

AIX-MARSEILLE UNIVERSITE
FACULTE DE MÉDECINE DE MARSEILLE
Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

T H È S E

Présentée et publiquement soutenue devant
LA FACULTE DE MEDECINE DE MARSEILLE

Le 19 décembre 2013

par **Mme MERCURIO SANDY**

Née le 21 août 1987 à La Seyne/mer

Titre de la thèse :

**Mise en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques
dans les tumeurs gliales et glioneuronales de l'enfant**

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de L'UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE

Spécialité : Immunologie

Thèse dirigée par le Pr. Dominique Figarella-Branger
INSERM UMR911– CRO2

« *Angiogenèse, invasivité et micro-environnement tumoral* »

Membres du Jury de la Thèse :

Mme le Pr. Dominique FIGARELLA-BRANGER
Mme le Pr. Catherine GODFRAIND
Mme le Pr. Emmanuelle URO-COSTE
Mr le Dr Nicolas ANDRE
Mme le Dr Manon CARRE
Mme le Dr Céline CHAPPE

Directrice de thèse
Présidente/Rapporteur externe
Rapporteur externe
Examinateur
Examinatrice
Examinatrice

Remerciements

*Je tiens tout d'abord à adresser mes sincères remerciements au **Pr Catherine Godfraind** et au **Pr Emmanuelle Uro-Coste** pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Merci d'avoir pris le temps d'examiner et de juger ce manuscrit.*

*Je tiens sincèrement à remercier ma directrice de thèse, le **Pr Dominique Figarella-Branger**, de m'avoir accueillie dans son laboratoire pendant 3 ans. Je vous remercie infiniment de m'avoir fait confiance pour réaliser ce projet de thèse et de m'avoir permis d'établir plusieurs collaborations. J'ai apprécié vos bons conseils et les moments que vous m'avez consacrés pour diriger cette thèse. J'ai été extrêmement sensible à votre écoute et votre attention tout au long de ce travail.*

Au Dr Nicolas André,

Merci d'avoir accepté d'examiner cette thèse. J'ai beaucoup apprécié votre disponibilité lorsque j'ai eu besoin de vos lumières et de votre savoir d'oncologue pédiatrique au cours de ces travaux. Merci pour votre implication dans ces projets.

Au Dr Manon Carré,

Merci également d'avoir étudié le contenu de cette thèse. Je tenais à vous dire que je serai toujours reconnaissante de votre implication dans mes travaux de thèse. Vous avez toujours pu vous rendre disponible et me donner de précieux conseils. Encore merci pour tout !

Au Dr Céline Chappé,

Je te remercie d'avoir examiné cette thèse. Je suis très heureuse de t'avoir rencontré ces dernières années. Tu as de nombreuses qualités et je te remercie pour ta gentillesse et tes conseils si précieux. Merci pour tout ce que tu m'as apporté autant professionnellement que personnellement.

A Carole,

Je te remercie d'avoir encadré mon travail et d'avoir été là pour moi durant cette thèse. Cela a été un grand plaisir de travailler avec toi. Merci pour ta grande disponibilité, tous tes conseils, ton écoute et surtout ta patience !

A Nathalie,

Merci pour tout ce que tu m'as appris durant ces 3 ans. Cela a été très agréable de travailler au quotidien auprès de toi. Tu as toujours été disponible et à mon écoute pour me donner de très bons conseils.

A Émilie,

Alalala ! Que serait cette thèse sans toi Emilou ! Ces moments de rigolades et de fous rires resteront de super bons souvenirs. On s'est soutenues pendant tous les moments difficiles de ces années de thèse. Tu as été ma grande complice et toujours là pour m'encourager. Tu es une fille super !

A Aurélie,

J'ai été contente de faire ta connaissance et te remercie de tous tes bons conseils qui ont pu m'aider pour cette thèse. Merci pour ta bonne humeur!

A Carine,

Merci pour ton aide, ta disponibilité et tes précieuses recommandations durant ma thèse. Tu es quelqu'un de surprenante et tu m'as toujours étonnée pour toutes tes activités hors du commun ! A quand un tour en ULM ?!

A Fred,

Merci pour tes nombreux conseils. Ton aide au cours de cette thèse m'a été très précieuse. Tu es l'as des manips!!

A Dominique, DI,

Tu es une personne formidable, d'une incroyable gentillesse et toujours pleine d'énergie. Encore merci pour toutes ces bonnes choses que tu nous as cuisinées !

A Guylaine et Lenaïg,

Alias "nos supers secrétaires" !! Merci pour votre bonne humeur et toute votre énergie ! Je garderai en mémoire de très bonnes rigolades auprès de vous. Vous êtes irremplaçables !

A Emeline,

Tu es une personne toujours pleine de motivation et d'énergie. Cela a été un grand plaisir de faire ta connaissance ces dernières années.

A Doriane,

Merci pour ta sympathie et toutes ces heures à s'encourager dans la salle de culture pour se motiver !

A Célia,

Je te remercie pour ta bonne humeur toujours au rendez-vous et bien sûr pour ton écoute. Tu as toujours été là pour me motiver et me soutenir. Que la force des jonquilles soit avec toi !

A Ikbale,

Je te remercie pour ta bonne humeur, tes conseils et toute ton énergie pendant les moments où tu étais au labo.

A Victor,

Merci pour ta sympathie et d'avoir toujours été disponible pour m'aider à descendre, monter et brancher toutes ces bouteilles d'azote et toujours avec le sourire !

A Sylvie Mathieu,

Vous avez été l'une des premières personnes avec qui j'ai pu travailler au début de ma thèse. Votre aide m'a été très précieuse et je vous en remercie.

A l'Houcine, Corinne, Caroline, Nadège, Christine, Françoise, Yolande, Philippe, Mylène, Véronique, Assou, Sébastien Salas, Asma, Zora, Romain, Safa, Quy, Jean-Camille, Clémence,

Merci pour toute la sympathie que vous m'avez témoignée au cours de cette thèse.

Au Dr Laëtitia Padovani,

J'ai beaucoup apprécié de travailler avec vous. Merci pour votre implication dans ces projets.

Au Dr Philippe Metellus,

Cela a été un honneur pour moi de collaborer avec vous durant ma thèse. Je vous remercie pour votre disponibilité et votre implication dans mes projets de thèse.

Dr Didier Scavarda,

Je vous remercie pour tous les prélèvements que vous avez effectués pour ces projets.

A Sout, Dr Carla Fernandez, Agnès, Mireille, Françoise,

Merci d'avoir été si agréables et si serviables chaque fois que je vous ai demandé votre aide.

A Charles Prévot,

Merci de votre aide pour les analyses en cytométrie de flux de mes travaux de thèse et du temps que vous m'avez consacré.

A José Adelaïde,

Merci d'avoir été disponible toutes les fois où j'en ai eu besoin. Merci de ton aide pour ces travaux notamment pour les extractions d'ADN et pour les CGH array.

A Anderson Loundou,

Je vous remercie de votre aide pour les analyses statistiques de ces projets.

A Pascal Weber,

Merci d'avoir été disponible toutes les fois où j'ai eu besoin de toi. Merci de m'avoir fait partager ton savoir sur la microscopie !

A l'ARTC Sud,

Un grand merci, particulièrement à Mme David, d'avoir été présente pour le début de ma thèse. Je suis très admirative pour tout ce que vous faites pour la recherche.

*Enfin, je souhaite remercier **ma famille** pour leur soutien permanent.*

A mes parents,

Je vous remercie du fond du cœur pour tout ce que vous avez fait pour moi depuis toujours. Vous êtes des parents exceptionnels et vous m'avez toujours poussé pour aller le plus haut possible. Cette thèse, je vous la dois, car c'est sans aucun doute la vôtre aussi.

A mes sœurs,

Merci pour tous vos précieux conseils et merci d'être là à chaque fois que j'en ai besoin. Vous êtes et serez toujours mes exemples.

A mon mari, ma moitié,

Bien évidemment je tiens à remercier mon mari qui m'épaule depuis maintenant 6 ans. Merci pour tout ce que tu as fait pour moi depuis toutes ces années et de m'avoir encouragé et soutenu tout au long de cette thèse! Tu as été à mon écoute et toujours là à chaque instant. Je te dois énormément !

*Merci également à **mes deux merveilleuses nièces, mon adorable neveu et mes beaux-frères** qui sont toujours là pour me soutenir !*

Encore un grand merci à tous pour m'avoir conduit à ce jour mémorable !!

TABLE DES MATIERES

Table des matières

Table des illustrations.....	12
-------------------------------------	-----------

Liste des abréviations	15
-------------------------------------	-----------

PARTIE I : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Les gliomes	20
---------------------------------------	-----------

I. Définition et classification des gliomes.....	20
---	-----------

II. Épidémiologie	20
--------------------------------	-----------

III. Histologie et imagerie des tumeurs gliales et glioneurales de l'adulte	22
--	-----------

A. Les tumeurs gliales de grade II et III	22
--	-----------

1. L'astrocytome de grade II et III.....	22
---	-----------

2. L'oligodendrogliome de grade II et III	22
--	-----------

3. L'oligoastrocytome de grade II et III.....	23
--	-----------

B. Le glioblastome : grade IV	23
--	-----------

IV. Histologie, imagerie et thérapeutique des tumeurs gliales et glioneurales de l'enfant et du jeune adulte.....	25
--	-----------

A. Tumeurs circonscrites.....	25
--------------------------------------	-----------

1. L'astrocytome pilocytique (AP) classique.....	25
---	-----------

2. L'astrocytome pilomyxoïde	27
---	-----------

3. Le gangliogliome (GG)	28
---------------------------------------	-----------

4. Les tumeurs neuroépithéliales dysembryoplasiques (DNT).....	28
---	-----------

5. Le xanthoastrocytome pleiomorphe (PXA)	29
--	-----------

B. Tumeurs infiltrantes.....	30
-------------------------------------	-----------

1. Le gliome diffus du tronc cérébral.....	30
---	-----------

2. Le gliome du thalamus	30
---------------------------------------	-----------

3. Le glioblastome.....	30
--------------------------------	-----------

Chapitre 2. Principales altérations moléculaires des tumeurs gliales et glioneurales de l'enfant.....	34
--	-----------

I. Les astrocytomes pilocytiques (AP)	34
--	-----------

A.	La voie de signalisation des MAPKinases : fonctions et mécanismes	34
1.	Fonctions de la voie MAPKinase.....	34
2.	Mécanismes de la voie RAS/RAF/MEK/ERK.....	34
B.	Mutation du gène <i>NFI</i>	36
C.	Altérations de la protéine BRAF	38
1.	Fusion KIAA1549: BRAF	39
2.	Mutation BRAF ^{V600E}	41
D.	Autres aberrations génomiques	42
II.	Les xanthoastrocytomes pleïomorphes (PXA)	43
A.	Mutation BRAF ^{V600E} et délétion de <i>p16/CDKN2A</i>	43
B.	Autres aberrations génomiques	44
III.	Les gangliogliomes (GG)	44
A.	Mutation BRAF ^{V600E} et délétion de <i>CDKN2A</i>	44
B.	Autres aberrations moléculaires	44
IV.	Les tumeurs neuroépithéliales dysembryoplasiques (DNT)	45
A.	Altérations de BRAF	45
B.	Autres altérations moléculaires	45
1.	Mutation IDH1	45
2.	TP53 et 1p19q.....	46
Chapitre 3. Nouvelle approche thérapeutique dans la prise en charge de l'astrocytome pilocytique réfractaire aux traitements conventionnels.....		47
I.	Mise en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques dans l'AP hypothalamo-chiasmatique	47
A.	Une signature moléculaire spécifique.....	47
B.	Le celecoxib et ses cibles.....	48
1.	Présentation du celecoxib	48
2.	CRK.....	52
3.	ICAM-1 (intercellular adhésion molecule-1)	55
C.	La fluvastatine et ses cibles	55
1.	Présentation de la fluvastatine.....	55
2.	CD36	57
3.	IQGAP1	59

II. Stratégie de la thérapie métronomique et applications.....	60
A. La chimiothérapie métronomique.....	61
1. Principe de la chimiothérapie métronomique	61
2. Chimiothérapie métronomique et réponse immunitaire anti-tumorale	62
3. La chimiothérapie métronomique dans les essais cliniques	64
B. Le « drug repositioning ».....	64
1. Principe du « drug repositioning »	64
2. Combinaison de la chimiothérapie métronomique et du « drug repositioning »	65
3. Emploi du celecoxib et de la fluvastatine en thérapie métronomique	65

PARTIE II : PRESENTATION, DISCUSSION ET PERSPECTIVES DES TRAVAUX

Présentation des travaux	71
I. Caractérisation de nouvelles cibles thérapeutiques et effet synergique de la combinaison du celecoxib et de la fluvastatine dans les AP	74
A. Présentation des travaux	74
Publication I : "Evidence for new targets and synergistic effect of metronomic celecoxib/fluvastatin combination in pilocytic astrocytoma"	74
B. Discussion des travaux et perspectives.....	76
II. Contribution à la caractérisation clinico-pathologique et à la mise en évidence d'altérations moléculaires des gliomes pédiatriques	85
A. Présentation des travaux	85
Publication II : "Outcome analysis of childhood pilocytic astrocytomas: a retrospective study of 148 cases at a single institution"	85
Publication III : "Search for Distinctive Markers in DNT and Cortical Grade II Glioma in children: Same Clinicopathological and Molecular Entities?"	87
Publication IV : "Dysembryoplastic Neuroepithelial Tumors Share with Pleomorphic Xanthoastrocytomas and Gangliogliomas BRAF^{V600E} Mutation and Expression"	89
B. Discussion des travaux et perspectives.....	91
Conclusion générale	102
Références bibliographiques	105
ANNEXE	117

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Table des illustrations

Figure 1 : Aspect histologique de gliomes de l'adulte

Figure 2 : Aspect en IRM d'un GB

Figure 3 : Distribution des tumeurs cérébrales selon l'histologie (A) et l'âge (B) selon les données de CBTRUS de 2012

Figure 4 : Aspect en IRM de gliomes pédiatriques

Figure 5 : Aspect histologique de gliomes pédiatriques

Figure 6 : Formes active et inactive de la protéine RAS

Figure 7 : Représentation schématique de la voie RAS/RAF/MEK/ERK

Figure 8 : Représentation schématique de la protéine BRAF

Figure 9 : La fusion *KIAA1549:BRAF*

Figure 10 : Représentation schématique du gène de fusion *KIAA1549:BRAF*

Figure 11 : Représentation des cinq variants du gène de fusion *KIAA1549:BRAF*

Figure 12 : Régulation contrôlée de la voie de la PGH_2 par COX-2 et de ses fonctions cellulaires

Figure 13 : Interaction du celecoxib avec les voies de signalisation de l'apoptose

Figure 14 : Mécanisme d'action du celecoxib influençant la survie cellulaire tumorale

Figure 15 : Représentation schématique du complexe d'adhérence focale incluant la protéine CRK

Figure 16 : Représentation schématique des différentes voies de signalisation induites par le complexe d'adhérence focale

Figure 17 : Représentation schématique de la synthèse du cholestérol à partir de l'HMG-CoA et l'activation des différentes voies

Figure 18 : Mécanismes d'action du CD36 induisant la voie MAPKinase

Figure 19 : Représentation schématique des domaines de IQGAP1 montrant les sites d'interaction avec ses différents partenaires

Figure 20 : Nouvelle stratégie de chimiothérapie : la chimiothérapie métronomique à faibles doses et en combinaison avec d'autres drogues

Figure 21 : Représentation d'une tumeur et de son microenvironnement avant (a) et après (b) traitement par chimiothérapie métronomique

Figure 22 : Mécanisme d'action de la chimiothérapie métronomique et du "drug repositioning"

Figure 23 : Mécanisme moléculaire anti-tumoral de la combinaison synergique de l'atorvastatine et du celecoxib ciblant des voies communes

Figure 24 : Représentation hypothétique du mécanisme moléculaire anti-tumoral de la combinaison synergique de la fluvastatine et du celecoxib ciblant une voie commune : la voie des MAPKinases

Figure 25 : Test de trois milieux de culture sur des cellules d'AP en monocouche

Figure 26 : Aspect d'un explant d'AP en contraste de phase (A) et expression en immunofluorescence de marqueurs de cellules souches (B et C) et de cellules différenciées (D, E, F)

Figure 27 : Classification des GB selon les caractéristiques biomoléculaires

Figure 28 : Altérations de la voie MAPK dans les astrocytomes pilocytiques

Figure 29 : Prévalence des altérations moléculaires retrouvées dans les AP en fonction du site de développement tumoral

Figure 30 : Différentes thérapeutiques ciblées contre la voie MAPK

Tableau 1 : Classification des gliomes et des tumeurs glioneurales selon l'OMS

Tableau 2 : Essais cliniques chez l'adulte utilisant la thérapie métronomique

Tableau 3 : Essais cliniques pédiatriques utilisant la thérapie métronomique

Tableau 4 : Cultures cellulaires primaires d'AP réalisées dans notre laboratoire

LISTE DES ABREVIATIONS

Liste des abréviations

A

ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
AINS : Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien
AKT : Protéine kinase B
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
AMP : AMP-activated protein kinase
AP : Astrocytome Pilocytique
ARNm : Acide RiboNucléique messenger

B

β3TUB : Beta-3-tubulin
BAD : BCL2-associated Agonist of cell Death
Bak : Bcl-2 homologous antagonist/Killer
Bax : Bcl-2-associated X protein
BBSFOP : protocole de la Société Française d'Oncologie Pédiatrique protocole des BB
Bcl-2 : B-cell lymphoma 2
bFGF : basic Fibroblast Growth Factor
BID : BH3 Interacting-Domain death agonist
BIM : Bcl-2-like protein 11

C

CD36 : Cluster of Differentiation 36
CDC42 : Cell Division Control protein 42 homolog
CDK4 : Cyclin-Dependent Kinase 4
CDKN2A : Cyclin-Dependent Kinase inhibitor 2a
CGH array : array Comparative Genomic Hybridization
CLA-1 : CD36 and LIMP-2 Analogous
COMBAT : Combined Oral Maintenance Biodifferentiating and Anti-angiogenic Therapy
COX : Cyclooxygénase
CRD : Cystein Rich Domain
CRK : V-crk avian sarcoma virus CT10 oncogene homologue

D

DMBT : Deleted in Malignant Brain Tumour
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMT : Dose Maximale Tolérée
DNT : Tumeurs Neuroépithéliales Dysembryoplasiques

E

EGF : Epidermal Growth Factor
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase

F

FAK : Focal Adhesion Kinase
FCS : Fetal Calf Serum
FGFR1 : Fibroblast Growth Factor Receptor 1
FISH : Fluorescence In Situ Hybridization
FPP : FarnesylPyroPhosphate

G

GAP : GTPase Activating Proteins
GB : Glioblastome
GBMO : Glioblastome à composante Oligodendrogliale
GDP : Guanosine DiPhosphate
GEF : Guanine nucleotide Exchange Factors
GENOP : Groupe d'Étude en Neuropathologie et Oncologie Pédiatrique
GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein
GG : Gangliogliome
GGPP : GéranylGéranyl-PyroPhosphate
GRD : GAP-Related Domain
GTP : Guanosine TriPhosphate

H

HMG-CoA : 3-Hydroxy-3-MéthylGlutaryl-COenzyme A
HRAS : Transforming protein p21
HT29 cells : Human colon adenocarcinoma grade II cell line

I

IC50 : Half maximal Inhibitory Concentration
ICAM-1 : InterCellular Adhesion Molecule-1
IDH : Isocitrate DeHydrogenase
IFN γ : Interferon gamma
IL-1 β : InterLeukin-1 beta
IL-6 : InterLeukin 6
INCA : Institut National du CAncer
IQGAP1 : Ras GTPase-activating-like protein
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

J

JNK : C-Jun N-terminal Kinase

K

KRAS : V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

L

LDL : Low-Density Lipoprotein
LFA-1 : Lymphocyte Function-associated Antigen 1
LIMP-2 : Lysosomal Integral Membrane Protein-2
LGG : Low Grade Gliomas

M

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases

Mcl-1 : Induced myeloid leukemia cell differentiation

MDM2 : Mouse Double Minute 2 homolog

mTOR : mammalian Target Of Rapamycin

MYB : V-myb avian myeloblastosis viral oncogen homolog

MYBL1 : V-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 1

N

NF1 : NeuroFibromatose de type I

NK : Natural Killer

NR2E1 : Nuclear Receptor subfamily 2 group E member 1

NRAS : Neuroblastoma RAS

NT3 : Neurotrophin-3

NTRK2 : Neurotrophic Tyrosine Kinase Receptor, type 2

O

O-2A/OPC : Oligodendrocyte type-2 Astrocyte/ Oligodendrocyte Precursor Cell

O4 : Oligodendrocyte Marker O4

OLIG2 : Oligodendrocyte transcription factor

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OS : Survie globale

P

p130Cas : Crk-associated substrate 130 kDa

P38 : P38 mitogen-activated protein kinases

PCDH9 : ProtoCaDHérine 9

PDGF : Platelet-Derived Growth Factor

PDK1 : Pyruvate Dehydrogenase lipoamide Kinase isozyme 1

PFS : Survie sans progression

PI3K : Phosphatidylinositol-3-Kinase

PIP2 : Phosphatidylinositol-2-biphosphate

PIP3 : Phosphatidylinositol-3.4.5-triphosphate

PMA : PiloMyxoid Astrocytoma

PPAR γ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor

PTEN : Phosphatase and TENsin homolog

PXA : XanthoAstrocytome Pleiomorphe

R

RAC1 : Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1

RAF : Rapidly Accelerated Fibrosarcoma

RASS1 : Ras association domain-containing protein 1

RDB : Rasn-Binding-Domain

RGCT : RasGAP C-Terminal

RT-Q-PCR : Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction

S

SERCA : Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase

SFCE : Société Française de lutte contre les Cancers et leucémies de l'Enfant et de l'adolescent

SH2 : Src Homology 2 domain

SIRIC : SIte de Recherche Intégrée sur le Cancer

SNC : Système Nerveux Central

SOS : Son Of Sevenless

SRB-1 : Scavenger Receptor B-1

T

TP53 : Tumor Protein 53

TUNEL : Terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling

V

VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule-1

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VLA-4 : Integrin alpha4beta1 (Very Late Antigen-4)

PARTIE I

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Les gliomes

I. Définition et classification des gliomes

Les gliomes sont les tumeurs du système nerveux central (SNC) les plus fréquentes. Ces tumeurs récidivent très fréquemment et sont, pour la plupart, de mauvais pronostic. La classification de référence des tumeurs du SNC est celle de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) révisée en 2007 (1) qui distingue entre autres, deux grandes classes de tumeurs neuroépithéliales : les tumeurs gliales et les tumeurs glioneuronales (**Tableau 1**). La classification des gliomes est basée sur le type cellulaire prédominant (astrocytaire, oligodendrocytaire ou mixte) et classe les gliomes selon leur potentiel d'agressivité, du grade I, pour les tumeurs bénignes, au grade IV pour les tumeurs agressives, en fonction des critères suivants : densité cellulaire, atypies nucléaires, mitoses, prolifération endothélio-capillaire et nécrose. Elle distingue également les gliomes circonscrits, habituellement bénins et de grade I, des gliomes infiltrants (envahissant le parenchyme adjacent sain). Ces derniers peuvent être lentement évolutifs (grades II et III) ou d'emblée malins (grade IV) (2). Les manifestations cliniques sont variables d'un patient à l'autre mais les principaux signes et symptômes associés à la présence d'un gliome sont une hypertension intracrânienne, des crises d'épilepsie et des déficits neurologiques. Les symptômes peuvent varier selon la localisation de la tumeur. Les tumeurs glioneuronales regroupent des tumeurs assez hétérogènes listées dans le **Tableau 1**.

II. Épidémiologie

Les gliomes représentent 70% des tumeurs du SNC et affectent 1 personne sur 100 000 en France. Trois à quatre mille nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année avec un pic de fréquence chez les personnes âgées de 50 à 60 ans (3). Les gliomes sont également les tumeurs solides les plus fréquentes chez l'enfant, et représentent 30% des cancers pédiatriques (4). Les tumeurs cérébrales chez l'enfant ont une fréquence assez semblable dans le monde avec une estimation de 29.9 cas par million d'enfants âgés de 0-15 ans enregistrés dans une étude européenne, 36.1 au Japon et 47.1 aux États-Unis (4).

1- Gliomes astrocytaires

Astrocytome pilocytique	Grade I
Astrocytome pilocytique, variant pilomyxoïde	Grade II
Astrocytome à cellules géantes sous-épendymaire	Grade I
Xanthoastrocytome pléiomorphe	Grade II
Astrocytome diffus (fibrillaire, protoplasmique, gémistocytique)	Grade II
Astrocytome anaplasique	Grade III
Glioblastome	Grade IV
Variant : glioblastome à cellules géantes	Grade IV
Gliosarcome	Grade IV
Gliomatose cérébrale	Grade III

2-Gliomes oligodendrogliaux

Oligodendrogliome	Grade II
Oligodendrogliome anaplasique	Grade III

3-Gliomes mixtes

Oligoastrocytome	Grade II
Oligoastrocytome anaplasique	Grade III
Si nécrose (GBMO : glioblastome à composante oligodendrogliale)	Grade IV

4-Tumeurs glioneuronales

Gangliogliome	Grade I
Gangliogliome anaplasique	Grade III
Astrocytome/gangliogliome desmoplasique infantile	Grade I
Tumeur neuroépithéliale dysembryoplasique	Grade I
Tumeur glioneuronale papillaire	Grade I
Tumeur glioneuronale à rosettes du IVe ventricule	Grade I

Tableau 1 : Classification des gliomes et des tumeurs glioneuronales selon l'OMS

III. Histologie et imagerie des tumeurs gliales et glioneurales de l'adulte

A. Les tumeurs gliales de grade II et III

1. L'astrocytome de grade II et III

L'astrocytome diffus de grade II est défini par une densité cellulaire modérée, des atypies cytonucléaires occasionnelles, une activité mitotique très faible et une absence de nécrose et de prolifération endothélio-capillaire. Il est souvent microkystique, composé d'astrocytes néoplasiques bien différenciés d'aspect fibrillaire organisés en une structure lâche et exprime fortement la protéine GFAP (**Figure 1A**) (2). L'astrocytome diffus de grade II peut progresser en astrocytome anaplasique (grade III) et en glioblastome (GB, grade IV).

L'astrocytome anaplasique de grade III se démarque de l'astrocytome de grade II, par une densité cellulaire plus importante et la présence de plus d'une mitose (**Figure 1B**) (2). Il ne doit pas être confondu avec une périphérie de GB. Ces tumeurs sont le plus fréquemment situées dans les zones corticales et subcorticales (5).

La chirurgie lorsqu'elle est possible et lorsqu'elle peut être complète est le traitement à privilégier. La radiothérapie et la chimiothérapie ont peu d'effet sur ces tumeurs peu proliférantes.

2. L'oligodendrogliome de grade II et III

L'OMS divise les oligodendrogliomes en 2 grades : l'oligodendrogliome (grade II) et l'oligodendrogliome anaplasique (grade III). Ils sont caractérisés par la présence de cellules rondes entourées d'un halo périnucléaire en aspect de « nid d'abeille » (**Figure 1C**). Les vaisseaux ont une forme rectiligne mais leur prolifération reste faible. L'oligodendrogliome de grade II, souvent de localisation frontale, apparaît hypodense au scanner. Il présente une densité cellulaire modérée, quelques atypies cytonucléaires, une activité mitotique occasionnelle et une absence de nécrose et de prolifération endothélio-capillaire. La prise de contraste est souvent absente dans les bas grades et traduit le passage à l'anaplasie (grade III). Selon l'OMS, l'oligodendrogliome anaplasique diffère du grade II par une densité cellulaire augmentée, une activité mitotique "significative", une nécrose "possible" et une prolifération

microvasculaire "marquée" (**Figure 1D**) (1, 2). Les oligodendrogliomes expriment fortement le marqueur OLIG2 et occasionnellement la GFAP (minigémistocytes). La chirurgie, lorsqu'elle est possible, continue d'être le traitement classique.

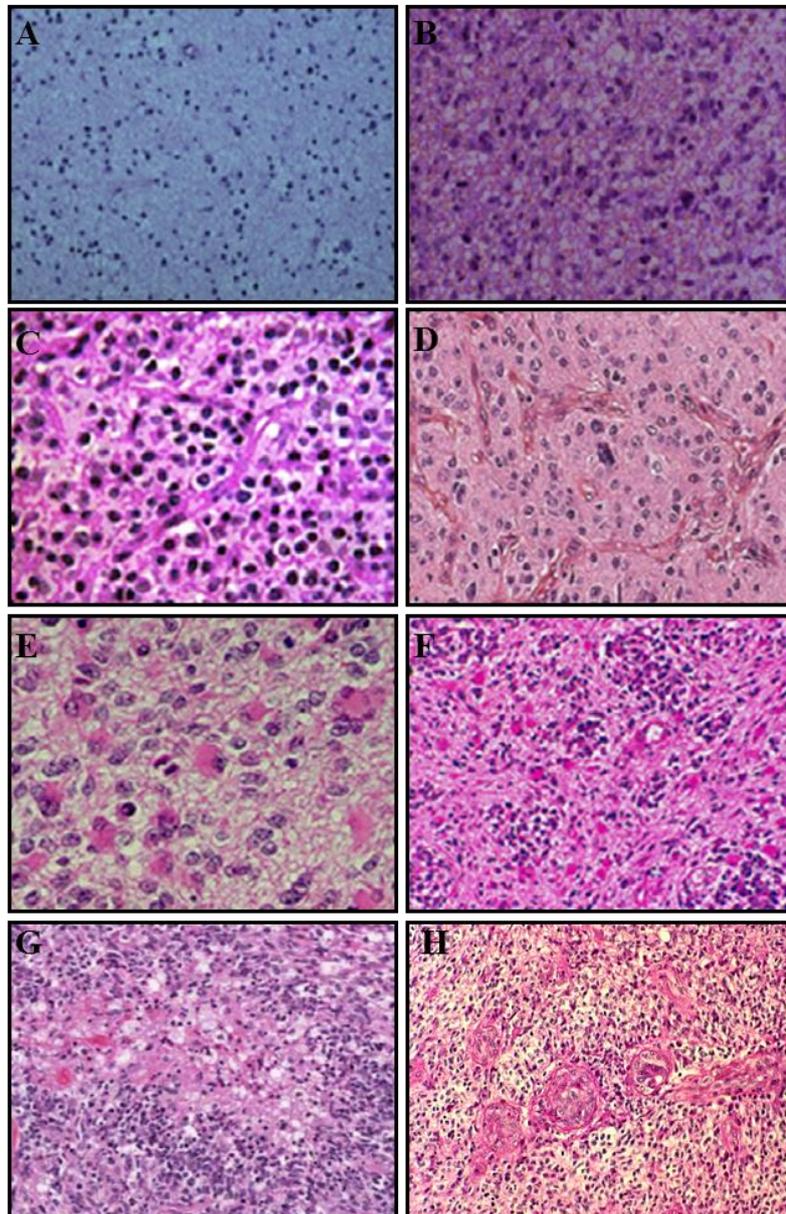
3. L'oligoastrocytome de grade II et III

L'oligoastrocytome, ou gliome mixte, est constitué des deux composantes, astrocytaire et oligodendrogliale. Il n'existe pas de règle sur la proportion minimale de chacune des deux populations cellulaires pour établir un diagnostic de gliome mixte. Comme pour les oligodendrogliomes, l'OMS classe ces tumeurs selon 2 grades : l'oligoastrocytome de grade II et l'oligoastrocytome anaplasique (grade III). Les oligoastrocytomes de grade II sont définis par une densité cellulaire modérée, une activité mitotique rare et une absence de nécrose et de prolifération endothélio-capillaire (**Figure 1E**). Les grades III se caractérisent par une densité cellulaire plus élevée, des atypies cytonucléaires "possibles", une activité mitotique "possiblement forte" et une prolifération endothélio-capillaire "possible" (**Figure 1F**). La présence de nécrose classe la tumeur en oligoastrocytome de grade IV. Le marqueur OLIG2 est très abondant.

B. Le glioblastome : grade IV

Le GB est la tumeur gliale de plus haut grade et la plus fréquente chez l'adulte de plus de 45 ans. Selon l'OMS, la présence de nécrose et d'une prolifération endothélio-capillaire distinguent les GB des autres grades. La nécrose est entourée de cellules proliférantes organisées en pseudo-palissades appelées "palissades périnécrotiques" (**Figure 1G**). La vascularisation est anormale avec une prolifération endothélio-capillaire qui peut être exubérante dans certains territoires (**Figure 1H**) (6). Ces gliomes sont très infiltrants et on retrouve à leur périphérie des cellules tumorales isolées infiltrant le parenchyme adjacent sain caractérisées par des noyaux atypiques allongés. Il existe deux types de GB : le GB "primaire" qui survient *de novo*, et le GB "secondaire" qui provient de l'évolution d'un grade inférieur (7, 8). À l'imagerie, le tissu tumoral est identifié par une prise de contraste en anneau. Le parenchyme normal est fréquemment infiltré par des cellules tumorales isolées. La présence de ces cellules est déterminée par l'existence d'un œdème péri-tumoral présentant un aspect typique dit en « doigt de gant » (**Figure 2**) (6).

