculté de Médecine Paris 5, Paris, France; ¹⁰INSERM, Centre d'Investigation Clinique 006, AP-HP, Hôpital Henri-Mondor, Créteil, France; ¹¹Service de Dermatologie, Hôpital l'Archet 2, Nice, France; ¹²Service de Pédiatrie, Institut Calot, Berck Hôpital Central, Berck, France; ¹³Service de Neurologie, Nancy, France and ¹⁴Service de Dermatologie, Hôpital Nord, Marseille, France

Correspondence: Sylvie Bastuji-Garin, Service de Santé Publique, Hôpital Henri-Mondor, Créteil Cedex 94010, France. E-mail: sylvie.bastuji-garin@mn.aphp.fr

Abbreviations: AUC-ROC, area under the receiver-operating characteristic curve; CI, confidence interval; MPNSTs, malignant peripheral nerve-sheath tumors; MRI, magnetic resonance imaging; NF-1, neurofibromatosis type-1; OR, odds ratio; ROC, receiver-operating characteristic

Received 7 October 2009; revised 16 February 2010; accepted 13 March 2010; published online 29 April 2010

RESULTS

Study populations

The characteristics of the development and validation samples are reported in Table 1. The development sample comprised 208 patients, 122 females (59%), and 86 males with a mean age of 41.10 (± 13) years (range, 20–78). Internal neurofibromas were present in 46 (22%) patients. The validation sample was composed of 191 patients, 108 females (57%), and 83 males with a mean age of 40.3 (± 13) years (range 17–72), of whom 39 (20%) were classified as having internal neurofibromas. There were 304 patients whose internal neurofibroma status was unknown and who therefore were not included in the validation sample; their characteristics were not significantly different from those of the validation sample (data not shown).

Model development

In the univariate analyses, five variables were associated, or nearly associated, with internal neurofibromas: age ≥ 30 years, at least two subcutaneous neurofibromas, fewer than six café-au-lait spots, absence of cutaneous neurofibromas, and absence of freckles (Table 2). No significant interaction was observed between these parameters. Absence of freckles was strongly associated with the other variables and was not independently associated with internal neurofibromas in the multivariate analysis. The four remaining variables

were independently associated with internal neurofibromas (Table 3). Calibration was excellent (Hosmer-Lemeshow statistic ¼2.4; df ¼4; P¼0.66) and discrimination was good (area under the receiver-operating characteristic curve (AUC-ROC)¼0.75; 95% confidence interval (CI), 0.7–0.8). The b-coefficients derived from the four independent predictors were multiplied by 10 and rounded to the nearest integer (Table 3). Loss-of-fit related to the rounded coefficients was negligible (Hosmer-Lemeshow statistic ¼4.5; df ¼7; P4 0.5). Discrimination was similar (AUC-ROC¼0.75; 95% CI, 0.68–0.82). Table 4 shows the sensitivity and the specificity of the different cut-off levels of the score in the development sample. False-positive and false-negative rates can be deducted from sensitivity and specificity (1 – specificity and 1 – sensitivity, respectively). The score was then computed by means of a linear combination of the rounded coefficients: Score¼10 Å(age ≥ 30 years)þ 10 Å(ab- sence of cutaneous neurofibromas)þ 15 Å(X 2 subcutaneous neurofibromas)þ 5 Å(o 6 café-au-lait spots). Each factor was assigned the value 1 if present or 0 if absent. Therefore, the score could range from 0 to 40. The mean score was 12.8 (± 10.8). An equation based on the logistic regression model was developed to convert the score into a probability of having internal neurofibromas in the following manner: exp (Å2.93 þ 0.11*Score)/exp (1 þ (Å2.93 þ 0.11*Score)).

Model assessments

Internal validation. The shrinkage coefficients obtained by bootstrapping methods were similar to those based on the logistic regression model: a⁰¼a* 1.05 and b⁰¼b*0.98.

External validation. The score maintained adequate discrimination and calibration (Hosmer-Lemeshow statistic ¼12.7; df ¼9; P¼0.2; AUC-ROC¼0.73) when it was applied to each member of the validation sample. Table 5 shows the predicted risk of internal neurofibromas for each possible score.

DISCUSSION

Our study shows that easily recognizable clinical features can be used to predict the risk of internal neurofibromas among adults with NF-1. Four factors were independently associated with internal neurofibromas: at least two subcutaneous neurofibromas, absence of cutaneous neurofibromas, fewer than 6 café-au-lait spots, and age ≥ 30 years. The NF-1Score was computed as follows: 10 (age ≥ 30 years)þ 10 (absence of cutaneous neurofibromas)þ 15 (X 2 subcutaneous neurofibromas)þ 5 (o 6 café-au-lait spots). This score had excellent calibration and good discrimination.

Special attention was given to selecting the development sample. Our goal was to select a population of NF-1 patients systematically investigated with MRI, as this method is highly reliable for detecting internal neurofibromas. As part of the case-control study that included the patients in the development sample, the MRI data were reviewed by senior radiologists who were masked to the clinical features, to minimize assessment bias. Furthermore, the prevalence of the various clinical features in the development sample was

Table 1. Characteristics of the patients with NF-1 included in the development (n=208) and validation (n=191) samples

Clinical feature	Development sample n=208	Validation sample n=191
Female gender	122 (59)	108 (57)
Age ≥ 30 years	48 (23)	46 (24)
Familial case	112 (54)	127 (67)
X 2 Subcutaneous neurofibromas	106 (51)	111 (61)
No cutaneous neurofibromas	19 (9)	30 (16)
Plexiform neurofibromas	114 (55)	95 (50)
o 6 Café-au-lait spots	43 (21)	58 (30)
No freckles	39 (19)	31 (16)
Scoliosis	87 (42)	90 (47)
Pseudarthrosis	6 (3)	6 (3)
Headache	79 (38)	77 (40)
Epilepsy	4 (2)	8 (4)
Hydrocephalus	3 (1)	7 (4)
Learning disabilities	109 (52)	98 (51)
Facial asymmetry	20 (10)	13 (7)
Hypertension	17 (8)	23 (12)
Internal neurofibroma	46 (22)	39 (20)

Abbreviation: NF-1, neurofibromatosis-1.
The data are the numbers of patients (%).

Table 2. Univariate analysis in the development sample (n=208) of factors suspected to be associated with internal NFs

	Internal neurofibroma		Odds ratio (95% CI) ¹	P-value ²
	No (n=162)	Yes (n=46)		
Female gender	97 (60)	25 (58)	1.3 (0.6-2.4)	0.502
Age ≥ 30 years	30 (18)	18 (39)	2.8 (1.4-5.9)	0.004 ³
Familial cases	88 (54)	24 (52)	0.9 (0.5-1.8)	0.800
X 2 Subcutaneous neurofibromas	70 (43)	36 (78)	4.7 (2.1-10.6)	o 10 ⁻⁴ ³
No cutaneous NF	9 (6)	10 (22)	4.7 (1.7-12.8)	0.001 ³
Flexiform NF	90 (56)	24 (52)	0.9 (0.5-1.7)	0.684
o 6 Café-au-lait spots	28 (17)	15 (33)	2.3 (1.1-4.9)	0.024 ³
No freckles	26 (16)	13 (28)	2.1 (0.9-4.5)	0.061 ³
Scoliosis	68 (42)	19 (41)	1.0 (0.5-1.9)	0.935
Pseudarthrosis	4 (2)	2 (4)	1.8 (0.3-10.2)	0.502
Headache	59 (36)	20 (43)	1.3 (0.7-2.6)	0.385
Epilepsy	2 (1)	2 (4)	3.6 (0.5-26.9)	0.175
Hydrocephalus	3 (2)	0	0	0.353
Learning disabilities	83 (51)	26 (57)	1.2 (0.6-2.4)	0.527
Facial asymmetry (n=122/78)	12 (10)	5 (6)	0.6 (0.21-1.87)	0.397
Hypertension	13 (8)	4 (9)	1.1 (0.3-3.5)	0.883

Abbreviations: CI, confidence interval; NF, neurofibromatosis.

¹Odds ratios with their 95% CIs were estimated using logistic regression.

²P-value by χ^2 -test or Fisher's exact test, as appropriate.

³Variables yielding P-values less than 0.15 were entered into a multiple logistic regression model.

The data represent the numbers of patients (%).

Table 3. Factors independently associated with internal NFs in the multivariate analysis in the development sample (n=208)

	Odds ratio	95% CI ¹	P-value	b-Coefficient ²	Points
Age ≥ 30 years old	3.1	1.4-6.8	0.006	1.12	10
No cutaneous neurofibromas	2.6	0.9-7.5	0.08	0.95	10
X 2 Subcutaneous neurofibromas	4.7	2.1-10.5	o 10 ^{A4}	1.55	15
o 6 Café-au-lait spots	2.0	0.9-4.6	0.08	0.71	5

Abbreviations: CI, confidence interval; NF, neurofibromatosis.

¹Confidence interval.

