



**HAL**  
open science

# Au delà des frontières du glioblastome : caractérisation de la zone péri-tumorale des glioblastomes

Jean-Michel Lemée

► **To cite this version:**

Jean-Michel Lemée. Au delà des frontières du glioblastome : caractérisation de la zone péri-tumorale des glioblastomes. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2015. Français. NNT : 2015ANGE0001 . tel-01149582

**HAL Id: tel-01149582**

**<https://theses.hal.science/tel-01149582>**

Submitted on 7 May 2015

**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.

# Thèse de Doctorat

Jean-Michel LEMÉE

Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
**grade de Docteur de l'Université d'Angers**  
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans

École doctorale : *Biologie-Santé*

Discipline : *Neurosciences, section CNU 69*

Unité de recherche :

- Département de Neurochirurgie, CHU d'Angers
- INSERM U1066 MINT

Soutenue le 26 Février 2015

Thèse N° : 1467

## Au-delà des frontières du glioblastome

### Caractérisation de la zone péritumorale des glioblastomes

#### JURY

**Rapporteurs :** François DUCRAY  
Hugues LOISEAU

**Examineurs :** Anne CLAVREUL  
François DUCRAY  
Emmanuel GARCION  
Hugues LOISEAU  
Philippe MENEI  
Jean MOSSER

**Invitée :** Audrey ROUSSEAU

**Directeur de Thèse :** Philippe MENEI

**Co-encadrante :** Anne CLAVREUL

Praticien hospitalier - HDR, Université de Lyon  
Professeur des Universités - Praticien hospitalier - HDR, Université de Bordeaux

Ingénieur hospitalier, CHU d'Angers - INSERM  
Praticien hospitalier - HDR, Université de Lyon  
Chargé de recherche - HDR, INSERM - Université d'Angers  
Professeur des Universités – Praticien hospitalier - HDR, Université de Bordeaux  
Professeur des Universités – Praticien hospitalier - HDR, Université d'Angers  
Professeur des Universités – Praticien hospitalier - HDR, Université de Rennes

Professeur des Universités – Praticien hospitalier - HDR, Université d'Angers

Professeur des Universités – Praticien hospitalier - HDR, Université d'Angers

Ingénieur hospitalier, CHU d'Angers - INSERM

**L'auteur du présent document vous autorise à le partager, reproduire, distribuer et communiquer selon les conditions suivantes :**



- Vous devez le citer en l'attribuant de la manière indiquée par l'auteur (mais pas d'une manière qui suggérerait qu'il approuve votre utilisation de l'œuvre).
- Vous n'avez pas le droit d'utiliser ce document à des fins commerciales.
- Vous n'avez pas le droit de le modifier, de le transformer ou de l'adapter.

**Consulter la licence creative commons complète en français :**  
**<http://creativecommons.org/licences/by-nc-nd/2.0/fr/>**

# REMERCIEMENTS

Au Dr Anne Clavreul et au Pr Philippe Menei, merci d'avoir accepté de m'encadrer et de m'accompagner durant cette Thèse de Sciences,

Au Pr Hugues Loiseau et au Dr François Ducray, merci de me faire l'honneur d'être les rapporteurs de ce travail de Thèse,

Aux Prs Audrey Rousseau et Jean Mosser, et au Dr Emmanuel Garcion, merci de me faire l'honneur de faire partie de mon jury de Thèse,

A ma femme, Eva. Merci de ton soutien et de ton aide en toute circonstance. Ce travail est aussi le tien.

A ma famille, mes parents Marie-Anne et Christian, mon frère Didier et ma sœur Émilie,

A ma belle-famille, Jacqueline, Claudine, Paule, Jean-Pierre et Bertrand,

A mes co-internes passés et présents,

A mes maîtres,

A mes collègues de l'unité INSERM 1066,

A tous ceux que j'ai oublié ...



## Table des matières

<b>Abréviations</b> .....	<b>6</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>8</b>
<b>1. Les glioblastomes</b> .....	<b>9</b>
1.1. Epidémiologie.....	9
1.2. Présentation clinique.....	9
1.3. Imagerie.....	10
1.4. Histologie.....	11
1.5. Biologie moléculaire.....	12
1.6. Prise en charge thérapeutique.....	14
<b>2. Le Projet Gliome Grand Ouest</b> .....	<b>18</b>
<b>3. Objectifs de la Thèse</b> .....	<b>22</b>
<b>Travail expérimental</b> .....	<b>23</b>
<b>1. Comparaison des résultats des analyses transcriptomiques et protéomiques du GB</b> .....	<b>24</b>
❖ Article n°1 :.....	26
<b>Integration of transcriptomic and proteomic profiles in glioblastoma: looking for the missing link</b> , Lemée JM, Clavreul A, Aubry M, Com E, De Tayrac M, Mosser J, Menei P, <i>PLoS Genet</i> , (soumis).....	26
<b>2. Analyse protéomique de la zone péri tumorale du GB</b> .....	<b>42</b>
2.1. Analyse du profil protéomique de la ZMN des GB.....	42
❖ Article n°2 :.....	44
<b>Proteomic analysis of glioblastomas: What is the best brain control sample?</b> Lemée JM, Com E, Clavreul A, Avril T, Quillien V, De Tayrac M, Pineau C, Menei P, <i>J Prot. Juin 2013</i> .....	44
2.2. Etude de la CRYAB.....	45
<b>3. Analyse multimodale de la zone péri tumorale des glioblastomes</b> .....	<b>49</b>
❖ Article n°3 :.....	50
<b>Characterizing the Peritumoral Brain Zone in Glioblastoma: a Multidisciplinary Analysis</b> , Lemée JM, Clavreul A, Aubry M, Com E, De Tayrac M, Eliat PA, Henry C, Rousseau A, Mosser J, Menei P, <i>J Neuro-Oncol</i> , 2015 Janv 6.....	50
<b>4. Développement de nouvelles modalités d'analyse per-opératoire de la ZMN des GB</b> .....	<b>55</b>
4.1. La microscopie biphotonique.....	56
4.2. Développement d'une nouvelle technique de biopsie optique permettant l'analyse per-opératoire du cerveau en Neurochirurgie.....	58
❖ Déclaration d'invention en vue d'un dépôt de brevet :.....	59
<b>Développement d'un nouveau système de biopsie optique dédié à une utilisation per-opératoire en Neurochirurgie</b> , Lemée JM, Ter Minassian A, Humeau-Heurtier A, Menei P, <i>Brevet en cours d'évaluation, cabinet de brevet ICOSA</i> .....	59
<b>Revue de la littérature</b> .....	<b>60</b>

❖ Article n°4 : .....	62
<b>Thinking outside the box: a systematic review of glioblastoma peritumoral brain zone characteristics and perspectives for future research. Lemée JM, Clavreul A, Menei P, <i>Neuro-Oncology</i>, (soumis) .....</b>	<b>62</b>
<b>Discussion générale, Perspectives, Conclusion.....</b>	<b>79</b>
1. <b>Caractéristiques de la ZMN des GB.....</b>	<b>80</b>
2. <b>Identification et validation de marqueurs spécifiques de la ZMN.....</b>	<b>85</b>
3. <b>Développement de nouvelles modalités d'analyses de la ZMN .....</b>	<b>86</b>
4. <b>Conclusion .....</b>	<b>87</b>
5. <b>Bilan personnel.....</b>	<b>88</b>
<b>Publications et communications présentées au cours de la Thèse.....</b>	<b>90</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>93</b>
<b>Table des matières.....</b>	<b>102</b>
<b>Table des illustrations.....</b>	<b>104</b>
<b>Table des tableaux .....</b>	<b>105</b>

# Abréviations

5-ALA	<i>5-Amino Levulinic Acid</i> / Acide δ Amino-Lévulinique
AMM	Autorisation de mise sur le marché
ANOCEF	Association des Neuro-Oncologues d'Expression Française
ARNm	Acide ribonucléique messenger
CAF	<i>Cancer associated fibroblast</i> / Fibroblaste associé aux cancers
CRYAB	<i>Alpha-crystallin B</i> / cristalline alpha B
GB	Glioblastome
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i> / protéine acide fibrillaire gliale
EGF	<i>Epithelial growth factor</i> / facteur de croissance épithélial
EGFR	<i>Epithelial growth factor receptor</i> / récepteur du facteur de croissance épidermique
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> / dosage d'immunoabsorption par enzyme liée
F2P	Fluorescence à 2 Photons
FGFR	<i>Fibroblast growth factor receptor</i> / récepteur au facteur de croissance des fibroblastes
GASC	<i>GB associated stroma cells</i> / cellules stromales associées au GB
GSH	Génération de second harmonique
H3F3A	Histone H3.3
ICPL	<i>Isotope coded protein labeling</i> / marquage des protéines par isotopes
IDH	Isocitrate déshydrogénase
IHC	Immuno-histochimie
IK	Index de Karnofsky
INCa	Institut National du Cancer
MBP	Myelin basic protein / protéine basique myélinique
MGMT	O <sup>6</sup> -methylguanine–DNA methyltransferase
Munc18	Mammalian uncoordinated protein 18 / protéine mammifère non coordonnée 18
NEFL	<i>Neurofilament, light polypeptide</i> / polypeptide léger du neurofilament
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PCV	procarbazine – CCNU (lomustine) - vincristine
PDGFR	<i>Platelet derived growth factor receptor</i> / récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes
PGGO	Projet Gliome Grand Ouest
RANO	<i>Response assessment in Neuro-Oncology</i> / évaluation de la réponse thérapeutique en Neuro-Oncologie
RCP	Réunion de concertation pluridisciplinaire
RT	Radiothérapie
STIC	Soutien aux techniques innovantes coûteuses

STX1B	<i>Syntaxin 1B</i> / syntaxine 1B
TAA	<i>Tumor associated antigens</i> / antigènes associés aux tumeurs
TFBSs	Transcription factors binding sites / sites de liaisons aux facteurs de transcription
TMZ	Témozolomide
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> / facteur de croissance endothélial vasculaire
ZI	Zone d'interface
ZMN	Zone péri tumorale macroscopiquement normale
ZN	Zone nécrotique centrale
ZT	Zone tumorale

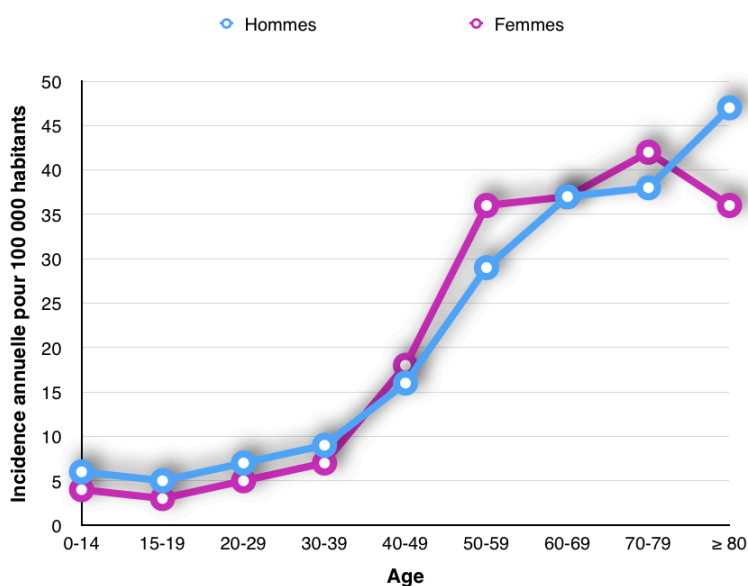
# Introduction

# 1. Les glioblastomes

## 1.1. Epidémiologie

Le glioblastome (GB) est la tumeur cérébrale primitive la plus fréquente et la plus agressive. En France, l'incidence de ce type de tumeur est de 4,96 cas / 100 000 habitants / an (1). Le pic de fréquence d'apparition est situé entre 50 et 75 ans (Figure 1) (2). Il existe en fait 2 pics de fréquence pour cette maladie : un pic de fréquence après 65 ans correspondant aux GB primaires, apparus *de novo* chez un patient sans antécédent et un pic de fréquence plus précoce vers 40-60 ans, correspondant aux GB secondaires, c'est-à-dire issus de la transformation anaplasique d'une tumeur gliale infiltrante de bas grade de malignité, au terme de plusieurs années d'évolution.

L'incidence des GB est en augmentation. Ce phénomène est lié à l'augmentation de l'espérance de vie, à l'augmentation de l'âge moyen de la population, à la systématisation de l'examen histologique et à l'accès de plus en plus facile à des moyens diagnostiques performants tel que l'IRM (3-5).



**Figure 1 : Incidence des GB en fonction de l'âge et du sexe. Données extraites du registre des tumeurs cérébrales de Gironde**

Tableau tiré de Loiseau et al., *Rev Neurol*, 2009 (2)

## 1.2. Présentation clinique

Les symptômes et la présentation clinique initiale d'un GB dépendent de sa taille et de sa localisation. La particularité des GB est une extension « en tâche d'huile » avec une aggravation rapide des symptômes en l'absence de prise en charge adaptée (6). Dans la majorité des cas, les GB sont révélés par un tableau d'hypertension intracrânienne, indépendant de la localisation tumorale. L'hypertension intracrânienne associe des maux de tête, typiquement majorés en début de journée, pouvant entraîner des vomissements qui soulagent les céphalées et un œdème papillaire lors de la réalisation d'un fond d'œil.

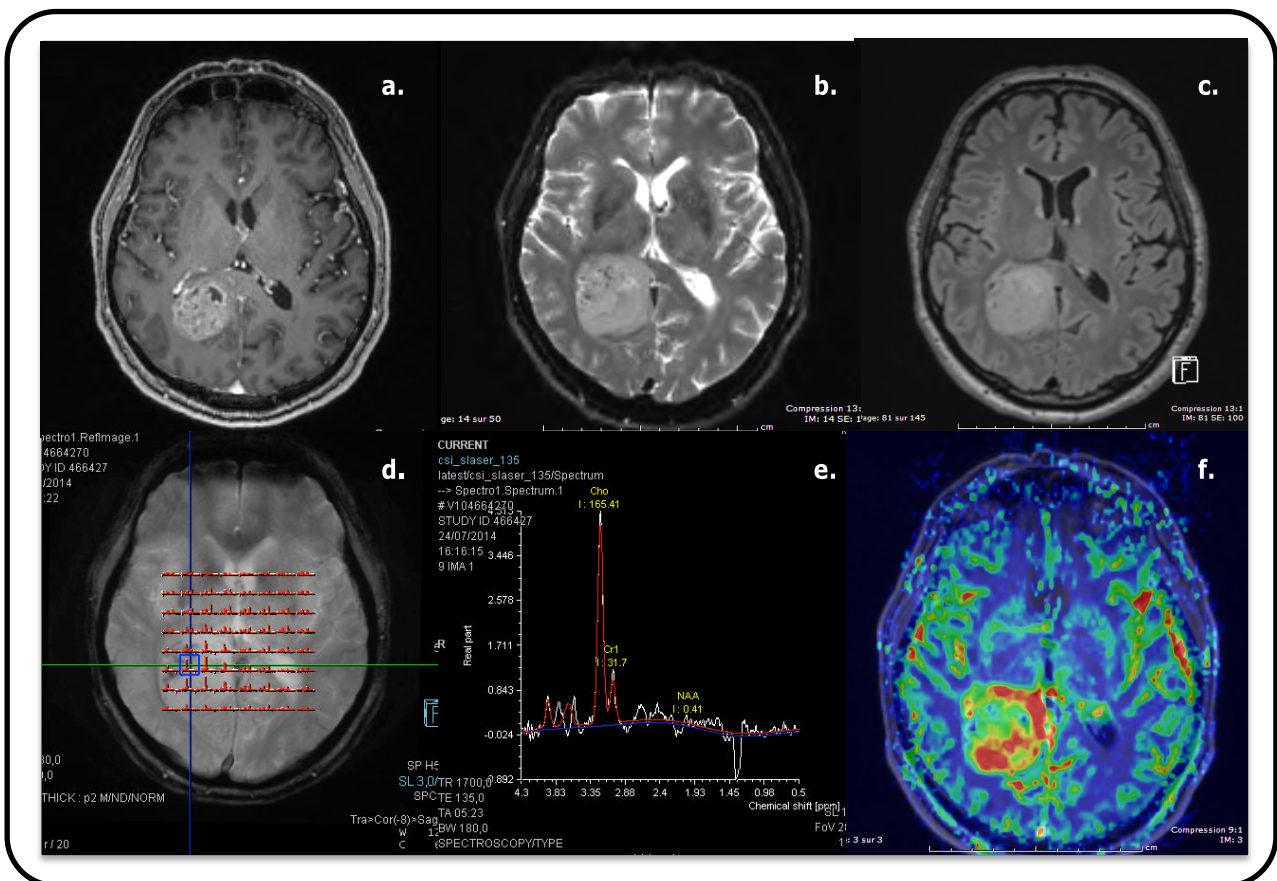
Parallèlement aux signes d'hypertension intracrânienne, les GB peuvent aussi être révélés par des signes cliniques spécifiques liés à la localisation cérébrale de la lésion et à l'effet de masse exercé par la tumeur, comme un déficit sensitivo-moteur, des troubles phasiques, des troubles du comportement ou un

ralentissement idéo-moteur (7). Les GB peuvent aussi être révélés dans environ 30% des cas par une crise d'épilepsie dont la clinique dépend de la localisation de la tumeur (8).

### 1.3. Imagerie

Dans le cadre du bilan préopératoire, l'examen d'imagerie de référence est l'IRM cérébrale. L'aspect typique d'un GB est celui d'une lésion hétérogène, en hyposignal en séquence T1, avec une prise de contraste périphérique irrégulière en anneau et un centre nécrotique, entouré d'une couronne œdémateuse en hypersignal en séquence T2 FLAIR (Figure 2).

Grâce aux progrès récents des séquences IRM, il est possible d'étudier spécifiquement par des séquences d'IRM la vascularisation tumorale ainsi que le métabolisme de la tumeur, nous permettant de réaliser une IRM dite multimodale. Dans le cas des GB, la séquence d'IRM de perfusion montre typiquement un profil de néoangiogenèse associé à une rupture de la barrière hémato-encéphalique associé à une augmentation du volume sanguin relatif proportionnel au grade histologique de la tumeur (9). En séquence de spectroscopie, les tumeurs cérébrales malignes sont caractérisées par une augmentation du pic de choline lié à une augmentation de la synthèse membranaire et une diminution du pic de N-acétyl-aspartate. De manière plus spécifique au GB, il est fréquent de retrouver un double pic de lactates et un pic de lipide, signes respectivement d'une augmentation du métabolisme anaérobie et d'une nécrose tumorale (10,11).



**Figure 2 : Aspect IRM d'un GB**  
IRM cérébrale multimodale d'un patient porteur d'un GB, réalisée au CHU d'Angers

- a. **Coupe axiale T1 avec injection de gadolinium** mettant en évidence une prise de contraste annulaire périphérique avec un centre nécrotique en hyposignal
- b. **Coupe axiale T2**

- c. **Coupe axiale T2 FLAIR** identifiant la présence d'un œdème au sein de la tumeur et du parenchyme cérébral adjacent
- d. **Spectroscopie multivoxel** montrant une modification de la composition moléculaire de la tumeur par rapport au parenchyme cérébral sain adjacent
- e. **Courbe de spectroscopie d'un voxel tumoral** identifiant un pic de choline avec une inversion du rapport choline / N-acétyl-aspartate, soulignant le haut grade de la tumeur gliale
- f. **IRM de perfusion** mettant en évidence une augmentation de la vascularisation en périphérie de la tumeur témoignant d'une néoangiogenèse et d'une rupture de la barrière hémato-encéphalique

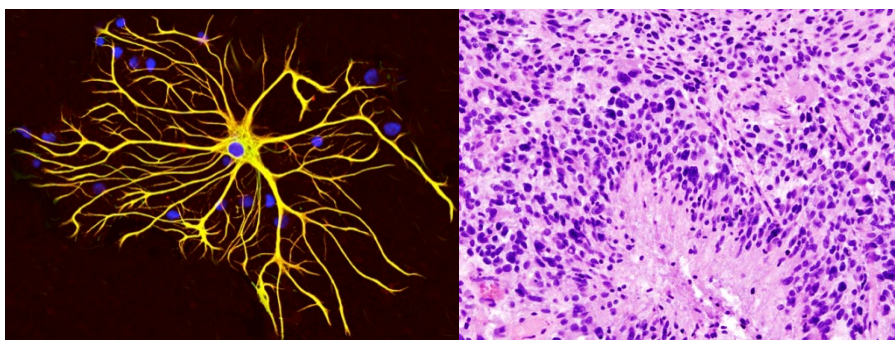
## 1.4. Histologie

L'évaluation de la nature histologique de la tumeur cérébrale et de son degré de malignité est basée sur la classification des tumeurs du système nerveux central publiée par l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS) en 2007 (12). L'OMS reconnaît en fonction du type cellulaire dont dérive *a priori* la prolifération tumorale trois grandes catégories de tumeurs gliales : les astrocytomes, les oligodendrogliomes (et oligoastrocytomes) et les épendymomes (18). On oppose aussi classiquement les gliomes infiltrants (tumeurs astrocytaires et oligodendrogiales), qui peuvent être de bas ou haut grade, aux gliomes circonscrits, tels que les épendymomes.

Les gliomes diffus, quelque soit leur grade de malignité (allant de II à IV selon l'OMS), sont à l'origine, comme leur nom l'indique, d'une infiltration diffuse du parenchyme cérébral. Celle-ci se fait préférentiellement le long des faisceaux de substance blanche. En histopathologie, cette infiltration donne typiquement « les structures secondaires de Scherer ». Ces dernières comprennent 1) l'agencement préférentiel des cellules tumorales autour des neurones, appelé « satellitose périneuronale », 2) la diffusion le long des vaisseaux dans les espaces de Virchow-Robin et 3) la dissémination sous-piale.

Les GB, ou astrocytomes de grade IV, sont des tumeurs gliales infiltrantes hautement malignes, composés d'éléments astrocytaires peu différenciés, souvent pléiomorphes, présentant d'importantes atypies cytonucléaires, ainsi qu'une activité mitotique marquée. Une prolifération endothélicapillaire floride et/ou des foyers de nécrose (typiquement pseudo-palissadique) sont les éléments essentiels au diagnostic de ces tumeurs. Les 4 critères histologiques décrits dans la classification OMS permettant de poser le diagnostic sont : (Figure 3 et 4) (12,13).

- présence d'atypies cytonucléaires
- nécrose tumorale
- index mitotique élevé
- néoangiogenèse



**Figure 3 : Illustration d'un astrocyte et de l'aspect d'une coupe histologique de GB**



En plus de la forme histologique « pure » des GB comprenant uniquement des cellules de la lignée astrocytaire, il existe différents variants histologiques classiques tels que les GB à composante oligodendrogliale, les GB à cellules géantes et les gliosarcomes. Ces formes plus rares de GB sont susceptibles de poser des problèmes de diagnostic différentiel avec d'autres types de tumeurs gliales lors de l'examen anatomopathologique (14).

Toutefois, la classification OMS des tumeurs gliales souffre de plusieurs défauts : sa subjectivité, l'absence de prise en compte des résultats de l'examen radiologique, le manque de précision concernant la prédiction de la réponse aux traitements, mais l'existence pour chaque un type histologique de tumeur de plusieurs sous-types moléculaires dont les profils évolutifs et la réponse au traitement sont différents (15–17). Par exemple, Verhaak et al. (2010) ont identifié quatre sous-entités de GB en se basant sur le profil d'expression de 840 gènes: classiques, mésoenchymateux, neuraux et proneuraux (18).

Ces limitations de la classification OMS des tumeurs gliales ont un retentissement au niveau individuel car il est difficile d'informer le patient de manière précise sur sa maladie. De plus, il est possible de sous-estimer l'agressivité de la lésion tumorale si la biopsie permettant le diagnostic a été effectuée dans une zone de tumeur gliale infiltrante, alors que l'IRM montre des signes évident de passage à l'anaplasie avec la présence de prises de contraste intratumorales sur les séquences avec injection de gadolinium. Ces défauts ont aussi des répercussions au niveau collectif, entraînant une hétérogénéité des populations incluses dans les études, ce qui est à l'origine d'un manque de puissance statistique dans les différents essais et d'une difficulté à généraliser les résultats à une population hétérogène (15).

## 1.5. Biologie moléculaire

Au cours de cette dernière décennie, les progrès de la biologie moléculaire ont eu un impact significatif sur le diagnostic, la classification et même la prise en charge thérapeutique des GB. L'apport de ces nouvelles techniques d'analyses ainsi que les marqueurs moléculaires diagnostiques, pronostiques et de réponses thérapeutiques remettent en question la classification OMS des tumeurs et soulignent le besoin d'une nouvelle classification des tumeurs gliales qui intégrerait, en plus des données de l'anatomopathologie, des données issues de la biologie moléculaire, et de la radiologie (15,18–20). Dans les GB, plusieurs marqueurs pronostiques, diagnostiques ou prédictifs de la chimiosensibilité de la tumeur ont été identifiés en biologie moléculaire. Les marqueurs moléculaires les plus étudiés, que nous allons détailler par la suite, sont l'isocitrate déshydrogénase (IDH), la méthylation du promoteur de la O<sup>6</sup>-méthylguanine–DNA méthyltransferase (MGMT), la co-délétion 1p/19q, la p53 et le récepteur du facteur de croissance épidermique (*epidermal growth factor receptor* ou EGFR).

**La mutation de l'IDH** est le marqueur le plus récemment identifié dans les tumeurs gliales (21). Les gènes IDH1 et 2 codent pour l'enzyme IDH qui participe à la décarboxylation de l'isocitrate en  $\alpha$ -cétoglutarate. La mutation la plus fréquente dans les tumeurs gliales est la mutation R132H sur le gène IDH1, qui est présente dans plus de 90% des cas et dont l'identification est réalisable en immunohistochimie à l'aide d'anticorps spécifiques. La mutation du gène IDH2 est plus rare. La mutation IDH1 possède :

- Une valeur diagnostique : la mutation du gène IDH1 est présente dans plus de 70% des gliomes diffus et dans seulement 5% des GB primaires. La présence de cette mutation signe est utilisée en pratique courante pour faire la distinction entre GB secondaire, développé à partir d'une lésion gliale de bas grade de malignité, des GB *de novo* (21).
- Une valeur pronostique : la mutation d'IDH est un facteur de bon pronostic, indépendamment du grade histologique de la tumeur (22).

Le second marqueur identifié dans les tumeurs gliales est un marqueur épigénétique : **la méthylation du promoteur de la MGMT**. Cette modification épigénétique du promoteur de la MGMT entraîne une diminution de la production de cette protéine, qui est une molécule s'opposant à l'action des agents alkylants comme le témozolomide (TMZ). La méthylation du promoteur de la MGMT possède :

- Une valeur pronostique : la méthylation du promoteur de la MGMT est un marqueur de bon pronostic des GB, indépendamment du traitement reçu (23).
- Une chimiosensibilité de la tumeur : la méthylation du promoteur de la MGMT et donc la répression de l'expression de cette protéine permet d'augmenter la chimiosensibilité de la tumeur aux agents alkylants classiquement utilisés dans le traitement des GB (24). Il semble que cette chimiosensibilité induite par la présence de la méthylation du promoteur de la MGMT soit aussi influencée par d'autres facteurs, comme la méthylation de la diacylglycerol kinase  $\iota$  (25,26).

Le troisième marqueur identifié est un marqueur chromosomique : **la co-délétion 1p/19q** (bras court du chromosome 1 et bras long du chromosome 19). Cette mutation est associée dans 100% des cas avec la mutation du gène IDH1 et dans 90% des cas avec une méthylation du promoteur de la MGMT (27). Ce marqueur est associé à un phénotype histologique oligodendrogial et n'est donc pas retrouvé dans les tumeurs de la lignée astrocytaire, dont le GB fait partie, sauf si le GB possède une composante oligodendrogiale. Il est possible d'évaluer la présence d'une co-délétion 1p/19q en dosant l'expression de l'interneurine  $\alpha$ , dont la surexpression est prédictive de la présence d'une co-délétion avec une valeur prédictive positive de 76 % (28). La présence de cette co-délétion a un triple rôle :

- Une valeur diagnostique : l'identification d'une codélétion 1p/19q est caractéristique de la présence d'un contingent oligodendrogial au sein du GB étudié (29).
- Une valeur pronostique : la mutation 1p/19q est un marqueur de bon pronostic des gliomes indépendamment du traitement reçu (30).
- Une chimiosensibilité de la tumeur : plusieurs essais contrôlés, randomisés ont mis en évidence une réponse thérapeutique accrue chez les patients présentant cette co-délétion (31,32).

**La protéine p53** est un facteur de transcription impliqué dans la régulation d'un certain nombre de fonctions cellulaires comme la mitose ou l'apoptose. Cette mutation n'est pas prédictive de la réponse thérapeutique ni d'un meilleur pronostic dans les GB, contrairement aux tumeurs gliales infiltrantes dites de bas grades, dont elle est un facteur de mauvais pronostic. Cette mutation est détectable en immunohistochimie par l'observation d'une accumulation intranucléaire de la protéine p53 (39). La mutation de la protéine p53 possède :

- Une valeur diagnostique : la mutation du gène de ce facteur de transcription est un marqueur des tumeurs de la lignée astrocytaire, dont fait partie le GB.
- Une valeur pronostique : L'amplification de l'EGFR a une valeur pronostique péjorative dans certaines populations de patients (34).

**L'amplification de l'EGFR** est fréquente dans les GB *de novo*. Cette amplification conduit à des altérations structurales du récepteur pouvant avoir des propriétés pro-oncogéniques, comme le variant III de ce récepteur (EGFRvIII), qui est une forme constitutivement active même en absence de ligand (35). L'amplification de l'EGFR reste exceptionnelle dans les tumeurs oligodendrogiales. L'amplification de l'EGFR, notamment le variant vIII, est détectable en immunohistochimie (36). L'amplification de l'EGFR possède :

- Une valeur pronostique : L'amplification de l'EGFR a une valeur pronostique péjorative dans certaines populations de patients (37).

Une nouvelle classification internationale des tumeurs gliales est en cours de rédaction, prenant en compte à la fois les données histologiques, mais aussi celles issues de la biologie moléculaire. Comme le diagnostic moléculaire n'est pas encore répandu dans tous les centres de Neuro-Oncologie, il est convenu pour le moment d'utiliser la biologie moléculaire comme un outil pour affiner le diagnostic, sans la rendre indispensable au diagnostic et à la mise en place d'un traitement.

## 1.6. Prise en charge thérapeutique

Afin de déterminer la prise en charge et les thérapeutiques les plus adaptées pour chaque patient, il faut en premier lieu évaluer l'état clinique du patient. Deux scores principaux sont disponibles pour évaluer l'état clinique général des patients : le score OMS et l'index de Karnofsky (IK), tous deux basés sur les capacités fonctionnelles et l'autonomie du patient (Tableau 1).

score OMS		Index de Karnofsky	
Activité normale	0	100%	Etat général normal, asymptomatique
Signes et symptômes mineurs de la maladie, patient ambulatoire	1	90%	Activité normale, signes mineurs de la maladie
		80%	Activité normale avec difficulté
Patient alité < 50% de la journée	2	70%	Patient autonome mais incapable de travailler
		60%	Besoin intermittent d'une assistance et de soins médicaux fréquents
Patient alité > 50% de la journée	3	50%	Besoin constant d'une assistance avec soins médicaux fréquents
		40%	Invalide, besoin de soins spécifiques et d'assistance
		30%	Invalide, hospitalisation indiquée, pas de risque de mort imminent
Patient confiné au lit	4	20%	Invalide, hospitalisation indiquée, soins de support intensifs nécessaires
		10%	Patient moribond
Patient décédé	5	0%	Patient décédé

**Tableau 1 : Correspondance entre score OMS et IK pour l'évaluation de l'état clinique des patients**

### 1.6.1. Prise en charge chirurgicale

La première étape de la prise en charge des GB est la réalisation d'une exérèse chirurgicale de la lésion cérébrale (38). Cette exérèse permet de faire le diagnostic histologique grâce à l'examen anatomopathologique de la pièce opératoire, et constitue aussi la première étape de la prise en charge thérapeutique. En effet, les données de littératures mettent en évidence qu'une résection > 90% du volume tumoral initial prenant le contraste sur les séquences IRM avec injection de gadolinium a un impact significatif sur la survie et la qualité de vie du patient (39-41).

La chirurgie d'exérèse des GB est proposée en première intention aux patients de moins de 70 ans, avec un état clinique conservé (IK  $\geq$  70). Bien que l'indication d'une chirurgie d'exérèse ne soit pas validée en première intention chez les patients de plus de 70 ans, celle-ci est souvent pratiquée si la localisation de la tumeur rend l'exérèse complète possible. L'intérêt d'une exérèse chirurgicale dans cette population est actuellement en cours d'évaluation dans le cadre de l'essai CSA, qui compare biopsie et chirurgie d'exérèse chez les patients de plus de 70 ans ayant un IK  $\geq$  70. Chez les patients pour lesquels une chirurgie d'exérèse tumorale n'est pas indiquée, il est nécessaire de réaliser une biopsie stéréotaxique de la lésion cérébrale suspecte afin d'obtenir un diagnostic histologique, nécessaire à la mise en place de thérapies adjuvantes.

### 1.6.2. Thérapies adjuvantes

Actuellement, le traitement complémentaire de référence après exérèse chirurgicale d'un GB est actuellement un protocole décrit par Stupp, associant radiothérapie adjuvante et TMZ (Figure 4) (24). Ce protocole comprend :

- **une phase d'induction** associant des séances de radiothérapie de 2 Gy chacune 5 jours / 7 pendant 6 semaines pour une dose totale de 60 Gy à une prise quotidienne de TMZ par voie orale à la dose de 75 mg/m<sup>2</sup>/j.
- **une pause de 4 semaines** dans le traitement.
- **une phase de consolidation** de 6 cycles de chimiothérapie de 28 jours consistant en une prise de TMZ à une dose de 150-200 mg/m<sup>2</sup>/j les 5 premiers jours du cycle.

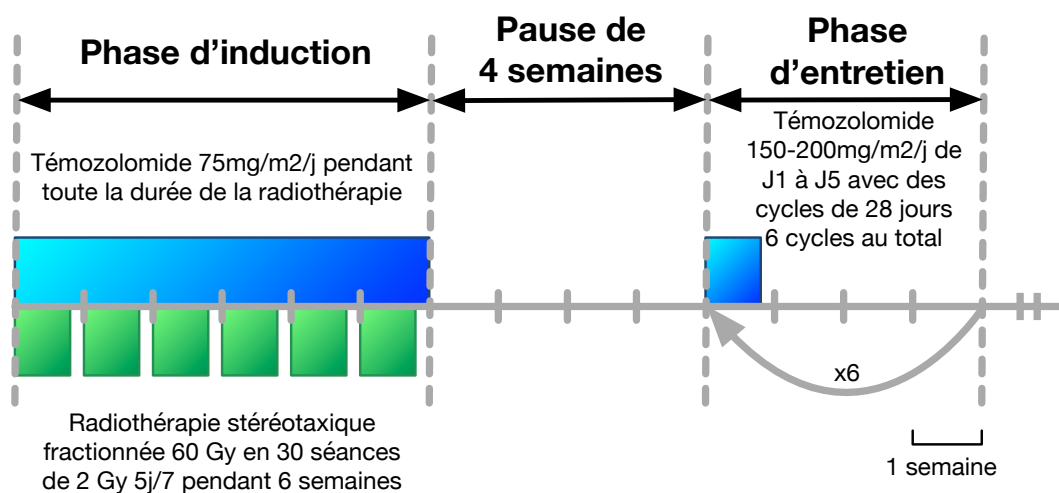


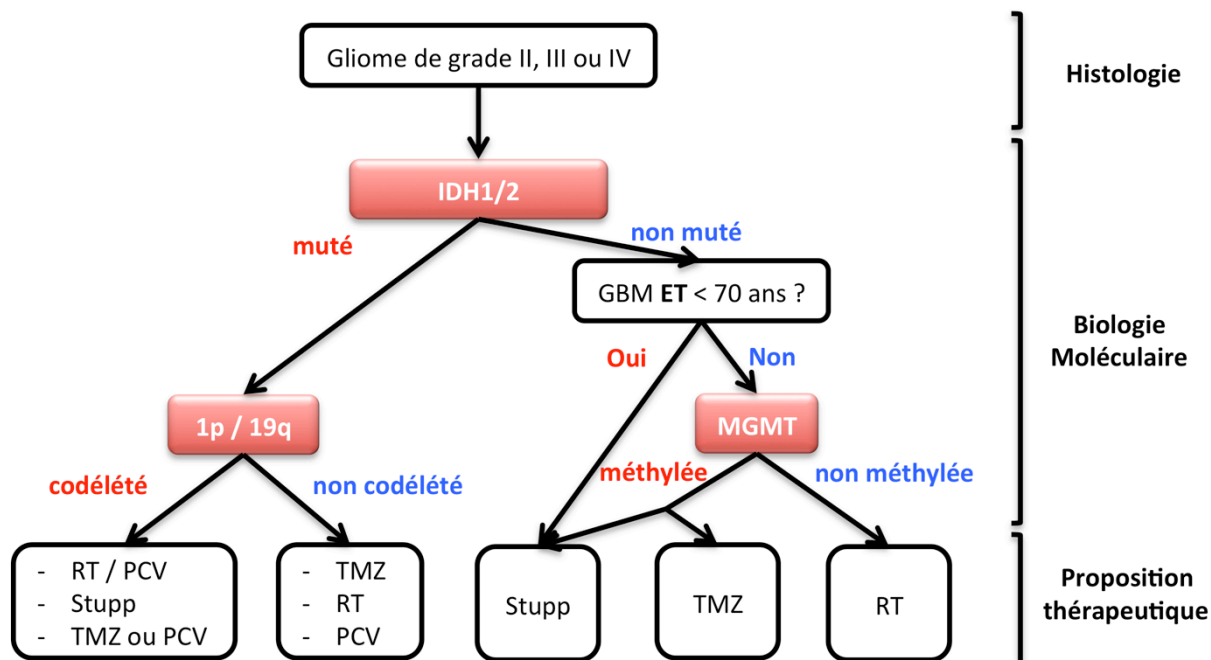
Figure 4 : Illustration du protocole de radio-chimiothérapie validé par R. Stupp

Le protocole Stupp permet une prise en charge bien codifiée des patients, mais il n'a été validé que chez les patients de moins de 70 ans avec un bon état général (IK  $\geq$  70) (24). Pour les autres patients, l'Association de Neuro-Oncologues d'Expression Française (ANOCEF) recommande pour les patients jeunes ou âgés qui ont un état de santé altéré une chimiothérapie par TMZ, tandis qu'un traitement par radiothérapie est la référence pour les patients de plus de 70 ans avec un bon état général (IK  $\geq$  70) (42). Cependant, de récentes études comme l'essai Nordic recommandent de privilégier un traitement par TMZ chez les sujets âgés dont la tumeur présente une méthylation du promoteur de la MGMT (43-45).

Une autre option thérapeutique dans la prise en charge des GB est l'utilisation de thérapies locales. Le Gliadel<sup>®</sup>, constitué d'implants de carmustine mis en place au sein de la cavité de résection chirurgicale, est le seul traitement local des GB possédant l'autorisation de mise sur le marché (AMM). Les essais contrôlés randomisés ont mis en évidence une augmentation significative de la survie des patients traités par implants de carmustine, montrant une augmentation de la survie globale de 2,3 mois (46-48). Des études multicentriques françaises ont récemment souligné l'intérêt des implants de carmustine associés au protocole Stupp, avec une augmentation de la survie sans progression de 2 mois et une augmentation de la survie globale de 3,4 mois (49). Cette étude a aussi démontré que bien que le taux de complication post-opératoire soit plus important avec l'utilisation des implants de carmustine, ceci n'a pas d'impact négatif sur la survie des patients. Une étude récente a aussi identifié la présence d'une méthylation du promoteur de la MGMT comme étant un facteur de bonne réponse au traitement local par implants de carmustine associé au protocole Stupp (50).

Enfin, il est possible d'utiliser des traitements antiangiogéniques, dont le chef de file est le bévacicumab [Avastin<sup>™</sup>, anticorps dirigé contre le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (*vascular endothelium growth factor* ou VEGF)]. Ces molécules permettent d'agir sur la néoangiogenèse tumorale avec une action anti-tumorale directe, mais aussi une action sur l'œdème vasogénique péri-tumoral. Il a été démontré que le bévacicumab est le seul traitement susceptible d'améliorer l'état général (et donc l'IK) d'un patient. Toutefois, les antiangiogéniques ne possèdent pas l'AMM dans le traitement des GB en première ligne. En effet, les deux grands essais contrôlés randomisés Avaglio et celui piloté par le *Radiation Therapy Oncology Group* ont mis en évidence une augmentation de la survie sans progression sans augmentation de la survie globale chez les patients traités par bévacicumab en association avec le protocole de Stupp en première ligne dans le GB *de novo* (51,52). Des études sont en cours sur les applications potentielles du bévacicumab en tant que traitement néoadjuvant ou en première ligne chez des sujets jeunes présentant un état clinique altéré, afin d'améliorer leur état clinique général (et donc leur IK) dans le but de les rendre éligible à une radio-chimiothérapie conventionnelle selon le protocole de Stupp (53).

Bientôt, la nouvelle classification OMS des tumeurs gliales malignes permettra de proposer à chaque patient la thérapie la plus efficace en fonction du type histologique et moléculaire de la lésion tumorale, en s'appuyant sur les principaux marqueurs moléculaires identifiés dans la littérature permettant d'évaluer le pronostic et la chimiosensibilité de la tumeur (Figure 5).



**Figure 5: Illustration de la nouvelle proposition de classification moléculaire des tumeurs gliales ainsi que de ses potentielles implications au niveau du choix des thérapeutiques (R Stupp, EANO 2014).**

*PCV : chimiothérapie par procarbazine, CCNU (lomustine) et vincristine*

*RT : radiothérapie*

*TMZ : témozolomide*

### 1.6.3. Prise en charge de la récurrence

La réponse tumorale au traitement est évaluée selon les critères RANO (*Response Assessment in Neuro-Oncology*), qui ont remplacé la précédente classification de McDonald (54,55). Les critères RANO prennent en compte l'évolution clinique, la prise de corticoïdes et les données de l'IRM (tableau 2). La récurrence tumorale, à distinguer d'une pseudo-progression, est la règle dans l'histoire naturelle d'un GB.

Il n'existe pas de prise en charge standardisée lors de la récurrence et celle-ci doit être discutée en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) de Neuro-Oncologie en fonction de l'état général du patient et des caractéristiques radiologiques de la tumeur. Une reprise chirurgicale avec exérèse de la récurrence tumorale doit être proposée de manière systématique à chaque patient si celle-ci est possible. Cependant, le bénéfice d'une reprise chirurgicale dans le contexte de la récurrence n'a pas été clairement démontré, même si une étude tend à mettre en évidence un effet bénéfique chez des patients bien sélectionnés (10). Il est aussi possible de discuter lors de la chirurgie de la mise en place d'implants de carmustine (Gliadel®) au niveau du site opératoire. La carmustine est la chimiothérapie locale disposant de l'AMM dans le cadre de la récurrence des GB (48,56). Il est aussi licite de proposer une ré-irradiation en tenant compte des doses précédemment délivrées et du délai entre l'irradiation et la récurrence (57), sans qu'il ait été démontré de bénéfice de la ré-irradiation dans un essai contrôlé randomisé de bonne qualité.

Réponse	Critères cliniques	Critères IRM
<b>Réponse Complète</b>	Tous les critères suivants : - Amélioration ou stabilité clinique - Sevrage complet des corticoïdes	- Disparition des lésions prenant le contraste pendant au moins 4 semaines - Diminution ou stabilité du signal T2 FLAIR - Absence de nouvelles lésions
<b>Réponse Partielle</b>	Tous les critères suivants : - Amélioration ou stabilité clinique - Diminution ou stabilité des corticoïdes	- Diminution $\geq 50\%$ de la somme du produit des diamètres perpendiculaires des lésions prenant le contraste par rapport à l'examen de référence - Pas de nouvelle lésion - Diminution ou stabilité du signal T2 FLAIR sous une dose stable ou diminuée de corticoïdes
<b>Stabilité</b>	Tous les critères suivants : - Absence de réponse complète, partielle ou de progression - Diminution ou stabilité des corticoïdes	- Diminution ou stabilité du signal T2 FLAIR sous une dose stable ou diminuée de corticoïdes
<b>Progression</b>	- Détérioration clinique non attribuable à une autre cause que la tumeur - Augmentation de la dose des corticoïdes rendue nécessaire par la détérioration clinique	- Augmentation $\geq 25\%$ de la somme du produit des diamètres perpendiculaires des lésions prenant le contraste par rapport à l'examen de référence - Augmentation du signal T2 FLAIR - Apparition d'une nouvelle lésion - Absence de contrôle IRM lié au décès ou à la détérioration clinique

**Tableau 2 : Evaluation de la réponse au traitement des patients porteurs d'un GB selon les critères RANO (55).**

La chimiothérapie de seconde ligne n'est pas clairement définie et les oncologues disposent d'un large éventail de traitements disponibles, comme le TMZ, la bélustine, la carmustine, le carboplatine ou un protocole PCV (procarbazine, CCNU, vincristine). Il est aussi possible de mettre en place hors AMM un traitement par bévaccizumab parfois associé à de l'irinotécan.

## 2. Le Projet Gliome Grand Ouest

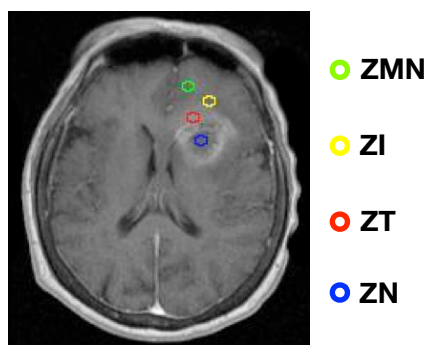
Les travaux de recherche actuels sur les GB se focalisent essentiellement sur la variabilité inter-patients et sur l'isolement de nouveaux éléments de classification ou de facteurs prédictifs de réponse aux différentes thérapeutiques. Toutefois, ces dernières années n'ont pas vu d'avancées thérapeutiques majeures dans la prise en charge des GB par rapport aux autres types de cancer, le standard de soin dans la prise en charge des GB restant le schéma thérapeutique décrit par Stupp *et al.* en 2005, il y a presque 10 ans.

En 2006, le Professeur Philippe Menei a débuté une analyse originale des GB axée sur l'hétérogénéité intratumorale du GB. Ce projet intitulé, projet Gliome Grand Ouest « du cœur de la tumeur vers la périphérie » a été retenu et financé dans le cadre de l'appel à projets « réseaux structurants 2005 » du Cancéropole Grand-Ouest, *via* l'INCa, la Ligue contre le Cancer et les régions Bretagne, Centre, Pays de la Loire et Poitou-Charentes. L'objectif de ce projet est d'acquérir une meilleure compréhension de l'hétérogénéité intratumorale caractéristique des GB pour fournir des éléments de réponse sur l'origine et la récurrence de ces tumeurs, pouvant déboucher sur de nouvelles approches thérapeutiques.

La composition interne du GB est très hétérogène et quatre zones ont été définies au sein du GB pour cette étude avec, du centre vers la périphérie : la zone de nécrose (ZN), la zone tumorale (ZT), la zone



d'interface entre la tumeur et le parenchyme (ZI) et la zone macroscopiquement normale (ZMN) (Figure 6). Le PGGO a permis d'analyser ces quatre zones sous différentes modalités combinant l'imagerie fonctionnelle, des techniques de biologie moléculaire nouvelles générations dites « omiques » (génomique, transcriptomique et protéomique), et des techniques d'analyses plus classiques comme l'histologie et la culture cellulaire.



**Figure 6 : Illustration des différentes zones de prélèvement pour l'étude de l'hétérogénéité intra-tumorale des GB dans le cadre du PGGO**

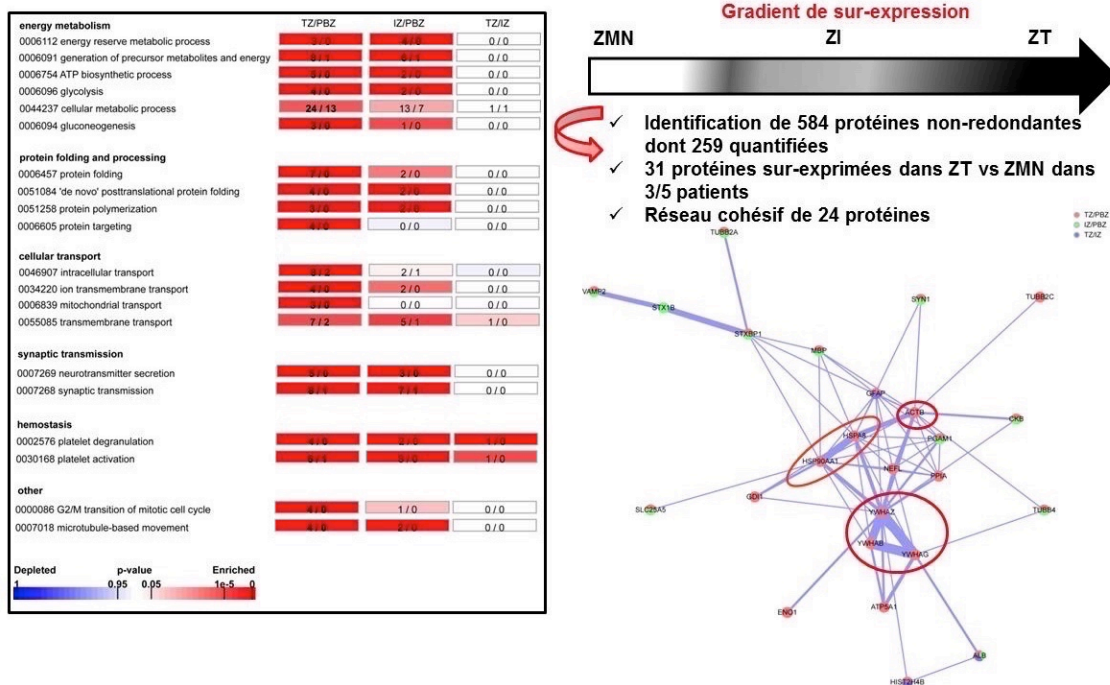
**L'analyse des données de protéomique du PGGO** a été réalisée au sein de la plate-forme protéomique Biogenouest en collaboration avec Charles Pineau et Emmanuelle Com. Cinq patients ont été inclus dans cette analyse avec 3 zones par patients analysées : ZT, ZI et ZMN. La ZN a été exclue de cette analyse compte-tenu du faible rendement protéique obtenu. L'analyse protéomique a été réalisée par la technique ICPL (*Isotope-Coded Protein Labeling*), permettant l'identification de 584 protéines non redondantes, dont 259 ont pu être quantifiées.

