

RESUME EN FRANÇAIS

CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET DEFINITIONS

Les gliomes de bas-grade représentent la tumeur cérébrale la plus fréquente chez l'enfant. Leur définition actuelle est basée sur l'aspect morphologique des tumeurs. Elles sont caractérisées par un très large spectre de sous-types tumoraux, très hétérogènes tant cliniquement que radiologiquement.

Leur définition actuelle est principalement basée sur des critères histologiques, en fonction de la prédominance et de l'architecture des sous-types cellulaires décrits dans la tumeur. Il existe deux principales classifications histologiques couramment utilisées ; la première est définie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et la seconde est celle définie par la classification de Sainte-Anne, plus fréquemment utilisée en France. Elles sont dites de bas-grade car elles correspondent à un grade I ou II selon la classification OMS. Ces classifications ont l'avantage de répertorier les multiples tumeurs en différentes catégories afin d'harmoniser leur appellation à travers le monde. Leur principale limite est qu'elles se basent uniquement sur l'architecture cellulaire au microscope. Ces classifications souffrent ainsi d'un manque de consensualisme et de précision due à la variabilité interindividuelle lors de l'appellation d'une tumeur dans une certaine catégorie.

Les astrocytomes pilocytiques (PA) sont les gliomes de bas-grade les plus fréquents chez l'enfant. Dans la majorité des cas, les PA sont aisément diagnostiqués car leur

architecture tumorale est relativement typique et caractérisée par une la présence de fibres de Rosenthal, d'une prolifération vasculaire et de corps éosinophiles fréquemment localisés en bordure des régions kystiques qui sont caractéristiques de ces tumeurs. Elles sont caractérisées par une expression constante de Glial Fibrillary Acid Protein (GFAP) en immunohistochimie. Elles expriment également typiquement le marqueur de différenciation OLIG2 et la myelin basic protein (MBP).

Les gangliogliomes (GG) sont également des gliomes de grade I et se caractérisent typiquement par une prolifération de neurones binuclés, d'une inflammation périvasculaire, de calcifications et de kystes.

Les tumeurs neuroépithéliales dysembryoplastiques (DNT) et les gliomes angiocentriques (AG ou ANET) sont des tumeurs de grade I qui ont été récemment décrites et reconnues comme entité histologique à part. Les DNT se caractérisent par des cellules apparentées aux oligodendrocytes, GFAP négatives associées à des neurones immergés dans un environnement éosinophile. Les AGs décrits initialement par Lellouch-Tubiana et al. sont composés d'astrocytomes fusiformes et bipolaires fixant la GFAP se disposant classiquement en palissade autour des structures vasculaires.

Les gliomes de grade II selon l'OMS sont définis essentiellement par les astrocytomes diffus (DA), les astrocytomes pilomixoides (PMA), les xanthoastrocytomes pleomorphique (PXA) et les tumeurs oligodendrogiales (OD).

Globalement, l'index de prolifération cellulaire MIB est faible avec moins de 10%.

Sur le plan clinique, les gliomes de bas-grade ont un comportement tumoral intrigant. Leur croissance tumorale est lentement progressive, marquée par des phases de croissance puis de « quiescence » probable. Leur traitement actuel est principalement

basé sur la chirurgie et la chimiothérapie. La radiothérapie tend à être moins utilisée compte tenu des complications à long terme. Malgré une excellente survie globale dans la population pédiatrique, ces tumeurs rechutent ou progressent fréquemment et sont responsables d'une comorbidité importante liée aux différents traitements utilisés. Malgré un manque de preuve formelle sur le plan scientifique, ces tumeurs ont une tendance à entrer dans une phase de quiescence définitive lors de la transition à l'âge adulte, expliquant ainsi leur excellente survie globale. Les raisons physiopathologiques à l'origine de ce phénomène d'arrêt de croissance tumorale demeurent inconnues et interpellent les scientifiques.

Les progrès récents de la biologie moléculaire et de la génomique, avec l'expansion des techniques de séquençage à haut débit et le développement de plateformes permettant l'exploration à haute résolution du génome tumoral ont permis d'approfondir la biologie de nombreux types de cancers. Dans les gliomes de bas-grade de l'enfant, ces techniques modernes nous permettent premièrement d'approfondir considérablement les connaissances sur la biologie de ces tumeurs afin d'enrichir et compléter leur classification morphologique actuelle. Elles permettent également d'appréhender des questions plus fondamentales comme celle du type cellulaire initial à l'origine de ces tumeurs multiples et des voies de différenciation cellulaires responsables du développement puis du ralentissement de la croissance tumorale.