²b-Coefficients of the factors independently associated with internal neurofibromas.

consistent with those previously reported in NF-1 patients (Friedman and Birch, 1997), indicating that the development sample was representative of NF-1 patients. A cohort study design is generally used to assess predictors to minimize information bias (Coste et al., 1996). However, NF-1 is a rare disease and routine MRI screening is not recommended in everyday clinical practice (Pinson et al., 2001). By taking the development sample from a case-control study in which all patients underwent MRI, we improved the reliability of internal neurofibroma diagnosis as compared with a cohort study.

The validation sample was composed of patients included in the Réseau NF-France database. Selection bias seems unlikely, as the prevalences of NF-1 features were consistent with those reported previously in other populations of NF-1 patients (Friedman and Birch, 1997). Furthermore, the

features in non-included patients whose internal neurofibroma status was unknown were similar to those in the validation sample. However, absence of routine MRI or computed tomography in the validation sample may constitute a limitation of our study. MRI or computed tomography was performed only when routine imaging studies (chest radiograph and abdominal sonogram) or clinical symptoms suggested the presence of internal neurofibromas. This may have resulted in verification bias. Furthermore, we had no data on the size or location of internal neurofibromas in the validation sample.

To validate the NF-1Score, we used a rigorous procedure involving both internal validation (shrinkage) and external validation. Shrinkage of the regression coefficients (a and b) to correct for over-optimism in the model may help to make

Table 4. Sensitivity and specificity values of the different cut-off levels of the NF-1Score obtained in the development sample

Cut-point	Development sample (n=208) AUC-ROC=0.75	
	Sensitivity (%)	Specificity (%)
X 0	100	0
X 5	91	37
X 10	87	43
X 15	80	53
X 20	50	83
X 25	41	91
X 30	26	98
X 35	11	99
X 40	2	100

Abbreviations: AUC-ROC, area under the receiver-operating characteristic curve; NF-1, neurofibromatosis-1.

Table 5. Probabilities of the presence of internal NFs according to the NF-1Score level in the validation sample (191 patients)

Probability of having internal neurofibromas	NF-1Score	Internal neurofibromas (n=39)		No internal neurofibromas (n=152)	
		Observed	Expected	Observed	Expected
0.051	0	3	2.0	36	37.0
0.083	5	2	1.1	11	11.9
0.133	10	3	1.7	10	11.3
0.207	15	6	11.6	50	44.4
0.308	20	8	8.0	18	18.0
0.430	25	7	9.5	15	12.5
0.561	30	3	5.1	6	4.0
0.684	35	2	4.1	4	1.9
0.787	40	5	5.5	2	1.5

Abbreviation: NF-1, neurofibromatosis-1.

models more transferable (Steyerberg et al., 2004). The results of our internal and external validations in an independent sample indicated satisfactory performance, with good calibration and discrimination. Therefore, from a methodological point of view, this score could be considered as a good prediction tool. Although such probability models cannot be used reliably to predict outcome in individual patients, the information provided by such models using easily recognizable clinical features could be useful for clinical decision-making. For instance, a probability of 0.56 (NF-1Score ¼30) means that approximately 56 out of 100 patients with this score would be expected to have internal neurofibromas. One cannot say whether any specific individual patient will be one of the 56 patients who may have internal neurofibromas or one of the 44 such patients who may have not.

Clinicians often have to discuss whether or not an imaging would be useful. That is, which NF-1 patients need MRI to detect asymptomatic MPNTs. Thus, although MRI is not systematically recommended, faced with a patient with a high NF-1Score value, physicians would be alerted and mandate a radiological follow-up. Whether systematic radiological investigations are required to evaluate the potential risk of MPNTs in this new population at risk remains to be investigated. Furthermore, introduction of new treatment is usually preceded by the demonstration of its effectiveness in a controlled trial. An important aspect of the conduct of such trials is the ability to define and control the severity-of-illness of the patients studied.

In choosing the appropriate "cut-off" score that defines high risk, there is a trade-off between a score that confers high sensitivity or high specificity. A high cut-off score that gave high specificity would lose sensitivity, thereby missing many patients who have internal neurofibromas. However, a low score, with high sensitivity, might select too many patients as high risk, which would be of no practical benefit. Therefore, different thresholds should be defined according to the clinical purpose.

Subcutaneous neurofibromas were independently associated with internal neurofibromas in our study, in keeping with earlier data (Tucker et al., 2005). Furthermore, patients with subcutaneous neurofibromas were at higher risk for mortality in two different NF-1 populations, from France (Khosrotehrani et al., 2003) and North America (Khosrotehrani et al., 2005), respectively. None of the other three factors identified in our study have been reported previously to be associated with internal neurofibromas. However, the association linking absence of cutaneous neurofibromas to internal neurofibromas is in agreement with a previous study in which mortality was higher among NF-1 patients who had no cutaneous neurofibromas (Khosrotehrani et al., 2003). The association between the presence of internal neurofibromas and age younger than 30 years is consistent with a report that most MPNSTs may develop from pre-existing internal neurofibromas, with the risk being highest at about 30 years of age (Evans et al., 2002). Conversely the association between presence of internal neurofibromas and fewer than six café-au-lait spots has never been reported even though four individuals with multiple spinal tumors and no café-au-lait spots but with NF-1 mutation have been identified (Kaufmann et al., 2001). The two features in the score, namely, absence of cutaneous neurofibromas and fewer than six café-au-lait spots, are unusual in NF-1 patients. Presence of at least two neurofibromas of any type and at least six café-au-lait spots are the diagnostic criteria for NF-1. However, all the patients in our study had a definitive diagnosis of NF-1. In patients younger than 30 years, the combination of internal neurofibromas, fewer than six café-au-lait spots, no cutaneous neurofibromas, and at least two subcutaneous neurofibromas constitutes a phenotype that is both distinct from classical NF-1 and particularly severe. Recently, examination of the phenotypic correlations between affected relatives in 750 NF-1 patients from 275 multiplex families collected through the NF-France Network provided evidence that genetic modifiers, unlinked to the NF-1

locus, contribute to the variable expressivity of the disease (Sabbagh et al., 2009). However, biological factors that influence the NF-1 risk of morbidity-mortality are not known.

In sum, we developed a simple scoring system (the NF-1Score) that accurately predicted the presence of internal neurofibromas in patients with NF-1. The NF-1Score could be used to identify NF-1 patients who require particularly close monitoring for internal neurofibromas.

MATERIALS AND METHODS

Population and study samples

Patients meeting the diagnostic criteria for NF-1 established at the National Institutes of Health Consensus Development Conference (Conference statement, 1988) were included prospectively by the French NF network (Réseau NF-France). We used two samples for our study. The development sample, used to develop the prediction score, comprised 208 adults (17 years or older) included in an ongoing prospective multicenter case-control study (begun in 2005) designed to assess whether subcutaneous neurofibromas were associated with several types of internal neurofibromas. All patients in this sample were carefully investigated by MRI to determine with confidence whether internal neurofibromas were present. The validation sample was composed of the 191 NF-1 patients who were prospectively included in the Réseau NF-France database from June 2003 to June 2008, and who met the following criteria: 17 years or older, probands or sporadic disease, known internal neurofibroma status, and non-inclusion in the above-mentioned case-control study (Figure 1). The study was approved by the institutional review boards of Île-de-France IV (Paris, France) and informed consent was obtained from all patients. The study adhered to the Declaration of Helsinki Principles.

Data collection

Demographic information (age and sex) and clinical features recorded in the databases were collected during routine clinical assessments at neurofibromatosis clinics (Table 1). Detailed information was available on the dermatological characteristics: number of café-au-lait spots (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, X 7), number of cutaneous

neurofibromas (0, 1, 2-9, 10-99, X 100), number of subcutaneous neurofibromas (0, 1, 2-9, 10-99, X 100), and number and location of plexiform neurofibromas. Among clinical features, we selected those known to be associated with mortality: absence of cutaneous neurofibromas, facial asymmetry, at least two subcutaneous neurofibromas, and male gender (Khosrotehrani et al., 2003, 2005). We recorded the following features as present or absent: orthopedic complications (scoliosis and pseudarthrosis), neurological abnormalities (headache, epilepsy and learning disabilities), hypertension, and renal artery stenosis.

Classification of patients: identification of internal neurofibromas

All patients in the development sample underwent standardized MRI of the spinal cord and nerve roots using non-contrast-enhanced T1- and T2-weighted sequences (coronal plane) and short-tau inversion-recovery (STIR) sequences. Paraspinal neurofibromas were characterized as diffuse or focal and as ≤ 3 or > 3 cm. Patients were classified as having internal neurofibromas if they had at least one diffuse paraspinal neurofibroma or at least one focal paraspinal neurofibroma measuring at least 3 cm. Patients with neither criterion were classified as not having internal neurofibromas (Drouet et al., 2004; Mautner et al., 2006).