L'analyse de ces données protéomiques n'a pas permis d'identifier de profil protéomique spécifique pour chaque zone mais un gradient de surexpression de protéines de ZMN vers ZT suggérant une dilution du contingent tumoral du cœur de la tumeur vers la périphérie.

Sur les 259 protéines quantifiées, seulement 31 protéines ont été retrouvées surexprimées dans la ZT vs ZMN chez au moins 3 patients sur 5 signalant une forte hétérogénéité inter-patients. Les fonctions biologiques sur-exprimées dans ZT sont associées au métabolisme énergétique, au repliement des protéines, au transport cellulaire, à la transmission synaptique et à l'hémostase (Figure 7). Parmi les 31 protéines surexprimées dans la ZT, 24 forment un réseau cohésif dont le cœur est principalement constitué de la  $\beta$ -actine (ACTB) et de deux familles de protéines : les protéines de choc thermique (HSP90AA1, HSPA8) et les protéines 14-3-3 (YWHAZ, YWHAG, YWHAB). Les protéines de ces deux familles ont été déjà proposées comme des cibles potentielles pour la thérapie du GB (58,59).

Ce travail sur le profil protéomique des différentes zones du GB a conduit à une publication dans *Journal of Proteomics* en 2012 (60).





**Figure 7 : Résumé de l'analyse des données de protéomique issues du PGGO**  
Données issues de Com et al., *J Proteomics*, 2012 (60)

L'analyse des données de génomique et de transcriptomique du PGGO a été réalisée au sein de la plate-forme Génomique Santé Biogenouest en collaboration avec l'équipe de Jean Mosser à Rennes sur les échantillons des 4 zones du GB de 10 patients.

Peu d'altérations génomiques ont été identifiées dans la ZMN sauf dans celles où une infiltration de cellules tumorales a été identifiée. Comme attendu, de fortes altérations ont été observées dans la ZT. Ces altérations génomiques de la ZT étaient celles décrites dans la littérature : perte partielle ou complète du chromosome 10, délétion du locus CDKN2A/B, polysomie du chromosome 7 et amplification sélective de l'EGFR (Figure 8).

De manière similaire aux résultats de l'analyse protéomique, nous avons observé lors de l'analyse des données de transcriptomique un gradient de surexpression d'ARN de la ZMN vers la ZT. Les modules de gènes surexprimés dans la ZT sont associés à la croissance, au développement et à la mobilité cellulaire, ainsi qu'au cycle cellulaire. Les modules de gènes surexprimés dans la ZMN sont associés quant à eux à la fonction et au développement du système nerveux et possèdent un profil ARN plus « classique » similaire à celui retrouvé classiquement dans le tissu cérébral « sain ». L'analyse de ces profils d'expression génique a permis l'identification d'une signature de 100 gènes dont l'expression est fortement corrélée au gradient tumoral, susceptible de nous apporter des informations sur le caractère infiltrant ou non du GB (Aubry et al., *soumis*). Parmi ces gènes, nous distinguons un marqueur mésenchymateux (la chitinase 3-like 1) et un marqueur de cellules souches (la nestine).

L'analyse des données de transcriptomique a également permis de mettre en évidence que la classification moléculaire des GB décrite par Verhaak sur la base de 840 gènes (18) n'est pas constante sur l'ensemble des différentes zones d'un même échantillon tumoral et que le sous-type tumoral (neural, proneural, classique ou mésenchymateux) peut varier au sein d'un même échantillon en fonction de la localisation de la biopsie. La ZMN a une signature neurale dans la majorité des cas, par contre les zones ZT et ZI de la tumeur

sont classées majoritairement en sous-type neural/proneural ou mésenchymateux (18)(Aubry et al., *soumis*). Ce résultat remet en cause la classification des tumeurs gliales en fonction de leur sous-type moléculaire, et remet en question son application comme outil de stratification des patients dans les essais cliniques ou comme aide au choix des différentes thérapeutiques proposées.

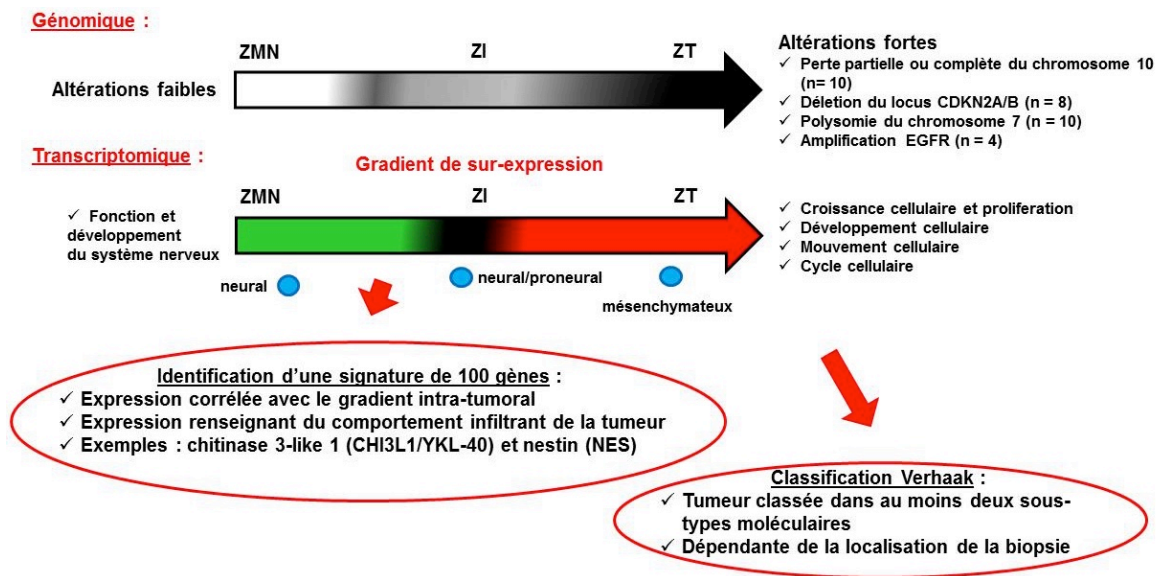


Figure 8 : Résumé de l'analyse des données de génomique et de transcriptomique.

L'analyse des cultures cellulaires du PGGO a été réalisée au sein de l'unité INSERM U1066 par le Dr Anne Clavreul. Cette analyse a permis l'isolement d'une population cellulaire particulière dans la ZMN. Ces cellules que nous avons appelées GASC (*glioblastoma associated stromal cells*) possèdent des propriétés très proches des fibroblastes associés au cancer appelés CAF (*cancer associated fibroblasts*) ou myofibroblastes, qui sont largement décrits au sein du stroma des carcinomes (Figure 9) (61-65). Ces GASC ont comme caractéristiques une diploïdie, un génome normal et expriment un panel de marqueurs identifiés sur les CAF tels que l' $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), le PDGFR $\beta$  et la *fibroblast specific protein-1* (FSP1). De plus, comme les CAF, ces cellules possèdent des propriétés protumorales. En particulier, les GASC favorisent le développement des vaisseaux sanguins et augmentent la prolifération des cellules de gliome *in vitro* et *in vivo* (66,67). Ces cellules pourraient représenter une cible potentielle nouvelle ou un moyen innovant de vectoriser des thérapies dans le traitement des GB.

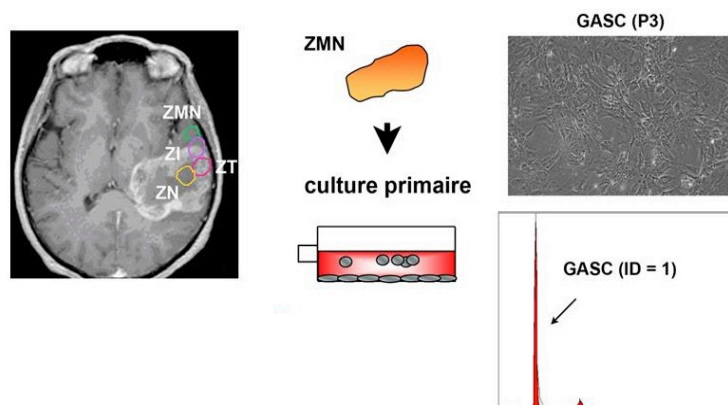


Figure 9: Résumé de l'analyse des données de cultures cellulaires (ID = index d'ADN)

### 3. Objectifs de la Thèse

Les analyses « omiques » du PGGO ont permis de générer d'importantes quantités de données brutes concernant les 4 zones du GB étudiées. Le 1<sup>er</sup> objectif de ce travail de Thèse a été de poursuivre l'analyse de ces données en réalisant une synthèse commune des données de transcriptomiques et de protéomiques obtenues afin d'identifier des marqueurs qui pourraient être pertinents pour le diagnostic et/ou le pronostic des GB.

Le 2<sup>ème</sup> objectif de cette Thèse a été de se focaliser sur les données obtenues sur la ZMN des GB afin d'en identifier les caractéristiques. Cette ZMN est d'un intérêt particulier car les récurrences des GB après chirurgie et radio-chimiothérapie surviennent dans plus de 90% des cas dans cette zone, au niveau des berges de la cavité de résection. Nous disposons de peu d'informations sur les caractéristiques et le potentiel rôle pronocogénique de la ZMN dans la littérature et il nous a semblé pertinent d'en préciser les différentes propriétés à l'aide des données issues du PGGO et d'expérimentations complémentaires.

L'analyse des caractéristiques de cette ZMN des GB a été l'objet de plusieurs travaux :

- Réalisation d'une analyse protéomique comparant la ZMN et du tissu cérébral issu de la chirurgie de l'épilepsie
- Réalisation d'une analyse multimodale de la ZMN des GB
- Réalisation d'une revue bibliographique synthétisant l'état actuel des connaissances sur la ZMN
- Développement de nouvelles modalités d'analyse per-opératoire de la ZMN des GB afin d'optimiser la qualité de la résection chirurgicale

# Travail expérimental



# 1. Comparaison des résultats des analyses transcriptomiques et protéomiques du GB

Comme décrit précédemment dans l'objectif du travail de thèse, des analyses génomiques, transcriptomiques et protéomiques ont été réalisées sur les 4 zones du GB dans le cadre du PGGO (16,17,25). Pour comparer les données obtenues en transcriptomique avec les données de protéomique, nous avons sélectionné les échantillons des cinq patients pour lesquels l'étude comparative ZT vs ZMN a été effectuée dans les deux types d'analyses (Figure 10).

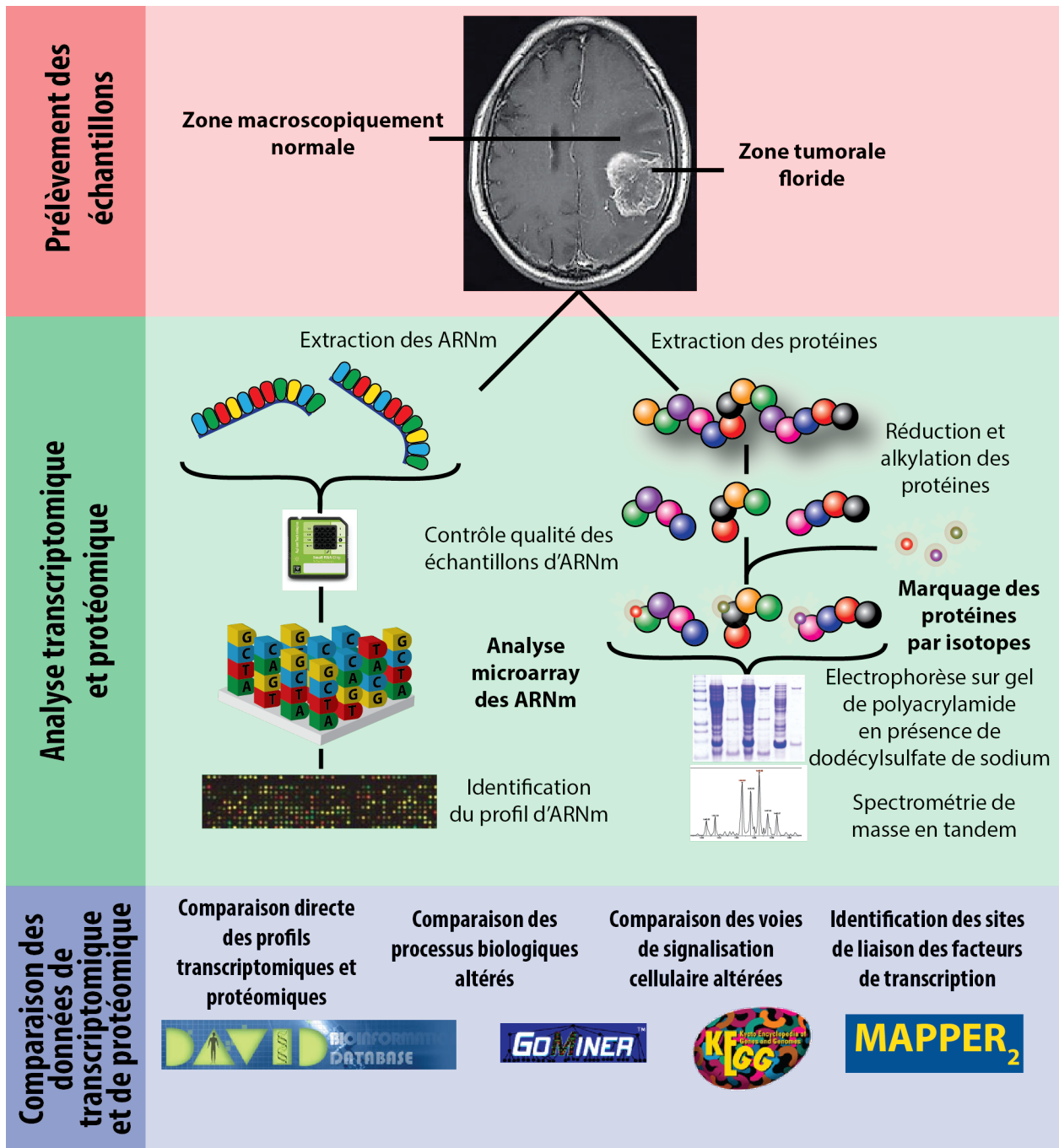


Figure 10 : Résumé de la méthodologie utilisée dans cette étude

Les profils transcriptomiques et protéomiques identifiés ont été comparés en utilisant différentes méthodes. La première a été de comparer directement les ARNm et les protéines dysrégulés. Ensuite, nous avons étudié les processus biologiques et les voies de signalisations cellulaires altérées suite à la modification des profils d'expression transcriptomique et protéomique. Enfin, nous avons recherché en amont de la région codante des gènes des protéines dysrégulées la présence de sites de liaison des facteurs de transcription (TFBSs), qui sont des sites de liaisons préférentiels des facteurs de transcription, susceptibles de modifier l'expression du gène situé en aval. Pour réaliser ces analyses, nous nous sommes appuyés sur des bases de données dédiées disponibles en ligne comme DavidGenes (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>), KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) et MAPPER<sub>2</sub> (<http://genome.ufl.edu/mapper/#se>).

De manière assez contre-intuitive, mais déjà décrite dans la littérature pour d'autre type de tissus (68–71), nous avons mis en évidence un faible taux de recouvrement entre les données de transcriptomique et de protéomique, retrouvant même une corrélation inverse entre le degré d'expression de certains ARNm et la production de la protéine correspondante. Nous avons néanmoins identifié une modification du peptide léger du neurofilament (*neurofilament light polypeptid* ou NEFL) comme une des caractéristiques communes entre le profil transcriptomique et le profil protéomique de la ZT des GB. L'expression de cette protéine dans le GB est inhabituelle car le GB est une tumeur astrocytaire et le NEFL n'est pas produit en temps normal par les cellules gliales, dont les astrocytes font partie. L'expression de cette protéine par les GB pourrait être notamment un signe d'invasivité car cette protéine interagit avec les tubuline et participe à la motilité cellulaire en servant d'interface entre l'actine et les tubulines.

Suite à ces résultats, nous avons effectué une revue de la littérature sur les mécanismes susceptibles d'expliquer la discordance obtenue entre les résultats en transcriptomique et en protéomique. La littérature sur ce sujet est succincte portant sur d'autres types de cancer ou chez la souris, et l'étude de la discordance des données issues de l'analyse transcriptomique et protéomique dans les GB est un sujet qui n'a, pour l'instant, fait l'objet d'aucune publication (70–73).

Cet article est actuellement **soumis à PLoS Genetics**.

❖ Article n°1 :

**Integration of transcriptomic and proteomic profiles in glioblastoma: looking for the missing link**

Lemée JM, Clavreul A, Aubry M, Com E, De Tayrac M, Mosser J, Menei P

*PLoS Genet, (soumis)*

# Integration of transcriptomic and proteomic profiles in glioblastoma: looking for the missing link

Jean-Michel LEMÉE<sup>1,2</sup>, Anne CLAVREUL<sup>1,2</sup>, Marc AUBRY<sup>3</sup>, Emmanuelle COM<sup>4</sup>, Marie De TAYRAC<sup>3,5</sup>, Jean MOSSER<sup>3,5</sup>, Philippe MENEI<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Département de Neurochirurgie, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, 4 rue Larrey, 49933 Angers Cedex 09, France

<sup>2</sup> INSERM UMR-1066, Micro- et Nanomédecine Biomimétiques, 4 rue Larrey, 49933 Angers Cedex 09, France

<sup>3</sup> UMR 6290 CNRS "Génomique fonctionnelle intégrée et biomarqueurs", Université Rennes1, 35043 Rennes, France

<sup>4</sup> Proteomic Core Facility BiogenOuest, IRSET, Inserm U1085, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes, France

<sup>5</sup> Service de Génétique Moléculaire et Génomique CHU de Rennes - Hôpital Pontchaillou 2 Rue Henri Le Guilloux 35033 Rennes Cedex 9, France

Running Title: Integration of transcriptomic and proteomic profiles in glioblastoma: looking for the missing link

Corresponding author:

Pr Philippe MENEI, M.D., Ph.D.

Department of Neurosurgery – University Hospital of Angers

4, rue Larrey 49933 Angers Cedex 09, France

Phone: +33 (0) 2 41 35 39 88

Fax: +33 (0) 2 41 35 45 08

Mail: phmenei@chu-angers.fr



# Introduction

Glioblastoma (GB) is the most common and aggressive primary brain tumors in adults. Despite years of research and clinical trials, median survival remains poor (1). Progress has been made in understanding the underlying biology of GB through genotype-based approaches and proteomics. The Cancer Genome Atlas (TCGA) analysis identified important genetic events in human GBs, including (i) dysregulation of growth factor signaling via amplification and mutational activation of receptor tyrosine kinase (RTK) genes; (ii) activation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway; and (iii) inactivation of the p53 and retinoblastoma tumor suppressor pathways (2). Recent genome-wide profiling studies have also shown remarkable genomic heterogeneity between GB and the existence of molecular subtypes with distinct biological features and clinical correlates (3–5). For example, Verhaak et al. (2010) described four subtypes of GB: proneural, neural, classical and mesenchymal characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR and NF1. However, Verhaak classification is questioned as GB is a very heterogeneous tumor and a recent study showed that different samples from the same tumor could have a distinct Verhaak subtype (6).

Recently, proteomic profiling of human glioma samples revealed a protein cluster (Huntingtin, HNF4a, c-Myc and 14-3-3z) that was differentially expressed in GB and might serve as a diagnostic marker (7,8). Another biomarker for GB discovered through omic analyses is the methylation status of MGMT, which predicts sensitivity to temozolomide, an alkylating agent that is the current standard of care for GB patients (9). More recently, the identification of the isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) mutation has diagnostic applications as it helps in distinguishing primary from secondary GB (2).

Until recently, understanding the behavior of GB has been pursued through independent analysis of the transcriptome or the proteome (10–13). Joint transcriptomic and proteomic profilings may reveal new biological insights, and identify pathogenic mechanisms or therapeutic target for GB therapy.

In this study, GB from five patients were analyzed through RNA microarray and isotope-coded protein label (ICPL) technology. The transcriptome and the proteome of GB tumor zone (TZ) were defined by comparison with the periphery brain zone (PBZ). The transcriptomic and proteomic integrative analysis was performed through 4 different approaches described by Haider and Pal (2013) (14): 1) Intersection of transcriptomic and proteomic data, 2) Extraction of common functional context of transcriptomic and proteomic features using biological processes 3) Identification of the common functional pathways altered in the 2 datasets, 4) Topological network methods, with the analysis of the transcription factor binding sites of the upregulated proteins identified in ICPL analysis.

## Material and methods

### Patients' recruitment

Five patients with both proteomic and transcriptomic analysis of their GB tissue were selected among the databank of the "Grand Ouest Glioma Projet". This project was a translational prospective multicentric study

that performed a multidisciplinary analysis of the GB tumor tissue. Patients included in this study were diagnosed with *de novo* GB.

All patients gave their informed consent prior to the enrolment. The protocol of this study was approved by the local ethics committee (CPP Ouest II, Angers, France).

## **GB and control brain sampling**

Image-guided neuronavigation was used during pre-surgical planning to define the sampling area in the florid GB tumor zone (TZ) in the contrast-enhanced area of the tumor. All tumor sampling were then performed using computer-assisted, image-guided neurosurgery in the previously defined region of interest, before surgical resection of the tumor, with a sampling volume around 1 cm<sup>3</sup> (Brainlab®, La Défense, France).

Control brain samples were taken from the macroscopically normal peritumoral brain tissue at least 1 cm from the tumor.

## **Transcriptomic analysis**

Transcriptomic analyses of the tumor samples were made according to the protocol described in our previous studies (15). In short, Total RNA was isolated with the NucleoSpin RNAII kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France) and RNA integrity (RNA integrity NC8) was assessed with an Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Transcriptomic analysis was carried out using Agilent Whole Human Genome 4x44K Microarray 15 Kit (Agilent technologies) according to the manufacturer's recommendations.

Data were log<sub>2</sub>-transformed and normalized (quantile normalization and baseline transformation) with *R* v3.1.0. (<http://www.r-project.org>). We used a non-parametric rank product method to account for hybridization bias and to identify genes up- or downregulated in GB tumor tissue compared to the peritumoral brain samples, using the *RankProd* R package. RNA were considered significantly differentially expressed if the false detection rate (FDR) was below 0.05 and the absolute fold-change (GBM vs. normal brain) was greater than 2.

## **Proteomic analysis**

The protocol for proteomic analyses of our data was described in our previous studies (10,11). To sum-up, tumor samples were analyzed using isotope-coded protein labeling. Intact proteins were labeled with isotopic derivatives of nicotinic acid of different molecular weight, followed by gel liquid chromatography and tandem mass spectrometry to identify and quantify proteins with an Esquire HCT Ultra PTM Discovery mass spectrometer.

Peptides were identified by querying the human Swiss-Prot with the Mascot search engine (v.2.2.07) applying a score above the identity threshold and a FDR < 1%. Differentially expressed proteins were identified by comparison to the peritumoral brain samples with a threshold >1.41 for up-regulated proteins and <0.71 for down-regulated proteins, which is above the calculated technical variation of the method (10).

## Comparison of transcriptomic and proteomic data

We compared the results from the transcriptomic and proteomic analyses of the GB tumor tissue according to 4 different methods:

- 1) We performed a direct comparison of the intersection of dysregulated transcripts and protein identified from tumor samples analyses, to identify the direct features overlap between transcriptomic and proteomic data.
- 2) We realized an analysis of the altered biological and functional processes in transcriptomic and proteomic data using DavidGenes (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>). The probability of alteration of the biological process was calculated using one-sided Fisher exact p value and the False Discovery Rate (FDR) was calculated using one-sided Fisher exact p value corrected for multiple comparisons.
- 3) The common functional altered pathway between transcriptomic and proteomic data were identified using KEGG database (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>). Biological processes and functional pathways were considered significantly altered in each dataset with a  $p < 0.05$  using Benjamini-Hochberg method.
- 4) We looked for the presence of direct edges between transcripts and proteins with the identification of the transcription factor binding sites (TFBSs) in the regulatory region upstream to the open reading frames of the dysregulated proteins identified in GB. The main objective of this analysis was to identify promoter proteins that may bind to the DNA of over-expressed proteins in proteomic analysis, and thus lead to an increase of their DNA translation. The search was performed using the Multi-genome Analysis of Positions and Patterns of Elements of Regulation search engine, running the set of proteins found to be dysregulated in GB (MAPPER<sub>2</sub>, <http://genome.ufl.edu/mapper/#se>).

## Results

### Direct comparison of dysregulated RNA and proteins

The transcriptomic analysis identified 478 differentially expressed probes among the 41000 analyzed. 437 non-redundant genes were identified with 101 genes over-expressed in the florid tumor zone, and 300 genes under-expressed, none of them correlated to the potential biomarkers of GB described in the literature (7,8)(List of differentially expressed probes in Supplementary data n°1). Proteomic analysis identified 584 non-redundant proteins. Among them 259 proteins were quantified and 31 proteins were found up-regulated in the TZ in at least 3/5 patients (Full proteomic data available in (10)).

The intersection between transcriptomic and proteomic data found 2 upregulated genes in common between the 2 datasets: the neurofilament, light polypeptide (NEFL) and the synapsin I (SYN1) (Figure 2a).

### Comparison of altered biological processes

The identification of the altered biological processes found 149 biological processes altered in the transcriptomic analysis and 23 biological processes altered in the proteomic analysis (List in Supplementary Data 2). The comparison between the 2 datasets found 12 altered biological processes in common, all

repressed in transcriptomic analysis while enriched in proteomic analysis, except for the “regulation of biological quality” process, which was enriched in both datasets (Figure 2b, Table 1).

Gene Ontology	Transcriptomic				Proteomic			
	Total Genes	Diff. genes	p	FDR (%)	Total Genes	Diff. genes	p	FDR (%)
GO:0003008 <b>system_process</b>	840	40	< 0.001	<0.01	27	9	<b>0.01</b>	0.37
GO:0007267 <b>cell-cell_signaling</b>	612	38	< 0.001	<0.01	23	8	<b>0.01</b>	0.40
GO:0007268 <b>synaptic_transmission</b>	297	31	< 0.001	<0.01	18	7	<b>0.01</b>	0.58
GO:0019226 <b>transmission_of_nerve_impulse</b>	326	33	< 0.001	<0.01	20	7	<b>0.02</b>	0.43
GO:0023046 <b>signaling_process</b>	1975	63	< 0.001	<0.01	41	13	<b>0.002</b>	0.25
GO:0023060 <b>signal_transmission</b>	1973	63	< 0.001	<0.01	41	13	<b>0.002</b>	0.25
GO:0050877 <b>neurological_system_process</b>	541	35	< 0.001	<0.01	21	7	<b>0.03</b>	0.39
GO:0007154 <b>cell_communication</b>	1174	41	<b>0.001</b>	<0.01	32	9	<b>0.04</b>	0.36
GO:0007269 <b>neurotransmitter_secretion</b>	50	8	<b>0.002</b>	<0.01	5	3	<b>0.03</b>	0.45
GO:0023052 <b>signaling</b>	2871	71	<b>0.003</b>	<0.01	53	13	<b>0.03</b>	0.46
GO:0044057 <b>regulation_of_system_process</b>	135	8	<b>0.05</b>	0.04	5	3	<b>0.03</b>	0.45
GO:0065008 <b>regulation_of_biological_quality</b>	1443	21	<b>0.05</b>	0.02	49	12	<b>0.05</b>	0.35

**Table 1: Common altered biological processes between transcriptomic and proteomic datasets.**

*Diff. genes:* differentially expressed genes

*FDR:* False Discovery Rate calculated with one-sided Fisher exact p value corrected for multiple comparisons

*Enr.:* Enrichment

*Green:* enriched processes

*Red:* repressed processes

## Comparison of altered functional pathways

The analysis of altered functional pathways using the KEGG database found 8 upregulated functional pathways altered in transcriptome analysis and 2 upregulated pathways in proteomic analysis. No significant overlap between transcriptomic and proteomic analyses was observed (Table 2).

	Pathway	Genes	Official Gene Symbol	Fold Change	p value	
T r a n s c r i p t o m i c	hsa04080: <b>Neuroactive ligand-receptor interaction</b>	18	GABRG1, GABRD, GABRG2, GABRA2, GABRA1, CCKBR, GRIN1, OXTR, GABBR2, GRM1, GRIN2C, SSTR1, PRSS2, PRSS3, ADRA1B, HTR5A, F2R, HTR2A	3.69	< 0.01	
	hsa04020: <b>Calcium signaling pathway</b>	14	CCKBR, GRIN1, OXTR, ITPKA, GRM1, ATP2B3, GRIN2C, ADRA1B, RYR2, CAMK2B, CAMK2A, HTR5A, F2R, HTR2A	4.17	< 0.01	
	hsa04512: <b>ECM-receptor interaction</b>	10	IBSP, COL4A2, COL4A1, CD44, TNC, COL3A1, COL1A2, SV2B, COL1A1, FN1	6.24	< 0.01	
	hsa00910: <b>Nitrogen metabolism</b>	4	GLS2, CA9, CA12, GLS	9.12	0.19	
	hsa04720: <b>Long-term potentiation</b>	6	GRIN2C, PPP1R1A, GRIN1, CAMK2B, CAMK2A, GRM1	4.63	0.15	
	hsa05014: <b>Amyotrophic lateral sclerosis</b>	5	SLC1A2, GRIN2C, GRIN1, NEFH, NEFL	4.95	0.24	
	hsa04510: <b>Focal adhesion</b>	9	IBSP, PAK6, COL4A2, COL4A1, TNC, COL3A1, COL1A2, COL1A1, FN1	2.35	0.38	
	hsa00471: <b>D-Glutamine and D-glutamate metabolism</b>	2	GLS2, GLS	26.21	0.59	
	P r o t e o m i c	hsa05130: <b>Pathogenic Escherichia coli infection</b>	5	ACTB, TUBB2A, TUBB2C, TUBB4, YWHAZ	19.39	0.00
		hsa00010: <b>Glycolysis / Gluconeogenesis</b>	4	ALDOA, PGAM1, HK1, ENO1	14.74	0.04

**Table 2: Functional pathways altered in transcriptomic and proteomic analyses in KEGG database**

## Identification of TFBSs

The analysis of TFBSs in the regulatory region located upstream from the open reading frames of the up-regulated proteins identified in the proteomic analysis allows the identification of 6 specific TFBSs (Table 3, Supplementary Data 3). No protein or mRNA related to these TFBSs was found to be dysregulated at the mRNA or protein level.

We observe that the TFBS Topoisomerase I Binding, Arginine/Serine-Rich, E3 Ubiquitin Protein (TOPORS) was found to be present upstream to the open reading frame regions of all identified proteins.

SYN1, one of the two dysregulated genes in common with the transcriptomic and proteomic analyses possess 2 identified TFBSs upstream to its open reading frame, NIL and RSRFC4. However none of the TFBSs-linked transcription factors were found upregulated at the mRNA or protein level in our analysis (Supplementary data 3).

TFBSs	Prot with TFBS	E value
<b>bZIP911</b>	MBP	0.05
<b>NIL</b>	SYN1	< 0.01
<b>PPARG</b>	TUBB4	0.01
<b>PPARG-RXRA</b>	GDI1, MBP, TUBB4	0.01 - 0.04
<b>RSRFC4</b>	SYN1	0.03
<b>TOPORS / LUN-1</b>	All	< 0.01- 0.05

**Table 3: Transcription factor binding sites (TFBSs) identified in the open reading frame region of the up-regulated proteins and their respective RNA profile in transcriptomic analysis, and the transcription factors associated with these TFBS**

E value: probability of the presence of the TFBS upstream of the open reading frame of the protein, corrected for multiple comparisons using the Benjamini-Hochberg method

## Discussion

This study is to our knowledge the first to compare GB's transcriptomic and proteomic data. Haider and Pal (2013) reviewed recently the existing major approaches for joint analysis of transcriptomic and proteomic data (14). From this publication, we chose to perform a direct comparison of the dysregulated proteins and mRNA followed by a comparison of the common functional processes and regulators from transcriptomic and proteomic data sets.

We identified a few common features between transcriptomic and proteomic data, like the dysregulation of NEFL and SYN 1 and the presence of TOPORS, a specific TFBS in the non-coding region of the dysregulated proteins. While NEFL and SYN1 are in common between the two omics analyses, they did not show the same dysregulation. They are underexpressed in TZ in the transcriptomic analysis while they are overexpressed in the proteomic analysis. This mismatch result between the two datasets has already been described in the literature (14).

The identification of NEFL as a common feature between transcriptomic and proteomic data from GB is interesting since glial cells do not normally produce NEFL. NEFL gene is located on chromosome 8p21 and the protein coded by this gene is one of the 3 proteins forming the neurofilament, part of the neuron cytoskeleton. Its mutation is linked to Charcot-Marie-Tooth disease (17). The production of NEFL by GB cells may be a distinct malignant feature that allows an increased mobility and invasivity of GB cells compared to normal glial cells: an up-regulation of NEFL gene in a sub-population of high mobility glioma cells was described (18). The increased production of NEFL in GB cells can also be the reflect of an increased mitotic activity since NEFL acts as a reserve for depolymerized tubulin in quiescent phase of the cell cycle and can accelerate the cell cycle. This is supported by the publications describing that a 24 amino acid peptide (NFL-TBS.40-63) corresponding to the tubulin-binding site located on the NEFL subunit, selectively enters in GB cells where it disrupts their microtubule network and inhibits their proliferation (19-22).

SYN1, whose gene is located chromosome Xp11, is a neuron phosphoprotein coating the synaptic vesicles, acting in the regulation of neurotransmitter release. This protein is involved in pre-synaptic

microvesicular exocytosis. Its mutation is linked to epilepsy, behavior disorders and learning disability (23). No link has been found in the literature between SYN1 mutation and dysregulation in GB, but, other molecules linked to microvesicular exocytosis and cell/cell communication were identified in one of our previous work comparing proteomic datas from the florid GB tumor zone and the peritumoral brain zone: Munc18, STX1B & VAMP2 (10).

The analysis of TFBSs located upstream from the open reading frame of the dysregulated proteins identified one ubiquitary TFBSs: TOPORS. The identification of TOPORS in all the dysregulated protein is interesting because it acts as a tumor-suppressor gene inhibiting cellular proliferation by blocking cells in G0-G1 phase (24), and this transcription factor has been already studied in GB, finding a significant correlation with a poor survival in glioblastoma (25,26). However, none of the proteins linked to these TFBSs were found to be upregulated at the transcript or protein level (Supplementary data 3).

The comparison of the altered biological and functional processes in transcriptomic and proteomic analyses shows 12 altered biological processes in common, related to cell communication, synaptic transmission and nervous system processes. The alterations of these processes in GB have been already described in the literature (27). Specific alterations were focused on the enhancement of cell signaling, without a specific dysregulation of biological process linked to tumorigenesis like cell cycle regulation, cell metabolism or cell motility. Also, no known pathways implied in tumorigenesis were found to be altered in both transcriptomic and proteomic analysis but only in one of the dataset, like D-glutamine metabolism in transcriptomics and the glycolysis / glyconeogenesis in proteomic analysis (28,29).

However, despite these few common features, the global overlap between the datasets is poor when comparing transcriptomic and proteomic data. The lack of similarity between transcriptomic and proteomic data found in this analysis is a known phenomenon, since the correlation between mRNA and protein abundances other studies has been reported to be notoriously poor (30–33). For example, only 17% of correlation was found between mRNA and proteins in lung adenocarcinoma (30,34). In prostate cancer, the correlation between gene and expression levels was also poor to moderate (35).

## **Known explanations of poor correlation between transcriptomic and proteomic data**

There are several explanations to the poor concordance between transcriptomic and proteomic data, depending of the techniques used for the transcriptome and proteome analysis, as well as the different biological properties and processes involved in the transcription and translation.

The choice of the analysis techniques is crucial in omics studies and affects directly the results and the possibility of comparison between different modalities (36,37). Recently, high-throughput techniques have transformed the genome and transcriptome analysis. We now dispose of fast and precise methods to display mRNA levels of almost any gene.

RNA microarray technique is the most used technique, allowing a fast and accurate identification of mRNA (38). However, the number of probe on the microarray chip limits this extension of mRNA detection and the probe set identification is a source of error in mRNA analysis. Despite the advent of high throughput RNA sequencing, our RNA microarray analysis remains adapted for low-input analyses like our study, whereas the RNA deep sequencing technology will be an alternative for future high-input studies (39).

The ICPL method chosen for proteomic allows a fast and accurate assessment of proteins level with an error rate <8% and a detection threshold of 5 fmol/L (40). Relative quantitative analysis assessment of protein expression levels is much more time-consuming than transcriptomics because of the need to go deeper in the dynamic range of the proteome, in order to identify lower abundant proteins, leads to the fractionation of the samples which multiply the number of analysis per samples. Compared to transcriptomic analysis, proteomics provides types of allowing a good description of the state of a biological system and that are not readily apparent from the sequence and the level of expression of the mRNA transcript without an appropriate data processing (32).

The main advantage of this integrated analysis is to identify easily pathways and processes altered in the dysregulated genes in both modalities. The main shortcoming being that this method is unable to create a dynamic model involving transcript and proteins (14). New bioinformatics tools are currently developed, including mathematical monetization of processes that may alter the transcript / protein correspondence, allowing to construct dynamic networks of mRNA / protein interaction using Bayesian network model (41,42).

On the biological front, differences can result from RNA splicing that is not detectable by the microarray platform in use, differential RNA and protein turnover, post-translational modifications, allosteric protein interactions and proteolysis processing events.

The physical properties of the mRNA have a great impact on translational efficiency (14). It has been previously reported that the half-life of mRNA is lower than the half-life of the proteins and that mRNA are less abundant than protein (43)(44). Temperature is also an important factor as RNA structure is temperature-sensitive and mRNA conformation may vary depending on the temperature (45,46). One other important feature in mRNA is the codon bias. Codon-bias described the fact that several codons may be used to translate the same amino-acid (up to 6 different codons for leucine) (47). This means that several distinct mRNAs can code for the same proteins, which influence the translation since the usage of more efficient codons increase the elongation rate and thus the speed of the translational process (48). Codon-bias has been considered as the most influential translational factor (49). Predicting the exact protein product from the transcript sequence is usually not possible because of effects such as internal ribosome entry sites, initiation at non-AUG codons, and nonsense read-through (50,51).

In proteins, several post-translational processes can modify the proteins half-life like phosphorylation, or ubiquitination. Also, when comparing transcriptomic and proteomic data, kinetic and delay of the translation of mRNA into protein are not taken into account. The proteomic data acquired resulting of the earlier transcriptome of the sample, not the one present simultaneously to the protein during the tissue sampling. This forbids us to identify several autoregulation processes like a protein overexpression that may induce a negative retro-control on its gene transcription.



Ribosome plays a key role in the translational process. First, the ribosome density is important as more ribosome means more proteins synthesized from the RNA strand but also increase RNA half-life (52). Translated mRNA (or ribosome-associated RNA) shows better correlation with protein expression levels (14,50). The ribosome-binding site (RBS), also known as the Kozak sequence in eukaryotic mRNA, or Shine-Dalgarno in prokaryotic mRNA, plays an essential role in the translational process (53,54). Transcripts that have weak RBS sequence are translated less efficiently, as showed in the case of specific alterations affecting P2 promoter of the *Escherichia coli* galactose operon (55).

Cell cycle plays also a role in translational regulation. mRNA expression levels and translation can vary through the different phases of the cell-cycle with the action of different mechanisms like microRNAs (56). This variability through the cell-cycle directly impacts the correlation between mRNA and proteins levels (57).

We saw that the poor correlation rate between transcriptomic and proteomic data can be explain by several factors, both biological or analytical that are not studied by the transcriptome / proteome analysis and comparison. These factors alone induce a bias in the comparison between the 2 modalities, influencing the transcriptional and translational processes, thus altering the correlation between these 2 datasets.

## **GB-specific alterations of transcriptional and translational processes**

Recent studies showed that cancer has an important impact on translational processes through multiples mechanisms, including the adaptation of the tumor and of the tumoral microenvironment (58). The role of eukaryotic initiation factors (eIF) alterations has been the subject of several studies, these molecules playing a key role in the initiation of the translational process, and ribosome mRNA interactions (59,60). Also, different pathways have an impact on proteins synthesis, the most known being the PI3K-Akt-mTOR and the Ras-Erk-MAPK pathways that stimulate translational mechanisms (61,62), increasing proteins synthesis.

More than the previous bias detailed above, GB tumor tissue possesses several specific properties able to influence the comparison between transcriptomic and proteomic data.

GB is by definition a heterogeneous tumor, which complicates the comparison between the two different analyses since even the use of mirror samples doesn't guaranty that the two samples are identical (15).

Also, Eder and Kalman (2014) conducted a review on the inter- and intra- heterogeneity of GB (6). Molecular definition of intratumoral heterogeneity of GB is somewhat lagging behind, but the data are rapidly growing. Nobusawa et al. (2010) observed numerous tumor area-specific genomic imbalances (63). Other studies showed that RTK amplifications are heterogeneously distributed in GB (64,65). Sottoriva et al. (2013) report that based upon gene expression levels, tumor fragments from the same patient may be classified into different GB subtypes (66).

In GB, translational processes have also been considered as more affected than transcriptional changes in glioma cell lines exposed to radiation, which is a part of the line of adjuvant treatment against GB (67). Specific alteration of translational processes have been identified in of eIF4E has been identified in glioblastoma, suggesting an increase of translational processes due to the cap-dependent facilitation (68). PTEN mutations have been identified in GB, leading to a reduced tumor latency and more aggressive phenotype using a PI3K-mediated pathway (69). Ras and Akt were also altered in GB, leading to substantial modifications of mRNA profile, recruiting of specific mRNA to the ribosomes without altering the translational process (70). Ribosome efficiency is increased in GB with an increase of ribosome-bound RNA compared to normal brain tissue (71).

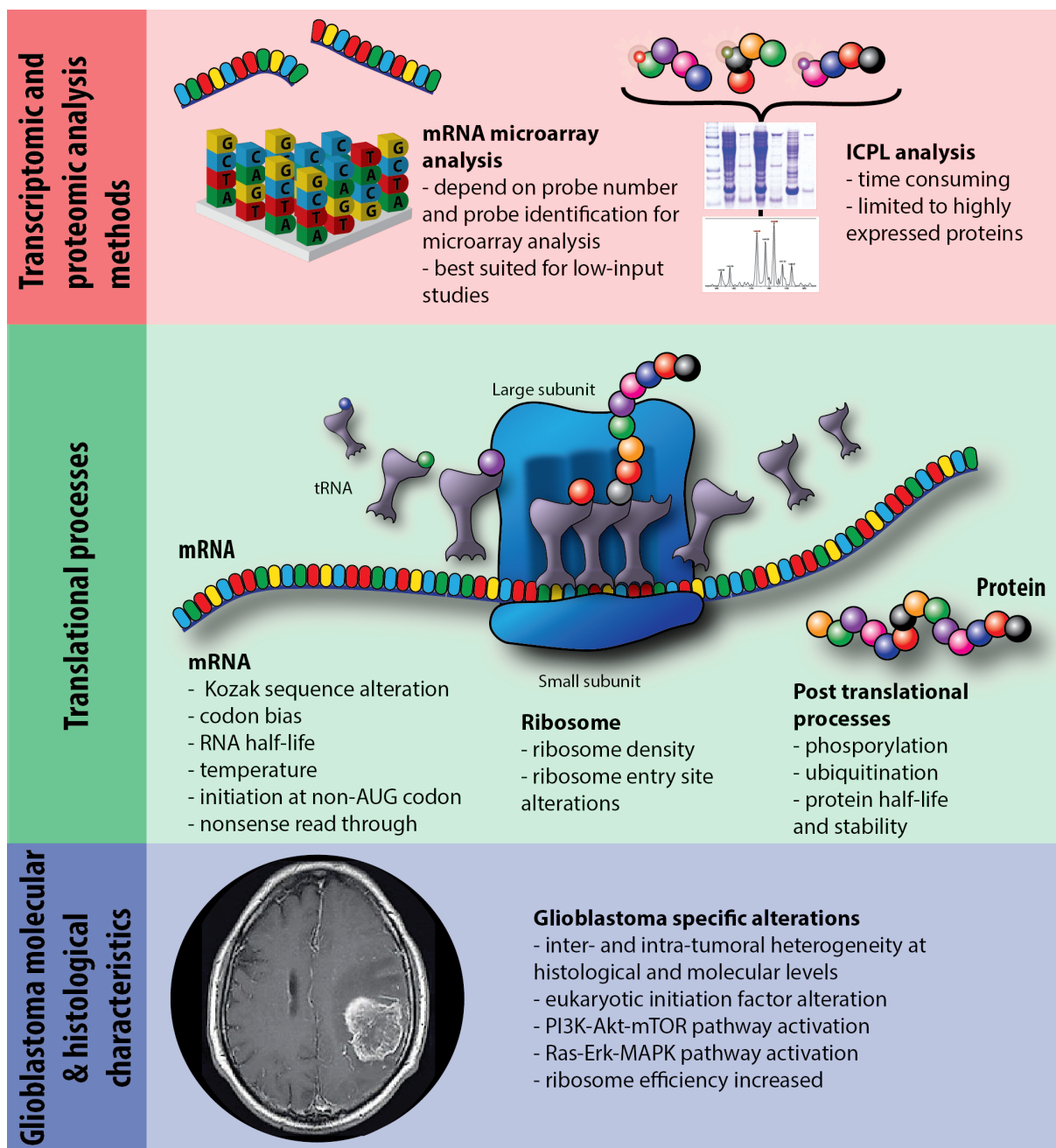


Figure 3: Summary of the technical bias intervening when comparing transcriptomic and proteomic data

## Conclusion

The correlation between transcriptomic and proteomic data is poor in glioblastoma sample, as described in other tissues. The translational process from mRNA to protein and its regulatory mechanisms can in themselves explain the low overlap between transcriptomic and proteomic data, as well as GB- and cancer-specific alterations.

Few biological processes linked to cancer and malignancy were found to be dysregulated, but we identified among the few overlapping features the dysregulation of NEFL and SYN1. These proteins are implicated in cell mitosis and in cell/cell communication, promoting tumor growth and invasiveness.

## Conflicts of interest, funding

The authors do not disclose any conflict of interest.

The first author of this article received grants from the *Société française de Neurochirurgie* and the *Institut national de la santé et de la recherche médicale*.

Collection and analysis of the GB sample was funded by the *Institut National du Cancer*.

## Bibliography

1. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005 Mar 10;352(10):987–96.
2. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. 2008 Oct 23;455(7216):1061–8.
3. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 2010 Jan 19;17(1):98–110.
4. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, et al. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell*. 2006 Mar;9(3):157–73.
5. Li A, Walling J, Ahn S, Kotliarov Y, Su Q, Quezado M, et al. Unsupervised analysis of transcriptomic profiles reveals six glioma subtypes. *Cancer Res*. 2009 Mar 1;69(5):2091–9.
6. Eder K, Kalman B. Molecular heterogeneity of glioblastoma and its clinical relevance. *Pathol Oncol Res POR*. 2014 Oct;20(4):777–87.
7. Simeone P, Trerotola M, Urbanella A, Lattanzio R, Ciavardelli D, Di Giuseppe F, et al. A unique four-hub protein cluster associates to glioblastoma progression. *PloS One*. 2014;9(7):e103030.
8. Malkki H. Neuro-oncology: Proteomic profiling could facilitate glioblastoma diagnosis. *Nat Rev Neurol*. 2014 Sep;10(9):484.
9. Hegi ME, Liu L, Herman JG, Stupp R, Wick W, Weller M, et al. Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2008 Sep 1;26(25):4189–99.