Si la tumeur n'est pas trop profonde, le traitement est chirurgical. L'exérèse doit être la plus large possible en sachant qu'il est en général impossible d'enlever toute la tumeur qui s'infiltré dans le parenchyme cérébral normal.



D'après Figarella et al., 2008 (2) et Figarella et al., 2010 (6)

Figure 1: Aspect histologique de gliomes de l'adulte

Aspect histologique d'un astrocytome diffus de grade II (A), d'un astrocytome diffus de grade III (B), d'un oligodendrogliome de grade II (C), d'un oligodendrogliome de grade III (D), d'un oligoastrocytome de grade II (E), d'un oligoastrocytome de grade III (F), d'un GB montrant des cellules proliférantes organisées en pseudo-palissades périnécrotiques (G), d'un GB présentant des vaisseaux anormaux (H).

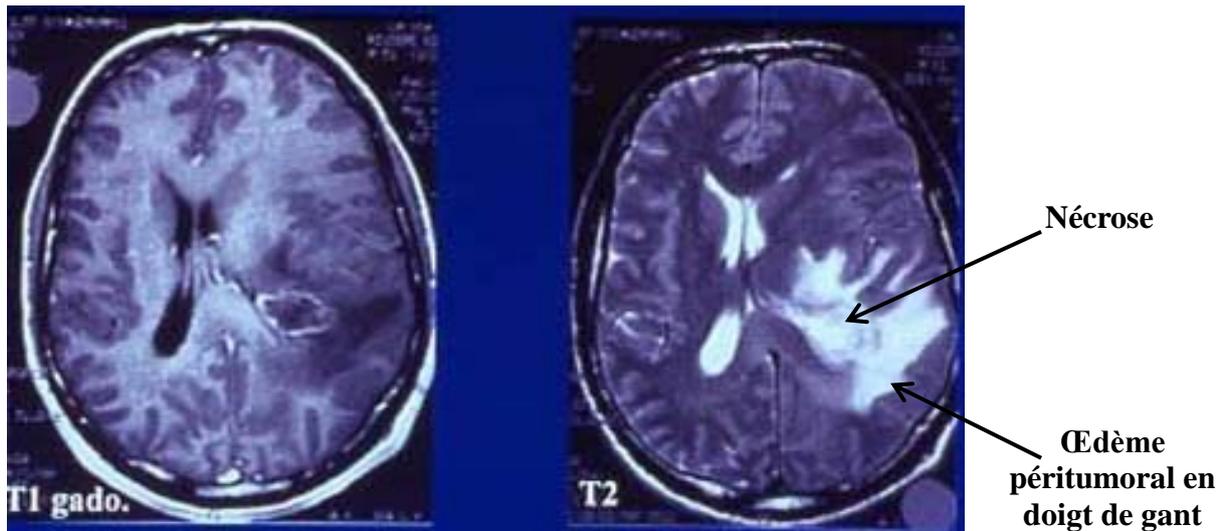


Figure 2 : Aspect en IRM d'un GB

Gauche : prise de contraste en T1 rehaussée par le gadolinium. Tumeur à centre hypodense (nécrotique) avec prise de contraste en « anneau » ;

Droite : prise de contraste en T2. Le GB apparaît en hypersignal et montre un œdème péritumoral d'aspect typique en « doigt de gant ». Le centre de la tumeur est constitué d'une zone nécrotique.

IV. Histologie, imagerie et thérapeutique des tumeurs gliales et glioneuronales de l'enfant et du jeune adulte

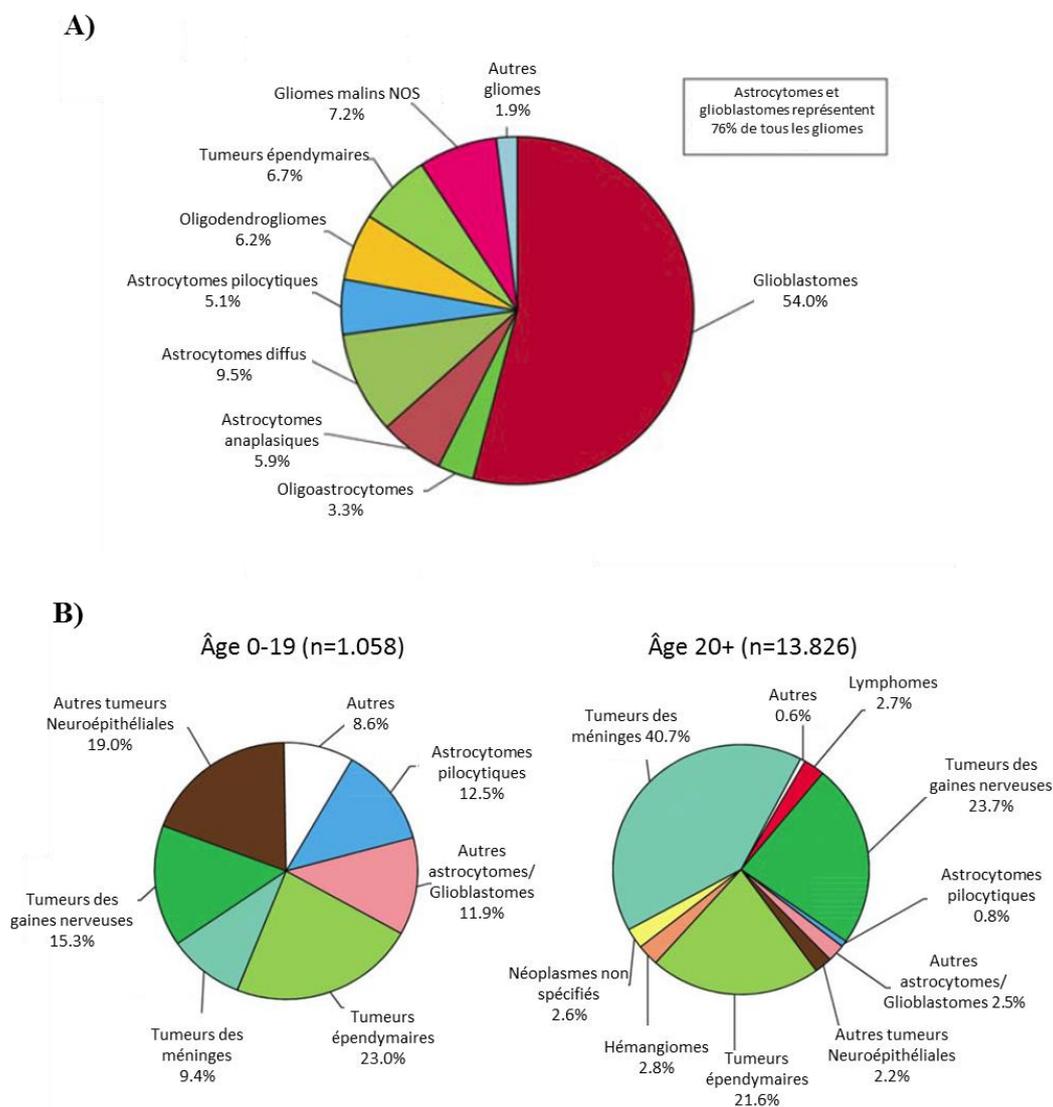
Les tumeurs cérébrales de l'enfant sont les tumeurs solides les plus fréquentes en pédiatrie et la première cause de morbidité et de décès lié au cancer chez l'enfant (4). Leur classification histologique reste complexe mais on distingue tout de même 2 types de gliomes : les gliomes infiltrants et les gliomes circonscrits (rares chez l'adulte).

A. Tumeurs circonscrites

1. L'astrocytome pilocytique (AP) classique

L'AP classique est une tumeur astrocytaire circonscrite, bénigne, de grade I, qui survient principalement chez l'enfant et le jeune adulte. L'AP représente 5.1% de l'ensemble des gliomes (**Figure 3A**) et 12.5% des tumeurs gliales de l'enfant et du jeune adulte de 0 à 19 ans avec un pic de fréquence de 5 à 9 ans (**Figure 3B**) (9, 10). La fréquence de cette tumeur diminue avec l'âge (0.8% après 20 ans) (**Figure 3B**). Il s'agit d'une tumeur de bon pronostic et

qui survient dans différentes localisations du SNC comme le cervelet, le tronc cérébral, la moelle épinière et de façon plus exceptionnelle, au niveau supra-tentoriel comme dans la région hypothalamo-chiasmatique. Les AP du nerf optique sont fréquemment associés à une neurofibromatose de type I (NF1) (11). Les symptômes apparaissent progressivement et sont le plus souvent des crises convulsives ou encore des signes neurologiques spécifiques en rapport avec la localisation tumorale comme des anomalies visuelles, des troubles endocriniens ou de l'équilibre. À l'imagerie, il s'agit le plus souvent d'une tumeur bien circonscrite, présentant une portion kystique avec un nodule mural charnu rehaussé par le produit de contraste, hypointense en T1 et hyperintense en T2 (**Figure 4A**) (10, 12).



D'après le CBTRUS 2012 (9)

Figure 3 : Distribution des tumeurs cérébrales selon l'histologie (A) et l'âge (B) selon les données de CBTRUS de 2012

Histologiquement, l'AP se caractérise typiquement par un aspect biphasique, associant dans des proportions variables des territoires fibrillaires à cellules bipolaires riches en fibres de Rosenthal exprimant la GFAP (**Figure 5A**). Il existe également des territoires lâches, microkystiques, à cellules multipolaires *oligo-like* et exprimant le facteur de transcription OLIG2 et présentant des corps granuleux éosinophiles. (**Figure 5B**). La vascularisation est souvent anormale, les mitoses sont exceptionnelles et la nécrose quand elle existe est de type ischémique (2, 13, 14).

Le traitement de base de l'AP est principalement la chirurgie. L'exérèse chirurgicale doit être la plus complète possible (90% des cas) pour permettre une guérison. Par contre, elle est parfois difficile voire impossible à cause de sa localisation notamment au niveau des voies optiques (12, 15). Si l'exérèse est incomplète, une progression tumorale peut avoir lieu et dans ce cas, la radiothérapie ou la chimiothérapie peuvent être utilisées. La radiothérapie cause un fort taux de morbidité et des effets néfastes surtout chez le nourrisson et le jeune enfant (10, 15). La chimiothérapie est plutôt utilisée après la chirurgie afin d'éviter ou de reporter la radiothérapie chez le jeune enfant jusqu'à qu'il soit plus âgé. Notamment, la combinaison carboplatine/vincristine est devenue la principale thérapie des gliomes hypothalamo-chiasmatiques (10).

2. L'astrocytome pilomyxoïde

L'astrocytome pilomyxoïde, tumeur gliale de grade II, est un variant plus agressif de l'AP classique mis en évidence par Tihan et collaborateurs en 1999 (16). La fréquence de ces tumeurs peut atteindre 23% et est retrouvée le plus souvent dans la petite enfance (17). Cette tumeur cause des symptômes neurologiques comme des crises d'épilepsie, un retard de développement, des vomissements, des difficultés d'alimentation et une faiblesse généralisée (18). L'AP pilomyxoïde s'observe essentiellement dans la région hypothalamo-chiasmatique et les voies optiques. En imagerie, il est moins kystique et moins délimité que l'AP classique et peut montrer un œdème péri-tumoral et de la nécrose (**Figure 4D**) (17). Histologiquement, il se distingue de la forme classique par des cellules bipolaires se disposant le plus souvent en pseudorosettes périvasculaires dans une matrice myxoïde dépourvue de fibre de Rosenthal ou de corps granuleux (**Figure 5G**). Les mitoses sont rares mais la prolifération est plus élevée que dans l'AP classique et il existe des atypies nucléaires. Les cellules expriment également les marqueurs GFAP et OLIG2 (2, 16). De par sa localisation, l'exérèse complète reste difficile nécessitant la mise en place d'une thérapie supplémentaire de type chimiothérapie ou

radiothérapie. Comme pour l'AP classique, la chimiothérapie est tout de même préférable pour les très jeunes enfants pour retarder ou éviter la radiothérapie (18).

3. Le gangliogliome (GG)

Le GG est une tumeur glioneuronale, il représente environ 1% des tumeurs cérébrales et est retrouvé le plus fréquemment chez les enfants et les jeunes adultes. Le GG est une tumeur bénigne, de grade I et de bon pronostic. Les symptômes les plus fréquents sont des crises d'épilepsie (15, 19, 20). Il existe également le GG anaplasique de grade III qui résulte de la transformation maligne du GG bénin mais il reste exceptionnel (19, 21). Le GG est préférentiellement localisé dans la région supra-tentorielle et habituellement dans le lobe temporal. Il se développe plus rarement dans le cervelet, le thalamus, l'hypothalamus, le tronc cérébral et la moelle épinière. En IRM, il s'agit d'une tumeur corticale, bien circonscrite et entièrement charnue ou en partie kystique prenant le contraste, hypointense en T1 et hyperintense en T2 (**Figure 4B**) (22). L'histologie des GG est caractérisée par la présence de neurones matures de types ganglionnaires présentant des aspects anormaux (bi-nucléation, prolongements multiples) et de cellules gliales néoplasiques qui sont des astrocytes (**Figure 5C**). Ainsi, si les deux composants cellulaires sont présents le diagnostic est simple à déterminer. Par contre, quand la population neuronale est concentrée à un endroit spécifique de la tumeur, le diagnostic erroné d'astrocytome peut être posé.

Le traitement le plus bénéfique est l'exérèse totale de la tumeur (22). La radiothérapie est réservée aux patients ayant un GG anaplasique et en cas de récurrence.

4. Les tumeurs neuroépithéliales dysembryoplasiques (DNT)

Les DNT sont des tumeurs glioneuronales de grade I, décrites pour la première fois par Catherine Dumas-Duport en 1988 (23). Les DNT représentent 1.2% des tumeurs chez les patients de moins de 20 ans et se caractérisent par des crises d'épilepsie partielles, réfractaires aux traitements et sans déficit neurologique. Les DNT sont considérées comme la deuxième cause la plus fréquente d'épilepsie réfractaire chez les enfants et les adolescents (l'incidence varie de 0.5 à 15%) (24). Comme pour les GG, elles se développent le plus souvent au niveau cortical et essentiellement dans le cortex supra-tentoriel, le plus fréquemment dans le lobe temporal.

Histologiquement, les DNT sont caractérisées par la présence d'une composante glioneuronale spécifique associée à des nodules gliaux. Il existe la forme simple contenant seulement une composante glioneuronale spécifique correspondant à des faisceaux d'axones bordés par de petits oligodendrocytes et neurones flottant dans le liquide interstitiel et expliquant l'aspect kystique en imagerie (**Figure 5D**). La forme complexe associe la composante glioneuronale spécifique à des nodules gliaux multiples de taille variée et de composition hétérogène imitant des oligodendrogliomes, astrocytomes ou oligoastrocytomes et présente des foyers de dysplasie corticale (**Figure 5E**). La troisième forme, très controversée, dite « non-spécifique » ne contient pas de composante glioneuronale spécifique et peut simuler à l'histologie un gliome diffus cortical de grade II (**Figure 5F**) (25, 26).

L'imagerie est alors une aide diagnostique précieuse : elle fait partie intégrante des éléments du diagnostic et permet d'éviter des erreurs de classification. À l'IRM, ces tumeurs sont bien délimitées et ne prennent classiquement pas le contraste. La composante glioneuronale est localisée dans le cortex et apparaît sous la forme de multiples pseudokystes de tailles variables hypointenses en séquence T1 et hyperintenses en séquence T2 (**Figure 4C**) (25).

À ce jour, le seul traitement possible reste la chirurgie qui permet la guérison du patient. Le pronostic à long terme reste excellent même si l'exérèse est parfois incomplète.

5. Le xanthoastrocytome pleiomorphe (PXA)

Le PXA est une tumeur classée dans le groupe des gliomes astrocytaires représentant 1% des tumeurs gliales de grade II de l'OMS et affectant le plus souvent les enfants et les jeunes adultes. Il existe des PXA dits anaplasiques, qui se caractérisent par des mitoses nombreuses, de la nécrose et un comportement plus malin. Les PXA ont une localisation supra-tentorielle, corticale superficielle, le plus souvent temporale (27). À l'imagerie, les PXA se présentent le plus souvent sous forme d'une masse superficielle kystique avec un nodule mural et la chirurgie représente le traitement de choix (**Figure 4H**). Histologiquement, les PXA sont définis par la présence de cellules tumorales très pléiomorphes, avec souvent des cellules géantes à plusieurs noyaux et des cellules xanthomateuses. Il existe fréquemment un réseau de réticuline intercellulaire dense et des infiltrats lymphocytaires en foyers. Les PXA expriment fortement la GFAP, peu ou pas OLIG2, le CD34 et ils peuvent exprimer des marqueurs neuronaux. Les atypies cellulaires et nucléaires très marquées ne sont pas des signes d'anaplasie et peuvent faire poser à tort un diagnostic de gliome de haut grade (**Figure 5H**)

(27). Le PXA est considéré comme une tumeur bénigne avec un pronostic assez favorable après résection totale et une survie globale de 81% à 5 ans (hors PXA anaplasiques) mais une surveillance clinique à long terme reste indispensable (28).

B. Tumeurs infiltrantes

1. Le gliome diffus du tronc cérébral

Les gliomes diffus du tronc cérébral représentent 10% à 20% des tumeurs primaires du SNC chez l'enfant et 20% à 25% des tumeurs infra-tentorielles (29, 30). Chez l'enfant, le pic d'incidence est entre 6 et 8 ans. Ils sont le plus souvent de phénotype astrocytaire et peuvent être de grade II, III mais rarement de grade IV. Ils sont essentiellement localisés au niveau de la protubérance et entraînent une augmentation diffuse de la taille du tronc cérébral avec peu ou pas de prise de contraste à l'imagerie (**Figure 4E**). Le gliome du tronc cérébral est de très mauvais pronostic quel que soit le grade. L'exérèse maximale est toujours tentée car le degré de résection chirurgicale est le principal facteur pronostique pour ces patients. Elle est ensuite complétée par de la radiothérapie et/ou chimiothérapie (4).

2. Le gliome du thalamus

Les gliomes du thalamus sont plus fréquents chez les enfants que chez les adultes, et représentent environ 12% des gliomes pédiatriques de bas grade (29, 31). Contrairement au gliome diffus du tronc cérébral, il est le plus souvent de phénotype oligodendrogial et peut être de grade II, III mais rarement de grade IV. À l'imagerie, il entraîne un gonflement du thalamus, généralement aucun œdème n'est visible et peu ou pas de prise de contraste (**Figure 4F**). Toutefois, comme pour le gliome diffus du tronc, le gliome du thalamus est de très mauvais pronostic quel que soit le grade, notamment car l'exérèse totale de cette tumeur est difficile (32). Cependant, après une importante exérèse, les enfants atteints de gliomes de bas grade du thalamus peuvent avoir un taux de survie globale à 5 ans de 80% après radiothérapie et/ou chimiothérapie (31).

3. Le glioblastome

Le GB est rare en pédiatrie avec une incidence de l'ordre de 0,6/100 000 chez les enfants et adolescents âgés de 0 à 19 ans. Le taux de mortalité à 5 ans des GB est très élevé (proche de 90%) en pédiatrie comme chez l'adulte (33). Les GB se localisent essentiellement dans les

hémisphères cérébraux et les caractéristiques histologiques sont identiques selon l'âge du patient (enfant ou adulte) ou la localisation de la tumeur (**Figure 4G**).

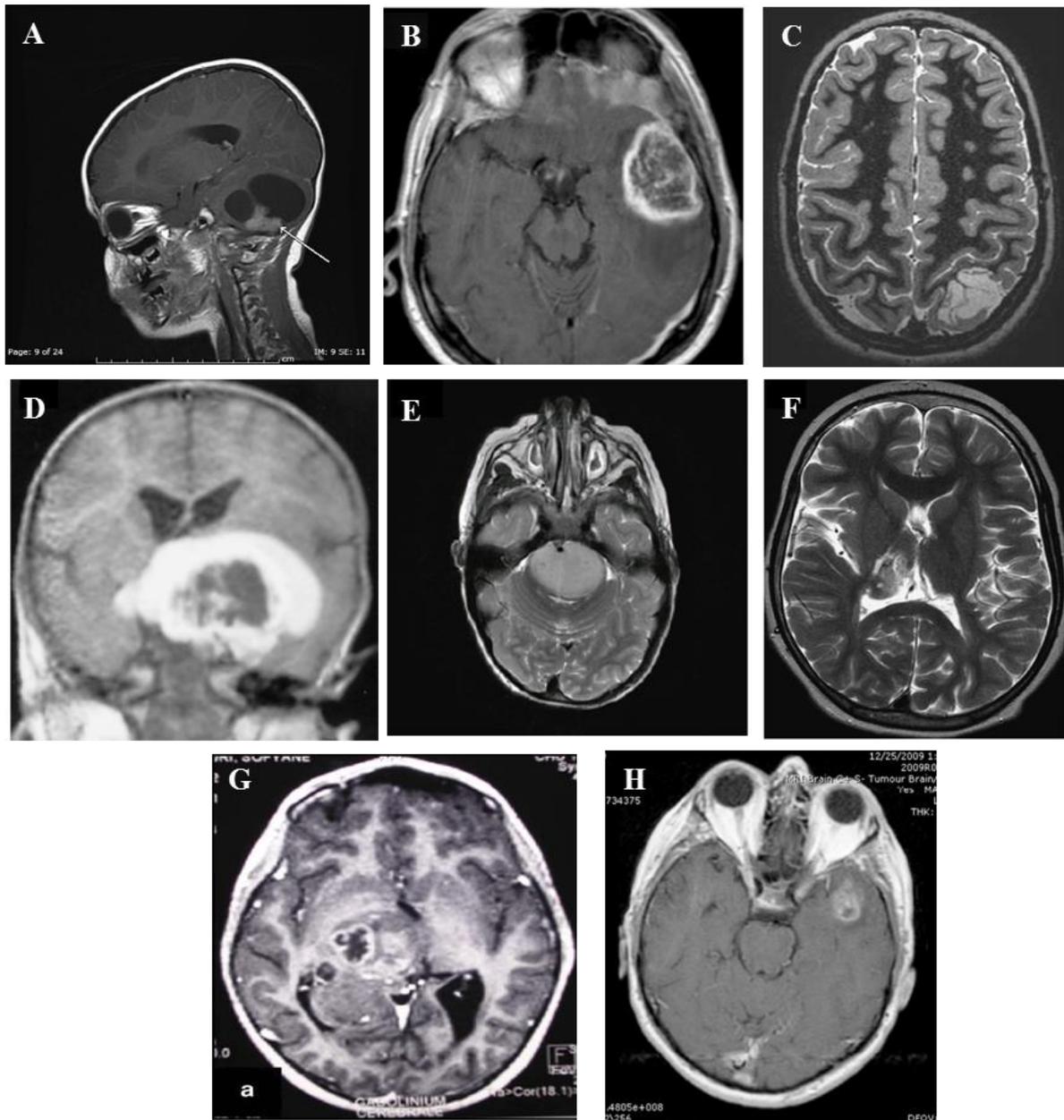


Figure 4 : Aspect en IRM de gliomes pédiatriques

Aspect en IRM d'un AP de la fosse postérieure (cervelet) (**A**) (12), d'un GG localisé dans le lobe temporal gauche rehaussée par le gadolinium en T1 (**B**) (21), d'une DNT localisée dans le lobe temporal hyperintense en séquence T2 (**C**) (25), d'un AP pilomyxoïde rehaussé par le gadolinium (**D**) (17), d'un gliome diffus du tronc en T2 (**E**) (4), d'un gliome diffus du thalamus hyperintense en T2 (**F**) (10), d'un GB hyperintense en T1 et rehaussé par le gadolinium (**G**) (32) et d'un PXA dans le lobe temporal gauche (**H**) (27)

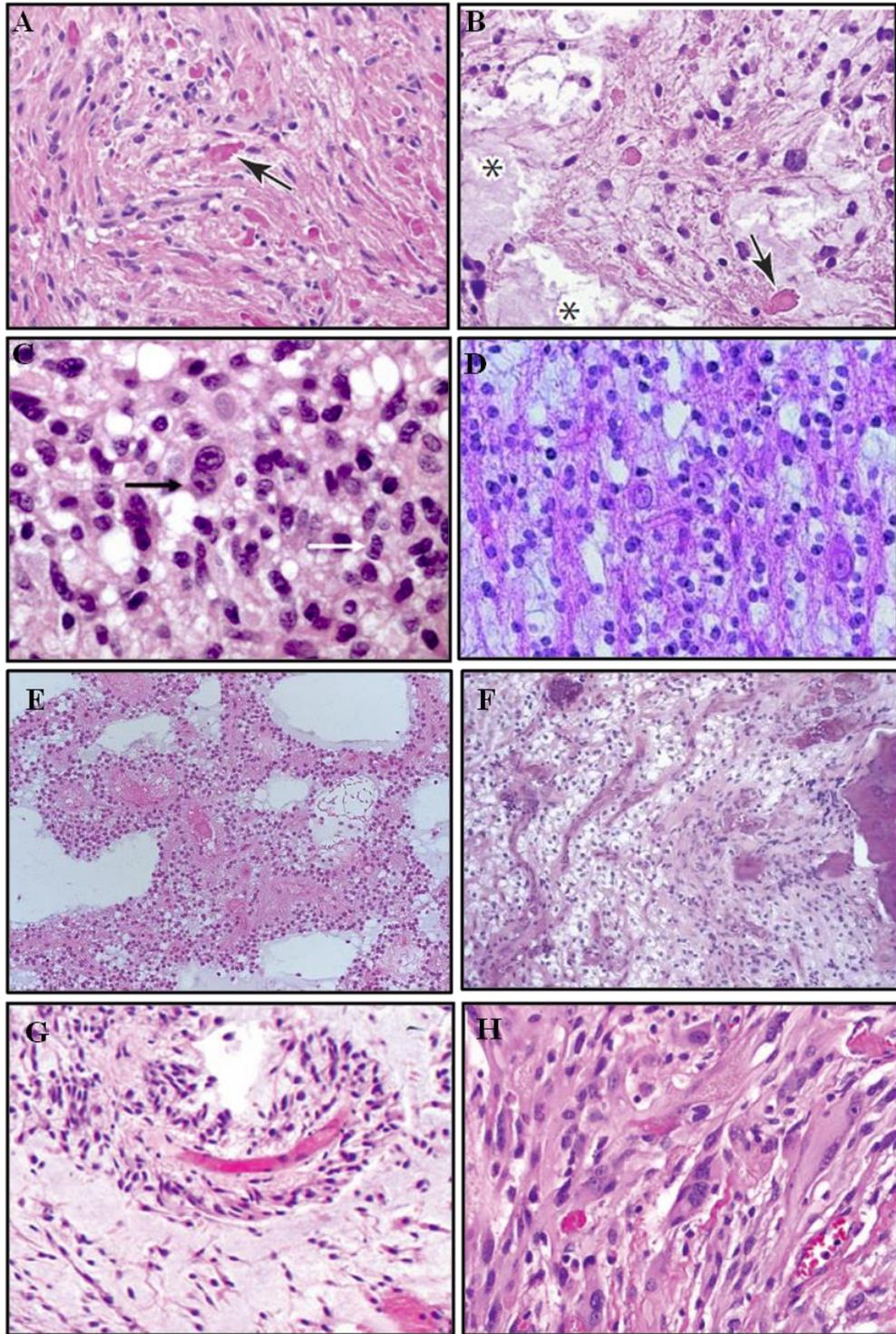


Figure 5 : Aspect histologique de gliomes pédiatriques

AP classique contenant des territoires fibrillaires à cellules bipolaires riches en fibres de Rosenthal (*flèche*) (A) (14), AP classique contenant des territoires lâches, microkystiques (*astérisque*) et des corps granuleux éosinophiles (*flèche*) (B) (14), GG contenant des neurones matures de type ganglionnaires (*flèche noire*) et des cellules gliales de type astrocytes (*flèche blanche*) (C) (21), Aspect histologique de la composante glioneuronale spécifique d'une DNT correspondant à des faisceaux d'axones entourés d'oligodendrocytes de petite taille et des

neurones baignant dans du liquide interstitiel (**D**) (34), Aspect histologique d'une DNT de forme complexe associant la composante glioneuronale spécifique à des nodules gliaux multiples de taille variée de composition hétérogène imitant des oligodendrogliomes, astrocytomes ou oligoastrocytomes et présentant des foyers de dysplasie corticale (**E**) (34), Aspect histologique d'une DNT non-spécifique ne contenant pas de composante glioneuronale spécifique (**F**) (34), AP pilomyxoïde composé de cellules bipolaires se disposant en pseudorosettes périvasculaires dans une matrice myxoïde dépourvue de fibre de Rosenthal ou de corps granuleux (**G**) (14), PXA composé de cellules xanthomateuses ayant un réseau de réticuline intercellulaire dense et des infiltrats lymphocytaires en foyers (**H**)(14)

Chapitre 2. Principales altérations moléculaires des tumeurs gliales et glioneurales de l'enfant

I. Les astrocytomes pilocytiques (AP)

De récentes études ont permis de mettre en lumière des anomalies génétiques récurrentes dans les AP et d'autres gliomes pédiatriques, impliquant notamment la voie des MAPKinases.

A. La voie de signalisation des MAPKinases : fonctions et mécanismes

La voie de signalisation des MAPKinases est présentée ici car plusieurs études ont désormais révélé son importance capitale dans le développement des tumeurs gliales pédiatriques de bas grade. Plusieurs altérations génétiques activant cette voie de signalisation ont été mises en évidence et jouent un rôle fondamental dans la tumorigénèse des gliomes et en particulier des AP.

1. Fonctions de la voie MAPKinase

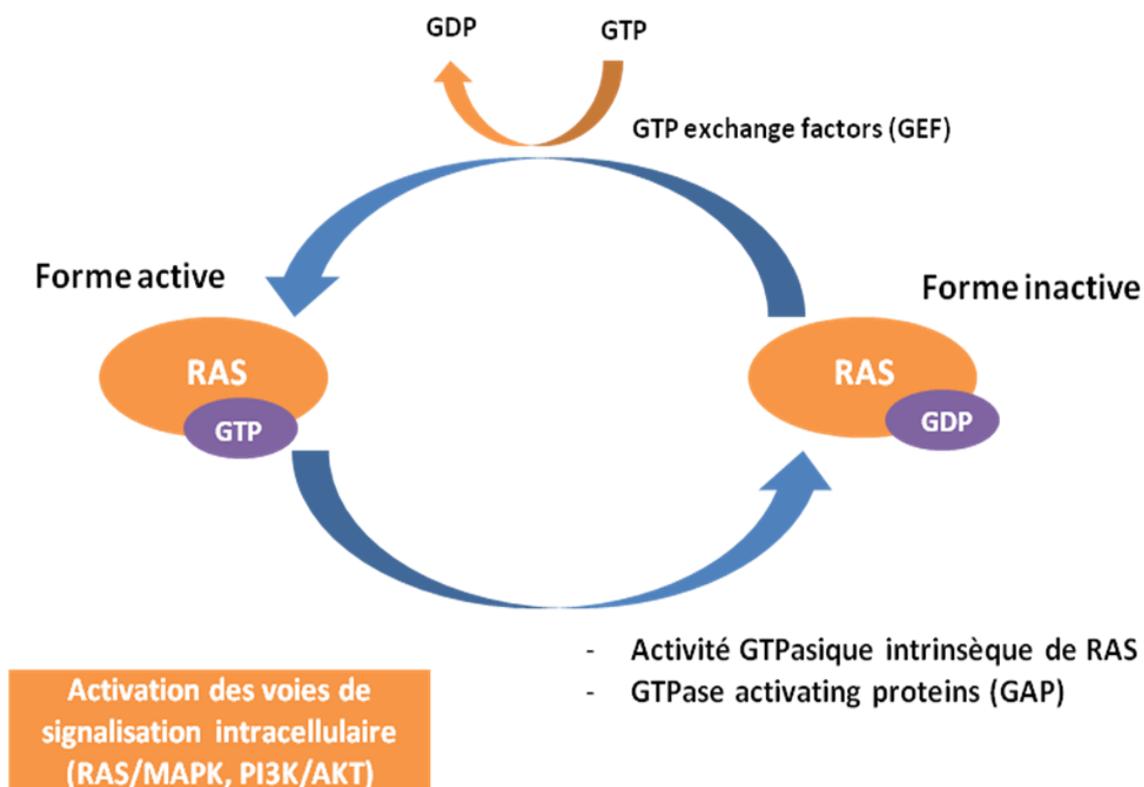
La voie MAPKinase est impliquée physiologiquement dans différentes fonctions cérébrales et dans divers processus de neurocognition dont la mémorisation (35, 36). Elle intervient également dans le phénomène de la douleur, l'induction de la neurogénèse et le développement du diencéphale et du cervelet au cours de l'embryogénèse (37, 38). C'est une voie de signalisation intracellulaire jouant un rôle important dans la régulation de la prolifération, de la survie, de la différenciation, de la migration cellulaire, et de l'angiogénèse. Il existe six groupes de MAPKinases : ERK1/2, ERK3/4, ERK5, ERK7/8, JNK et P38. La voie ERK1/2 implique la protéine Ras et est la plus étudiée dans les gliomes. Nous allons en détailler son mécanisme ci-après.