In the validation sample, MRI was not performed routinely (Pinson et al., 2001). MRI or computed tomography is usually recommended when there is evidence of internal neurofibromas on other imaging studies (chest radiograph or abdominal sonogram) or when symptoms such as pain or neurological deficits suggest internal neurofibromas. Patients in the validation sample were classified as having internal neurofibromas when the variable "paraspinal neurofibromas" was coded "yes" in the database and as not having internal neurofibromas when this variable was coded "no". No information was available on the size or location of internal neurofibromas in the validation sample.

Statistical analysis

Data were analyzed using STATA software version 8 (Stata, College Station, TX). All tests were two-tailed and P-values no greater than

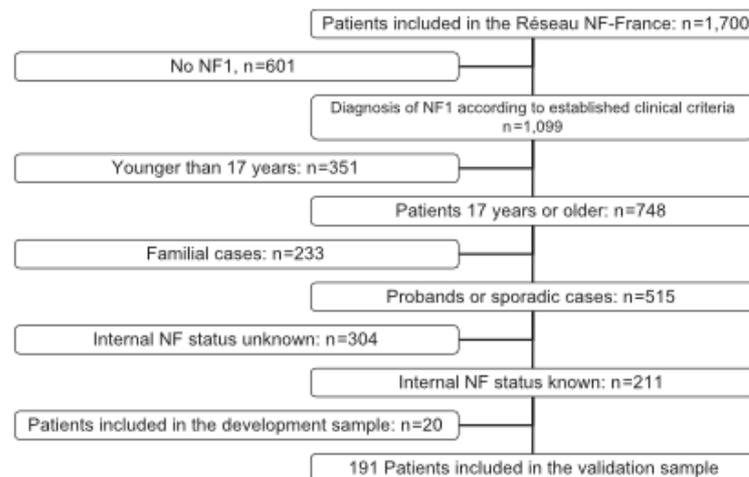


Figure 1. Flow chart of the validation sample.

0.10 were considered for prognostic modeling (Steyerberg et al., 2000). The characteristics of the development and validation samples were described. The characteristics of the patients who were not included in the validation sample because their internal neurofibroma status was unknown, were compared to those of the patients included in the validation sample. Quantitative variables are either reported as median \pm SD or converted to categorical variables. Thus, age was dichotomized according to the peak MPNST incidence in NF-1 patients (< 30 or ≥ 30 years) (Evans et al., 2002). Qualitative variables are reported as number (%).

Model development

The characteristics of patients with and without internal NF were compared in univariate analyses using the χ^2 -test or Fisher's exact test, as appropriate. Odds ratios (ORs) were estimated with their 95% CIs, using logistic regression models. Two-by-two analyses were also performed to assess potential interactions and confounding by fitting multiplicative models. Variables yielding P-values less than 0.15 in the univariate analyses were entered into a multiple logistic regression model. The final model included the variables independently associated with the presence of internal neurofibromas. Performance of the model, including calibration and discrimination, was evaluated by computing the Hosmer-Lemeshow statistic (Hosmer and Lemeshow, 1989) and the AUC-ROC (Hanley and McNeil, 1982), respectively. The Hosmer-Lemeshow test evaluates whether the predicted probabilities agree with the observed probabilities. Discrimination is the ability to distinguish patients with internal neurofibromas from those without internal neurofibromas.

Then, we used the variables identified by the multivariate analysis to build a simple-to-use score for predicting the presence of internal neurofibromas. Points were assigned to each variable on the basis of the regression coefficients in the final model: the b-coefficient was multiplied by 10 and the result was rounded to the nearest integer (Le Gall et al., 1993). We checked whether the predictive performance of these rounded coefficients was similar to that of the original coefficients. The score was calculated for each patient and a multiple logistic regression equation was used to convert the score into a probability of having internal neurofibromas: the logit ($a + b \text{Score}$) was computed and the probability was then estimated as $P = \frac{e^{\text{logit}}}{1 + e^{\text{logit}}}$.

Model assessments

Internal validation. As the development sample comprised only 208 patients, we used bootstrapping to estimate shrinkage coefficients (van Houwelingen and Le Cessie, 1990) to avoid over-optimism (Miller and Hui, 1991; Steyerberg et al., 2004) and to obtain nearly unbiased estimates of the predictive accuracy of the model (Harrell et al., 1996). We drew 1,000 samples at random. The logistic regression coefficients were re-estimated in the bootstrap samples.

External validation. Performance of the model, including calibration and discrimination, was assessed in the validation sample.

CONFLICT OF INTEREST

The authors state no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to Antoinette Wolfe for review of the paper. This work was completed at Hôpital Henri-Mondor (Créteil F-94010, France).

REFERENCES

- Coste J, Wasserman D, Venot A (1996) Predicting mortality in adult burned patients: methodological aspects of the construction and validation of a composite ratio scale. *J Clin Epidemiol* 49:1125-31
- Doom PF, Molenaar WM, Buter J et al. (1995) Malignant peripheral nerve sheath tumors in patients with and without neurofibromatosis. *Eur J Surg Oncol* 21:78-82
- Drouot A, Wolkenstein P, Lefaucheur JP et al. (2004) Neurofibromatosis 1-associated neuropathies: a reappraisal. *Brain* 127:1993-2009
- Evans DG, Baser ME, McGaughran J et al. (2002) Malignant peripheral nerve sheath tumors in neurofibromatosis 1. *J Med Genet* 39:311-4
- Friedman JM, Birch PH (1997) Type 1 neurofibromatosis: a descriptive analysis of the disorder in 1728 patients. *Am J Med Genet A* 70:138-43
- Hanley JA, McNeil BJ (1982) The meaning and the use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Diagn Radiol* 143:29-36
- Harrell FE, Lee KL, Mark DB (1996) Multivariable prognostic models: issues in developing models, evaluating assumptions and adequacy, and measuring and reducing errors. *Stat Med* 15:361-87
- Hosmer DW, Lemeshow S (1989) *Applied Logistic Regression*. New York, NY: John Wiley and Sons Inc.
- Kaufmann D, Müller R, Bartelt B et al. (2001) Spinal neurofibromatosis without café-au-lait macules in two families with null mutations of the NF1 gene. *Am J Hum Genet* 69:1395-400
- Khosrotehrani K, Bastuji-Garin S, Zeller J et al. (2003) Clinical risk factors for mortality in patients with neurofibromatosis 1: a cohort study of 378 patients. *Arch Dermatol* 139:187-91
- Khosrotehrani K, Bastuji-Garin S, Riccardi VM et al. (2005) Subcutaneous neurofibromas are associated with mortality in neurofibromatosis 1: a cohort study of 703 patients. *Am J Med Genet A* 132A:49-53
- Le Gall JR, Lemeshow S, Saulnier F (1993) A new simplified acute physiology score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA* 270:2957-63
- Mautner VF, Hartmann M, Kluwe L et al. (2006) MRI growth patterns of plexiform neurofibromas in patients with neurofibromatosis type 1. *Neuroradiology* 48:160-5
- Miller ME, Hui SL (1991) Validation techniques for logistic regression models. *Stat Med* 10:1213-26
- National Institutes of Health Consensus Development Conference. Conference statement (1988) Neurofibromatosis. *Arch Neurol* 45:575-8
- Pinson S, Créange A, Barbarot S et al. (2001) Neurofibromatose 1: recommandations pour la prise en charge. *Ann Dermatol Venerol* 128:567-75
- Rasmussen SA, Yang Q, Friedman JM (2001) Mortality in neurofibromatosis type 1: an analysis using US death certificates. *Am J Hum Genet* 68:1110-8
- Sabbagh A, Pasmant E, Laurendeau I et al. (2009) Unravelling the genetic basis of variable clinical expression in Neurofibromatosis type 1. *Hum Mol Genet* 18:2768-78
- Steyerberg EW, Borsboom GJ van Houwelingen HC et al. (2004) Validation and updating of predictive logistic regression models: a study on sample size and shrinkage. *Stat Med* 23:2567-86
- Steyerberg EW, Eijkemans M, Harrell FE et al. (2000) Prognostic modeling with logistic regression analysis: a comparison of selection and estimation methods in small data sets. *Stat Med* 19:1059-79
- Tongard JH, Kwak SM, Short MP et al. (1998) CT imaging in adults with neurofibromatosis-1: frequent asymptomatic plexiform lesions. *Neurology* 50:1755-60
- Tucker T, Wolkenstein P, Revuz J et al. (2005) Association between benign and malignant peripheral nerve sheath tumors in NF1. *Neurology* 65:205-11
- Valeyrie-Allanore L, Ismaili N, Bastuji-Garin S et al. (2005) Symptoms associated with malignancy of peripheral nerve sheath tumors: a retrospective study of 69 patients with neurofibromatosis. *Br J Dermatol* 153:79-82
- Van Houwelingen JC, Le Cessie S (1990) Predictive value of statistical models. *Stat Med* 9:1303-25

ANNEXE 4

Sbidian E, Hadj-Rabia S, Riccardi V, Valeyrie-Allanore L, Barbarot S, Chosidow O, Ferkal S, Rodriguez D, Wolkenstein P/Bastuji-Garin S. **Clinical features predicting internal neurofibromas in 357 children with Neurofibromatosis-1: results from a cross-sectional study.** *Orphanet Journal of rare diseases, (sous presse) 2012*