10. Com E, Clavreul A, Lagarrigue M, Michalak S, Menei P, Pineau C. Quantitative proteomic Isotope-Coded Protein Label (ICPL) analysis reveals alteration of several functional processes in the glioblastoma. *J Proteomics*. 2012 Jul 16;75(13):3898–913.
11. Lemée J-M, Com E, Clavreul A, Avril T, Quillien V, de Tayrac M, et al. Proteomic analysis of glioblastomas: what is the best brain control sample? *J Proteomics*. 2013 Jun 24;85:165–73.
12. Mangiola A, Saulnier N, De Bonis P, Orteschi D, Sica G, Lama G, et al. Gene expression profile of glioblastoma peritumoral tissue: an ex vivo study. *PLoS One*. 2013;8(3):e57145.
13. Piccirillo SGM, Dietz S, Madhu B, Griffiths J, Price SJ, Collins VP, et al. Fluorescence-guided surgical sampling of glioblastoma identifies phenotypically distinct tumour-initiating cell populations in the tumour mass and margin. *Br J Cancer*. 2012 Jul 24;107(3):462–8.
14. Haider S, Pal R. Integrated analysis of transcriptomic and proteomic data. *Curr Genomics*. 2013 Apr;14(2):91–110.
15. De Tayrac M, Etcheverry A, Aubry M, Saikali S, Hamlat A, Quillien V, et al. Integrative genome-wide analysis reveals a robust genomic glioblastoma signature associated with copy number driving changes in gene expression. *Genes Chromosomes Cancer*. 2009 Jan;48(1):55–68.
16. Paonessa F, Latifi S, Scarongella H, Cesca F, Benfenati F. Specificity protein 1 (Sp1)-dependent activation of the synapsin I gene (SYN1) is modulated by RE1-silencing transcription factor (REST) and 5'-cytosine-phosphoguanine (CpG) methylation. *J Biol Chem*. 2013 Feb 1;288(5):3227–39.
17. Tazir M, Bellatache M, Nouioua S, Vallat J-M. Autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease: from genes to phenotypes. *J Peripher Nerv Syst JPNS*. 2013 Jun;18(2):113–29.
18. Tatenhorst L, Senner V, Püttmann S, Paulus W. Regulators of G-protein signaling 3 and 4 (RGS3, RGS4) are associated with glioma cell motility. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2004 Mar;63(3):210–22.
19. Bocquet A, Berges R, Frank R, Robert P, Peterson AC, Eyer J. Neurofilaments bind tubulin and modulate its polymerization. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2009 Sep 2;29(35):11043–54.
20. Berges R, Balzeau J, Takahashi M, Prevost C, Eyer J. Structure-function analysis of the glioma targeting NFL-TBS.40-63 peptide corresponding to the tubulin-binding site on the light neurofilament subunit. *PLoS One*. 2012;7(11):e49436.
21. Berges R, Balzeau J, Peterson AC, Eyer J. A tubulin binding peptide targets glioma cells disrupting their microtubules, blocking migration, and inducing apoptosis. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. 2012 Jul;20(7):1367–77.
22. Laine A-L, Huynh NT, Clavreul A, Balzeau J, Béjaud J, Vessieres A, et al. Brain tumour targeting strategies via coated ferrociphenol lipid nanocapsules. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Für Pharm Verfahrenstechnik EV*. 2012 Aug;81(3):690–3.
23. Cesca F, Baldelli P, Valtorta F, Benfenati F. The synapsins: key actors of synapse function and plasticity. *Prog Neurobiol*. 2010 Aug;91(4):313–48.
24. Saleem A, Dutta J, Malegaonkar D, Rasheed F, Rasheed Z, Rajendra R, et al. The topoisomerase I- and p53-binding protein topors is differentially expressed in normal and malignant human tissues and may function as a tumor suppressor. *Oncogene*. 2004 Jul 8;23(31):5293–300.
25. Serão NVL, Delfino KR, Southey BR, Beaver JE, Rodriguez-Zas SL. Cell cycle and aging, morphogenesis, and response to stimuli genes are individualized biomarkers of glioblastoma progression and survival. *BMC Med Genomics*. 2011;4:49.
26. Bredel M, Bredel C, Juric D, Harsh GR, Vogel H, Recht LD, et al. High-resolution genome-wide mapping of genetic alterations in human glial brain tumors. *Cancer Res*. 2005 May 15;65(10):4088–96.
27. Dong H, Siu H, Luo L, Fang X, Jin L, Xiong M. Investigation gene and microRNA expression in glioblastoma. *BMC Genomics*. 2010;11 Suppl 3:S16.
28. Hensley CT, Wasti AT, DeBerardinis RJ. Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities. *J Clin Invest*. 2013 Sep 3;123(9):3678–84.
29. Beckner ME, Gobbel GT, Abounader R, Burovic F, Agostino NR, Laterra J, et al. Glycolytic glioma cells with active glycogen synthase are sensitive to PTEN and inhibitors of PI3K and gluconeogenesis. *Lab Investig J Tech Methods Pathol*. 2005 Dec;85(12):1457–70.
30. Maier T, Güell M, Serrano L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett*. 2009 Dec 17;583(24):3966–73.
31. Ghazalpour A, Bennett B, Petyuk VA, Orozco L, Hagopian R, Mungrue IN, et al. Comparative analysis of proteome and transcriptome variation in mouse. *PLoS Genet*. 2011 Jun;7(6):e1001393.
32. Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol*. 1999 Mar;19(3):1720–30.
33. Com E, Boitier E, Marchandeu J-P, Brandenburg A, Schroeder S, Hoffmann D, et al. Integrated transcriptomic and proteomic evaluation of gentamicin nephrotoxicity in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012 Jan 1;258(1):124–33.

34. Chen G, Gharib TG, Huang C-C, Taylor JMG, Misek DE, Kardia SLR, et al. Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol Cell Proteomics MCP*. 2002 Apr;1(4):304–13.
35. Pascal LE, True LD, Campbell DS, Deutsch EW, Risk M, Coleman IM, et al. Correlation of mRNA and protein levels: cell type-specific gene expression of cluster designation antigens in the prostate. *BMC Genomics*. 2008;9:246.
36. Louhimo R, Lepikhova T, Monni O, Hautaniemi S. Comparative analysis of algorithms for integration of copy number and expression data. *Nat Methods*. 2012 Apr;9(4):351–5.
37. Megger DA, Pott LL, Ahrens M, Padden J, Bracht T, Kuhlmann K, et al. Comparison of label-free and label-based strategies for proteome analysis of hepatoma cell lines. *Biochim Biophys Acta*. 2014 May;1844(5):967–76.
38. Heller MJ. DNA microarray technology: devices, systems, and applications. *Annu Rev Biomed Eng*. 2002;4:129–53.
39. Raghavachari N, Barb J, Yang Y, Liu P, Woodhouse K, Levy D, et al. A systematic comparison and evaluation of high density exon arrays and RNA-seq technology used to unravel the peripheral blood transcriptome of sickle cell disease. *BMC Med Genomics*. 2012;5:28.
40. Schmidt A, Kellermann J, Lottspeich F. A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels. *Proteomics*. 2005 Jan;5(1):4–15.
41. Nariai N, Kim S, Imoto S, Miyano S. Using protein-protein interactions for refining gene networks estimated from microarray data by Bayesian networks. *Pac Symp Biocomput Pac Symp Biocomput*. 2004;336–47.
42. Werhli AV, Husmeier D. Reconstructing gene regulatory networks with bayesian networks by combining expression data with multiple sources of prior knowledge. *Stat Appl Genet Mol Biol*. 2007;6:Article15.
43. Hargrove JL, Schmidt FH. The role of mRNA and protein stability in gene expression. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 1989 Oct;3(12):2360–70.
44. Schwanhäusser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, et al. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*. 2011 May 19;473(7347):337–42.
45. Chursov A, Kopetzky SJ, Bocharov G, Frishman D, Shneider A. RNAtips: Analysis of temperature-induced changes of RNA secondary structure. *Nucleic Acids Res*. 2013 Jul;41(Web Server issue):W486–491.
46. Grossman AD, Zhou YN, Gross C, Heilig J, Christie GE, Calendar R. Mutations in the rpoH (htpR) gene of *Escherichia coli* K-12 phenotypically suppress a temperature-sensitive mutant defective in the sigma 70 subunit of RNA polymerase. *J Bacteriol*. 1985 Mar;161(3):939–43.
47. Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol*. 2004 Jul;22(7):346–53.
48. Tuller T, Waldman YY, Kupiec M, Ruppin E. Translation efficiency is determined by both codon bias and folding energy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Feb 23;107(8):3645–50.
49. Lithwick G, Margalit H. Hierarchy of sequence-dependent features associated with prokaryotic translation. *Genome Res*. 2003 Dec;13(12):2665–73.
50. Ingolia NT, Ghaemmaghami S, Newman JRS, Weissman JS. Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science*. 2009 Apr 10;324(5924):218–23.
51. Namy O, Rousset J-P, Naphine S, Brierley I. Reprogrammed genetic decoding in cellular gene expression. *Mol Cell*. 2004 Jan 30;13(2):157–68.
52. Edri S, Tuller T. Quantifying the effect of ribosomal density on mRNA stability. *PLoS One*. 2014;9(7):e102308.
53. Shine J, Dalgarno L. Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes. *Nature*. 1975 Mar 6;254(5495):34–8.
54. Kozak M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res*. 1987 Oct 26;15(20):8125–48.
55. Bingham AH, Ponnambalam S, Chan B, Busby S. Mutations that reduce expression from the P2 promoter of the *Escherichia coli* galactose operon. *Gene*. 1986;41(1):67–74.
56. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Cell-cycle control of microRNA-mediated translation regulation. *Cell Cycle Georget Tex*. 2008 Jun 1;7(11):1545–9.
57. Greenbaum D, Colangelo C, Williams K, Gerstein M. Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biol*. 2003;4(9):117.
58. Cuesta R, Gupta M, Schneider RJ. The regulation of protein synthesis in cancer. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2009;90:255–92.
59. De Benedetti A, Graff JR. eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. *Oncogene*. 2004 Apr 19;23(18):3189–99.
60. Silvera D, Formenti SC, Schneider RJ. Translational control in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2010 Apr;10(4):254–66.

61. Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009 May;10(5):307–18.
62. Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer.* 2009 Aug;9(8):550–62.
63. Nobusawa S, Lachuer J, Wierinckx A, Kim YH, Huang J, Legras C, et al. Intratumoral patterns of genomic imbalance in glioblastomas. *Brain Pathol Zurich Switz.* 2010 Sep;20(5):936–44.
64. Little SE, Popov S, Jury A, Bax DA, Doey L, Al-Sarraj S, et al. Receptor tyrosine kinase genes amplified in glioblastoma exhibit a mutual exclusivity in variable proportions reflective of individual tumor heterogeneity. *Cancer Res.* 2012 Apr 1;72(7):1614–20.
65. Szerlip NJ, Pedraza A, Chakravarty D, Azim M, McGuire J, Fang Y, et al. Intratumoral heterogeneity of receptor tyrosine kinases EGFR and PDGFRA amplification in glioblastoma defines subpopulations with distinct growth factor response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Feb 21;109(8):3041–6.
66. Sottoriva A, Spiteri I, Piccirillo SGM, Touloumis A, Collins VP, Marioni JC, et al. Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Mar 5;110(10):4009–14.
67. Lü X, de la Peña L, Barker C, Camphausen K, Tofilon PJ. Radiation-induced changes in gene expression involve recruitment of existing messenger RNAs to and away from polysomes. *Cancer Res.* 2006 Jan 15;66(2):1052–61.
68. Tejada S, Lobo MVT, García-Villanueva M, Sacristán S, Pérez-Morgado MI, Salinas M, et al. Eukaryotic initiation factors (eIF) 2alpha and 4E expression, localization, and phosphorylation in brain tumors. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc.* 2009 May;57(5):503–12.
69. Bleau A-M, Hambardzumyan D, Ozawa T, Fomchenko EI, Huse JT, Brennan CW, et al. PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells. *Cell Stem Cell.* 2009 Mar 6;4(3):226–35.
70. Rajasekhar VK, Viale A, Socci ND, Wiedmann M, Hu X, Holland EC. Oncogenic Ras and Akt signaling contribute to glioblastoma formation by differential recruitment of existing mRNAs to polysomes. *Mol Cell.* 2003 Oct;12(4):889–901.
71. Helmy K, Halliday J, Fomchenko E, Setty M, Pitter K, Hafemeister C, et al. Identification of global alteration of translational regulation in glioma in vivo. *PLoS One.* 2012;7(10):e46965.

## 2. Analyse protéomique de la zone péri-tumorale du GB

### 2.1. Analyse du profil protéomique de la ZMN des GB

L'analyse des 4 zones du GB nous a amené par la suite à nous focaliser sur la zone péri-tumorale macroscopiquement normale du GB appelée ZMN. L'objectif de cette étude était d'identifier les marqueurs protéiques qui lui sont propres, pouvant potentiellement être utilisés dans le cadre de thérapies ciblées. Nous avons réalisé une analyse protéomique pour comparer 6 ZMN avec un pool de 3 échantillons de cerveau issus de la chirurgie de l'épilepsie, classiquement utilisés comme tissu contrôle dans les analyses de biologie moléculaire, dont les études omiques. Cette analyse a été effectuée comme précédemment au sein de la plateforme protéomique Biogenouest avec la technique ICPL, suivie d'une analyse par spectrométrie de masse en tandem (Figure 11).

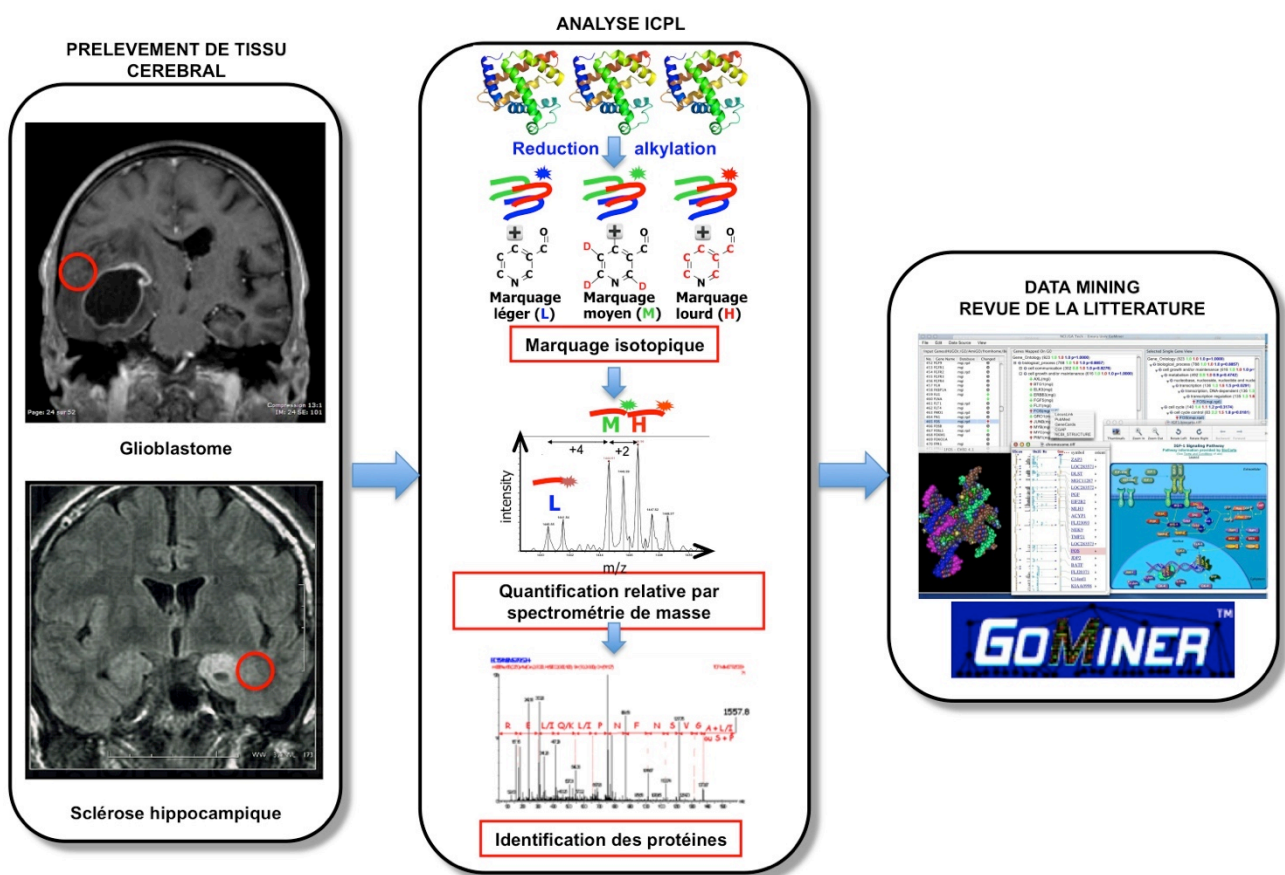


Figure 11: Résumé de la méthodologie utilisée pour l'analyse protéomique dans cet article

La comparaison des profils protéiques de la ZMN et du tissu cérébral « contrôle » issu de la chirurgie de l'épilepsie a montré 35 protéines différentiellement exprimées chez un minimum de 3 patients sur 6. De façon surprenante, nous avons observé une plus grande abondance de protéines surexprimées dans les échantillons issus d'épilepsie que dans la ZMN. Parmi les protéines surexprimées dans le tissu cérébral issu de la chirurgie de l'épilepsie, 5 protéines ont un rôle dans la pathologie épileptique mais aussi et de manière plus surprenante, plusieurs protéines surexprimées sont impliquées dans l'oncogénèse et dans les mécanismes

physiopathologiques des tumeurs cérébrales, suggérant un profil protéomique tumoral de la zone périphérique issue d'épilepsie.

Ce résultat indique que le tissu cérébral issu de cortectomies de foyers épileptiques ne représente pas un contrôle idéal pour caractériser le protéome de la ZMN et de la ZT. Ceci soulève la question du choix du tissu cérébral de contrôle le plus adapté lors de l'analyse protéomique des GB. Le contrôle idéal serait du tissu cérébral sain, dont l'obtention se heurte à d'évidentes difficultés techniques et éthiques qui rendent nécessaire la recherche d'alternatives.

Lors de la comparaison des profils protéomiques entre la ZMN et le tissu cérébral issu de la chirurgie de l'épilepsie, seules 6 protéines ont été retrouvées surexprimées dans la ZMN. Certaines sont ubiquitaires comme l'albumine et les histones (HIST1H2AC et HIST1H4A). La surexpression de la GFAP et de la MBP (*myelin basic protein*), s'explique vraisemblablement par une proportion de substance blanche plus importante dans les échantillons de ZMN comparée aux échantillons issus de la chirurgie de l'épilepsie.

L'histone H3.3 (H3F3A) est une protéine dont le rôle majeur dans l'étiopathogénie des gliomes du tronc de l'enfant et du jeune adulte a été récemment caractérisé (74). Le rôle de cette protéine dans l'oncogénèse et son application potentielle dans le développement de thérapies ciblées des gliomes du tronc de l'enfant et du jeune adulte font actuellement l'objet d'intenses recherches (75-77).

La CRYAB est une protéine chaperonne appartenant à la famille des *heat shock proteins*. Cette protéine possède un rôle neuroprotecteur dans la démyélinisation et régule l'angiogénèse tumorale en se fixant au VEGF, empêchant ainsi sa dégradation (78-80). Il a été mis en évidence que la surexpression de la CRYAB est un facteur de mauvais pronostic dans les cancers du colon et du poumon (81,82) ainsi qu'un facteur de résistance au traitement antiangiogénique dans le cancer du sein (83).

Ce travail a fait l'objet d'une **publication dans *Journal of Proteomics***, présenté ci-dessous.

L'implication de la CRYAB en tant que marqueurs pronostique de la réponse au traitement par bévacizumab chez les patients porteurs d'un GB n'a jamais été étudiée. Ceci nous a semblé une piste particulièrement intéressante à poursuivre dans le cadre de ce travail de Thèse. Les résultats de ce travail non publié sont présentés à la suite de l'article.



❖ Article n°2 :

**Proteomic analysis of glioblastomas: What is the best brain control sample?**

Lemée JM, Com E, Clavreul A, Avril T, Quillien V, De Tayrac M, Pineau C, Menei P

*Journal of Proteomics. 2013 Jun 24;85:165-73. doi: 10.1016/j.jprot.2013.04.031. Epub 2013 May*

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SciVerse ScienceDirect

[www.elsevier.com/locate/jprot](http://www.elsevier.com/locate/jprot)

## Proteomic analysis of glioblastomas: What is the best brain control sample?



Jean-Michel Lemée<sup>a,b,\*</sup>, Emmanuelle Com<sup>c</sup>, Anne Clavreul<sup>a,b</sup>, Tony Avril<sup>d,e,f</sup>,  
Véronique Quillien<sup>d,e,f</sup>, Marie de Tayrac<sup>e,f,g</sup>, Charles Pineau<sup>c</sup>, Philippe Menei<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Département de Neurochirurgie, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, LUNAM université, 4 rue Larrey, 49100 Angers, France

<sup>b</sup>LUNAM Université, INSERM UMR-1066, Micro- et Nanomédecine Biomimétiques (MINT), 4 rue Larrey, 49100 Angers, France

<sup>c</sup>Proteomic Core Facility Biogenouest, IRSET, Inserm U1085, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes, France

<sup>d</sup>Centre Eugène Marquis, Département de Biologie, 35042 Rennes, France

<sup>e</sup>CNRS, UMR 6290, Institut Génétique et Développement de Rennes, 35043 Rennes, France

<sup>f</sup>Université Rennes 1, UEB, IFR 140, Faculté de Médecine, 35043 Rennes, France

<sup>g</sup>CHU Rennes, Service de Génétique Moléculaire et Génomique, F-35033 Rennes, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 19 January 2013

Accepted 26 April 2013

Available online 4 May 2013

#### Keywords:

Proteomic

Glioblastoma

ICPL

Epilepsy

### ABSTRACT

Glioblastoma (GB) is the most frequent and aggressive tumor of the central nervous system. There is currently growing interest in proteomic studies of GB, particularly with the aim of identifying new prognostic or therapeutic response markers. However, comparisons between different proteomic analyses of GB have revealed few common differentiated proteins. The types of control samples used to identify such proteins may in part explain the different results obtained.

We therefore tried to determine which control samples would be most suitable for GB proteomic studies. We used an isotope-coded protein labeling (ICPL) method followed by mass spectrometry to reveal and compare the protein patterns of two commonly used types of control sample: GB peritumoral brain zone samples (PBZ) from six patients and epilepsy surgery brain samples (EB) pooled from three patients. The data obtained were processed using AMEN software for network analysis.

We identified 197 non-redundant proteins and 35 of them were differentially expressed. Among these 35 differentially expressed proteins, six were over-expressed in PBZ and 29 in EB, showing different proteomic patterns between the two samples. Surprisingly, EB appeared to display a tumoral-like expression pattern in comparison to PBZ.

In our opinion, PBZ may be more appropriate control sample for GB proteomic analysis.

#### Biological significance

This manuscript describes an original study in which we used an isotope-coded protein labeling method followed by mass spectrometry to identify and compare the protein patterns in two types of sample commonly used as control for glioblastoma (GB) proteomic analysis: peritumoral brain zone and brain samples obtained during surgery for epilepsy. The choice of control samples is critical for identifying new prognostic and/or diagnostic markers in GB.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

\* Corresponding author at: Département de Neurochirurgie, CHU Angers, 4 rue Larrey, 49933 Angers Cedex 09, France. Tel.: +33 241353988; fax: +33 241354508.

E-mail address: [lemee.jmichel@wanadoo.fr](mailto:lemee.jmichel@wanadoo.fr) (J.-M. Lemée).

## 1. Introduction

Glioblastoma (GB) is the most frequent and aggressive tumor of the central nervous system. Despite the development of new therapies, the prognosis remains poor, with a mean progression-free survival of 7 months and an average survival of 12 to 15 months [1,2]. Even following gross total resection and optimal adjuvant treatment, recurrence is extremely common, mainly from the margin of the resection cavity [3–5].

GB is a very heterogeneous group of tumors [6], involving different zones; both genomic [7,8] and proteomic [9–11] approaches have been used to study these tumors. These analyses led to the identification of different markers, allowing the characterization of different subtypes of GBs and tumoral mechanisms, and may serve as a basis for the development of new therapies focused on the molecular, genetic and proteomic particularities of GB.

In one of our previous proteomic studies, we used an isotope-coded protein label (ICPL) method to compare three areas of GB: the tumor zone (TZ), the interface zone between the tumor and the parenchyma (IZ) and the peritumoral brain zone (PBZ). We successfully identified 35 proteins over-expressed in the core of the tumor by comparison with the periphery and showed that 23 of these belong to a cohesive network of physically interacting proteins linked to several cellular functions [10].

However, few of the 35 proteins that we found to be altered in TZ are the same as those identified by previous studies (Table 1). For example, Khalil [12] used 2DE with MALDI-TOF MS and LC-MS/MS to analyze 30 GB samples with seven control samples obtained from epilepsy surgery for reference. Forty-six differentially expressed proteins were identified of which only ten proteins were in common with our study ( $\beta$ -actin, CKB, GDI1, ALDOA, 14-3-3 $\gamma$ , ATP5A1, ALB, GFAP, NEFL, ENO1). Except for  $\beta$ -actin, most of these proteins showed a different pattern of expression to that described in this previous study. Indeed, we found these proteins to be over-expressed in TZ versus PBZ whereas Khalil [12] observed under-expression in GB samples versus control epilepsy samples. To understand the apparent differences in the protein expression patterns between the two studies, we conducted a bibliographical search for proteomic analyses of fresh brain tumor samples (reported in Table 1). This analysis revealed substantial heterogeneity in results associated with the different proteomic analysis techniques employed and the control tissues used. Indeed, differences in both the analytical methodologies and the control tissues used may explain the only weak similarities between proteomic patterns reported by the various studies.

Obviously, normal live brain samples are not available to be used as control samples under all circumstances, and consequently the control samples commonly used in GB proteomic studies include brain tissue obtained during surgery for epilepsy (EB) or from the walls of the resection cavity during GB surgery (PBZ), with the informed consent of the patient.

However, it is unclear whether PBZ or EB brain samples, commonly used as controls, can be considered to be “normal” brain tissue, and therefore whether they are appropriate for

proteomic comparisons and describing the differential proteomic expression pattern of brain tumors.

The aim of this study was to analyze and compare the protein expression patterns of these two control tissues (PBZ versus EB) using the ICPL proteomic method, and to determine which is the most suitable for use as control tissue for proteomic analyses of brain tumors.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Clinical materials

Six patients whose diagnosis of primary GB (WHO 2007 classification) was confirmed by a central committee of neuropathologists and three patients undergoing epilepsy surgery were included in the study. This study was approved by the relevant ethics committee (CPP Ouest II, Angers, France) and all patients signed an informed consent form for participation in this study.

The tumoral zone and PBZ from GB were defined on preoperative T1 gadolinium-enhanced 3D MRI. Stereotaxic biopsies were performed in the operating theater, by computer-assisted neurosurgery (BrainLab®, La Défense, France). EB was obtained from cortical resection during surgery for epilepsy after identification of the epileptic cradle using per-operative electroencephalograms and electrostimulation.

Histological analysis and protein extraction were performed for each biopsy specimen. For histological analysis, formalin-fixed, paraffin-embedded sections of the biopsy specimens were stained with hematoxylin–phloxin–safran.

### 2.2. Tissue protein extraction

Protein extracts of tissue samples were prepared as previously described [10]. Briefly, cell pellets from PBZ and EB samples were resuspended in cold lysis buffer (6 M guanidine HCl, pH 8.5, cells/buffer: 1/2.5(v/v)) and sonicated on dry ice with an ultrasonic processor (Bioblock Scientific, Illkirch, France) six times for 10 s with 30 s pauses between using a microtip setting power level at 40% pulse duration. The homogenates were centrifuged (15,000 g, 30 min, 4 °C) and the resulting supernatants were then ultracentrifuged (105,000 g, 1 h, 4 °C). Protein concentrations in the resulting supernatants were measured with a BioRad Protein Assay Kit (BioRad, Marnes-la-Coquette, France) according to the manufacturer's instructions. The samples from the three patients undergoing epilepsy surgery were pooled.

### 2.3. ICPL labeling and protein digestion

The experimental design and the ICPL method are described in Table 2. ICPL labeling was performed on 50  $\mu$ g of PBZ or pooled EB samples as previously described [10], according to the experimental design described in Table 2. Labeled proteins (50  $\mu$ g) were separated by SDS-PAGE in 12% precast gels (GeBeGel, Gene Bio Application), which was then stained with Coomassie blue R-350 using the EZBlue gel staining reagent (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France).

**Table 1 – Overview of the GB biopsy proteomic literature and comparison of the proteins identified with our previous study\* [10].**

Reference	Year	n	WHO grade	Method	Control	Proteins differentially expressed	Proteins in common*
[28]	2011	5	GB	2DGE, MALDI-TOF MS, 2D-PAGE, Western Blot	EB	22	4
[29]	2009	27	GB	Western Blot	Cancer genome atlas	55	1
[30]	2009	1	GB	HPLC-ESI-MS/MS	PBZ	15	–
[31]	2009	3	GB	2DGE, MALDI-TOF MS	PBZ	8	1
[12]	2007	41	24 primary GBs 4 secondary GBs 4 grade III 2 grade II 7 epilepsy	2D-PAGE, 2DGE, MALDI-TOF MS	EB	91	9
[32]	2007	20	10 GBs 10 controls	Nano-LC prior to MALDI-TOF/TOF	Samples from different patients with a variety of CNS conditions	16	0
[33]	2005	20	10 grade IV 10 grade II	2DGE, LC – ESI – MS/MS, Western Blot	PBZ	15	2
[34]	2005	13	GBs	2DGE	PBZ	19	1
[35]	2005	127	57 GBs 22 grade III glioma 29 grade II glioma	MALDI-TOF	19 patients undergoing surgery for “non-neoplastic diseases”	24	0
[36]	2005	27	10 GBs 14 grade III 1 grade II 2 grade I	2DGE, MALDI-TOF MS	EB	29	4
[37]	2004	85	52 GBs 13 grade III 10 grade II 10 epilepsy	2DGE, MALDI-TOF MS	PBZ	37	2
[38]	2004	18	4 GBs 2 oligo II 2 AO grade III 2 embryonal carcinoma 1 pheochromocytoma 1 DNET 1 gemistocytic astrocytoma grade II	MALDI-MS	EB	Identification of protein patterns without protein characterization	–
[39]	2003	5	2 GBs 2 grade III 1 grade I	2DGE, MALDI-TOF MS	PBZ from the same patient	15	1
[40]	2003	4	4 GBs	SELDI-TOF-MS	None	Identification of protein profiles without protein characterization	–
[41]	2001	94	56 GBs 13 AAIII 25 low-grade gliomas	Western Blot analysis	Lysates from 16 week old fetuses	14	0

GB: glioblastoma; AA: anaplastic astrocytoma; AO: anaplastic oligodendroglioma; oligo: oligodendroglioma; DNET: Dysembryoplastic neuroepithelial tumor; 2DGE: 2D Gel electrophoresis; ICPL: isotope coded protein labeling; LC-ESI: liquid chromatography electrospray ionization; MALDI-TOF: matrix-assisted laser desorption ionization time of flight; nano-LC: nanoliquid chromatography; SELDI-TOF: surface enhanced laser desorption ionization time of flight; PBZ: peritumoral brain zone, EB: peripheral epilepsy surgery brain zone.

Entire gel lanes were cut into 20 sections, which were washed in different ACN/100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  solutions. In-gel digestion was performed overnight at 37 °C with modified trypsin (Promega, Charbonnières-lès-Bains, France) following a previously described protocol [13]. Proteolytic peptides were then extracted from the gel sections by sequential incubation in the following solutions: ACN/ $\text{H}_2\text{O}$ /TFA, 70:30:0.1 (v/v/v), 100% ACN and ACN/ $\text{H}_2\text{O}$ /TFA, 70:30:0.1 (v/v/v), and the extracts

were concentrated by evaporation down to a final volume of 30  $\mu\text{L}$ .

#### 2.4. GLC-MS/MS analysis and protein identification and relative quantification

Proteolytic mixtures were analyzed on a nano-HPLC system (Ultimate 3000, Dionex, Jouy-en-Josas, France) coupled on-line

**Table 2 – Experimental design of the ICPL labeling for each sample.**

	L	M	H
Reaction 1	EB pool	GB3-PBZ	GB16-PBZ
Reaction 2	GB10-PBZ	EB pool	GB25-PBZ
Reaction 3	GB22-PBZ	GB26-PBZ	EB pool

L: light ICPL reagent, M: medium ICPL reagent, H: heavy ICPL reagent, GB-PBZ: glioblastoma-peritumoral brain zone, EB pool: peripheral epilepsy surgery brain samples pooled from three patients.

with an Esquire HCT Ultra PTM Discovery mass spectrometer (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany), equipped with a nanoflow ESI source and an ion trap analyzer (ITMS) as previously described [10]. The EsquireControl™ software (Bruker Daltonik GmbH) automatically altered MS and MS–MS acquisitions and was tuned to preferentially subject ICPL-labeled peptides to MS–MS acquisitions. DataAnalysis™ 3.4 software (Bruker Daltonik GmbH) was used to create the peak lists from raw data. For each acquisition, a maximum of 700 compounds was detected with an intensity threshold of 100,000 and the charge state of precursor ions was automatically determined by resolved-isotope deconvolution. ProteinScape™ 2.0 software (Bruker Daltonik GmbH) was used to submit MS/MS data to the Swiss-Prot database (version 70, November 2011, *Homo sapiens* taxonomy, 20,257 sequence entries) and the randomized version of this database (decoy) to determine the false positive rate (FPR), defined as the number of validated decoy hits / (number of validated targets hits + number of decoy hits) \* 100, using the Mascot algorithm (Mascot server v2.2, <http://www.matrixscience.com>) as previously described [10]. Given that modification of lysine residues by ICPL labeling prevents their cleavage by trypsin, arginine C was selected as the enzyme with one allowed miscleavage. Carbamidomethylation of cysteines was set as a fixed modification, and labeling of lysine residues by light (L), medium (M) or heavy (H) ICPL reagents, and methionine oxidation were considered as variable modifications. The mass tolerance for parent and fragment ions was set to 0.25 and 0.5 Da, respectively. Peptide identifications were accepted if the individual ion Mascot scores were above 30 or above the identity threshold (the ion score is  $-10 * \log(p)$ , where  $p$  is the probability that the observed match is a random event,  $p$ -value < 0.05). The ProteinExtractor algorithm [14] was used to compile identified peptides to proteins as previously described [10]. Every protein reported was identified by at least one peptide with significant ion Mascot score (above the identity threshold) and which cannot be mapped to a higher-ranking protein already in the result list, and protein identifications were accepted if the FPR of the search was lower than 1%.

WarpLC 1.2 software (Bruker Daltonik GmbH) was used for relative protein quantification; this software automatically calculates H/L, M/L and H/M ratios by comparing the relative intensities of  $m/z$  ratios corresponding to the labeled peptides observed on MS spectra using DataAnalysis 3.4 software using previously described parameters [10]. The minimum differences in H/L, M/L, and H/M ratios associated with significant differences in protein expression were determined by calculating the

technical variability of our system as previously described [10] and the significant threshold was fixed at 2 standard deviations from the normalized median of each H/L, M/L and H/M ratio; this gave thresholds of 1.41 for over-expressed proteins and 0.71 for under-expressed proteins (data not shown).

### 2.5. Gene ontology term enrichment and network analysis

The Annotation, Mapping, Expression and Network (AMEN) suite of software tools [16] was used to assess biological process GO term enrichment in the GB-PBZ/EB differential protein group using the International Protein Index human proteome for reference (release 3.8) [20]. To be significantly over-represented in a group of genes, a GO term should have a  $p$ -value (adjusted with FDR by the Benjamin-Hochberg Method) lower than 0.01 and at least three proteins had to be associated with the annotation involved. A high Ontology Specific Information Rate (OSIR) cut-off,  $\geq 0.4$ , was selected to avoid redundancy between closely related terms.

The network representation was drawn using AMEN and seven protein interaction databases: IntAct (release 2010-03, <http://www.ebi.ac.uk/intact>), MINT (release 2010-03, <http://160.80.34.4/mint/Welcome.do>), BioGRID (release 2010-03, <http://thebiogrid.org>), DIP (release 2010-04, <http://dip.doe-mbi.ucla.edu>), HPRD (release 2010-04, <http://www.hprd.org>), CORUM (release 2010-04, <http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/corum>), and MatrixDB (release 2010-04, <http://matrixdb.icbp.fr>).

## 3. Results and discussion

This study is, to our knowledge, the first to compare the proteomic profiles of peritumoral brain zone tissue from GB and brain tissue samples obtained after epilepsy surgery to assess which is the most suitable for use as control samples for proteomic studies of GB.

Macroscopically, PBZ samples are composed of a mixture of grey and white matters but the proportion of white matter is greater because of the usual localization of GB in the brain. As GB is an highly infiltrative tumor, histological analysis of PBZ can show microsatellite tumors or isolated infiltrated GB cells. For all the samples included in this study, histological analysis indicated an infiltration of tumor cells in two PBZ samples only (between 5–10%) (data not shown). However, this infiltration was too low to alter the genomic and proteomic profiles of PBZ. In fact, while array CGH analysis of TZ indicated gain of chromosome 7 and loss of chromosome 9 and 10, no such genomic aberrations were observed in corresponding PBZ (data not shown). As epileptic zone are usually cortical, EB samples are principally composed of grey matter with a small contingent of white matter. Consequently, these two types of brain tissue sample are divergent, with different cytoarchitectural organizations and containing different types of neural cells.

We used the ICPL technique to compare the proteomes of these two types of brain tissue sample because it allows high-throughput, quantitative proteome profiling in an accurate and reproducible manner for up to four different samples [13]. Unlike other MS-based differential proteomic approaches,



**Table 3 – Number of identified and quantified proteins for each patient.**

	# identified proteins <sup>b</sup>	# quantified proteins <sup>c</sup>	PBZ/EB		
			<0.71 <sup>d</sup>	>0.71 and <1.41 <sup>e</sup>	>1.41 <sup>f</sup>
GB3 <sup>a</sup>	145	72	42	19	11
GB10 <sup>a</sup>	123	58	36	10	12
GB16 <sup>a</sup>	145	72	22	40	10
GB22 <sup>a</sup>	116	55	36	11	8
GB25 <sup>a</sup>	123	58	34	12	12
GB26 <sup>a</sup>	116	55	46	6	3

<sup>a</sup> The anonymous designation of each patient is reported in the first column,  
<sup>b</sup> Number of unique identified proteins,  
<sup>c</sup> Number of unique quantified proteins,  
<sup>d</sup> Number of unique quantified proteins with a ratio <0.71 (expression decrease above 41%),  
<sup>e</sup> Number of unique quantified proteins with a ratio >0.71 and <1.41 (non modulated expression),  
<sup>f</sup> Number of unique quantified proteins with a ratio >1.41 (expression increase above 41%).

this technique can be applied both to cell cultures and to tissue samples and provides information about protein isoforms [14,15]. The ICPL technique is also informative about non-differential proteins thanks to the simultaneous quantification and identification.

By querying the human Swiss-Prot database, we identified 197 non-redundant proteins with a score above the identity threshold and with a FDR < 1% (Supplementary Table 1). The numbers of identified and quantified proteins per patient are reported in Table 3.

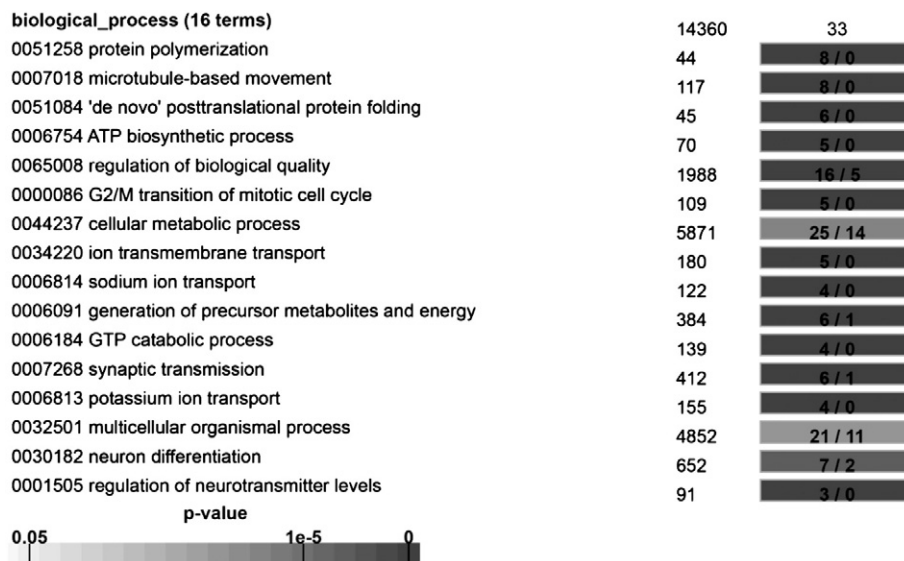
To assess the differential expression of proteins between PBZ and EB samples, we selected proteins with an average ratio,

in six analyzed patients, of > 1.41 or < 0.71, with individual ratios > 1.41 or < 0.71 in at least 3/6 patients with a minimum of two peptides in at least 50% of the patients. On this basis, we identified 35 proteins the expression of which differed between PBZ and EB. Most of these proteins (29/35 proteins, or 83%) were more weakly expressed in PBZ than EB, and only six were more strongly expressed (Table 4).

AMEN software was used to evaluate GO term enrichment. The over-represented biological functions (p-value < 0.01) in EB are associated with energy metabolism, nervous system development, synaptic transmission, cellular transport and protein folding and processing (Fig. 1). We previously observed these biological functions as being up-regulated in GB biopsies by comparison with PBZ samples used for reference [10]. Furthermore, we identified a functional network including 21 of the 35 proteins differentially expressed between PBZ and EB (Fig. 2).

An analysis of the literature revealed that some of the six proteins up-regulated in GB-PBZ are ubiquitous, components of basic cellular pathways like DNA folding for histones (HIST1H2AC and HIST1H4A) or involved in the regulation of the osmotic pressure of blood, such as albumin. We will not consider these proteins further. The up-regulation of the myelin basic protein (MBP) and the glial fibrillary acidic protein (GFAP) observed in PBZ may be related to the fact that this zone contain more white matter than EB. Note, however, that two of the up-regulated proteins, the crystallin B α-chain (CRYAB) and the histone H3F3A have known oncogenic roles.

The histone H3F3A was not considered to be an oncogene until recently when two publications reported that it is a specific and reproducible marker of pontine GB [16,17]. These articles document two mutations, K27M and G64V, in a large cohort of children with pediatric GB. They also report that the K27M mutation is preferentially associated with cases with older onset, during teenage, and a hemispheric localization [16]. Therefore, the histone H3F3A up-regulation in GB-PBZ/EB we observed is of interest. Possibly, this up-regulation could be the result of one of



**Fig. 1 – Biological processes involving the differentially expressed proteins. The color scale represents the down (in blue) or up-regulation (in red) with their respective corrected p-value for each GO term. Bold characters display a significant enrichment.**

**Table 4 – Selection of proteins differentially expressed between PBZ and EB samples.**

Accession <sup>a</sup>	Protein name <sup>b</sup>	# ratio <sup>c</sup>	Geometric mean <sup>d</sup>	PBZ/EB		% ratio quantified with 1 peptide <sup>g</sup>
				CV <sup>e</sup>	Ratio >1.41 or <0.71 / # patient <sup>f</sup>	
<i>Up-regulated proteins</i>						
CRYAB_HUMAN	Alpha-crystallin B chain OS = <i>Homo sapiens</i> GN = CRYAB PE = 1 SV = 2	4	2.45	0.34	4/6	50%
H2A1C_HUMAN	Histone H2A type 1-C OS = <i>Homo sapiens</i> GN = HIST1H2AC PE = 1 SV = 3	4	2.43	0.35	3/6	50%
H33_HUMAN	Histone H3.3 OS = <i>Homo sapiens</i> GN = H3F3A PE = 1 SV = 2	6	2.13	1.13	4/6	0%
H4_HUMAN	Histone H4 OS = <i>Homo sapiens</i> GN = HIST1H4A PE = 1 SV = 2	6	2.05	0.81	4/6	0%
ALBU_HUMAN	Serum albumin precursor — <i>Homo sapiens</i> (Human)	6	2.04	1.01	4/6	0%
GFAP_HUMAN	Glial fibrillary acidic protein OS = <i>Homo sapiens</i> GN = GFAP PE = 1 SV = 1	6	1.70	0.87	4/6	0%
MBP_HUMAN	Myelin basic protein OS = <i>Homo sapiens</i> GN = MBP PE = 1 SV = 3	6	1.27	0.61	3/6	0%
<i>Down-regulated proteins</i>						
PRDX2_HUMAN	Peroxiredoxin-2 OS = <i>Homo sapiens</i> GN = PRDX2 PE = 1 SV = 5	6	0.81	0.56	3/6	0%
ENOA_HUMAN	Alpha-enolase — <i>Homo sapiens</i> (Human)	6	0.71	0.41	3/6	0%
CLH1_HUMAN	Clathrin heavy chain 1 OS = <i>Homo sapiens</i> GN = CLTC PE = 1 SV = 5	6	0.66	0.26	3/6	33%
DYN1_HUMAN	Dynamamin-1 OS = <i>Homo sapiens</i> GN = DNMI PE = 1 SV = 2	4	0.66	0.43	3/6	0%
1433B_HUMAN	14-3-3 protein beta/alpha OS = <i>Homo sapiens</i> GN = YWHAB PE = 1 SV = 3	4	0.58	0.50	3/6	0%
1433G_HUMAN	14-3-3 protein gamma OS = <i>Homo sapiens</i> GN = YWHAG PE = 1 SV = 2	6	0.58	0.37	4/6	0%
TBA4A_HUMAN	Tubulin alpha-4A chain OS = <i>Homo sapiens</i> GN = TUBA4A PE = 1 SV = 1	6	0.57	0.57	4/6	0%
TBB3_HUMAN	Tubulin beta-3 chain OS = <i>Homo sapiens</i> GN = TUBB3 PE = 1 SV = 2	6	0.56	0.40	5/6	0%
PEBP1_HUMAN	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 — <i>Homo sapiens</i> (Human)	4	0.56	0.24	3/6	50%
TBB4_HUMAN	Tubulin beta-4 chain OS = <i>Homo sapiens</i> GN = TUBB4 PE = 1 SV = 2	6	0.56	0.36	5/6	0%
ADT3_HUMAN	ADP/ATP translocase 3 OS = <i>Homo sapiens</i> GN = SLC25A6 PE = 1 SV = 4	4	0.55	0.35	3/6	50%
RAC3_HUMAN	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 3 OS = <i>Homo sapiens</i> GN = RAC3 PE = 1 SV = 1	4	0.54	0.42	3/6	50%
TBB5_HUMAN	Tubulin beta chain OS = <i>Homo sapiens</i> GN = TUBB PE = 1 SV = 2	4	0.54	0.39	3/6	0%
TBA1A_HUMAN	Tubulin alpha-1A chain OS = <i>Homo sapiens</i> GN = TUBA1A PE = 1 SV = 1	6	0.53	0.54	5/6	0%
TBA1B_HUMAN	Tubulin alpha-1B chain OS = <i>Homo sapiens</i> GN = TUBA1B PE = 1 SV = 1	6	0.53	0.54	5/6	0%
TBB2A_HUMAN	Tubulin beta-2A chain OS = <i>Homo sapiens</i> GN = TUBB2A PE = 1 SV = 1	6	0.51	0.39	5/6	0%
GBB2_HUMAN	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2 OS = <i>Homo sapiens</i> GN = GNB2 PE = 1 SV = 3	4	0.50	0.39	4/6	50%
AT1A3_HUMAN	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3 OS = <i>Homo sapiens</i> GN = ATP1A3 PE = 1 SV = 3	6	0.50	0.27	6/6	0%
TBAL3_HUMAN	Tubulin alpha chain-like 3 OS = <i>Homo sapiens</i> GN = TUBAL3 PE = 1 SV = 2	4	0.48	0.29	4/6	50%
G3P_HUMAN	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase — <i>Homo sapiens</i> (Human)	4	0.48	0.42	4/6	0%
AT1A2_HUMAN	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2 OS = <i>Homo sapiens</i> GN = ATP1A2 PE = 1 SV = 1	4	0.47	0.32	4/6	50%
ATPA_HUMAN	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor — <i>Homo sapiens</i> (Human)	6	0.46	0.39	5/6	33%

Table 4 (continued)

Accession <sup>a</sup>	Protein name <sup>b</sup>	# ratio <sup>c</sup>	Geometric mean <sup>d</sup>	CV <sup>e</sup>	PBZ/EB	
					Ratio >1.41 or <0.71 / # patient <sup>f</sup>	% ratio quantified with 1 peptide <sup>g</sup>
HSP7C_HUMAN	Heat shock cognate 71 kDa protein OS = <i>Homo sapiens</i> GN = HSPA8 PE = 1 SV = 1	4	0.46	0.29	4/6	0%
SPTA2_HUMAN	Spectrin alpha chain, brain — <i>Homo sapiens</i> (Human)	4	0.45	0.24	4/6	0%
AT1A1_HUMAN	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 OS = <i>Homo sapiens</i> GN = ATP1A1 PE = 1 SV = 1	6	0.44	0.31	6/6	0%
GBB1_HUMAN	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1 OS = <i>Homo sapiens</i> GN = GNB1 PE = 1 SV = 3	6	0.43	0.41	6/6	0%
KCRB_HUMAN	Creatine kinase B-type OS = <i>Homo sapiens</i> GN = CKB PE = 1 SV = 1	4	0.42	0.24	4/6	0%
AT1B1_HUMAN	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1 OS = <i>Homo sapiens</i> GN = ATP1B1 PE = 1 SV = 1	4	0.30	0.42	4/6	0%

<sup>a</sup> Swiss-Prot accession number,  
<sup>b</sup> Protein name,  
<sup>c</sup> Number of observed ratios,  
<sup>d</sup> Geometric mean of the observed ratios,  
<sup>e</sup> Coefficient of variation of the observed ratios,  
<sup>f</sup> Number of patient ratio >1.41 or <0.71 compared to the total number of analyzed patient,  
<sup>g</sup> Percentage of ratio quantified with more than one peptide.

these mutations. Unfortunately, the tryptic peptides which would be mutated were not detected in our experiments.