2. Mécanismes de la voie RAS/RAF/MEK/ERK

Les protéines kinases sont des enzymes qui catalysent le transfert d'un groupe phosphate sur des acides aminés ayant une fonction alcool : sérine, thréonine et tyrosine. L'addition de ce groupe phosphate permet à la protéine d'être activée et d'interagir avec les autres protéines. Les voies de signalisation des MAPKinases impliquent une série de kinases qui s'activent en cascade permettant la transduction du signal de la membrane plasmique de la cellule au noyau.

Lorsqu'un ligand extracellulaire, comme un facteur de croissance ou une cytokine, se fixe spécifiquement à un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase, ce complexe s'active en se dimérisant et en s'autophosphorylant, recrutant alors des facteurs d'échanges GEF (*Guanine Nucleotide Exchange Factors*), comme les protéines SOS. Ces dernières permettent l'échange du GDP (*Guanosine DiPhosphate*) par le GTP (*Guanosine TriPhosphate*) sur des protéines de la famille RAS, alors activées. Ce processus peut être inhibé par l'action de protéines GAP (*GTPase Activating Proteins*), comme la protéine neurofibromine (NF1), qui catalysent l'hydrolyse du GTP en GDP rendant alors les protéines RAS inactives (**Figure 6**).

Les protéines RAS ont donc une activité GTPase et il existe 4 isoformes : HRAS, NRAS, KRAS4A, KRAS4B. La protéine RAS activée induit de multiples interactions avec des protéines dont l'activation des protéines RAF et de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) (39).



D'après Lièvre et al., 2010 (40)

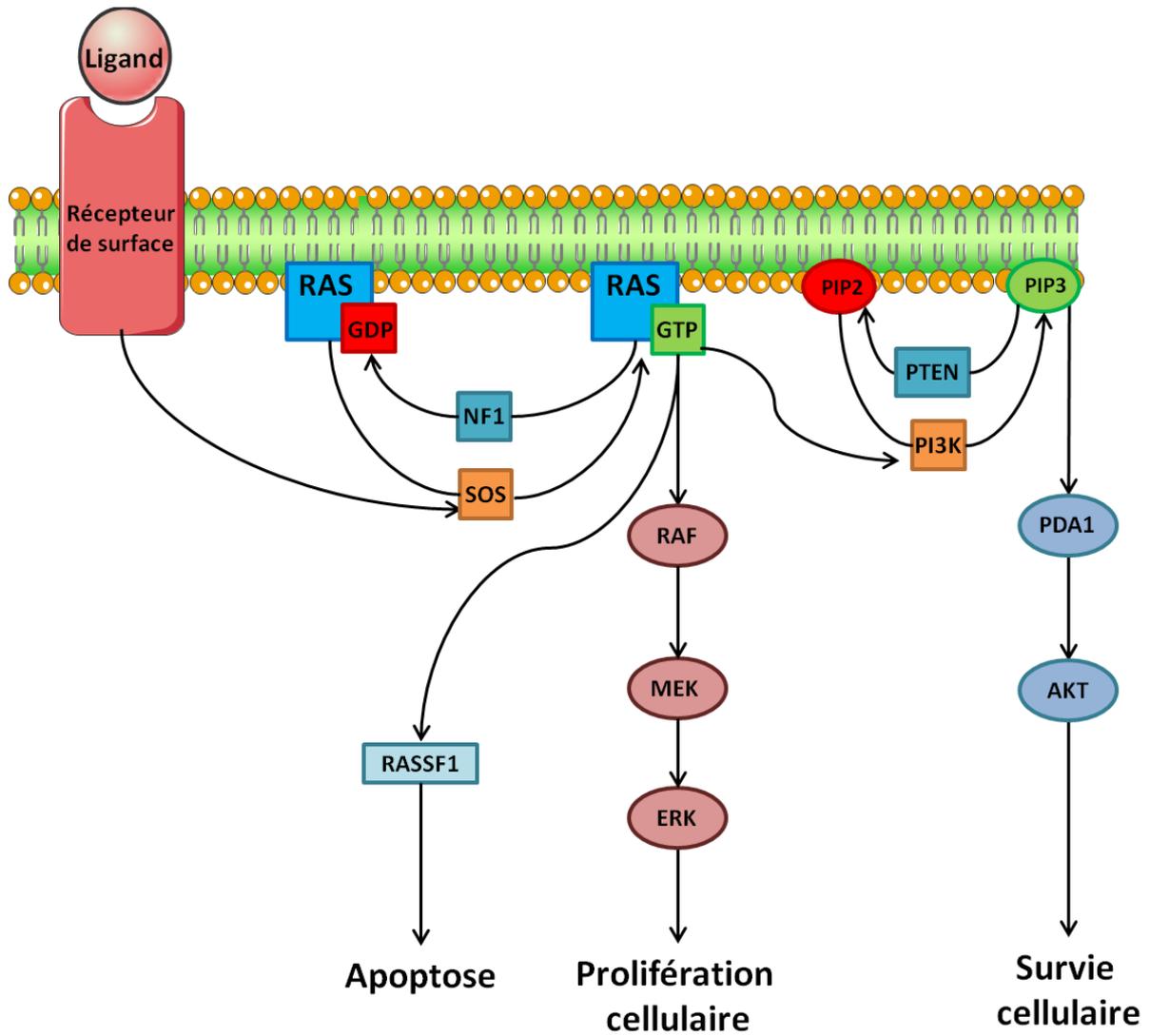
Figure 6 : Formes active et inactive de la protéine RAS

La voie RAS/ERK est activée par l'interaction avec les protéines kinases RAF. Les protéines RAF sont constituées de 4 formes (BRAF, RAF-1, ARAF, CRAF), BRAF étant la plus connue (41). L'activation des protéines RAF induit alors l'activation des protéines MEK1 et MEK2 qui activent à leur tour ERK1 et ERK2. Ces dernières induisent l'activation de différents facteurs de transcription comme ETS-1, C-JUN, et C-MYC permettant la prolifération cellulaire. En parallèle, la protéine PI3K activée catalyse la phosphorylation du phosphatidylinositol-2-biphosphate (PIP2) générant le phosphatidylinositol-3.4.5-triphosphate (PIP3). Ce processus peut être inhibé par l'action de la protéine PTEN qui déphosphoryle la protéine PIP3 en PIP2. L'accumulation de PIP3 permet le recrutement de PDK1 à la membrane où il phosphoryle la protéine AKT. La protéine AKT activée peut, tout comme ERK, phosphoryler un grand nombre de protéines impliquées dans la survie cellulaire comme la protéine BIM et BAD.

Enfin, la protéine RAS peut activer une autre protéine, appelée RASSF1A, entraînant la mort de la cellule par apoptose (**Figure 7**).

B. Mutation du gène *NF1*

Le gène *NF1* est situé sur le chromosome 17. La mutation de ce gène est une mutation autosomique dominante qui induit une neurofibromatose de type 1 dans 1/3500 naissances. Le gène *NF1* est un gène suppresseur de tumeur et code pour une protéine appelée neurofibromine exprimée dans différentes cellules notamment les cellules gliales, les neurones et les cellules de Schwann. Cette protéine appartient à la famille des protéines GAP possédant un domaine GRD (*GAP-related domain*), homologue au domaine catalytique des protéines RAS-GTPase. Sa fonction est de réguler négativement RAS en induisant la diminution de la prolifération de cellules astrocytaires et de la différenciation neuronale. Une perte d'expression de la neurofibromine conduit donc à une activité anormale de RAS et ainsi à une forte prolifération des astrocytes *via* la voie MAPK/ERK. Par ailleurs, des travaux ont rapporté que, paradoxalement, la mutation du gène *NF1* induisait également un phénomène de sénescence cellulaire en inhibant la voie RAS/PI3K (42).



D'après Tavetossian et al., 2010 (43)

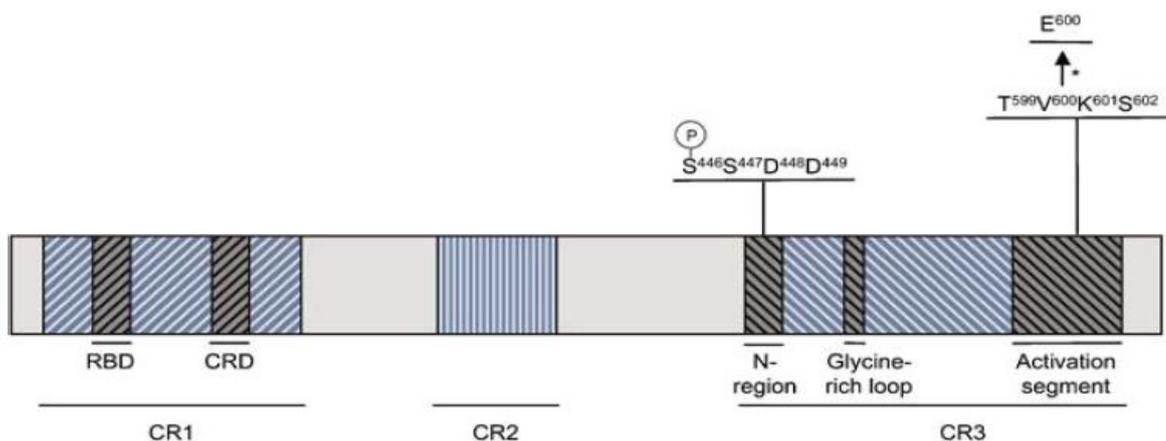
Figure 7 : Représentation schématique de la voie RAS/RAF/MEK/ERK

Cette mutation est associée à une prédisposition à développer un astrocytome et plus particulièrement un AP des voies optiques (39, 44-46). Dans l'étude de Chateil et collaborateurs, les IRMs de 14 enfants présentant une mutation de *NFI* et 13 autres ne l'ayant pas, ont été comparées (47). Ils ont constaté que 10/14 patients ayant la mutation de *NFI* avaient une tumeur localisée au niveau du nerf optique alors que pour 11/13 patients sans mutation de *NFI*, la tumeur était localisée plutôt au niveau du chiasma. De plus, 71% des patients (10/14) portant la mutation de *NFI* présentaient moins de symptômes. La tumeur était également plus petite et le pronostic meilleur pour les patients avec une mutation (44, 47).

C. Altérations de la protéine BRAF

Comme nous venons de le voir, BRAF est un membre de la famille des protéines kinases RAF (41) et un des effecteurs des protéines RAS participant à la voie de signalisation ERK/MAPK.

BRAF, comme les autres protéines RAF, contient 3 régions conservées : CR1, 2 et 3 (**Figure 8**). CR1 et CR2 sont des domaines de régulation. Le domaine de liaison à RAS, RDB (*RAS-Binding-Domain*) et le domaine riche en cystéine, CRD (*Cystein Rich Domain*) sont localisés dans CR1. CR3 est un domaine kinase permettant l'activation de RAF par phosphorylation de 2 résidus (T599 et S602 pour BRAF). Il contient également un domaine amino-terminal contenant un motif SSDD, $S^{446}S^{447}D^{448}D^{449}$ pour BRAF, dont le résidu sérine S446 est constitutivement phosphorylé.

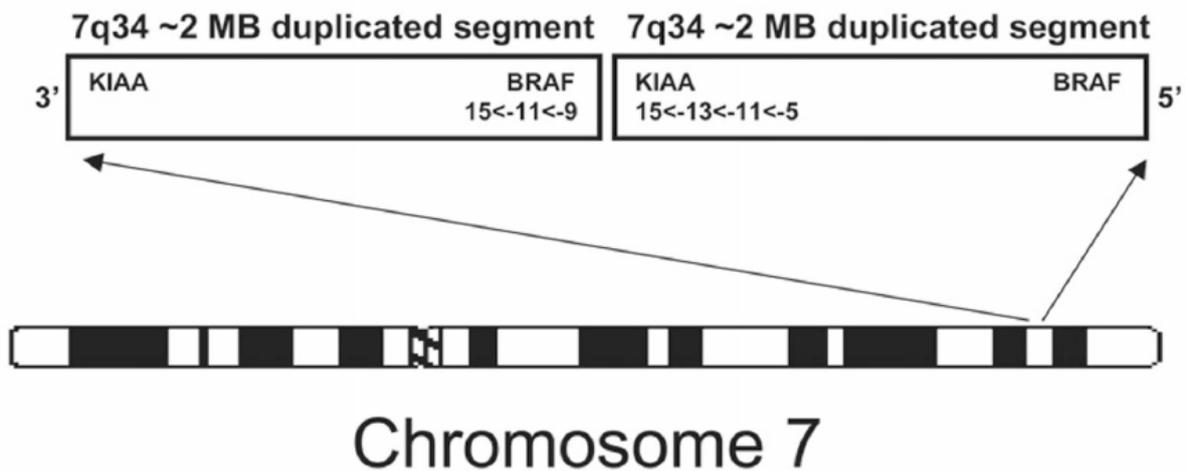


D'après Michaloglou et al., 2008 (48)

Figure 8 : Représentation schématique de la protéine BRAF

1. Fusion KIAA1549:BRAF

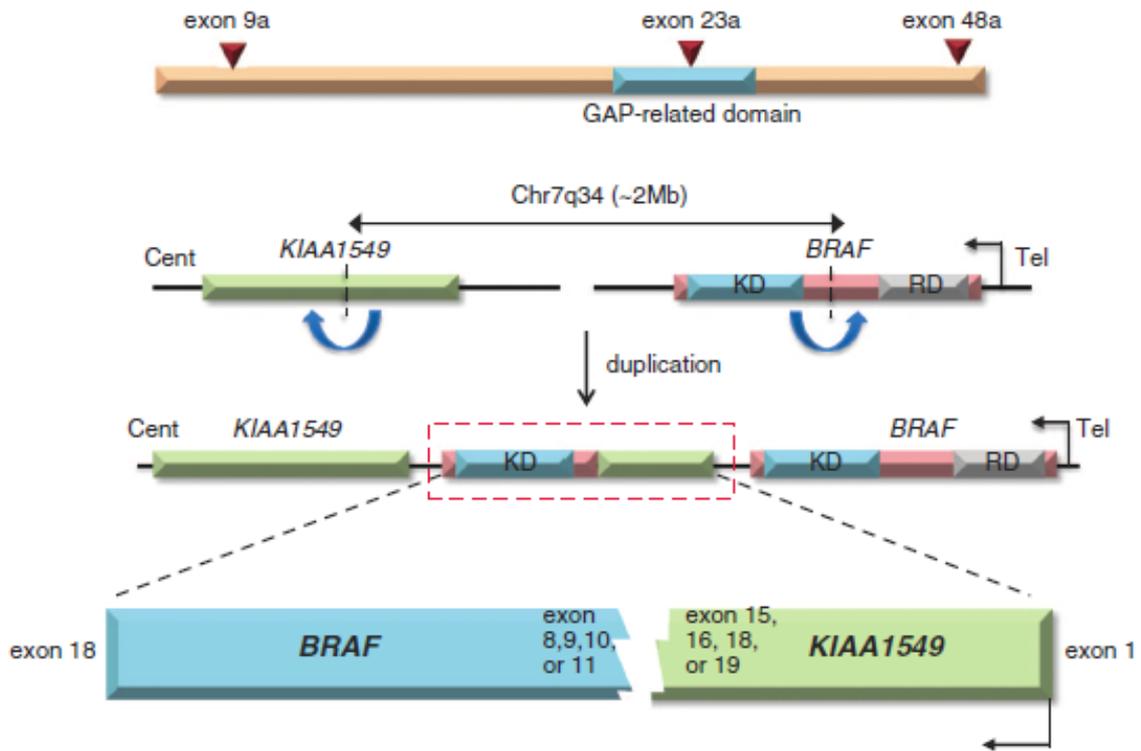
La fusion du gène *BRAF* avec d'autres gènes impliquant l'activation constitutive de la voie MAPKinase a été décrite initialement en 2005 dans les cancers de la thyroïde avec la fusion *AKAP9:BRAF* et en 2007 dans les mélanomes avec la fusion *FCHSD1:BRAF* (49, 50). En 2008, 2 équipes ont mis en évidence un gain fréquent en 7q34 correspondant à une duplication en tandem de l'oncogène *BRAF* dans 2/3 des AP (45, 51). En 2008 et 2009, d'autres équipes ont confirmé ces résultats et démontré que cette duplication en tandem dans la région de *BRAF* résultait d'une fusion *KIAA1549:BRAF* (10, 52, 53) (**Figure 9**).



D'après Sievert et al., 2009 (10, 53)

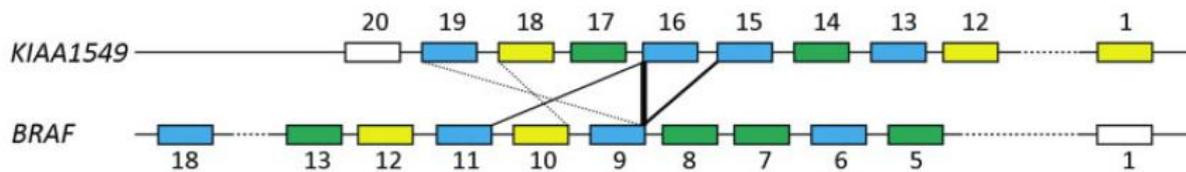
Figure 9 : La fusion *KIAA1549:BRAF*

Son mécanisme se résume par le remplacement de l'extrémité amino-terminale du gène *BRAF* par le gène *KIAA1549* (**Figure 10**). Il existe cinq principales combinaisons de fusion *KIAA1549:BRAF* décrites impliquant différents exons. Les 3 plus fréquentes sont : *KIAA1549^{exon-16}/BRAF^{exon-9}* ; *KIAA1549^{exon-15}/BRAF^{exon-9}* ; *KIAA1549^{exon-16}/BRAF^{exon-11}*. Les deux autres variants plus rares sont : *KIAA1549^{exon-18}/BRAF^{exon-10}* ; *KIAA1549^{exon-19}/BRAF^{exon-9}* (**Figure 11**) (52, 54). Dans tous les cas, la fusion produit la perte du domaine d'autorégulation en amino-terminal de BRAF et l'activation du domaine kinase (55).



D'après Chen et al., 2013 (39)

Figure 10 : Représentation schématique du gène de fusion *KIAA1549:BRAF*



D'après Forshew et al., 2009 (54)

Figure 11 : Représentation des cinq variants du gène de fusion *KIAA1549:BRAF*

Korshunov et son équipe ont démontré l'intérêt diagnostique de la fusion *KIAA1549:BRAF* permettant de distinguer les AP, qui l'expriment fortement (70%), des astrocytomes diffus et des gliomes de l'adulte (56). L'équipe de Jacob a montré également dans une étude sur 84 gliomes pédiatriques de bas grades que 66% des AP présentaient la fusion *KIAA1549:BRAF* contre aucun des 27 astrocytomes diffus (57). Enfin, une autre équipe a constaté que 97% (31/32) des AP avaient la fusion *KIAA1549:BRAF* qui les différenciaient ainsi des autres gliomes de bas grade et des AP pilomyxoïdes (0/18) (54) même si d'autres études ont rapporté cette fusion dans ces tumeurs (54, 58). Par ailleurs, dans une étude portant sur 124 AP, Hasselbalt et collaborateurs ont corrélié la fréquence de la fusion avec l'âge des patients au diagnostic : 79% de fusion pour des patients de 0 à 10 ans contre 7% pour des patients de plus de 40 ans (59). La présence de la fusion a également été associée à une localisation infratentorielle (45, 60). L'étude de Jacob a montré que 80% des AP cérébelleux avaient une fusion *KIAA1549:BRAF* contre 62.5% des AP des voies optiques et 14% des AP hémisphériques (57). Une étude menée en 2013 par Reis et collaborateurs confirme ces résultats (61). Enfin, des travaux sur une population pédiatrique de 125 patients n'ayant pu bénéficier d'une exérèse complète, ont rapporté que la présence de la fusion *KIAA1549:BRAF* était signe d'un phénotype clinique moins agressif et de bon pronostic et ceci indépendamment de la localisation tumorale, du grade histologique tumoral (gliome de grade I ou II) et d'un traitement de chimiothérapie néoadjuvante ou non (58).

D'autres fusions plus rares ont été identifiées. Il existe une fusion impliquant une autre protéine RAF : RAF1. Elle produit une protéine SRGAP3-RAF1, retrouvée à ce jour seulement dans 4 cas d'AP (54, 62). FAM131B-BRAF est une autre fusion encore plus rare et également retrouvée dans 1 seul cas d'AP (63). Ces deux fusions induisent elles aussi une activation constitutive de la voie MAPKinase.

2. Mutation BRAF^{V600E}

La mutation V600E est la plus fréquemment rapportée (15174 sur 15682 mutations de *BRAF* soit environ 97% de mutation V600E d'après le "Catalogue of Somatic Mutations in Cancer"). C'est une mutation de transversion d'une thymine en adénine au 1799^{ème} nucléotide conduisant au remplacement d'une valine (V) par un glutamate (E) au niveau du codon 600. La mutation est située entre les résidus T599 et S602 de la région CR3, où se produit la phosphorylation responsable de l'activité de BRAF. Ainsi, la mutation V600E induit une activation constitutive de la protéine conduisant ainsi à la phosphorylation des protéines de la cascade sous-jacente.

BRAF est la seule protéine RAF à être fréquemment mutée. Des mutations de BRAF ont déjà pu être identifiées dans différents cancers comme le mélanome et moins fréquemment dans le carcinome papillaire de la thyroïde, le carcinome colorectal, le carcinome des voies biliaires et le cancer de l'ovaire (48, 64-66).

Elle a été récemment décrite dans les tumeurs gliales notamment dans les AP, plus fréquemment dans les AP extra-cérébelleux (65, 66), mais comme nous le verrons dans les paragraphes suivants, elle est beaucoup plus fréquente dans les tumeurs glioneurales de type GG et PXA (65, 67, 68). En effet, dans l'étude de Pfister et collaborateurs, comprenant 66 astrocytomes pédiatriques dont 53 AP, seulement 3 (6%) portaient la mutation BRAF^{V600E} (45).

D'un point de vue pronostique, une étude portant sur une cohorte de 66 AP a montré que la mutation BRAF^{V600E} associée à l'expression du marqueur p16/CDKN2A était liée à une meilleure survie (69). Les auteurs ont proposé que la présence de la mutation BRAF^{V600E} induisant l'arrêt de la croissance cellulaire *via* p16 pouvait expliquer l'absence de transformation maligne voire la régression spontanée et le bon pronostic de ces tumeurs.

Enfin, notons que la présence de la mutation BRAF^{V600E} peut être associée ou non à la fusion *KIAA1549:BRAF*. En effet, dans l'étude d'Hawkins et collaborateurs, sur 70 AP, 3 avaient la mutation BRAF^{V600E} dont 2 avaient également la fusion *KIAA1549:BRAF* (58).

D. Autres aberrations génomiques

KRAS est une des protéines RAS la plus mutée dans différents cancers comme les cancers du pancréas (> 60%), les cancers colorectaux (35-40%), ceux des voies biliaires (33%), les cancers broncho-pulmonaires (18%) et les adénocarcinomes de l'endomètre et des ovaires (14%). La mutation de *KRAS* a été également décrite dans les AP mais cette mutation est plus rare (2% des AP) et résulte aussi dans l'activation de la voie MAPK (45). Forsheew et collaborateurs ont séquencé les gènes de *HRAS*, *KRAS*, and *NRAS* dans une cohorte d'astrocytomes de bas grade pédiatriques et ont trouvé une mutation du gène *KRAS* dans un AP cérébelleux qui ne présentait pas de fusion de *BRAF* ni de *RAF1* (54). De plus, Cin et collaborateurs ont examiné 125 astrocytomes et ont identifié 2 tumeurs portant la mutation *KRAS* (63). Les gènes *NRAS* et *HRAS* sont beaucoup moins souvent mutés et peuvent induire le cancer de la peau et de la thyroïde (40). Les mutations de ces gènes ne sont pas retrouvées dans les gliomes de bas grade et il n'a pas encore été décelé de mutation de *RAF1* (70).

D'autres altérations génétiques ont été retrouvées pour quelques cas exceptionnels. Une étude portant sur 331 gliomes et tumeurs glioneuronales a mis en évidence un AP portant une mutation de PTEN généralement retrouvée dans les GB (71). Une méthylation anormale de l'ADN peut aussi être retrouvée dans les AP. Une étude récente a décrit une méthylation différentielle de certains gènes du développement, comme *NR2E1* et *EN2*, selon la localisation de la tumeur (supra-tentorielle vs infra-tentorielle) (72).

II. Les xanthoastrocytomes pleïmorphes (PXA)

À ce jour, peu de données sont disponibles sur les altérations génétiques des PXA mais l'altération majeure et caractéristique de ces tumeurs est la mutation $BRAF^{V600E}$ souvent associée à une délétion de *p16/CDKN2A*.

A. Mutation $BRAF^{V600E}$ et délétion de *p16/CDKN2A*

La présence de la mutation $BRAF^{V600E}$ est une altération connue dans les PXA avec une fréquence de l'ordre de 65% (65, 73, 74). L'étude de Dias-Santagata a démontré que la mutation $BRAF^{V600E}$ serait présente de préférence dans les PXA moins agressifs : 60% dans les PXA de grade II contre 17% dans les PXA anaplasiques (73).

Une autre altération génétique retrouvée fréquemment dans les PXA (60%) est la délétion du chromosome 9p21.3 portant le gène suppresseur de tumeur *p16^{INK4a}/CDKN2A* (75).

Forsheew et collaborateurs ont rapporté le cas d'1 PXA présentant cette double altération (54). Une autre étude a décrit 6 PXA ayant la mutation $BRAF^{V600E}$ et également la délétion du chromosome 9p21.3 (74).

D'un point de vue mécanistique, la mutation $BRAF^{V600E}$ a déjà été décrite dans les cellules humaines de mélanocytes comme induisant l'activation de *CDKN2A* (*p16^{INK4a}*) et provoquant ainsi la sénescence des cellules (76). Par ailleurs, la mutation de *BRAF* seule n'est pas suffisante pour déclencher la tumorigénèse dans un modèle murin, mais la combinaison de la mutation de *BRAF* associée à la délétion de *CDKN2A* permet la formation d'une tumeur (65, 77). Ainsi, il semble possible que les PXA contournent l'induction de la sénescence par la mutation $BRAF^{V600E}$ lorsque celle-ci est associée à la délétion de *CDKN2A* (65). Cette association d'altérations moléculaires est fréquemment retrouvée dans les astrocytomes diffus de grade II à IV qui constituent un sous-groupe d'astrocytomes pédiatriques plus agressifs (68, 70).

B. Autres aberrations génomiques

D'autres altérations moléculaires des PXA ont été décrites comme la mutation de *TP53* avec une fréquence d'environ 5% (73, 78), la perte des chromosomes 17, 8, 18 et 22 ou le gain du chromosome X, 7, 9q, 20, 4, 5 et 19 (75). Aucune amplification du *REGF*, de *MDM2*, ou *CDK4* n'a été retrouvée (78). La fusion *KIAA1549:BRAF* n'a pas été détectée dans les PXA (45, 67, 73).

III. Les gangliogliomes (GG)

Les altérations génétiques des GG sont assez peu connues mais une des altérations majeures est la mutation $BRAF^{V600E}$.

A. Mutation $BRAF^{V600E}$ et délétion de *CDKN2A*

La mutation $BRAF^{V600E}$ est une des altérations génétiques les plus fréquentes dans le GG avec une fréquence de 13 à 57% (67, 74, 79). Dans l'étude de Schindler, cette mutation est plus fréquemment retrouvée dans les GG localisés au niveau temporal. De plus, les GG de grade III présentent beaucoup plus la mutation que les GG de grade I (50% grade III vs 18% grade I) (65, 68). Certains auteurs proposent l'existence d'un sous-groupe de GG ayant la mutation $BRAF^{V600E}$ qui ressemblerait aux PXA (65, 79). Plus récemment, une étude comportant la plus grande cohorte de GG pédiatriques de grade I (53 tumeurs), a montré que 38,3% de tumeurs avaient la mutation $BRAF^{V600E}$. La présence de cette mutation serait associée à une survie plus courte (80).

Comme pour les PXA, la mutation $BRAF^{V600E}$ est souvent retrouvée avec la délétion du chromosome 9p21 incluant *CDKN2A*. Dans l'étude de Schindler et collaborateurs, 10% des GG présentent une délétion 9p21 (65). De même, Dougherty et son équipe ont retrouvé deux tumeurs ayant la délétion 9p21 dont une des tumeurs avait la mutation $BRAF^{V600E}$ (67).

B. Autres aberrations moléculaires

À ce jour, aucune altération de *PTEN* ou du *REGF* n'a été retrouvée dans les GG (71, 81). Par ailleurs, la mutation du gène suppresseur de tumeur *TP53*, retrouvé principalement dans les astrocytomes diffus, a été retrouvée dans quelques GG au niveau de la composante gliale (82, 83). Un cas a présenté la mutation de *TP53* principalement au niveau de la composante neuronale (84). Un autre cas isolé de GG bénin ayant une mutation du gène *TP53* a rechuté et

progressé en GB suggérant que l'inactivation du gène *TP53* a un potentiel de transformation maligne (82).

La fusion *KIAA1549:BRAF* est très rare dans les GG (10, 45, 57, 74, 85).

D'autres altérations connues dans les GG sont un gain du chromosome 5, 7, 8 et 12 et la perte des chromosomes 9, 10 et 22. On constate également une amplification de l'oncogène *CDK4* et une perte du gène suppresseur de tumeur *DMBT1* trouvée seulement dans la composante gliale des GG anaplasiques (67, 86).

IV. Les tumeurs neuroépithéliales dysembryoplasiques (DNT)

Peu d'altérations génétiques des DNT ont été décrites à ce jour. Les principaux travaux incluant des DNT sont présentés ci-dessous.

A. Altérations de BRAF

Avant nos travaux, présentés dans cette thèse, deux études rapportaient respectivement seulement 4 et 5 cas de DNT pour lesquels une recherche de la mutation *BRAF*^{V600E} avait été réalisée et les résultats se sont avérés négatifs (65, 67). En revanche, dans une série de 20 DNT que nous présenterons dans la deuxième partie de ce manuscrit (cf. Deuxième partie, II.A), nous avons retrouvé cette mutation dans 6 cas. Aucune publication n'a rapporté de fusion *KIAA1549:BRAF* dans les DNT.

B. Autres altérations moléculaires

1. Mutation IDH1

Les mutations de l'isoforme 1 ou 2 de l'enzyme isocitrate déshydrogénase (IDH1 et IDH2) sont fréquemment retrouvées dans les gliomes de l'adulte. La mutation d'IDH1 la plus fréquente affecte l'acide aminé R132. Elle concerne plus de 80% des gliomes diffus de l'adulte de grade II ou III et les GB secondaires (67, 87, 88). La mutation la plus fréquente d'IDH2 affecte l'acide aminé R172 (89). Ces mutations chez l'adulte sont associées à un bon pronostic. La littérature rapporte peu de données concernant les DNT et les mutations d'IDH. L'étude de Capper et collaborateurs comprenant 274 échantillons de tumeurs cérébrales adultes et pédiatriques n'a pas détecté de mutation d'IDH parmi 21 DNT (90).

2. TP53 et 1p19q

La mutation de *TP53* et la codélétion des chromosomes 1p et 19q permettent depuis plusieurs années de distinguer les astrocytomes des oligodendrogliomes de l'adulte. En effet, les mutations de *TP53* sont plus particulièrement retrouvées dans les astrocytomes alors que la codélétion 1p19q est caractéristique des oligodendrogliomes (91, 92).

La codélétion 1p19q semble exceptionnelle dans les oligodendrogliomes de l'enfant. Les deux études pédiatriques principales de la littérature concernent toutes les deux un très faible nombre de gliomes de grade II (93, 94). Elles ne retrouvent que très peu ou pas de codélétion 1p19q. Deux études ont recherché la délétion du 1p ou la codélétion 1p19q dans les DNT mais aucune n'a retrouvé cette anomalie (95, 96).

La mutation de *TP53* est également rare dans les gliomes pédiatriques mais fréquente dans les haut grade pédiatriques (97). Très peu de recherches existent concernant cette mutation dans les DNT. L'étude de Dougherty et son équipe comprenant 3 DNT ne retrouve pas d'altération de *TP53* (67).