Title page

Clinical characteristics Predicting Internal Neurofibromas in 357 Children with Neurofibromatosis-1: results from a cross-sectional study

Emilie Sbidian, MD,^{1,2,3} Smaïl Hadj-Rabia, MD PhD,⁵ Vincent M. Riccardi, MD PhD,⁶ Laurence Valeyrie-Allanore L, MD,^{1,2,4} Sébastien Barbarot, MD PhD,⁷ Olivier Chosidow, MD PhD,^{2,8} Salah Ferkal, MD,^{4,9} Diana Rodriguez, MD PhD,¹⁰ Pierre Wolkenstein*, MD PhD^{1,2,4} and Sylvie Bastuji-Garin*, MD PhD,^{1,3,4,11} on behalf of the NF France Network

*Sylvie Bastuji-Garin and Pierre Wolkenstein contributed equally to this work

Emilie Sbidian, MD : emilie.sbidian@hmn.aphp.fr^{1,2,3}

Smaïl Hadj-Rabia, MD PhD : hadj@necker.fr⁵

Vincent M. Riccardi, MD PhD: vmriccardi@charter.net⁶

Laurence Valeyrie-Allanore, MD : laurence.allanore@hmn.aphp.fr^{1,2,4}

Sébastien Barbarot, MD PhD : sebastien.barbarot@chu-nantes.fr⁷

Olivier Chosidow, MD PhD : olivier.chosidow@hmn.aphp.fr^{2,8}

Salah Ferkal, MD : salah.ferkal@hmn.aphp.fr^{4,9}

Diana Rodriguez, MD PhD, diana.rodriguez@trs.aphp.fr¹⁰

Pierre Wolkenstein, MD PhD : pierre.wolkenstein@hmn.aphp.fr^{1,2,4}

Sylvie Bastuji-Garin, MD PhD: sylvie.bastuji-garin@hmn.aphp.fr^{1,3,4}

¹Université Paris Est (UPEC), LIC EA4393 (Laboratoire d'Investigation Clinique), F-94010 Créteil, France;

²Assistance Publique-Hôpital Paris (AP-HP), Hôpital Henri-Mondor, Service de Dermatologie, F-94010 Créteil, France;

³Assistance Publique-Hôpital Paris (AP-HP), Hôpital Henri-Mondor, Pôle Recherche Clinique-Santé Publique, F-94010 Créteil, France;

⁴ Assistance Publique-Hôpital Paris (AP-HP), Hôpital Henri-Mondor, Centre de référence des Neurofibromatoses, F-94010 Créteil, France;

⁵Assistance Publique-Hôpital Paris (AP-HP), Hôpital Necker-Enfants malades, Centre de Référence des Maladies Génétiques à Expression Cutanée (MAGEC) et Service de Dermatologie, Université Paris V Descartes, F-75015 Paris, France;

⁶The Neurofibromatosis Institute, La Crescenta, California, USA;

⁷Service de Dermatologie, CHU Hôtel Dieu, Nantes, F-44200, France;

⁸Université Paris Est (UPEC), F-94010 Créteil, France;

⁹INSERM, Centre d'Investigation Clinique 006, F-94010 Créteil, France;

¹⁰ Assistance Publique-Hôpital Paris (AP-HP), Hôpital Trousseau, Service de Neuropédiatrie, Université Pierre et Marie Curie, Paris F-75571, France

¹¹ Assistance Publique-Hôpital Paris (AP-HP), Hôpital Henri-Mondor, Unité de Recherche Clinique (URC), F-94010 Créteil, France;

Corresponding author: Sylvie Bastuji-Garin, Service de Santé Publique, Hôpital Henri-Mondor, 51 avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 94010 Creteil Cedex, France

sylvie.bastuji-garin@hmn.aphp.fr

Tel: +33 149 813 706; Fax: +33 149 813 697

Abstract

Objective. To identify clinical characteristics associated with internal neurofibromas in children with NF1, as a means of ensuring the early identification of patients at high risk for malignant peripheral nerve-sheath tumors developed from preexisting internal neurofibromas.

Patients and methods. We used data from two NF1 populations, in France and North America, respectively. The French database comprised 1083 patients meeting NIH diagnostic criteria for NF1 and the Neurofibromatosis Institute Database of North America comprised 703 patients. Patients younger than 17 years of age were eligible for our study if they had been evaluated for internal neurofibromas using computed tomography and/or magnetic resonance imaging. Clinical characteristics associated with internal neurofibromas by univariate analysis ($P \leq 0.15$) were entered into a multiple logistic regression model after checking for potential interactions and confounding. Multiple imputation was used for missing values.

Results. Among the 746 children in the two databases, 357 (48%) met our inclusion criteria. Their mean age was 7.7 ± 5.0 years and there were 192 (53.8%) males. Internal neurofibromas were present in 35 (9.8%) patients. Internal neurofibromas developed earlier in females than in males and their prevalence increased during adolescence. Factors independently associated with internal neurofibromas were age (OR=1.16 [1.07-1.27]), xanthogranulomas (OR=5.85 [2.18-15.89]) and presence of both subcutaneous and plexiform neurofibromas (OR=6.80 [1.52-30.44]).

Conclusions. Several easily recognizable clinical characteristics indicate a high risk of internal neurofibromas in children with NF1 and, therefore, a need for very close monitoring.

Key Words

Neurofibromatosis 1, Internal neurofibromas, Subcutaneous neurofibromas, Children, Cross-sectional study

Words count

Abstract word count: 232

Manuscript word count (without references): 2444

Number of references: 34

Number of tables: 3

Number of figures: 3

INTRODUCTION

Neurofibromatosis-1 (NF1 [MIM 162200]) is a common autosomal dominant disorder with an incidence of 1 in 2500-3000 births and a prevalence of 1 in 4000 [(15)]. NF1 is associated with increased morbidity and mortality rates (23, 84). In spite of tremendous progress in understanding and treating NF1, there continues to be inconsistency, if not confusion about the various types of neurofibromas. Our interest in this article is to sensitize clinicians to NF1 neurofibromas that are not obvious by inspection and/or palpation of the skin. That is, the focus is on internal neurofibromas. An internal neurofibroma simply is a neurofibroma that is not appreciated by physical examination. Part of the problem is that some neurofibromas that may have internal components may also be apparent externally. In particular, both the large *diffuse plexiform neurofibroma* and the large *nodular plexiform neurofibroma*, as described by Riccardi (47)], corresponding to Masson's *diffuse neurofibroma* and *encapsulated neurofibroma*, respectively, as utilized by Tucker and coworkers (85-86)], can have both external and internal components. In the present article we are reserving the term, internal neurofibroma, for those neurofibromas not having an apparent external component. By definition, both cutaneous neurofibromas and subcutaneous neurofibromas are excluded from being internal neurofibromas. Most specifically, the term, plexiform neurofibroma, does not on its own afford distinction from or inclusion in what we are specifying here as an internal neurofibroma.

Internal neurofibromas are among the main causes of life-threatening events in patients with NF1 (25, 47)]. Ten percent of internal neurofibromas undergo transformation to malignant peripheral nerve-sheath tumors (MPNSTs) (21), a leading cause of death in adults with NF1 (23, 84)]. Clinical indicators of MPNST are persistent or increasing pain, enlargement of the tumor, and neurological deficiencies (27)]. The diagnosis is often delayed, especially for deep diffuse plexiform or internal neurofibromas as imaging studies are not performed routinely as part of the follow-up of patients with NF1 (14)] but instead are ordered only as clinically indicated (31)]. The mean age at diagnosis of MPNST is younger in patients with NF1 than in unaffected individuals (21, 60-62). MPNSTs may develop before 30 years of age (21, 60) and even in childhood (61). Moreover internal neurofibromas grow

faster in young patients (63). In previous work, we developed a simple scoring system (the NF1Score) that accurately predicted the presence of internal neurofibromas at risk for transformation to MPNST in adults with NF1 (87). Four characteristics were independently associated with internal neurofibromas: presence of subcutaneous neurofibromas, fewer than 6 café-au-lait spots, absence of cutaneous neurofibromas, and age ≤ 30 years. However, the NF1Score was developed in patients aged 17 years or older. Consequently, a specific study was needed in pediatric patients. The clinical expression of NF1 varies across the life span in a given patient (31, 59)]. For instance, café-au-lait spots are present within the first year of life and cutaneous or subcutaneous neurofibromas are usually present by adolescence (15-16, 59)].

The purpose of this study was to identify clinical characteristics associated with internal neurofibromas in children with NF1. Such clinical characteristics could serve to ensure the early identification of children with NF1 who require particularly close monitoring for internal neurofibromas.