CRYAB is the major protein of the eye lens and also a chaperone belonging to the small heat shock protein family. In the CNS, CRYAB has a protective role in autoimmune demyelination [18]. CRYAB has been found in various types of solid tumor as a novel protein and may serve as a prognostic marker [19,20]. CRYAB is also modulated by hypoxia [21,22] and regulates tumor angiogenesis [23].

Our analysis of the literature for the 29 proteins up-regulated in EB versus PBZ indicated that only a few have a role in the pathogenesis of some forms of epilepsy: solute carrier family 25 member 6 (SCL25A6), Ras-related G3 botulinum toxin substrate 3 (Rac3), TUBA1A, spectrin alpha chain (SPTAN1) and GAPDH.

Surprisingly, we observed that several proteins over-expressed in EB have been implicated in the oncogenesis and in the pathophysiological mechanisms of brain tumors; these proteins included 14-3-3 proteins  $\beta$  and  $\gamma$ , the ATPase Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> + transporting alpha-1 and alpha-2 polypeptides (ATP1A1 and ATP1A2), GAPDH, the heat shock 70 kDa protein 8 (HSPA8), phosphatidylethanolamine binding protein 1 (PEBP1/RKIP) and the tubulin subtypes identified (TUBA1A, TUBA1B, TUBA4A, TUBAL3, TUBB, TUBB2A, TUBB3 and TUBB4).

These various findings demonstrate that the proteomes of PBZ and EB differ, but that EB has a more “tumoral” protein expression pattern, whereas PBZ seemed to have a more conventional proteomic profile. The up-regulation of oncogenic proteins such as Fos and Jun has already been observed in the dentate gyrus of animal models of epilepsy [24,25]. Therefore, in our opinion, PBZ appears to be a more suitable control tissue than EB for proteomic studies of GB. However, considering PBZ as a “normal” tissue is likely to be erroneous. GB generally recurs at the resection margin,

strongly suggesting that the PBZ is not “normal” [3–5]. Furthermore, we have isolated a new cell population from PBZ; these cells, named GB-associated stromal cells (GASCs), have properties similar to those of cancer-associated fibroblasts (CAFs). Like CAFs, GASCs express mesenchymal markers and have tumor-promoting effects [26].

Post-mortem brain tissue obtained from autopsy is a potential alternative source of brain control samples. However, Skold et al. [27] showed that several highly abundant proteins are enzymatically degraded in the brain within minute of death, such that the proteome rapidly differs from that normally present *in vivo*.

#### 4. Conclusion

The PBZ and EB have each a specific protein expression pattern. This has consequences for the interpretation of proteomic data obtained using these types of tissues as control samples. In our opinion, PBZ may be more suitable control tissue for differential proteomic analysis. However, this tissue should not be considered to be “normal” tissue and other alternatives should be sought.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2013.04.031>.

#### Acknowledgements

We gratefully acknowledge the contribution of the Cancéropole Grand Ouest. We also thank neurosurgeons at the CHU of Angers, Rennes and Tours for supplying peritumoral and epilepsy tissue samples. This work was supported by the French National Cancer Institute (INCa) and the Ligue Départementale de lutte contre le cancer.



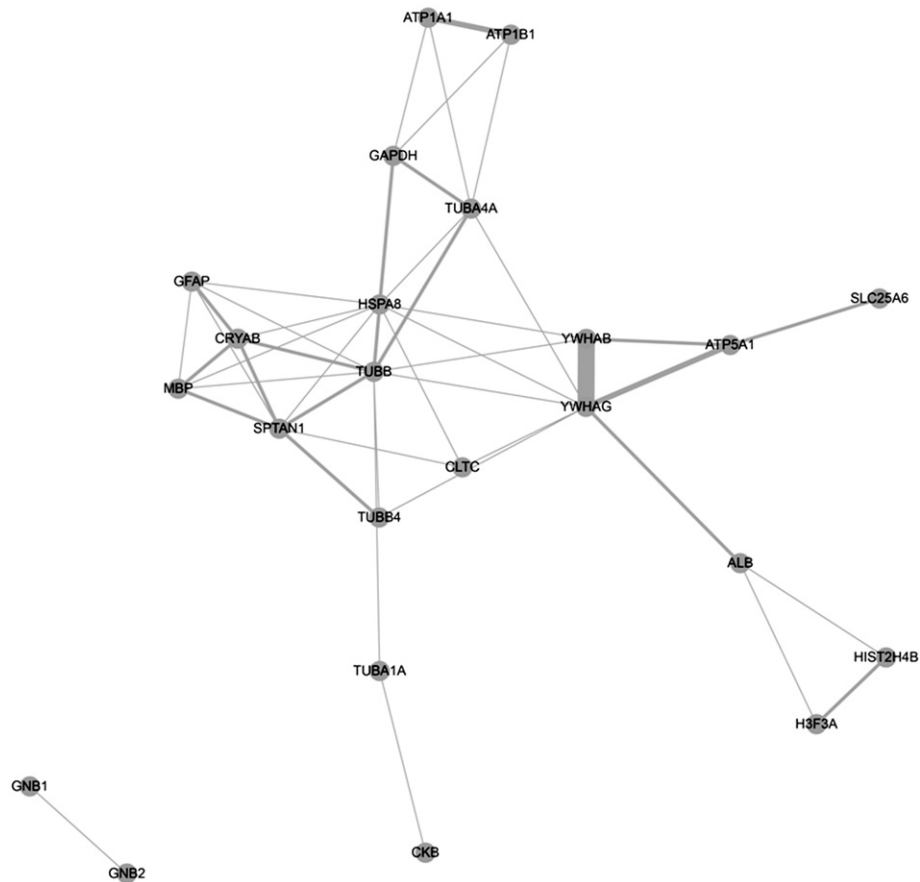


Fig. 2 – Interaction network representation of the differentially expressed proteins using the AMEN software.

## REFERENCES

- [1] Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 2009;10:459–66.
- [2] Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med* 2008;359:492–507.
- [3] Giese A, Kucinski T, Knopp U, Goldbrunner R, Hamel W, Mehdorn HM, et al. Pattern of recurrence following local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) implants in patients with glioblastoma. *J Neurooncol* 2004;66:351–60.
- [4] Lefranc F, Brotchi J, Kiss R. Possible future issues in the treatment of glioblastomas: special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis. *J Clin Oncol* 2005;23:2411–22.
- [5] Liang BC, Thornton Jr AF, Sandler HM, Greenberg HS. Malignant astrocytomas: focal tumor recurrence after focal external beam radiation therapy. *J Neurosurg* 1991;75:559–63.
- [6] Iacob G, Dinca EB. Current data and strategy in glioblastoma multiforme. *J Med Life* 2009;2:386–93.
- [7] Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 2008;321:1807–12.
- [8] Vitucci M, Hayes DN, Miller CR. Gene expression profiling of gliomas: merging genomic and histopathological classification for personalised therapy. *Br J Cancer* 2011;104:545–53.
- [9] Carlsson A, Persson O, Ingvarsson J, Widegren B, Salford L, Borrebaeck CA, et al. Plasma proteome profiling reveals biomarker patterns associated with prognosis and therapy selection in glioblastoma multiforme patients. *Proteomics Clin Appl* 2010;4:591–602.
- [10] Com E, Clavreul A, Lagarrigue M, Michalak S, Menei P, Pineau C. Quantitative proteomic Isotope-Coded Protein Label (ICPL) analysis reveals alteration of several functional processes in the glioblastoma. *J Proteomics* 2012;75:3898–913.
- [11] Niclou SP, Fack F, Rajcevic U. Glioma proteomics: status and perspectives. *J Proteomics* 2010;73:1823–38.
- [12] Khalil AA. Biomarker discovery: a proteomic approach for brain cancer profiling. *Cancer Sci* 2007;98:201–13.
- [13] Schmidt A, Kellermann J, Lottspeich F. A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels. *Proteomics* 2005;5:4–15.
- [14] Kellermann J. ICPL— isotope-coded protein label. *Methods Mol Biol* 2008;424:113–23.
- [15] Lottspeich F, Kellermann J. ICPL labeling strategies for proteome research. *Methods Mol Biol* 2011;753:55–64.
- [16] Schwartzenruber J, Korshunov A, Liu XY, Jones DT, Pfaff E, Jacob K, et al. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature* 2012;482:226–31.
- [17] Sturm D, Witt H, Hovestadt V, Khuong-Quang DA, Jones DT, Konermann C, et al. Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer Cell* 2012;22:425–37.
- [18] Ousman SS, Tomooka BH, van Noort JM, Wawrousek EF, O'Connor KC, Hafler DA, et al. Protective and therapeutic role for alphaB-crystallin in autoimmune demyelination. *Nature* 2007;448:474–9.

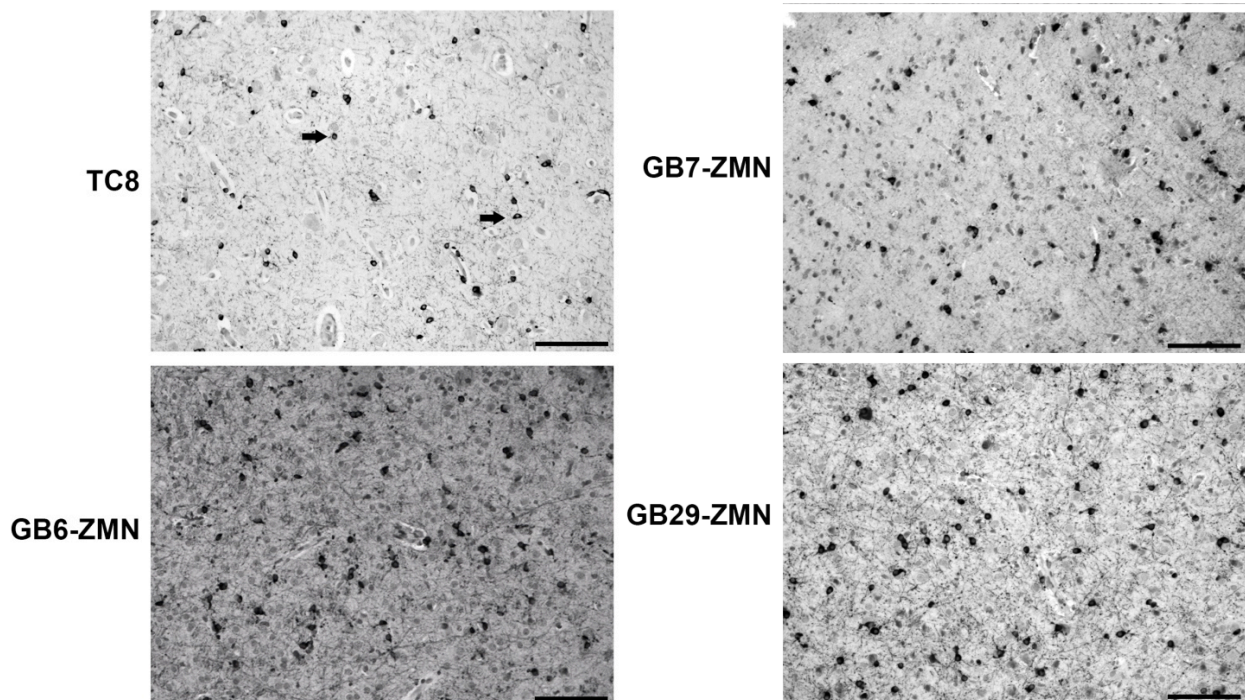
- [19] Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:10869–74.
- [20] Chin D, Boyle GM, Williams RM, Ferguson K, Pandeya N, Pedley J, et al. Alpha B-crystallin, a new independent marker for poor prognosis in head and neck cancer. *Laryngoscope* 2005;115:1239–42.
- [21] Young J, Kannan R, Wawrousek EF, Spee C, Sreekumar PG, Hinton DR. Exacerbation of retinal degeneration in the absence of alpha crystallins in an *in vivo* model of chemically induced hypoxia. *Exp Eye Res* 2008;86:355–65.
- [22] Louapre P, Grongnet JF, Tanguay RM, David JC. Effects of hypoxia on stress proteins in the piglet heart at birth. *Cell Stress Chaperones* 2005;10:17–23.
- [23] Dimberg A, Rylova S, Dieterich LC, Olsson AK, Schiller P, Wikner C, et al. alphaB-crystallin promotes tumor angiogenesis by increasing vascular survival during tube morphogenesis. *Blood* 2008;111:2015–23.
- [24] Han SR, Shin C, Park S, Rhyu S, Park J, Kim YI. Differential expression of activating transcription factor-2 and c-Jun in the immature and adult rat hippocampus following lithium-pilocarpine induced status epilepticus. *Yonsei Med J* 2009;50:200–5.
- [25] Houser CR, Zhang N, Peng Z, Huang CS, Cetina Y. Neuroanatomical clues to altered neuronal activity in epilepsy: from ultrastructure to signaling pathways of dentate granule cells. *Epilepsia* 2012;53(Suppl. 1):67–77.
- [26] Clavreul A, Etcheverry A, Chassevent A, Quillien V, Avril T, Jourdan ML, et al. Isolation of a new cell population in the glioblastoma microenvironment. *J Neurooncol* 2012;106:493–504.
- [27] Skold K, Svensson M, Norrman M, Sjogren B, Svenningsson P, Andren PE. The significance of biochemical and molecular sample integrity in brain proteomics and peptidomics: stathmin 2-20 and peptides as sample quality indicators. *Proteomics* 2007;7:4445–56.
- [28] Collet B, Guitton N, Saikali S, Avril T, Pineau C, Hamlat A, et al. Differential analysis of glioblastoma multiforme proteome by a 2D-DIGE approach. *Proteome Sci* 2011;9:16.
- [29] Brennan C, Momota H, Hambarzumyan D, Ozawa T, Tandon A, Pedraza A, et al. Glioblastoma subclasses can be defined by activity among signal transduction pathways and associated genomic alterations. *PLoS One* 2009;4:e7752.
- [30] Melchior K, Tholey A, Heisel S, Keller A, Lenhof HP, Meese E, et al. Proteomic study of human glioblastoma multiforme tissue employing complementary two-dimensional liquid chromatography- and mass spectrometry-based approaches. *J Proteome Res* 2009;8:4604–14.
- [31] Park CK, Jung JH, Moon MJ, Kim YY, Kim JH, Park SH, et al. Tissue expression of manganese superoxide dismutase is a candidate prognostic marker for glioblastoma. *Oncology* 2009;77:178–81.
- [32] Mustafa DA, Burgers PC, Dekker LJ, Charif H, Titulaer MK, Smitt PA, et al. Identification of glioma neovascularization-related proteins by using MALDI-FTMS and nano-LC fractionation to microdissected tumor vessels. *Mol Cell Proteomics* 2007;6:1147–57.
- [33] Odreman F, Vindigni M, Gonzales ML, Niccolini B, Candiano G, Zanotti B, et al. Proteomic studies on low- and high-grade human brain astrocytomas. *J Proteome Res* 2005;4:698–708.
- [34] Furuta M, Weil RJ, Vortmeyer AO, Huang S, Lei J, Huang TN, et al. Protein patterns and proteins that identify subtypes of glioblastoma multiforme. *Oncogene* 2004;23:6806–14.
- [35] Schwartz SA, Weil RJ, Thompson RC, Shyr Y, Moore JH, Toms SA, et al. Proteomic-based prognosis of brain tumor patients using direct-tissue matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Cancer Res* 2005;65:7674–81.
- [36] Chumbalkar VC, Subhashini C, Dhople VM, Sundaram CS, Jagannadham MV, Kumar KN, et al. Differential protein expression in human gliomas and molecular insights. *Proteomics* 2005;5:1167–77.
- [37] Iwadate Y, Sakaida T, Hiwasa T, Nagai Y, Ishikura H, Takiguchi M, et al. Molecular classification and survival prediction in human gliomas based on proteome analysis. *Cancer Res* 2004;64:2496–501.
- [38] Schwartz SA, Weil RJ, Johnson MD, Toms SA, Caprioli RM. Protein profiling in brain tumors using mass spectrometry: feasibility of a new technique for the analysis of protein expression. *Clin Cancer Res* 2004;10:981–7.
- [39] Hiratsuka M, Inoue T, Toda T, Kimura N, Shirayoshi Y, Kamitani H, et al. Proteomics-based identification of differentially expressed genes in human gliomas: down-regulation of SIRT2 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309:558–66.
- [40] Hobbs SK, Shi G, Homer R, Harsh G, Atlas SW, Bednarski MD. Magnetic resonance image-guided proteomics of human glioblastoma multiforme. *J Magn Reson Imaging* 2003;18:530–6.
- [41] Chakravarti A, Delaney MA, Noll E, Black PM, Loeffler JS, Muzikansky A, et al. Prognostic and pathologic significance of quantitative protein expression profiling in human gliomas. *Clin Cancer Res* 2001;7:2387–95.

## 2.2. Etude de la CRYAB

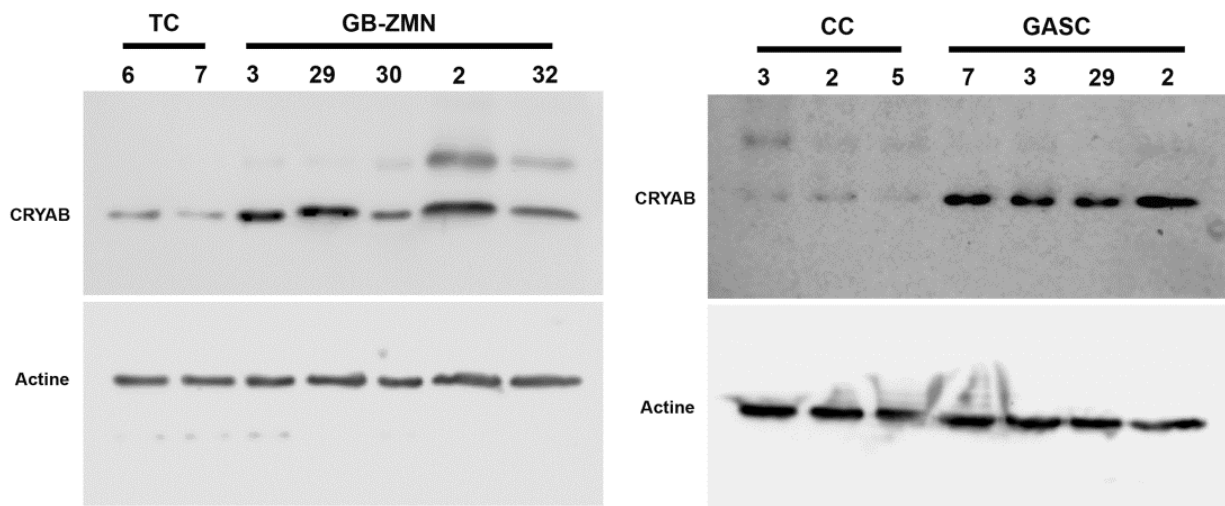
### 2.2.1. Validation de la surexpression de la CRYAB dans la ZMN de GB

Nous avons réalisé une double validation de la surexpression de la CRYAB au sein de la ZMN des GB par immunohistochimie et Western Blot. Le marquage de la CRYAB en immunohistochimie sur les coupes de tissu cérébral contrôle montre une expression de la protéine au sein des astrocytes et des oligodendrocytes (Figure 12). La comparaison de ce marquage avec celui obtenu sur des ZMN de GB montre un marquage plus intense dans les ZMN de GB avec plus de cellules et de fibres marquées. Ce résultat a été validé par Western-Blot où nous observons une forte expression de la CRYAB dans les ZMN de GB en comparaison aux échantillons contrôles issus de chirurgie d'épilepsie (Figure 13). On note aussi que l'expression de la CRYAB dans la ZMN est variable entre chaque patient.

En parallèle à la validation de l'expression de la CRYAB dans la ZMN des GB, nous avons étudié l'expression de la CRYAB dans les GASC issus de primocultures de ZMN. Ces GASC sont une population de cellules stromales possédant des propriétés pro-oncogène et pro-angiogénique (66,67,84). De façon intéressante, nous avons observé que la CRYAB était fortement exprimée dans les GASC, et qu'elle est très peu exprimée dans les cellules contrôles stromales issues d'autres pathologies cérébrales (Figure 13).



**Figure 12 : Analyse de l'expression de la CRYAB par immunohistochimie sur un tissu contrôle et 3 ZMN de GB** (les flèches indiquent les cellules gliales, astrocytes et oligodendrocytes, barre d'échelle = 100  $\mu$ m)



**Figure 13 : Validation en Western Blot de la surexpression de la CRYAB dans la ZMN des GB et les GASC**  
 TC : tissu contrôle                      CC : cellule contrôle

### 2.2.2. Analyse de l'expression plasmatique de la CRYAB chez des patients opérés d'un GB

La CRYAB est une molécule décrite dans la littérature comme un facteur de mauvais pronostic de certains cancers (81,82) et pourrait être un marqueur pronostic potentiellement intéressant des GB. Aussi, après avoir validé en immunohistochimie et en Western Blot la surexpression de la CRYAB au sein de la ZMN des GB, nous avons évalué si cette molécule était quantifiable dans le plasma des patients porteurs d'un GB. La mise au point d'une technique de dosage de la CRYAB dans le sang circulant des patients permettrait de disposer d'un moyen de dépistage rapide et simple à mettre en œuvre.

Nous avons évalué chez 4 patients porteurs d'un GB le niveau d'expression de la CRYAB par immunohistochimie ainsi qu'en immunofluorescence dans les coupes de tissu tumoral et par ELISA dans les échantillons de plasma prélevés avant la chirurgie (Tableau 3, Figure 14). Sur les 4 patients analysés, 3 présentent une expression de la CRYAB détectable dans la tumeur, et seul le patient possédant un fort taux d'expression tumoral de la CRYAB présentait un taux plasmatique détectable.

En faisant une revue de la littérature, nous avons constaté que les concentrations plasmatiques de CRYAB décrits dans d'autres études portant sur la broncho-pneumopathie chronique obstructive étaient de l'ordre de 7,7-9,5 ng/L ce qui est inférieur à la concentration de CRYAB détectée dans nos échantillons (85). Ces faibles concentrations sanguines décrites dans la littérature correspondent au seuil minimal de détection du kit utilisé pour réaliser l'ELISA sur nos échantillons de plasma. Il est donc possible que les concentrations plasmatiques des échantillons des patients ayant une expression tumorale faible de la CRYAB soient inférieures au seuil de détection du kit ELISA utilisé pour cette expérimentation. Ces premiers résultats sont encourageants et les analyses doivent être poursuivies sur une plus grande cohorte de patients.

	<b>Expression tumorale</b>	<b>Concentration sanguine</b>
13H11122	+++	4,1 ng/mL
13H13349	++	0 ng/mL
14H00469	+	0 ng/mL
13H08950	0	0 ng/mL

**Tableau 3 : Comparaison du niveau d'expression de la CRYAB dans la tumeur (en IHC) et dans le plasma (par ELISA)**

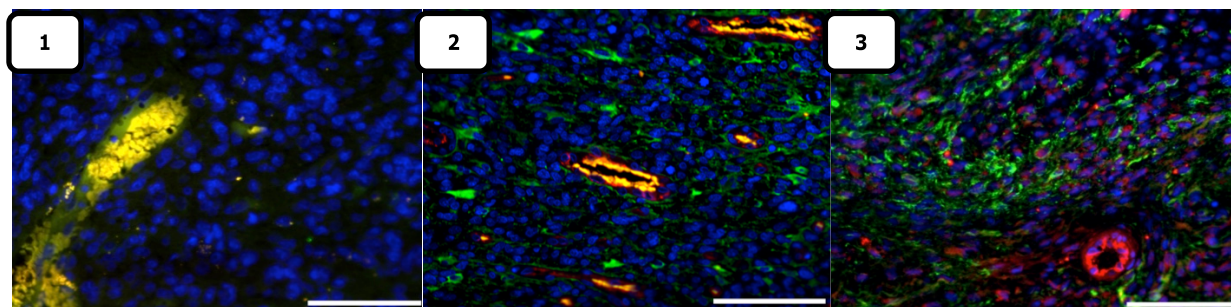
0 : pas d'expression

++ : 10-50% de cellules marquées

+ : < 10% de cellules marquées

+++ : >50% de cellules marquées





**Figure 14 : Coupes illustratives de l'analyse de l'expression de la CRYAB par immunofluorescence dans des échantillons de ZMN (barre d'échelle = 100 µm)**

1. pas de marquage
2. ++: 10 à 50% de cellules marquées
3. +++: > de 50% des cellules marquées

### 2.2.3. Relation entre le statut de la CRYAB et la réponse de l'avastin/irinotécan en seconde ligne de traitement d'un GB

En plus d'être un facteur de mauvais pronostic dans certains cancers, la CRYAB interagit avec le VEGF en augmentant sa demi-vie (80). Compte-tenu du rôle décrit de la CRYAB dans l'angiogénèse tumorale, nous avons déterminé si l'expression de cette protéine dans la tumeur pouvait influencer la réponse des patients à un traitement avec bévécizumab/irinotécan.

Nous avons sélectionné une cohorte de patients suivis au CHU d' Angers et à l'Institut de Cancérologie de l'Ouest Paul Papin pour un GB, opérés et traités selon le protocole de Stupp en première ligne, et traités en seconde ligne par un traitement avec bévécizumab/irinotécan. Le résumé des données recueillies est basé sur les critères de suivi standardisés RANO : évolution clinique, radiologique et du traitement par corticoïdes (Tableau 4) (55). L'analyse statistique n'a pas mis en évidence de corrélation entre le niveau d'expression de la CRYAB et la survie des patients au seuil statistique de 5%.

Expression tumorale de la CRYAB	Survie globale	Survie sans progression clinique	Survie sans progression radiologique	Diminution ou arrêt des corticoïdes sous bévécizumab
0	11 mois	10 mois	9 mois	oui
++	13 mois	10 mois	10 mois	oui
++	15 mois	14 mois	14 mois	non
++	18 mois	14 mois	14 mois	non
++	46 mois	43 mois	44 mois	oui
++	29 mois	23 mois	22 mois	oui
++	27 mois	23 mois	20 mois	non
+++	vivant	64 mois	64 mois	oui
+++	32 mois	28 mois	28 mois	non

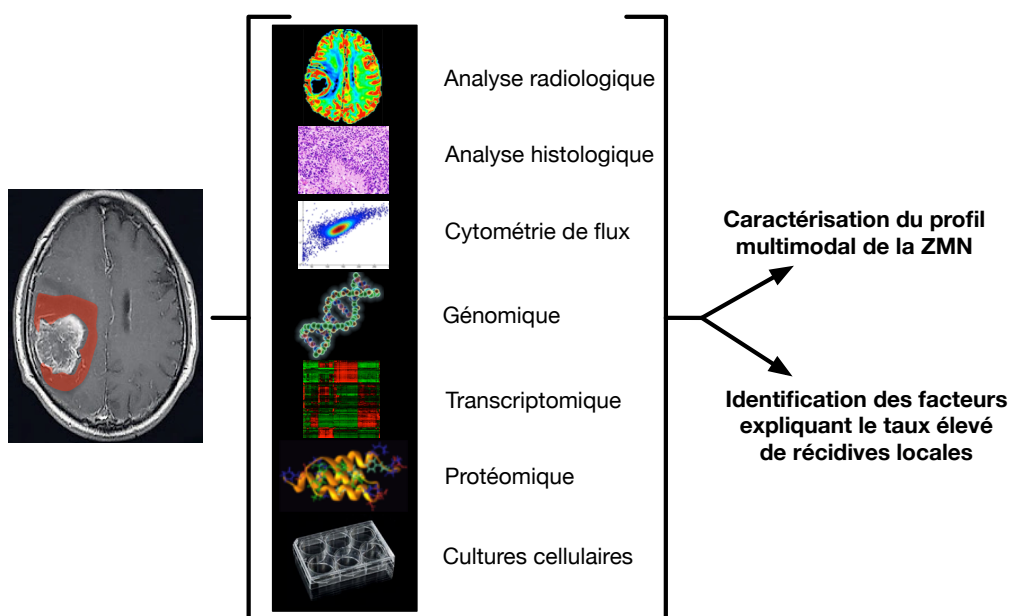
**Tableau 4 : Données radio-clinique d'un échantillon de patients suivis pour un GB à Angers, et traités par avastin/irinotécan en seconde ligne après un Stupp**

La CRYAB, identifiée dans de l'analyse du profil protéomique de la ZMN, semble être un biomarqueur susceptible de prédire la réponse au traitement par bévécizumab des patients porteurs d'un GB. Il a été mis en évidence que la surexpression de la CRYAB est un facteur de mauvais pronostic dans les cancers du colon et du poumon (81,82) ainsi qu'un facteur de résistance au traitement antiangiogénique dans le cancer du sein (83). Bien que nous n'ayons pas réussi à mettre en évidence de corrélation entre le taux d'expression tumoral de la

CRYAB et la réponse des patients à un traitement anti-angiogénique par bévacizumab, nous continuerons cette analyse dans la suite de mon doctorat. Nous évaluerons la corrélation entre le niveau d'expression de la CRYAB et la réponse au traitement par bévacizumab chez les patients porteurs d'un GB en se basant sur une plus grande cohorte de patient afin de disposer d'une plus grande puissance statistique. Nous poursuivrons aussi la validation de l'expression de la CRYAB dans la ZMN et le sang circulant des patients porteurs d'un GB à l'aide de techniques disposant d'une plus grande sensibilité que le kit ELISA utilisé, comme la chromatographie liquide haute performance.

### 3. Analyse multimodale de la zone péri-tumorale des glioblastomes

Dans la continuité du PGGO, nous avons conduit une analyse multimodale de la ZMN des GB avec les différentes modalités d'analyses à disposition, que cela soit la radiologie, l'anatomopathologie, la cytométrie de flux, la génomique, la transcriptomique, la protéomique ou les cultures cellulaires. L'objectif de cette étude est de caractériser le profil multimodal de la ZMN des GB afin d'identifier des marqueurs qui lui sont propres, susceptibles d'être utilisés dans le cadre de thérapies ciblées et/ou pour optimiser la qualité de la résection chirurgicale (Figure 15).



**Figure 15 : Présentation des différentes modalités d'analyses de la ZMN des GB**

Comme ce qui est décrit dans la littérature, nous avons mis en évidence que l'œil du chirurgien et l'IRM pré-opératoire sont insuffisants pour évaluer la qualité de la résection chirurgicale. Le caractère invasif des GB, connu de longue date (86), est confirmé dans notre étude car 30% des ZMN macroscopiquement et radiologiquement normales présentent un infiltrat tumoral identifié lors de l'examen anatomopathologique.

L'analyse de l'index d'ADN par cytométrie de flux et l'analyse génomique suggèrent que seuls certains contingents tumoraux migrent à distance de la tumeur. De plus, les analyses omiques soulignent l'existence d'une importante hétérogénéité inter-individuelle de la ZMN, à l'image de celle décrite pour les GB. Cette importante hétérogénéité inter-individuelle des ZMN souligne la nécessité de réaliser des études portant sur de grandes cohortes de sujets pour réussir à identifier des marqueurs spécifiques de cette zone.

Les résultats de cette analyse multimodale sont détaillés dans l'article ci-dessous, **publié dans *Journal of Neuro-Oncology***.

❖ Article n°3 :

**Characterizing the Peritumoral Brain Zone in Glioblastoma: a Multidisciplinary Analysis**

Lemée JM, Clavreul A, Aubry M, Com E, De Tayrac M, Eliat PA, Henry C, Rousseau A, Mosser J, Menei P  
*J Neurooncol. 2015 Jan 6. [Epub ahead of print]*  
*PubMed PMID: 25559687.*



# Characterizing the peritumoral brain zone in glioblastoma: a multidisciplinary analysis

Jean-Michel Lemée · Anne Clavreul · Marc Aubry · Emmanuelle Com · Marie de Tayrac · Pierre-Antoine Eliat · Cécile Henry · Audrey Rousseau · Jean Mosser · Philippe Menei

Received: 8 October 2014 / Accepted: 20 December 2014  
© Springer Science+Business Media New York 2015

**Abstract** Glioblastoma (GB) is the most frequent and aggressive type of primary brain tumor. Recurrences are mostly located at the margin of the resection cavity in the peritumoral brain zone (PBZ). Although it is widely believed that infiltrative tumor cells in this zone are responsible for GB recurrence, few studies have examined this zone. In this study, we analyzed PBZ left after surgery with a variety of techniques including radiology, histopathology, flow cytometry, genomic, transcriptomic, proteomic, and primary cell cultures. The resulting PBZ profiles were compared with those of the GB tumor zone and normal brain samples to identify characteristics specific to

the PBZ. We found that tumor cell infiltration detected by standard histological analysis was present in almost one third of PBZ taken from an area that was considered normal both on standard MRI and by the neurosurgeon under an operating microscope. The panel of techniques used in this study show that the PBZ, similar to the tumor zone itself, is characterized by substantial inter-patient heterogeneity, which makes it difficult to identify representative markers. Nevertheless, we identified specific alterations in the PBZ such as the presence of selected tumor clones and stromal cells with tumorigenic and angiogenic properties. The study of GB-PBZ is a growing field of interest and this region needs to be characterized further. This will facilitate the development of new, targeted therapies for patients with GB and the development of approaches to refine the per-operative evaluation of the PBZ to optimize the surgical resection of the tumor.

This work was presented as a poster at the Congress of the French speaking association of Neuro-Oncologist (ANOCEF), May 17th 2014, in Lausanne, Swiss and as an oral communication in the Congress of the French society of Neurosurgery, May 23rd, in Clermont-Ferrand, France.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s11060-014-1695-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

J.-M. Lemée · A. Clavreul · P. Menei (✉)  
Département de Neurochirurgie, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, 4 rue Larrey, 49933 Angers Cedex 09, France  
e-mail: phmenei@chu-angers.fr

J.-M. Lemée · A. Clavreul · A. Rousseau · P. Menei  
INSERM UMR-1066, Micro- et Nanomédecine Biomimétiques (MINT), 4 rue Larrey, 49933 Angers Cedex 09, France

M. Aubry · M. de Tayrac · J. Mosser  
UMR 6290 CNRS "Génomique fonctionnelle intégrée et biomarqueurs", Université Rennes 1, 35043 Rennes, France

E. Com  
Proteomic Core Facility BiogenOuest, IRSET,  
Inserm U1085, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes,  
France

**Keywords** Glioblastoma · Peritumoral brain zone · Genomics · Transcriptomics · Proteomics · Histopathology

M. de Tayrac · J. Mosser  
Service de Génétique Moléculaire et Génomique CHU de Rennes - Hôpital Pontchaillou, 2 Rue Henri Le Guilloux, 35033 Rennes Cedex 9, France

P.-A. Eliat  
PRISM, SFR Biosit, Université de Rennes 1, CNRS UMS 3480 - INSERM US 018, 35043 Rennes, France

C. Henry  
Centre Régional de Lutte contre le Cancer Paul Papin, 2 rue Moll, 49000 Angers, France

A. Rousseau  
Département de Pathologie Cellulaire et Tissulaire, Centre Hospitalo-universitaire d'Angers, 4 rue Larrey, 49933 Angers Cedex 09, France

## Introduction

Glioblastoma (GB) is the most frequent and aggressive type of primary tumor in the central nervous system (CNS) [1]. The standard treatment is surgical resection followed by fractionated radiotherapy, with concomitant and adjuvant chemotherapy with temozolomide [2]. Despite this treatment, the prognosis remains poor [1].

Gross total resection of GB, which is the first step of therapeutic management, has a major effect on overall survival, progression-free survival, and the quality of life of the patient [3, 4]. It is only achieved in 35–50 % of cases [5, 6] because the presence of functional areas makes impossible to perform a resection with safe margins and no risk of neurological impairment [4]. Despite complete surgical resection, recurrence happens in almost all cases, mostly at the margin of the resection cavity in the peritumoral brain zone (PBZ) [7, 8]. It is widely believed that tumor cell infiltration into the PBZ may promote recurrence [9–11]. However, few cellular and molecular analyses have been performed in this area. Some studies have shown that residual, unresected tumor cells display alterations different from those of cells isolated from the corresponding tumor mass [12–14]. A better understanding of the characteristics of the PBZ and tumor cell infiltration in this region is critical to unravel the mechanisms underlying the recurrence of GB and to optimize the quality of surgical resection and the development of new therapies.

As part of the “Grand Ouest Glioma Project”, funded by the French National Institute of Cancer, whose objective was to study tumor heterogeneity in GB [15–22], we performed a multidisciplinary analysis of the PBZ with a variety of techniques including radiology, histopathology, flow cytometry, omic analyses and primary cell cultures. The resulting PBZ profiles were compared with those of GB tumor zone (TZ) and normal brain samples to identify characteristics specific to the PBZ.

## Materials and methods

### Patient recruitment and brain biopsies

Thirty-nine patients with de novo GB were included in the “Grand Ouest Glioma Project”. All patients gave informed consent prior to their enrolment. The study protocol was approved by the local ethics committee (CPP Ouest II, Angers, France).

Image-guided neuronavigation (Brainlab<sup>®</sup>, La Défense, France) was used during pre-surgical planning to define four regions of interest (ROI) in the tumor and its surroundings: the PBZ, the interface zone (IZ), the florid tumor zone (TZ), and the central necrotic zone (NZ)

(Fig. 1a). Biopsies were performed in the selected regions and were studied by various techniques: radiology, histopathology, flow cytometry, omic, and cell culture analyses and the results of these various methods were compared. All types of analysis could not be performed for each PBZ sample due to limited sample size. Among the 39 patients initially included, biopsies from 28 patients were analyzed by at least three techniques.

### Radiological analysis

Standardized sequences were used for pre-surgical MRI and were carried out in the following order: T1-weighted axial and coronal acquisitions, diffusion, a quantitative dynamic contrast-enhanced (DCE) session after the injection of gadolinium at a concentration of 0.1 mmol/kg, and finally T2 FLAIR, T2-weighted and 3D T1 acquisitions. For a detailed description, see Supplementary Methods.

### Histopathological analysis

For histopathological analysis, formalin-fixed paraffin-embedded sections of the biopsy specimens were stained with hematoxylin–phloxin–saffron (HPS). The diagnosis of GB was made according to the 2007 WHO classification of CNS tumors [23].

### Flow cytometry analysis

DNA of cells of the PBZ and those of the TZ from 25 patients was stained by Vindeløv’s protocol [24] and the samples were analyzed by flow cytometry (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). DNA index (DI) and the percentage of cell populations identified on the basis of different DNA contents were calculated with Modfit version 5.2 software (Verity Software House, Topsham, Maine) as previously described [15].

### Omic analyses

PBZ and TZ samples were used for genomic (n = 10), transcriptomic (n = 9) and proteomic (n = 6) analyses. Brain samples from patients who underwent epilepsy surgery were also used as control brain samples. For a detailed description of omic analyses, see Supplementary Methods.

### Primary cultures

PBZ from 19 patients were used for cell cultures. Biopsy specimens were minced and mechanically dissociated in Dulbecco’s modified Eagles’ medium–high glucose (DMEM-HG) (Lonza, Verviers, Belgium). The resulting suspension was seeded in T80 flasks (Nunc, Dominique

Dutscher, Brumath, France) containing DMEM-HG supplemented with 10 % human AB serum (EFS, Lyon, France) and 1 % antibiotics (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Cells were grown at 37 °C in a humidified incubator, under an atmosphere containing 5 % CO<sub>2</sub>, and the medium was changed twice weekly. Contrast-phase microscopy was used to examine cells at passage 1 or 2.

**Results**

**Radiological analysis**

We examined NZ, TZ, IZ and PBZ of seven patients with GB by DCE-MRI.

The comparison of the four zones in a multivariate analysis shows significant differences in all variables, except for s360 and T1<sub>0</sub> (Fig. 1b). The PBZ presents lower values of k<sup>trans</sup> and v<sub>e</sub> than the TZ, indicating that the blood–brain barrier was preserved in the PBZ, in contrast to the TZ. Contrast enhancement was also lower in the PBZ than in the TZ and the AUC of contrast enhancement over time was significantly lower in the PBZ. We found that PBZ enhancement curves were consistent, except for patient GB-09. All constants were high for this patient, although they were not statistically different from those of other samples.

These results suggest that the DCE-MRI properties of the PBZ were similar to those of normal brain previously described by Tofts [25]. This was expected because PBZ

was defined in our study as a radiologically normal peritumoral tissue, located at a distance from the brain/tumor interface, with the absence of gadolinium enhancement and a normal aspect on T1-weighted sequences.

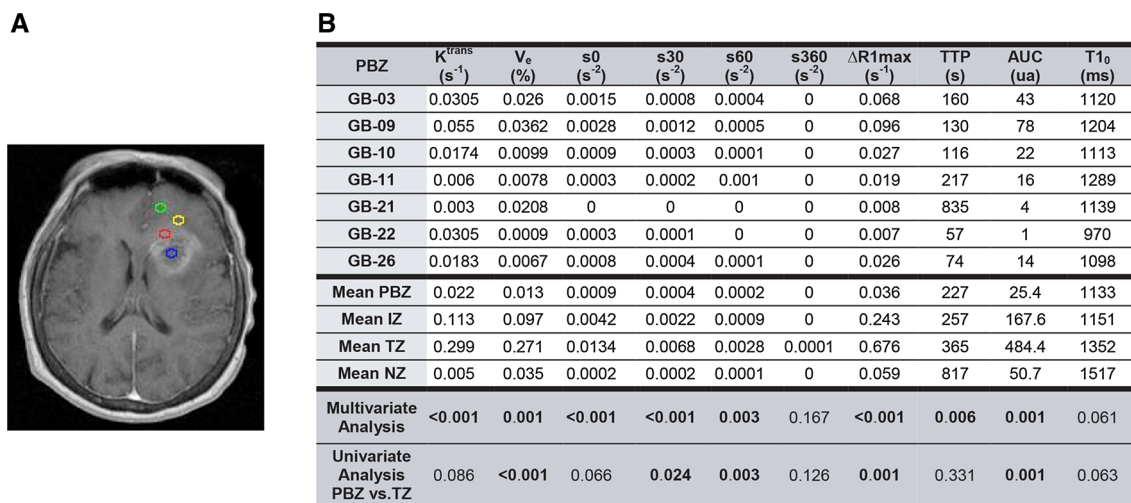
**Histopathological analysis**

All PBZ samples were considered macroscopically similar to normal brain under surgical microscope magnification. Histological analysis showed no abnormalities for 20 of the 28 biopsies (71 %). We observed mild tumor cell infiltration in six patients (21 %) and marked infiltration in two patients (7 %) (Supplementary Table 1).

**Flow cytometry analysis**

Analysis of DNA index by flow cytometry is highly informative only if the tumor is aneuploid. We analyzed PBZ and TZ samples from 25 patients; eight (32 %) did not contain an aneuploid cell population, thus flow cytometry could not be applied to assess tumor cell infiltration in these PBZ. Among the 17 patients with an aneuploid cell population in their TZ, eight (47 %) displayed aneuploid cells in the PBZ and the percentage of aneuploid cells in the PBZ ranged from 3 to 44 % (Table 1).

Interestingly, for a few samples (GB04, GB-09, GB-10 and GB-12), the PBZ contained only a few of the aneuploid cell populations identified in the TZ. This suggests that some tumor clones, but not all, migrate away from the tumor core.



**Fig. 1 a** Example of pre-surgical planning of biopsies on an axial contrast-enhanced T1 MRI brain slide. *Blue area* necrotic zone (NZ), *red area* florid tumor zone (TZ), *yellow area* intermediate zone (IZ) and *green area* peritumoral brain zone (PBZ). **b** Individual results for quantitative DCE MRI analysis of PBZ and comparison to the other sampling areas (IZ, NZ and TZ) (K<sup>trans</sup> permeability constant, V<sub>e</sub>

fractional volume of extravascular extracellular space, s0 initial slope, s30, s60 and s360 slope at 30 s, 60 s and 360 s respectively, ΔR1max maximum longitudinal relaxation rate variation, TTP time to peak, AUC area under the curve, T1<sub>0</sub> longitudinal relaxation time before gadolinium injection)

Histopathology and flow cytometry gave similar results because all PBZ with a normal flow cytometry profile were considered free of tumor cell infiltration by histopathological analysis. However, flow cytometry was a more sensitive approach to detect tumor cell infiltration than histopathological analysis, because three PBZ with an aneuploid cell population were identified as histologically normal (GB-06, GB-09, and GB-12).

#### Genomic analysis

Array-CGH analysis of TZ showed genomic alterations commonly described in GB, such as gain of chromosome 7 with EGFR amplification, deletion of chromosome 10, and loss of CDKN2A/2B on chromosome 9 (Aubry et al. submitted).

Six of the ten PBZ analyzed (GB-03, GB-09, GB-16, GB-17, GB-25, and GB-26) showed <1 % of genome aberrations. The other four PBZ samples (GB-10, GB-15, GB-35, and GB-36) exhibited various large genomic alterations that were also present in tumor samples from these patients (Fig. 2a, Supplementary Fig. 1). The results of genomic analysis were correlated with those from histopathological analysis. All of the PBZ that were characterized as abnormal by genomic analysis exhibited tumor cell infiltration on microscopic examination. All the PBZ with minimal genomic alteration (<1 %) did not show tumor cell infiltration on histopathological analysis, except for the PBZ of GB-17.

Similar to findings from the flow cytometry analysis, abnormal PBZ samples exhibited only a few of the genetic alterations present in their respective TZ sample. For example, the CDKN2A/2B deletion was present in almost all TZ whereas only one PBZ harbored this anomaly (GB-36). The deletion of chromosome 10 and the gain of chromosome 7 with the EGFR (7p11) amplification were found in both altered PBZ and their respective TZ.

#### Transcriptomic analysis

The hierarchical clustering of transcriptomic data from nine PBZ and TZ samples, and four control brain samples distinguished two main clusters: one cluster grouping the PBZ with the control brain samples and the TZ from GB-09, and a second cluster comprising the remaining TZ (Fig. 2b).

The PBZ and the control brain cluster could be further divided into two subgroups. The first subgroup comprised the control brain samples and the PBZ from GB-09, GB-16, GB-25, and GB-26. These PBZ did not show tumor cell infiltration on histopathological analysis and displayed minimal genomic alterations. Only the PBZ from GB-09 presented a tumor-related flow cytometry profile

characterized by a rare aneuploid cell population (3 %). The second subgroup, which clustered closer to the TZ sample cluster than the first subgroup, comprised the TZ from GB-09 and the PBZ from GB-03, GB-15, GB-17, GB-35, and GB-36. These PBZ displayed tumor cell infiltration on histopathology and/or an altered genomic profile, with the exception of GB-03 PBZ.

These results indicate that tumor infiltration in the PBZ alters the transcriptomic profile of this region but is not sufficient for PBZ and control brain samples to form separate clusters in transcriptomic analysis. The inter-patient heterogeneity of PBZ samples as well as the low number of samples analyzed did not allow us to identify genes that were differentially expressed between PBZ and control brain samples.

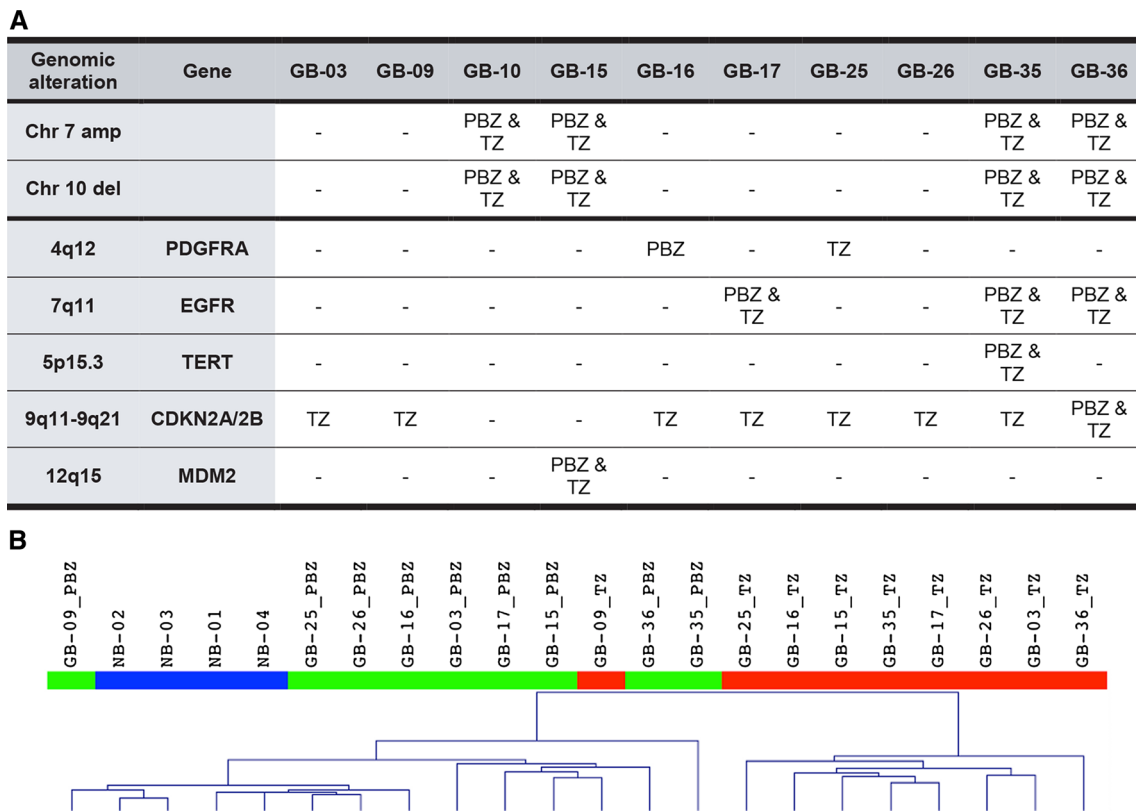
#### Proteomic analysis

We used the ICPL (isotope coded protein labeling) technique to examine the protein content of PBZ samples compared to their respective TZ samples and found that between 47 and 83 % of proteins were differentially expressed between PBZ and TZ samples (Table 2). Similarly, a large proportion (44–83 %) of proteins were differentially expressed between PBZ samples and pooled samples from control brain (Table 2). More detailed proteomic analyses are available in our previous studies [17, 18].