CHAPITRE 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE

Dans le premier chapitre, ce travail résume de façon détaillée les connaissances actuelles sur la prise en charge clinique de ces tumeurs. Il décrit ensuite toutes les différentes technologies d'exploration de l'ADN tumoral (détection des altérations de nombre, des mutations ponctuelles, des insertions, délétions, réarrangements chromosomiques) et de l'ARN tumoral (étude du transcriptome par méthodes array ou par séquençage direct de l'ARN tumoral) ainsi que les outils bioinformatiques actuellement disponibles pour exploiter l'ensemble de ces ressources.

Sur la base d'une revue de la bibliographie, ce travail décrit l'ensemble des altérations génétiques qui ont été récemment découvertes grâce aux progrès des techniques de séquençage à haut débit.

Sur le plan génétique, plusieurs facteurs influencent la probabilité de découvrir de nouvelles altérations potentiellement oncogéniques. La fréquence des mutations au sein d'un sous-type tumoral, le taux de mutation somatique tumoral, et surtout le nombre de tumeurs utilisées sont importants. L'importance de la cohorte de tumeurs étudiée est donc un aspect primordial. Compte tenu de leur faible prévalence à travers le monde, l'accessibilité à un grand nombre de gliomes de bas-grade pédiatriques représente un obstacle important dans les études de séquençage du génome. Par conséquent, les collaborations et le partage des résultats sont nécessaires afin d'augmenter la cohorte des tumeurs et de bénéficier de conditions optimales pour découvrir de nouvelles altérations génétiques à l'origine de ces tumeurs.

Ce travail bénéficie directement de cet effort de collecter un maximum de tissu et d'information sur le séquençage tumoral afin de réaliser une analyse approfondie des altérations génomiques de l'ADN et l'ARN des gliomes de bas-grade pédiatriques.

CHAPITRE 2 : ETUDE DES ALTERATIONS DE L'ADN

Dans le deuxième chapitre, notre travail se base sur la description des altérations de l'ADN des gliomes de bas-grade de l'enfant à partir des données de séquençage à haut débit récemment publiées par des équipes de chercheurs aux USA (Washington University et St-Jude Hospital, Tennessee) et en Europe (DKFZ, Heidelberg) ainsi que des tumeurs nouvellement séquencées au Dana-Farber Cancer Institute et au Children's Hospital of Philadelphia et des tumeurs originaires de l'Hôpital Necker à Paris. Nous avons analysé au total le génome de 169 gliomes de bas-grade de l'enfant, comprenant 138 whole genome sequencing (WGS) et 53 RNA-sequencing (parmi lesquelles 22 tumeurs ont également bénéficié de whole exome sequencing (WES)).

Le taux médian de mutation dans les régions exoniques était de 1.02×10^{-5} mutations /base. Nous avons pu confirmer que les mutations du gène *BRAF* sont les plus fréquentes. 98 tumeurs (57%) présentent un des 7 différents isoformes de duplication de *BRAF*. 12 tumeurs présentent une mutation *BRAF* (V600E, insertion p.599 599T>TT, insertion VLR à la position 506 et une mutation ponctuelle p.E451D). Les altérations du gène *FGFR1* ont été retrouvées dans 12 tumeurs (5 tumeurs avec une mutation faux-sens, 4 duplications dans la région exonique du gène et 3 duplication-inversions entre *FGFR1* et *TACC1*). Nous avons également identifié un réarrangement chromosomique entre *FGFR3* et *TACC4* dans un PA. Les réarrangements du gène codant pour le récepteur à la Tyrosine kinase *NTRK2* ont été retrouvés dans 4 tumeurs. Deux de ces tumeurs présentent un réarrangement identique entre l'exon 15 du gène *NTRK2* et

l'exon 6 de *QKI*. Nous avons également identifié un réarrangement entre *NTRK3* et *NAV6* dans une tumeur PXA analysée par RNA-sequencing.

NF1 était muté dans 5 tumeurs.

Nous avons observé des mutations dans les gènes codant pour les histones (*H3F3A* et *HIST1H3B*) dans 5 tumeurs. 80% de ces mutations ont également été décrites dans les gliomes de haut-grade pédiatriques.