PATIENTS AND METHODS

Population and study samples

The study was performed using data from two NF1 populations, one in France and the other in North America. Patients meeting the diagnostic criteria for NF1 established at the National Institutes of Health Consensus Development Conference (88)] were included prospectively by the NF-France network (Réseau NF-France) from 2002 to 2005 (83)] and the Neurofibromatosis Institute Database (NFID) from 1977 to 1996 (47)]. The NF-France database was a French Clinical Research Program entitled “Study of expressivity of neurofibromatosis-1: constitution of a phenotype-genotype database” (83)]. The NFID is a collaborative system for collecting demographic information, clinical signs and symptoms, basic measurements, and psychosocial assessments of individuals and families with neurofibromatosis (47)]. The NF-France database included 1083 patients and the NFID 703 patients. For the present study, patients were eligible if they were younger than 17 years of

age and had undergone imaging studies to look for internal neurofibromas because of symptoms such as pain or neurologic deficits or when there was evidence of internal neurofibromas on other imaging studies (Figure 1). In all, 357 children met these criteria.

The study was approved by the Île-de-France IX Ethics committee Paris, France. Informed consent was obtained from all patients. The study adhered to Declaration of Helsinki guidelines.

Data collection

The demographic information (age, sex, and whether the NF1 was familial or sporadic) and clinical characteristics recorded in the databases were collected during routine clinical assessments at neurofibromatosis clinics (Table 1). Among the clinical characteristics, we selected those known to be associated with mortality in children with NF1 (plexiform neurofibromas) or showing trends toward an association with mortality in NF1 patients (subcutaneous neurofibromas, absence of cutaneous neurofibromas, and short stature) (33)]. Special attention was also given to clinical characteristics independently associated with internal neurofibromas in adult NF1 patients, namely, fewer than 6 café-au-lait spots, age ≤ 30 years (a criterion met by all our patients), and subcutaneous and cutaneous neurofibromas (87)]. Most of the other clinical characteristics selected for our study were easily identified by physical examination, with the exception of Lisch nodules, which were evaluated by slit lamp examination. Detailed information was available on the dermatological characteristics, namely, freckles, plexiform neurofibromas, and xanthogranulomas (previous or current diagnosis). We recorded the following characteristics as present or absent: facial asymmetry, orthopedic complications (nonunion, dysplasia), hypertension, and macrocephaly.

Study definitions

Cutaneous neurofibromas are exophytic tumors that move with the skin on examination (47)]. Subcutaneous neurofibromas lie deeper in the skin, do not move with the skin, and are firm and sometimes tender to palpation (47)]. A plexiform neurofibroma is an area of thick

hypertrophic skin with tissue hyperpigmentation overlying a subcutaneous tumor (47)]. Xanthogranulomas are soft, flat, yellow-to-pink papules. Macrocephaly was defined as a head circumference 2 SDs or more above the age- and sex-matched population mean. Short stature was defined as a height 2 SDs or more below the age- and sex-matched population mean.

Classification of patients: identification of internal neurofibromas

All the study patients had been evaluated for internal neurofibromas using computed tomography (CT) and/or magnetic resonance imaging (MRI). The presence of internal neurofibromas was coded 1 in the databases.

Statistical analysis

Quantitative variables are described as mean±standard deviation (SD). Age was not converted to a categorical variable. Qualitative variables are described as number (%). All tests were two-tailed and *P* values <0.05 were considered statistically significant.

The characteristics of patients with and without internal neurofibromas were compared in univariate analyses. Odds ratios (ORs) were estimated with their 95% confidence intervals (95% CIs), using logistic regression models. ORs were adjusted for age because the prevalence of several NF1 characteristics varies with age (number of café-au-lait spots and cutaneous and subcutaneous neurofibromas). Potential interactions were assessed by pairwise analyses and confounding by fitting multiplicative models. Variables yielding *P* values smaller than 0.15 in the univariate analyses were entered into a multiple logistic regression model. The final model included the variables independently associated with the presence of internal neurofibromas.

We first conducted an analysis without the individuals who had missing data (complete-case analysis). We then estimated the missing values for the co-variables independently associated with the internal neurofibromas in the final model, using the multiple-multivariate-imputations-by-chained-equations procedure in STATA (69)], with the

missing-at-random assumption. We used all predictors together to impute the missing data values, and we independently analyzed 10 copies of the data using 10 cycles of regression. Logistic regression for binary variables and multinomial logistic regression for categorical variables with $k > 2$ classes were used to impute missing values.

We conducted all statistical analysis using STATA Statistical Software (version 11.0, StataCorp LP, College Station, TX, USA) and LogXact-8 software (2007, CYTEL Inc. Cambridge, MA, USA).

RESULTS

Study population

Table 1 reports the main characteristics of the 357 children with NF1 included in our study. Mean age was 7.7 (± 5.0) years (range, 0.01-16.9), and there were 192 (53.8%) males. Internal neurofibromas were present in 35 (9.8%) patients. The prevalence of internal neurofibromas increased during adolescence (Figure 2). Internal neurofibromas developed earlier in females than in males (Figures 3).

Characteristics associated with internal neurofibromas

Table 2 compares the clinical characteristics in the patients with and without internal neurofibromas. By univariate analysis, five variables were associated or nearly associated with internal neurofibromas: age (continuous variable), subcutaneous neurofibromas, plexiform neurofibromas, Lisch nodules, and xanthogranulomas.

The presence of Lisch nodules was strongly associated with the other variables and was not independently associated with internal neurofibromas in the multivariate analysis. The study of potential interactions between variables showed an effect modification between plexiform neurofibromas and subcutaneous neurofibromas ($P=0.10$). To facilitate the

interpretation of the model, the usual assessment of interaction effects is done by entering an additional variable composed of the product of the two variables (76)]. So, we replaced the interaction term by a composite variable: no subcutaneous and no plexiform neurofibromas (reference category), either subcutaneous or plexiform neurofibromas, and both subcutaneous and plexiform neurofibromas. We chose these three categories because subcutaneous and plexiform neurofibromas had closely similar OR values by univariate analysis (Table 2).

By multivariate analysis, three characteristics were independently associated with internal neurofibromas: age, presence of xanthogranulomas and presence of both subcutaneous and plexiform neurofibromas (Table 3).

The general pattern of the results after multiple imputation was similar to that obtained in the patient subset with complete data (Table 3). *P* values were smaller for all three variables independently associated with internal neurofibromas. The OR for the presence of subcutaneous or plexiform neurofibromas was similar between the complete-case and imputed models. The bound categories were thinner as the multivariate analysis included all cases after multiple imputation.

DISCUSSION

In this study, we identified easily recognizable clinical characteristics associated with internal neurofibromas in children with NF1. By multivariate analysis, age, xanthogranulomas, and presence of both subcutaneous and plexiform neurofibromas were independently associated with internal neurofibromas.

NF1 has been reported to be associated with a 15-year decrease in life expectancy (23)]. We recently reported overall excess mortality in a cohort of 1895 patients with NF1 compared to the general population in France (84)]. Excess mortality occurred among NF1 patients aged 10 to 20 years (Standard Mortality Ratio, SMR, 5.2; 95%CI, 2.6-9.3; $P < 10^{-4}$) and 20 to 40 years (SMR, 4.1; 95%CI, 2.8-5.8; $P < 10^{-4}$). MPNSTs were the main cause of death (60%) (84). Thus, the main concern in the long-term clinical management of patients

with NF-1 is the identification of patients at high risk for MPNSTs developed from preexisting internal neurofibromas (23)]. Although no effective treatment is available for inoperable MPNSTs, several novel targeted treatments may hold promise [20]. We therefore developed a clinical score, the NF1Score, for predicting the presence of internal neurofibromas in adults with NF1 (87)].

Internal neurofibromas grow faster in young children than in adults (63)]. Volumetric MRI has been used to assess the growth rate of internal neurofibromas in 49 NF1 patients (median age, 8.3 years; range, 3.3-25) with a median follow up of 34 months. The growth rate per year of internal neurofibromas was significantly greater in the younger patients (<8.3 years) than in the older patients (21.1% versus 8.4%, $P=0.001$). In addition, if effective treatments are found, they will be more likely to prevent the growth of internal neurofibromas than to reduce their size (81)]. Therefore, the benefits will probably be greatest if the treatments are given at the time of most rapid internal neurofibroma growth, that is, in childhood or adolescence. Therefore, the risk factors identified in our study will help to improve the clinical management of children with NF1.

Many factors support the internal validity of our study. First, all patients had a definitive diagnosis of NF1. Selection bias seems unlikely, as the prevalence of NF1 characteristics were consistent with those reported previously in other populations of NF1 patients (89-90)]. Our study provided a good external validation as it was performed using two NF1 populations, from France and North America, respectively. However, our patients were recruited at hospitals and may therefore have had greater disease severity compared to the overall NF1 population. An important strength of our study is the accuracy of the information on internal neurofibroma status obtained by using MRI or CT. However, the absence of routine MRI or CT in the study population may constitute a limitation of our study. MRI or CT was performed only when routine imaging studies (chest radiograph and abdominal sonogram) or clinical symptoms suggested the presence of internal neurofibromas. Half our patients did not undergo MRI or CT. This may have resulted in verification bias. Finally, to validate the final model, we used multiple imputation analysis to deal with the missing values. Multiple imputations allow individuals with incomplete data to be included in analyses and improve the validity of the results. The empirical rule of entering only one variable per 10 events in a multivariate analysis model was followed (53)].