**Table 1** DNA index of TZ and their corresponding PBZ

	TZ	PBZ
GB-02	1 + 1.97 (13.5 %)	<b>1 (0 %)</b>
GB-03	1 + 0.95 (56 %)	<b>1 (0 %)</b>
GB-04	1 + 0.9 + 1.8 (18 %)	1 + 0.9 (24 %)
GB-05	1 + 0.9 + 1.8 (48 %)	1 + 0.9 + 1.8 (30 %)
GB-06	1 + 1.8 (29 %)	1 + 1.8 (3 %)
GB-07	1 + 2 + 2.3 (78 %)	<b>1 (0 %)</b>
GB-08	1 + 1.43 (76 %)	<b>1 (0 %)</b>
GB-09	1 + 1.54 + 1.7 (57 %)	1 + 1.7 (3 %)
GB-10	1 + 0.9 + 1.8 (57 %)	1 + 0.9 (44 %)
GB-11	1 + 1.7 + 1.8 (21 %)	<b>1 (0 %)</b>
GB-12	1 + 0.9 + 1.8 (39 %)	1 + 0.9 (20 %)
GB-15	1 + 1.05 + 2.05 (55 %)	1 + 1.05 + 2.05 (26 %)
GB-21	1 + 1.45 (18 %)	<b>1 (0 %)</b>
GB-29	1 + 1.04 + 2.01 (84 %)	<b>1 (0 %)</b>
GB-32	1 + 1.06 + 2.08 (76 %)	<b>1 (0 %)</b>
GB-34	1 + 0.96 (22 %)	1 + 0.96 (33 %)
GB-37	1 + 0.95 (50 %)	<b>1 (0 %)</b>

All TZ presented in this table contained aneuploid cell populations (DI <1 or >1). The percentage of aneuploid cells is indicated in brackets. Bold values indicate PBZ without aneuploid cell population, thus without the aneuploid tumoral infiltration observed in its respective TZ.



**Fig. 2 a** Most frequent genomic alterations found in the PBZ and the TZ. **b** Dendrogram of hierarchical clustering of brain samples based on the 1,000 most differentially expressed genes between PBZ and

TZ. Two main clusters of samples are observed: one cluster grouping the PBZ with the control brain samples (NB) and the TZ from GB-09, and a second cluster comprising the remaining TZ

We assumed from these two comparative analyses that the PBZ can be considered as infiltrated if the number of differentially expressed proteins between the PBZ and the TZ is smaller than that between the PBZ and control brain. However, PBZ that were classified as infiltrated according to these parameters did not match those identified as infiltrated by histopathological examination. The PBZ harbored a proteomic profile distinct from that of TZ and control brain regardless of histological profile. Thus, the number of differentially expressed proteins between PBZ and control brain samples may not be a good parameter to evaluate the tumoral infiltration in the PBZ. As for the transcriptomic analysis, the identification of a proteomic profile specific to the PBZ was not possible and requires a larger cohort of samples.

**Primary cultures**

We examined primary cultures of 19 samples of PBZ and TZ by phase-contrast microscopy. Six (32 %) of the PBZ cultures gave rise to tumor-like cells with a morphology similar to that of GB cells derived from their respective TZ sample (Fig. 3, Supplementary Table 2). These cells were

spindle-shaped or clumped into irregular spheroids, often several layers thick. These PBZ samples, except for GB-11 PBZ, displayed tumor cell infiltration on histopathological and/or flow cytometry analyses. The other PBZ samples (68 %) devoid of tumor cells on histopathological and/or flow cytometry analyses gave rise to diploid cells that we called GB-associated stromal cells (GASCs). These cells were star-shaped, were unable to assemble into multiple-layered structures as shown for GB-03 (Fig. 3), and could be maintained in culture until passage 10. We recently showed that these stromal cells, despite their normal genomic profile, may display tumorigenic properties similar to myofibroblasts or cancer-associated fibroblasts (CAFs) in carcinoma [15, 16].

**Discussion**

Although the PBZ is largely considered as abnormal, this study is the first to analyze the PBZ via a multidisciplinary approach, and paints a picture of a PBZ that is normal from afar but far from normal.



**Table 2** Differential proteomic profile between PBZ and NB, and between PBZ and TZ

	PBZ vs NB			PBZ vs TZ		
	IdProt	Quant Prot	Diff Prot	IdProt	Quant Prot	Diff Prot
GB-03	145	58	48 (83 %)	267	105	49 (47 %)
GB-10	123	72	32 (44 %)	273	135	82 (61 %)
GB-16	145	72	53 (74 %)	258	114	72 (63 %)
GB-22	116	55	44 (80 %)	266	96	62 (65 %)
GB-25	123	58	44 (76 %)	321	90	75 (83 %)
GB-26	116	55	36 (65 %)	–	–	–

A threshold of <0.71 was used for under-expressed proteins and >1.41 was used for over-expressed proteins. Percentage of differentially expressed proteins (from the total number of unique quantified proteins) is displayed in brackets

*NB* normal brain, *IdProt* number of unique identified proteins, *QuantProt* number of unique quantified proteins, *DiffProt* number of unique quantified proteins that are differentially expressed between PBZ and the control sample

Normal from afar ...

Radiological and macroscopic analyses revealed that the PBZ resembled normal brain tissue. The PBZ presented a homogeneous DCE profile similar to that of normal brain but unlike that of the other sampling zones of GB. This radiological profile was characterized by low permeability and low extracellular volume fraction. This reflects the maintenance of the blood–brain barrier in the PBZ, which would explain the absence of contrast enhancement because the permeability in DCE imaging is proportional to the tumor histopathological grade [26]. However, radiological analysis of low-grade glioma has shown that tumor infiltration may be present without neoangiogenesis and that the tumoral cell density threshold to modify the MRI signal must be around 500 cells/mm<sup>3</sup> [27], showing the limitations of radiological examination to apprehend glial tumor's infiltration in the brain parenchyma. This is highlighted by the results of histopathological examination that found tumor cell infiltration in one third of radiologically normal PBZ.

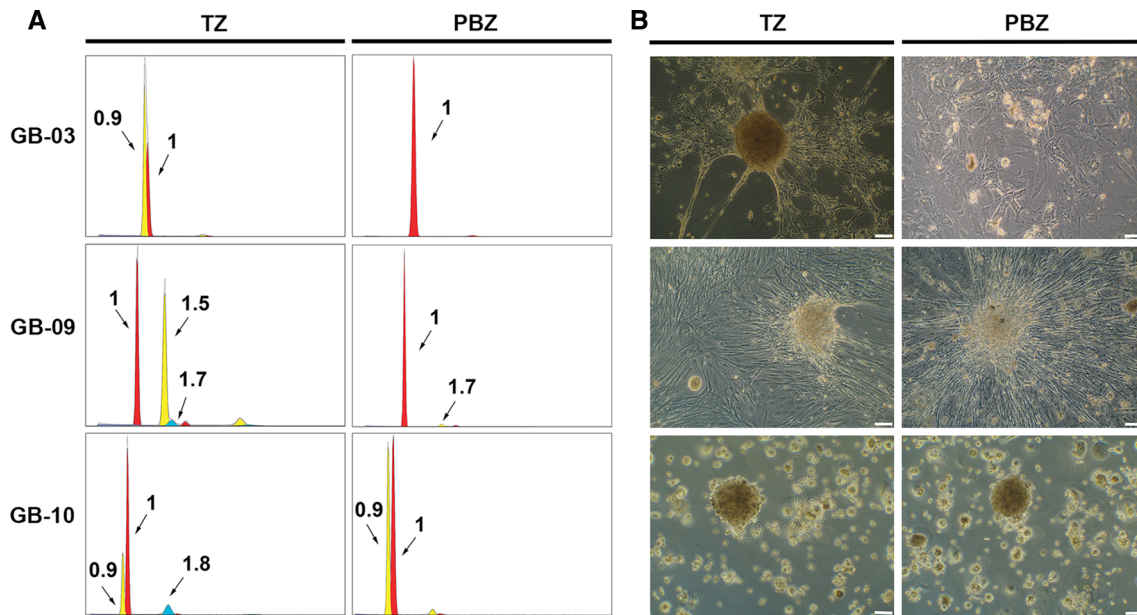
Other pre-surgical MRI techniques such as diffusion- and perfusion-weighted imaging and spectroscopy may be useful to evaluate tumor cell infiltration in PBZ. These approaches have already been used to assess the histological nature of the adjacent tumor [28–30] or the WHO grade of glial tumors [31, 32]. Recently, diffusion tensor imaging sequences were used to assess PBZ infiltration and showed that vasogenic edema and tumor-infiltrated edema are characterized by distinct patterns in imaging data [33]. Further radiological studies that take into account this interesting result may be able to refine the pre-operative evaluation of PBZ infiltration, which may challenge traditional surgical strategies based on the removal of the contrast-enhanced tumor. In parallel, per-operative analysis of the resection margin, and thus of the PBZ, is currently

increasingly performed during surgery, with the development of intra-operative imaging and fluorescence-guided surgery [5, 34, 35].

But far from normal

As indicated above, histopathological examination found tumor cell infiltration in one third of PBZ in contrast with radiological and macroscopic analyses, which is consistent with data from the literature [9–11, 36]. Flow cytometry, genomic, transcriptomic, and primary cell culture approaches also identified these neoplastic features in PBZ. Flow cytometry and primary culture analyses were more sensitive than histological analyses because they were able to identify tumor cell infiltration in histologically normal PBZ.

Proteomic and transcriptomic analyses showed that the RNA and protein content of the PBZ is distinct from that of both the TZ and control brain. However, due to the inter-patient heterogeneity of the PBZ, we were unable to identify specific markers that could be involved in recurrence mechanisms. A large cohort of PBZ samples is necessary to identify such markers, but the constitution of such a cohort faces the ethical issue of sampling “normal” brain tissue around the tumor. Furthermore, the identification of markers is also made difficult by the choice of the brain control sample to be used. Obviously, brain samples from healthy, living individuals are difficult to obtain and the control samples commonly used include tissue obtained during brain surgery for pathological conditions such as epilepsy. However, we showed recently that epilepsy samples have a tumor-like protein expression pattern [17]; thus, caution should be urged about their use as control samples. Post-mortem brain tissue obtained from autopsy is a potential, alternative source of brain control samples. However, RNA and several highly abundant proteins are



**Fig. 3** **a** Flow cytometry histograms showing the DNA content of TZ biopsies (GB-03, GB-09 and GB-10) and their respective PBZ. A DI value of 1 was classified as DNA diploid and DI values of  $<1$  or  $>1$  were classified as aneuploid. **b** Phase-contrast microscopy of primary cultures of TZ biopsies (GB-03, GB-09 and GB-10) and their respective PBZ (P1 or P2). Cells derived from TZ cultures were spindle-shaped and clumped into irregular spheroids, often several

layers thick. In the PBZ cultures from GB-09 and GB10, in which tumor cells were present to a significant level in the biopsy specimen before culture, these cells proliferated. In the PBZ culture from GB-03 in which tumor cells were absent, cell culture led, after two passages, to a diploid cell population. These diploid cells, which we called GASCs, were star-shaped and unable to assemble into multiple-layered structures. The *bar* indicates 50  $\mu\text{m}$

degraded rapidly after death [37, 38]; therefore, the use of such control brain samples necessitates quick sampling and storage, which are difficult to implement. These observations show that it is a major obstacle to find brain control samples with a proteome and transcriptome that are similar to that normally present *in vivo*.

Although we have not identified representative markers of the PBZ through transcriptomic and proteomic analyses, we observed specific alterations of this area through genomic, flow cytometry and primary culture analyses. We show that the PBZ possesses some, but not all, of the tumor cell alterations found in the TZ. In particular, genomic analyses indicated that the deletion of chromosome 10 and the EGFR amplification present in the TZ were also present in PBZ, whereas the CDKN2A/B deletion was in most cases absent from the PBZ. The amplification of EGFR in the PBZ was also previously described [39]. These results suggest that copy number alterations targeting chromosome 7 and 10 are among the earliest events in GB tumor evolution and that some tumor clones, but not all, migrate away from the tumor. Some studies have reported findings that support this suggestion [12–14]. Glas et al. (2010) used primary cultures to isolate tumor cells from the brain tissue surrounding the resection cavity [12]. These infiltrating tumor cells displayed genetic alterations typical of GB, but could be distinguished from tumor cells isolated from the

tumor core on the basis of their distinctive molecular profiles and responses to drugs and irradiation *in vitro*. Similarly, Piccirillo et al. (2012) used fluorescence-guided surgical sampling of GB to identify phenotypically distinct tumor-initiating cell populations in the tumor mass and margins [13]. Our observations in primary cultures show that the PBZ can be altered even in the absence of tumor cell infiltration. We isolated a population of stromal cells that we named GASCs, which share phenotypic and functional properties with CAFs described in the stroma of carcinomas. In particular, they have a myofibroblast phenotype and tumorigenic and angiogenic properties [15, 16]. GASCs may be implicated in recurrence mechanisms of GB as infiltrating tumor cells.

## Conclusion

This multidisciplinary analysis of the PBZ confirms that macroscopic and radiological analyses are insufficient to determine whether the PBZ has an abnormal profile. Omic analyses highlight the complexity of this zone, which shows inter-patient variability similar to its corresponding tumor zone, which makes it difficult to identify representative markers of the PBZ. The observation of select tumor clones in the PBZ and the presence of stromal cells with

tumorigenic and angiogenic properties emphasizes the importance to characterize better this area in order to: (1) develop approaches to refine the per-operative evaluation of the PBZ to optimize the surgical resection of the tumor, and (2) improve the understanding of mechanisms that underlie GB recurrence to develop new therapies.

**Acknowledgments** We gratefully acknowledge the neurosurgeons, the radiologists and the neuropathologists at the University Hospitals of Angers, Rennes, Poitiers, Brest, and Tours for supplying us with GB and PBZ tissue samples. We also thank the members of the glioma network of the Cancéropôle Grand Ouest and Agnès Chassevent for providing facilities. This work was supported by the *Cancéropôle Grand Ouest* and the *Institut National du Cancer (INCa)*. The first author of the study (J.-M.L.) received grants from the *Société Française de Neuro-Chirurgie (SFNC)* and from the *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)*.

**Conflicts of interest** The authors report no conflict of interest concerning the materials or methods used in this study or the findings specified in this paper.

## References

- Stupp R, Hegi ME, Mason WP et al (2009) Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5 year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 10:459–466
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ et al (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352:987–996
- Chaichana KL, Jusue-Torres I, Navarro-Ramirez R et al (2013) Establishing percent resection and residual volume thresholds affecting survival and recurrence for patients with newly diagnosed intracranial glioblastoma. *Neuro-Oncol*. doi:10.1093/neuonc/not137
- Orringer D, Lau D, Khatri S, Zamora-Berridi GJ, Zhang K, Wu C, Chaudhary N, Sagher O (2012) Extent of resection in patients with glioblastoma: limiting factors, perception of resectability, and effect on survival. *J Neurosurg* 117:851–859
- Stummer W, Reulen H-J, Meinel T et al (2008) Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias. *Neurosurgery* 62:564–576 discussion 564–576
- McGirt MJ, Chaichana KL, Gathinji M, Attenello FJ, Than K, Olivi A, Weingart JD, Brem H, Quiñones-Hinojosa AR (2009) Independent association of extent of resection with survival in patients with malignant brain astrocytoma. *J Neurosurg* 110:156–162
- Sherriff J, Tamangani J, Senthil L, Cruickshank G, Spooner D, Jones B, Brookes C, Sanghera P (2013) Patterns of relapse in glioblastoma multiforme following concomitant chemoradiotherapy with temozolomide. *Br J Radiol* 86:20120414
- Petrecca K, Guiot M-C, Panet-Raymond V, Souhami L (2013) Failure pattern following complete resection plus radiotherapy and temozolomide is at the resection margin in patients with glioblastoma. *J Neurooncol* 111:19–23
- Nagashima G, Suzuki R, Hokaku H, Takahashi M, Miyo T, Asai J, Nakagawa N, Fujimoto T (1999) Graphic analysis of microscopic tumor cell infiltration, proliferative potential, and vascular endothelial growth factor expression in an autopsy brain with glioblastoma. *Surg Neurol* 51:292–299
- Scherer HJ (1940) The forms of growth in gliomas and their practical significance. *Brain* 63:1–35
- Yamahara T, Numa Y, Oishi T, Kawaguchi T, Seno T, Asai A, Kawamoto K (2010) Morphological and flow cytometric analysis of cell infiltration in glioblastoma: a comparison of autopsy brain and neuroimaging. *Brain Tumor Pathol* 27:81–87
- Glas M, Rath BH, Simon M et al (2010) Residual tumor cells are unique cellular targets in glioblastoma. *Ann Neurol* 68:264–269
- Piccirillo SGM, Dietz S, Madhu B, Griffiths J, Price SJ, Collins VP, Watts C (2012) Fluorescence-guided surgical sampling of glioblastoma identifies phenotypically distinct tumour-initiating cell populations in the tumour mass and margin. *Br J Cancer* 107:462–468
- Ruiz-Ontañón P, Orgaz JL, Aldaz B et al (2013) Cellular plasticity confers migratory and invasive advantages to a population of glioblastoma-initiating cells that infiltrate peritumoral tissue. *Stem Cells Dayt Ohio* 31:1075–1085
- Clavreul A, Etcheverry A, Chassevent A et al (2012) Isolation of a new cell population in the glioblastoma microenvironment. *J Neurooncol* 106:493–504
- Clavreul A, Guette C, Faguer R et al (2014) Glioblastoma-associated stromal cells (GASCs) from histologically normal surgical margins have a myofibroblast phenotype and angiogenic properties. *J Pathol*. doi:10.1002/path.4332
- Lemée J-M, Com E, Clavreul A, Avril T, Quillien V, de Tayrac M, Pineau C, Menei P (2013) Proteomic analysis of glioblastomas: what is the best brain control sample? *J Proteomics* 85:165–173
- Com E, Clavreul A, Lagarrigue M, Michalak S, Menei P, Pineau C (2012) Quantitative proteomic isotope-coded protein label (ICPL) analysis reveals alteration of several functional processes in the glioblastoma. *J Proteomics* 75:3898–3913
- De Tayrac M, Etcheverry A, Aubry M, Saïkali S, Hamlat A, Quillien V, Le Treut A, Galibert M-D, Mosser J (2009) Integrative genome-wide analysis reveals a robust genomic glioblastoma signature associated with copy number driving changes in gene expression. *Genes Chromosomes Cancer* 48:55–68
- De Tayrac M, Saïkali S, Aubry M, Bellaud P, Boniface R, Quillien V, Mosser J (2013) Prognostic significance of EDN/RB, HJURP, p60/CAF-1 and PDL14, four new markers in high-grade gliomas. *PLoS ONE* 8:e73332
- De Tayrac M, Aubry M, Saïkali S et al (2011) A 4-gene signature associated with clinical outcome in high-grade gliomas. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 17:317–327
- Etcheverry A, Aubry M, de Tayrac M et al (2010) DNA methylation in glioblastoma: impact on gene expression and clinical outcome. *BMC Genom* 11:701
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol (Berl)* 114:97–109
- Vindeløv LL, Christensen IJ, Jensen G, Nissen NI (1983) Limits of detection of nuclear DNA abnormalities by flow cytometric DNA analysis. Results obtained by a set of methods for sample-storage, staining and internal standardization. *Cytometry* 3:332–339
- Tofts PS, Kermode AG (1991) Measurement of the blood-brain barrier permeability and leakage space using dynamic MR imaging. I. Fundamental concepts. *Magn Reson Med* 17:357–367
- Zhang N, Zhang L, Qiu B, Meng L, Wang X, Hou BL (2012) Correlation of volume transfer coefficient Ktrans with histopathologic grades of gliomas. *J Magn Reson Imaging JMRI* 36:355–363



27. Jbabdi S, Mandonnet E, Duffau H, Capelle L, Swanson KR, Pélégriani-Issac M, Guillemin R, Benali H (2005) Simulation of anisotropic growth of low-grade gliomas using diffusion tensor imaging. *Magn Reson Med* 54:616–624
28. Server A, Kulle B, Maehlen J, Josefsen R, Schellhorn T, Kumar T, Langberg CW, Nakstad PH (2009) Quantitative apparent diffusion coefficients in the characterization of brain tumors and associated peritumoral edema. *Acta Radiol Stockh Swed* 50: 682–689
29. Tsolaki E, Svolos P, Kousi E, Kapsalaki E, Fountas K, Theodorou K, Tsougos I (2013) Automated differentiation of glioblastomas from intracranial metastases using 3T MR spectroscopic and perfusion data. *Int J Comput Assist Radiol Surg* 8:751–761
30. Tsougos I, Svolos P, Kousi E, Fountas K, Theodorou K, Fezoulidis I, Kapsalaki E (2012) Differentiation of glioblastoma multiforme from metastatic brain tumor using proton magnetic resonance spectroscopy, diffusion and perfusion metrics at 3 T. *Cancer Imaging Off Publ Int Cancer Imaging Soc* 12:423–436
31. Server A, Kulle B, Gadmar ØB, Josefsen R, Kumar T, Nakstad PH (2011) Measurements of diagnostic examination performance using quantitative apparent diffusion coefficient and proton MR spectroscopic imaging in the preoperative evaluation of tumor grade in cerebral gliomas. *Eur J Radiol* 80:462–470
32. Law M, Yang S, Wang H, Babb JS, Johnson G, Cha S, Knopp EA, Zagzag D (2003) Glioma grading: sensitivity, specificity, and predictive values of perfusion MR imaging and proton MR spectroscopic imaging compared with conventional MR imaging. *AJNR Am J Neuroradiol* 24:1989–1998
33. Min Z, Niu C, Rana N, Ji H, Zhang M (2013) Differentiation of pure vasogenic edema and tumor-infiltrated edema in patients with peritumoral edema by analyzing the relationship of axial and radial diffusivities on 3.0T MRI. *Clin Neurol Neurosurg* 115: 1366–1370
34. Colditz MJ, Jeffree RL (2012) Aminolevulinic acid (ALA)–protoporphyrin IX fluorescence guided tumour resection. Part 1: clinical, radiological and pathological studies. *J Clin Neurosci* 19:1471–1474
35. Idoate MA, Díez Valle R, Echeveste J, Tejada S (2011) Pathological characterization of the glioblastoma border as shown during surgery using 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence. *Neuropathology* 31:575–582
36. Burger PC, Heinz ER, Shibata T, Kleihues P (1988) Topographic anatomy and CT correlations in the untreated glioblastoma multiforme. *J Neurosurg* 68:698–704
37. Koppelkamm A, Vennemann B, Lutz-Bonengel S, Fracasso T, Vennemann M (2011) RNA integrity in post-mortem samples: influencing parameters and implications on RT-qPCR assays. *Int J Legal Med* 125:573–580
38. Sköld K, Svensson M, Norrman M, Sjögren B, Svenningsson P, Andrén PE (2007) The significance of biochemical and molecular sample integrity in brain proteomics and peptidomics: stathmin 2–20 and peptides as sample quality indicators. *Proteomics* 7:4445–4456
39. Mangiola A, Saulnier N, De Bonis P et al (2013) Gene expression profile of glioblastoma peritumoral tissue: an ex vivo study. *PLoS ONE* 8:e57145

# Supplementary methods

## Radiological analysis

Standardized sequences were used for pre-surgical MRI at each participating center and were carried out in the following order: T1-weighted axial and coronal acquisitions, diffusion, a quantitative dynamic contrast-enhanced (DCE) session after the injection of gadoteric acid at a concentration of 0.1 mmol/kg, and finally T2 FLAIR, T2-weighted and 3D T1 acquisitions.

Preliminary quality controls were performed at each center to ensure that acquisitions between the different sites were similar. Signal homogeneity, geometric distortions, spatial resolution, slice position, and MRI acquisition parameters were controlled between the different MR scanners [1]. Images were written onto a CD-ROM and transferred to the reference center for centralized interpretation (Functional imaging platform PRISM, Cancéropôle Grand Ouest, Rennes, France).

Quantitative and semi-quantitative DCE-MRI variables were calculated in all four zones (NZ, TZ, IZ and PBZ) for seven patients, with a DCE-MRI protocol adapted from a previous study [2]. 2D Spoiled Gradient Echo sequences (TR/TE = 150/5.6 ms and variable flip angle,  $\theta_1 = 10^\circ$ ,  $\theta_2 = 90^\circ$ ) were performed. Thirteen sagittal slices were acquired with a field of view of 180 mm x 240 mm, a slice thickness of 5 mm, and a 192 x 256 matrix leading to spatial resolution of 0.94 mm x 0.94 mm. Five longitudinal relaxation time (T1) calibration vials were positioned in the coil and were simultaneously imaged with the patient.

Images were corrected for head movements prior to DCE-MRI post-processing with 3D Slicer ([www.slicer.org](http://www.slicer.org)) and variables were calculated with Matlab (MATLAB and Statistics Toolbox Release 2012b, The MathWorks, Inc., Natick, MA, USA). We were able to extract several variables from the DCE-MRI curves; the transfer constant ( $k^{\text{trans}}$ ), which reflects capillary permeability, the fractional volume ( $v_e$ ) of extravascular extracellular space, which indicates the tissue fraction accessible to the contrast agent, and other variables [ $s_0$ ,  $s_{30}$ ,  $s_{60}$ ,  $s_{360}$ , the maximal relaxation rate variation ( $\Delta R_{1\text{max}}$ ), time to peak (TTP), the area under the curve (AUC), and the longitudinal relaxation time ( $T_{1_0}$ )]. The experimental data were adjusted with the Tofts experimental model to extract characteristics of the different sampling zones [3].

Statistical analysis was carried out with ANOVA for multivariate analysis and post-hoc analysis was carried out with an LSD test and a T3 Dunnett's test. Alpha risk was set at 5 %.

## Genomic and transcriptomic analyses

PBZ and TZ samples from ten patients were used for genomic analyses and samples from nine patients were used for transcriptomic analyses. We also used four samples of control brain parenchyma that were obtained from patients who underwent cortectomy for epilepsy, as a control for transcriptomic analysis. Total DNA was isolated with Nucleospin tissue kit and total RNA was isolated with the NucleoSpin RNAII kit (both from Macherey–Nagel, Hoerdt, France). DNA quality was assessed by electrophoresis in a 1% agarose gel. RNA integrity (RNA integrity NC8) was confirmed with an Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

The full procedure for the analysis of genomic data is described in one of our previous publications [4]. Briefly, genomic alteration profiles were obtained by comparing copy number variation between DNA extracted

from the sampling zones and matching constitutional DNA by *HaarSeg* and *CGHcall* methods with waviCGH software [5]. Comparisons between PBZ and TZ copy number alteration profiles were extracted from the TuMult analysis performed with all the samples included in the original study [6]. Analysis of gene expression profiles was restricted to TZ and PBZ and was performed with TMeV software [7]. Probes were selected on the basis of their expression levels (intensity greater than 100 in at least one of the two conditions). The 1000 most differentially expressed genes between PBZ and TZ were identified by a two-class paired SAM (Significant Analysis of Microarray). PBZ, TZ, and CB samples were grouped by hierarchical clustering with average linkage and Euclidean distance.

## Proteomic analysis

The isotope-coded protein labeling technique (ICPL) was used to analyze PBZ and TZ samples from six patients and the proteomic profile of PBZ was compared to that of TZ. Pooled brain samples from three patients who underwent epilepsy surgery were used as control brain samples. During the ICPL method, intact proteins are labeled with isotopic derivatives of nicotinic acid of different molecular weights; this is followed first by gel liquid chromatography and subsequently by tandem mass spectrometry (GeLC-MS/MS) to identify and quantify proteins with an Esquire HCT Ultra PTM Discovery mass spectrometer. Detailed methodological information about ICPL is available in our previous publications [8, 9].

Peptides were identified by querying the human Swiss-Prot database with the Mascot search engine (v2.2.07), applying a score above the identity threshold and a false discovery rate (FDR) < 1%. The ProteinExtractor algorithm in the ProteinScape 2.0 software was used to compile the identified peptides into a non-redundant protein list. Relative quantification of labeled peptides was determined for each sample with the WarpLC 1.2 software. The threshold of differential expression between PBZ and CB samples, and between PBZ and TZ samples, was set to > 1.41 for up-regulated proteins and < 0.71 for down-regulated proteins, which is above the calculated technical variation of the method [8].

## References

1. Ollivro S, Eliat P-A, Hitti E, Tran L, de Certaines JD, Saint-Jalmes H (2012) Preliminary MRI quality assessment and device acceptance guidelines for a multicenter bioclinical study: the GO Glioblastoma Project. *J Neuroimaging Off J Am Soc Neuroimaging* 22:336–342
2. Eliat P-A, Olivie D, Saïkali S, Carsin B, Saint-Jalmes H, de Certaines JD (2012) Can dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging combined with texture analysis differentiate malignant glioneuronal tumors from other glioblastoma? *Neurol Res Int* 2012:195176
3. Tofts PS, Kermode AG (1991) Measurement of the blood-brain barrier permeability and leakage space using dynamic MR imaging. 1. Fundamental concepts. *Magn Reson Med Off J Soc Magn Reson Med Soc Magn Reson Med* 17:357–367
4. De Teyrac M, Etcheverry A, Aubry M, Saïkali S, Hamlat A, Quillien V, Le Treut A, Galibert M-D, Mosser J (2009) Integrative genome-wide analysis reveals a robust genomic glioblastoma signature associated with copy number driving changes in gene expression. *Genes Chromosomes Cancer* 48:55–68
5. Carro A, Rico D, Rueda OM, Díaz-Uriarte R, Pisano DG (2010) waviCGH: a web application for the analysis and visualization of genomic copy number alterations. *Nucleic Acids Res* 38:W182–187
6. Letouzé E, Allory Y, Bollet MA, Radvanyi F, Guyon F (2010) Analysis of the copy number profiles of several tumor samples from the same patient reveals the successive steps in tumorigenesis. *Genome Biol* 11:R76
7. Saeed AI, Sharov V, White J, et al (2003) TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *BioTechniques* 34:374–378

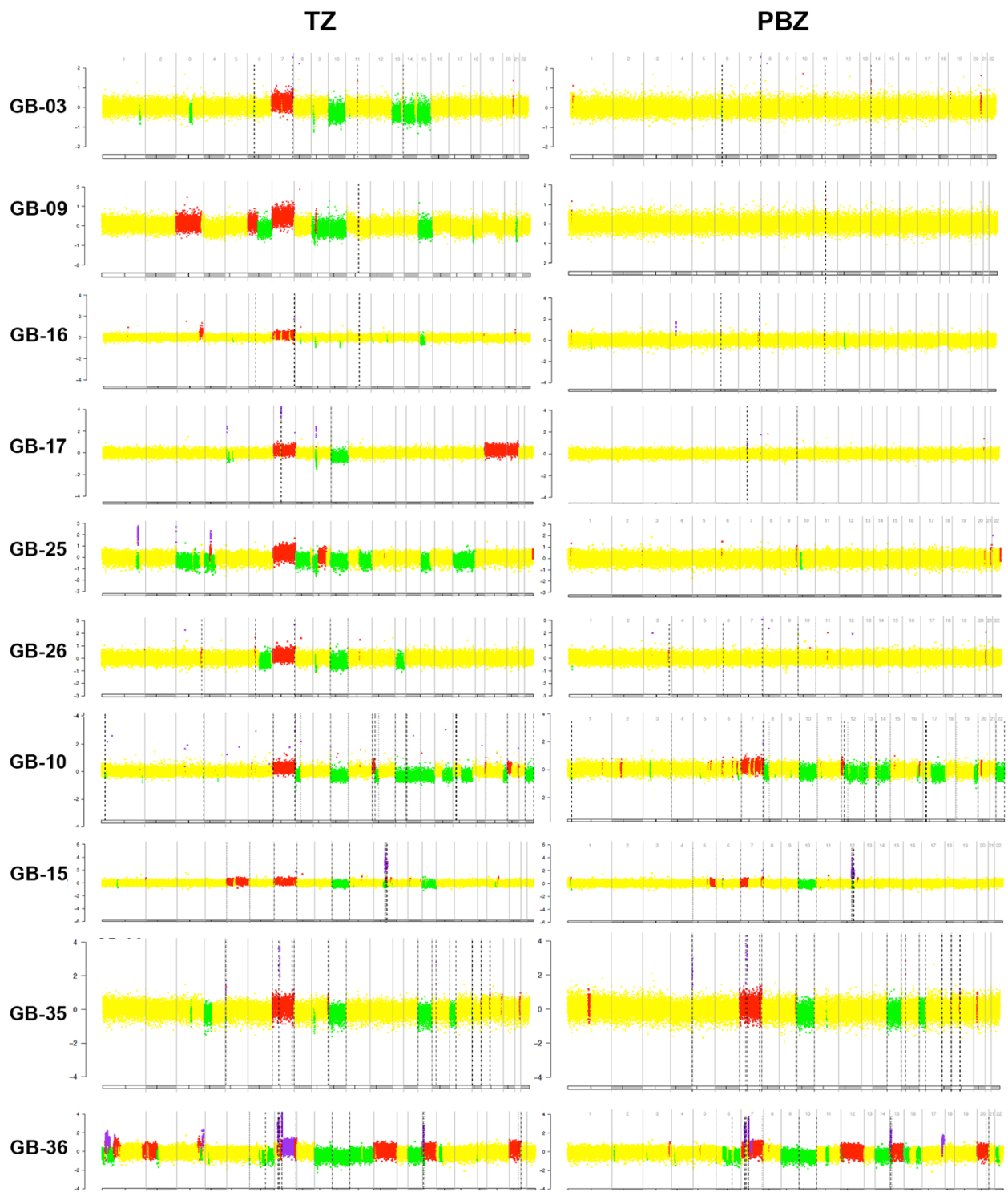
8. Com E, Clavreul A, Lagarrigue M, Michalak S, Menei P, Pineau C (2012) Quantitative proteomic Isotope-Coded Protein Label (ICPL) analysis reveals alteration of several functional processes in the glioblastoma. *J Proteomics* 75:3898–3913
9. Lemée J-M, Com E, Clavreul A, Avril T, Quillien V, de Tairac M, Pineau C, Menei P (2013) Proteomic analysis of glioblastomas: what is the best brain control sample? *J Proteomics* 85:165–173

**Supplementary Table 1:** Microscopic histopathological classification of tumor cell infiltration in studied PBZ samples

<b>Histopathological analysis of the PBZ</b>								
<b>No infiltration</b>			<b>Mild infiltration</b>			<b>Marked infiltration</b>		
GB-01	GB-02	GB-03	GB-05	GB-10	GB-15	GB-04	GB-35	
GB-06	GB-07	GB-08	GB-17	GB-34	GB-36			
GB-09	GB-11	GB-12						
GB-13	GB-14	GB-16						
GB-21	GB-22	GB-25						
GB-26	GB-29	GB-31						
GB-32	GB-37							

**Supplementary Table 2:** Results of 19 primary cultures, sorted by the type of developing cells

<b>Glioma associated stroma cells</b>						<b>GB cells</b>		
GB-01	GB-02	GB-03	GB-04	GB-06		GB-05	GB-09	GB-10
GB-07	GB-08	GB-13	GB-14	GB-29		GB-11	GB-12	GB-34
	GB-31	GB-32	GB-37					



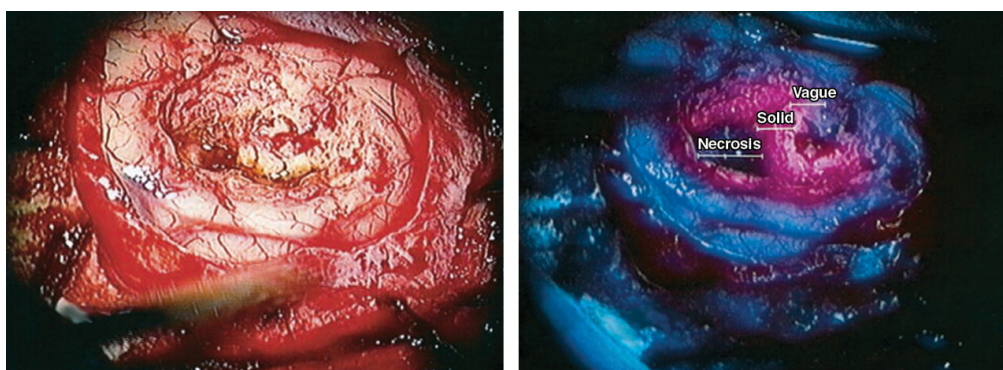
**Supplementary figure 1:** TZ and PBZ CGH array profiles of the different GB samples

## 4. Développement de nouvelles modalités d'analyse per-opératoire de la ZMN des GB

Malgré les progrès technologiques récents, le taux de résection complète des GB reste faible avec un taux de résection radiologiquement complète de 20 à 37 % en utilisant les techniques opératoires conventionnelles (39,40,87). Ce faible taux de résection chirurgicale peut être expliqué à la fois par la nature infiltrante des GB, mais aussi par la faible sensibilité des techniques actuellement disponibles en routine au bloc opératoire de Neurochirurgie pour évaluer la qualité de la résection chirurgicale.

Le développement de l'analyse per-opératoire de la ZMN représente un véritable challenge pour améliorer la résection chirurgicale du GB. En effet, cette résection constitue la première étape de la prise en charge thérapeutique du patient et sa qualité a une influence directe sur le pronostic vital et fonctionnel du patient. Des études récentes ont mis en évidence que l'exérèse de plus de 90% de la tumeur et un résidu tumoral post-chirurgical de moins de 5 cm<sup>3</sup> sont statistiquement associées à une survie globale et à une survie sans progression plus importantes (39,40,87). Il est aussi décrit dans la littérature que plus de 90% des récurrences ont lieu au niveau des marges de la cavité de résection chirurgicale (88-90).

Différentes techniques ont été développées afin de pouvoir mieux évaluer en per-opératoire la présence d'un infiltrat tumoral, la plus connue et la plus diffusée étant la chirurgie guidée par fluorescence. Cette technique, développée par Stummer et coll. (91), permet de marquer les cellules tumorales après ingestion par le patient d'acide  $\delta$ -amino-lévilinique (5-ALA), qui sera métabolisé en protoporphyrine IX dans le tissu tumoral, entraînant une fluorescence rose du tissu tumoral sous un éclairage dans le proche-ultraviolet (Figure 16). Cette technique a été validée par un essai de phase III, permettant d'atteindre un taux de résection complète de 65 % et fait actuellement l'objet d'une évaluation en France dans le cadre d'un projet STIC piloté par le Pr Guyotat (91).



**Figure 16 : Exemple de chirurgie assistée par fluorescence permettant une bonne visualisation de la tumeur**  
Tiré de Schucht et al., *Neurosurgery*, 2012 (92)

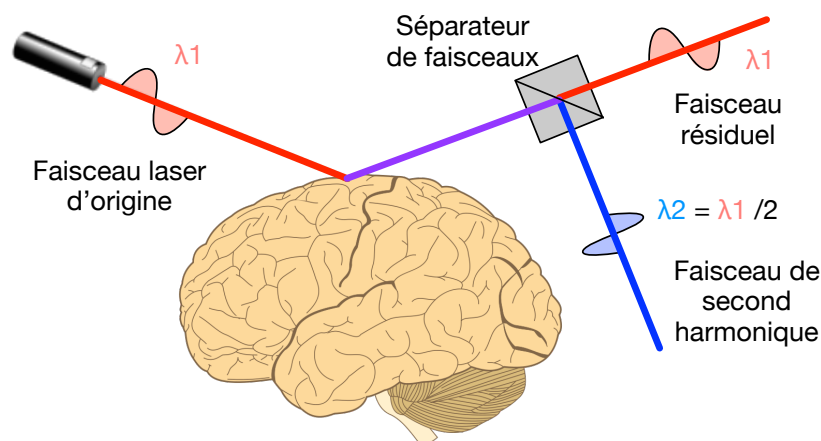
Cette technique, bien que très performante dans les GB, présente plusieurs limitations techniques. Une concentration cellulaire minimale est nécessaire afin de produire une fluorescence visible à l'œil nu, ce qui signifie qu'une infiltration cellulaire diffuse ne pourra pas être visualisée du fait d'une fluorescence insuffisante. De plus, certains tissus cérébraux sains comme les murs des cavités ventriculaires et les plexus choroïdes fixent de manière non spécifique le 5-ALA, ce qui doit inciter à la plus grande prudence lors de l'ouverture des ventricules en per-opératoire sous peine de réséquer du tissu cérébral sain.

Suite aux résultats obtenus lors de notre étude des caractéristiques multimodales de la ZMN des GB, nous avons choisi d'explorer de nouvelles modalités d'analyse per-opératoire des GB et de leur ZMN afin d'optimiser la qualité de la résection chirurgicale avec des techniques de biopsies optiques tels que la microscopie biphotonique. Le terme de « biopsie optique » est un terme générique désignant les analyses non-invasives d'échantillons de tissus basées sur l'analyse de la diffusion, réflexion ou propagation de faisceaux lumineux, afin d'en extraire des informations sur la composition du tissu étudié. Ces méthodes d'analyses sont non-destructives, c'est à dire qu'elles ne nécessitent pas de dégrader l'échantillon étudié. De plus, certaines de ces analyses sont réalisables en per-opératoire sur du tissu vivant. Toutes ces propriétés font des biopsies optiques des outils extrêmement intéressants et prometteurs pour développer l'analyse per-opératoire de la ZMN des GB, et ainsi optimiser la qualité de la résection chirurgicale.

#### 4.1. La microscopie biphotonique

La microscopie biphotonique est une technique permettant d'étudier des échantillons de tissus vivants jusqu'à une profondeur d'1 mm avec une haute résolution. Cette technique repose sur l'étude d'un échantillon par faisceau lumineux émis par un laser titane-saphir, permettant d'émettre des impulsions focalisées de très courte durée, permettant d'étudier de manière précise la fluorescence d'un tissu sans endommager les tissus environnants (93,94).

La microscopie biphotonique permet d'obtenir des images en génération de second harmonique. Cette technique utilise un effet linéaire de second ordre permettant un doublement de la fréquence des photons émis par une source laser en traversant un matériel non-linéaire (Figure 17). Ce phénomène permet d'étudier la structure de tissus vivants contenant des molécules non-centrosymétriques, comme le collagène (94,95).

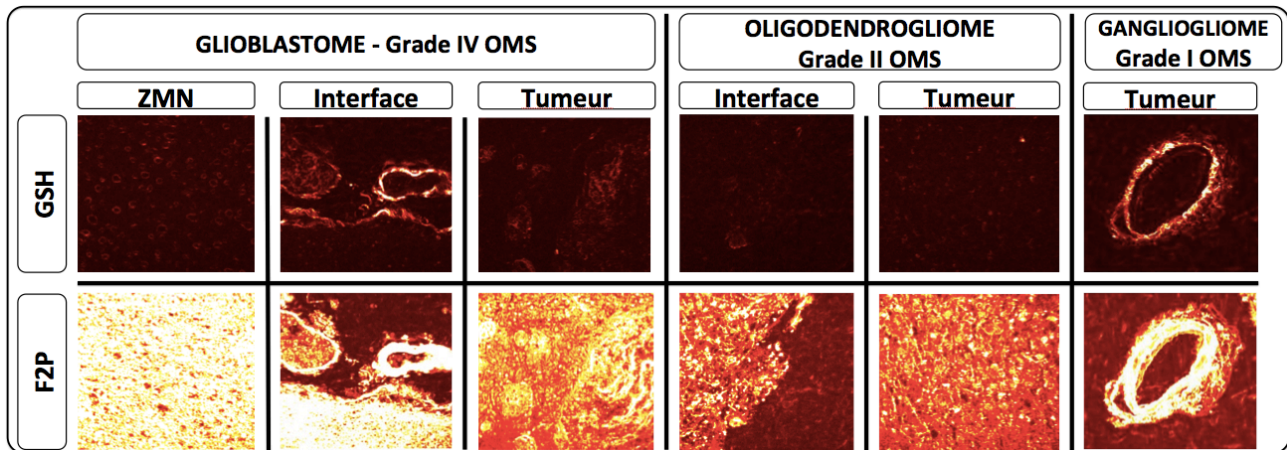


**Figure 17 : Illustration du principe de l'imagerie de second harmonique**

L'utilisation de la microscopie biphotonique comme aide à l'évaluation de la qualité de la résection chirurgicale nous semble intéressant puisqu'il n'existe pas de collagène dans le cerveau sain, tandis que plusieurs études ont mis en évidence la production de collagène par les cellules de GB (96-102). Il existe quelques publications s'intéressant à l'étude des tumeurs cérébrales en microscopie biphotonique, se focalisant sur la caractérisation tissulaire et histologique des tumeurs cérébrales et décrivant des patterns de fluorescence distincts (95,103).



Nous avons analysé en fluorescence à 2 photons et en imagerie de second harmonique des lames de tumeurs gliales des différents grade OMS, des lames du tissu cérébral normal ainsi que des lames de ZMN de GB afin d'évaluer la pertinence de cette méthode d'analyse dans l'évaluation de la qualité de la résection chirurgicale. Ce travail a été réalisé en partenariat avec des chercheurs du Département de Physique de l'Université d'Angers (Dr Gindre et S. Rakotoarimalala, doctorant). Les premiers résultats sont encourageants, montrant une délimitation nette entre la tumeur et le tissu cérébral sain. Ces premiers résultats ont fait l'objet de communications par poster dans plusieurs congrès français et internationaux, dont le congrès de la Société Française de Neurochirurgie (Clermont-Ferrand, 2014) et le congrès de l'association européenne de Neuro-Oncologie (Turin, 2014) (Figure 18).



**Figure 18 : Illustration des résultats obtenus en microscopie biphotonique en imagerie de second harmonique et en fluorescence à 2 photons en fonction de l'histologie des différents échantillons tumoraux**

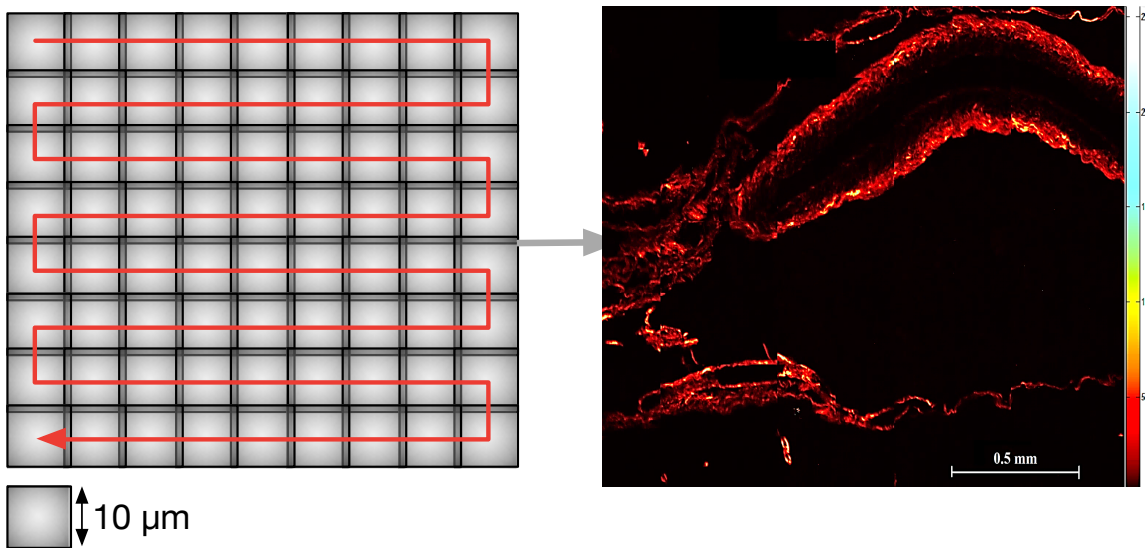
F2P : Fluorescence à 2 photons

GSH : génération de second harmonique

Malgré de premiers résultats encourageants, la technique d'analyse de la ZMN par microscopie biphotonique présente des limitations techniques sur lesquelles nous travaillons afin de simplifier et d'automatiser les acquisitions. Actuellement, l'acquisition des images se fait à l'aide d'un dispositif piloté par un programme dédié que nous avons écrit en langage Labview®, nous limitant actuellement à l'acquisition d'images de 10 mm<sup>2</sup> (Figure 19). La faible taille de ces images pose un problème à la fois de lenteur d'acquisition, puisqu'il est nécessaire de programmer manuellement le déplacement de la lame avant de lancer une autre acquisition, mais aussi de représentativité de l'échantillon, car la nature hétérogène d'un GB ou la présence d'un infiltrat localisé de cellules tumorales peut difficilement être évalué avec des images de cette taille. Nous avons résolu en partie ce problème en automatisant l'acquisition des images et le déplacement de la platine afin de scanner des zones de 5 mm x 5 mm.

Notre prochain objectif est de diminuer le temps d'acquisition de cette technique car l'acquisition d'une surface de 1 cm<sup>2</sup> avec cette technique prend de 30 min à 2 h selon la définition des images acquises, ce qui n'est pas compatible pour l'instant avec une utilisation en per-opératoire. En parallèle à ces problématiques d'acquisition et de traitement des images, nous évaluons la possibilité de miniaturiser cette technique et de pouvoir la transférer dans le bloc opératoire. En effet, pour le moment, la taille du dispositif nécessaire à la génération d'un faisceau de second harmonique et le dispositif de traitement du signal ne permettent pas son utilisation au sein d'un bloc opératoire, cantonnant cette technique à l'analyse *ex vivo* d'échantillons de tissus prélevés au bloc opératoire.