Notre travail présente pour la première fois un réarrangement chromosomique prédominant de façon quasi exclusive dans les AGs. Parmi les 6 AGs analysés dans notre cohorte, nous avons découvert que 5 présentaient une translocation entre le gène *MYB* et *QKI*. Au total nous avons décrit 4 différents types de réarrangements entre *MYB* et *QKI*, résultant tous en une perte de l'extrémité 3' end de *MYB* et 5' de *QKI*. Deux de ces tumeurs ont pu être analysées par WGS ayant permis d'identifier de façon précise la cartographie des cassures chromosomiques. Dans la première tumeur, la cassure chromosomique se situe entre l'exon 9 et 10 de *MYB* et entre l'exon 4 et 5 de *QKI*. La seconde tumeur décrit un réarrangement complexe entre le gène *EYA4*, *MYB* et *QKI* résultant à la perte du dernier exon de *MYB* accolé aux exons 5-7 de *QKI*. Les quatre premiers exons de *QKI* sont accolés aux 11 premiers exons de *EYA4*. De façon intéressante, *MYB* (activateur transcriptionnel) et *QKI* (protéine se liant à l'ARN) ont été décrits dans d'autres études génétiques comme potentiels oncogène et gène suppresseur de tumeur, respectivement.

Des études complémentaires dans divers modèles *in vitro* and *in vivo* réalisées principalement par Bandopahhayay et Ramkisson, deux collaboratrices dans le laboratoire, ont permis d'appréhender les répercussions fonctionnelles de ce

réarrangement particulier. Elles ont pu décrire que le réarrangement entre *MYB* et *QKI* entraînait entre autre trois potentiels mécanismes à l'origine des mécanismes d'oncogénèse ; la création d'une protéine oncogénique MYB-QKI, l'augmentation de l'expression de MYB en partie lié à la translocation des enhancers présents à l'extrémité 3' de *QKI* proches des domaines de transactivation de *MYB* et enfin par une perte hétérozygote de *QKI*.

CHAPITRE 3 : ETUDE DES ALTERATIONS DE L'ARN DANS LE BULK TUMORAL

Dans le troisième chapitre, ce travail décrit les résultats d'analyses des profils d'expression génétiques de 151 gliomes de bas grade pédiatriques extraits à partir de tissu conservé en paraffine. Les tumeurs pédiatriques sélectionnées reflètent en partie l'hétérogénéité clinique et génétique avec une bonne représentativité des différents sous-types histologiques. Nous avons pu analyser le profil d'expression de 6100 gènes de 76 PAs, 17 GGs, 11 DAs, 12 DNTs, 2 ODs et 33 tumeurs NOS (histologie indifférenciée). 48% de ces tumeurs étaient localisées dans des régions supratentorielles (cortex cérébral, région hypothalamo-chiasmatiques) et 52% provenaient de la fosse postérieure. Nous avons également pu déterminer le statut *BRAF* (91% pour la duplication *BRAF-KIAA1549* et 62% pour la mutation V600E) des tumeurs. Nous disposons également d'une répartition homogène des âges au sein de la population pédiatrique avec 13 tumeurs développées dans la petite enfance (entre 0 et 18 mois), 89 tumeurs dans l'enfance (entre 19 mois et 11 ans) et 49 tumeurs dans l'adolescence (entre 12 et 19 ans). Nous avons pu mettre en évidence des différences

moléculaires en fonction de leur sous-type histologique, de la localisation tumorale et de leur statut *BRAF*.

Grâce aux différentes techniques de clustering non supervisées, nous avons identifié que les 151 gliomes de bas-grade pédiatriques se distribuèrent majoritairement en 3 groupes moléculaires. Le premier cluster moléculaire était significativement composé de DA et DNT et d'autres tumeurs supratentorielles. Ce cluster était enrichi avec des tumeurs portant la mutation V600E. Le deuxième cluster était significativement enrichi de PAs développés dans la fosse postérieure comportant la duplication *BRAF-KIAA1549*. Le troisième cluster, groupe mixte, se composait majoritairement de PA, GG et NOS provenant des régions supra ou infratentorielles. L'étude de la survie sans événement des patients portant ces tumeurs n'a pas permis d'identifier de différence significative en fonction des trois clusters moléculaires.

En comparant les profils d'expression des différents sous-types histologiques, nous avons observé que certains sous-types histologiques divergeaient, comme les PA des DA ou les PA des DNT, alors que d'autres sous-types ne présentaient pas de différences moléculaires significatives, comme les PA et les GG.