Internal neurofibromas were present in 35 (9.8%) patients, in keeping with previous data. In a study of 53 children with NF1 who underwent MRI of the entire spine, 7 (13.2%) patients had internal spinal neurofibromas (80)]. In our study, older age was independently associated with internal neurofibromas. Excess risk of developing internal neurofibromas seems to occur between the adolescence and the age of to 30 in NF1 patients. Moreover internal neurofibromas increased during adolescence and developed earlier in females, in agreement with previous data (82)]. Changes in steroid hormone production may affect the NF1 phenotype. Immunostaining studies have provided support for this hypothesis by identifying the progesterone receptor in neurofibromas (41)]. Estrogen and progesterone increased the growth rate of MPNSTs xenografts in mice (43)]. Plexiform and subcutaneous neurofibromas were also independently associated with internal neurofibromas in our study, in accordance with earlier work in both adults and children (25, 91)]. In the MRI study of the spine in children with NF1, characteristics found more often in patients with than without internal neurofibromas included scoliosis (71.4% vs. 30.4%), subcutaneous neurofibromas (71.4% vs. 39.1%), and plexiform neurofibromas (28.6% vs. 8.7%); none of these differences was statistically significant, ($P=0.08$, $P=0.22$, and $P=0.17$, respectively), possibly because statistical power was limited (80)]. Furthermore, patients with subcutaneous neurofibromas were at higher risk for mortality in two different NF1 populations, from France (34)] and North America (33)], respectively. Finally, xanthogranulomas were independently associated with internal neurofibromas in our study. NF1 children with xanthogranulomas are at increased risk for juvenile chronic myelogenous leukemia (92)]. Although it should be noted that this study included a small number of patients and has not been confirmed since. To our knowledge, xanthogranulomas have not been previously reported to be associated with internal neurofibromas.

In sum, we identified easily recognizable clinical characteristics that were associated with internal neurofibromas in children with NF1. These risk factors could be used to ensure the early identification of NF1 patients who require particularly close monitoring for internal neurofibromas. In the future, this approach may allow the initiation of treatments at the time of fastest growth of internal neurofibromas, when they are most likely to be effective.

List of Abbreviations

aOR: adjusted odds ratio

CI: confidence interval

CT: computed tomography

MPNST: malignant peripheral nerve sheath tumor

MRI: magnetic resonance imaging

NF-1: neurofibromatosis 1

SC-NF(s): subcutaneous neurofibroma(s)

SD: standard deviation

Conflict of interest: SBG, PW, DR, SF, OC, SB, LVA, VMR, SHR, ES have non-financial interests that may be relevant to the submitted work.

Contributors' statement

SBG and PW made substantial contributions to the study conception and design. SBG, PW, SF, SHR, VMR, LVA, ES, DR, and SB made substantial contributions to data acquisition or analysis and to interpretation of the data. ES performed the data analysis under the supervision of SBG. SBG, PW, and ES were involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content. All authors gave final approval of the version submitted for publication

Study Funding: Grant from the Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC, AOM 02 108/P 020906), French Ministry of Health

Acknowledgments

We thank the study sponsor *Département de la Recherche Clinique et du Développement* (Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, AP-HP). We are grateful to the two nonprofit organizations *Association Neurofibromatoses et Recklinghausen* and *Ligue française de lutte contre les Neurofibromatoses* for supporting this study. We are indebted to A. Wolfe MD for her helpful review of the manuscript. We express our gratitude to NF-France Network for its precious collaboration: H. Adamski, C. Baumann-Morel, C. Bellanne, E. Bieth, P. Bousquet, C. Brandt, X. Balguerie, L. Boudali, P. Berbis, P. Castelnau, Y. Chaix, J. Chevrant-Breton, E. Collet, J.F. Cuny, P. Chastagner, M.L. Chandeclerc, E. Cheuret, P. Cintas, H. Dollfus, C. Derancourt, V. Drouin-Garraud, M. D'Incan, H. De Leersnyder, O. Dereure, D. Doumar, N. Fabre, V. Ferraro, C. Francannet, L. Faivre, F. Fellmann, N. Feugier, D. Gaillard, A. Goldenberg, L. Guyant-Maréchal, J.S. Guillamo, S. Hadj-Rabia, D. Hamel Teillac, I. Kemlin, J.P. Lacour, V. Laithier, J.C. Leonard, N. Lesavre, S. Lyonnet, K. Maincent, S. Maradeix, L. Machet, E. Mansat, N. Meyer, M. Mozelle, J.C. Moreno, O. Montagne, C. Moret, E. Puzenat, S. Pinson, D. Rodriguez, S. Sportich, J.F. Stalder, E. Schweitzer, C. Thalamas, C. Thauvin, L. Taillandier, A. Verloes and J. Zeller.

References

1. Huson SM, Compston DA, Clark P, Harper PS. A genetic study of von Recklinghausen neurofibromatosis in south east Wales. I. Prevalence, fitness, mutation rate, and effect of parental transmission on severity. *J Med Genet* 1989;26(11):704-11.
2. Rasmussen SA, Yang Q, Friedman JM. Mortality in neurofibromatosis 1: an analysis using U.S. death certificates. *Am J Hum Genet* 2001;68(5):1110-8.
3. Duong TA, Sbidian E, Valeyrie-Allanore L, Vialette C, Ferkal S, Hadj-Rabia S, et al. Mortality associated with neurofibromatosis 1: a cohort study of 1895 patients in 1980-2006 in France. *Orphanet J Rare Dis* 2011;6:18.
4. Riccardi VM. Neurofibromatosis: phenotype, natural history, and pathogenesis: Johns Hopkins University Press; 1992.
5. Tucker T, Riccardi VM, Brown C, Fee J, Sutcliffe M, Vielkind J, et al. S100B and neurofibromin immunostaining and X-inactivation patterns of laser-microdissected cells indicate a multicellular origin of some NF1-associated neurofibromas. *J Neurosci Res* 2011;89(9):1451-60.
6. Tucker T, Riccardi VM, Sutcliffe M, Vielkind J, Wechsler J, Wolkenstein P, et al. Different patterns of mast cells distinguish diffuse from encapsulated neurofibromas in patients with neurofibromatosis 1. *J Histochem Cytochem* 2011;59(6):584-90.
7. Tucker T, Wolkenstein P, Revuz J, Zeller J, Friedman JM. Association between benign and malignant peripheral nerve sheath tumors in NF1. *Neurology* 2005;65(2):205-11.
8. Evans DG, Baser ME, McGaughan J, Sharif S, Howard E, Moran A. Malignant peripheral nerve sheath tumours in neurofibromatosis 1. *J Med Genet* 2002;39(5):311-4.
9. Valeyrie-Allanore L, Ismaili N, Bastuji-Garin S, Zeller J, Wechsler J, Revuz J, et al. Symptoms associated with malignancy of peripheral nerve sheath tumours: a retrospective study of 69 patients with neurofibromatosis 1. *Br J Dermatol* 2005;153(1):79-82.
10. Pinson S, Creange A, Barbarot S, Stalder JF, Chaix Y, Rodriguez D, et al. [Neurofibromatosis 1: recommendations for management]. *Ann Dermatol Venereol* 2001;128(4):567-75.
11. Gutmann DH, Aylsworth A, Carey JC, Korf B, Marks J, Pyeritz RE, et al. The diagnostic evaluation and multidisciplinary management of neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2. *JAMA* 1997;278(1):51-7.
12. Hagel C, Zils U, Peiper M, Kluwe L, Gotthard S, Friedrich RE, et al. Histopathology and clinical outcome of NF1-associated vs. sporadic malignant peripheral nerve sheath tumors. *J Neurooncol* 2007;82(2):187-92.
13. Friedrich RE, Hartmann M, Mautner VF. Malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNST) in NF1-affected children. *Anticancer Res* 2007;27(4A):1957-60.
14. McCaughan JA, Holloway SM, Davidson R, Lam WW. Further evidence of the increased risk for malignant peripheral nerve sheath tumour from a Scottish cohort of patients with neurofibromatosis type 1. *J Med Genet* 2007;44(7):463-6.
15. Dombi E, Solomon J, Gillespie AJ, Fox E, Balis FM, Patronas N, et al. NF1 plexiform neurofibroma growth rate by volumetric MRI: relationship to age and body weight. *Neurology* 2007;68(9):643-7.