**Figure 19 : Illustration du processus d'automatisation des acquisitions en microscopie biphotonique permettant l'acquisition d'une image de plus grande taille**

La figure de gauche illustre le processus d'acquisition des différentes vignettes afin de reconstituer une image de plus grande taille (Figure de gauche). Illustration d'une image en microscopie biphotonique d'un échantillon de tissu cérébral (Figure de droite).

## 4.2. Développement d'une nouvelle technique de biopsie optique permettant l'analyse per-opératoire du cerveau en Neurochirurgie

En parallèle à la microscopie biphotonique, j'ai développé dans le cadre de mon travail de Thèse, une autre technique de biopsie optique dédiée à une utilisation au bloc opératoire de Neurochirurgie, en collaboration avec le Pr Humeau-Heurtier et le Laboratoire Angevin de Recherche en Ingénierie des Systèmes.

Pour concevoir et développer ce nouvel imageur adapté à la Neurochirurgie, nous avons déposé un projet de recherche qui a été sélectionné pour être promu par le CHU d'Angers. J'ai aussi obtenu une bourse de 10 000 € auprès de la Société Française de Neurochirurgie qui nous permettra de financer une grande partie du coût des expérimentations. Ce travail a débuté et s'effectue en collaboration avec le Pr Anne Humeau-Heurtier, du Laboratoire Angevin de Recherche en Ingénierie des Systèmes (LARIS). En se basant sur des publications précédentes, deux élèves-ingénieurs en stage M1 que j'ai co-encadré ont réalisé un prototype d'imageur à bas coût pour moins de 300 €. Une déclaration d'invention a été rédigée et déposée à la Société d'Accélération et de Transfert de Technologies de l'Ouest (SATT). Cette déclaration d'invention a été évaluée favorablement et la SATT a accepté de financer l'intégralité des frais de rédaction et de dépôt du brevet. La déclaration d'invention a été transférée dans au cabinet de brevet ICOSA. **Le dépôt d'un brevet est actuellement en cours d'évaluation par le cabinet de brevet.** Je ne détaillerai donc pas les travaux en cours dans le cadre de ce travail de Thèse.

*❖ Déclaration d'invention en vue d'un dépôt de brevet :*

**Développement d'un nouveau système de biopsie optique dédié à une utilisation per-opératoire en Neurochirurgie**

Lemée JM, Ter Minassian A, Humeau-Heurtier A, Menei P

*Brevet en cours d'évaluation, cabinet de brevet ICOSA*

# Revue de la littérature

L'ensemble du travail expérimental réalisé au cours de ma Thèse a permis de souligner le caractère complexe de la ZMN des GB, possédant à la fois des caractéristiques du tissu tumoral sain, du tissu tumoral, mais aussi des caractéristiques et des altérations qui lui sont propres. En parallèle du travail expérimental de ma Thèse, j'ai réalisé une revue de la littérature portant sur les caractéristiques multimodales de la ZMN. Cette revue de la littérature est focalisée sur les caractéristiques moléculaires et cellulaires de cette zone, les différentes possibilités d'analyses per-opératoires de la ZMN ainsi que les thérapies ciblées développées ou en cours de développement ciblant spécifiquement la ZMN ou les cellules tumorales résiduelles et/ou stromales situées dans cette zone.

Cet article a été **soumis à *Neuro Oncology*** et est actuellement en cours de revue.

❖ Article n°4 :

**Thinking outside the box: a systematic review of glioblastoma peritumoral brain zone characteristics and perspectives for future research**

Lemée JM, Clavreul A, Menei P  
*Neuro-Oncology, (soumis)*

# Thinking outside the box: a review of glioblastoma peritumoral brain zone characteristics and perspectives for future research

LEMEE, J.-M. <sup>1,2</sup>  
CLAVREUL, A. <sup>1,2</sup>  
MENEI, P. <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Neurosurgery, University Hospital of Angers, 4, rue Larrey, 49933 Angers Cedex 09, France

<sup>2</sup> INSERM U1066, "Micro- et nano-médecine biomimétiques", Bâtiment IRIS 3e étage, 4, rue Larrey, 49933 Angers Cedex 09, France

Corresponding author:

Pr Philippe MENEI, M.D., Ph.D.

Department of Neurosurgery – University Hospital of Angers  
4, rue Larrey 49933 Angers Cedex 09, France

Phone: +33 (0) 2 41 35 39 88

Fax: +33 (0) 2 41 35 45 08

Mail: [phmenei@chu-angers.fr](mailto:phmenei@chu-angers.fr)

# Abstract

Glioblastoma (GB) is the most frequent and aggressive primary tumor of the central nervous system. Prognosis remains poor despite ongoing progresses. Even in cases of complete resection of the gadolinium-enhanced portion of the GB, 90% of recurrences occur at the margin of the surgical resection, in the macroscopically normal peritumoral brain zone (PBZ). We dispose of an abundant literature about the GB tumor core characteristics and its microenvironment, but only few studies have focused on the GB PBZ. The high rate of local recurrences in this area and the limited success of targeted therapies against GB show the need of a better understanding of GB PBZ. We present here a systematic review of the literature on the GB PBZ, focusing on its radiological, cellular and molecular characteristics. We highlight perspectives to develop per-operative analyses of PBZ to optimize the quality of the surgical resection and targeted therapies against GB.



# Introduction

Glioblastoma (GB) is the most frequent and aggressive primary tumor of the central nervous system (CNS). The incidence varies depending on the country and the population, with 4.96 cases / 100 000 inhabitants / year<sup>1</sup>. Despite ongoing progresses in GB therapeutic management, the prognosis remains poor with an overall survival of 14 to 15 months after complete surgical resection and adjuvant radio-chemotherapy<sup>2-4</sup>. Typically, radiological recurrence occurs 6 to 7 months after surgery, shortly followed by a clinical relapse of the disease.

The extensive analyses and characterization of GB allowed the identification of several biomarkers implicated in cellular proliferation, invasion or angiogenesis<sup>5</sup>. Several of these biomarkers may be useful for targeted therapies against GB. For example, targeted therapies against the vascular endothelial growth factor (VEGF) have been developed acting directly on the VEGF like bevacizumab<sup>3,4</sup>, or indirectly on cellular pathways enabling its activity, like enzastaurin, cediranib, or cilengitide<sup>6-8</sup>. Despite the originality of these targeted therapies, few of them have been proved to be efficient in GB therapy, all of them failing to demonstrate a significant improvement of overall survival. The recent phase III studies on bevacizumab showed only an improvement of progression-free survival<sup>3,4</sup>. The few progresses made in GB therapy these last years, despite the advent of targeted therapies, make the understanding of the mechanisms underlying tumor recurrences a special topic of interest.

In 90% of cases, the GB recurrence is located at the margin of the surgical resection cavity, in the peritumoral brain zone (PBZ)<sup>9</sup>. Despite this statement, which makes the PBZ an interesting field of study for improvement of GB therapies, there are few studies available in the literature on this area while there are abundant data about the characteristics of the GB tumor core and its microenvironment. We present here a review on the PBZ of GB, focusing on its radiological, cellular and molecular characteristics based on the current literature and our findings obtained during the Grand Ouest Glioma Project, a translational research project on the intratumoral heterogeneity that we conducted recently<sup>10-17</sup>. We highlight also the perspectives for future research in PBZ analysis to develop new targeted therapies against GB and to optimize the quality of the surgical resection.

## Characterization of GB PBZ

### Radiological aspect

PBZ is radiologically described as the brain area surrounding the tumor, without contrast enhancement in T1 gadolinium-enhanced three dimensional (3D) magnetic resonance imaging (MRI) but often hyper intense in T2-weighted, especially in T2-FLAIR acquisition, reflecting a vasogenic edema in the vicinity of the tumor and may signal the presence of a tumoral infiltration. The absence of contrast enhancement in gadolinium enhance MRI of the PBZ does not mean the lack of tumor cells in this area since a minimal tumor cell density of 500 cells/mm<sup>3</sup> is necessary to produce a detectable alteration of brain MRI<sup>18</sup>. To assess the presence of tumoral infiltration in the PBZ, various pre-operative MRI sequences can be used. For example, it has been shown that

an increase of the apparent diffusion coefficient (ADC) in the PBZ which measures the magnitude of water molecule diffusion is correlated with an infiltration of tumor cells<sup>19,20 21-23</sup>. The volume transfer coefficient  $k^{trans}$ , which is associated with gliomas' microvascular permeability, is also the most sensitive and specific parameter of the dynamic contrast enhancement (DCE) analysis for brain infiltration histological grading<sup>24</sup> (Lemée et al., *journal of Neuro-Oncology, under revision*). Furthermore, the role of diffusion tensor imaging (DTI) was highlighted in a recent review, describing an inverse correlation between the fractional anisotropy (FA) and the infiltration of the PBZ<sup>25,26</sup>. Some authors proposed a tumoral infiltration index based on the ratio between the expected and the observed FA to determine the existence of a tumoral cell infiltration in the PBZ<sup>27</sup>, although this index may not be able to evaluate efficiently the presence of a tumoral infiltration among the peritumoral vasogenic edema<sup>28</sup>.

## **Cellular content**

### ***Tumor cells***

PBZ shares the same macroscopical aspect as the normal brain, but it is well known that the GB cell infiltration extends well beyond the radiological limits of the tumor in the macroscopically normal PBZ, which may lead to considerate GB more as a systemic brain disease than a delineated tumor<sup>29</sup>. Classically, the presence of tumoral cells in the PBZ is sought using microscopical analyses with hematoxylin-phloxin-saffron (HPS) staining and/or immunohistochemistry using anti-p53 and anti-Ki-67 antibodies. More recently, we analyzed 28 GB PBZ biopsies stained with HPS and we found tumor cell infiltration in one third of these samples (Lemée et al., submitted). We also performed DNA index analysis by flow cytometry on 25 of these PBZ. Eight (32%) displayed aneuploid cells and the percentage of aneuploid cells ranged from 3 to 44%. Interestingly, the PBZ of 3 patients contained only some of the aneuploid cell populations identified in their corresponding TZ. This suggests that some tumor clones, but not all, migrate away from the tumor core.

In accordance with this hypothesis, the infiltrating GB cells in PBZ have been recently characterized using primary cell cultures and they have been shown phenotypically different from those isolated from the corresponding mass<sup>30-33</sup>. In particular, it has been shown that residual GB cells from the resection margin biopsies constitute a population of rapidly proliferating and highly invasive cells compared to GB cells from center biopsies<sup>30,32</sup>. Furthermore, residual GB cells responded dissimilarly from their corresponding GB center cells to drug and irradiation challenges *in vitro*<sup>30</sup>. Glas et al. (2010) as well as two other studies using 5-aminolevulinic acid-assisted surgery observed that in comparison with center GB cells, residual GB cells showed low self-renewing capacities<sup>30,31,34</sup>. A number of genes that may serve to distinguish residual GB cells from center GB cells have been identified<sup>30,32,33</sup>. These markers include genes involved in stem cell phenotype (CD133, Sox2, nestin, musashi 1), invasion (Galectin-1, Rac1, Rac3, RhoA GTPases, p27,  $\alpha v \beta 3$  integrin), cell adhesion (CDH20, PCDH19), migration (SNAI2, NANOG, USP6, DISC1), immune or inflammatory responses (TLR4) and blood vessel formation (HEG1, VEGFR2), opening new lines of research to deepen our understanding of the molecular features that promote GB dissemination and progression.

## ***Reactive astrocytes***

Astrocytes are star-shaped glial cells found in the CNS, assuming several important functions including synaptic transmission and information processing<sup>35</sup>. The presence of reactive astrocytes around GB cells is well described. However, the role of these cells in GB progression is not completely defined. Several studies have demonstrated that reactive astrocytes promote tumor growth and survival<sup>36,37</sup> and stimulate brain metastasis of breast and lung cancer cells by secreting various cytokines<sup>37,38</sup>. Astrocytes have also been described to enhance the invasion potential of GB cells by producing neurotrophic factors such as TGF- $\alpha$ , CXCL12, S1P and GDNF<sup>39-42</sup>. Astrocytes, through their high expression of IL1 $\beta$  may also be involved in immune reactions against the tumor<sup>43</sup>.

## ***Inflammatory cells***

The presence of inflammatory cells in GB tumor core and in particular tumor associated macrophages (TAMs) and microglia is largely described<sup>44,45</sup>. The number of TAMs in GB (grade IV) was higher than in grade II or III gliomas, and was closely correlated with the intratumoral vascular density<sup>46</sup>. While the abundance of TAMs *per se* is not associated with differential survival in GB patients, the activation state of TAMs (M1 or M2) has been shown to confer some prognostic value<sup>47-49</sup>. Specifically, TAMs that have differentiated into M2 macrophages act as "protumoral macrophages" and contribute to the progression of disease. TAMs are now emerging as a promising target for new adjuvant therapies for GB<sup>45,50</sup>.

Lot of studies focused on the inflammatory cells present in the GB tumor core, we found only one study conducted by Parney et al. (2009) on the inflammatory cells in the PBZ<sup>51</sup>. In this study, macrophage-like cells were the most common infiltrating inflammatory cells in the PBZ followed by microglia-like cells and lymphocytes. Also, the concentration of these inflammatory cells in PBZ was an order of magnitude lower than in GB tumor core. Actually, we do not know if the macrophage-like cells present in PBZ possess similar characteristics with TAMs described in the GB tumor core.

## ***Other stromal cells***

We have isolated, from GB histologically normal PBZ, another population of stromal cells, which we have named glioblastoma-associated stromal cells (GASCs). GASCs are diploid, do not display the genomic alterations typical of GB cells and have phenotypic and functional properties in common with the cancer-associated fibroblasts (CAFs) described in the stroma of carcinomas. In particular, GASCs express markers associated with CAFs such as alpha smooth-muscle actin ( $\alpha$ -SMA), platelet derived growth factor receptor-beta (PDGFR $\beta$ ), S100A4/FSP1 and CD46. They have angiogenic properties and tumor-promoting effects on GB cells *in vitro* and *in vivo*<sup>10,11</sup>. These GASCs found mostly near blood vessels in PBZ, could be a vascular niche constituent, creating a permissive environment facilitating angiogenesis and possibly the colonization of recurrence-initiating cells. The origin of GASCs has not been identified. We previously showed that these cells share several properties in common with mesenchymal stem cells (MSCs), suggesting that GASCs may be derived from these cells<sup>10</sup>.

## **Molecular profile**

## ***Immunohistochemistry***

Various immunohistochemistry studies on PBZ have been done and suggest that the peritumor compartment undergoes significant modifications in terms of vascularization and biomolecular features. For example, PBZ has a specific increase of adenosine A1 receptors and STAT 1 expression compared to GB and normal brain samples<sup>52,53</sup>. These modifications may have a neuroprotective effect against GB progression, since STAT1 is a notorious tumor suppressor protein *via* the JAK-STAT pathway and that adenosine A1 receptor-deficient mice presented a faster glioma growth than their normal counterparts<sup>53,54</sup>. The immediate vicinity of GB is also characterized by increased levels of copper and zinc<sup>52</sup> but the pathophysiological impact of these altered peritumoral element distribution needs to be explored.

Markers of neovascularization, such as CD105, nestin, phosphorylated extracellular signal-regulated kinases (ERKs) and c-Jun NH2 terminal kinases (JNKs) were expressed in PBZ independently of the presence of tumor cells<sup>55-57</sup>. In addition, CD105, JNK and nestin expression in PBZ has been shown to carry a bad prognostic significance in GB patients<sup>55,56</sup>.

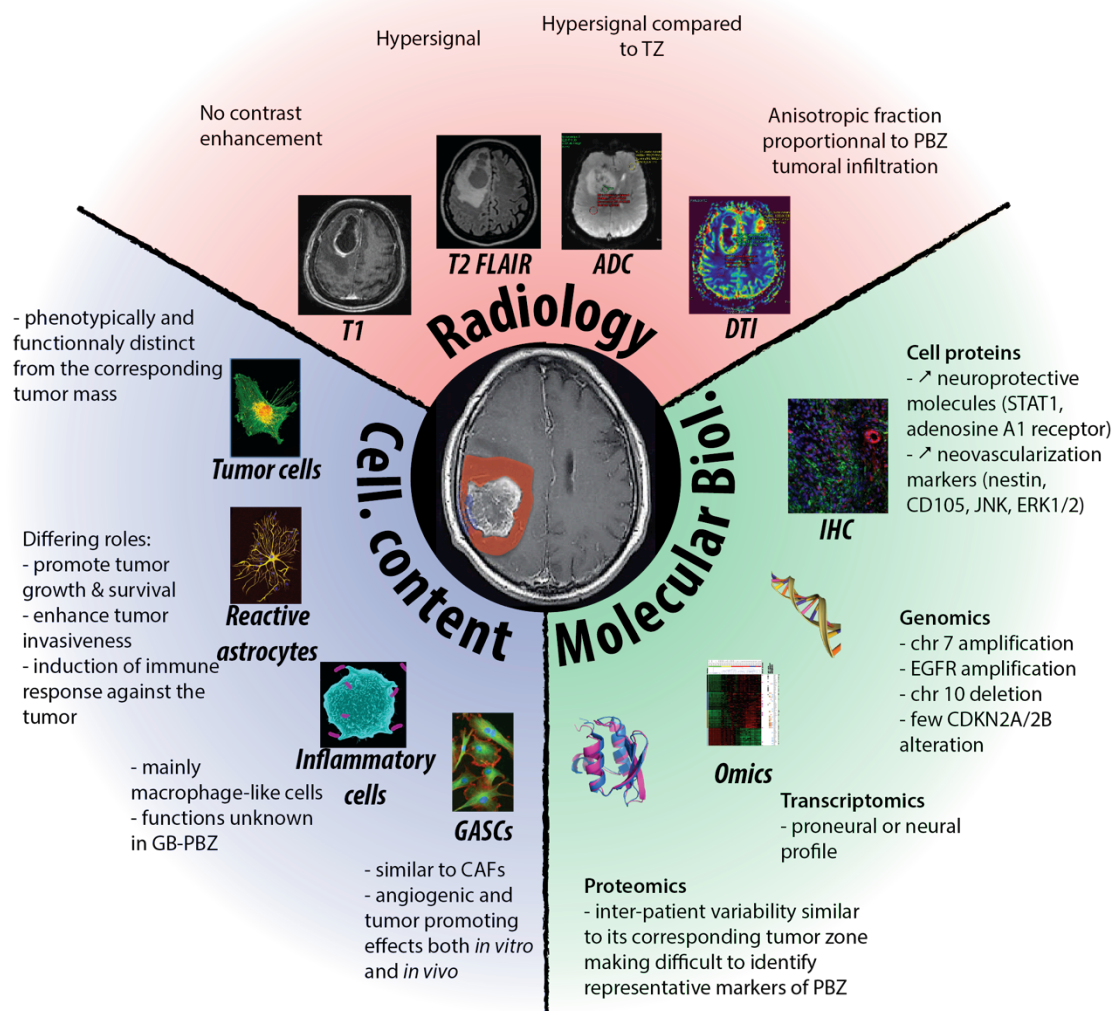
## ***Omics***

Molecular biology made important progresses in the last years, with the development and increased ease of omic analyses including genomic, transcriptomic and proteomic analyses. These analyses have been largely performed on the tumor core of GB and we conducted recently during the Grand Ouest glioma project, such analyses on PBZ (*Lemée et al. Journal of Neuro Oncology, Aubry et al., submitted*). Ten PBZ were analyzed through genomic analysis. For 6 PBZ considered free of tumoral infiltration in histopathological analysis, no genomic alteration was found while their corresponding TZ presented the typical genomic alterations of GB including loss/partial loss of chromosome 10, focal deletion of the CDKN2A/B locus, polysomy of chromosome 7 and focal amplification of EGFR. For 4 PBZ in which an infiltration of tumor cells was identified through histopathological analysis, genomic alterations were identified, corresponding to some but not all alterations found in their nearby corresponding TZ. Classical alterations found in GB were identified in these PBZ, like chromosome 7 polysomy, EGFR amplification and chromosome 10 deletion but CDKN2A/2B deletion was rare. This result suggests that chromosome 7 and 10 alterations are forward events in the GB tumorigenesis and that as we described above some but not all tumor clones migrates away from the tumor core to the PBZ. These results are coherent with the recent work of Mangiola et al. (2013), where they described an EGFR amplification in the PBZ<sup>58</sup>.

We observed through the transcriptomic analysis that PBZ has a proneural or neural profile, independently of the adjacent GB subtype (*Aubry et al, submitted*)<sup>59</sup>. Furthermore, transcriptomic and proteomic analyses of the PBZ highlight inter-patient variability similar to its corresponding tumor zone. This complexity makes it difficult to identify a molecular signature of the PBZ. We just noticed an intratumoral gradient of genes and proteins from the tumor core to the PBZ. A large cohort of PBZ samples is necessary to identify if this area presents a specific molecular signature, but the constitution of such a cohort faces the ethical issue of sampling "normal" brain tissue around the tumor.

Furthermore, the identification of such signature is also made difficult by the choice of the brain control sample to be used. The brain control samples commonly used in proteomic or transcriptomic studies include

epilepsy surgery brain samples (EB). However, we showed recently that EB displayed a tumoral-like expression pattern and was not appropriate for identifying proteomic or transcriptomic profile of PBZ. Mangiola et al. (2013) used patients operated for deep cavernomas with radiological signs of recent bleeding as controls to define the gene expression profile of PBZ<sup>58</sup>. They identified 57 genes significantly differentially expressed between PBZ and brain control samples. Genes associated with growth and proliferation and cell motility/adhesion were up-regulated while genes involved in neurogenesis were largely down-regulated in GB PBZ. However, these data were obtained with only 4 PBZ samples and a large cohort of PBZ samples is necessary to identify a molecular signature of this area able to predict a clinical outcome in GB patients.



**Figure 1: Graphical representation of PBZ multimodal features identified through the systematic review in radiology, cellular content and molecular biology**

## Perspectives on GB PBZ

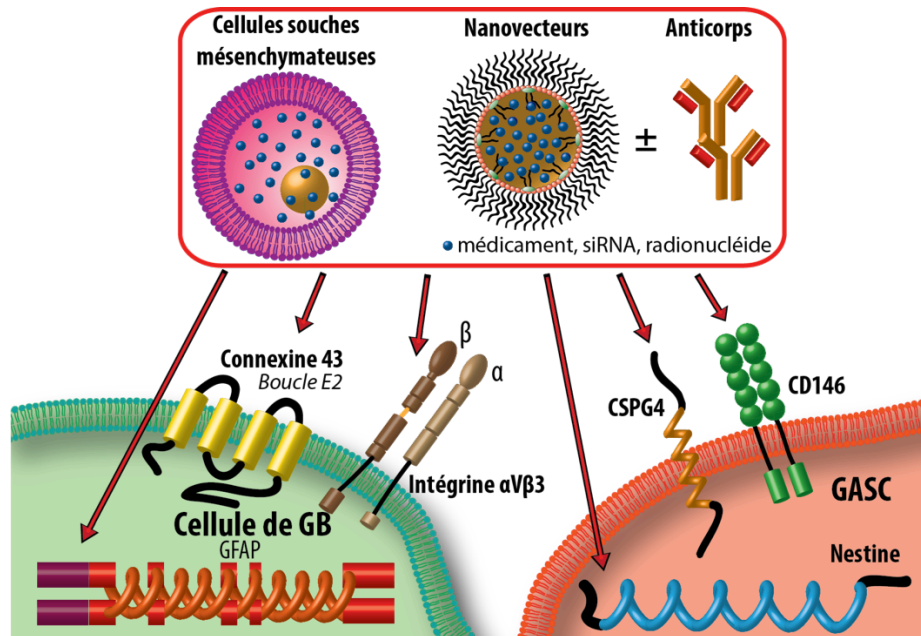
### GB PBZ: a potential target for GB therapy?

Among the many promising preclinical studies, only few have been successful in human clinical trials. The most recent examples being the trials on anti-angiogenic therapies, which did not prove to have a significant impact on overall survival<sup>5</sup>. The two last trials on bevacizumab, a humanized monoclonal **antibody**

against VEGF, find only an increase of progression free survival <sup>3,4,6-8</sup>. Other approaches in GB targeted therapies focus on interleukin 13 receptor alpha 2 (IL13R $\alpha$ 2) and EGFR variant III (EGFRvIII) as targets for specific drug delivery in GB <sup>60,61</sup>. While these targeted therapies show promising results in preclinical rodent glioma models, they demonstrate limited success in human clinical trials due in part to the intra tumoral heterogeneity in the expression of these targets.

To find new targets and develop new treatments for GB, it is of special interest to further characterize the cellular and molecular components of the PBZ because this region corresponds to the residual disease that is subsequently exposed to therapy and from which treatment-resistant recurrent disease emerges. As described above, some studies highlight that residual tumor cells display alterations different from those of cells isolated from the corresponding tumor mass <sup>30-32</sup>. For example, Ruiz-Ontanon et al. (2013) found that  $\alpha$ V $\beta$ 3 integrin, low levels of cytoplasmic p27 and their downstream effector proteins Rac and RhoA GTPases are needed by residual tumor cells from the PBZ to acquire an invasive advantage <sup>32</sup>. These molecules should be the targets of novel therapeutic strategies against GB dissemination and recurrence. In a recent study (Clavreul et al., *submitted*), we identified two subtypes of GASCs in surgical margins in GB patients: one subtype with tumor-promoting and angiogenic properties, and the other without these pro-oncogenic properties. The procarcinogenic GASC subtype overexpressed several markers such as CSPG4/NG2, nestin and CD146. These molecules have been shown to be attractive potential biomarkers of cancer prognosis as well as potentially attractive targets for cancer treatment <sup>62-68</sup>. They should serve as prognostic factors for GB and/or targets for anti-GB treatment. Macrophages detected in PBZ could represent also interesting targets. Further investigations are needed to determine their phenotype and their functions in this area.

Technological approaches should also be developed to target the cellular and molecular components of the PBZ. Nano-biotechnological approaches could be a good alternative. Chekhonin et al. (2012) produced immunoliposomal nanocontainers based on antibodies against GFAP and the EZ extracellular fragment of connexin 43 to target the delivery of diagnostic and therapeutic drugs to reactive astrocytes and migrating glioma cells present in the PBZ of GB <sup>69</sup>. Our laboratory has developed and patented a novel nanoscale system, the so-called lipid nanocapsules (LNCs) <sup>70</sup>. These LNCs, which have the advantages of being prepared without organic solvent using a low-energy process, allow the encapsulation of various compounds including drugs <sup>71,72</sup>, radionuclides <sup>73</sup>, DNA <sup>74</sup>, siRNA <sup>75</sup>, and nuclease-resistant locked nucleic acids <sup>76</sup>. These LNCs, which showed promising results in glioma models <sup>71-73,77</sup>, could be therapeutic options to target cellular and molecular components of GB PBZ through the grafting of antibodies on their surface or the use of MSCs. We demonstrated recently that these cells, which have endogenous tumor-homing activity and are preferentially found throughout the peritumoral zone, represent a good device for the targeted delivery of LNCs in the tumor <sup>11,78-81</sup>.



**Figure 2: Illustration of the main cellular components of the PBZ (tumor cells, reactive astrocytes and GASCs) and their potential molecular targets that could be targeted through nanotechnology. Nanoparticles could deliver diagnostic and/or therapeutic drugs into PBZ through their functionalization with antibodies against molecular components of the PBZ or their internalization into MSCs**

## **GB PBZ: Per-operative assessment for optimal GB resection?**

It has been clearly demonstrated that the quality of the surgical resection is of critical importance for the overall survival of the patient, its quality of life and its response to adjuvant therapies<sup>82-84</sup>. The per-operative assessment of GB PBZ to detect tumoral infiltration is potentially extremely important to optimize the surgical resection. The classical way to obtain per-operative information about the PBZ is the extemporaneous histopathological examination with a smear test, able to give a first diagnosis about the histological nature of the sampled tissue and the presence of a tumoral cell infiltration. However, this examination is not enough sensitive and the sample is not representative of the entire resection cavity raising the question of the development of new techniques to identify the presence of a tumoral infiltration in the area surrounding the tumor.

Besides the refinement of PBZ *via* pre-operative MRI sequences described before, the development of per-operative MRI in glioma surgery is also an interesting possibility to optimize the quality of the surgical resection. The per-operative MRI showed promising results with a gross total resection rate of 96 % in high-grade glioma, which is impressive regarding the classical resection rates of 27-35 % reported in the literature<sup>82,84,85</sup>. However, the impact of per-operative MRI on patient survival is less important, with an increase in progression-free survival of 226 days vs. 154 days in the control group<sup>85</sup>. Debates are ongoing to determine if per-operative MRI is the future of Neurosurgery or a "technical overkill", since similar results are achieved in survival improvement using alternative technique like the fluorescence guided surgery with 5-aminolevulinic acid for a far lower cost<sup>86,87</sup>. However, fluorescence guided surgery is not sufficient to grasp the tumor in its whole, since isolated tumor cells have been identified beyond the fluorescent tumor in the PBZ<sup>31</sup>. The development of spectroscopic devices to improve detection and quantification of fluorescence signals more precisely than the surgeon's eye are needed<sup>34,88</sup>.



There are currently new modalities in PBZ analysis called optical biopsies, which are at different stages of development (Figure 3, Table 1). Among them, we can distinguish *in vivo* or *ex vivo* optical biopsies.

*Ex vivo* optical biopsies need the sampling of brain tissue during the surgery to be able to perform an analysis because of technical limitations. However, in next years, thanks to technological advances, these *ex vivo* optical biopsies may hopefully translate into *in vivo* optical biopsies. Among these techniques, optic coherence tomography imaging uses interference to precisely locate light deep inside tissue. It allows non-contact assessment of the brain surface up to 200  $\mu\text{m}$  deep with a spatial resolution of 1  $\mu\text{m}$ , allowing discrimination between normal brain, tumor tissue, necrosis and peripheral infiltrated brain<sup>89,90</sup>. In the same way, biphotonic microscopy is currently under evaluation for the PBZ analysis. This technique allows a fast and label-free analysis of brain samples with the identification of non-centrosymmetrical structure of the brain like the collagen that gives an overview of the extracellular matrix architecture, with a resolution below 1  $\mu\text{m}$  and a depth penetration of 400  $\mu\text{m}$ <sup>91</sup> (Lemée, Poster EANO, *Neuro-Oncol*).

*In vivo* optical biopsies allow the assessment of the presence of tumoral infiltration in the PBZ during the surgery, giving to the neurosurgeon the opportunity to optimize the quality of the surgical resection. Among the *in vivo* optical biopsies, we notice the near infrared confocal endomicroscopy which is able to identify isolated tumor cell infiltrated in the PBZ during the surgery with a precision below 1  $\mu\text{m}$  and a depth of analysis up to 250  $\mu\text{m}$ <sup>92,93</sup>. However, this technique is not label-free and requires an intravenous injection of dyes such as indocyanine green during the surgery to perform the analysis. Raman spectroscopy is another *in vivo* optical biopsy based on the modification of a laser wavelength reflected upon the brain parenchyma with an axial and depth resolution of 1  $\mu\text{m}$ . Preliminary studies showed potential application of this technique in the identification of the histological nature of brain samples, or even identification of tumor remnant in the surgical resection cavity<sup>94-96</sup>. Karabeber et al. (2014) used gold-silica surface-enhanced Raman scattering (SERS) nanoparticles in conjunction with a hand-held Raman scanner to provide image-guided surgical resection of GBMs in a transgenic murine model<sup>97</sup>.

In our opinion, the per-operative MRI is for now the most reliable, easy to use technique to assess the presence of a remaining tumor infiltration in the PBZ and thus optimize the quality of the surgical resection, despite its known limits and the knowledge we have of the fact that tumoral infiltration reach well beyond the radiological delimitation of the tumor<sup>85,98</sup>.

**Table 1: Description of the different technique available for per-operative ZMN analysis**

Technique	Type of technique	spatial resolution	depth of penetration	Acquisition surface	time for image acquisition & processing
<b>Optic coherence tomography</b>	<i>ex vivo</i>	1 $\mu\text{m}$	200 $\mu\text{m}$	whole brain sample	< 5 min
<b>Biphotonic microscopy</b>	<i>ex vivo</i>	0.7 $\mu\text{m}$	400 $\mu\text{m}$	whole brain sample	5 – 45 min
<b>Confocal endomicroscopy</b>	<i>in vivo</i>	1 $\mu\text{m}$	250 $\mu\text{m}$	probe surface	Real time
<b>Raman spectrometry</b>	<i>in vivo</i>	1 $\mu\text{m}$	1 $\mu\text{m}$	probe surface	Real time
<b>Per-operative MRI</b>	<i>in vivo</i>	< 1 mm	whole brain	whole brain	15-20 min

## Conclusion

This review highlights that we have much to learn from the PBZ about GB recurrence. PBZ has shown to possess specific tumor and stromal cells enhancing GB growth and invasion. Given the heterogeneity of GB, larger scale studies are warranted to further characterize these cells and the molecular components of GB PBZ to identify new targets that could be translated into routine clinical application. Technical progress must also be done to push further the analysis of the brain / tumor delimitation and optimize the quality of surgical resection. All these developments on the GB and its peritumoral characteristics will allow to advance further in personalized targeted therapy and adjuvant treatment of GB after surgery.

## Conflicts of interest, funding

The authors do not disclose any conflict of interest.

The first author of this article received grants from the *Société française de Neurochirurgie* and the *Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale*.

# Bibliography

1. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352(10):987-996. doi:10.1056/NEJMoa043330.
2. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol*. 2009;10(5):459-466. doi:10.1016/S1470-2045(09)70025-7.
3. Chinot OL, Wick W, Mason W, et al. Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med*. 2014;370(8):709-722. doi:10.1056/NEJMoa1308345.
4. Gilbert MR, Sulman EP, Mehta MP. Bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med*. 2014;370(21):2048-2049. doi:10.1056/NEJMc1403303.
5. Bastien JIL, McNeill KA, Fine HA. Molecular characterizations of glioblastoma, targeted therapy, and clinical results to date. *Cancer*. 2014. doi:10.1002/cncr.28968.
6. Wick W, Puduvalli VK, Chamberlain MC, et al. Phase III study of enzastaurin compared with lomustine in the treatment of recurrent intracranial glioblastoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2010;28(7):1168-1174. doi:10.1200/JCO.2009.23.2595.
7. Batchelor TT, Duda DG, di Tomaso E, et al. Phase II study of cediranib, an oral pan-vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2010;28(17):2817-2823. doi:10.1200/JCO.2009.26.3988.
8. Stupp R, Hegi ME, Neyns B, et al. Phase I/IIa study of cilengitide and temozolomide with concomitant radiotherapy followed by cilengitide and temozolomide maintenance therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2010;28(16):2712-2718. doi:10.1200/JCO.2009.26.6650.
9. Petrecca K, Guiot M-C, Panet-Raymond V, Souhami L. Failure pattern following complete resection plus radiotherapy and temozolomide is at the resection margin in patients with glioblastoma. *J Neurooncol*. 2013;111(1):19-23. doi:10.1007/s11060-012-0983-4.
10. Clavreul A, Etcheverry A, Chassevent A, et al. Isolation of a new cell population in the glioblastoma microenvironment. *J Neurooncol*. 2012;106(3):493-504. doi:10.1007/s11060-011-0701-7.
11. Clavreul A, Guelle C, Faguer R, et al. Glioblastoma-associated stromal cells (GASCs) from histologically normal surgical margins have a myofibroblast phenotype and angiogenic properties. *J Pathol*. 2014. doi:10.1002/path.4332.
12. Com E, Clavreul A, Lagarrigue M, Michalak S, Menei P, Pineau C. Quantitative proteomic Isotope-Coded Protein Label (ICPL) analysis reveals alteration of several functional processes in the glioblastoma. *J Proteomics*. 2012;75(13):3898-3913. doi:10.1016/j.jprot.2012.04.034.
13. Lemée J-M, Com E, Clavreul A, et al. Proteomic analysis of glioblastomas: what is the best brain control sample? *J Proteomics*. 2013;85:165-173. doi:10.1016/j.jprot.2013.04.031.
14. De Tayrac M, Etcheverry A, Aubry M, et al. Integrative genome-wide analysis reveals a robust genomic glioblastoma signature associated with copy number driving changes in gene expression. *Genes Chromosomes Cancer*. 2009;48(1):55-68. doi:10.1002/gcc.20618.
15. De Tayrac M, Aubry M, Saikali S, et al. A 4-gene signature associated with clinical outcome in high-grade gliomas. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2011;17(2):317-327. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-1126.
16. De Tayrac M, Saikali S, Aubry M, et al. Prognostic significance of EDN/RB, HJURP, p60/CAF-1 and PDLI4, four new markers in high-grade gliomas. *PLoS One*. 2013;8(9):e73332. doi:10.1371/journal.pone.0073332.
17. Etcheverry A, Aubry M, de Tayrac M, et al. DNA methylation in glioblastoma: impact on gene expression and clinical outcome. *BMC Genomics*. 2010;11:701. doi:10.1186/1471-2164-11-701.
18. Jbabdi S, Mandonnet E, Duffau H, et al. Simulation of anisotropic growth of low-grade gliomas using diffusion tensor imaging. *Magn Reson Med Off J Soc Magn Reson Med Soc Magn Reson Med*. 2005;54(3):616-624. doi:10.1002/mrm.20625.
19. Nakai K, Nawashiro H, Shima K, Kaji T. An analysis of T2 mapping on brain tumors. *Acta Neurochir Suppl*. 2013;118:195-199. doi:10.1007/978-3-7091-1434-6\_36.
20. Wijnen JP, Idema AJS, Stawicki M, et al. Quantitative short echo time 1H MRSI of the peripheral edematous region of human brain tumors in the differentiation between glioblastoma, metastasis, and meningioma. *J Magn Reson Imaging JMRI*. 2012;36(5):1072-1082. doi:10.1002/jmri.23737.
21. Abstracts for the Eighth Congress of the European Association for Neuro-Oncology (EANO). *Neuro-Oncol*. 2008;10(6):1061-1149. doi:10.1215/15228517-2008-045.

22. Pauleit D, Langen K-J, Floeth F, et al. Can the apparent diffusion coefficient be used as a noninvasive parameter to distinguish tumor tissue from peritumoral tissue in cerebral gliomas? *J Magn Reson Imaging JMRI*. 2004;20(5):758-764. doi:10.1002/jmri.20177.
23. Min Z, Niu C, Rana N, Ji H, Zhang M. Differentiation of pure vasogenic edema and tumor-infiltrated edema in patients with peritumoral edema by analyzing the relationship of axial and radial diffusivities on 3.0T MRI. *Clin Neurol Neurosurg*. 2013;115(8):1366-1370. doi:10.1016/j.clineuro.2012.12.031.
24. Zhang N, Zhang L, Qiu B, Meng L, Wang X, Hou BL. Correlation of volume transfer coefficient K<sub>trans</sub> with histopathologic grades of gliomas. *J Magn Reson Imaging JMRI*. 2012;36(2):355-363. doi:10.1002/jmri.23675.
25. Sundgren PC, Fan X, Weybright P, et al. Differentiation of recurrent brain tumor versus radiation injury using diffusion tensor imaging in patients with new contrast-enhancing lesions. *Magn Reson Imaging*. 2006;24(9):1131-1142. doi:10.1016/j.mri.2006.07.008.
26. Deng Z, Yan Y, Zhong D, et al. Quantitative analysis of glioma cell invasion by diffusion tensor imaging. *J Clin Neurosci Off J Neurosurg Soc Australas*. 2010;17(12):1530-1536. doi:10.1016/j.jocn.2010.03.060.
27. Lu S, Ahn D, Johnson G, Law M, Zagzag D, Grossman RI. Diffusion-tensor MR imaging of intracranial neoplasia and associated peritumoral edema: introduction of the tumor infiltration index. *Radiology*. 2004;232(1):221-228. doi:10.1148/radiol.2321030653.
28. Kinoshita M, Goto T, Okita Y, et al. Diffusion tensor-based tumor infiltration index cannot discriminate vasogenic edema from tumor-infiltrated edema. *J Neurooncol*. 2010;96(3):409-415. doi:10.1007/s11060-009-9979-0.
29. SCHERER HJ. THE FORMS OF GROWTH IN GLIOMAS AND THEIR PRACTICAL SIGNIFICANCE. *Brain*. 1940;63(1):1-35. doi:10.1093/brain/63.1.1.
30. Glas M, Rath BH, Simon M, et al. Residual tumor cells are unique cellular targets in glioblastoma. *Ann Neurol*. 2010;68(2):264-269. doi:10.1002/ana.22036.
31. Piccirillo SGM, Dietz S, Madhu B, et al. Fluorescence-guided surgical sampling of glioblastoma identifies phenotypically distinct tumour-initiating cell populations in the tumour mass and margin. *Br J Cancer*. 2012;107(3):462-468. doi:10.1038/bjc.2012.271.
32. Ruiz-Ontañón P, Orgaz JL, Aldaz B, et al. Cellular plasticity confers migratory and invasive advantages to a population of glioblastoma-initiating cells that infiltrate peritumoral tissue. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2013;31(6):1075-1085. doi:10.1002/stem.1349.
33. Toussaint LG, Nilson AE, Goble JM, et al. Galectin-1, a gene preferentially expressed at the tumor margin, promotes glioblastoma cell invasion. *Mol Cancer*. 2012;11:32. doi:10.1186/1476-4598-11-32.
34. Rampazzo E, Della Puppa A, Frasson C, et al. Phenotypic and functional characterization of Glioblastoma cancer stem cells identified through 5-aminolevulinic acid-assisted surgery. *J Neurooncol*. 2014;116(3):505-513. doi:10.1007/s11060-013-1348-3.
35. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2010;119(1):7-35. doi:10.1007/s00401-009-0619-8.
36. Lin Q, Balasubramanian K, Fan D, et al. Reactive astrocytes protect melanoma cells from chemotherapy by sequestering intracellular calcium through gap junction communication channels. *Neoplasia N Y N*. 2010;12(9):748-754.
37. Fitzgerald DP, Palmieri D, Hua E, et al. Reactive glia are recruited by highly proliferative brain metastases of breast cancer and promote tumor cell colonization. *Clin Exp Metastasis*. 2008;25(7):799-810. doi:10.1007/s10585-008-9193-z.
38. Seike T, Fujita K, Yamakawa Y, et al. Interaction between lung cancer cells and astrocytes via specific inflammatory cytokines in the microenvironment of brain metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 2011;28(1):13-25. doi:10.1007/s10585-010-9354-8.
39. Le DM, Besson A, Fogg DK, et al. Exploitation of astrocytes by glioma cells to facilitate invasiveness: a mechanism involving matrix metalloproteinase-2 and the urokinase-type plasminogen activator-plasmin cascade. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2003;23(10):4034-4043.
40. Rath BH, Fair JM, Jamal M, Camphausen K, Tofilon PJ. Astrocytes enhance the invasion potential of glioblastoma stem-like cells. *PLoS One*. 2013;8(1):e54752. doi:10.1371/journal.pone.0054752.
41. Kim J-K, Jin X, Sohn Y-W, et al. Tumoral RANKL activates astrocytes that promote glioma cell invasion through cytokine signaling. *Cancer Lett*. 2014. doi:10.1016/j.canlet.2014.07.034.
42. Hoelzinger DB, Demuth T, Berens ME. Autocrine factors that sustain glioma invasion and paracrine biology in the brain microenvironment. *J Natl Cancer Inst*. 2007;99(21):1583-1593. doi:10.1093/jnci/djm187.
43. Nagashima G, Suzuki R, Asai J, Fujimoto T. Immunohistochemical analysis of reactive astrocytes around glioblastoma: an immunohistochemical study of postmortem glioblastoma cases. *Clin Neurol Neurosurg*. 2002;104(2):125-131.

44. Charles NA, Holland EC, Gilbertson R, Glass R, Kettenmann H. The brain tumor microenvironment. *Glia*. 2012;60(3):502-514.
45. Glass R, Synowitz M. CNS macrophages and peripheral myeloid cells in brain tumours. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2014;128(3):347-362. doi:10.1007/s00401-014-1274-2.
46. Nishie A, Ono M, Shono T, et al. Macrophage infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with angiogenesis in human gliomas. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1999;5(5):1107-1113.
47. Komohara Y, Ohnishi K, Kuratsu J, Takeya M. Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. *J Pathol*. 2008;216(1):15-24. doi:10.1002/path.2370.
48. Engler JR, Robinson AE, Smirnov I, et al. Increased microglia/macrophage gene expression in a subset of adult and pediatric astrocytomas. *PLoS One*. 2012;7(8):e43339. doi:10.1371/journal.pone.0043339.
49. Pyonteck SM, Akkari L, Schuhmacher AJ, et al. CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nat Med*. 2013;19(10):1264-1272. doi:10.1038/nm.3337.
50. Bowman RL, Joyce JA. Therapeutic targeting of tumor-associated macrophages and microglia in glioblastoma. *Immunotherapy*. 2014;6(6):663-666. doi:10.2217/imt.14.48.
51. Parney IF, Waldron JS, Parsa AT. Flow cytometry and in vitro analysis of human glioma-associated macrophages. Laboratory investigation. *J Neurosurg*. 2009;110(3):572-582. doi:10.3171/2008.7.JNS08475.
52. Dehnhardt M, Zoriy MV, Khan Z, et al. Element distribution is altered in a zone surrounding human glioblastoma multiforme. *J Trace Elem Med Biol Organ Soc Miner Trace Elem GMS*. 2008;22(1):17-23. doi:10.1016/j.jtemb.2007.08.002.
53. Haybaeck J, Obrist P, Schindler CU, Spizzo G, Doppler W. STAT-1 expression in human glioblastoma and peritumoral tissue. *Anticancer Res*. 2007;27(6B):3829-3835.
54. Synowitz M, Glass R, Färber K, et al. A1 adenosine receptors in microglia control glioblastoma-host interaction. *Cancer Res*. 2006;66(17):8550-8557. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0365.
55. Mangiola A, Lama G, Giannitelli C, et al. Stem cell marker nestin and c-Jun NH2-terminal kinases in tumor and peritumor areas of glioblastoma multiforme: possible prognostic implications. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2007;13(23):6970-6977. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1229.
56. Sica G, Lama G, Anile C, et al. Assessment of angiogenesis by CD105 and nestin expression in peritumor tissue of glioblastoma. *Int J Oncol*. 2011;38(1):41-49.
57. Lama G, Mangiola A, Anile C, et al. Activated ERK1/2 expression in glioblastoma multiforme and in peritumor tissue. *Int J Oncol*. 2007;30(6):1333-1342.
58. Mangiola A, Saulnier N, De Bonis P, et al. Gene expression profile of glioblastoma peritumoral tissue: an ex vivo study. *PLoS One*. 2013;8(3):e57145. doi:10.1371/journal.pone.0057145.
59. Ambady P, Holdhoff M, Ferrigno C, et al. NEURO/MEDICAL ONCOLOGY. *Neuro-Oncol*. 2013;15(suppl 3):iii98-iii135. doi:10.1093/neuonc/not182.
60. Thaci B, Brown CE, Binello E, Werbaneth K, Sampath P, Sengupta S. Significance of interleukin-13 receptor alpha 2-targeted glioblastoma therapy. *Neuro-Oncol*. 2014. doi:10.1093/neuonc/nou045.
61. Addeo R, Zappavigna S, Parlato C, Caraglia M. Erlotinib: early clinical development in brain cancer. *Expert Opin Investig Drugs*. 2014;23(7):1027-1037. doi:10.1517/13543784.2014.918950.
62. Svendsen A, Verhoeff JJC, Immervoll H, et al. Expression of the progenitor marker NG2/CSPG4 predicts poor survival and resistance to ionising radiation in glioblastoma. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2011;122(4):495-510. doi:10.1007/s00401-011-0867-2.
63. Chekenya M, Enger PØ, Thorsen F, et al. The glial precursor proteoglycan, NG2, is expressed on tumour neovasculature by vascular pericytes in human malignant brain tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2002;28(5):367-380.
64. Dahlrot RH, Hermansen SK, Hansen S, Kristensen BW. What is the clinical value of cancer stem cell markers in gliomas? *Int J Clin Exp Pathol*. 2013;6(3):334-348.
65. Hatanpaa KJ, Hu T, Vemireddy V, et al. High expression of the stem cell marker nestin is an adverse prognostic factor in WHO grade II-III astrocytomas and oligoastrocytomas. *J Neurooncol*. 2014;117(1):183-189. doi:10.1007/s11060-014-1376-7.
66. Kapoor S. Nestin and its emerging role in tumor progression and carcinogenesis in systemic tumors besides pancreatic carcinomas. *Med Mol Morphol*. 2013;46(1):56-57. doi:10.1007/s00795-013-0022-3.
67. Wang P, Luo Y, Duan H, et al. MicroRNA 329 suppresses angiogenesis by targeting CD146. *Mol Cell Biol*. 2013;33(18):3689-3699. doi:10.1128/MCB.00343-13.
68. Akiyama M, Matsuda Y, Ishiwata T, Naito Z, Kawana S. Inhibition of the stem cell marker nestin reduces tumor growth and invasion of malignant melanoma. *J Invest Dermatol*. 2013;133(5):1384-1387. doi:10.1038/jid.2012.508.
69. Chekhonin VP, Baklaushev VP, Yusubaliev GM, et al. Targeted delivery of liposomal nanocontainers to the peritumoral zone of glioma by means of monoclonal antibodies against GFAP and the extracellular loop of Cx43. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med*. 2012;8(1):63-70. doi:10.1016/j.nano.2011.05.011.