Il y a quelques mois, 3 études de grande envergure ont rapporté des données primordiales concernant la caractérisation des gliomes pédiatriques de bas grade en décrivant de nouvelles altérations dont la duplication du gène *FGFR1* (*fibroblast growth factor receptor 1*) ou un réarrangement des gènes *MYB* (*v-myb avian myeloblastosis viral oncogen homolog*) et *MYBL1* dans les séries analysées (85, 98, 99). Ces travaux, publiés après ceux présentés dans cette thèse, seront exposés et discutés dans la deuxième partie de ce manuscrit.

Chapitre 3. Nouvelle approche thérapeutique dans la prise en charge de l'astrocytome pilocytique réfractaire aux traitements conventionnels

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, les AP hypothalamo-chiasmatiques sont des tumeurs d'évolution lente, mais très invalidantes, s'accompagnant d'une cécité progressive et de troubles endocriniens majeurs, contrairement aux AP de la fosse postérieure. L'exérèse totale n'est pas possible de par la localisation de la tumeur et la chimiothérapie conventionnelle est peu efficace et comporte des effets secondaires notoires comme des altérations cognitives. Il est donc urgent de développer une stratégie pour le traitement de ces tumeurs qui soit efficace et bien tolérée d'autant plus qu'il s'agit d'une population pédiatrique.

I. Mise en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques dans l'AP hypothalamo-chiasmatique

A. Une signature moléculaire spécifique

En 2009, notre équipe a comparé le transcriptome de 6 AP de la fosse postérieure à celui de 5 AP hypothalamo-chiasmatiques afin de déterminer si les différences de pronostic de ces deux tumeurs étaient liées à des signatures moléculaires distinctes (100). En effet, les résultats des analyses transcriptomiques ont permis de décrire une signature moléculaire spécifique à chaque localisation tumorale. Parmi les 349 gènes surexprimés dans les AP hypothalamo-chiasmatiques, 36 codaient pour des protéines impliquées dans l'adhésion, la migration et l'angiogenèse, 38 dans le cycle cellulaire et 11 dans l'apoptose et 27 gènes jouaient un rôle majeur au cours du développement cérébral. Cette étude a permis de mettre en évidence des gènes codant pour des molécules constituant des cibles thérapeutiques potentielles dans le traitement des AP hypothalamo-chiasmatiques : *CRK*, *IQGAP1/Cdc42*, *ICAM1* et *CD36*. Ces gènes sont impliqués dans les processus de migration, d'adhésion et de prolifération cellulaire et sont les cibles de deux molécules thérapeutiques déjà employées mais avec une autorisation de mise sur le marché (AMM) délivrée pour le traitement d'autres pathologies, le celecoxib et la fluvastatine. Nous allons présenter ces deux molécules au début de ce chapitre ainsi que leurs cibles d'action et les voies de signalisation activées en aval. Nous nous intéresserons

ensuite à leur utilisation dans le traitement de certains cancers selon une stratégie thérapeutique relativement nouvelle appelée thérapie métronomique.

B. Le celecoxib et ses cibles

1. Présentation du celecoxib

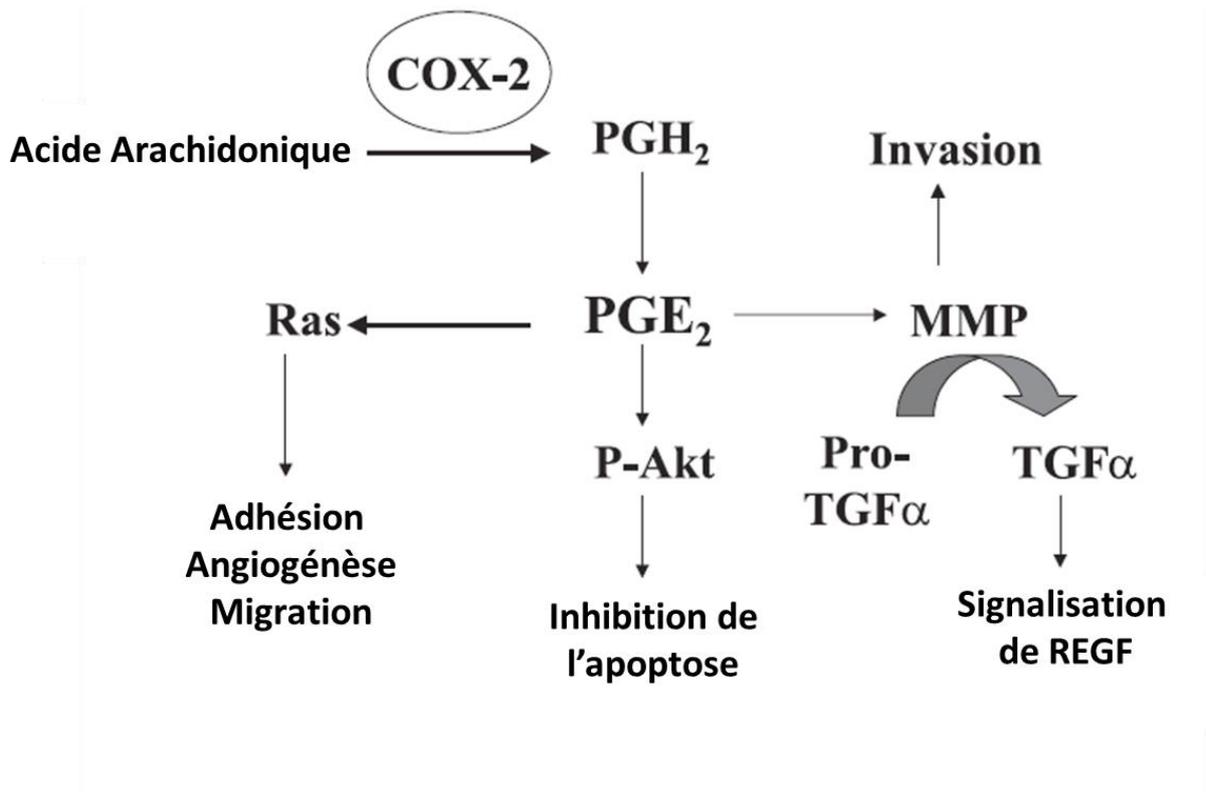
Le celecoxib est un médicament anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) appartenant à la famille des COXIBs et inhibant la cyclooxygénase 2 (COX-2). Depuis quelques années, des études ont montré que le celecoxib avait un effet anti-cancéreux en inhibant la survie des cellules tumorales de manière COX-2-dépendante mais également avec des mécanismes COX-2-indépendants.

➤ Voie COX-2 dépendante

L'action des enzymes COXs (isoformes COX-1 et COX-2) permet la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines H₂ (PGH₂) (**Figure 12**). Les prostaglandines régulent un grand nombre de processus physiologiques comme les réactions inflammatoires, les ulcérations et la thrombose.

COX-1 est constitutivement exprimé et contrôle les processus non tumoraux.

En revanche, l'expression de COX-2 est induite par des agents inflammatoires (TNF, cytokines, facteurs de croissance, hormones) et sa surexpression est souvent observée dans les processus cancéreux. En effet, elle a été retrouvée, associée à un mauvais pronostic, dans le cancer des ovaires, le cancer colorectal, du poumon, du sein, de la prostate, et du cerveau (101). Elle induit plusieurs mécanismes pro-tumoraux, notamment une activation de la molécule anti-apoptotique BCL2 aboutissant à la survie de la cellule tumorale. De plus, la synthèse des prostaglandines induite par COX-2 favorise l'angiogénèse tumorale notamment en augmentant l'expression de l'EGF et de son récepteur (REGF). Enfin, l'invasion tumorale et la formation de métastases sont également augmentées par la surexpression de métalloprotéases (MMP) induites par COX-2 (**Figure 12**) (101). Le celecoxib, en inhibant COX-2, permet donc de bloquer cette tumorigénèse.



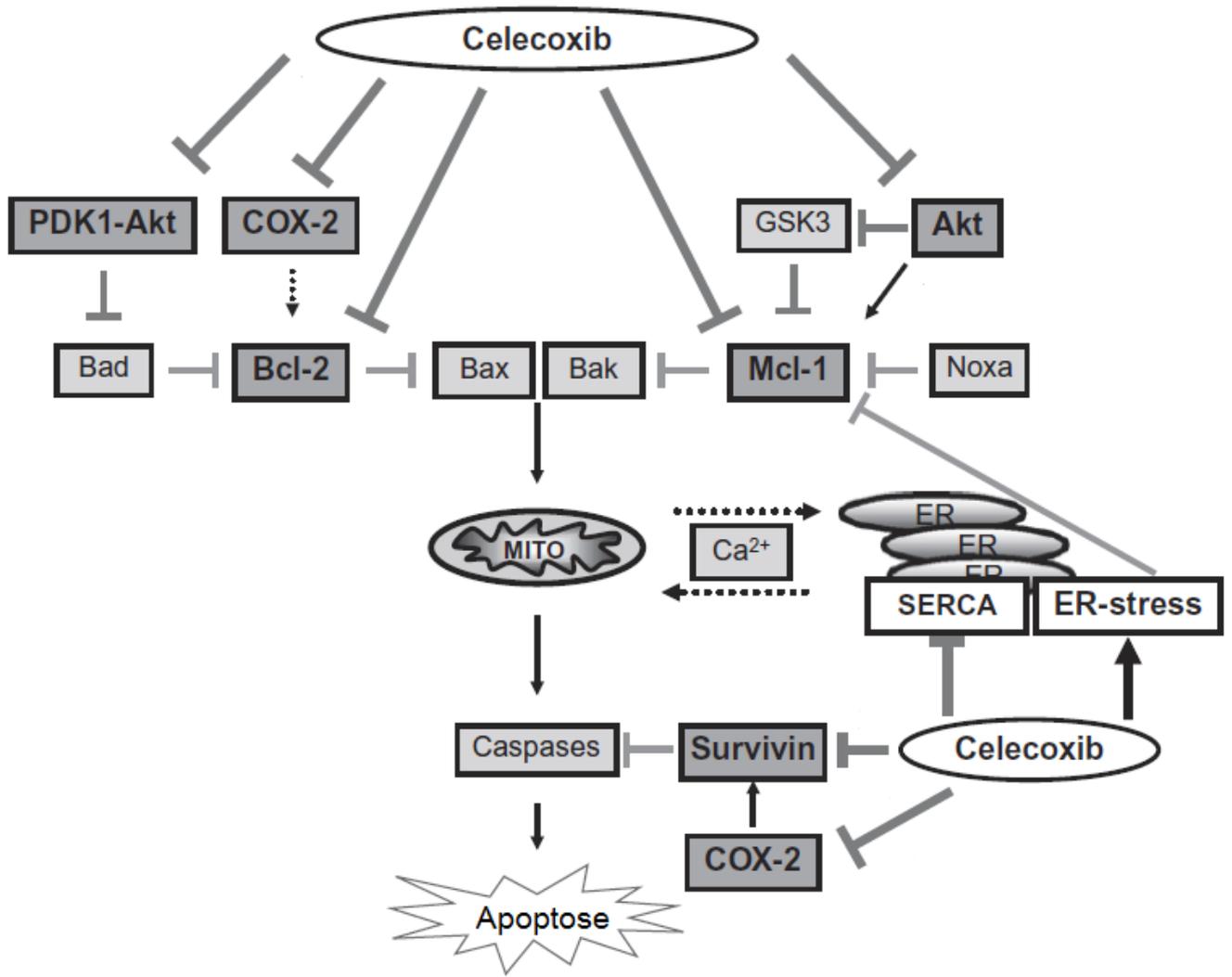
D'après Gosh et al., 2010 (101)

Figure 12 : Régulation de la voie de la PGH₂ par COX-2 et ses fonctions cellulaires

➤ **Voie COX-2-indépendante**

Le celecoxib peut interagir avec d'autres protéines, indépendamment de COX-2, pour inhiber la survie des cellules tumorales en interagissant avec les voies de signalisation de l'apoptose (**Figure 13**) (102):

- Il peut bloquer l'expression de protéines anti-apoptotiques comme BCL2 et MCL1 induisant une augmentation des protéines pro-apoptotiques BAX et BAK.
- Il diminue également l'expression de la survivine qui est un membre de la famille des protéines inhibitrices de l'apoptose en bloquant l'activation des caspases. En bloquant la survivine, le celecoxib inhibe la croissance des cellules tumorales. COX-2 peut également induire une résistance de l'apoptose en activant la survivine. Ainsi, la diminution d'expression de cette protéine pourrait partiellement être COX-2-dépendante.
- Enfin, le celecoxib inhibe la survie cellulaire tumorale en bloquant d'autres protéines impliquées dans le contrôle de la survie et de la mort cellulaire : la protéine kinase B (AKT), la phosphatidylinositol-3-kinase (voie PI3K/PDK1/AKT), la protéine SERCA (101, 102).



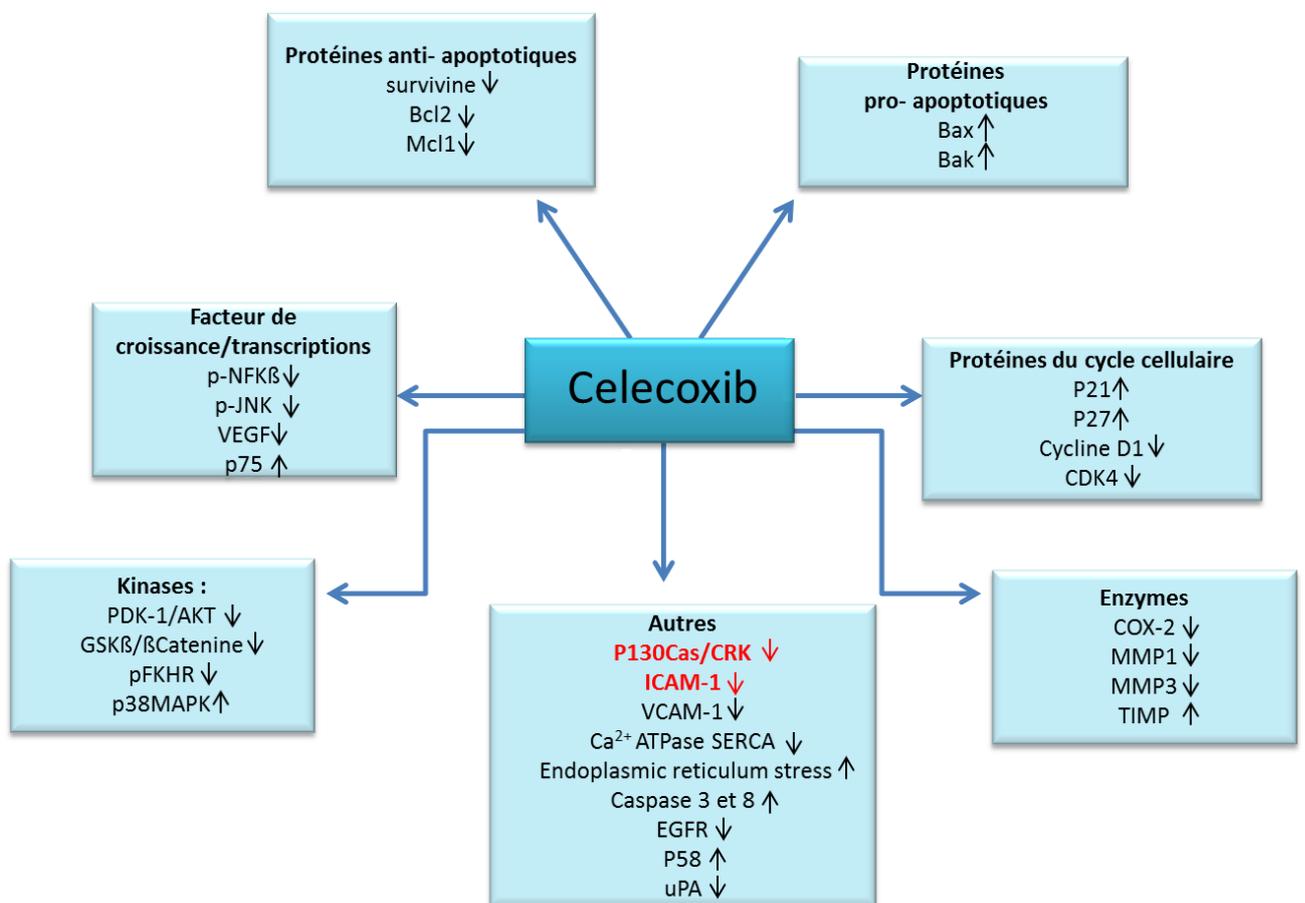
D'après Jendrossek et al., 2011(102)

Figure 13 : Interaction du celecoxib avec les voies de signalisation de l'apoptose

Le celecoxib agit également au niveau d'autres processus permettant d'inhiber la survie des cellules tumorales. Il peut notamment :

- réguler le cycle cellulaire pour induire un arrêt du cycle (augmentation de l'expression des inhibiteurs du cycle cellulaire, p27 et p21, de l'expression de la cycline D1 et de la kinase CDK4)
- réguler négativement la transcription de différents facteurs, d'enzymes, et de kinases permettant la prolifération cellulaire, l'angiogénèse et la formation de métastases.

Ces processus sont résumés dans la **Figure 14**.



Adapté de Winfield et al., 2012 (103)

Figure 14 : Mécanisme d'action du celecoxib influençant la survie cellulaire tumorale

Des études *in vitro* sur des lignées cellulaires cancéreuses du colon et du poumon ont montré que l'utilisation d'AINS pouvait augmenter les effets des traitements de la chimiothérapie ou de la radiothérapie sur la croissance et le développement tumoral (104, 105). Mann et collaborateurs ont également décrit que le celecoxib réduisait la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo* sur une lignée de cancer colorectal (HCA-7) et sa combinaison avec l'herceptine a montré une inhibition complète de la croissance tumorale (106).

Egalement, une étude de phase II portant sur 29 patients souffrant de cancer du poumon et testant l'administration quotidienne du celecoxib combinée à deux cycles de paclitaxel, de carboplatine, et suivie d'une résection chirurgicale, a montré que 48% des patients avait une réponse partielle et 17% une réponse complète. L'ajout du celecoxib a permis d'inhiber l'expression de PGE₂ responsable de la formation de métastase, de la stimulation de l'angiogenèse et de l'inhibition de l'apoptose (107).

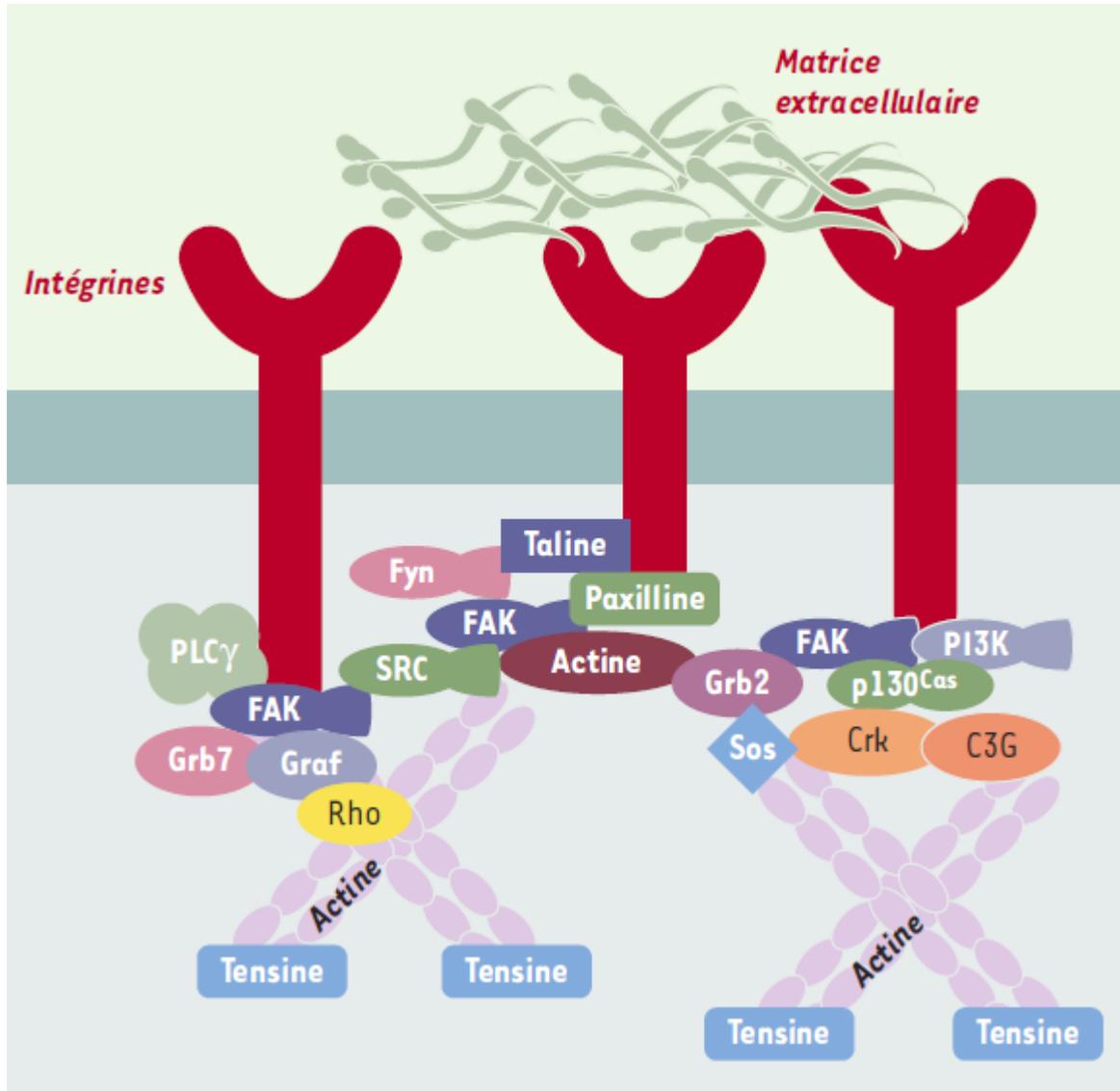
2. CRK

CRK est une protéine kinase contenant des domaines SH2/SH3 permettant la phosphorylation et donc l'interaction de différentes protéines dont une protéine de 130 kDa, p130Cas (*Crk-associated substrate 130 kDa*) (108). La protéine p130 joue un rôle important dans la transduction du signal médiée par le motif SH2 de CRK dans la transformation maligne de la cellule (108). La protéine CRK est surexprimée dans certains cancers incluant les tumeurs cérébrales. Une étude a montré que l'inhibition de la protéine CRK dans la lignée KMG4 de GB par siRNA, diminue la motilité de ces cellules et la croissance tumorale *in vivo* (109).

On retrouve CRK et la protéine p130Cas, au niveau des complexes d'adhérence focale qui sont particulièrement importants dans la transmission du signal relayé par les intégrines. D'autres protéines forment ces complexes : la protéine FAK (*focal adhesion kinase*), les protéines du cytosquelette dont l'actine, la paxilline, la taline et des protéines participant au remaniement du cytosquelette comme la PI3K. L'ensemble de ces protéines forme ainsi de larges structures sous-membranaires (**Figure 15**) (110).

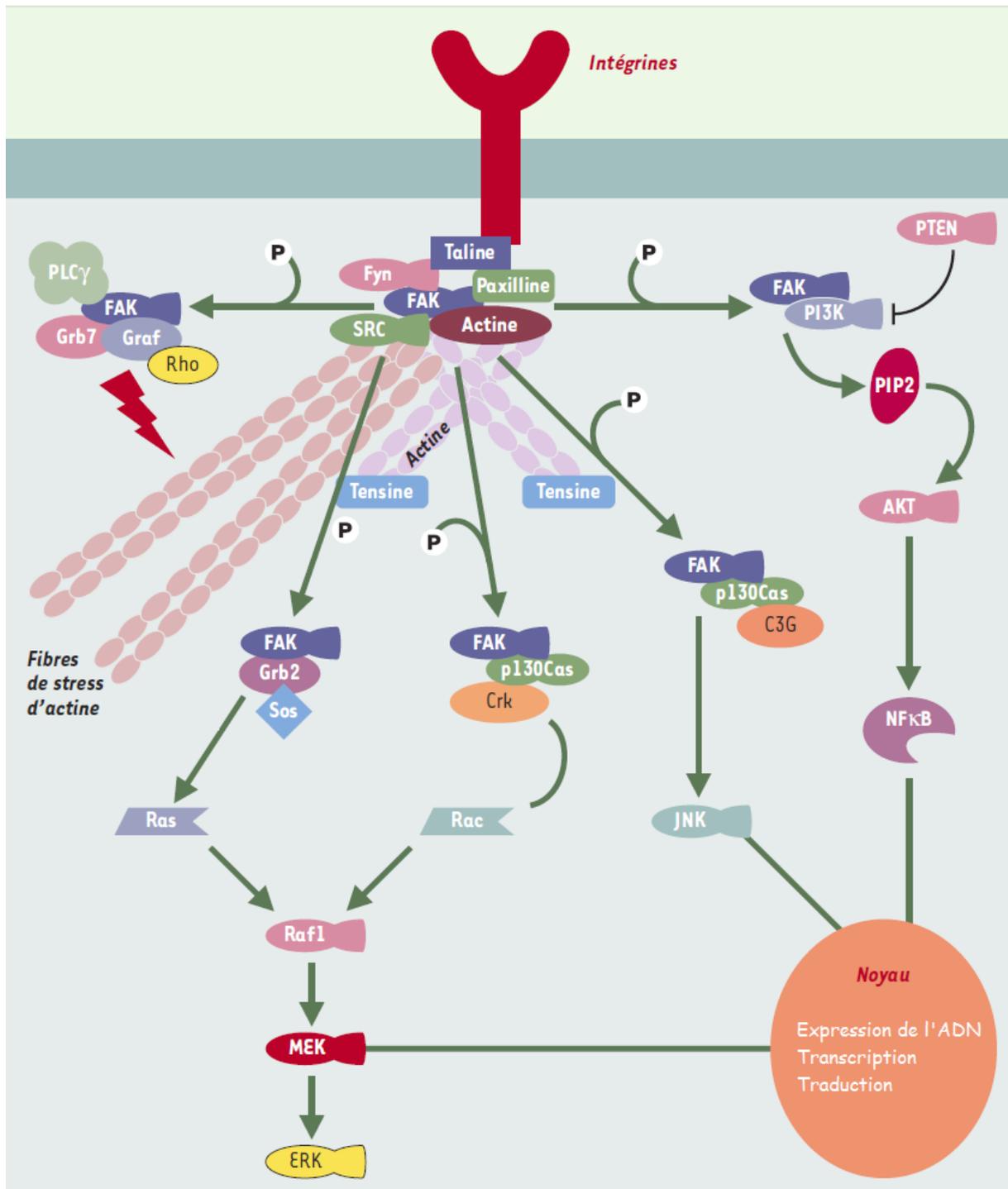
Les intégrines, les facteurs de croissance et des hormones activent la protéine FAK qui subit une phosphorylation en cascade de résidus tyrosine. Après son activation, la protéine FAK phosphorylée libère plusieurs sites de fixation pour des protéines contenant des domaines SH2/SH3 qui vont permettre le recrutement successif de protéines du complexe dont la p130Cas, qui forment un complexe avec CRK. Ce complexe active ensuite les protéines

MEK/ERK de la voie MAPKinase (**Figure 16**). Ainsi, CRK contrôle les processus de prolifération, de migration et de survie cellulaire (110).



D'après Cornillon et al., 2003 (110)

Figure 15 : Représentation schématique du complexe d'adhérence focale incluant la protéine CRK



D'après Cornillon et al., 2003 (110)

Figure 16 : Représentation schématique des différentes voies de signalisation induites par le complexe d'adhérence focale

En 2006, Casanova et collaborateurs ont montré que la mort de cellules de cancer du côlon par anoïkis (mort cellulaire par la dérégulation du complexe d'adhésion focal induisant la perte de l'attachement de la cellule à la matrice extracellulaire) peut être induite par le celecoxib en dérégulant la protéine p130Cas associée à CRK (111). En 2008, la même équipe a montré que le celecoxib peut également induire l'apoptose induite par la caspase 8 dans des cellules cancéreuses de leucémies myéloïdes aiguës, en inhibant la signalisation du complexe d'adhésion focal à travers p130Cas, FAK et c-Src (112).

3. ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1)

ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) et VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) sont des glycoprotéines de la superfamille des immunoglobulines et sont impliquées dans le trafic des leucocytes à travers les barrières endothéliales et épithéliales mais aussi dans la formation des métastases et dans la réponse immunitaire. Les cellules épithéliales humaines n'expriment pas ICAM-1 et VCAM-1 mais leur expression est induite lors d'une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme IFN γ , IL-1 β ou IL-6 (113, 114). Les ligands de ICAM-1 et VCAM-1 sont respectivement LFA-1 et VLA-4 exprimés à la surface des cellules sanguines et endothéliales (115). Leur interaction permet l'adhésion de cellules cancéreuses à l'endothélium et la formation de métastases.

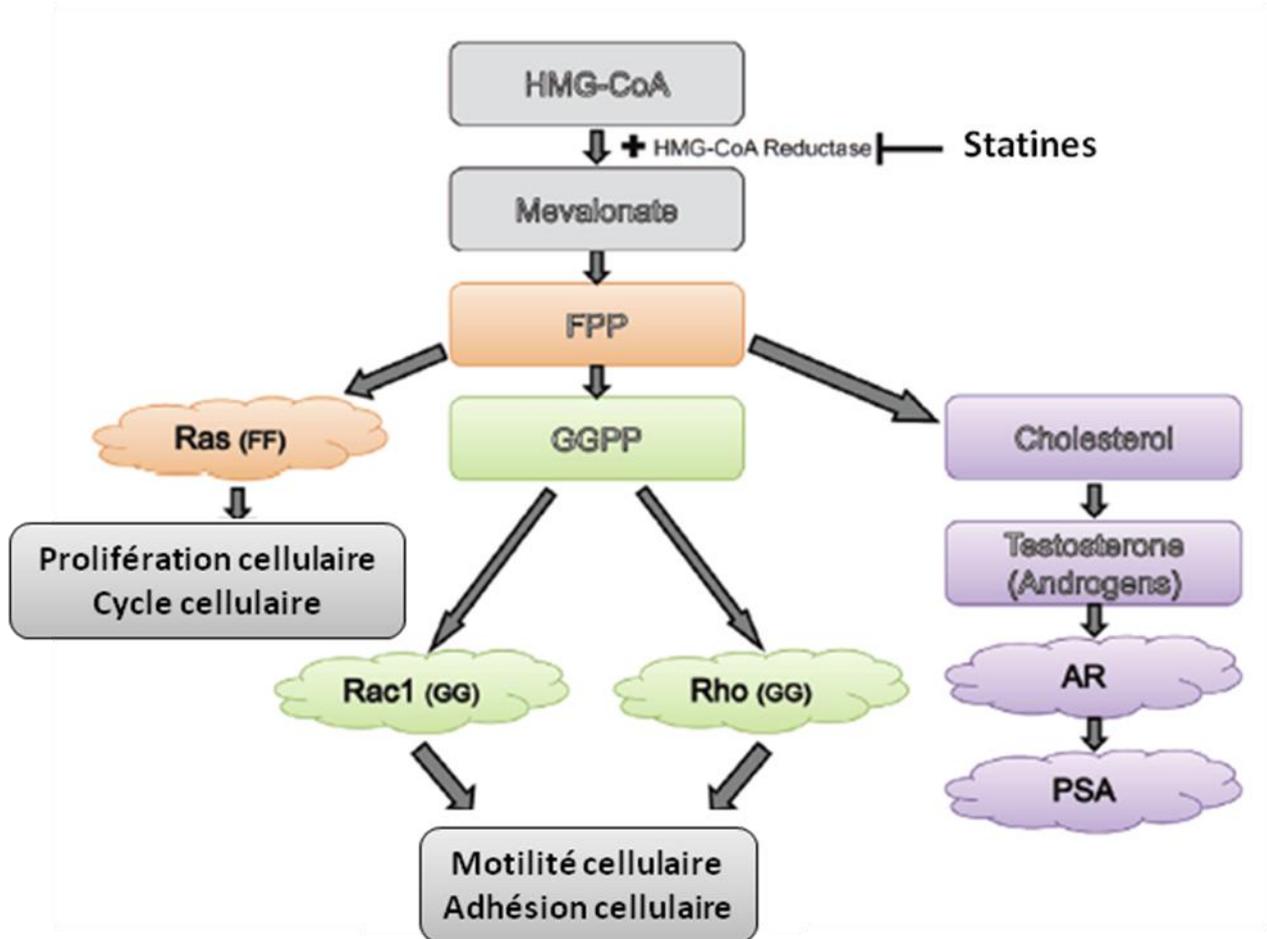
Certaines cellules cancéreuses expriment anormalement ICAM-1 et/ou VCAM-1, comme les cellules HT29 (lignée de cancer du côlon). Gallicchio et collaborateurs ont démontré que le celecoxib induit une forte diminution de l'expression des protéines ICAM-1 et VCAM-1 par les cellules HT29, affectant l'adhérence de ces cellules. Cette inhibition active également une voie pro-apoptotique en activant deux protéines de la famille BCL2, BAX et BID et inhibe les protéines p38 et p55 de la voie MAPKinase (116). Plus récemment, une autre étude a confirmé ces résultats (117).