16. Sbidian E, Wolkenstein P, Valeyrie-Allanore L, Rodriguez D, Hadj-Rabia S, Ferkal S, et al. NF-1Score: a prediction score for internal neurofibromas in neurofibromatosis-1. *J Invest Dermatol* 2010;130(9):2173-8.
17. Duong TA, Bastuji-Garin S, Valeyrie-Allanore L, Sbidian E, Ferkal S, Wolkenstein P. Evolving pattern with age of cutaneous signs in neurofibromatosis type 1: a cross-sectional study of 728 patients. *Dermatology* 2011;222(3):269-73.
18. Wolkenstein P, Freche B, Zeller J, Revuz J. Usefulness of screening investigations in neurofibromatosis type 1. A study of 152 patients. *Arch Dermatol* 1996;132(11):1333-6.
19. Neurofibromatosis. Conference statement. National Institutes of Health Consensus Development Conference. *Arch Neurol* 1988;45(5):575-8.
20. Sabbagh A, Pasmant E, Laurendeau I, Parfait B, Barbarot S, Guillot B, et al. Unravelling the genetic basis of variable clinical expression in neurofibromatosis 1. *Hum Mol Genet* 2009;18(15):2768-78.
21. Khosrotehrani K, Bastuji-Garin S, Riccardi VM, Birch P, Friedman JM, Wolkenstein P. Subcutaneous neurofibromas are associated with mortality in neurofibromatosis 1: a cohort study of 703 patients. *Am J Med Genet A* 2005;132A(1):49-53.
22. Sterne JA, White IR, Carlin JB, Spratt M, Royston P, Kenward MG, et al. Multiple imputation for missing data in epidemiological and clinical research: potential and pitfalls. *BMJ* 2009;338:b2393.
23. Schumacker RE MG. Interaction and Non-linear effects in structural Equation; 1998.
24. Kim A, Gillespie A, Dombi E, Goodwin A, Goodspeed W, Fox E, et al. Characteristics of children enrolled in treatment trials for NF1-related plexiform neurofibromas. *Neurology* 2009;73(16):1273-9.
25. DeBella K, Szudek J, Friedman JM. Use of the national institutes of health criteria for diagnosis of neurofibromatosis 1 in children. *Pediatrics* 2000;105(3 Pt 1):608-14.
26. Cnossen MH, de Goede-Bolder A, van den Broek KM, Waasdorp CM, Oranje AP, Stroink H, et al. A prospective 10 year follow up study of patients with neurofibromatosis type 1. *Arch Dis Child* 1998;78(5):408-12.
27. Harrell FE, Jr., Lee KL, Mark DB. Multivariable prognostic models: issues in developing models, evaluating assumptions and adequacy, and measuring and reducing errors. *Stat Med* 1996;15(4):361-87.
28. Khong PL, Goh WH, Wong VC, Fung CW, Ooi GC. MR imaging of spinal tumors in children with neurofibromatosis 1. *AJR Am J Roentgenol* 2003;180(2):413-7.
29. Tucker T, Friedman JM, Friedrich RE, Wenzel R, Funsterer C, Mautner VF. Longitudinal study of neurofibromatosis 1 associated plexiform neurofibromas. *J Med Genet* 2009;46(2):81-5.
30. Overdiek A, Winner U, Mayatepek E, Rosenbaum T. Schwann cells from human neurofibromas show increased proliferation rates under the influence of progesterone. *Pediatr Res* 2008;64(1):40-3.
31. Li H, Zhang X, Fishbein L, Kweh F, Campbell-Thompson M, Perrin GQ, et al. Analysis of steroid hormone effects on xenografted human NF1 tumor schwann cells. *Cancer Biol Ther* 2010;10(8):758-64.
32. Sbidian E, Bastuji-Garin S, Valeyrie-Allanore L, Ferkal S, Lefaucheur JP, Drouet A, et al. At-Risk Phenotype of Neurofibromatose-1 Patients: A Multicentre Case-Control Study. *Orphanet J Rare Dis* 2011;6(1):51.

33. Khosrotehrani K, Bastuji-Garin S, Zeller J, Revuz J, Wolkenstein P. Clinical risk factors for mortality in patients with neurofibromatosis 1: a cohort study of 378 patients. *Arch Dermatol* 2003;139(2):187-91.
34. Zvulunov A, Barak Y, Metzker A. Juvenile xanthogranuloma, neurofibromatosis, and juvenile chronic myelogenous leukemia. World statistical analysis. *Arch Dermatol* 1995;131(8):904-8.

Table 1. General characteristics of the 357 children with neurofibromatosis-1 included in the study. The data are number (%) unless otherwise specified.

Clinical characteristics (n=missing data)	n (%)
Male gender	192 (53.8)
Age at the first visit in years, mean±SD (range)	7.7±5.0 (0.01-16.9)
Familial case	183 (51.3)
Internal neurofibromas	35 (9.8)
Subcutaneous neurofibromas (n=17)	72 (20.2)
Cutaneous neurofibromas	153 (42.9)
Plexiform neurofibromas (n=184)	83 (23.3)
Café-au-lait spots	354 (99.2)
Freckles (n=11)	219 (61.3)
Lisch nodules (n=84)	160 (44.8)
Xanthogranulomas (n=68)	14 (3.9)
Short stature (n=32)	36 (10.1)
Macrocephaly (n=21)	85 (23.8)
Nonunion	13 (3.6)
Dysplasia (n=8)	31 (8.7)
Facial asymmetry (n=72)	23 (6.4)
Hypertension (n=28)	3 (0.8)

Table 2: Univariate analysis of selected characteristics for associations with the presence of internal neurofibromas in 357 children with neurofibromatosis-1

	Internal neurofibromas		Odds Ratio (95%CI)†	P value‡
	No n=322	Yes n=35		
Male gender	148 (46)	16 (46)	1.01 (0.49-2.07)	0.977
Age (years)	7.35 ± 4.87	10.67 ± 4.81	1.14* (1.07-1.23)	<10⁻⁴
Familial cases	166 (51)	17 (49)	0.61 (0.29-1.27)	0.184
Subcutaneous neurofibromas (n=305/35)	53 (17)	19 (54)	4.51 (2.13-9.55)	<10⁻⁴
Cutaneous neurofibromas	139 (43)	14 (40)	0.78 (0.37-1.64)	0.512
Plexiform neurofibromas (n=140/33)	60 (43)	19 (70)	3.60 (1.55-8.34)	0.003
Café-au-lait spots	319 (99)	35 (100)	0.81 (0.04 - ∞)	1.000
Freckles (n=312/34)	194 (56)	13 (28)	1.09 (0.47-2.52)	0.840
Lisch nodules (n=250/23)	151 (60)	9 (39)	0.35 (0.14–0.86)	0.05
Xanthogranulomas (n=257/32)	10 (4)	4 (13)	6.60 (1.69-25.74)	0.007
Short stature (n=293/32)	32 (11)	4 (13)	1.00 (0.32-3.13)	0.996
Macrocephaly (n=302/34)	12 (35)	73 (24)	1.65 (0.76-3.54)	0.203
Nonunion	1 (3)	12 (4)	1.8 (0.3-10.2)	0.684
Dysplasia (=314/35)	27 (9)	4 (11)	1.06 (0.34-3.35)	0.914
Facial asymmetry (n=261/24)	20 (8)	3 (12)	1.23 (0.45-6.93)	0.419
Hypertension (n=298/31)	2 (1)	1 (3)	5.41 (0.40-73.93)	0.205

†Odds ratio with 95% confidence interval (95% CI) by logistic regression adjusted for age;

*OR with 95%CI giving the risk increase for a 1-year increase in age; ‡ P value by logistic regression, Data are numbers (%) or means±1 standard deviation.

Table 3: Characteristics independently associated with internal neurofibromas in the multivariate analysis on complete cases (n=184) and after multiple imputation (n=357).

	Complete-case analysis ^a , n=184			Imputed data ^b , n=357		
	Odds Ratios	95% CI [†]	<i>P</i> value [‡]	Odds Ratios	95% CI [*]	<i>P</i> value ^{**}
Age	1.12^x	1.02-1.23	0.012	1.16^x	1.07-1.27	0.001
Subcutaneous/plexiform NFs						
- None	1	-	-	1	-	-
- Either subcutaneous or plexiform NFs	1.15	0.42-3.15	0.781	1.06	0.40-2.80	0.901
- Both subcutaneous and plexiform NFs	4.95	1.80-13.64	0.002	5.89	2.18-15.89	<10 ⁻⁴
Xanthogranuloma	4.51	0.94-21.73	0.06	6.80	1.52-30.44	0.012

^aExcluding individuals with missing values

^bMissing data imputed using imputation with chain equations

[†]Odds ratio with 95% confidence interval (95% CI) by logistic regression

[‡]*P* value by logistic regression

^xOR with 95% CI giving the risk increase for a 1-year increase in age

^{*}Odds ratio with 95% confidence interval (95% CI) by logistic regression with multiple imputation