70. Huynh NT, Passirani C, Saulnier P, Benoit JP. Lipid nanocapsules: a new platform for nanomedicine. *Int J Pharm.* 2009;379(2):201-209. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.04.026.
71. Allard E, Huynh NT, Vessières A, et al. Dose effect activity of ferrocifen-loaded lipid nanocapsules on a 9L-glioma model. *Int J Pharm.* 2009;379(2):317-323. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.05.031.
72. Laine A-L, Huynh NT, Clavreul A, et al. Brain tumour targeting strategies via coated ferrociphenol lipid nanocapsules. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Für Pharm Verfahrenstechnik EV.* 2012;81(3):690-693. doi:10.1016/j.ejpb.2012.04.012.
73. Vanpouille-Box C, Lacoëuille F, Belloche C, et al. Tumor eradication in rat glioma and bypass of immunosuppressive barriers using internal radiation with (188)Re-lipid nanocapsules. *Biomaterials.* 2011;32(28):6781-6790. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.05.067.
74. David S, Montier T, Carmoy N, et al. Treatment efficacy of DNA lipid nanocapsules and DNA multimodular systems after systemic administration in a human glioma model. *J Gene Med.* 2012;14(12):769-775. doi:10.1002/jgm.2683.
75. Resnier P, David S, Lautram N, et al. EGFR siRNA lipid nanocapsules efficiently transfect glioma cells in vitro. *Int J Pharm.* 2013;454(2):748-755. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.04.001.
76. Griveau A, Bejaud J, Anthiya S, Avril S, Autret D, Garcion E. Silencing of miR-21 by locked nucleic acid-lipid nanocapsule complexes sensitize human glioblastoma cells to radiation-induced cell death. *Int J Pharm.* 2013;454(2):765-774. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.05.049.
77. Vinchon-Petit S, Jarnet D, Michalak S, Lewis A, Benoit J-P, Menei P. Local implantation of doxorubicin drug eluting beads in rat glioma. *Int J Pharm.* 2010;402(1-2):184-189. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.09.013.
78. Roger M, Clavreul A, Venier-Julienne M-C, et al. Mesenchymal stem cells as cellular vehicles for delivery of nanoparticles to brain tumors. *Biomaterials.* 2010;31(32):8393-8401. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.07.048.
79. Roger M, Clavreul A, Venier-Julienne M-C, Passirani C, Montero-Menei C, Menei P. The potential of combinations of drug-loaded nanoparticle systems and adult stem cells for glioma therapy. *Biomaterials.* 2011;32(8):2106-2116. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.11.056.
80. Roger M, Clavreul A, Sindji L, et al. In vitro and in vivo interactions between glioma and marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells. *Brain Res.* 2012;1473:193-203. doi:10.1016/j.brainres.2012.07.030.
81. Roger M, Clavreul A, Huynh NT, et al. Ferrociphenol lipid nanocapsule delivery by mesenchymal stromal cells in brain tumor therapy. *Int J Pharm.* 2012;423(1):63-68. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.04.058.
82. Orringer D, Lau D, Khatri S, et al. Extent of resection in patients with glioblastoma: limiting factors, perception of resectability, and effect on survival. *J Neurosurg.* 2012;117(5):851-859. doi:10.3171/2012.8.JNS12234.
83. Chaichana KL, Jusue-Torres I, Navarro-Ramirez R, et al. Establishing percent resection and residual volume thresholds affecting survival and recurrence for patients with newly diagnosed intracranial glioblastoma. *Neuro-Oncol.* 2013. doi:10.1093/neuonc/not137.
84. McGirt MJ, Chaichana KL, Gathinji M, et al. Independent association of extent of resection with survival in patients with malignant brain astrocytoma. *J Neurosurg.* 2009;110(1):156-162. doi:10.3171/2008.4.17536.
85. Senft C, Bink A, Franz K, Vatter H, Gasser T, Seifert V. Intraoperative MRI guidance and extent of resection in glioma surgery: a randomised, controlled trial. *Lancet Oncol.* 2011;12(11):997-1003. doi:10.1016/S1470-2045(11)70196-6.
86. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, et al. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol.* 2006;7(5):392-401. doi:10.1016/S1470-2045(06)70665-9.
87. Barone DG, Lawrie TA, Hart MG. Image guided surgery for the resection of brain tumours. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014;1:CD009685. doi:10.1002/14651858.CD009685.pub2.
88. Valdés PA, Kim A, Brantsch M, et al.  $\delta$ -aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX concentration correlates with histopathologic markers of malignancy in human gliomas: the need for quantitative fluorescence-guided resection to identify regions of increasing malignancy. *Neuro-Oncol.* 2011;13(8):846-856. doi:10.1093/neuonc/nor086.
89. Assayag O, Grieve K, Devaux B, et al. Imaging of non-tumorous and tumorous human brain tissues with full-field optical coherence tomography. *NeuroImage Clin.* 2013;2:549-557. doi:10.1016/j.nicl.2013.04.005.
90. Chen Y, Aguirre AD, Ruvinskaya L, Devor A, Boas DA, Fujimoto JG. Optical coherence tomography (OCT) reveals depth-resolved dynamics during functional brain activation. *J Neurosci Methods.* 2009;178(1):162-173. doi:10.1016/j.jneumeth.2008.11.026.
91. Debarbieux F. [Towards a dynamic anatomopathology of glioblastoma in mice thanks to in vivo biphotonic microscopy]. *Ann Pathol.* 2010;30(5 Suppl 1):53-55. doi:10.1016/j.annpat.2010.08.002.

92. Martirosyan NL, Cavalcanti DD, Eschbacher JM, et al. Use of in vivo near-infrared laser confocal endomicroscopy with indocyanine green to detect the boundary of infiltrative tumor. *J Neurosurg.* 2011;115(6):1131-1138. doi:10.3171/2011.8.JNS11559.
93. Böhringer HJ, Lankenau E, Stellmacher F, Reusche E, Hüttmann G, Giese A. Imaging of human brain tumor tissue by near-infrared laser coherence tomography. *Acta Neurochir (Wien).* 2009;151(5):507-517; discussion 517. doi:10.1007/s00701-009-0248-y.
94. Kalkanis SN, Kast RE, Rosenblum ML, et al. Raman spectroscopy to distinguish grey matter, necrosis, and glioblastoma multiforme in frozen tissue sections. *J Neurooncol.* 2014;116(3):477-485. doi:10.1007/s11060-013-1326-9.
95. Rutka JT, Kim B, Etame A, Diaz RJ. Nanosurgical Resection of Malignant Brain Tumors: Beyond the Cutting Edge. *ACS Nano.* 2014. doi:10.1021/nn504854a.
96. Tanahashi K, Natsume A, Ohka F, et al. Assessment of tumor cells in a mouse model of diffuse infiltrative glioma by Raman spectroscopy. *BioMed Res Int.* 2014;2014:860241. doi:10.1155/2014/860241.
97. Karabeber H, Huang R, Iacono P, et al. Guiding Brain Tumor Resection Using Surface-Enhanced Raman Scattering Nanoparticles and a Hand-Held Raman Scanner. *ACS Nano.* 2014. doi:10.1021/nn503948b.
98. Schneider JP, Trantakis C, Rubach M, et al. Intraoperative MRI to guide the resection of primary supratentorial glioblastoma multiforme--a quantitative radiological analysis. *Neuroradiology.* 2005;47(7):489-500. doi:10.1007/s00234-005-1397-1.



# Discussion générale, Perspectives, Conclusion

L'objectif initial de ce travail de Thèse était de réaliser, à partir de l'ensemble des données d'imagerie, d'anatomopathologie et des analyses omiques obtenues suite au PGGO sur les 4 zones du GB (ZN, ZT, ZI et ZMN) une synthèse commune des données afin d'identifier des marqueurs qui pourraient être pertinents pour le diagnostic et/ou le pronostic des GB. Mais, à cause de l'hétérogénéité intratumorale et inter-individuelle des GB, on se rend compte que l'identification de tels marqueurs est difficile. En effet, nous avons observé une faible corrélation entre les données transcriptomiques et protéomiques alors qu'elles ont été obtenues à partir d'échantillons localisés dans les mêmes zones de la tumeur. Parmi les quelques points communs observés entre les données précédentes, nous avons constaté une surexpression du peptide léger du NEFL dans la ZT vs ZMN. La surexpression de cette protéine est inhabituelle dans les tumeurs astrocytaires telles que les GB, car elle n'est pas produite en temps normal par les cellules gliales. L'expression de cette protéine par les GB pourrait notamment être un signe d'invasivité et constitue donc une piste intéressante à suivre d'autant plus que le profil d'expression de la protéine NEFL n'a jamais été étudié de manière précise dans une population de GB humains. La poursuite de ce travail se fera en collaboration avec le Dr Joël Eyer, chercheur à l'Université d'Angers.

Le second objectif de ce travail de Thèse était de mieux caractériser la ZMN du GB. La ZMN est une zone particulière qui se situe en périphérie du GB et à distance de la prise de contraste annulaire. Cette zone est le siège de plus de 90% des récurrences tumorales de GB. Elles surviennent le plus souvent au niveau des marges de la cavité chirurgicale, même après une résection radiologiquement complète (88,89). Alors que de nombreuses études se sont focalisées sur l'analyse de la ZT floride du GB, permettant ainsi l'identification de marqueurs moléculaires et le développement de thérapies ciblées, peu d'études se sont intéressées à la ZMN. La compréhension de la ZMN est pourtant d'autant plus importante qu'elle persiste après l'exérèse chirurgicale du GB avec l'infiltrat tumoral qui s'y trouve. C'est donc la ZMN qui est la cible des thérapies adjuvantes telles que la radiothérapie et la chimiothérapie, et non la tumeur floride du GB qui est réséquée lors de la chirurgie.

Nous avons ainsi dans ce travail de thèse caractérisé la ZMN des GB sous différentes modalités : radiologie, histologie, cytométrie de flux, analyses omiques et cultures cellulaires. L'utilisation de ce panel de techniques a permis une analyse transversale des différentes caractéristiques de la ZMN des GB qui n'avait jamais été réalisée auparavant. De plus, cette analyse a permis non seulement de définir les caractéristiques de la ZMN des GB, mais aussi d'identifier des protéines d'intérêt susceptibles de pouvoir être utilisées comme marqueur diagnostique, pronostique et/ou cible thérapeutique. Nous avons aussi débuté le développement de nouvelles modalités d'analyses per-opératoires de cette ZMN afin de mieux détecter l'infiltration tumorale et ainsi optimiser la qualité de la résection chirurgicale.

## 1. Caractéristiques de la ZMN des GB

Les premiers résultats obtenus dans la caractérisation multimodale de la ZMN des GB sont en accord avec ceux de la littérature (86), retrouvant que **la ZMN ressemble macroscopiquement et radiologiquement à du tissu cérébral sain**. En effet, les biopsies de ZMN utilisées dans notre étude ont été réalisées à une distance minimale de 1 cm de la prise de contraste visible sur l'IRM pré-opératoire en zone radiologiquement normale, avec un aspect macroscopiquement sain évalué par le chirurgien en per-opératoire.

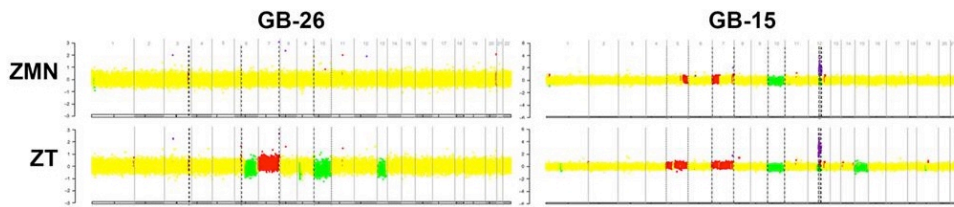
L'absence de caractéristiques radiologiques propres à la ZMN dans les séquences d'IRM étudiées a été confirmée lors de notre analyse multimodale. La ZMN présentait un profil radiologique similaire au tissu cérébral sain, avec un aspect normal sur les séquences IRM classiques et en étude dynamique de la prise de contraste. Ainsi, nous constatons que ces modalités d'analyses par IRM ne sont pas suffisantes pour délimiter cette ZMN ou évaluer la présence d'un infiltrat de cellules tumorales. En effet, 4 des 10 ZMN radiologiquement normales analysées dans notre étude présentaient un infiltrat tumoral significatif lors de l'analyse anatomopathologique.

Ceci montre que les outils d'investigation disponibles à l'heure actuelle en per-opératoire ne permettent pas d'identifier de manière claire cette ZMN ni d'évaluer la présence d'un infiltrat de cellules tumorales limitant ainsi la qualité de la résection chirurgicale et impactant le pronostic des patients. Ceci a été confirmé par une étude récente qui a mis en évidence qu'une concentration de cellules tumorale minimale de 500 cellules / mm<sup>3</sup> était nécessaire pour produire des modifications détectables du signal IRM (104).

Toutefois, ce caractère « radiologiquement normal » de la ZMN tend à être remis en cause avec les progrès de la radiologie et le raffinement des séquences d'IRM. Des travaux récents se sont focalisés sur l'analyse de la ZMN en IRM par séquences en tenseur de diffusion, établissant une corrélation inverse entre la fraction d'anisotropie et l'infiltration tumorale périphérique (105,106). Certains auteurs proposent même un abaque permettant de d'évaluer le degré d'infiltration tumorale en fonction de la fraction d'anisotropie calculée sous réserve que cet index ne permette pas d'évaluer de manière fiable l'infiltration tumorale au sein de l'œdème vasogénique péri-tumoral (107,108). Parallèlement aux progrès de la radiologie, des analyses per-opératoires sont développées pour mieux détecter l'infiltration tumorale et optimiser la résection chirurgicale. Ces analyses seront évoquées dans la troisième partie de cette discussion.

Malgré l'aspect macroscopique et radiologique normal de la ZMN, nous avons démontré dans ce travail de Thèse que **la ZMN possède quelques-unes des caractéristiques de la ZT du GB adjacent, mais aussi des caractéristiques qui lui sont propres.**

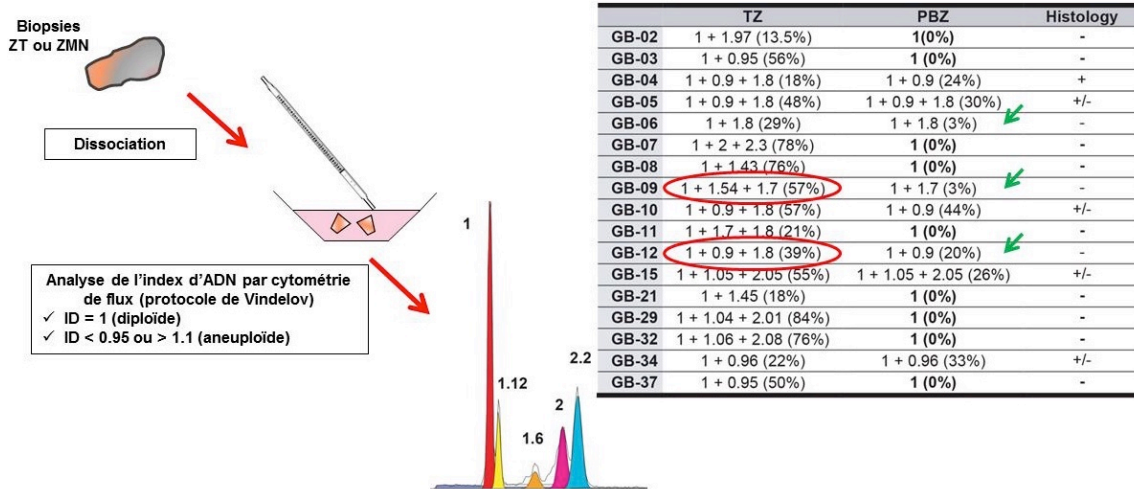
En génomique, de façon intéressante, toutes les altérations présentes dans la ZT n'ont pas été retrouvées dans la ZMN correspondante. La polysomie du chromosome 7, l'amplification de l'EGFR et la délétion du chromosome 10 sont retrouvées dans la ZMN. Par contre, la délétion du locus CDKN2A/2B est très faiblement retrouvée dans la ZMN. Mangiola et al. (109) ont également décrit une amplification de l'EGFR dans la ZMN. Ces données suggèrent que **les altérations ciblant les chromosomes 7 et 10 sont des évènements précoces dans l'évolution tumorale du GB** et que **tous les contingents tumoraux ne migrent pas en périphérie** (Figure 20). Ces résultats sont confirmés par les résultats de l'analyse de l'index d'ADN par cytométrie de flux réalisée dans notre étude, où tous les contingents aneuploïdes identifiés dans la ZT n'ont pas été retrouvés dans la ZMN adjacente (Figure 21).



Genomic alteration	Gene	GB-03	GB-09	GB-10	GB-15	GB-16	GB-17	GB-25	GB-26	GB-35	GB-36
Chr 7 amp		-	-	PBZ & TZ	PBZ & TZ	-	-	-	-	PBZ & TZ	PBZ & TZ
Chr 10 del		-	-	PBZ & TZ	PBZ & TZ	-	-	-	-	PBZ & TZ	PBZ & TZ
4q12	PDGFRA	-	-	-	-	PBZ	-	TZ	-	-	-
7q11	EGFR	-	-	-	-	-	PBZ & TZ	-	-	PBZ & TZ	PBZ & TZ
5p15.3	TERT	-	-	-	-	-	-	-	-	PBZ & TZ	-
9q11-9q21	CDKN2A/2B	TZ	TZ	-	-	-	TZ	TZ	TZ	TZ	PBZ & TZ
12q15	MDM2	-	-	-	-	PBZ & TZ	-	-	-	-	-

**Figure 20 : Résumé de l'analyse génomique de la ZMN des GB.**

La ZMN issue de GB-26 présente un profil génomique normal contrairement à la ZMN issue de GB-15. Toutes les altérations présentes dans la ZT des GB ne sont pas retrouvées systématiquement dans la ZMN correspondante. L'amplification EGFR est fréquemment retrouvée alors que la délétion du locus CDKN2A/2B est rarement observée.



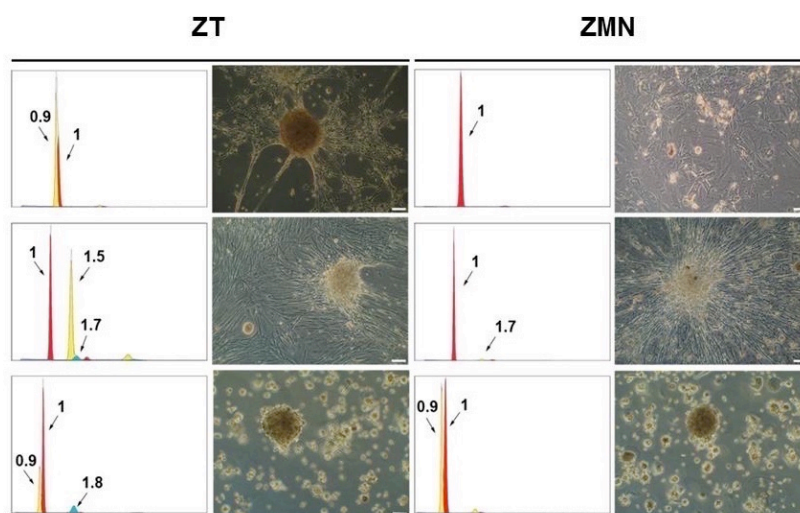
**Figure 21 : Résumé des données de l'analyse de la ZMN en cytométrie de flux**

Seuls certains contingents tumoraux (aneuploïdes) isolés dans la ZT, mais pas tous, sont identifiés dans la ZMN adjacentes (flèches vertes)

En accord avec nos résultats, les données de la littérature mettent en évidence que **les cellules de GB isolées dans la ZMN possèdent un phénotype particulier** qui est distinct des cellules tumorales isolées au sein de la ZT floride (110–113). Ces cellules constituent une population de cellules au fort potentiel invasif et proliférant par rapport aux cellules de GB de la ZT floride, tout en possédant de faibles capacités d'auto-renouvellement (110–112,114). De plus, elles répondent différemment à la chimiothérapie et à la radiothérapie *in vitro* (110). Un certain nombre de gènes, qui permettent de distinguer les cellules de GB présentes dans la cavité de résection chirurgicale des cellules de GB de la ZT floride ont été identifiés (110,112,113). Ces gènes sont impliqués dans le phénotype des cellules souches (CD133, Sox2, nestine, musashi 1), l'invasion (Galectin-1, Rac1, Rac3, RhoA GTPases, p27, intégrine  $\alpha v \beta 3$ ), l'adhésion cellulaire (CDH20, PCDH19), la migration (SNAI2, NANOG, USP6, DISC1), les réponses inflammatoires et immunitaires (TLR4) et la néoangiogenèse (HEG1, VEGFR2). L'étude des caractéristiques des cellules de GB isolées dans la ZMN est susceptible d'ouvrir de

nouvelles pistes de recherche et d'approfondir notre compréhension des mécanismes moléculaires promouvant l'infiltration et la récurrence des GB.

En plus de la présence dans la ZMN de cellules tumorales distinctes de celles trouvées dans la ZT, des travaux de recherche réalisés dans notre laboratoire par le Dr Clavreul ont permis d'isoler **au sein de la ZMN une population de cellules stromales particulières appelées GASC** à partir de primocultures de la ZMN (Figure 22). Ces cellules présentent le même phénotype et les mêmes propriétés que les CAF décrits dans le stroma des carcinomes. En particulier, les GASC favorisent la prolifération tumorale *in vitro* et *in vivo*, ainsi que la formation de nouveaux vaisseaux. Les GASC pourraient donc être impliqués dans les mécanismes de récurrences locales des GB (66,67). Suite à une étude transcriptomique et épigénétique des GASC, il a été mis en évidence que deux types de microenvironnements extratumoraux peuvent être rencontrés chez les patients porteurs d'un GB : un microenvironnement extratumoral contenant des GASC avec des propriétés procarcinogéniques et un autre contenant des GASC sans ces propriétés (84). En accord avec ces résultats, Roman-Pérez et al., (2012) ont rapporté la présence de deux microenvironnements extratumoraux dans le cancer du sein influençant son agressivité et son évolution (115). Ces données indiquent que le microenvironnement de la tumeur restant en place après la résection peut jouer un rôle déterminant dans la récurrence locale.



**Figure 22 : Exemples de primocultures de ZT et de leur ZMN correspondante.**

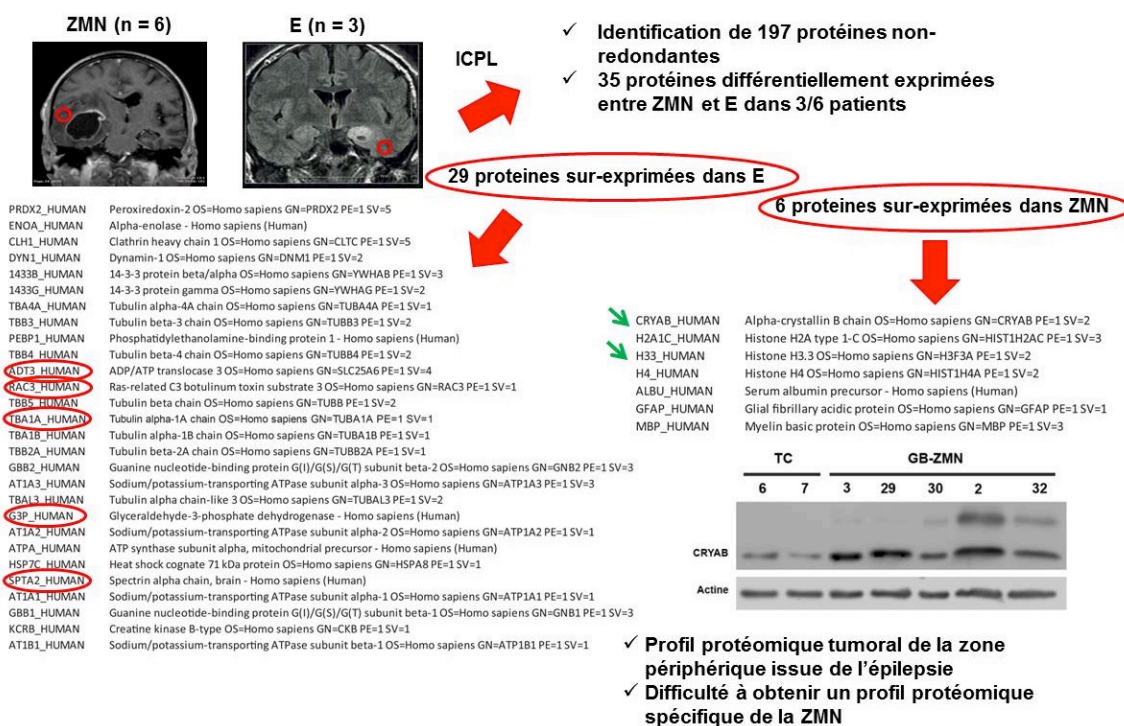
Dans 68% des cas, des GASC diploïdes adhérents, peu réfringents et ne formant pas de structures en multi-couche étaient obtenues suite à la primoculture de la ZMN (en haut à droite). Dans 32% des cas, des cellules tumorales similaires à celles présentes dans la ZT étaient obtenues (au milieu et en bas à droite). Il est à noter que pour ces ZMN, des cellules tumorales avaient été identifiées *via* l'analyse histologique ou l'analyse de l'index d'ADN par cytométrie de flux.

Issu de Lemée et al., *Journal of Neuro-Oncol*, 2015

Les analyses protéomiques et transcriptomiques effectuées sur la ZMN ont montré que les ARN et les protéines contenus dans la ZMN sont distincts de ceux présents dans le cerveau contrôle et la ZT. Toutefois, en raison de l'hétérogénéité inter-patient de la ZMN, nous n'avons pas identifié de marqueurs spécifiques de cette zone qui pourraient être impliqués dans les mécanismes de progression ou de récurrence. Une grande cohorte d'échantillons de ZMN serait nécessaire pour identifier ces marqueurs. Mais la constitution d'une telle cohorte fait face à la question éthique de l'échantillonnage d'un tissu cérébral "normal" autour de la tumeur. De plus, l'identification de tels marqueurs est aussi rendue difficile par la problématique du choix du tissu contrôle à utiliser. L'obtention de tissu cérébral sain est difficile d'un point de vue éthique et technique, ce qui nous amène



à utiliser, ce qui nous amène à utiliser d'autres sources de tissu cérébral contrôle telles que, comme le tissu cérébral issu de la chirurgie de l'épilepsie. Toutefois, nous avons mis en évidence dans ce travail de Thèse que **le tissu cérébral issu de la chirurgie de l'épilepsie possède un profil d'expression pseudo-tumoral par rapport au cerveau sain conduisant à la vigilance quant à l'utilisation de ce type d'échantillon en tant que tissu contrôle pour les analyses omiques** (Figure 23) (116). Une autre alternative est l'utilisation de tissu cérébral post-mortem. Mais, il a également été mis en évidence que le profil transcriptomique et protéique de ces échantillons se dégrade rapidement après le décès (117,118). De plus, l'emploi de ce type de tissu cérébral en tant que tissu contrôle nécessite des techniques de prélèvement particulières et un conditionnement rapide des échantillons, difficiles à implémenter. Ces constatations montrent qu'il est difficile de trouver des échantillons de tissu contrôle possédant les mêmes propriétés transcriptomiques et protéomiques que le tissu cérébral sain *in vivo*, et que l'interprétation des données de biologie moléculaire doit être pondérée en fonction du tissu contrôle choisi pour les analyses.



**Figure 23 : Bilan de l'analyse protéomique de la ZMN des GB**

Tiré de Lemée et al., *J Proteomics*, 2013 (116)

En conclusion, le GB est une tumeur hétérogène, agressive devant laquelle les possibilités thérapeutiques disponibles restent limitées, et pour laquelle l'étude de la ZMN des GB est essentielle à la compréhension des mécanismes de progression et de récurrence de la tumeur. Nous avons mis en évidence par le biais de la description du profil multimodal de la ZMN des GB que cette zone, dont l'aspect est similaire à première vue à celui du tissu cérébral sain, n'est pas une simple zone de transition entre le GB et le tissu cérébral sain. En effet, la ZMN est une entité spécifique possédant des caractéristiques qui lui sont propres, comme la présence d'un phénotype particulier de cellules de GB et de GASC, mais aussi certaines caractéristiques de la zone tumorale florissante adjacente, car seuls certains clones tumoraux migrent de la zone tumorale florissante vers la ZMN. Cette caractérisation de la ZMN nous permet de mieux appréhender son

implication dans la tumorigenèse et la présence de caractéristiques spécifiques de cette zone ouvre la porte à la détection de biomarqueurs spécifiques, ainsi qu'au développement de thérapies ciblées.

## 2. Identification et validation de marqueurs spécifiques de la ZMN

L'étude de la ZMN nous a montré que cette zone présente une importante hétérogénéité inter-individuelle. Malgré cela, les expérimentations réalisées dans le cadre de ce travail de Thèse ont permis l'identification de biomarqueurs d'intérêt pour lesquels des compléments d'investigation sont envisagés dans les suites de ce travail de Thèse.

L'analyse du profil protéique de la ZMN a permis l'identification de 2 protéines d'intérêt : l'histone H3F3A et la CRYAB, ayant potentiellement un rôle en tant que marqueur pronostique ou comme cible thérapeutique. Après avoir identifié dans la littérature que la surexpression de la protéines CRYAB était un facteur de mauvais pronostic des cancers du colon et du poumon (81,82) et de résistance au traitement antiangiogénique dans le cancer du sein (83), nous avons focalisé nos recherches sur cette protéine dont le potentiel en tant que marqueur de la ZMN nous semble prometteur. Bien que nous n'ayons pas mis en évidence de corrélation entre la CRYAB et la réponse au traitement par bévacizumab, il est important de poursuivre cette étude sur une plus grande cohorte de patient afin d'augmenter la puissance statistique. Nous poursuivrons ainsi, sur une plus grande cohorte de patients traités par bévacizumab/irinotécan, l'analyse de l'expression de la CRYAB dans la tumeur et son microenvironnement ainsi que dans le sang de patients porteurs d'un GB pour définir si cette protéine pourrait être un facteur de mauvais pronostic ou de récurrence précoce.

Nous analyserons aussi sur ces mêmes échantillons l'expression de CSPG4/NG2, de la nestine et de CD146. Nous avons observé que ces marqueurs étaient surexprimés sur la sous-population de GASC de la ZMN qui possède des propriétés procarcinogéniques. De façon intéressante, des données de la littérature indiquent que ces protéines sont des marqueurs pronostiques ou des cibles thérapeutiques potentielles de cancers (119–125). Il est donc pertinent de vérifier si l'expression de ces protéines dans le sang ou dans la tumeur peut-être corrélée à une agressivité du GB ou à sa récurrence précoce. Ces biomarqueurs pourront être utilisés par la suite pour cibler la ZMN (Figure 24).

Parallèlement au développement de nouvelles cibles thérapeutiques, il semble essentiel de développer de nouvelles techniques de ciblage des GB et de leur ZMN. Notre laboratoire possède une expertise reconnue dans la vectorisation. Un concept innovant de vectorisation par nanocapsules lipidiques a été récemment breveté par notre laboratoire (126). Ces nanocapsules possèdent l'avantage d'être préparées sans solvant organique et permettent l'encapsulation d'une grande variété d'agents thérapeutiques dont des médicaments (127,128), des radionucléides (129), de l'ADN (130), de l'ARN (131), et des acides nucléiques résistant aux nucléases (132). Ces nanocapsules lipidiques ont déjà montré d'intéressants résultats dans des modèles de gliomes (127–129,133). Elles pourraient être des options thérapeutiques sérieuses afin de cibler spécifiquement la ZMN en utilisant des anticorps ciblés contre des marqueurs moléculaires identifiés dans la ZMN. Dans ce même domaine de vectorisation, Chekhonin et al. (2012) ont produit des nanoconteneurs liposomaux dirigés contre le GFAP et le fragment extracellulaire E2 de la connexine 43, permettant de cibler spécifiquement les

astrocytes réactionnels et les cellules de GB présentes dans la ZMN (134). L'utilisation de cellules souches mésenchymateuses constitue un autre outil de vectorisation ciblée de thérapeutiques au sein de la ZMN des GB. Des travaux de notre équipe ont récemment démontré que ces cellules possèdent un tropisme particulier pour la ZMN *in vivo*, se répartissant de manière préférentielle au sein de la ZMN en périphérie du GB. De plus, ces cellules sont capables de véhiculer des nanocapsules lipidiques chargées en agents anticancéreux (67,135-138). Ces propriétés spécifiques des cellules souches mésenchymateuses font d'elles un moyen prometteur de cibler la ZMN des GB.

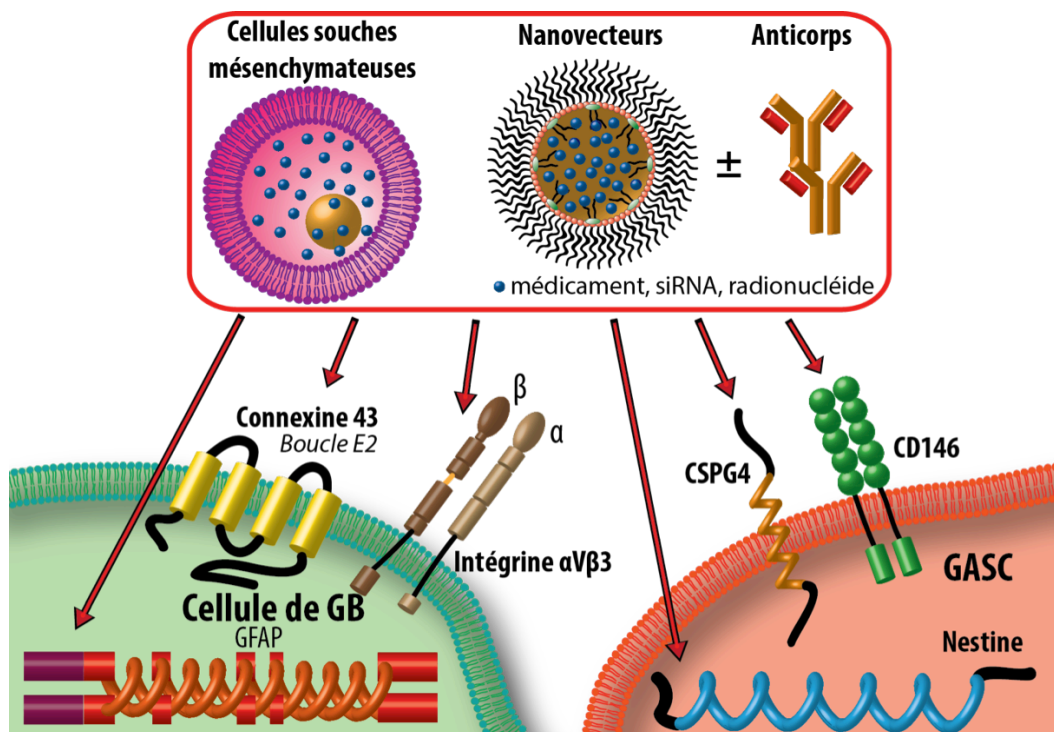


Figure 24 : Illustration des possibilités de ciblage de la ZMN des GB

### 3. Développement de nouvelles modalités d'analyses de la ZMN

Lors de l'analyse multimodale de la ZMN des GB, nous avons constaté que les modalités d'analyses disponibles en per-opératoire ne permettent pas d'étudier de manière satisfaisante la ZMN et la présence d'une infiltration tumorale périphérique. En effet l'œil du chirurgien, l'analyse de l'IRM pré-opératoire et même la neuronavigation (chirurgie guidée par l'image) sont insuffisants pour garantir une exérèse macroscopiquement complète de la tumeur. Nous savons que l'exérèse tumorale n'est complète que dans 20 à 37 % des cas sur l'IRM de contrôle réalisée en post-opératoire précoce (39,40). Or ce monitoring per-opératoire de l'infiltration tumorale au niveau des berges de la cavité de résection chirurgicale, et donc de la ZMN, est essentiel à la réalisation d'une chirurgie d'exérèse optimale, qui conditionnera le pronostic du patient et la réponse tumorale aux thérapies adjuvantes (87).

Avec le développement de nouvelles techniques, telles que le marquage isotopique des cellules tumorales couplé à un détecteur de rayonnement  $\beta$  (139), l'application de techniques déjà connues à la chirurgie comme la microscopie confocale (140) ou le raffinement de techniques déjà existantes comme la



chirurgie assistée par fluorescence (141), l'analyse per-opératoire de la ZMN des GB dans le but d'optimiser la qualité de la résection chirurgicale est un domaine de recherche en pleine expansion.

Nous avons choisi de développer dans cette dernière partie de mon travail de Thèse de nouvelles modalités d'analyses de la ZMN des GB. L'analyse par microscopie biphotonique est la première technique d'analyse que nous avons commencée à développer. Elle dispose d'une excellente résolution spatiale, mais le temps d'acquisition des données est long et nécessite encore des travaux dans le traitement des données acquises afin d'accélérer la vitesse d'acquisition. Pour l'instant la technique est limitée à de l'analyse *ex-vivo* à partir d'un échantillon de tissu prélevé durant la chirurgie.

L'analyse de la ZMN en microscopie biphotonique étant actuellement à un stade préliminaire, avec encore de nombreux problèmes techniques à résoudre. Aussi, nous nous sommes tournés en parallèle vers une nouvelle technique de biopsie optique plus adaptée à une utilisation per-opératoire en Neurochirurgie afin d'évaluer ses possibilités en terme de détection de l'infiltrat tumoral et d'optimisation du geste chirurgical. Cette technique nous semble particulièrement intéressante car elle permet d'étudier en temps réel les variations de vascularisation de la surface du cortex cérébral sur l'ensemble du champ opératoire.

Le développement de nouvelles techniques de biopsies optiques se poursuivra avec dans le cadre de partenariats de recherche. Le développement de la microscopie biphotonique sera réalisé en collaboration avec le Dr Gindre, du Département de Physique de l'Université d'Angers et le développement d'une nouvelle modalité de biopsie optique dédiée à la Neurochirurgie sera réalisé en collaboration avec le Pr Humeau-Heurtier du Laboratoire Angevin de Recherche en Ingénierie des Systèmes. Les travaux sur les nouvelles techniques de biopsies optiques se poursuivront dans le cadre d'un projet de recherche promu par le CHU dont je suis l'investigateur principal, financé par une bourse de 10 000 € que j'ai obtenu auprès de la Société Française de Neurochirurgie. Il est prévu dans ce projet de recherche que j'encadre un étudiant en master 2 sur le développement du nouvel imageur dédié à la Neurochirurgie.

Dans le même domaine, j'ai pour projet de développer une interface de réalité virtuelle afin de pouvoir identifier les zones fonctionnelles cérébrales liées aux fonctions cognitives complexes comme la cognition sociale ou la théorie de l'esprit chez les patients opérés en chirurgie éveillée, en collaboration avec le Pr Menei et le Dr Klinger du laboratoire « Réalité Virtuelle – Santé – Handicap » de l'Ecole Supérieure d'Informatique Electronique Automatique de Laval.

## 4. Conclusion

L'ensemble de ce travail de thèse souligne que les caractéristiques de la ZMN sont particulièrement complexes, à l'image de la ZT des GB. L'hétérogénéité inter-individuelle de la ZMN rend difficile l'identification de marqueurs diagnostiques, pronostiques et/ou cibles thérapeutiques. Afin de progresser et de passer outre cette variabilité des GB, il est nécessaire de constituer des bases clinico-biologiques de grande envergure telle que la collection clinico-biologique nationale Gliome pilotée par le Pr Menei et financée par l'INCa. La constitution d'une base clinico-biologique de GB est une étape importante dans l'étude de ces tumeurs rares. En effet cette collection clinico-biologique n'est pas simplement une base de données classique de patients, mais

comprend aussi en plus des données cliniques des patients des échantillons biologiques tumoraux, sanguins et capillaires. L'exploitation de ces échantillons et le croisement des données obtenues avec les données cliniques dans cette grande cohorte de patients faciliteront l'étude, la validation et le développement de nouveaux biomarqueurs des GB et de leur ZMN en augmentant la puissance statistique des expérimentations.

L'essor de nouvelles modalités d'analyse moléculaire à haut débit sera aussi à l'avenir la source la plus prometteuse pour identifier de tels biomarqueurs. Toutefois, ce type d'expérimentations génère de manière assez simple d'importantes quantités de données dont la manipulation, l'analyse statistique et la mise en forme nécessitent des connaissances poussées en bio-informatique et une quantité de temps importante pour en extraire les informations pertinentes. En plus de la complexité du post-traitement de ces analyses moléculaires, il est surtout essentiel et long d'interpréter ces résultats et de leur donner du sens pour les raccrocher à la réalité biologique et aux données de la littérature, avec parfois des résultats assez déroutants comme le faible taux de recouvrement entre les données de transcriptomique et de protéomique retrouvé dans une de nos études. En effet, c'est à partir de l'extraction des données moléculaires pertinentes sur le plan statistique, scientifique et physiopathologique que leur recoupement avec les données cliniques et épidémiologiques rendra possible l'identification de nouveaux biomarqueurs diagnostiques, pronostiques ou prédictifs de la réponse thérapeutique chez les patients porteurs d'un GB.

En parallèle à l'identification de biomarqueurs, les analyses per-opératoires capables d'évaluer la composition de la ZMN doivent être développées afin de pouvoir optimiser la qualité de la résection chirurgicale. Les techniques de biopsies optiques telles que la microscopie biphotonique initiées au cours de cette Thèse sont intéressantes dans cette indication car ce sont des méthodes d'analyse non-destructives, permettant de conserver l'échantillon étudié, voire d'étudier *in vivo* le tissu cible, sans réaliser de prélèvement.

## 5. Bilan personnel

La réalisation de ce travail de Thèse a été pour moi une expérience extrêmement enrichissante sur les plans scientifique, humain et professionnel. Sur le plan scientifique, j'ai appris à m'approprier une thématique de recherche dans laquelle je n'avais aucune compétence avant de commencer ma Thèse de Sciences. J'ai dû me former à la bio-informatique, à l'analyse et au traitement de données issues de la biologie moléculaire, ainsi qu'aux biostatistiques, avec l'obtention d'un DU de biostatistiques médicale, mention Très Bien. J'ai aussi appris à mener une thématique de recherche sur le long terme, en développant progressivement ma thématique de Thèse au fur et à mesure de l'obtention des résultats de mes travaux de recherche, notamment en m'orientant en fin de Thèse vers le développement de nouvelles techniques d'analyse per-opératoire de la ZMN des GB. J'ai aussi profité de ma Thèse pour me former à la paillasse avec les validations et dosages de la CRYAB en immunohistochimie et en ELISA.

Cette Thèse a aussi été pour moi l'occasion d'apprendre à répondre à des appels d'offre pour financer mes travaux de recherche. J'ai ainsi candidaté à de nombreux appels d'offre, dont l'appel d'offre national INSERM sur la recherche translationnelle, dans le cadre du plan Cancer, d'un montant de 40 500 € qui m'a

permis de prendre une disponibilité durant mon internat pour me consacrer à temps plein à mon travail de Thèse. Les frais de fonctionnement de mes travaux de recherche ont été en partie pris en charge par deux bourses obtenues auprès de la Société Française de Neurochirurgie : une bourse de 1 000 € pour l'analyse multimodale de la ZMN des GB, et une bourse de 10 000 € pour la conception d'un nouveau dispositif de biopsie optique dédiée à une utilisation au bloc opératoire de Neurochirurgie. Mes déplacements pour participer à des congrès internationaux ont été financés en partie par 2 bourses obtenues auprès du Cancéropôle Grand Ouest, de 1 000 € et 1 500 €.

J'ai aussi répondu à 5 appels d'offre au cours de ma Thèse, pour lesquels le dossier déposé n'a pas été retenu : 3 appels d'offre sur le développement d'une technique d'évaluation de l'imprégnation en pesticides à partir d'échantillons de cheveux (dont 2 lettres d'intention retenues), 1 appel d'offre sur le développement d'une nouvelle technique de biopsie optique dédiée à la Neurochirurgie et 1 appel d'offre sur le développement d'une interface de réalité virtuelle pour aider à l'identification des zones fonctionnelles cérébrales chez le patient opéré d'une lésion cérébrale en chirurgie éveillée (lettre d'intention retenue).

Les travaux réalisés sur le développement d'un imageur dédié à la Neurochirurgie se poursuivent actuellement et la déclaration d'invention a été validée par la Société d'Accélération et de Transfert de Technologies de l'Ouest, qui financera dans son intégralité la rédaction et le dépôt de brevet. Le dépôt d'un brevet est en cours d'évaluation par le cabinet de brevet ICOSA.

Sur le plan humain, ce travail de Thèse a été très enrichissant car il m'a appris à réaliser un travail de recherche en équipe. Cette Thèse a aussi l'occasion de rencontrer de nombreux chercheurs et doctorants par le biais des conférences et divers congrès auxquels j'ai participé au cours de ces trois dernières années. J'ai été en contact régulier avec les chercheurs de la plateforme de génomique, de transcriptomique et de protéomique de Rennes. J'ai aussi établi de nouvelles collaborations avec l'équipe du Dr Gindre du Département de Physique de l'Université d'Angers sur la thématique de la microscopie biphotonique et avec le Pr Humeau-Heurtier du Laboratoire Angevin en Ingénierie des Systèmes (LARIS) sur la thématique des biopsies optiques.

Sur le plan professionnel, cette Thèse de Sciences a été une occasion d'aborder d'une autre manière la Neurochirurgie, d'aller au-delà des standards de soins et des procédures validées et de garder un esprit critique sur la pratique clinique et chirurgicale de la Neurochirurgie afin d'identifier de nouveaux sujets de recherche et tenter d'améliorer la prise en charge des patients.