Nous avons également observé que les tumeurs développées dans les régions supratentorielles divergeaient clairement des tumeurs naissant dans la fosse postérieure. De façon complémentaire, nous avons pu démontrer que les PAs développés dans les régions corticales surexprimaient notamment un grand nombre de gènes impliqués dans les voies de signalisation de l'inflammation, par rapport aux PAs

de la fosse postérieure. Ces résultats suggèrent que selon la localisation tumorale, les patterns d'activation moléculaires divergent au sein d'une même entité histologique.

Nous avons également observé certaines différences moléculaires entre les tumeurs primitives et les tumeurs lors de la rechute ainsi qu'entre les tumeurs *BRAF* V600E mutées et *BRAF-KIAA1549* dupliquées.

Enfin, nous n'avons pas observé de différences moléculaires significatives entre les tumeurs développées dans la petite enfance avec celles diagnostiquées dans l'enfance ou l'adolescence. De façon opposée, en comparant le profil d'expression génétique de 20 gliomes de bas-grade de l'adulte nous avons observé que celles-ci divergent de façon importante avec celles développées chez l'enfant.

CHAPITRE 4 : ETUDE DES ALTERATIONS DE L'ARN A L'ECHELLE D'UNE CELLULE UNIQUE

Un des obstacles de l'analyse du transcriptome en cancérologie est la contamination des cellules tumorales par du tissu conjonctif normal. Dans le dernier volet de ce travail, nous avons pu tester la faisabilité d'isoler successivement par cytométrie en flux des cellules uniques issues de la dissociation tumorale provenant d'une exérèse chirurgicale récente. Afin de distinguer deux sous-types de population cellulaire au sein de la tumeur dissociée, nous avons initialement testé le taux d'expression dans les tumeurs fraîchement dissociées de plusieurs marqueurs membranaires de différenciation neuro-gliale, comme N-CAM, A2B5, GLAST, O4, FGFR1. Après avoir optimisé les contrôles

positifs et négatifs pour ces anticorps membranaires, nous avons privilégié l'utilisation de l'anticorps A2B5 qui nous semblait le plus robuste. Nous avons pu ensuite dissocier trois PAs et trier à l'échelle de la cellule unique des populations de cellules A2B5 positives et négatives.

En parallèle, nous avons bénéficié de l'expertise technologique du Broad Institute qui nous a permis d'optimiser les étapes d'extraction d'ARN, de génération de cDNA suivi d'amplification du cDNA et de la préparation des bibliothèques en vue d'une analyse transcriptomique à haut-débit de l'ARN d'une cellule unique A2B5 positive et négative. Notre hypothèse de travail était que ces deux sous-populations cellulaires exprimaient des profils différents. Nous souhaitons ensuite étudier leur degré d'hétérogénéité au sein de chaque population cellulaire (A2B5 positives ou négatives) et entre ces deux sous-populations.

L'analyse des données de RNA-sequencing des cellules A2B5 positives et négatives issues des trois PAs nous a permis de confirmer notre hypothèse que ces deux sous-populations cellulaires divergeaient significativement. Nous avons pu décrire de façon exhaustive les gènes et voies de signalisations divergentes entre ces deux sous-populations dans les trois PAs analysés.

Nous avons observé que le degré d'hétérogénéité semblait plus important pour la population cellulaire A2B5 négative et que les voies de signalisation de l'inflammation prédominaient fréquemment dans ces cellules, en comparaison avec celles exprimant

A2B5. Des études complémentaires de validation sont nécessaires pour consolider ces premiers résultats.

De façon complémentaire, il serait nécessaire d'identifier parmi les cellules uniques étudiées celles qui revêtent les altérations génétiques de BRAF afin d'observer si celles-ci sont majoritairement caractérisées par l'expression membranaire de A2B5. Ces résultats pourront fortement suggérer que les cellules exprimant le marqueur de différenciation A2B5 représentent la fraction de cellules cancéreuses responsable de la croissance et du développement tumoral.

Ces premiers résultats soulignent l'intérêt d'exploiter des nouvelles technologies de pointe pour servir de base à l'étude des caractéristiques biologiques des cellules tumorales ouvrant de nouvelles perspectives sur la compréhension fine des mécanismes moléculaires à l'origine des tumeurs.