^{**}*P* value by logistic regression with multiple imputation

NF, neurofibroma

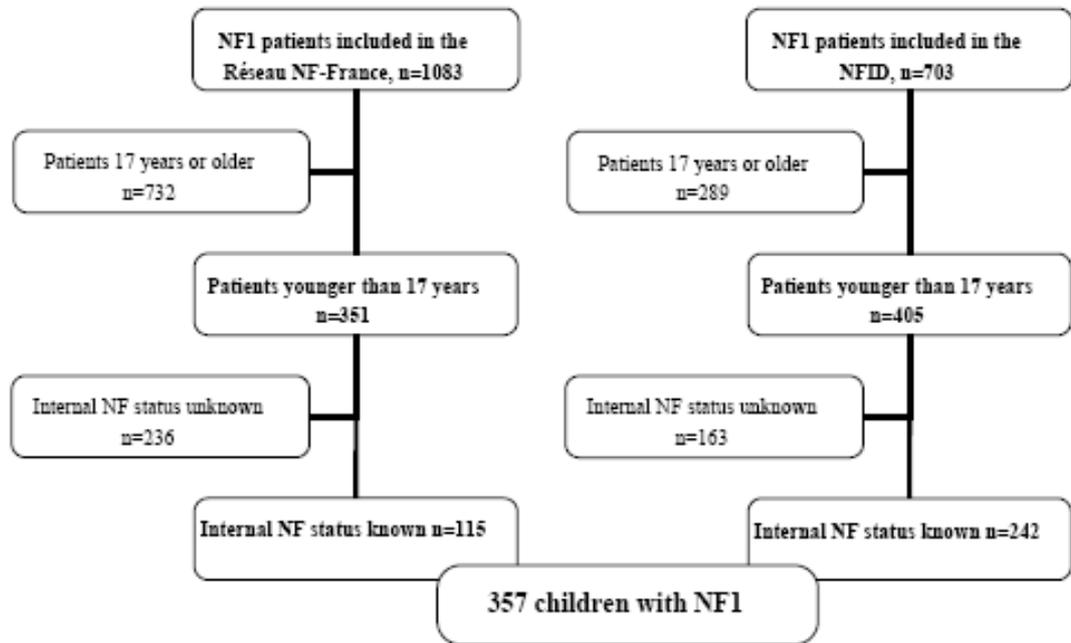
Figure Legends

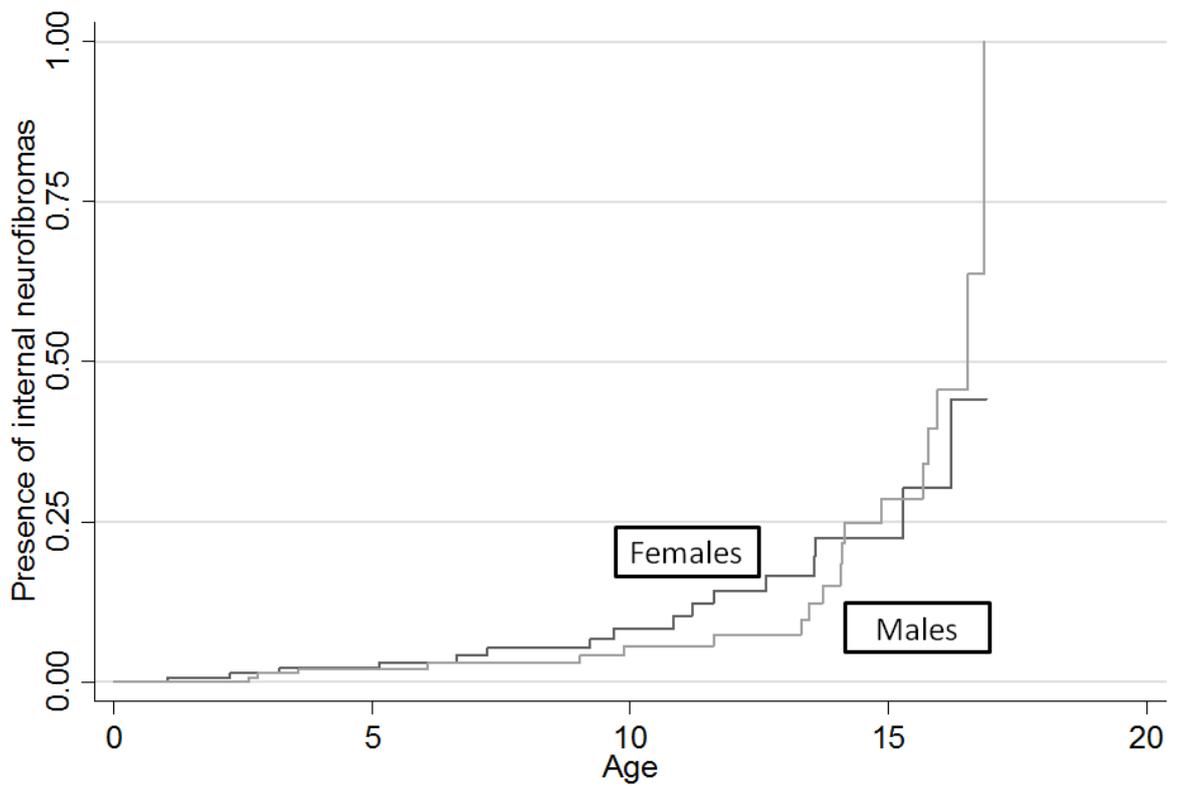
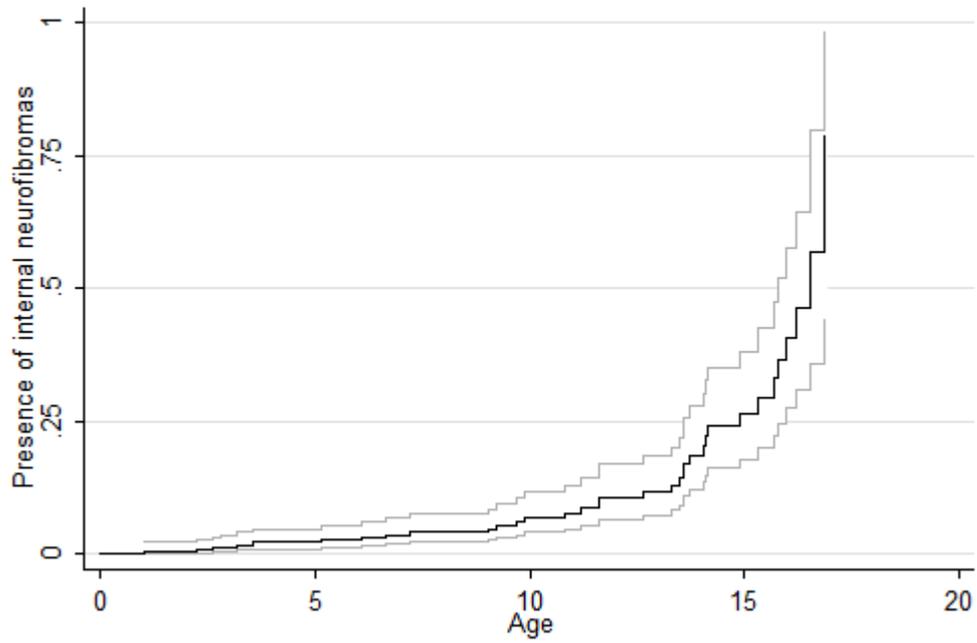
Figure 1. Flow chart

Figure 2. Probability of having internal neurofibromas with the 95% Confidence Interval

Figure 3. Probability of having internal neurofibromas stratified by sex (females black line and males grey line)

Figure 1





ANNEXE 5

Cahier d'observation « *Analyse de la mortalité au cours de la Neurofibromatose 1*
Cohortehistorique française de 1895 patients »

Identité Patient

Numéro du patient : Cohorte I__I__I__I
Site : Necker Trousseau Henri Mondor
NIP :
NDA :
Nom
Prénom
Date de naissance : I__I__I / I__I__I / I__I__I__I (jour / mois / année)
Sexe : Féminin Masculin
Décédé : Oui Non Date de décès : I__I__I / I__I__I / I__I__I__I
Lieu de naissance : CP : I__I__I__I

Information patient

Médecin Responsable :
Autre Médecin :
Adresse :
.....
Ville : Code Postal : I__I__I__I
Téléphone 1: Téléphone 2 :
Date de la première visite : I__I__I / I__I__I / I__I__I__I
Date de la dernière visite : I__I__I / I__I__I / I__I__I__I
Forme Familiale : Oui Non

Critères de diagnostics NF1

Plus de 6 taches café au lait significative Oui Non
Deux neurofibromes ou plus de n'importe quel type
ou un neurofibrome plexiforme Oui Non
Ephélides" axillaires ou inguinales. Oui Non
Gliome des voies optiques Oui Non
Deux nodules de Lisch ou plus Oui Non
Une lésion osseuse caractéristique Oui Non
Un parent du premier degré atteint de NF1 Oui Non

Complications

Neurofibrome(s) plexiforme(s) Oui Non
Nombre : I__I__I
Localisations : Tronc.. Tête Membres
Gliome des voies optiques : Non Symptomatique Asymptomatique
Objets brillants non identifiés à l'IRM : Oui Non
Scoliose nécessitant chirurgie : Oui Non
Difficultés d'apprentissage : Oui Non
Hydrocéphalie : Oui Non
Tumeurs malignes des gaines nerveuses : Oui Non
Phéochromocytome : Oui Non
Sténose de l'artère rénale : Oui Non