**Publications et  
communications  
présentées au cours de la  
Thèse**

## I. Publications :

- Lemée JM, Petit D, Splingard M, Menei P. **Autologous bone flap versus hydroxyapatite prosthesis in first intention in secondary cranioplasty after decompressive craniectomy: a French medico-economical study.** Neurochirurgie. 2013 Apr;59(2):60-3. doi: 10.1016/j.neuchi.2012.10.138. Epub 2013 Feb 14. PubMed PMID: 23414773.
- Lemée JM, Com E, Clavreul A, Avril T, Quillien V, de Tairac M, Pineau C, Menei P. **Proteomic analysis of glioblastomas: What is the best brain control sample?** J Proteomics. 2013 Jun 24;85:165-73. doi: 10.1016/j.jprot.2013.04.031. Epub 2013 May 4. PubMed PMID: 23651564
- Chinier E, Egon G, Lemée JM, Hamel O, Richard I, Perrouin-Verbe B. **Stress incontinence predictive factors after sacral posterior roots rhizotomy (abstract),** Annals of Physical and Rehabilitation Medicine, Volume 56, Supplement 1, October 2013, Page e76, ISSN 1877-0657, <http://dx.doi.org/10.1016/j.rehab.2013.07.430>.
- Lemée JM, Abraham P, Ter Minassian A, Menei P. **Application of laser speckle imaging to the identification of brain functional areas in Neurosurgery (abstract),** Neuro Oncol (2014) 16 (suppl 2): ii10. doi: 10.1093/neuonc/nou174.34
- Lemée JM, Clavreul A, Rakotoarimalala S, Gindre D, Menei P. **Analysis of glioblastoma's peritumoral brain zone using biphotonic microscopy (abstract),** Neuro Oncol (2014) 16 (suppl 2): ii82-ii83. doi: 10.1093/neuonc/nou174.316
- Lemée JM, Delahaye C, Laccourreye L, Mercier P, Fournier HD. **Post surgical vestibular schwannoma's remnant tumor: What to do?** Neurochirurgie. 2014 Sep 16. pii: S0028-3770(14)00084-8. doi: 10.1016/j.neuchi.2014.02.013. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25239383.
- Chinier E, Egon G, Hamel O, Lemée JM, Perrouin-Verbe B, **Stress incontinence predictive factors after sacral posterior roots rhizotomy,** Neuro-Urology and Urodynamics Dec 2014
- Lemée JM, Clavreul A, Aubry M, Com E, De Tairac M, Eliat PA, Henry C, Rousseau A, Mosser J, Menei P. **Multimodal analysis of glioblastoma's peritumoral brain zone,** J Neurooncol. 2015 Jan 6. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25559687.
- Lemée JM, Clavreul A, Menei P, **Thinking outside the box: a review of glioblastoma peritumoral brain zone characteristics and perspectives for future research,** Neuro Oncol (soumis)
- Lemée JM, Clavreul A, Aubry M, Com E, De Tairac M, Mosser J, Menei P, **Integration of transcriptomic and proteomic profiles in glioblastoma: looking for the missing link,** PLoS Genet (soumis)

## II. Communications orales ou affichées

### A- Conférences et communications orales sur invitation

- Modérateur des 6<sup>èmes</sup> journées scientifiques sur les actualités en vertébroplastie et expansion vertébrale, 31 Janvier 2014, Paris
- **Chirurgie et cerveau au XXI<sup>e</sup> siècle : possibilités, limites, développements futurs,** Cycle de conférences de la Semaine du Cerveau, 13 Mars 2014, Ecole Normale Supérieure, Paris
- **Utilisation de la réalité virtuelle au bloc opératoire de Neurochirurgie,** Congrès de la Société de Neurophysiologie Clinique de Langue Française, 25 Juin 2014, Angers
- **Tumorectomie et aides à la définition des marges tumorales,** Journées Nationales d'Enseignement de Neurochirurgie, 25 Septembre 2014, Paris
- **Cerveau et cancer : état des lieux actuel et développement futurs,** Cycle de conférences de la Semaine du Cerveau, 17 Mars 2015, Ecole Normale Supérieure, Paris (accepté)
- **Coordinateur du symposium « Fonctionnalités corticales et variations hémodynamique »** Congrès de la Société Française de Neurochirurgie, 27 Mars 2015, Nantes

### B- Communications orales lors de congrès

- Lemée JM, Clavreul A, Com E, Menei P, **Projet Gliome Grand Ouest: Analyse des données de protéomique,** Journées du Réseau Gliome Grand Ouest, 3-4 Mai 2012, Angers
- Lemée JM, Delahaye C, Laccourreye L, Mercier P, Fournier HD **Post-surgical vestibular schwannoma's remnant: what to do?,** Joint congress Société française de Neurochirurgie-Deutsche gesellschaft für Neurochirurgie, 22 Mars 2013, Bordeaux
- Lemée JM, Clavreul A, Com E, Menei P, **Post-surgical vestibular schwannoma's remnant: what to do?,** Association de Neuro-Oncologie d'Expression Française, 23 Mars 2013, Bordeaux

- Lemée JM, Com E, Clavreul A, Avril T, Quillien V, de Tayrac M, Pineau C, Menei P. **Proteomic analysis of glioblastomas : what is the best brain control sample ?**, Joint congress Société française de Neurochirurgie-Deutsche gesellschaft für Neurochirurgie, *23 Mars 2013, Bordeaux*
- Chinier E, Lemée JM, Egon G, Hamel O, Perrouin-Verbe B, **Facteurs prédictifs de survenue d'une incontinence urinaire d'effort après radicotomie des racines sacrées postérieures**, (2e auteur) Congrès de la Société Française de Médecine Physique et Réadaptation, *18 Octobre 2013, Reims*
- Lemée JM, Clavreul A, Aubry M, Com E, De Tayrac M, Eliat PA, Henry C, Rousseau A, Mosser J, Menei P. **Multimodal analysis of glioblastoma peritumoral brain zone**, Journées Scientifiques de L'École doctorale Angers-Nantes, *10 Décembre 2013, Nantes*
- Lemée JM, Clavreul A, Rakotoarimalala S, Gindre D, Menei P, **Analyse de la zone péritumorale des glioblastomes: apport de la microscopie biphotonique**, Séminaire angevin interface Sciences de l'Ingénieur / Sciences de la Santé, *14 Février 2014, Angers*
- Lemée JM, Clavreul A, Menei P. **Analysis of the peritumoral brain zone of Glioblastoma: developing multimodal analysis and new therapeutic targets**, 7<sup>th</sup> International Joint Conference on Biomedical Engineering Systems and Technologies, *05 Mars 2014, Angers*
- Lemée JM, Clavreul A, Aubry M, Com E, De Tayrac M, Eliat PA, Henry C, Rousseau A, Mosser J, Menei P. **Characterizing the Peritumoral Brain Zone in Glioblastoma: a Multidisciplinary Analysis**, Congrès de la Société Française de Neurochirurgie, *22-25 Mai 2014, Clermont-Ferrand*
- Clavreul A, Lemée JM, Etcheverry A, Com E, Guette C, Rousseau A, Avril T, Aubry M, De Tayrac M, Coqueret O, Lemaire L, Quillien V, Pineau C, Eliat PA, Mosser J, Menei P. **Projet Gliome Grand Ouest "From the core to beyond the margin": les faces cachées de la zone péritumorale** (2e auteur) 8<sup>e</sup> Journées du Cancéropôle Grand Ouest, *Les Sables d'Olonnes, 19-20 Juin 2014*
- Lemée JM, Abraham P, Ter Minassian A, Menei P. **Characterization of brain langage area during awake surgery using laser speckle imaging**, *Congress of the European Association for Neuro-Oncology, 9-12 Octobre 2014, Turin (Italie)*

### C- Communication par poster lors de congrès

- Lemée JM, Com E, Clavreul A, Avril T, Quillien V, de Tayrac M, Karayan L, Pineau C, Menei P, **Proteomic analysis of glioblastomas : what is the best brain control sample ?**, 7<sup>e</sup> journées du Cancéropôle Grand Ouest, *3-4 Avril 2013, Les Sables d'Olonnes*
- Lemée JM, Clavreul A, Rakotoarimalala S, Gindre D, Menei P, **Analysis of the peritumoral brain zone from glioblastoma with biphotonic microscopy**
  - 7<sup>th</sup> International Joint Conference on Biomedical Engineering Systems and Technologies, *02-06 Mars 2014, Angers*
  - Congrès de l'Association des Neuro-Oncologues d'Expression Française et de la Société Suisse de Neuro-Oncologie, *17-18 Mai 2014, Lausanne (Suisse)*
  - Congrès de la Société Française de Neurochirurgie, *22-25 Mai 2014, Clermont-Ferrand*
  - 8<sup>e</sup> Journées du Cancéropôle Grand Ouest, *19-20 Juin 2014, Les Sables d'Olonnes*
  - European Association for Neuro-Oncology, *9-12 Octobre 2014, Turin (Italie)*
- Lemée JM, Clavreul A, Aubry M, Com E, De Tayrac M, Eliat PA, Henry C, Rousseau A, Mosser J, Menei P, **Characterizing the peritumoral brain zone in glioblastoma: a multimodal analysis**
  - Congrès de l'Association des Neuro-Oncologues d'Expression Française et de la Société Suisse de Neuro-Oncologie, *17-18 Mai 2014, Lausanne (Suisse)*
  - 8<sup>e</sup> Journées du Cancéropôle Grand Ouest, *Les Sables d'Olonnes, 19-20 Juin 2014*
- Lemée JM, Ter Minassian A, Abraham P, Menei P, **Characterization of brain langage area during awake surgery using laser speckle imaging**
  - Congrès de l'Association des Neuro-Oncologues d'Expression Française et de la Société Suisse de Neuro-Oncologie, *Lausanne, Suisse, 17-18 Mai 2014*
  - Congrès de la Société Française de Neurochirurgie, *Clermont-Ferrand, 22-25 Mai 2014*
  - 8<sup>e</sup> Journées du Cancéropôle Grand Ouest, *Les Sables d'Olonnes, 19-20 Juin 2014*

# Bibliographie

1. Baldi I, Huchet A, Bauchet L, Loiseau H. [Epidemiology of glioblastoma]. *Neurochirurgie*. 2010 Dec;56(6):433-40.
2. Loiseau H, Huchet A, Rué M, Cowppli-Bony A, Baldi I. [Epidemiology of primary brain tumor]. *Rev Neurol (Paris)*. 2009 Sep;165(8-9):650-70.
3. Lönn S, Klæboe L, Hall P, Mathiesen T, Auvinen A, Christensen HC, et al. Incidence trends of adult primary intracerebral tumors in four Nordic countries. *Int J Cancer J Int Cancer*. 2004 Jan 20;108(3):450-5.
4. Christensen HC, Kosteljanetz M, Johansen C. Incidences of gliomas and meningiomas in Denmark, 1943 to 1997. *Neurosurgery*. 2003 Jun;52(6):1327-1333; discussion 1333-1334.
5. Ho VKY, Reijneveld JC, Enting RH, Bienfait HP, Robe P, Baumert BG, et al. Changing incidence and improved survival of gliomas. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2014 Jun 24;
6. Bauchet L, Mathieu-Daudé H, Fabbro-Peray P, Rigau V, Fabbro M, Chinot O, et al. Oncological patterns of care and outcome for 952 patients with newly diagnosed glioblastoma in 2004. *Neuro-Oncol*. 2010 Jul;12(7):725-35.
7. Kelly KA, Kirkwood JM, Kapp DS. Glioblastoma multiforme: pathology, natural history and treatment. *Cancer Treat Rev*. 1984 Mar;11(1):1-26.
8. Van Breemen MSM, Wilms EB, Vecht CJ. Epilepsy in patients with brain tumours: epidemiology, mechanisms, and management. *Lancet Neurol*. 2007 May;6(5):421-30.
9. Law M, Yang S, Wang H, Babb JS, Johnson G, Cha S, et al. Glioma grading: sensitivity, specificity, and predictive values of perfusion MR imaging and proton MR spectroscopic imaging compared with conventional MR imaging. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2003 Dec;24(10):1989-98.
10. Lonjon M, Mondot L, Lonjon N, Chanalet S. [Clinical factors in glioblastoma and neuroradiology]. *Neurochirurgie*. 2010 Dec;56(6):449-54.
11. Negendank WG, Sauter R, Brown TR, Evelhoch JL, Falini A, Gotsis ED, et al. Proton magnetic resonance spectroscopy in patients with glial tumors: a multicenter study. *J Neurosurg*. 1996 Mar;84(3):449-58.
12. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2007 Aug;114(2):97-109.
13. Figarella-Branger D, Labrousse F, Mohktari K, Société française de neuropathologie, Réseau de neuro-oncologie pathologique. [Guidelines for adult diffuse gliomas WHO grade II, III and IV: pathology and biology. Société française de neuropathologie . Réseau de neuro-oncologie pathologique]. *Ann Pathol*. 2012 Oct;32(5):318-27.
14. Figarella-Branger D, Bouvier C, Moroch J, Michalak S, F Burel-Vandenbos null. [Morphological classification of glioblastomas]. *Neurochirurgie*. 2010 Dec;56(6):459-63.
15. Van den Bent MJ. Interobserver variation of the histopathological diagnosis in clinical trials on glioma: a clinician's perspective. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2010 Sep;120(3):297-304.
16. De Tayrac M, Saikali S, Aubry M, Bellaud P, Boniface R, Quillien V, et al. Prognostic significance of EDN/RB, HJURP, p60/CAF-1 and PDLI4, four new markers in high-grade gliomas. *PloS One*. 2013;8(9):e73332.

17. De Tayrac M, Etcheverry A, Aubry M, Saikali S, Hamlat A, Quillien V, et al. Integrative genome-wide analysis reveals a robust genomic glioblastoma signature associated with copy number driving changes in gene expression. *Genes Chromosomes Cancer*. 2009 Jan;48(1):55–68.
18. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 2010 Jan 19;17(1):98–110.
19. Tabatabai G, Stupp R, van den Bent MJ, Hegi ME, Tonn JC, Wick W, et al. Molecular diagnostics of gliomas: the clinical perspective. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2010 Nov;120(5):585–92.
20. Houillier C, Wang X, Kaloshi G, Mokhtari K, Guillemin R, Laffaire J, et al. IDH1 or IDH2 mutations predict longer survival and response to temozolomide in low-grade gliomas. *Neurology*. 2010 Oct 26;75(17):1560–6.
21. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC-H, Leary RJ, Angenendt P, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*. 2008 Sep 26;321(5897):1807–12.
22. Sanson M, Marie Y, Paris S, Idbaih A, Laffaire J, Ducray F, et al. Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2009 Sep 1;27(25):4150–4.
23. Gorlia T, van den Bent MJ, Hegi ME, Mirimanoff RO, Weller M, Cairncross JG, et al. Nomograms for predicting survival of patients with newly diagnosed glioblastoma: prognostic factor analysis of EORTC and NCIC trial 26981-22981/CE.3. *Lancet Oncol*. 2008 Jan;9(1):29–38.
24. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005 Mar 10;352(10):987–96.
25. Etcheverry A, Aubry M, de Tayrac M, Vauleon E, Boniface R, Guenot F, et al. DNA methylation in glioblastoma: impact on gene expression and clinical outcome. *BMC Genomics*. 2010;11:701.
26. Etcheverry A, Aubry M, Idbaih A, Vauleon E, Marie Y, Menei P, et al. DGKI methylation status modulates the prognostic value of MGMT in glioblastoma patients treated with combined radio-chemotherapy with temozolomide. *PLoS One*. 2014;9(9):e104455.
27. Labussière M, Idbaih A, Wang X-W, Marie Y, Boisselier B, Falet C, et al. All the 1p19q codeleted gliomas are mutated on IDH1 or IDH2. *Neurology*. 2010 Jun 8;74(23):1886–90.
28. Ducray F, Crinière E, Idbaih A, Mokhtari K, Marie Y, Paris S, et al. alpha-Internexin expression identifies 1p19q codeleted gliomas. *Neurology*. 2009 Jan 13;72(2):156–61.
29. Cairncross G, Jenkins R. Gliomas with 1p/19q codeletion: a.k.a. oligodendroglioma. *Cancer J Sudbury Mass*. 2008 Dec;14(6):352–7.
30. Jenkins RB, Blair H, Ballman KV, Giannini C, Arusell RM, Law M, et al. A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. *Cancer Res*. 2006 Oct 15;66(20):9852–61.
31. Van den Bent MJ, Brandes AA, Taphoorn MJB, Kros JM, Kouwenhoven MCM, Delattre J-Y, et al. Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy in newly diagnosed anaplastic oligodendroglioma: long-term follow-up of EORTC brain tumor group study 26951. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2013 Jan 20;31(3):344–50.
32. Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, Lisle DK, Finkelstein DM, Hammond RR, et al. Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst*. 1998 Oct 7;90(19):1473–9.
33. Kim Y-H, Nobusawa S, Mittelbronn M, Paulus W, Brokinkel B, Keyvani K, et al. Molecular classification of low-grade diffuse gliomas. *Am J Pathol*. 2010 Dec;177(6):2708–14.



34. England B, Huang T, Karsy M. Current understanding of the role and targeting of tumor suppressor p53 in glioblastoma multiforme. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med.* 2013 Aug;34(4):2063–74.
35. Guillaudeau A, Durand K, Rabinovitch-Chable H, Pommepuy I, Mesturoux L, Robert S, et al. Adult diffuse gliomas produce mRNA transcripts encoding EGFR isoforms lacking a tyrosine kinase domain. *Int J Oncol.* 2012 Apr;40(4):1142–52.
36. Faulkner C, Palmer A, Williams H, Wragg C, Haynes HR, White P, et al. EGFR and EGFRvIII analysis in glioblastoma as therapeutic biomarkers. *Br J Neurosurg.* 2014 Aug 20;1–7.
37. Coulibaly B, Nanni I, Quilichini B, Gaudart J, Metellus P, Fina F, et al. Epidermal growth factor receptor in glioblastomas: correlation between gene copy number and protein expression. *Hum Pathol.* 2010 Jun;41(6):815–23.
38. Stummer W, van den Bent MJ, Westphal M. Cytoreductive surgery of glioblastoma as the key to successful adjuvant therapies: new arguments in an old discussion. *Acta Neurochir (Wien).* 2011 Jun;153(6):1211–8.
39. Orringer D, Lau D, Khatri S, Zamora-Berridi GJ, Zhang K, Wu C, et al. Extent of resection in patients with glioblastoma: limiting factors, perception of resectability, and effect on survival. *J Neurosurg.* 2012 Nov;117(5):851–9.
40. Chaichana KL, Jusue-Torres I, Navarro-Ramirez R, Raza SM, Pascual-Gallego M, Ibrahim A, et al. Establishing percent resection and residual volume thresholds affecting survival and recurrence for patients with newly diagnosed intracranial glioblastoma. *Neuro-Oncol.* 2013 Nov 26;
41. Ryken TC, Kalkanis SN, Buatti JM, Olson JJ, AANS/CNS Joint Guidelines Committee. The role of cytoreductive surgery in the management of progressive glioblastoma: a systematic review and evidence-based clinical practice guideline. *J Neurooncol.* 2014 Jul;118(3):479–88.
42. Keime-Guibert F, Chinot O, Taillandier L, Cartalat-Carel S, Frenay M, Kantor G, et al. Radiotherapy for glioblastoma in the elderly. *N Engl J Med.* 2007 Apr 12;356(15):1527–35.
43. Malmström A, Grønberg BH, Marosi C, Stupp R, Frappaz D, Schultz H, et al. Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2012 Sep;13(9):916–26.
44. Arvold ND, Reardon DA. Treatment options and outcomes for glioblastoma in the elderly patient. *Clin Interv Aging.* 2014;9:357–67.
45. Wick W, Weller M, van den Bent M, Sanson M, Weiler M, von Deimling A, et al. MGMT testing—the challenges for biomarker-based glioma treatment. *Nat Rev Neurol.* 2014 Jul;10(7):372–85.
46. Valtonen S, Timonen U, Toivanen P, Kalimo H, Kivipelto L, Heiskanen O, et al. Interstitial chemotherapy with carmustine-loaded polymers for high-grade gliomas: a randomized double-blind study. *Neurosurgery.* 1997 Jul;41(1):44–48; discussion 48–49.
47. Westphal M, Hilt DC, Bortey E, Delavault P, Olivares R, Warnke PC, et al. A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro-Oncol.* 2003 Apr;5(2):79–88.
48. Menei P, Metellus P, Parot-Schinkel E, Loiseau H, Capelle L, Jacquet G, et al. Biodegradable carmustine wafers (Gliadel) alone or in combination with chemoradiotherapy: the French experience. *Ann Surg Oncol.* 2010 Jul;17(7):1740–6.
49. Pallud J, Audureau E, Noel G, Lechapt-Zalcman E, Duntze J, Guyotat J, et al. [In Process Citation]. *Neurochirurgie.* 2014 Dec;60(6):330.
50. Lechapt-Zalcman E, Levallet G, Dugué AE, Vital A, Diebold M-D, Menei P, et al. O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation and low MGMT-encoded protein expression as

prognostic markers in glioblastoma patients treated with biodegradable carmustine wafer implants after initial surgery followed by radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide. *Cancer*. 2012 Sep 15;118(18):4545–54.

51. Chinot OL, Wick W, Mason W, Henriksson R, Saran F, Nishikawa R, et al. Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med*. 2014 Feb 20;370(8):709–22.
52. Gilbert MR, Sulman EP, Mehta MP. Bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med*. 2014 May 22;370(21):2048–9.
53. Kaley T, Nolan C, Carver A, Omuro A. Bevacizumab for acute neurologic deterioration in patients with glioblastoma. *CNS Oncol*. 2013 Sep;2(5):413–8.
54. Gállego Pérez-Larraya J, Lahutte M, Petrirena G, Reyes-Botero G, González-Aguilar A, Houillier C, et al. Response assessment in recurrent glioblastoma treated with irinotecan-bevacizumab: comparative analysis of the Macdonald, RECIST, RANO, and RECIST + F criteria. *Neuro-Oncol*. 2012 May;14(5):667–73.
55. Wen PY, Macdonald DR, Reardon DA, Cloughesy TF, Sorensen AG, Galanis E, et al. Updated response assessment criteria for high-grade gliomas: response assessment in neuro-oncology working group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2010 Apr 10;28(11):1963–72.
56. Brem H, Piantadosi S, Burger PC, Walker M, Selker R, Vick NA, et al. Placebo-controlled trial of safety and efficacy of intraoperative controlled delivery by biodegradable polymers of chemotherapy for recurrent gliomas. The Polymer-brain Tumor Treatment Group. *Lancet*. 1995 Apr 22;345(8956):1008–12.
57. Fogh SE, Andrews DW, Glass J, Curran W, Glass C, Champ C, et al. Hypofractionated stereotactic radiation therapy: an effective therapy for recurrent high-grade gliomas. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2010 Jun 20;28(18):3048–53.
58. Lee J-J, Lee J-S, Cui MN, Yun HH, Kim HY, Lee SH, et al. BIS targeting induces cellular senescence through the regulation of 14-3-3 zeta/STAT3/SKP2/p27 in glioblastoma cells. *Cell Death Dis*. 2014;5:e1537.
59. Shevtsov MA, Kim AV, Samochernych KA, Romanova IV, Margulis BA, Guzhova IV, et al. Pilot study of intratumoral injection of recombinant heat shock protein 70 in the treatment of malignant brain tumors in children. *OncoTargets Ther*. 2014;7:1071–81.
60. Com E, Clavreul A, Lagarrigue M, Michalak S, Menei P, Pineau C. Quantitative proteomic Isotope-Coded Protein Label (ICPL) analysis reveals alteration of several functional processes in the glioblastoma. *J Proteomics*. 2012 Jul 16;75(13):3898–913.
61. Ostman A, Augsten M. Cancer-associated fibroblasts and tumor growth--bystanders turning into key players. *Curr Opin Genet Dev*. 2009 Feb;19(1):67–73.
62. Shimoda M, Mellody KT, Orimo A. Carcinoma-associated fibroblasts are a rate-limiting determinant for tumour progression. *Semin Cell Dev Biol*. 2010 Feb;21(1):19–25.
63. Bhowmick NA, Moses HL. Tumor-stroma interactions. *Curr Opin Genet Dev*. 2005 Feb;15(1):97–101.
64. Gonda TA, Varro A, Wang TC, Tycko B. Molecular biology of cancer-associated fibroblasts: can these cells be targeted in anti-cancer therapy? *Semin Cell Dev Biol*. 2010 Feb;21(1):2–10.
65. Franco OE, Shaw AK, Strand DW, Hayward SW. Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2010 Feb;21(1):33–9.
66. Clavreul A, Etcheverry A, Chassevent A, Quillien V, Avril T, Jourdan M-L, et al. Isolation of a new cell population in the glioblastoma microenvironment. *J Neurooncol*. 2012 Feb;106(3):493–504.

67. Clavreul A, Guette C, Faguer R, Tétaud C, Boissard A, Lemaire L, et al. Glioblastoma-associated stromal cells (GASCs) from histologically normal surgical margins have a myofibroblast phenotype and angiogenic properties. *J Pathol*. 2014 Jan 30;
68. Haider S, Pal R. Integrated analysis of transcriptomic and proteomic data. *Curr Genomics*. 2013 Apr;14(2):91–110.
69. Maier T, Güell M, Serrano L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett*. 2009 Dec 17;583(24):3966–73.
70. Ghazalpour A, Bennett B, Petyuk VA, Orozco L, Hagopian R, Mungrue IN, et al. Comparative analysis of proteome and transcriptome variation in mouse. *PLoS Genet*. 2011 Jun;7(6):e1001393.
71. Gygi SP, Rochon Y, Franz BR, Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol*. 1999 Mar;19(3):1720–30.
72. Chen G, Gharib TG, Huang C-C, Taylor JMG, Misek DE, Kardia SLR, et al. Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol Cell Proteomics MCP*. 2002 Apr;1(4):304–13.
73. Pascal LE, True LD, Campbell DS, Deutsch EW, Risk M, Coleman IM, et al. Correlation of mRNA and protein levels: cell type-specific gene expression of cluster designation antigens in the prostate. *BMC Genomics*. 2008;9:246.
74. Schwartzenuber J, Korshunov A, Liu X-Y, Jones DTW, Pfaff E, Jacob K, et al. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature*. 2012 Feb 9;482(7384):226–31.
75. Buczkowicz P, Hoeman C, Rakopoulos P, Pajovic S, Letourneau L, Dzamba M, et al. Genomic analysis of diffuse intrinsic pontine gliomas identifies three molecular subgroups and recurrent activating ACVR1 mutations. *Nat Genet*. 2014 May;46(5):451–6.
76. Yuen BTK, Knoepfler PS. Histone H3.3 mutations: a variant path to cancer. *Cancer Cell*. 2013 Nov 11;24(5):567–74.
77. Khuong-Quang D-A, Buczkowicz P, Rakopoulos P, Liu X-Y, Fontebasso AM, Bouffet E, et al. K27M mutation in histone H3.3 defines clinically and biologically distinct subgroups of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2012 Sep;124(3):439–47.
78. Dimberg A, Rylova S, Dieterich LC, Olsson A-K, Schiller P, Wikner C, et al. alphaB-crystallin promotes tumor angiogenesis by increasing vascular survival during tube morphogenesis. *Blood*. 2008 Feb 15;111(4):2015–23.
79. Ousman SS, Tomooka BH, van Noort JM, Wawrousek EF, O'Connor KC, Hafler DA, et al. Protective and therapeutic role for alphaB-crystallin in autoimmune demyelination. *Nature*. 2007 Jul 26;448(7152):474–9.
80. Kase S, He S, Sonoda S, Kitamura M, Spee C, Wawrousek E, et al. alphaB-crystallin regulation of angiogenesis by modulation of VEGF. *Blood*. 2010 Apr 22;115(16):3398–406.
81. Shi C, He Z, Hou N, Ni Y, Xiong L, Chen P. Alpha B-crystallin correlates with poor survival in colorectal cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(9):6056–63.
82. Qin H, Ni Y, Tong J, Zhao J, Zhou X, Cai W, et al. Elevated expression of CRYAB predicts unfavorable prognosis in non-small cell lung cancer. *Med Oncol Northwood Lond Engl*. 2014 Aug;31(8):142.
83. Ruan Q, Han S, Jiang WG, Boulton ME, Chen ZJ, Law BK, et al. alphaB-crystallin, an effector of unfolded protein response, confers anti-VEGF resistance to breast cancer via maintenance of intracrine VEGF in endothelial cells. *Mol Cancer Res MCR*. 2011 Dec;9(12):1632–43.

84. Clavreul A, Etcheverry A, Tétaud C, Rousseau A, Avril T, Henry C, et al. Identification of two glioblastoma-associated stromal cell subtypes with different carcinogenic properties in histologically normal surgical margins. *J Neurooncol.* 2014 Dec 13;
85. Cherneva RV, Georgiev OB, Petrova DS, Trifonova NL, Stamenova M, Ivanova V, et al. The role of small heat-shock protein  $\alpha$ B-crystalline (HspB5) in COPD pathogenesis. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2012;7:633-40.
86. SCHERER HJ. THE FORMS OF GROWTH IN GLIOMAS AND THEIR PRACTICAL SIGNIFICANCE. *Brain.* 1940 Mar 1;63(1):1-35.
87. McGirt MJ, Chaichana KL, Gathinji M, Attenello FJ, Than K, Olivi A, et al. Independent association of extent of resection with survival in patients with malignant brain astrocytoma. *J Neurosurg.* 2009 Jan;110(1):156-62.
88. Sherriff J, Tamangani J, Senthil L, Cruickshank G, Spooner D, Jones B, et al. Patterns of relapse in glioblastoma multiforme following concomitant chemoradiotherapy with temozolomide. *Br J Radiol.* 2013 Feb;86(1022):20120414.
89. Petrecca K, Guiot M-C, Panet-Raymond V, Souhami L. Failure pattern following complete resection plus radiotherapy and temozolomide is at the resection margin in patients with glioblastoma. *J Neurooncol.* 2013 Jan;111(1):19-23.
90. Nagashima G, Suzuki R, Hokaku H, Takahashi M, Miyo T, Asai J, et al. Graphic analysis of microscopic tumor cell infiltration, proliferative potential, and vascular endothelial growth factor expression in an autopsy brain with glioblastoma. *Surg Neurol.* 1999 Mar;51(3):292-9.
91. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen H-J, et al. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol.* 2006 May;7(5):392-401.
92. Schucht P, Beck J, Abu-Isa J, Anderegg L, Murek M, Seidel K, et al. Gross total resection rates in contemporary glioblastoma surgery: results of an institutional protocol combining 5-aminolevulinic acid intraoperative fluorescence imaging and brain mapping. *Neurosurgery.* 2012 Nov;71(5):927-935; discussion 935-936.
93. Helmchen F, Denk W. Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Methods.* 2005 Dec;2(12):932-40.
94. Ustione A, Piston DW. A simple introduction to multiphoton microscopy. *J Microsc.* 2011 Sep;243(3):221-6.
95. Meyer T, Bergner N, Bielecki C, Krafft C, Akimov D, Romeike BFM, et al. Nonlinear microscopy, infrared, and Raman microspectroscopy for brain tumor analysis. *J Biomed Opt.* 2011 Feb;16(2):021113.
96. Caffo M, Germanò A, Caruso G, Meli F, Galatioto S, Sciacca MP, et al. An immunohistochemical study of extracellular matrix proteins laminin, fibronectin and type IV collagen in paediatric glioblastoma multiforme. *Acta Neurochir (Wien).* 2004 Oct;146(10):1113-1118; discussion 1118.
97. Chernov AV, Strongin AY. Epigenetic regulation of matrix metalloproteinases and their collagen substrates in cancer. *Biomol Concepts.* 2011 Jun;2(3):135-47.
98. Grässel S, Bauer RJ. Collagen XVI in health and disease. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol.* 2013 Mar 11;32(2):64-73.
99. Han J, Daniel JC, Pappas GD. Expression of type VI collagen during glioblastoma cell invasion in brain tissue cultures. *Cancer Lett.* 1995 Jan 27;88(2):127-32.
100. Han J, Daniel JC. Biosynthesis of type VI collagen by glioblastoma cells and possible function in cell invasion of three-dimensional matrices. *Connect Tissue Res.* 1995;31(2):161-70.

101. Paulus W, Roggendorf W, Schuppan D. Immunohistochemical investigation of collagen subtypes in human glioblastomas. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1988;413(4):325–32.
102. Senner V, Ratzinger S, Mertsch S, Grassel S, Paulus W. Collagen XVI expression is upregulated in glioblastomas and promotes tumor cell adhesion. *FEBS Lett*. 2008 Oct 15;582(23-24):3293–300.
103. Madden KS, Zettel ML, Majewska AK, Brown EB. Brain tumor imaging: live imaging of glioma by two-photon microscopy. *Cold Spring Harb Protoc*. 2013 Mar;2013(3).
104. Jbabdi S, Mandonnet E, Duffau H, Capelle L, Swanson KR, Péligrini-Issac M, et al. Simulation of anisotropic growth of low-grade gliomas using diffusion tensor imaging. *Magn Reson Med Off J Soc Magn Reson Med Soc Magn Reson Med*. 2005 Sep;54(3):616–24.
105. Sundgren PC, Fan X, Weybright P, Welsh RC, Carlos RC, Petrou M, et al. Differentiation of recurrent brain tumor versus radiation injury using diffusion tensor imaging in patients with new contrast-enhancing lesions. *Magn Reson Imaging*. 2006 Nov;24(9):1131–42.
106. Deng Z, Yan Y, Zhong D, Yang G, Tang W, Lü F, et al. Quantitative analysis of glioma cell invasion by diffusion tensor imaging. *J Clin Neurosci Off J Neurosurg Soc Australas*. 2010 Dec;17(12):1530–6.
107. Lu S, Ahn D, Johnson G, Law M, Zagzag D, Grossman RI. Diffusion-tensor MR imaging of intracranial neoplasia and associated peritumoral edema: introduction of the tumor infiltration index. *Radiology*. 2004 Jul;232(1):221–8.
108. Kinoshita M, Goto T, Okita Y, Kagawa N, Kishima H, Hashimoto N, et al. Diffusion tensor-based tumor infiltration index cannot discriminate vasogenic edema from tumor-infiltrated edema. *J Neurooncol*. 2010 Feb;96(3):409–15.
109. Mangiola A, Saulnier N, De Bonis P, Orteschi D, Sica G, Lama G, et al. Gene expression profile of glioblastoma peritumoral tissue: an ex vivo study. *PLoS One*. 2013;8(3):e57145.
110. Glas M, Rath BH, Simon M, Reinartz R, Schramme A, Trageser D, et al. Residual tumor cells are unique cellular targets in glioblastoma. *Ann Neurol*. 2010 Aug;68(2):264–9.
111. Piccirillo SGM, Dietz S, Madhu B, Griffiths J, Price SJ, Collins VP, et al. Fluorescence-guided surgical sampling of glioblastoma identifies phenotypically distinct tumour-initiating cell populations in the tumour mass and margin. *Br J Cancer*. 2012 Jul 24;107(3):462–8.
112. Ruiz-Ontañón P, Orgaz JL, Aldaz B, Elosegui-Artola A, Martino J, Berciano MT, et al. Cellular plasticity confers migratory and invasive advantages to a population of glioblastoma-initiating cells that infiltrate peritumoral tissue. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2013 Jun;31(6):1075–85.
113. Toussaint LG, Nilson AE, Goble JM, Ballman KV, James CD, Lefranc F, et al. Galectin-1, a gene preferentially expressed at the tumor margin, promotes glioblastoma cell invasion. *Mol Cancer*. 2012;11:32.
114. Rampazzo E, Della Puppa A, Frasson C, Battilana G, Bianco S, Scienza R, et al. Phenotypic and functional characterization of Glioblastoma cancer stem cells identified through 5-aminolevulinic acid-assisted surgery. *J Neurooncol*. 2014 Feb;116(3):505–13.
115. Román-Pérez E, Casbas-Hernández P, Pirone JR, Rein J, Carey LA, Lubet RA, et al. Gene expression in extratumoral microenvironment predicts clinical outcome in breast cancer patients. *Breast Cancer Res BCR*. 2012;14(2):R51.
116. Lemée J-M, Com E, Clavreul A, Avril T, Quillien V, de Teyrac M, et al. Proteomic analysis of glioblastomas: what is the best brain control sample? *J Proteomics*. 2013 Jun 24;85:165–73.
117. Koppelkamm A, Vennemann B, Lutz-Bonengel S, Fracasso T, Vennemann M. RNA integrity in post-mortem samples: influencing parameters and implications on RT-qPCR assays. *Int J Legal Med*. 2011 Jul;125(4):573–80.

118. Sköld K, Svensson M, Norrman M, Sjögren B, Svenningsson P, Andrén PE. The significance of biochemical and molecular sample integrity in brain proteomics and peptidomics: stathmin 2-20 and peptides as sample quality indicators. *Proteomics*. 2007 Dec;7(24):4445–56.
119. Svendsen A, Verhoeff JJC, Immervoll H, Brøgger JC, Kmiecik J, Poli A, et al. Expression of the progenitor marker NG2/CSPG4 predicts poor survival and resistance to ionising radiation in glioblastoma. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2011 Oct;122(4):495–510.
120. Chekenya M, Enger PØ, Thorsen F, Tysnes BB, Al-Sarraj S, Read TA, et al. The glial precursor proteoglycan, NG2, is expressed on tumour neovasculature by vascular pericytes in human malignant brain tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2002 Oct;28(5):367–80.
121. Dahlrot RH, Hermansen SK, Hansen S, Kristensen BW. What is the clinical value of cancer stem cell markers in gliomas? *Int J Clin Exp Pathol*. 2013;6(3):334–48.
122. Hatanpaa KJ, Hu T, Vemireddy V, Foong C, Raisanen JM, Oliver D, et al. High expression of the stem cell marker nestin is an adverse prognostic factor in WHO grade II-III astrocytomas and oligoastrocytomas. *J Neurooncol*. 2014 Mar;117(1):183–9.
123. Kapoor S. Nestin and its emerging role in tumor progression and carcinogenesis in systemic tumors besides pancreatic carcinomas. *Med Mol Morphol*. 2013 Mar;46(1):56–7.
124. Wang P, Luo Y, Duan H, Xing S, Zhang J, Lu D, et al. MicroRNA 329 suppresses angiogenesis by targeting CD146. *Mol Cell Biol*. 2013 Sep;33(18):3689–99.
125. Akiyama M, Matsuda Y, Ishiwata T, Naito Z, Kawana S. Inhibition of the stem cell marker nestin reduces tumor growth and invasion of malignant melanoma. *J Invest Dermatol*. 2013 May;133(5):1384–7.
126. Huynh NT, Passirani C, Saulnier P, Benoit JP. Lipid nanocapsules: a new platform for nanomedicine. *Int J Pharm*. 2009 Sep 11;379(2):201–9.
127. Allard E, Huynh NT, Vessières A, Pigeon P, Jaouen G, Benoit J-P, et al. Dose effect activity of ferrocifen-loaded lipid nanocapsules on a 9L-glioma model. *Int J Pharm*. 2009 Sep 11;379(2):317–23.
128. Laine A-L, Huynh NT, Clavreul A, Balzeau J, Béjaud J, Vessieres A, et al. Brain tumour targeting strategies via coated ferrociphenol lipid nanocapsules. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Für Pharm Verfahrenstechnik EV*. 2012 Aug;81(3):690–3.
129. Vanpouille-Box C, Lacoeyille F, Belloche C, Lepareur N, Lemaire L, LeJeune J-J, et al. Tumor eradication in rat glioma and bypass of immunosuppressive barriers using internal radiation with (188)Re-lipid nanocapsules. *Biomaterials*. 2011 Oct;32(28):6781–90.
130. David S, Montier T, Carmoy N, Resnier P, Clavreul A, Mével M, et al. Treatment efficacy of DNA lipid nanocapsules and DNA multimodular systems after systemic administration in a human glioma model. *J Gene Med*. 2012 Dec;14(12):769–75.
131. Resnier P, David S, Lautram N, Delcroix GJ-R, Clavreul A, Benoit J-P, et al. EGFR siRNA lipid nanocapsules efficiently transfect glioma cells in vitro. *Int J Pharm*. 2013 Oct 1;454(2):748–55.
132. Griveau A, Bejaud J, Anthiya S, Avril S, Autret D, Garcion E. Silencing of miR-21 by locked nucleic acid-lipid nanocapsule complexes sensitize human glioblastoma cells to radiation-induced cell death. *Int J Pharm*. 2013 Oct 1;454(2):765–74.
133. Vinchon-Petit S, Jarnet D, Michalak S, Lewis A, Benoit J-P, Menei P. Local implantation of doxorubicin drug eluting beads in rat glioma. *Int J Pharm*. 2010 Dec 15;402(1-2):184–9.
134. Chekhonin VP, Baklaushev VP, Yusubalieva GM, Belorusova AE, Gulyaev MV, Tsitrin EB, et al. Targeted delivery of liposomal nanocontainers to the peritumoral zone of glioma by means of monoclonal antibodies against GFAP and the extracellular loop of Cx43. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med*. 2012 Jan;8(1):63–70.

135. Roger M, Clavreul A, Venier-Julienne M-C, Passirani C, Sindji L, Schiller P, et al. Mesenchymal stem cells as cellular vehicles for delivery of nanoparticles to brain tumors. *Biomaterials*. 2010 Nov;31(32):8393–401.
136. Roger M, Clavreul A, Venier-Julienne M-C, Passirani C, Montero-Menei C, Menei P. The potential of combinations of drug-loaded nanoparticle systems and adult stem cells for glioma therapy. *Biomaterials*. 2011 Mar;32(8):2106–16.
137. Roger M, Clavreul A, Sindji L, Chassevent A, Schiller PC, Montero-Menei CN, et al. In vitro and in vivo interactions between glioma and marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells. *Brain Res*. 2012 Sep 14;1473:193–203.
138. Roger M, Clavreul A, Huynh NT, Passirani C, Schiller P, Vessières A, et al. Ferrociphenol lipid nanocapsule delivery by mesenchymal stromal cells in brain tumor therapy. *Int J Pharm*. 2012 Feb 14;423(1):63–8.
139. Collamati F, Pepe A, Bellini F, Bocci V, Chiodi G, Cremonesi M, et al. Toward Radioguided Surgery with  $\beta$ -Decays: Uptake of a Somatostatin Analogue, DOTATOC, in Meningioma and High-Grade Glioma. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2014 Dec 11;
140. Assayag O, Grieve K, Devaux B, Harms F, Pallud J, Chretien F, et al. Imaging of non-tumorous and tumorous human brain tissues with full-field optical coherence tomography. *NeuroImage Clin*. 2013;2:549–57.
141. Sanai N, Snyder LA, Honea NJ, Coons SW, Eschbacher JM, Smith KA, et al. Intraoperative confocal microscopy in the visualization of 5-aminolevulinic acid fluorescence in low-grade gliomas. *J Neurosurg*. 2011 Oct;115(4):740–8.

# Table des matières

<b>Abréviations</b> .....	<b>6</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>8</b>
<b>1. Les glioblastomes</b> .....	<b>9</b>
1.1. Epidémiologie.....	9
1.2. Présentation clinique .....	9
1.3. Imagerie .....	10
1.4. Histologie.....	11
1.5. Biologie moléculaire .....	12
1.6. Prise en charge thérapeutique.....	14
1.6.1. Prise en charge chirurgicale .....	15
1.6.2. Thérapies adjuvantes .....	15
1.6.3. Prise en charge de la récurrence .....	17
<b>2. Le Projet Gliome Grand Ouest</b> .....	<b>18</b>
<b>3. Objectifs de la Thèse</b> .....	<b>22</b>
<b>Travail expérimental</b> .....	<b>23</b>
<b>1. Comparaison des résultats des analyses transcriptomiques et protéomiques du GB</b> .....	<b>24</b>
<b>2. Analyse protéomique de la zone péri-tumorale du GB</b> .....	<b>42</b>
2.1. Analyse du profil protéomique de la ZMN des GB.....	42
2.2. Etude de la CRYAB.....	45
2.2.1. Validation de la surexpression de la CRYAB dans la ZMN de GB.....	45
2.2.2. Analyse de l'expression plasmatique de la CRYAB chez des patients opérés d'un GB.....	46
2.2.3. Relation entre le statut de la CRYAB et la réponse de l'avastin/irinotécan en seconde ligne de traitement d'un GB ..	47
<b>3. Analyse multimodale de la zone péri-tumorale des glioblastomes</b> .....	<b>49</b>
<b>4. Développement de nouvelles modalités d'analyse per-opératoire de la ZMN des GB</b> .....	<b>55</b>
4.1. La microscopie biphotonique .....	56
4.2. Développement d'une nouvelle technique de biopsie optique permettant l'analyse per-opératoire du cerveau en Neurochirurgie .....	58
<b>Revue de la littérature</b> .....	<b>60</b>
<b>Discussion générale, Perspectives, Conclusion</b> .....	<b>79</b>
<b>1. Caractéristiques de la ZMN des GB</b> .....	<b>80</b>
<b>2. Identification et validation de marqueurs spécifiques de la ZMN</b> .....	<b>85</b>
<b>3. Développement de nouvelles modalités d'analyses de la ZMN</b> .....	<b>86</b>



4. Conclusion.....	87
5. Bilan personnel .....	88
<b>Publications et communications présentées au cours de la Thèse.....</b>	<b>90</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>93</b>
<b>Table des matières.....</b>	<b>102</b>
<b>Table des illustrations .....</b>	<b>104</b>
<b>Table des tableaux .....</b>	<b>105</b>

# Table des illustrations

<b>Figure 1 : Incidence des GB en fonction de l'âge et du sexe. Données extraites du registre des tumeurs cérébrales de Gironde .....</b>	<b>9</b>
<b>Figure 2 : Aspect IRM d'un GB .....</b>	<b>10</b>
<b>Figure 3 : Illustration d'un astrocyte et de l'aspect d'une coupe histologique de GB .....</b>	<b>11</b>
<b>Figure 4 : Illustration du protocole de radio-chimiothérapie validé par R. Stupp .....</b>	<b>15</b>
<b>Figure 5: Illustration de la nouvelle proposition de classification moléculaire des tumeurs gliales ainsi que de ses potentielles implications au niveau du choix des thérapeutiques .....</b>	<b>17</b>
<b>Figure 6 : Illustration des différentes zones de prélèvement pour l'étude de l'hétérogénéité intratumorale des GB dans le cadre du PGGO .....</b>	<b>19</b>
<b>Figure 7 : Résumé de l'analyse des données de protéomique issues du PGGO .....</b>	<b>20</b>
<b>Figure 8 : Résumé de l'analyse des données de génomique et de transcriptomique.....</b>	<b>21</b>
<b>Figure 9: Résumé de l'analyse des données de cultures cellulaires.....</b>	<b>21</b>
<b>Figure 10 : Résumé de la méthodologie utilisée dans cette étude.....</b>	<b>24</b>
<b>Figure 11: Résumé de la méthodologie utilisée pour l'analyse protéomique dans cet article .....</b>	<b>42</b>
<b>Figure 12 : Analyse de l'expression de la CRYAB par immunohistochimie sur un tissu contrôle et 3 ZMN de GB .....</b>	<b>45</b>
<b>Figure 13 : Validation en Western Blot de la surexpression de la CRYAB dans la ZMN des GB et les GASC.....</b>	<b>46</b>
<b>Figure 14 : Coupes illustratives de l'analyse de l'expression de la CRYAB par immunofluorescence dans des échantillons de ZMN .....</b>	<b>47</b>
<b>Figure 15 : Présentation des différentes modalités d'analyses de la ZMN des GB.....</b>	<b>49</b>
<b>Figure 16 : Exemple de chirurgie assistée par fluorescence permettant une bonne visualisation de la tumeur .....</b>	<b>55</b>
<b>Figure 17 : Illustration du principe de l'imagerie de second harmonique.....</b>	<b>56</b>
<b>Figure 18 : Illustration des résultats obtenus en microscopie biphotonique en imagerie de second harmonique et en fluorescence à 2 photons en fonction de l'histologie des différents échantillons tumoraux .....</b>	<b>57</b>
<b>Figure 19 : Illustration du processus d'automatisation des acquisitions en microscopie biphotonique permettant l'acquisition d'une image de plus grande taille.....</b>	<b>58</b>
<b>Figure 20 : Résumé de l'analyse génomique de la ZMN des GB. ....</b>	<b>82</b>
<b>Figure 21 : Résumé des données de l'analyse de la ZMN en cytométrie de flux.....</b>	<b>82</b>
<b>Figure 22 : Exemples de primocultures de ZT et de leur ZMN correspondante. ....</b>	<b>83</b>
<b>Figure 23 : Bilan de l'analyse protéomique de la ZMN des GB .....</b>	<b>84</b>
<b>Figure 24 : Illustration des possibilités de ciblage de la ZMN des GB .....</b>	<b>86</b>

# Table des tableaux

<b>Tableau 1 : Correspondance entre score OMS et IK pour l'évaluation de l'état clinique des patients</b>	<b>14</b>
<b>Tableau 2 : Evaluation de la réponse au traitement des patients porteurs d'un GB selon les critères RANO.</b>	<b>18</b>
<b>Tableau 3 : Comparaison du niveau d'expression de la CRYAB dans la tumeur (en IHC) et dans le plasma (par ELISA)</b>	<b>46</b>
<b>Tableau 4 : Données radio-clinique d'un échantillon de patients suivis pour un GB à Angers, et traités par avastin/irinotécan en seconde ligne après un Stupp</b>	<b>47</b>

# ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné(e) Jean-Michel Lemée  
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une  
partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet,  
constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.  
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées  
pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiant(e) le **11 / 01 / 2015**

**Cet engagement de non plagiat doit être signé et joint  
à tous les rapports, dossiers, mémoires.**

Présidence de l'université  
40 rue de rennes - BP 73532  
49035 Angers cedex  
Tél. 02 41 96 23 23 | Fax 02 41 96 23 00

# Thèse de Doctorat

Jean-Michel LEMÉE

## Au-delà des frontières du glioblastome : caractérisation de la zone péri-tumorale des glioblastomes

Beyond the frontiers of glioblastoma: multidisciplinary characterisation of glioblastoma's peritumoral brain zone

### Résumé

Le glioblastome (GB) est une tumeur hétérogène, agressive devant laquelle les possibilités thérapeutiques disponibles restent limitées. L'étude de la zone péri-tumorale macroscopiquement normale (ZMN) des GB est essentielle à la compréhension de ses mécanismes de progression et de récurrence.

Le premier objectif de ce travail de Thèse a été de comparer les données de transcriptomique et de protéomique issues de l'analyse de la zone tumorale des GB dans le cadre du Projet Gliome Grand Ouest. Le taux de concordance entre les 2 modalités est faible, retrouvant toutefois comme point commun une dysrégulation de la protéine légère des neurofilaments qui pourrait servir de biomarqueur potentiel des GB.

Le deuxième objectif de ce travail de Thèse a été la caractérisation de la ZMN des GB. Nous avons mis en évidence que cette zone, dont l'aspect est similaire à première vue à celui du tissu cérébral sain, n'est pas une simple zone de transition entre le GB et le tissu cérébral sain. En effet, la ZMN est une entité spécifique possédant des caractéristiques qui lui sont propres, comme la présence d'un phénotype particulier de cellules tumorales infiltrantes et de cellules stromales et une sur-expression des protéines CRYAB et H3F3A.

Ce travail de Thèse a aussi été l'occasion de développer de nouvelles techniques d'imagerie per-opératoire de la ZMN, afin d'évaluer la présence d'un contingent tumoral et ainsi optimiser la qualité de la résection chirurgicale.

La caractérisation de cette ZMN nous permet de mieux appréhender son implication dans la tumorigenèse et la présence de caractéristiques spécifiques de cette zone ouvre la porte à la détection de biomarqueurs spécifiques, ainsi qu'au développement de thérapies ciblées.

Ce travail de Thèse a été valorisé par 2 publications, 2 articles soumis et un brevet est en cours de dépôt et d'évaluation par un cabinet de brevet.

### Mots clés

Glioblastome, zone péri-tumorale, génomique, transcriptomique, protéomique, cultures cellulaires, CRYAB, microscopie biphotonique

### Abstract

Glioblastoma (GB) is a heterogeneous and aggressive tumor, before which therapeutic options are limited. The study of the macroscopically normal peritumoral brain zone (PBZ) of GB is essential to understand its mechanisms of progression and recurrence.

The first objective of this thesis work was to compare the transcriptomic and proteomic data from the GB tumor area obtained through the "Grand Ouest" glioma Project. The concordance rate between the 2 modalities is low. However, one of the common feature is the dysregulation of neurofilament light polypeptide, which could serve as a biomarker potential of GB.

The second objective of this thesis was the characterization of the PBZ. We have shown that this area, similar at first glance to that of healthy brain tissue, is not a simple transition area between the GB and healthy brain tissue but a specific entity with characteristics of its own. For example, the ZMN presents a particular phenotype of infiltrating GB cells and stromal cells and a surexpression of CRYAB and H3F3A proteins.

This thesis work was also an opportunity to develop new intraoperative imaging techniques of the PBZ, with the aim to assess the presence of a tumoral infiltration and optimize the quality of the surgical resection.

The characterization of this PBZ allows us to better understand its involvement in tumorigenesis and the presence of specific characteristics of this area opens the door for the detection of specific biomarkers and the development of targeted therapies.

This thesis work was led to 2 publications, 2 articles submitted and a patent being evaluated and redacted by a patent office.

### Keywords

Glioblastoma, peritumoral brain zone, genomics, transcriptomics, proteomics, cell cultures, CRYAB, two-photon microscopy