C. La fluvastatine et ses cibles

1. Présentation de la fluvastatine

Les statines sont des drogues administrées pour le traitement de l'hypercholestérolémie car elles inhibent le taux du cholestérol LDL (*low-density lipoprotein*) en inhibant la synthèse de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) réductase qui catalyse la conversion

de l'HMG-CoA en mévalonate. Le mévalonate conduit à la synthèse de métabolites isoprénoïdes servant à la synthèse finale du cholestérol (**Figure 17**) (118, 119).



D'après Roy et al., 2011 (119)

Figure 17 : Représentation schématique de la synthèse du cholestérol à partir de l'HMG-CoA et l'activation des différentes voies

Depuis quelques années, des études mettent en évidence que les statines pourraient avoir un rôle dans la prévention et le traitement contre le cancer grâce à leur implication dans différentes fonctions cellulaires comme la prolifération et la différenciation. Par exemple, des études *in vitro* et *in vivo* ont démontré que les statines inhibent la croissance tumorale et induisent l'apoptose dans différents cancers incluant les mélanomes, les gliomes et les neuroblastomes (120-122). De même, des études cliniques ont démontré le potentiel anti-tumoral des statines aboutissant à une meilleure survie des patients souffrant de carcinome hépatocellulaire, de GB et d'astrocytome anaplasique (123, 124).

➤ **Inhibition de la croissance tumorale par les statines**

Le cholestérol est un composant majeur de la membrane cellulaire et sa synthèse est fortement reliée aux processus de croissance cellulaire. En effet, la synthèse du mévalonate induit la synthèse du cholestérol mais est aussi un précurseur de différentes protéines incluant le farnesylpyrophosphate (FPP) et le geranylpyrophosphate (GGPP) régulant le cycle cellulaire. Le FPP et le GGPP stimulent les protéines RAS GTPases (RHO, RAC, RAS) impliquées dans la prolifération, le cycle cellulaire, la motilité et l'adhésion cellulaire (**Figure 17**). Ces voies sont donc inhibées lorsque les statines inhibent la synthèse du mévalonate (118, 125).

➤ **Induction de l'apoptose par les statines**

Les statines activent également l'apoptose en activant des protéines pro-apoptotiques (BAX, et BIM) et en inhibant des protéines anti-apoptotiques (BCL2) (118). Par exemple, la lovastatine peut augmenter l'expression de la protéine BIM et induire la mort cellulaire de plusieurs lignées cellulaires de GB (126).

➤ **Inhibition de l'angiogenèse et des métastases par les statines**

Les statines ont une double action sur l'angiogénèse : elles peuvent inhiber ou activer la formation de vaisseaux selon le type cellulaire. Weis et collaborateurs, ont montré qu'à faibles doses, la cerivastatine et l'atorvastatine augmentent la prolifération des cellules endothéliales mais inhibent significativement l'angiogénèse à hautes doses (127).

Les statines inhibent également le potentiel métastatique des cellules tumorales en inhibant la migration et l'attachement à la matrice extracellulaire (118).

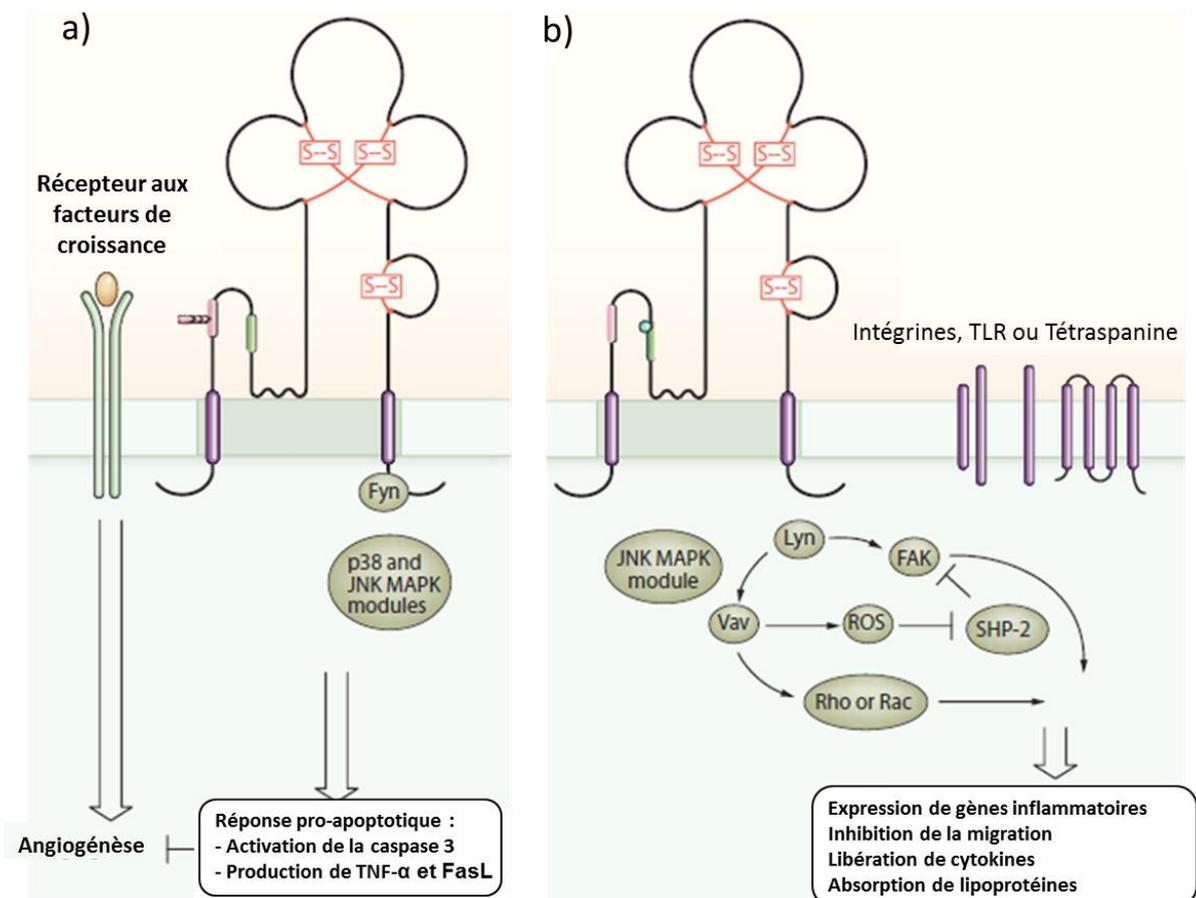
2. CD36

CD36 est une glycoprotéine membranaire présente à la surface de différents types cellulaires comme les plaquettes, les phagocytes mononucléaires, les adipocytes, les hépatocytes, les myocytes et les cellules endothéliales. CD36 appartient à une famille de protéines comprenant deux autres membres : LIMP-2 (*lysosomal integral membrane protein-2*) et CLA-1 (*CD36 and LIMP-2 analogous*), aussi appelé SRB-1 (*scavenger receptor B-1*). CD36 est situé au niveau de la membrane et peut donc interagir avec d'autres récepteurs membranaires lui permettant d'avoir plusieurs fonctions (128) :

- ✓ Sur les cellules endothéliales, CD36 est un récepteur de la thrombospondine et fonctionne comme un régulateur négatif de l'angiogénèse (**Figure 18a**).

- ✓ Sur les phagocytes, CD36 peut se lier avec des phospholipides et lipoprotéines participant ainsi à l'internalisation des cellules apoptotiques ou d'autres pathogènes. CD36 intervient dans la réponse inflammatoire (**Figure 18b**).
- ✓ Il peut également se lier aux longues chaînes d'acide gras favorisant ainsi l'absorption des lipides et conduisant à l'activation du récepteur nucléaire PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor*) contrôlant la transcription de nombreux gènes impliqués dans la différenciation, la prolifération et l'apoptose de divers types cellulaires.

La transduction du signal de CD36 active plusieurs protéines de la voie MAPKinase (p38, JNK, MAPK) (**Figure 18**).



D'après Silverstein et al., 2009 (128)

Figure 18 : Mécanismes d'action du CD36 induisant la voie MAPKinase

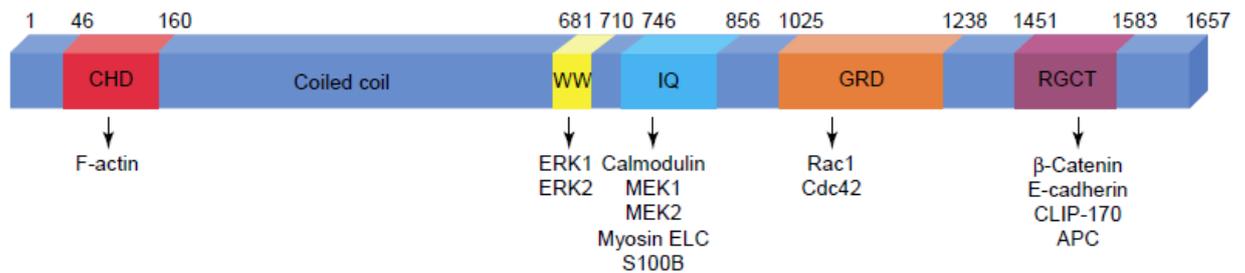
a) Dans les cellules endothéliales, CD36 inhibe l'angiogénèse. **b)** Dans les macrophages et les monocytes, CD36 induit la réponse inflammatoire et la phagocytose.

Une étude a démontré que le traitement d'une lignée murine de macrophages par la pivalstatine diminuait l'expression de l'ARNm CD36 mais également l'expression de cette protéine à la surface des macrophages (129). Une étude clinique a également montré que l'expression de CD36 par les monocytes de patients souffrant de syndrome coronarien aigu, était fortement diminuée après un traitement d'atorvastatine (130).

3. IQGAP1

La protéine IQGAP1 est une protéine appartenant à une famille de protéines IQ-GAP. Cette famille comporte 2 autres protéines : IQGAP2 et IQGAP3. IQGAP1 est la protéine de cette famille la plus étudiée et la mieux caractérisée car, en plus d'être la première découverte, elle est retrouvée dans de nombreux tissus et sa localisation dans la cellule dépend du type cellulaire. Elle possède un grand nombre de domaines qui vont permettre l'interaction avec plusieurs protéines. Elle contient notamment (**Figure 19**) (131) :

- Un domaine ayant une activité d'hydrolyse du GTP, RAS-GAP (*RAS-GTPase Activating Protein*) appelé domaine "GRD" permettant l'activation de petites RHO GTPases, CDC42 et RAC impliquées dans la dynamique du cytosquelette d'actine (132).
- Le domaine RGCT permettant d'établir des contacts cellule-cellule en se liant avec la β -caténine et la E-cadhérine permettant ainsi la régulation des jonctions adhérentes aux contacts intercellulaires.
- Le motif « IQ » permettant de moduler la voie de signalisation des MAPKinases, en fixant les protéines MEK1 et MEK2. IQGAP1 peut donc participer à la prolifération et à la différenciation cellulaire.
- Le domaine WW présentant toutes les fonctionnalités des domaines « SH3 » en recrutant des protéines comportant des régions riches en résidus proline. Cette propriété lui permet d'interagir avec certaines protéines de la signalisation cellulaire, notamment la protéine ERK-2.



D'après Brown et al., 2006 (131)

Figure 19 : Représentation schématique des domaines de IQGAP1 montrant les sites d'interaction avec ses différents partenaires

IQGAP1 est une cible des statines par l'intermédiaire de CDC42 (119). En effet, les statines inhibent les protéines CDC42 et RAC1, deux cibles de IQGAP1, impliquées dans la prolifération, la survie, l'inflammation, l'angiogénèse, et la formation des métastases (119).

Lin et collaborateurs ont montré dans une étude *in vitro* que la pravastatine induit la surexpression de la thrombomoduline dans les cellules endothéliales humaines de l'aorte (HAEC) en inhibant l'activation des protéines CDC42 et RAC1 (133). Une autre équipe a montré que la lovastatine induisait la biosynthèse de farnesyl produisant le blocage de la signalisation de RAS et diminuant ainsi l'activité de la voie MAPK et donc la prolifération cellulaire. Ils ont également constaté que la lovastatine entraînait une augmentation de l'apoptose (125).

II. Stratégie de la thérapie métronomique et applications

La chimiothérapie conventionnelle et la thérapie ciblée sont les thérapies les plus utilisées actuellement. Cependant, elles induisent de nombreux effets secondaires ne permettant pas d'administrer de fortes doses de traitement, surtout chez l'enfant, et diminuant l'efficacité de ces traitements anticancéreux. Ainsi, de nouvelles stratégies sont essentielles pour améliorer le traitement des cancers notamment des gliomes pédiatriques. La thérapie métronomique incluant la chimiothérapie métronomique et le "drug repositioning " serait une stratégie intéressante pour traiter, entre autres, les AP hypothalamo-chiasmatiques réfractaires aux traitements conventionnels.

A. La chimiothérapie métronomique

1. Principe de la chimiothérapie métronomique

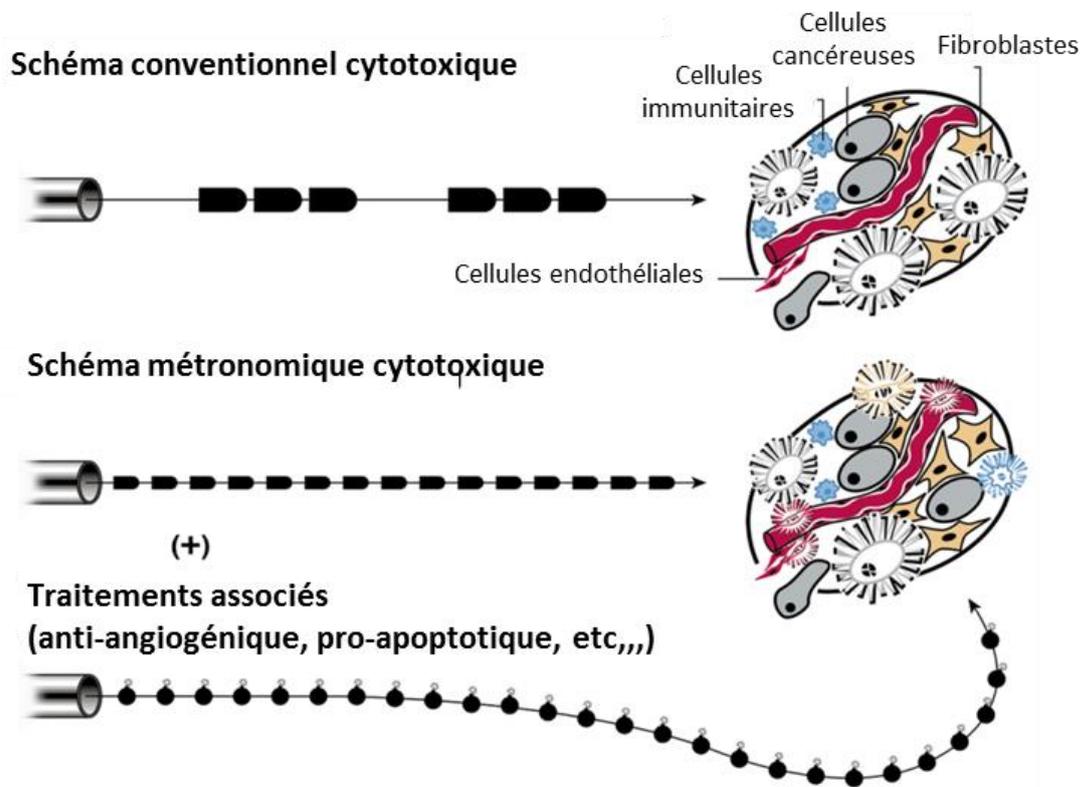
Depuis un demi-siècle, la thérapie systématique pour soigner le cancer est l'utilisation de la chimiothérapie. Elle est administrée en simple dose ou durant plusieurs cycles à des doses les plus élevées possible, appelée dose maximale tolérée (DMT). Malgré de nombreux progrès accomplis dans ce domaine, ces thérapies induisent de nombreux effets secondaires toxiques comme une neurotoxicité et l'altération des cellules des tissus sains (134, 135). De plus, des résistances aux chimiothérapies ont été observées impliquant plusieurs mécanismes comme l'invasion et les métastases des cellules cancéreuses (136-138). Il est donc indispensable de mettre en place une nouvelle stratégie de traitement anti-tumoral.

Browder et collaborateurs ont montré qu'une résistance à la chimiothérapie conventionnelle pouvait être supprimée en administrant l'agent chimiothérapeutique à plus faible dose, plus fréquemment et sur une longue durée. Pour le démontrer, ils ont évalué les effets anti-angiogéniques de la cyclophosphamide, un agent alkylant, dans un modèle murin sous-cutané de cancer du poumon de Lewis et de carcinome du sein. Ils ont constaté qu'en administrant la cyclophosphamide plus fréquemment (plusieurs fois par semaine), à plus petites doses (1/3 de la dose DMT) et sans pause, la résistance au traitement était diminuée en comparaison d'une administration donnée de manière conventionnelle (139).

De plus, Klement et collaborateurs ont montré que l'efficacité de cette stratégie augmentait lorsque l'agent chimiothérapeutique était administré en association avec d'autres médicaments comme des anti-angiogéniques. Pour cela, ils ont testé deux drogues sur des modèles murins sous-cutanés de neuroblastomes (2 lignées humaines différentes). La première drogue était la vinblastine, un agent anti-mitotique et la deuxième le DCI01, bloquant les fonctions d'un des récepteurs du VEGF. Ils ont constaté que l'administration de ces drogues seules et à faibles doses permettait une régression de la tumeur. En revanche, l'administration de la combinaison de ces deux drogues de manière régulière, à faibles doses a permis une meilleure régression de la tumeur et une apoptose des cellules endothéliales beaucoup plus élevée (140). D'autres résultats *in vitro* ont confirmé ces données (141, 142).

Ainsi, Hanahan et collaborateurs ont nommé chimiothérapie métronomique l'administration d'agents chimiothérapeutiques à des doses relativement faibles, d'une façon ininterrompue pendant une période prolongée et pouvant être associée à d'autres drogues (**Figure 20**).

L'administration de doses plus faibles et régulières permet ainsi d'augmenter l'efficacité, en diminuant la résistance au traitement tout en diminuant la toxicité (134).



D'après Hanahan et al., 2000 (134)

Figure 20 : Nouvelle stratégie de chimiothérapie : la chimiothérapie métronomique à faibles doses et en combinaison avec d'autres drogues

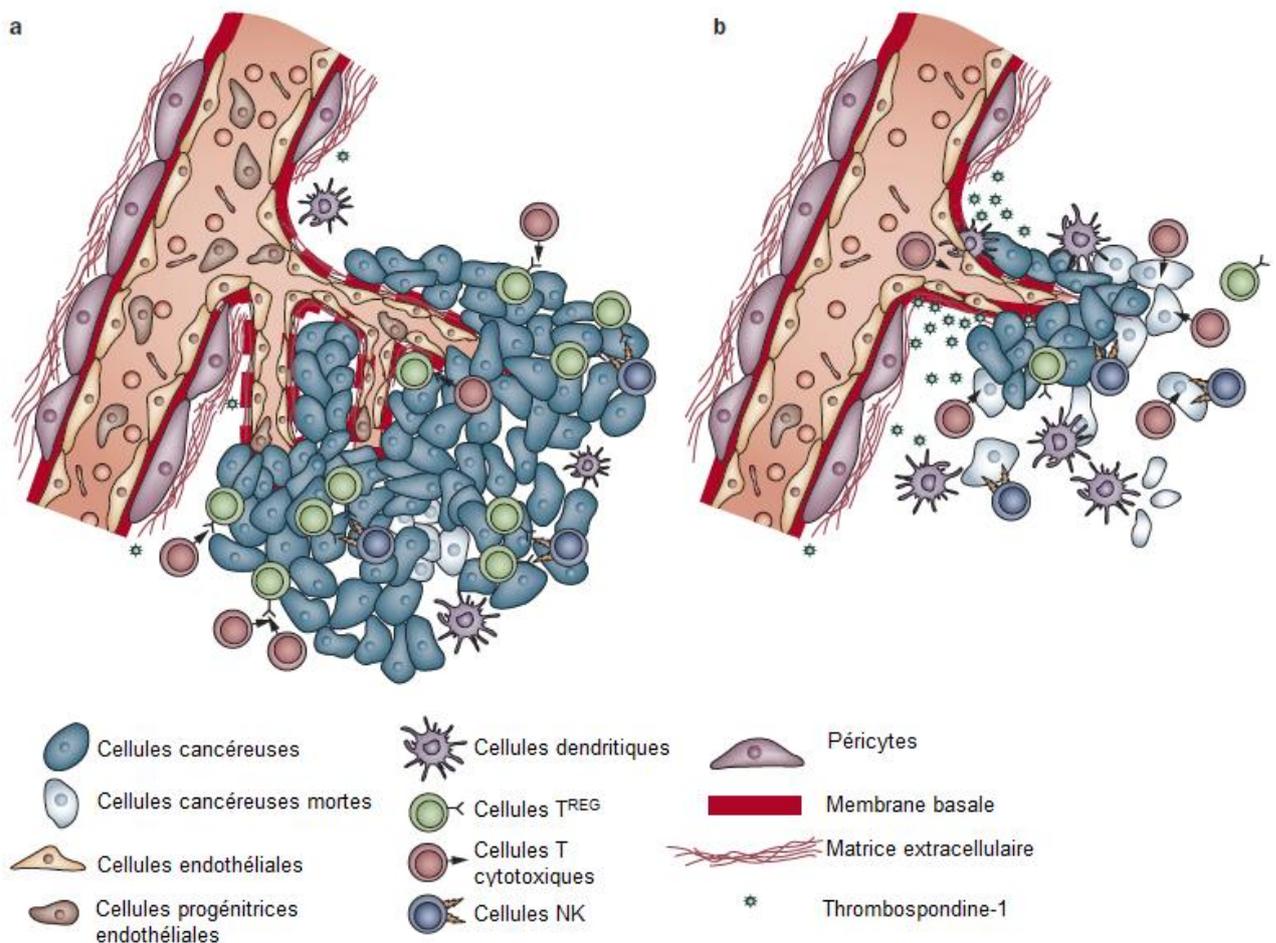
2. Chimiothérapie métronomique et réponse immunitaire anti-tumorale

De nouveaux mécanismes consécutifs à une chimiothérapie ont été identifiés, notamment, la restauration et la stimulation de la réponse immunitaire anti-tumorale (**Figure 21**).

Le système immunitaire inné et adaptatif joue un rôle clé dans le développement tumoral, mais les cellules cancéreuses peuvent échapper à la surveillance immunitaire. La chimiothérapie conventionnelle peut aussi induire des effets secondaires sur le système immunitaire comme une neutropénie, une lymphopénie et une stimulation des cellules immunitaires pro-tumorales dont les cellules Treg (143). Les cellules Treg sont les

lymphocytes $CD4^+/CD25^+$ qui inhibent les cellules du système immunitaire anti-tumoral (cellules T cytotoxiques (CD8 et CD4) et cellules NK). Une étude a montré qu'un traitement métronomique au témozolomide permettait l'inhibition de l'activité des cellules Treg dans des xénogreffes de gliome chez le rat (144). Une autre étude a montré que la chimiothérapie métronomique (comprenant 54 drogues testées dont la vinblastine, le paclitaxel et l'etoposide) induisait la maturation des cellules dendritiques à des doses non toxiques activant alors le système immunitaire anti-tumoral (145). Les rechutes tardives chez certains patients et dans les modèles murins immuno-déficients pourraient donc être reliées à un système immunitaire non efficace (146).

Ainsi, la chimiothérapie métronomique permettrait de stimuler le système immunitaire anti-tumoral et d'éviter les récives (**Figure 21**).



D'après Pasquier et al., 2010 (146)

Figure 21 : Représentation d'une tumeur et de son microenvironnement avant (a) et après (b) traitement par chimiothérapie métronomique

3. La chimiothérapie métronomique dans les essais cliniques

De nombreux essais cliniques ont testé la chimiothérapie métronomique (135, 146). Des essais cliniques testant la chimiothérapie métronomique seule ou en combinaison avec d'autres agents anticancéreux comme le letrozole, le trastuzumab ou le bevacizumab, ont été effectués sur des patientes ayant un cancer du sein et ont donné de très bons résultats (146). Une de ces études concerne celle de Garcia et collaborateurs, portant sur 64 femmes ayant un cancer du sein en progression, avancé ou réfractaire au traitement. Ces patientes ont reçu une faible dose journalière de cyclophosphamide et du méthotrexate, deux fois par semaine. Les résultats ont montré que 2 patientes répondaient complètement, 10 répondaient partiellement, et 12 étaient stabilisées après 6 mois ou plus. Ces résultats étaient meilleurs que ceux obtenus avec un traitement de chimiothérapie standard (147). Une autre étude portant sur 70 patientes atteintes de cancer des ovaires et testant la combinaison métronomique bevacizumab/cyclophosphamide a montré une bonne tolérance et une réponse au traitement (148). De même, Kong et collaborateurs ont testé l'administration du témozolomide de manière métronomique sur des patients atteints de GB réfractaire à cet agent chimiothérapeutique. Ils ont montré que la chimiorésistance à ce traitement était réduite (149). Enfin, un essai clinique de phase III a également montré que l'administration métronomique de l'uracil et du tegafur augmentait la survie globale de patients ayant un cancer du poumon (150). D'autres essais cliniques sont résumés dans le **Tableau 2**.

B. Le « drug repositioning »

1. Principe du « drug repositioning »

Le "drug repositioning" consiste en l'utilisation de médicaments ayant déjà une AMM pour soigner des maladies bénignes, pour traiter d'autres pathologies. Cette stratégie présente plusieurs avantages. En effet, ces molécules ont des effets secondaires modérés et connus. Les essais de phase I ne sont pas obligatoires et les essais cliniques peuvent directement commencer en phase II pour évaluer l'efficacité du médicament comme traitement anti-cancéreux. Un autre avantage est que ces médicaments sont peu coûteux, surtout depuis le développement des génériques.

Plusieurs études de "drug repositioning" ont montré que des drogues utilisées normalement pour d'autres pathologies que le cancer ont des propriétés anti-tumorales. Par exemple, une première étude a montré que l'acide valproïque, un médicament antiépileptique

(anticonvulsivant), inhibait l'histone deacétylase, activant des facteurs de transcription impliqués dans l'initiation et la progression tumorale (151). Une seconde étude a également rapporté que la metformine (Glucophage®, Stagid®), utilisée dans le traitement du diabète de type 2, pouvait inhiber l'enzyme mTOR, la kinase AMP et la transition épithélio-mésenchymateuse dans le cancer du sein (152, 153). Enfin, une autre étude a montré que l'itraconazole, un antifongique de la peau, inhibait la voie de signalisation Hedgehog et la croissance tumorale de xénogreffes de médulloblastome (154).

2. Combinaison de la chimiothérapie métronomique et du « drug repositioning »

Plusieurs essais métronomiques combinant la chimiothérapie métronomique avec le "drug repositioning" ont été effectués ces dernières années. Quelques-uns d'entre eux sont résumés dans le **Tableau 2** pour les essais cliniques de l'adulte et dans le **Tableau 3** pour les essais pédiatriques.

Dans certains cas, la thérapie métronomique n'a pas amélioré de façon significative la survie des patients mais elle a permis tout de même une stabilisation de la tumeur chez les patients réfractaires au traitement conventionnel ou rechutant après une chimiothérapie. Il faut noter que ces cas étaient exclusivement des patients répondant mal à la chimiothérapie conventionnelle ou de très mauvais pronostic (155, 156).

3. Emploi du celecoxib et de la fluvastatine en thérapie métronomique

Comme nous l'avons vu dans la première partie de ce chapitre, le celecoxib, médicament anti-inflammatoire non stéroïdien, et la fluvastatine, utilisée pour traiter l'hypercholestérolémie, sont 2 médicaments ayant des propriétés anti-tumorales potentielles (cf. Le celecoxib et ses cibles et la fluvastatine et ses cibles) et sont donc 2 molécules intéressantes pour être utilisées dans une stratégie de "drug repositioning".

Le celecoxib a fréquemment été testé en combinaison avec de la chimiothérapie métronomique. En effet, des essais cliniques ont combiné la stratégie de la chimiothérapie métronomique et celle du "drug repositioning" afin d'optimiser les effets anticancéreux. Chez l'adulte, des résultats positifs incluant au total plus de 500 patients, ont été rapportés dans le

cancer du poumon, de la prostate, le myélome multiple, le lymphome de Hodgkin ou encore le GB (157-159).

Patient population	Metronomic protocol	RR and CB (%)	Best responses
Recurrent ovarian cancer, previously treated with conventional chemotherapy ^{24,25}	Cyclophosphamide (oral, daily) Bevacizumab (every 2 weeks)	RR: 44 CB: 67	CR: 2/9 PR: 2/9 SD: 2/9
	Cyclophosphamide (oral, daily) Bevacizumab (every 2 weeks)	RR: 24 CB: 56	CR: 0/70 PR: 17/70 SD: 44/70 with 22*
Hormone-refractory prostate cancer, previously treated by androgen deprivation ^{26,28,29}	Cyclophosphamide (oral, daily) Dexamethasone (oral, daily)	RR: 64 CB: 70	CR: 22/34 SD: 2/34
	Cyclophosphamide (oral, daily) Cyclophosphamide (oral, daily)	RR: 45	OR: 26/58
	Dexamethasone (oral, daily) Celecoxib (oral, twice daily)	RR: 32	OR: 9/28
Aggressive relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphoma ³¹	Cyclophosphamide (oral, daily) Celecoxib (oral, twice daily)	RR: 37.5 CB: 59	CR: 2/32 PR: 10/32 SD: 7/32
Progressive multiple myeloma, previously treated with conventional chemotherapy ³⁰	Cyclophosphamide (oral, daily) Prednisone (oral, daily)	RR: 69	OR: 29/42
Recurrent glioblastoma and malignant glioma, previously treated with radiotherapy and/or conventional chemotherapy ^{32-34,38}	Temozolomide (oral, daily)	RR: 16 CB: 58	CR: 0/12 PR: 2/12 SD: 5/12
	Temozolomide (oral, daily)	RR: 14 CB: 59	CR: 0/49 PR: 7/49 SD: 22/49
	Etoposide (oral, daily, 3 weeks) Bevacizumab (every 2 weeks)	RR: 22 CB: 90	CR: 3/59 PR: 10/59 SD: 40/59
	Etoposide (oral, daily, 3 weeks) alternating with Cyclophosphamide (oral, daily, 3 weeks) Thalidomide (oral, daily) Celecoxib (oral, twice daily)	RR: 10	CR: 0/47 PR: 1/47 MR: 4/47 SD: 26/47
Progressive, locally advanced or metastatic renal-cell carcinoma ^{39,55}	Cyclophosphamide (oral, daily) Celecoxib (oral, twice daily)	RR: 3 CB: 12.5	CR: 0/32 PR: 1/32 SD: 3/32 all*
	Capecitabine (oral, twice daily) Gemcitabine (i.v., weekly) Sorafenib (oral, twice daily)	RR: 50 CB: 93	PR: 20/40 SD: 17/40
Metastatic or locally advanced neuroendocrine carcinoma ³⁵	5-Fluorouracil (i.v., daily) Long-acting release octreotide (monthly)	RR: 24 CB: 93	CR: 0/29 PR: 7/29 SD: 20/29
Metastatic melanoma, previously treated with conventional chemotherapy ⁵²	Paclitaxel (i.v. for 3 days, weekly) Celecoxib (oral, twice daily)	RR: 5 CB: 35	CR: 0/20 PR: 1/20 SD: 7/20 with 3*
Advanced solid tumors of various types, previously treated with conventional chemotherapy ^{36,37,44}	Cyclophosphamide (oral, daily) Rofecoxib (oral, twice daily) Vinblastine (i.v., weekly) ± minocycline	RR: 13 CB: 30	CR: 2/47 PR: 4/47 SD: 8/47 all*
	Capecitabine (oral, twice daily)	CB: 34	SD: 11/35 all*
	Celecoxib (oral, twice daily) Vinorelbine (oral, 3 times per week)	RR: 13 CB: 45	OR: 8/62 SD: 20/62 all*

*For more than 6 months. Abbreviations: CB, clinical benefit; CR, complete response; i.v., intravenous; MR, minor response; OR, objective response; PR, partial response; RR, response rate; SD, stable disease.

D'après Pasquier et al., 2010 (146)

Tableau 2 : Essais cliniques chez l'adulte utilisant la thérapie métronomique

Patient population	Metronomic protocol	RR and CB (%)	Best responses
Refractory or relapsing tumors of various types ⁵⁸	Vinblastine (i.v., 3 times per week) Celecoxib (oral, daily)	RR: 0 CB: 17	CR: 0/17 PR: 0/17 SD: 9/17 with 3* PD: 8/17
	Cyclophosphamide (oral, daily) Celecoxib (oral, daily)	RR: 0 CB: 6	CR: 0/16 PR: 0/16 SD: 7/16 with 1* PD: 9/16
Refractory or relapsing tumors of various types ⁴¹	Etoposide (oral, daily, 3 weeks) alternating with cyclophosphamide (oral, daily, 3 weeks) Thalidomide (oral, daily) Celecoxib (oral, daily)	RR: 15 CB: 50	CR: 0/20 PR: 3/20 SD: 10/20 with 7* PD: 8/20
Refractory, relapsing or "high risk of relapse" tumors of various types ⁴⁰	Etoposide (oral, daily, 3 weeks) alternating with temozolomide (oral, daily, 6 weeks) Celecoxib (oral, daily) Retinoic acid (oral, daily, 2 weeks)	RR: 32 CB: 77	CR: 3/22 PR: 4/22 SD: 11/22 with 10* PD: 4/22
Refractory, relapsing or "high risk of relapse" brain tumors (age < 5 years) ⁵⁷	Alternating combination every 3 weeks: celecoxib (oral, daily) and retinoic acid (oral, daily) and either temozolomide (oral, daily), etoposide (oral, daily) or cyclophosphamide (oral, daily)	RR: 20 CB: 80	CR: 0/10 PR: 2/10 SD: 6/10 all* PD: 2/10
Refractory, relapsing or "high risk of relapse" tumors ⁵⁹	Celecoxib (oral, daily) + etoposide (oral, daily, 2 weeks) alternating with cyclophosphamide (oral, daily, 2 weeks)	RR: 0 CB: 35	CR: 0/17 PR: 0/17 SD: 12/17 with 6* PD: 5/17
*For more than 6 months. Abbreviations: CB, clinical benefit; CR: complete response; OR: objective response; PD, progressive disease; PR: partial response; RR, response rate; SD, stable disease.			

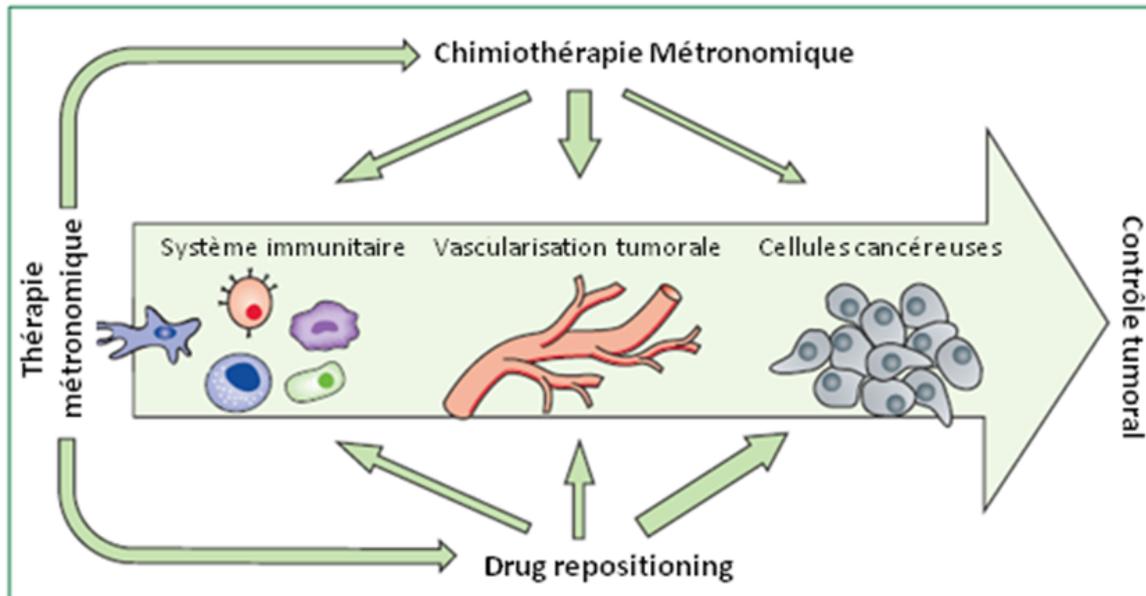
D'après Pasquier et al., 2010 (146)

Tableau 3 : Essais cliniques pédiatriques utilisant la thérapie métronomique

Dans le traitement des tumeurs pédiatriques, la combinaison des deux stratégies, utilisant d'ailleurs souvent le celecoxib, a également été employée afin d'améliorer la qualité de vie des enfants et réduire les effets secondaires induits par la chimiothérapie conventionnelle. Les essais cliniques pédiatriques sont assez limités mais la plupart d'entre eux ont donné des résultats encourageants. Sterba et collaborateurs rapportent un essai clinique sur des enfants atteints de tumeurs solides et réfractaires au traitement. Ils ont utilisé la combinaison de 4 drogues de manière métronomique appelée COMBAT (*Combined oral maintenance Biodifferentiating and anti-angiogenic therapy*) où le celecoxib était administré avec de l'acide rétinoïque de l'étoposide et du témozolomide. L'administration de ces drogues de manière métronomique a été bien tolérée et 9/14 patients ont montré une stabilisation de la maladie avec très peu d'effets secondaires (160). En 2012, une seconde étude utilisant cette même combinaison comprenant 74 enfants a confirmé ces résultats (161). Choi et collaborateurs ont effectué un essai clinique sur 10 enfants ayant des tumeurs cérébrales et ayant reçu une forte dose de chimiothérapie. La combinaison de ces mêmes drogues, plus de la cyclophosphamide, administrées de manière métronomique, a montré une très faible toxicité permettant une bonne qualité de vie et 6/10 patients ont montré une stabilisation de la tumeur (162).

Deux études d'André et collaborateurs ont testé les combinaisons métronomiques Etoposide, Cyclophosphamide, Celecoxib et Vinblastine, Cyclophosphamide, Methotrexate, Celecoxib, sur des enfants et des adolescents souffrant de cancers réfractaires aux traitements conventionnels. Ces études ont montré que les deux traitements étaient bien tolérés, avec une toxicité minimale et permettant une stabilisation de la tumeur (163, 164).

Peu d'études rapportent à ce jour l'emploi de la fluvastatine selon la méthode métronomique mais on peut citer une étude clinique de phase II incluant des enfants souffrant de tumeur cérébrale (comprenant des astrocytomes de bas et haut grade) traités avec une combinaison métronomique incluant médicaments : Thalidomide, Carboplatine, Vincristine, Fluvastatine. Les auteurs ont décrit une augmentation de la survie des patients, une diminution du volume tumoral, et une amélioration de leur qualité de vie (165).



D'après André et al., 2013 (166)

Figure 22 : Mécanisme d'action de la chimiothérapie métronomique et du "drug repositioning"

La chimiothérapie métronomique et le "drug repositioning" font ainsi apparaître une nouvelle génération de traitements novateurs ciblant à la fois la tumeur elle-même et son microenvironnement, tout en garantissant une toxicité minimale et en maintenant un faible coût (**Figure 22**). Cette nouvelle stratégie de traitement semble donc être intéressante pour traiter les gliomes pédiatriques réfractaires aux traitements conventionnels tels que les astrocytomes hypothalamo-chiasmatiques.

PARTIE II

PRÉSENTATION, DISCUSSION ET PERSPECTIVES DES TRAVAUX

Présentation des travaux

Mon travail de thèse a essentiellement porté sur l'étude des gliomes pédiatriques circonscrits selon les deux volets suivants:

Le premier volet, qui a constitué la majeure partie de mon travail de thèse, a été de rechercher de nouvelles cibles thérapeutiques pour les AP hypothalamo-chiasmatiques, qui sont des tumeurs de mauvais pronostic contrairement aux AP de la fosse postérieure. Ce mauvais pronostic s'explique par des contraintes cliniques notamment par une localisation de la tumeur ne permettant pas une bonne résection chirurgicale et par une mauvaise réponse à la chimiothérapie, mais aussi par des particularités moléculaires. Le projet que nous avons donc développé avait pour but d'élaborer une nouvelle stratégie thérapeutique pour ces tumeurs.

Pour ce faire, l'analyse du transcriptome d'AP hypothalamo-chiasmatiques et d'AP de la fosse postérieure par puce à ADNc puis par RT-Q-PCR, nous a permis d'identifier l'expression de 4 gènes, cibles de deux drogues : le celecoxib et la fluvastatine. Connaissant les effets anti-tumoraux rapportés dans la littérature de ces deux drogues, nous avons trouvé intéressant de les tester *in vitro*, séparément et en combinaison sur des explants d'AP et sur deux lignées de GB (faute de lignée d'AP). Nous avons constaté que cette combinaison présente un fort potentiel synergique capable d'arrêter le cycle cellulaire, de diminuer la prolifération et d'induire l'apoptose des cellules tumorales. La collaboration avec le Dr Nicolas André à l'Hôpital de la Timone a permis également de proposer avec succès cette combinaison dans le cadre d'une thérapie métronomique à une patiente souffrant d'un AP multifocal et réfractaire aux traitements conventionnels. Ces résultats ont été publiés cette année dans le journal *Acta Neuropathologica Communications*.

Dans le deuxième volet de ma thèse, j'ai collaboré à la caractérisation clinico-pathologique et moléculaire de plusieurs types de gliomes pédiatriques de bas grade. En effet, des problèmes de reproductibilité rencontrés dans la classification de l'OMS, la diversité des comportements cliniques et la variabilité histo-morphologique au sein d'une même entité conduisent à des difficultés de diagnostic et donc de stratégies thérapeutiques. De plus, comme nous l'avons vu dans le chapitre 2 de l'introduction, les connaissances sur les altérations génétiques dans les gliomes pédiatriques sont tout à fait nouvelles. Ainsi, nous avons recherché des facteurs clinico-pathologiques et tenté de mettre en évidence des profils biomoléculaires spécifiques

dans 4 types de gliomes pédiatriques (AP, PXA, GG et DNT) pour améliorer leur diagnostic et caractériser d'éventuels sous-groupes de tumeurs qui auraient un comportement différent. Ces travaux ont abouti à la publication de 3 articles dans les journaux *Current Topics in Medicinal Chemistry* en 2012, *Neuropathology and Applied Neurobiology* et *Brain Pathology* en 2013. Dans ce contexte, j'ai également été associée à la revue parue cette année dans le *Bulletin du Cancer* intitulée « Les tumeurs gliales et glioneuronales de l'adulte et de l'enfant : principales altérations génétiques et classification histomoléculaire », ajoutée en annexe de ce manuscrit.

PUBLICATION I

"Evidence for new targets and synergistic effect of metronomic celecoxib/fluvastatin combination in pilocytic astrocytoma"

Sandy Mercurio, Laëtitia Padovani, Carole Colin, Manon Carré, Aurélie Tchoghandjian, Didier Scavarda, Sally Lambert, Nathalie Baeza-Kallee, Carla Fernandez, Céline Chappé,

Nicolas André et Dominique Figarella-Branger

Acta Neuropathologica Communications 2013, 1:17

I. Caractérisation de nouvelles cibles thérapeutiques et effet synergique de la combinaison du celecoxib et de la fluvastatine dans les AP

A. Présentation des travaux

Publication I : "Evidence for new targets and synergistic effect of metronomic celecoxib/fluvastatin combination in pilocytic astrocytoma"

Sandy Mercurio, Laëtitia Padovani, Carole Colin, Manon Carré, Aurélie Tchoghandjian, Didier Scavarda, Sally Lambert, Nathalie Baeza-Kallee, Carla Fernandez, Céline Chappé, Nicolas André et Dominique Figarella-Branger

Acta Neuropathologica Communications 2013, 1:17

Les AP sont préférentiellement des tumeurs pédiatriques. Contrairement aux AP de la fosse postérieure, les AP hypothalamo-chiasmatiques sont très invalidants et de mauvais pronostic de par la localisation de la tumeur et l'inefficacité de la chimiothérapie conventionnelle. Il est donc indispensable de définir une nouvelle stratégie de traitement mieux tolérée et plus efficace contre ces tumeurs.

Récemment, afin de déterminer si les différences de pronostic de ces deux tumeurs étaient en rapport avec des signatures moléculaires distinctes, nous avons analysé et comparé les profils transcriptomiques de 6 AP de la fosse postérieure et 5 AP hypothalamo-chiasmatiques (100). Nous avons obtenu une signature moléculaire spécifique à chaque topographie, comprenant notamment des gènes surexprimés dans les AP hypothalamo-chiasmatiques comme *ICAMI*, *CRK*, *CD36*, et *IQGAPI* qui sont des cibles de deux médicaments disposant déjà d'une AMM pour d'autres pathologies : la fluvastatine et le celecoxib.

Dans la présente étude, l'expression de ces gènes a été quantifiée par RT-Q-PCR dans une plus grosse cohorte de 51 AP (27 AP de la fosse postérieure et 17 AP hypothalamo-chiasmatiques) ainsi que 10 GB. Une surexpression significative a été retrouvée pour les transcrits *ICAMI*, *CRK*, *CD36*, et *IQGAPI* dans les AP hypothalamo-chiasmatiques en comparaison avec les AP de la fosse postérieure. De même, une surexpression significative

des transcrits *CRK* et *ICAM1* a été mise en évidence dans les AP quelle que soit leur localisation par rapport aux GB.

Les protéines codées par ces 4 gènes sont impliquées dans le mode d'action du celecoxib et de la fluvastatine, c'est pourquoi nous avons testé le pouvoir cytotoxique de ces molécules *in vitro* et *in vivo*, seules puis en combinaison. En l'absence de lignées cellulaires provenant de patients atteints d'AP, nous avons, dans un premier temps, utilisé deux lignées cellulaires commerciales de GB (U87-MG et U118) exprimant les gènes cibles des deux drogues pour évaluer l'effet cytotoxique de la combinaison. Nous avons pu démontrer que les lignées cellulaires de GB étaient sensibles aux deux drogues et que la combinaison de celles-ci conduisait à une action synergique ; 100µM de celecoxib associés à 240µM de fluvastatine étant la combinaison la plus synergique. Cette combinaison induisait également l'arrêt du cycle cellulaire et activait l'apoptose. L'association synergique du celecoxib et de la fluvastatine a également été utilisée sur des cultures d'explants d'AP et a conduit à une mort cellulaire massive des cellules.

Enfin, en appliquant la stratégie du « drug repositioning » nous avons pu tester la combinaison de ces deux drogues durant 18 mois sur une patiente souffrant d'un AP multifocal réfractaire à la chimiothérapie conventionnelle. Les deux drogues ont été administrées oralement et de manière métronomique selon les conditions suivantes : 200mg de celecoxib 2 fois par jour et 2 mg/kg/jour de fluvastatine pendant 2 semaines toutes les 4 semaines avec une augmentation de la dose jusqu'à 8 mg/kg/jour. Ce traitement s'est avéré bénéfique : il a été bien toléré et a conduit à une régression significative de la tumeur.

Ce travail de thèse a permis de mettre en évidence des cibles du celecoxib et de la fluvastatine dans les AP, et de démontrer l'effet synergique de ces deux molécules *in vitro* sur les GB et les AP. Comme attendu, les effets anti-tumoraux connus de ces deux drogues, comme l'arrêt du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose, ont été mis en évidence. Ainsi, l'utilisation de cette combinaison non-toxique et peu coûteuse, utilisant la stratégie du "drug repositioning", utilisée en clinique de manière métronomique, pourrait être une nouvelle stratégie thérapeutique prometteuse pour les AP réfractaires.

B. Discussion des travaux et perspectives

Ces travaux de thèse ont permis de proposer une nouvelle stratégie thérapeutique utilisant le celecoxib et la fluvastatine dans la prise en charge d'AP réfractaires grâce à des données moléculaires, *in vitro* et précliniques.

La toxicité de la chimiothérapie conventionnelle est un problème majeur car elle induit de nombreux effets secondaires comme des altérations neurocognitives des patients. Depuis quelques années, la chimiothérapie métronomique et le "drug repositioning" ont permis d'améliorer le traitement de certains cancers et de diminuer la toxicité de la chimiothérapie conventionnelle (146). Cette stratégie nous a semblé intéressante à mettre en œuvre dans la prise en charge des AP réfractaires aux traitements conventionnels.

➤ Mécanisme de l'action synergique du celecoxib et de la fluvastatine

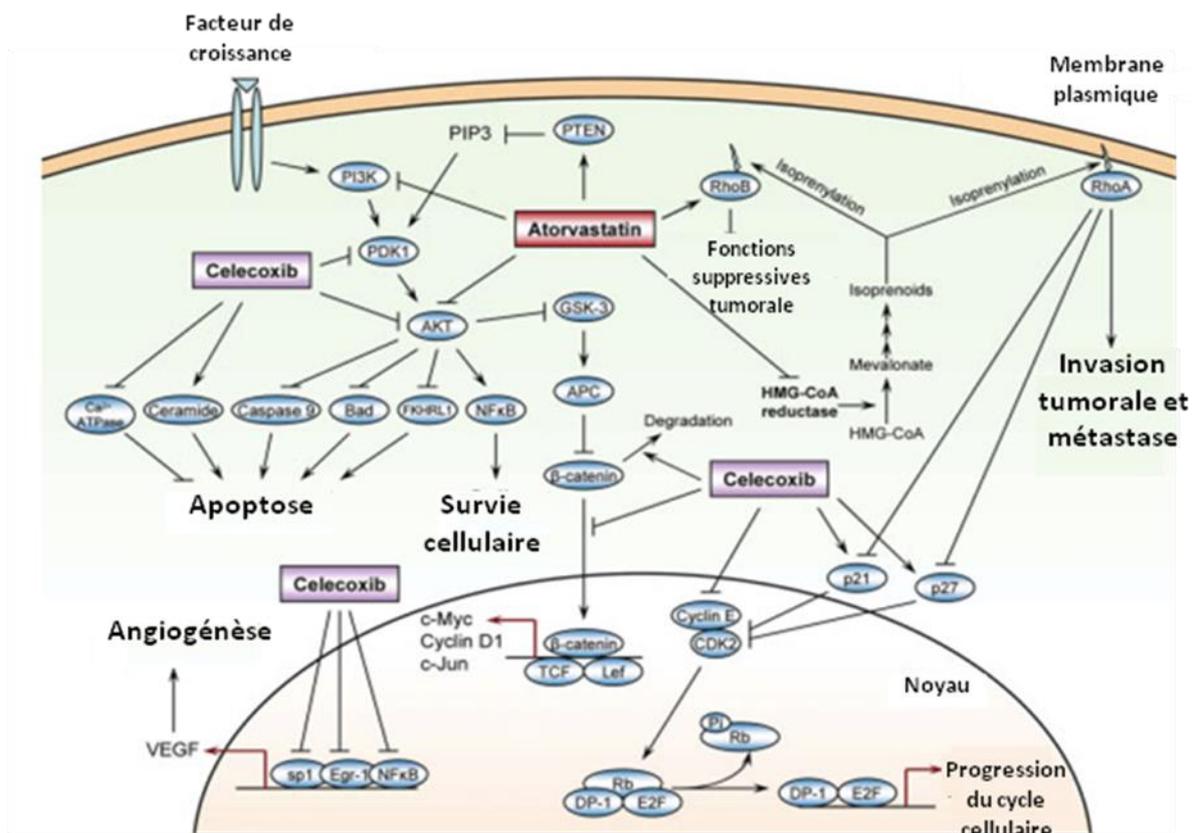
Parmi les gènes surexprimés dans les AP hypothalamo-chiasmatiques, nous avons identifié les gènes *CRK*, *CD36*, *IQGAP1* et *ICAM1* déjà décrits dans la littérature comme étant des cibles du celecoxib et de la fluvastatine (111, 112, 116, 117, 125, 129, 130, 133). Ces deux médicaments peu toxiques, le celecoxib, AINS et la fluvastatine, administrée pour le traitement de l'hypercholestérolémie, ne sont pas utilisés initialement contre le cancer mais de nombreuses études de "drug repositioning" ont montré qu'ils avaient un effet anti-tumoral lorsqu'ils étaient utilisés de manière métronomique, seuls ou en combinaison.

Nos résultats *in vitro* vont dans le même sens puisqu'ils confirment que le celecoxib et la fluvastatine, administrés seuls, induisent une activité anti-tumorale sur les deux lignées de GB (U87-MG et U118). En effet, après 48h de traitement, les IC50 obtenus étaient de 90µM et 110µM pour le celecoxib et de 470µM et 880µM pour la fluvastatine dans les lignées U118 et U87 respectivement. Ces données sont en accord avec d'autres études *in vitro* de la littérature (167-169).

Grâce à l'utilisation de la méthode Chou et Talalay, notre étude a révélé que l'association de ces deux drogues montrait une forte synergie, l'association la plus synergique étant la combinaison qui associait une dose proche de l'IC50 pour le celecoxib obtenu dans les deux lignées (100µM) avec une dose de fluvastatine qui n'avait pas d'effet sur la croissance cellulaire lorsqu'elle était administrée seule (240µM). Cette combinaison a inhibé la croissance cellulaire de 99%, montrant que la fluvastatine potentialisait l'effet cytotoxique du celecoxib. Nous avons pu voir également que cette association diminuait la prolifération en

arrêtant le cycle cellulaire en phase G1 et induisait l'apoptose des cellules. Nos résultats sont en accord avec les données de la littérature décrivant l'action de ces deux drogues sur le cycle cellulaire, la prolifération et la mort cellulaire. De plus, une étude testant l'association de l'atorvastatine et du celecoxib sur des cellules de cancer du côlon a également rapporté cet effet synergique. L'atorvastatine et le celecoxib ont entraîné l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose des cellules de deux lignées de cancer du côlon et ces effets étaient plus amplifiés lors de la combinaison (170, 171).

Pour aller plus loin, il nous faut maintenant comprendre comment la fluvastatine et le celecoxib collaborent de manière synergique pour produire ces effets anti-tumoraux. Xiao et collaborateurs suggèrent que la synergie de l'action anti-tumorale de la combinaison du celecoxib et des statines pourrait être expliquée par le fait que ces deux drogues ciblent les mêmes voies de signalisation et qu'elles sont complémentaires (**Figure 23**).



D'après Xiao et al., 2008 (171)

Figure 23 : Mécanisme moléculaire anti-tumoral de la combinaison synergique de l'atorvastatine et du celecoxib ciblant des voies communes

Les auteurs proposent deux mécanismes qui pourraient expliquer l'effet anti-tumoral de l'atorvastatine et du celecoxib par l'arrêt du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose, que nous retrouvons également dans notre étude (171) :

- L'atorvastatine diminue l'expression de la protéine RhoA à la membrane en inhibant l'isoprénylation. RhoA ne peut donc plus inhiber les protéines p27 et p21 qui sont deux protéines inhibitrices du cycle cellulaire. Les effets pro-tumoraux de RhoA sur la progression du cycle cellulaire et l'augmentation des métastases sont donc réduits. En parallèle, le celecoxib va amplifier cet effet en activant les protéines p27 et p21. Les deux drogues sont donc complémentaires au niveau de l'arrêt du cycle cellulaire (171).

- Un des mécanismes majeurs du celecoxib pour induire l'apoptose est l'inhibition de la protéine AKT. En parallèle, les statines sont capables de bloquer la protéine AKT en inhibant PDK1 et la PI3K et en activant PTEN. La protéine AKT est inhibée par les deux drogues et l'apoptose est donc déclenchée (171).

Ainsi, en se basant sur les mécanismes proposés par Xiao et collaborateurs, nous pouvons supposer que la fluvastatine et le celecoxib collaborent au niveau des mêmes voies de signalisation impliquant notamment CRK, ICAM1, CD36 et IQGAP1 pour induire l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. Comme nous l'avons vu dans l'introduction de cette thèse (Chapitre 2), la voie MAPKinase est très importante dans la tumorigénèse des AP, or cette voie de signalisation est commune à ces 4 gènes.

Plus précisément, comme décrit dans l'introduction, CRK, protéine du complexe d'adhérence focale, active la voie ERK1/2 par l'intermédiaire de RAF1 (**Figure 16**) (110). De plus, la transduction du signal de CD36 active les voies p38, JNK (**Figure 18**) et ERK1/2 (172).

Par ailleurs, deux études citées précédemment ont également montré que le celecoxib et les statines peuvent inhiber la voie MAPKinase par l'intermédiaire de ces cibles. Galicchio et collaborateurs ont montré que le traitement du celecoxib induisait une diminution de ICAM1 et VCAM1 mais également de p38 et p55 de la voie MAPKinase dans une lignée de cancer du côlon et ils ont proposé une relation entre ces protéines (116). D'autres études ont confirmé que la molécule ICAM1 pouvait activer la voie p38 mais également la voie ERK1/2 (173, 174). Bouterfa et collaborateurs ont également montré que la lovastatine induisait le blocage de la signalisation de RAS diminuant ainsi l'activité de la voie MAPKinase (125).

Ainsi, pour comprendre les mécanismes qui sous-tendent l'action cytotoxique et anti-tumorale du celecoxib et de la fluvastatine dans les AP, il serait intéressant d'étudier l'expression des protéines des voies MAPKinase en aval des 4 gènes cibles, notamment ERK1/2, JNK et p38, (**Figure 24**). Dans un premier temps, nous nous proposons de mener ces analyses sur les lignées U87-MG et U118, cultivées ou non en présence de la combinaison synergique celecoxib/fluvastatine, de réaliser l'extraction des protéines de ces cellules traitées *vs* contrôle et de doser dans ces extraits les protéines ERK1/2, JNK, p38 ainsi que leurs formes phosphorylées pour tester l'état d'activation des voies MAPkinases en présence ou en absence du traitement. Ces mêmes analyses seront ensuite envisagées sur des cultures primaires d'AP.

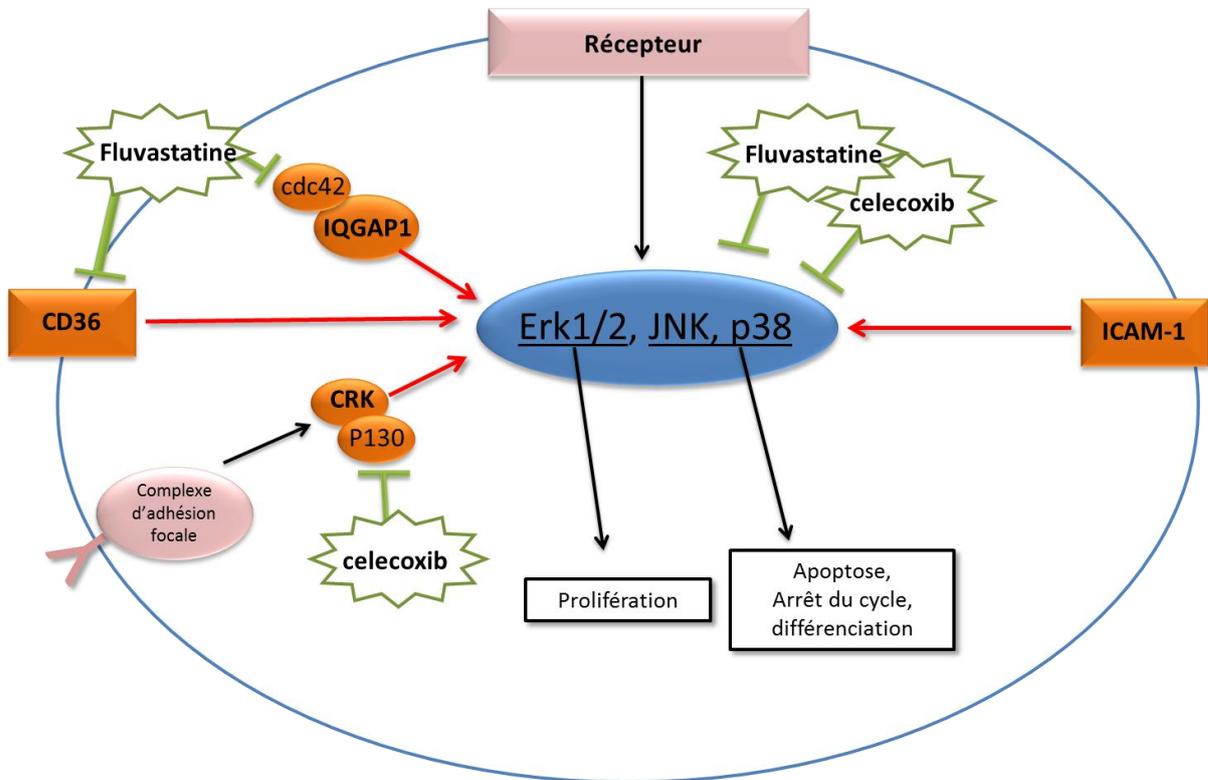


Figure 24 : Représentation hypothétique du mécanisme moléculaire anti-tumoral de la combinaison synergique de la fluvastatine et du celecoxib ciblant une voie commune : la voie des MAPKinases

➤ Modèles *in vitro* et *in vivo*

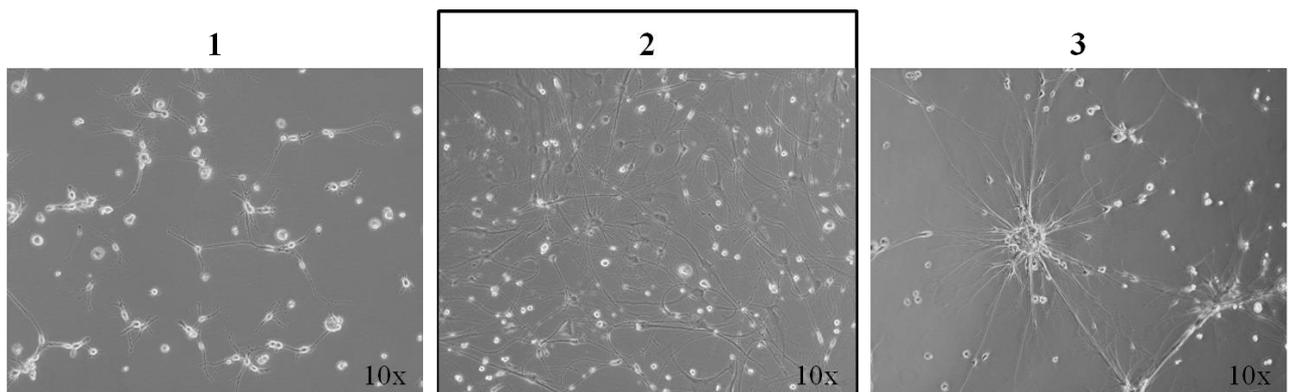
Dans notre étude, nous avons analysé l'effet synergique de nos deux molécules sur des lignées de GB. Cependant, il reste essentiel d'établir une lignée primaire d'AP à partir de reliquats d'exérèses chirurgicales. Nos essais réalisés au laboratoire montrent la difficulté d'une telle réalisation car nous nous sommes régulièrement heurtés à des problèmes majeurs : d'une part ces tumeurs restent rares, et les prélèvements, notamment pour les AP hypothalamo-chiasmatisques, sont de très petite taille, et d'autre part parce que, les cellules tumorales d'AP prolifèrent peu.

À ce jour, dans notre laboratoire, nous avons établi une quinzaine de lignées cellulaires primaires dérivant des tissus prélevés directement chez le patient. Ces lignées cellulaires sont résumées dans le **Tableau 4**. Lors des mises en culture, nous avons testé 3 milieux de culture : 1/ le milieu défini complémenté des facteurs bFGF (*Basic Fibroblast Growth Factor*), PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) et NT3 (*neurotrophin-3*) permettant de stimuler des cellules précurseurs gliaux d'oligodendrocytes et d'astrocytes de type O-2A/OPC (*Oligodendrocyte type-2 Astrocyte/ Oligodendrocyte Precursor Cell*), 2/ le milieu DMEM 10% FCS (*Fetal Calf Serum*) stimulant plutôt la population astrocytaire et 3/ le milieu défini complémenté en EGF (*Epidermal Growth Factor*), bFGF et le supplément B27 (supplément riche en facteur de croissance) stimulant les cellules souches. Nos essais ont permis de conclure que le milieu qui semblait le mieux convenir aux cellules d'AP en monocouche était le milieu DMEM 10% FCS car il permettait une meilleure adhésion et prolifération des cellules d'AP (**Figure 25**). Cependant, la mise en culture dans le milieu DMEM 10% FCS n'a permis à aucune des 15 lignées d'être maintenue après 7 passages (**Tableau 4**). Le taux de prolifération de ces cellules restait faible et le délai entre chaque passage était de 3 semaines à 2 mois.

C'est pourquoi nous avons opté pour la technique de culture d'explants qui a l'avantage de maintenir l'architecture du tissu, de permettre l'analyse de l'expression des marqueurs des cellules souches (A2B5, Nestine) et des cellules matures (GFAP, O4, β 3TUB) et qui est relativement reproductible (**Figure 26**).

	Âge	Histologie	Topographie	Nombre de passages en milieu DMEM 10% FCS
AP1	13,5 ans	Biphasique	Bordure ventricule	1
AP2	4 ans	Pseudo-oligodendrogliale	Fosse postérieure	7
AP3	6,5 ans	Fibrillaire	Voies optiques	2
AP4	9,5 ans	Biphasique	Voies optiques	2
AP5	11 ans	Biphasique	Voies optiques	2
AP6	4 ans	Biphasique	Fosse postérieure	3
AP7	10 ans	Biphasique	Supra-tentorielle	1
AP8	12 ans	Biphasique	Fosse postérieure	2
AP9	13 ans	pilomyxoïde	3ème ventricule	3
AP10	4 ans	pilomyxoïde	Thalamo pédonculaire	0
AP11	19 mois	Biphasique	Fosse postérieure	3
AP12	14 ans	Pseudo-oligodendrogliale	Fosse postérieure	3
AP13	3 ans	Biphasique	Fosse postérieure	0
AP14	5 ans	Biphasique	Fosse postérieure	2

Tableau 4 : Cultures cellulaires primaires d'AP réalisées dans notre laboratoire



1- Milieu défini + bFGF + PDGF + NT3

2- DMEM 10% FCS

3- Milieu défini + EGF + bFGF + B27

Figure 25 : Test de trois milieux de culture sur des cellules d'AP en monocouche

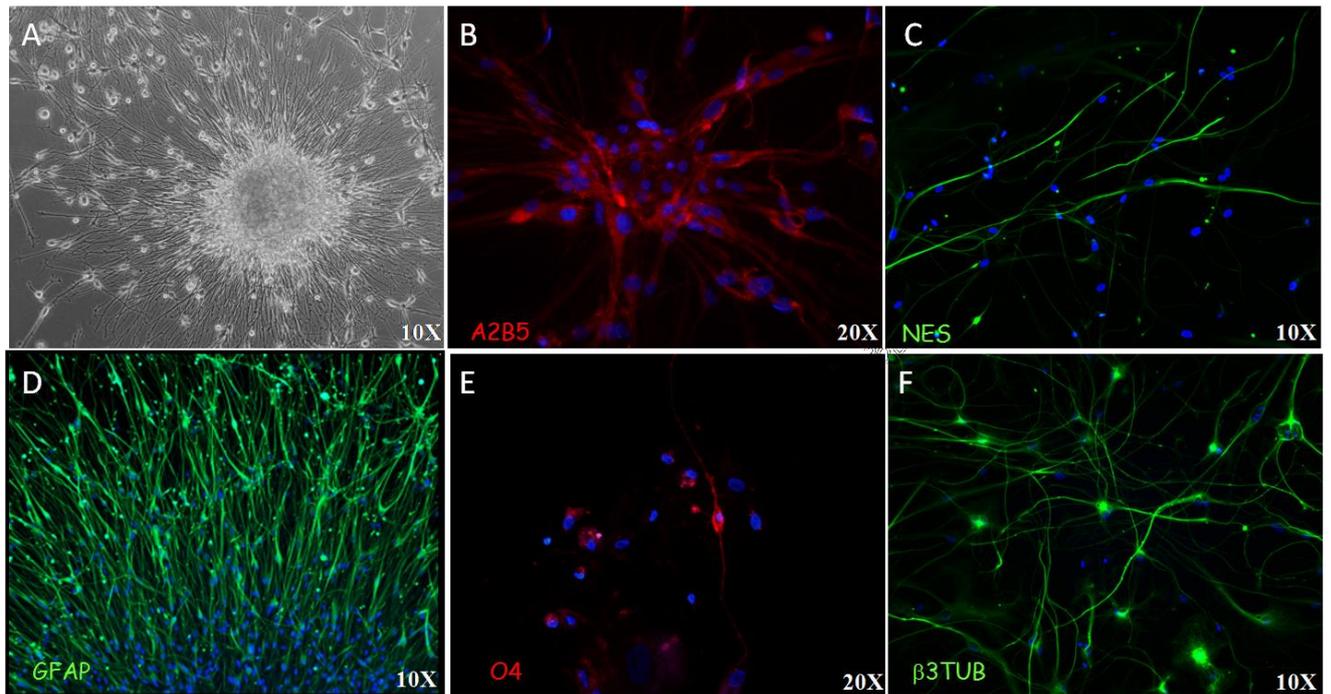


Figure 26 : Aspect d'un explant d'AP en contraste de phase (A) et expression en immunofluorescence de marqueurs de cellules souches (B et C) et de cellules différenciées (D, E, F)

Il serait également intéressant de confirmer les résultats de nos travaux *in vivo* afin d'étudier l'impact thérapeutique du celecoxib et de la fluvastatine dans des modèles murins. Nous projetons d'utiliser des xénogreffes sous-cutanées et orthotopiques de GB (U87-MG et U118) chez la souris. Toutefois, le modèle murin le plus pertinent serait un modèle d'AP. Très récemment, un modèle murin conditionnel d'AP exprimant la fusion KIAA1549 : BRAF a été élaboré (175). Ce modèle pourrait nous permettre de confirmer *in vivo* l'impact de la combinaison du celecoxib et de la fluvastatine sur la voie MAPKinase en évaluant par exemple, par western blot, la phosphorylation de ERK dans les cellules tumorales de l'AP formé.

➤ **Nouveaux essais cliniques**

D'autres études ont montré que la combinaison des AINS avec des statines était intéressante dans la prévention du cancer. En effet, l'association du celecoxib et de la fluvastatine a été testée *in vivo* dans d'autres modèles tumoraux. Une étude de Gao et collaborateurs a recherché l'effet de la combinaison de ces deux drogues sur la croissance de xénogreffes de carcinomes hépatocellulaires dans un modèle murin. Les souris ont reçu 15mg/kg/jour de fluvastatine et 25mg/kg/jour de celecoxib seul ou en combinaison pendant 6 semaines. Les

auteurs ont montré sur les tissus tumoraux collectés que la combinaison du celecoxib et de la fluvastatine était plus efficace que le traitement seul par une des deux molécules, entraînant une inhibition significative de la croissance de la tumeur, une augmentation de l'apoptose, et l'inhibition de l'angiogénèse et de la prolifération des cellules tumorales (176).

Etant donné que ces deux drogues ont déjà été utilisées indépendamment chez l'enfant sans toxicité (cf. Emploi du celecoxib et de la fluvastatine en thérapie métronomique), nous avons proposé cette combinaison dans la prise en charge thérapeutique d'une adolescente souffrant d'un AP multifocal réfractaire. Après 18 mois de traitement, la combinaison a été efficace sur la lésion hypothalamo-chiasmatique en diminuant progressivement la taille de la tumeur. Cependant, cet effet n'a pas été retrouvé au niveau des métastases vertébrales ceci pouvant être expliqué par l'hétérogénéité des cellules tumorales entre la tumeur primaire et les métastases ou encore par des phénomènes d'échappement.

A la lumière de ces résultats encourageants, un essai clinique de phase I intitulé « Fluvabrex » a été mis en place afin d'évaluer l'innocuité de l'association de la fluvastatine et du celecoxib chez les enfants atteints de gliomes réfractaires des voies optiques. Cet essai est actuellement en cours. Il implique 10 départements de cancérologie pédiatrique français, tous membres de la SFCE (Société Française de lutte contre les Cancers et leucémies de l'enfant et de l'adolescent) et les centres investigateurs principaux sont Lille (Dr P. Leblond) et Marseille (Dr N. André). En plus d'évaluer l'innocuité de plusieurs doses de fluvastatine (2, 4, 6 et 8 mg/kg/j) en association avec le celecoxib qui lui, sera administré en continu à une dose préalablement déterminée et déjà rapportée dans la littérature, l'essai évaluera la tolérance, la cinétique et la biodisponibilité de cette association ainsi que ses effets sur la taille et la progression de la tumeur (taux de réponse). Jusqu'à 24 enfants atteints d'un gliome des voies optiques en cours de progression malgré l'utilisation préalable de chimiothérapie seront recrutés sur une période s'étendant de 12 à 18 mois. Les premiers résultats devraient être publiés durant le second semestre 2016.

Selon les résultats obtenus, un essai clinique de phase II sera rapidement envisagé afin d'évaluer l'efficacité pharmacologique de la combinaison celecoxib-fluvastatine aux doses déterminées en phase I. Les propriétés thérapeutiques, la relation dose-effet, la posologie et le rythme d'administration optimaux seront alors déterminés sur une cohorte de 30 patients porteurs d'AP.

PUBLICATION II, III ET IV

"Outcome analysis of childhood pilocytic astrocytomas: a retrospective study of 148 cases at a single institution"

Carole Colin, Laëtitia Padovani, Céline Chappé, Sandy Mercurio, Didier Scavarda, Anderson Loundou, Frederic Frassinetti, Nicolas André, Corinne Bouvier, Andrey Korshunov, Gabriel Lena, et Dominique Figarella-Branger
Neuropathology and Applied Neurobiology 2013

"Search for Distinctive Markers in DNT and Cortical Grade II Glioma in children: Same Clinicopathological and Molecular Entities?"

Laëtitia Padovani, Carole Colin, Carla Fernandez, André Maués de Paula, Sandy Mercurio, Didier Scavarda, Frédéric Frassinetti, José Adélaïde, Anderson Loundou, Dominique Intagliata, Corinne Bouvier, Gabriel Lena, Daniel Birnbaum, Nadine Girard et Dominique Figarella-Branger
Current Topics in Medicinal Chemistry, 2012, 12, 1683-1692

"Dysembryoplastic Neuroepithelial Tumors Share with Pleomorphic Xanthoastrocytomas and Gangliogliomas BRAF^{V600E} Mutation and Expression"

Céline Chappé, Laëtitia Padovani, Didier Scavarda, Fabien Forest, Isabelle Nanni-Metellus, Anderson Loundou, Sandy Mercurio, Frédéric Fina, Gabriel Lena, Carole Colin, Dominique Figarella-Branger
Brain Pathology, 2013, 574–583

II. Contribution à la caractérisation clinico-pathologique et à la mise en évidence d'altérations moléculaires des gliomes pédiatriques

A. Présentation des travaux

Publication II : "Outcome analysis of childhood pilocytic astrocytomas: a retrospective study of 148 cases at a single institution"

Carole Colin, Laëtitia Padovani, Céline Chappé, Sandy Mercurio, Didier Scavarda, Anderson Loundou, Frederic Frassinetti, Nicolas André, Corinne Bouvier, Andrey Korshunov, Gabriel Lena, et Dominique Figarella-Branger

Neuropathology and Applied Neurobiology 2013

Cette étude avait pour but de rechercher des facteurs cliniques pronostiques des AP et d'évaluer les conséquences de la présence de la fusion *KIAA1549:BRAF* sur l'évolution du patient. Elle concernait un grand nombre d'enfants avec l'ensemble des variantes histologiques représentées et un suivi clinique particulièrement long. Dans cette étude, je me suis particulièrement consacrée à l'extraction de l'ARN des AP ainsi qu'à l'analyse des résultats notamment ceux des RT-PCR.

Cette étude portait sur 148 AP traités par chirurgie dans notre institution entre 1985 et 2010. Tous ces patients ont été traités selon le protocole BBSFOP (Carboplatine, Natulan, Etoposide, Cisplatine, Vincristine, Endoxan) avant 2004 et selon le protocole LGG (Carboplatine, Vincristine) en cours en France après 2004. Les enfants n'ont jamais reçu de radiothérapie avant l'âge de 5 ans.

À la date du dernier suivi, 83 patients étaient en rémission complète, 47 présentaient une maladie résiduelle stable, 7 une maladie en rechute, 11 étaient décédés. Au total, 44 patients ont fait une rechute. La survie globale était de 96% à 5 ans et de 84% à 15 ans avec une survie sans récurrence passant de 71% à 5 ans à 58% à 10 ans. Dans cette série, l'exérèse partielle de la tumeur ainsi qu'un âge à la chirurgie de moins de 36 mois étaient des facteurs de mauvais pronostic. En accord avec nos travaux antérieurs et les données de la littérature, nous avons

observé que les PMA et une localisation hypothalamo-chiasmatique des AP étaient également associés à un mauvais pronostic.

La fusion *KIAA1549:BRAF* a été recherchée par deux techniques : par RT-PCR et par méthode FISH. Les amorces utilisées pour la méthode de RT-PCR ont permis de détecter 3 types de fusion : *KIAA1549^{-exon-15}/BRAF^{-exon-9}*, *KIAA1549^{-exon-16}/BRAF^{-exon-11}* et *KIAA1549^{-exon-16}/BRAF^{-exon-9}*. La méthode de RT-PCR a détecté 37/47 tumeurs porteuses de la fusion *KIAA1549:BRAF*. La méthode de FISH a détecté 11/23 fusions *KIAA1549:BRAF*. La fusion a été recherchée par les deux méthodes pour 7 patients et 3 cas ont été discordants. Ceci peut s'expliquer par le fait que la méthode de RT-PCR est plus sensible que la méthode de FISH et qu'elle ne permet pas de détecter tous les types de fusion dans notre série. Cependant, la présence de la fusion *KIAA1549:BRAF* n'est pas significativement associée à la topographie tumorale et n'a pas de valeur pronostique.

Ainsi, cette étude montre que la chirurgie incomplète, un âge inférieur à 36 mois, la localisation hypothalamo-chiasmatique et un diagnostic de PMA sont des facteurs de mauvais pronostic.

Publication III : "Search for Distinctive Markers in DNT and Cortical Grade II Glioma in children: Same Clinicopathological and Molecular Entities?"

Laëtitia Padovani, Carole Colin, Carla Fernandez, André Maues de Paula, Sandy Mercurio, Didier Scavarda, Frédéric Frassinetti, José Adélaïde, Anderson Loundou, Dominique Intagliata, Corinne Bouvier, Gabriel Lena, Daniel Birnbaum, Nadine Girard et Dominique Figarella-Branger

Current Topics in Medicinal Chemistry, 2012, 12, 1683-1692

Cette étude a porté sur la caractérisation clinico-pathologique et biomoléculaire des DNT. Les DNT sont des tumeurs bénignes, avec un excellent pronostic. Leur diagnostic ne pose pas de difficulté si la composante glioneuronale est présente (forme simple). Par contre, en l'absence de cette composante glioneuronale ou s'il y a présence d'un nodule glial on peut confondre la DNT avec un gliome diffus de grade II. Ainsi, notre étude a porté sur une série de 24 tumeurs comprenant 13 DNT et 11 gliomes diffus de grade II qui présentaient les mêmes caractéristiques neuroradiologiques que les DNT. Dans cette étude, je suis intervenue dans les extractions d'ADN génomique et dans la réalisation et l'analyse de la CGH array. L'analyse des profils génomiques obtenus par cette technique pour 6 des 24 tumeurs de cette série n'a pas montré d'altération génomique. Par contre, l'analyse *a posteriori* d'un septième cas porteur d'une DNT a permis de mettre en évidence une altération non rapportée dans cet article. Ce résultat non publié sera détaillé dans la discussion de ces travaux.

Les DNT et les gliomes diffus de grade II ont un excellent pronostic : le taux de survie globale à 10 ans est de 100% et le taux de survie sans récurrence à 10 ans de 68.6%. Au niveau moléculaire, la recherche des marqueurs cibles dans notre étude n'a pas permis d'identifier un profil particulier. En effet, aucune altération chromosomique, délétion 1p19q ni de mutation de p53 n'a été mise en évidence. Seul un patient ayant un oligoastrocytome de grade II présentait une mutation du gène *IDH1*. De même, aucune différence significative n'a été retrouvée en termes d'âge au diagnostic, de sexe, de qualité de l'exérèse chirurgicale et de progression entre les deux groupes de tumeurs analysés.

Ainsi, nous avons montré dans cette étude que les DNT ne présentent aucune altération génétique spécifique. Aucun des marqueurs génétiques caractéristiques des gliomes de bas

grade de l'adulte comme les mutations des gènes *IDH1*, *IDH2*, *p53* ou la codélétion 1p19q ne peuvent les distinguer des gliomes diffus de grade II lorsque la composante glioneuronale est absente. Ces 11 tumeurs ont été reclassées en DNT non spécifiques dans l'article suivant.

Publication IV : "Dysembryoplastic Neuroepithelial Tumors Share with Pleomorphic Xanthoastrocytomas and Gangliogliomas BRAF^{V600E} Mutation and Expression"

Céline Chappé, Laëtitia Padovani, Didier Scavarda, Fabien Forest, Isabelle Nanni-Metellus, Anderson Loundou, Sandy Mercurio, Frédéric Fina, Gabriel Lena, Carole Colin, Dominique Figarella-Branger
Brain Pathology , 2013, 574–583

Dans cette dernière étude, nous avons recherché la valeur diagnostique et pronostique de la mutation BRAF^{V600E} dans une cohorte de tumeurs corticales gliales et glioneuronales de type GG (31), PXA (5), DNT (11 formes spécifiques et 9 non-spécifiques) et d'AP (34 AP et 6 PMA). Dans cette étude, qui se plaçait dans la continuité des deux autres précédemment décrites, j'ai participé à l'analyse des résultats.

La mutation BRAF^{V600E} a été mise en évidence par immunohistochimie dans 6/20 DNT (3/11 DNT spécifiques et 3/9 DNT non spécifiques), 3/5 PXA, 14/31 GG et aucune mutation n'a été retrouvée dans les AP et les PMA. Les techniques de séquençage direct et d'immunohistochimie étaient très concordantes dans cette série ($\kappa = +0.93$). En effet, seuls 2/69 cas ont été discordants pour des GG positifs en immunohistochimie mais négatifs en séquençage.

L'expression du biomarqueur CD34 à la surface des cellules tumorales a été recherchée par immunohistochimie. CD34 est une glycoprotéine transmembranaire de type I, exprimée à la surface des cellules souches hématopoïétiques mais aussi transitoirement à la surface des cellules souches neurales pendant la phase précoce de la neurulation. À l'exception de ces cellules, l'immunoréactivité de CD34 n'a jamais été retrouvée dans les cellules neurales du cerveau adulte normal ou du cerveau normal en développement (177). Cependant, l'expression de CD34 a été retrouvée dans 5/20 DNT (1 DNT spécifique et 4 non spécifiques), 3/5 PXA, 18/31 GG, et 5 AP des voies optiques.

Ainsi, notre étude a permis de rapporter pour la première fois la mutation BRAF^{V600E} dans 30% des DNT. La recherche de cette mutation dans les DNT semble donc être importante pour mieux caractériser ces tumeurs. Les DNT ont également montré une expression de CD34 principalement dans leur forme non-spécifique. Ces résultats sont similaires à une autre étude

où 100% des gliomes de grade II assimilables en tous points aux DNT non spécifiques exprimaient CD34 (178).

B. Discussion des travaux et perspectives

Les tumeurs gliales et glioneurales pédiatriques ont récemment commencé à faire l'objet d'analyses moléculaires afin de déterminer, comme pour les gliomes adultes, une classification histo-moléculaire plus pertinente que la classification purement histologique initialement décrite par l'OMS. Ces tumeurs ont un excellent pronostic et une survie à long terme avoisinant les 90%. La résection chirurgicale est le traitement de choix de ces lésions et suffit dans la grande majorité des cas à obtenir la guérison ou le contrôle de la maladie. En revanche, au sein d'un même groupe, certaines tumeurs ont un potentiel évolutif plus agressif et sont amenées à progresser ou récidiver voire à se transformer vers une tumeur anaplasique. Ces différences peuvent-elles s'expliquer par un profil moléculaire différent ?

C'est dans ce contexte que ce sont inscrits nos travaux sur l'analyse clinico-pathologique et biomoléculaire d'une série rétrospective de plus de 200 tumeurs circonscrites cérébrales de l'enfant : les AP, les GG, les PXA et les DNT.

Nous souhaitons répondre ainsi à plusieurs questions :

- La présence du gène de fusion *KIAA1549:BRAF* a-t-elle un impact pronostique chez les patients souffrant d'un AP ?
- Sur la base d'altérations moléculaires peut-on rapprocher les DNT des gliomes cortico-circonscrits de grade II de l'enfant liés à l'épilepsie chronique?
- Quelle est la fréquence de la mutation $BRAF^{V600E}$ dans les AP, les PXA, les DNT (spécifiques et non spécifiques) et les GG ? A-t-elle un impact diagnostique et/ou pronostique ?

Les résultats de notre étude portant sur une série de 148 AP (*Neuropathology and Applied Neurobiology*) sont en accord avec les études récentes qui ont caractérisé ces tumeurs gliales par la présence du gène de fusion *KIAA1549:BRAF* (77.8% des cas avec fusion dans notre étude) (54, 57, 62). Notre travail a confirmé le caractère péjoratif de la topographie hypothalamo-chiasmatique, du variant histologique pilomyxoïde et de l'âge au diagnostic inférieur à 36 mois ainsi que la meilleure survie (OS et PFS) des patients ayant bénéficié d'une exérèse complète (16, 17, 59, 63). En revanche, la fusion *KIAA1549:BRAF* n'a pas montré de valeur pronostique dans notre série de même que sa présence est restée indépendante de la topographie tumorale (supra-tentorielle *versus* infra-tentorielle). Toutefois, certains éléments qui auraient pu biaiser ces résultats méritent d'être soulignés : les AP extra-

cérébraux étaient peu représentés dans notre population (8.7%) et la technique RT-PCR que nous avons employée pour l'étude de la fusion permettait de ne détecter que les trois types de fusion principaux mis en évidence jusqu'alors. Les données de suivi clinique ont néanmoins confirmé que les AP supra-tentoriels sont différents des AP cérébelleux. Par ailleurs, les données de la littérature permettent d'affirmer que les AP supra-tentoriels expriment de manière préférentielle la mutation BRAF^{V600E} alors que les AP infra-tentoriels sont caractérisés par la fusion KIAA1549:BRAF. Ces résultats sont en accord avec l'étude dans laquelle nous avons démontré que les AP hypothalamo-chiasmatiques avaient une signature génétique différente des AP cérébelleux (100) et à partir de laquelle nous avons développé la thérapie ciblée proposée dans la publication présentée au début de ce chapitre (Mercurio et al., 2013).

Outre les AP qui restent les tumeurs circonscrites pédiatriques les plus fréquentes, nous nous sommes intéressés à d'autres tumeurs circonscrites gliales et glioneuronales, plus rares et au diagnostic parfois problématique : les DNT (spécifiques et non-spécifiques), les GG et les PXA.

Les DNT sont définies histologiquement par la présence d'une composante glioneuronale. En l'absence de cette composante glioneuronale, le diagnostic histologique de DNT *versus* un gliome diffus cortical de grade II est difficile malgré une topographie corticale, la même histoire clinique, un aspect radiologique et des symptômes similaires à une DNT classique.

Dans une première étude (*Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2012), 24 patients ont pu être identifiés et comparés d'un point de vue moléculaire. Aucun des marqueurs recherchés connus dans les tumeurs gliales adultes (mutation d'*IDH-1*, *IDH-2*, *P53*, codélétion 1p19q) n'a permis de différencier les gliomes corticaux de grade II liés à l'épilepsie chronique du groupe des DNT. Sachant que l'aspect radiologique et le suivi clinique de pronostic excellent sont identiques, ces résultats ont permis de supporter l'élargissement du concept des DNT spécifiques au sous-groupe des DNT non-spécifiques.

De plus, nous avons également confirmé que les altérations moléculaires récurrentes dans les gliomes de bas grade adultes (mutation d'*IDH-1*, *IDH-2*, *P53*, codélétion 1p19q) ne sont pas retrouvées dans leurs homologues pédiatriques, malgré une histologie souvent similaire. Ceci est un argument supplémentaire en faveur d'une modification de la classification actuelle pour distinguer tumeurs adultes et tumeurs pédiatriques.

Enfin, l'analyse de 6/24 de ces tumeurs en CGH array n'a pas montré d'altération génomique. En revanche, l'analyse *a posteriori* d'un septième cas (une DNT), nous a permis de mettre en évidence une altération non rapportée dans la littérature : une délétion en 13q21 contenant le gène de la protocadhérine 9 (*PCDH9*), décrit comme étant un gène suppresseur de tumeur sous-exprimé notamment dans les GB (179). De plus, une étude récente a rapporté la valeur pronostique de la sous-expression de la protéine PCDH9 dans une série de 116 gliomes, tous types histologiques, âge au diagnostic et grades confondus, mais ne comportant pas de DNT (180). Nous n'avons pas publié ce résultat pour l'instant car nous projetons d'étudier plus en avant cette altération dans un plus grand nombre de cas.

Les travaux suivants (*Brain Pathology*, 2013) ont été menés sur 20/24 de cette même série de DNT (spécifiques et non-spécifiques), complétés de cas d'AP (40), GG (31) et PXA (5). Les résultats obtenus sur cette série de 96 cas ont montré que la mutation BRAF^{V600E} était aussi bien retrouvée dans les DNT spécifiques que dans les DNT non-spécifiques (30% des cas), dans les GG (40%) et les PXA (60%). En revanche, seulement 2 des 40 AP analysés portaient cette mutation. Dans notre série, notons que la présence de la mutation n'a pas montré de valeur pronostique.

Ces travaux, en accord avec les données de la littérature, sont les premiers à rapporter cette mutation dans les DNT et ils confirment les résultats de notre précédente étude révélant l'absence de différence moléculaire entre les DNT spécifiques et les DNT non-spécifiques/pseudo-gliomes corticaux de grade II. Nous avons aussi démontré que ces tumeurs partagent les mêmes marqueurs moléculaires (mutation BRAF^{V600E} et expression de CD34) avec les GG et les PXA, suggérant une communauté nosologique entre ces tumeurs. En effet, les PXA sont actuellement classés dans le groupe des gliomes astrocytaires de grade II. L'ensemble des données pour le moment disponibles sur le plan moléculaire permet d'affirmer que la mutation BRAF^{V600E} est la caractéristique la plus robuste de ces tumeurs, et par là, les rapproche fortement de l'entité des GG. De plus, ces deux tumeurs peuvent partager aussi la délétion du gène *CDKN2A* qui lorsqu'elle est présente dans le compartiment glial des GG est prédictive d'une future transformation maligne (86). D'autre part, les gliomes diffus corticaux de grade II de l'enfant partagent clairement avec les DNT, outre leur histoire clinique, un profil moléculaire de type p53 négatif, une absence de codélétion 1p19q, une absence de mutation des gènes *IDH* et la présence de la mutation BRAF^{V600E}. Ces gliomes corticaux se rapprochent donc du groupe DNT, PXA et GG et sont en accord avec le concept de DNT non-spécifique.

Ces constats moléculaires, cliniques et anatomopathologiques soulignent le besoin d'établir une nouvelle classification intégrant des données cliniques et moléculaires.

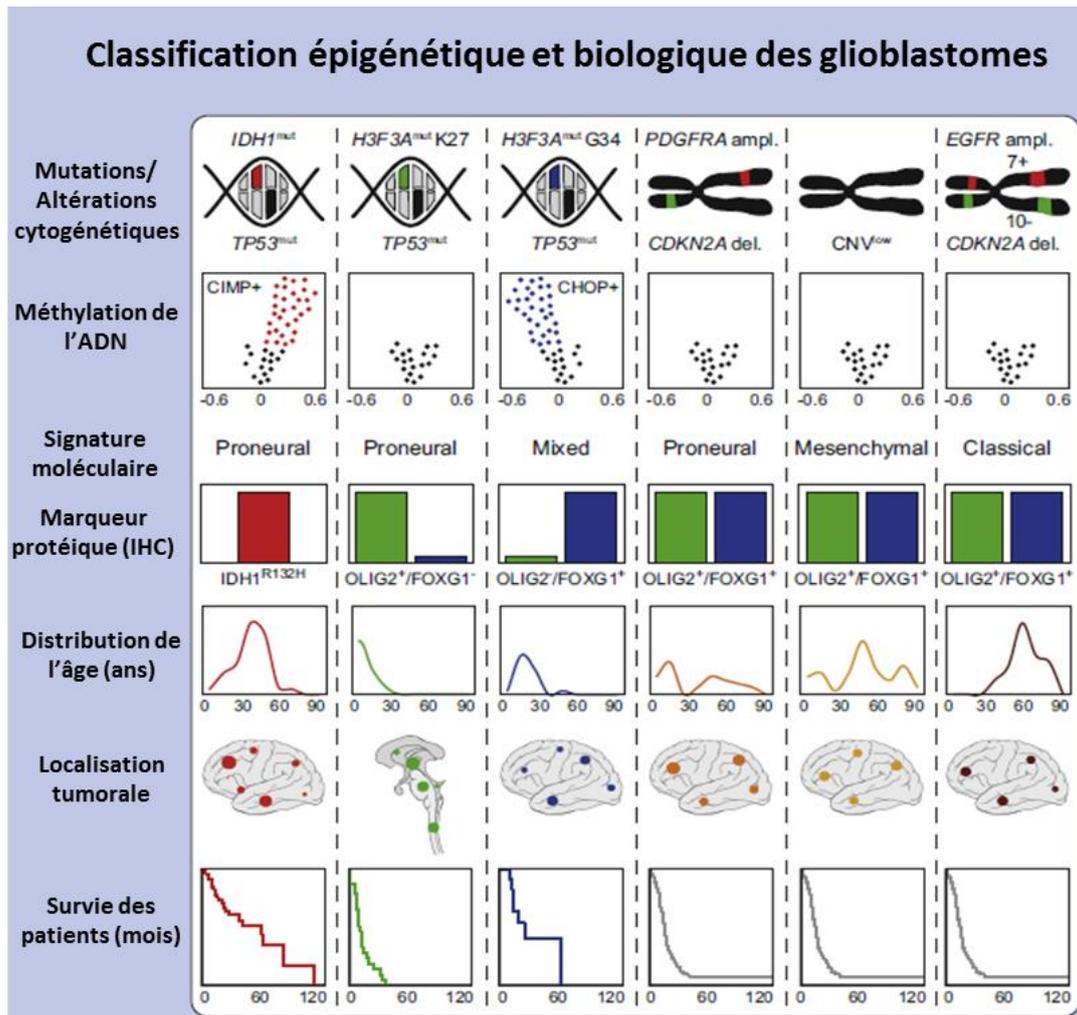
➤ **Proposition d'une classification moléculaire des tumeurs gliales et glioneuronales de l'enfant et d'outils diagnostiques utilisés en routine**

Ces dernières années, la mise en évidence d'altérations moléculaires récurrentes et de profils transcriptomiques spécifiques dans les gliomes de l'adulte a permis de proposer une nouvelle classification histo-moléculaire de ces tumeurs, affinée régulièrement par des marqueurs diagnostiques de plus en plus spécifiques tels que la mutation des gènes *IDH1/IDH2* (181, 182). De même, de récents travaux menés sur des gliomes infiltrants de haut grade de l'enfant (gliome diffus du tronc cérébral et GB) ont permis la caractérisation de mutations somatiques faux-sens récurrentes dans les gènes *H3F3A* et *HIST1H3B* codant respectivement pour l'histone H3.3 et l'histone H3.1. La mutation K27M dans l'histone H3.3 a été retrouvée dans 60% à 70% de ces tumeurs (183-186) et la mutation G34V/R dans l'histone H3.3 a été mise en évidence dans les GB de l'enfant et de l'adulte jeune (183, 187). Sturm et collaborateurs (188) ont ainsi distingué 6 grands sous-groupes de GB en fonction de leurs marqueurs moléculaires, du statut de méthylation de leur ADN, et de leur devenir clinique (**Figure 27**).

En revanche, les tumeurs gliales circonscrites de l'enfant ont été jusqu'ici beaucoup moins étudiées et nos travaux apportent quelques éléments de réponse quant à leur caractérisation moléculaire.

À la lumière des données de la littérature et de nos résultats, nous pouvons proposer de différencier :

- les gliomes pédiatriques infiltrants de haut grade présentant des altérations moléculaires au niveau des histones.
- les tumeurs pédiatriques circonscrites gliales et glioneuronales de bas grade présentant des altérations de la voie MAPKinase : d'une part celles qui présentent des altérations de BRAF de type fusion (principalement la fusion KIAA1549:BRAF) et d'autre part celles qui portent la mutation BRAF^{V600E}.



D'après Sturm et al., 2012 (188)

Figure 27 : Classification des GB selon les caractéristiques biomoléculaires.

Dans nos travaux publiés dans *Brain Pathology*, nous avons employé l'anticorps nouvellement développé par A. Von Deimling et collaborateurs (90, 189) permettant de détecter facilement et spécifiquement la mutation V600E de BRAF sur fragments de tissus fixés en formol et inclus en paraffine avec une excellente corrélation entre la technique d'immunohistochimie et celle de séquençage direct de l'ADN ($\kappa = +0.93$). Cet outil diagnostique se révèle très important pour une utilisation en routine, car au vu de nos résultats et du large spectre de tumeurs qui portent la mutation BRAF^{V600E}, il paraît aujourd'hui indispensable de rechercher systématiquement cette altération dans les tumeurs corticales glioneuronales. Cependant, les anticorps commercialisés aujourd'hui semblent nettement moins sensibles et spécifiques.

C'est pourquoi, aujourd'hui, au laboratoire d'anatomie pathologique, l'analyse histologique des tumeurs gliales et glioneuronales pédiatriques est complétée en routine de l'analyse des mutations des gènes *IDH1/2*, *BRAF* et *H3F3A*, de l'expression de p53 et CD34 et si possible de l'analyse de la fusion *KIAA1549:BRAF* (l'analyse en FISH reste cependant très difficile).

➤ **Le rôle primordial de la voie MAPKinase dans la genèse des tumeurs gliales et glioneuronales pédiatriques : analyse exhaustive de ces altérations dans 2 séries rétrospectives**

Très récemment, et parallèlement à nos publications, plusieurs travaux de grande envergure ont rapporté des données essentielles concernant la caractérisation des gliomes pédiatriques de bas grade.

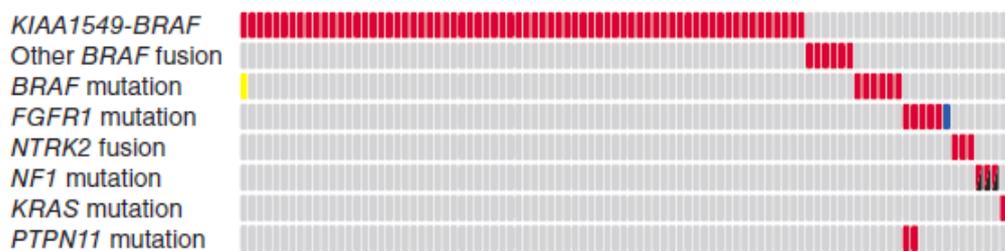
Les travaux du *Washington University Pediatric Cancer Genome Project* (98) ont révélé, par séquençage complet du génome de 39 jeunes patients porteurs de gliomes de bas grade, que plus de 50% de ces tumeurs présentaient une duplication du gène *FGFR1* ou un réarrangement des gènes *MYB* ou *MYBL1*, ces deux altérations étant mutuellement exclusives et préférentiellement retrouvées dans les gliomes diffus de grade II. D'autre part, l'analyse fine du séquençage complet du génome de ces tumeurs a permis de mettre en évidence de nouveaux gènes de fusion impliquant les gènes *RAF1* et *BRAF* tels que *FXR1:BRAF*, *BRAF:MACF1* et *QKI:RAF1*, des mutations du gène *FGFR1* et la fusion *FGFR1:TACCI*.

Dans le même temps, Ramkissoon et collaborateurs ont aussi procédé à l'analyse par CGHarray d'une série de 44 gliomes pédiatriques de bas grade, en excluant les AP. Ils ont retrouvé une amplification récurrente du gène *MYBL1* dans les astrocytomes diffus de grade II (85).

Enfin, dans le cadre de l'*International Cancer Genome Consortium Pediatric Brain Tumor Project*, le séquençage complet de l'ADN de 96 AP et le séquençage de l'ARN de 73 d'entre eux (99) ont permis une analyse exhaustive des altérations moléculaires propres à ces tumeurs. Les auteurs ont confirmé la présence des altérations connues de la voie des MAPKinases dont la fusion *KIAA1549:BRAF* (70 cas), la fusion *FAM131B:BRAF* (1 cas), la mutation *BRAF*^{V600E} (4 cas), la mutation du gène *NF1* (3 cas), mais ils ont aussi mis en évidence 4 nouveaux gènes de fusion impliquant *BRAF* : *RNF130:BRAF*, *CLCN6:BRAF*, *MKRNI:BRAF*, et *GNAI1:BRAF*, deux autres mutations de ce gène : *BRAF*^{ins599T} et *BRAF*^{insVLR} et de nouvelles altérations du gène *KRAS*. De plus, les auteurs ont rapporté

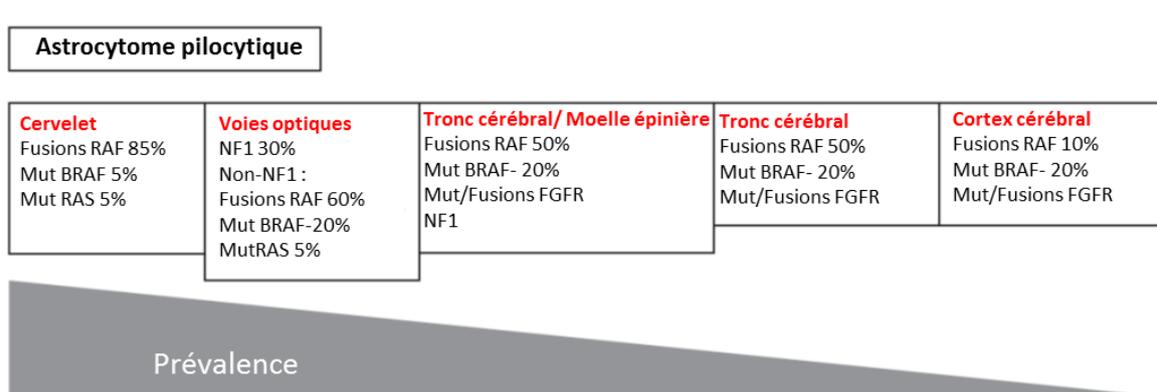
d'autres nouvelles altérations récurrentes telles que: les gènes de fusion impliquant le gène *NTRK2* (*QKI:NTRK2* et *NACC2:NTRK2*) dans 3 AP et la mutation du gène *FGFR1* dans 5 AP qui n'étaient pas du cervelet mais intéressaient des structures de la ligne médiane et dont 2 d'entre eux portaient aussi une mutation du gène *PTPN11*.

Au total, tous les AP de cette série présentaient au moins 1 altération de la voie MAPKinase (**Figure 28**), différentes selon notamment la localisation de la tumeur (**Figure 29**), confirmant l'importance de cette voie de signalisation dans la genèse des tumeurs gliales pédiatriques, ce qui en fait une cible privilégiée pour l'élaboration de thérapeutiques spécifiques.



D'après Jones et al., 2013 (99)

Figure 28 : Altérations de la voie MAPK dans les astrocytomes pilocytiques



D'après Fontebasso et al., 2013 (190)

Figure 29 : Prévalence des altérations moléculaires retrouvées dans les AP en fonction du site de développement tumoral

En considérant ces données tout à fait récentes, nous nous proposons aujourd'hui d'élargir les analyses de notre cohorte rétrospective publiée dans *Brain Pathology* mais en excluant les AP, à la recherche des altérations impliquant *FGFR1*, *MYB* et *MYBL1*. L'avantage de notre série est qu'elle comporte 20 DNT, tumeurs rares qui n'ont pas encore été analysées pour la recherche de ces altérations. Ce travail pourrait être fait en collaboration avec l'équipe d'Heidelberg (99) dans le cadre du groupe de travail sur les gliomes pédiatriques de bas grade (SIOP-LGG) dont nous faisons partie.

Nous envisageons également la recherche de ces altérations, en plus de celles faites en routine, sur une deuxième série rétrospective française revue de manière centralisée dans le cadre du GENOP (Groupe d'Étude en Neuropathologie et Oncologie Pédiatrique), et comportant 8 cas de DNT, 22 GG, 3 PXA et 15 gliomes inclassables histologiquement. Nous espérons que l'étude simultanée de l'ensemble des altérations récurrentes décrites dans les tumeurs gliales et glioneuronales de l'enfant pourra entre autre aider au diagnostic difficile de ces 15 gliomes et également apporter des éléments pronostiques dans la mesure où le suivi de ces deux cohortes est connu (cohorte Marseillaise) et en cours de récupération (cohorte française).

➤ Cibles thérapeutiques

En plus de l'aide au diagnostic, les altérations moléculaires de la voie MAPK identifiées dans les gliomes et les tumeurs glioneuronales pédiatriques sont des cibles thérapeutiques potentielles intéressantes. En effet, plusieurs inhibiteurs de la voie MAPkinase sont actuellement développés et testés en essais de phase II et III, essentiellement dans le traitement du mélanome, du cancer de la thyroïde, mais aussi dans celui du cancer colorectal, du cancer du poumon, du carcinome hépatocellulaire, de l'adénocarcinome pancréatique et certains cancers du sein (pour revue (191)). Ils ciblent principalement les tumeurs mutées pour *BRAF* et *KRAS*.

Les inhibiteurs de RAF

Le Vémurafenib et le Dabrafenib, ont été développés spécifiquement pour cibler la forme mutée de *BRAF* (**Figure 30**). Plusieurs essais cliniques dont certains de phase III ont démontré leur efficacité en terme de survie sans progression et survie globale chez des patients souffrant de mélanomes métastatiques et portant la mutation *BRAFV600E* (192-194). Ces deux inhibiteurs suppriment la phosphorylation de ERK et induisent des effets anti-

prolifératifs et pro-apoptotiques principalement dans les cellules portant la mutation BRAF (195).

Dans le cadre du traitement des gliomes et tumeurs glioneuronales pédiatriques mutées pour BRAF, quelques données sont disponibles dans la littérature. L'analogue pré-clinique du Vémurafenib (PLX4720) a été testé avec succès sur des xéno greffes intracrâniennes et sous-cutanées de gliomes pédiatriques mutés BRAFV600E, dont des AP (66, 196). L'efficacité du PLX4720 a notamment été testée en association avec de la radiothérapie, montrant une diminution de la prolifération tumorale et une meilleure survie des modèles animaux. Toutefois, bien que cette drogue soit relativement bien tolérée chez l'adulte, son innocuité doit être testée chez l'enfant, et il est préférable d'éviter la radiothérapie cérébrale chez ces jeunes patients. D'ailleurs, le seul essai clinique ayant testé le Vémurafenib dans le traitement des PXA (qui présentent la mutation BRAFV600E dans plus de 60% des cas) a été réalisé chez 4 patients adultes dont l'âge médian est de 45 ans (197) : après chimiothérapie 2 patients ont vu leur maladie se stabiliser, 1 était en progression, et 1 patient a répondu partiellement.

Par ailleurs, une étude récente a rapporté que les cellules d'AP portant la fusion KIAA1549:BRAF n'étaient pas sensibles au PLX4720 (198). Les auteurs ont développé une deuxième génération d'inhibiteur de BRAF, tel que le PLX PB-3, ciblant spécifiquement la fusion KIAA1549:BRAF.

De plus, plusieurs études ont identifié des résistances à ces inhibiteurs de BRAF, reflétant l'aptitude des cellules à contourner l'inhibition de BRAF mutée et réduisant ainsi l'efficacité du traitement. Plusieurs mécanismes de résistance aux inhibiteurs de RAF ont été décrits résultant en une réactivation de la signalisation de ERK en présence de la drogue (pour revue, 199). On peut citer les altérations activant la dimérisation de RAF (mutation NRAS), l'expression de variants d'épissage de RAF (p61), une surexpression de CRAF, une mutation NF1, menant à la réactivation de la voie MAPK malgré l'inhibition de BRAF muté. La résistance aux inhibiteurs de RAF peut également être due à des mutations en aval de ERK telle qu'une mutation de MEK ou encore être indépendante de la voie MAPK en promouvant la survie cellulaire de manière ERK-indépendante.

Les inhibiteurs de MEK

Il existe d'autres inhibiteurs de la voie MAPK qui ne ciblent pas BRAF, comme les inhibiteurs de MEK (**Figure 30**). Récemment, un essai clinique de phase III sur des patients souffrant de mélanome a démontré que le Trametinib permettait une meilleure survie sans progression et une meilleure survie globale que les agents anti-cancéreux habituellement

employés (dacarbazine et paclitaxel) (200). De plus, associé au Dabrafenib, le Trametinib offre un meilleur taux de réponse que la monothérapie (201).

En effet, comme pour les inhibiteurs de RAF, il existe des mécanismes de résistance aux inhibiteurs de MEK, c'est pourquoi se développent des stratégies thérapeutiques employant une combinaison d'inhibiteurs. Par exemple, Bid et collaborateurs (Bid et al., 2013) ont montré l'efficacité anti-tumorale de la combinaison du Selumetinib (inhibiteur de MEK) avec un inhibiteur de STAT3 (LLL12) sur des xénogreffes d'astrocytomes de bas grade pédiatriques (modèle BT40).

Cependant, les inhibiteurs de MEK ont des effets toxiques non négligeables (éruptions cutanées importantes, toxicité oculaire..) qui sont un problème majeur dans le développement de ces thérapeutiques.

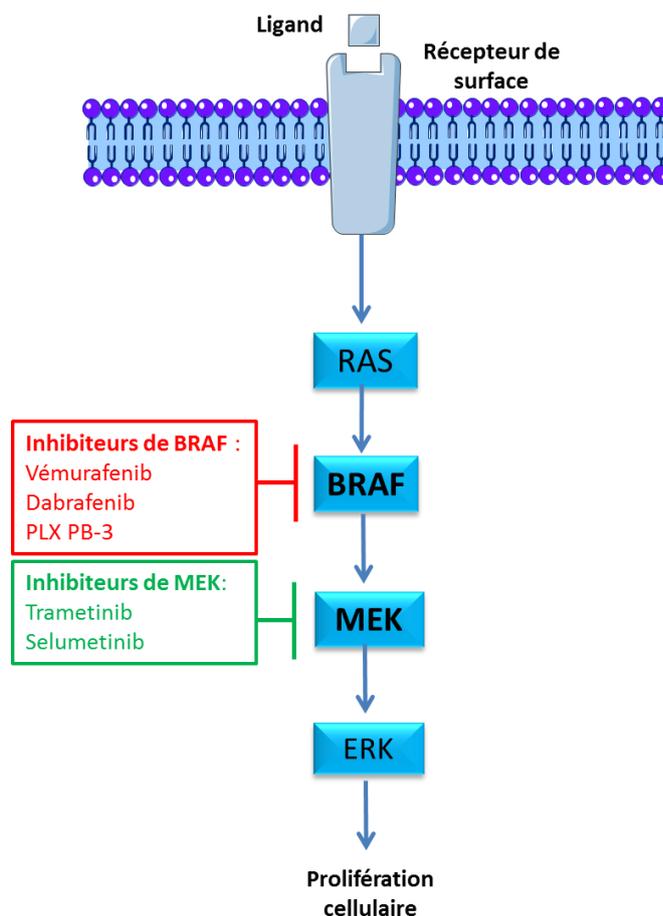


Figure 30 : Différentes thérapeutiques ciblées contre la voie MAPK

PARTIE III

CONCLUSION GÉNÉRALE

Conclusion générale

Au cours de cette thèse, j'ai développé et participé à deux axes d'étude: 1/ l'utilisation de la combinaison synergique celecoxib/fluvastatine utilisée de manière métronomique comme nouvelle stratégie dans le traitement des AP réfractaires, et 2/ la caractérisation clinico-pathologique et moléculaire de certaines tumeurs gliales et glioneuronales circonscrites de l'enfant. De plus, au cours de ma thèse, notre laboratoire a reçu, de la part de l'INCA (Institut National du Cancer), la labellisation SIRIC (SIte de Recherche Intégrée sur le Cancer), plaçant ainsi notre équipe au sein d'un réseau pluridisciplinaire de 18 équipes marseillaises travaillant toutes sur le gliome d'un point de vue clinique ou fondamental. J'ai pu ainsi bénéficier d'un environnement dynamique me permettant d'établir facilement des collaborations avec les services cliniques et d'autres équipes de recherche pour mener à bien nos travaux.

Les premiers ont permis de démontrer l'efficacité cytotoxique et anti-tumorale de la combinaison synergique du celecoxib et de la fluvastatine *in vitro* sur des modèles de culture d'AP et de GB, mais également chez le patient porteur d'AP réfractaire aux traitements conventionnels, grâce à une administration métronomique de ces deux molécules. Cette nouvelle stratégie de traitement est donc très prometteuse d'autant plus qu'elle est non toxique et peu coûteuse contrairement à la chimiothérapie conventionnelle. Nous attendons avec impatience les premiers résultats de l'essai « Fluvabrex » de phase I actuellement en cours.

Les études clinico-moléculaires que nous avons menées sur les tumeurs de bas grade de l'enfant incluant les AP, les GG, les PXA et les DNT ont permis de proposer de nouveaux éléments participant à l'amélioration du diagnostic de ces tumeurs et permettant ainsi de mieux orienter les indications thérapeutiques de ces patients. Ces travaux, ainsi que les données récentes de la littérature ont eu des répercussions immédiates dans l'activité de routine des laboratoires d'anatomie pathologique, dont celui du CHU Timone. En plus des analyses anatomo-pathologiques classiques des tumeurs pédiatriques, il a été mis en place une recherche appropriée quasi-systématique de plusieurs marqueurs moléculaires dont la mutation BRAF^{V600E}, les mutations de l'histone H3.3, les mutations d'*IDH1/2* et la recherche de l'expression de CD34. Nous pensons qu'à terme, ces éléments moléculaires pourront participer à la mise en place d'une classification plus pertinente des tumeurs gliales et glioneuronales pédiatriques, et à terme, à une prise en charge thérapeutique plus ciblée. De manière intéressante, l'ensemble de ces travaux confirme que la voie MAPKinase est au cœur de la tumorigenèse des gliomes pédiatriques de bas grade et constitue une cible thérapeutique prometteuse. Des inhibiteurs de BRAF sont actuellement

disponibles (Vémurafenib, Dabrafenib) de même que des inhibiteurs de MEK (Trametinib) mais les données sur leur utilisation dans le traitement des tumeurs cérébrales, notamment pédiatriques, sont encore peu nombreuses.

Il semble prometteur de s'y intéresser, afin de définir l'innocuité et la toxicité de ces molécules dans la population pédiatrique et envisager ainsi un traitement à la carte en fonction des altérations de la voie MAPK présente dans ces tumeurs : mutation de BRAF, fusion KIAA1549 :BRAF, ou autre altération.

Pour conclure, nous espérons que ces travaux et les perspectives qui en découlent permettront de mieux comprendre la biologie des gliomes pédiatriques de bas grade, d'établir des traitements plus efficaces et mieux tolérés mais également d'améliorer à long terme la qualité de vie de ces jeunes patients.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

1. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*; 2007. p. 97-109.
2. Figarella-Branger D, Colin C, Coulibaly B, Quilichini B, Maues De Paula A, Fernandez C, et al. [Histological and molecular classification of gliomas]. *Rev Neurol (Paris)*. 2008 Jun-Jul;164(6-7):505-15.
3. Bauchet L, Rigau V, Mathieu-Daude H, Figarella-Branger D, Hugues D, Palusseau L, et al. French brain tumor data bank: methodology and first results on 10,000 cases. *J Neurooncol*. 2007 Sep;84(2):189-99.
4. Pollack IF, Jakacki RI. Childhood brain tumors: epidemiology, current management and future directions. *Nat Rev Neurol*. 2011 Sep;7(9):495-506.
5. Duffau H, Capelle L. Preferential brain locations of low-grade gliomas. *Cancer*. 2004 Jun 15;100(12):2622-6.
6. Figarella-Branger D, Bouvier C, Moroch J, Michalak S, Burel-Vandenbos F. [Morphological classification of glioblastomas]. *Neurochirurgie*. 2010 Dec;56(6):459-63.
7. Lang FF, Miller DC, Koslow M, Newcomb EW. Pathways leading to glioblastoma multiforme: a molecular analysis of genetic alterations in 65 astrocytic tumors. *J Neurosurg*. 1994 Sep;81(3):427-36.
8. von Deimling A, Louis DN, Menon AG, von Ammon K, Petersen I, Ellison D, et al. Deletions on the long arm of chromosome 17 in pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol*. 1993;86(1):81-5.
9. Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro Oncol*. 2012 Nov;14 Suppl 5:v1-49.
10. Sievert AJ, Fisher MJ. Pediatric low-grade gliomas. *J Child Neurol*. 2009 Nov;24(11):1397-408.
11. Listerneck R, Darling C, Greenwald M, Strauss L, Charrow J. Optic pathway tumors in children: the effect of neurofibromatosis type 1 on clinical manifestations and natural history. *J Pediatr*. 1995 Nov;127(5):718-22.
12. Fleming AJ, Chi SN. Brain tumors in children. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 2012 Apr;42(4):80-103.
13. Colin C, Virard I, Baeza N, Tchoghandjian A, Fernandez C, Bouvier C, et al. Relevance of combinatorial profiles of intermediate filaments and transcription factors for glioma histogenesis. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2007 Aug;33(4):431-9.
14. Rodriguez FJ, Lim KS, Bowers D, Eberhart CG. Pathological and molecular advances in pediatric low-grade astrocytoma. *Annu Rev Pathol*. 2013 Jan 24;8:361-79.
15. Qaddoumi I, Sultan I, Broniscer A. Pediatric low-grade gliomas and the need for new options for therapy: Why and how? *Cancer Biol Ther*. 2009 Jan;8(1):4-10.
16. Tihan T, Fisher PG, Kepner JL, Godfraind C, McComb RD, Goldthwaite PT, et al. Pediatric astrocytomas with monomorphous pilomyxoid features and a less favorable outcome. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1999 Oct;58(10):1061-8.
17. Fernandez C, Figarella-Branger D, Girard N, Bouvier-Labit C, Gouvernet J, Paz Paredes A, et al. Pilocytic astrocytomas in children: prognostic factors--a retrospective study of 80 cases. *Neurosurgery*. 2003 Sep;53(3):544-53; discussion 54-5.

18. Komotar RJ, Mocco J, Jones JE, Zacharia BE, Tihan T, Feldstein NA, et al. Pilomyxoid astrocytoma: diagnosis, prognosis, and management. *Neurosurg Focus*. 2005 Jun 15;18(6A):E7.
19. Im SH, Chung CK, Cho BK, Wang KC, Yu IK, Song IC, et al. Intracranial ganglioglioma: preoperative characteristics and oncologic outcome after surgery. *J Neurooncol*. 2002 Sep;59(2):173-83.
20. Zentner J, Wolf HK, Ostertun B, Hufnagel A, Campos MG, Solymosi L, et al. Gangliogliomas: clinical, radiological, and histopathological findings in 51 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1994 Dec;57(12):1497-502.
21. DeMarchi R, Abu-Abed S, Munoz D, Loch Macdonald R. Malignant ganglioglioma: case report and review of literature. *J Neurooncol*. 2011 Jan;101(2):311-8.
22. Gelabert-Gonzalez M, Serramito-Garcia R, Arcos-Algaba A. Desmoplastic infantile and non-infantile ganglioglioma. Review of the literature. *Neurosurg Rev*. 2011 Apr;34(2):151-8.
23. Dumas-Duport C, Scheithauer BW, Chodkiewicz JP, Laws ER, Jr., Vedrenne C. Dysembryoplastic neuroepithelial tumor: a surgically curable tumor of young patients with intractable partial seizures. Report of thirty-nine cases. *Neurosurgery*. 1988 Nov;23(5):545-56.
24. Komori T, Arai N. Dysembryoplastic neuroepithelial tumor, a pure glial tumor? Immunohistochemical and morphometric studies. *Neuropathology*. 2013 Aug;33(4):459-68.
25. Campos AR, Clusmann H, von Lehe M, Niehusmann P, Becker AJ, Schramm J, et al. Simple and complex dysembryoplastic neuroepithelial tumors (DNT) variants: clinical profile, MRI, and histopathology. *Neuroradiology*. 2009 Jul;51(7):433-43.
26. Varlet P, Beuvon F, Fallet-Bianco C, Dumas-Duport C. [Dysembryoplastic neuroepithelial tumors]. *Ann Pathol*. 2000 Oct;20(5):429-37.
27. Vu TM, Liubinas SV, Gonzales M, Drummond KJ. Malignant potential of pleomorphic xanthoastrocytoma. *J Clin Neurosci*. 2012 Jan;19(1):12-20.
28. Giannini C, Scheithauer BW, Burger PC, Brat DJ, Wollan PC, Lach B, et al. Pleomorphic xanthoastrocytoma: what do we really know about it? *Cancer*. 1999 May 1;85(9):2033-45.
29. Jones C, Perryman L, Hargrave D. Paediatric and adult malignant glioma: close relatives or distant cousins? *Nat Rev Clin Oncol*. 2012 Jul;9(7):400-13.
30. Garzon M, Garcia-Fructuoso G, Guillen A, Sunol M, Mora J, Cruz O. Brain stem tumors in children and adolescents: single institutional experience. *Childs Nerv Syst*. 2013 Aug;29(8):1321-31.
31. Kramm CM, Butenhoff S, Rausche U, Warmuth-Metz M, Kortmann RD, Pietsch T, et al. Thalamic high-grade gliomas in children: a distinct clinical subset? *Neuro Oncol*. 2011 Jun;13(6):680-9.
32. Fernandez C, Maues de Paula A, Colin C, Quilichini B, Bouvier-Labit C, Girard N, et al. Thalamic gliomas in children: an extensive clinical, neuroradiological and pathological study of 14 cases. *Childs Nerv Syst*. 2006 Dec;22(12):1603-10.
33. Khuong-Quang DA, Gerges N, Jabado N. [Mutations in histone H3.3 and chromatin remodeling genes drive pediatric and young adult glioblastomas]. *Med Sci (Paris)*. 2013 Oct;28(10):809-12.
34. Chassoux F, Landré E. Tumeurs dysembryoplasiques neuroépithéliales. *Epilepsie* 2006 18(2): 85-100.
35. Di Benedetto B, Kallnik M, Weisenhorn DM, Falls WA, Wurst W, Holter SM. Activation of ERK/MAPK in the lateral amygdala of the mouse is required for acquisition of a fear-potentiated startle response. *Neuropsychopharmacology*. 2009 Jan;34(2):356-66.

36. Sweatt JD. The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J Neurochem.* 2001 Jan;76(1):1-10.
37. Ji RR, Gereau RWt, Malcangio M, Strichartz GR. MAP kinase and pain. *Brain Res Rev.* 2009 Apr;60(1):135-48.
38. Samuels IS, Karlo JC, Faruzzi AN, Pickering K, Herrup K, Sweatt JD, et al. Deletion of ERK2 mitogen-activated protein kinase identifies its key roles in cortical neurogenesis and cognitive function. *J Neurosci.* 2008 Jul 2;28(27):6983-95.
39. Chen YH, Gutmann DH. The molecular and cell biology of pediatric low-grade gliomas. *Oncogene.* 2013 Apr 29.
40. Lièvre A, Laurent-Puig P. RAS/MAPK signaling pathway. *Cancéro dig.* 2010;2(1):38-42.
41. Chong H, Vikis HG, Guan KL. Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal.* 2003 May;15(5):463-9.
42. Courtois-Cox S, Genter Williams SM, Reczek EE, Johnson BW, McGillicuddy LT, Johannessen CM, et al. A negative feedback signaling network underlies oncogene-induced senescence. *Cancer Cell.* 2006 Dec;10(6):459-72.
43. Tatevossian RG, Lawson AR, Forshew T, Hindley GF, Ellison DW, Sheer D. MAPK pathway activation and the origins of pediatric low-grade astrocytomas. *J Cell Physiol.* 2010 Mar;222(3):509-14.
44. Listernick R, Louis DN, Packer RJ, Gutmann DH. Optic pathway gliomas in children with neurofibromatosis 1: consensus statement from the NF1 Optic Pathway Glioma Task Force. *Ann Neurol.* 1997 Feb;41(2):143-9.
45. Pfister S, Janzarik WG, Remke M, Ernst A, Werft W, Becker N, et al. BRAF gene duplication constitutes a mechanism of MAPK pathway activation in low-grade astrocytomas. *J Clin Invest.* 2008 May;118(5):1739-49.
46. Boyd KP, Korf BR, Theos A. Neurofibromatosis type 1. *J Am Acad Dermatol.* 2009 Jul;61(1):1-14; quiz 5-6.
47. Chateil JF, Soussotte C, Pedespan JM, Brun M, Le Manh C, Diard F. MRI and clinical differences between optic pathway tumours in children with and without neurofibromatosis. *Br J Radiol.* 2001 Jan;74(877):24-31.
48. Michaloglou C, Vredeveld LC, Mooi WJ, Peeper DS. BRAF(E600) in benign and malignant human tumours. *Oncogene.* 2008 Feb 7;27(7):877-95.
49. Dessars B, De Raeve LE, El Housni H, Debouck CJ, Sidon PJ, Morandini R, et al. Chromosomal translocations as a mechanism of BRAF activation in two cases of large congenital melanocytic nevi. *J Invest Dermatol.* 2007 Jun;127(6):1468-70.
50. Ciampi R, Knauf JA, Kerler R, Gandhi M, Zhu Z, Nikiforova MN, et al. Oncogenic AKAP9-BRAF fusion is a novel mechanism of MAPK pathway activation in thyroid cancer. *J Clin Invest.* 2005 Jan;115(1):94-101.
51. Bar EE, Lin A, Tihan T, Burger PC, Eberhart CG. Frequent gains at chromosome 7q34 involving BRAF in pilocytic astrocytoma. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2008 Sep;67(9):878-87.
52. Jones DT, Kocialkowski S, Liu L, Pearson DM, Backlund LM, Ichimura K, et al. Tandem duplication producing a novel oncogenic BRAF fusion gene defines the majority of pilocytic astrocytomas. *Cancer Res.* 2008 Nov 1;68(21):8673-7.
53. Sievert AJ, Jackson EM, Gai X, Hakonarson H, Judkins AR, Resnick AC, et al. Duplication of 7q34 in pediatric low-grade astrocytomas detected by high-density single-nucleotide polymorphism-based genotype arrays results in a novel BRAF fusion gene. *Brain Pathol.* 2009 Jul;19(3):449-58.

54. Forshew T, Tatevossian RG, Lawson AR, Ma J, Neale G, Ogunkolade BW, et al. Activation of the ERK/MAPK pathway: a signature genetic defect in posterior fossa pilocytic astrocytomas. *J Pathol.* 2009 Jun;218(2):172-81.
55. Jones DT, Gronych J, Lichter P, Witt O, Pfister SM. MAPK pathway activation in pilocytic astrocytoma. *Cell Mol Life Sci.* 2012 Jun;69(11):1799-811.
56. Korshunov A, Meyer J, Capper D, Christians A, Remke M, Witt H, et al. Combined molecular analysis of BRAF and IDH1 distinguishes pilocytic astrocytoma from diffuse astrocytoma. *Acta Neuropathol.* 2009 Sep;118(3):401-5.
57. Jacob K, Albrecht S, Sollier C, Faury D, Sader E, Montpetit A, et al. Duplication of 7q34 is specific to juvenile pilocytic astrocytomas and a hallmark of cerebellar and optic pathway tumours. *Br J Cancer.* 2009 Aug 18;101(4):722-33.
58. Hawkins C, Walker E, Mohamed N, Zhang C, Jacob K, Shirinian M, et al. BRAF-KIAA1549 fusion predicts better clinical outcome in pediatric low-grade astrocytoma. *Clin Cancer Res.* 2011 Jul 15;17(14):4790-8.
59. Hasselblatt M, Riesmeier B, Lechtape B, Brentrup A, Stummer W, Albert FK, et al. BRAF-KIAA1549 fusion transcripts are less frequent in pilocytic astrocytomas diagnosed in adults. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2011 Dec;37(7):803-6.
60. Horbinski C, Nikiforova MN, Hagenkord JM, Hamilton RL, Pollack IF. Interplay among BRAF, p16, p53, and MIB1 in pediatric low-grade gliomas. *Neuro Oncol.* 2012 Jun;14(6):777-89.
61. Reis GF, Bloomer MM, Perry A, Phillips JJ, Grenert JP, Karnezis AN, et al. Pilocytic astrocytomas of the optic nerve and their relation to pilocytic astrocytomas elsewhere in the central nervous system. *Mod Pathol.* 2013 Oct;26(10):1279-87.
62. Jones DT, Kocialkowski S, Liu L, Pearson DM, Ichimura K, Collins VP. Oncogenic RAF1 rearrangement and a novel BRAF mutation as alternatives to KIAA1549:BRAF fusion in activating the MAPK pathway in pilocytic astrocytoma. *Oncogene.* 2009 May 21;28(20):2119-23.
63. Cin H, Meyer C, Herr R, Janzarik WG, Lambert S, Jones DT, et al. Oncogenic FAM131B-BRAF fusion resulting from 7q34 deletion comprises an alternative mechanism of MAPK pathway activation in pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol.* 2011 Jun;121(6):763-74.
64. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 2002 Jun 27;417(6892):949-54.
65. Schindler G, Capper D, Meyer J, Janzarik W, Omran H, Herold-Mende C, et al. Analysis of BRAF V600E mutation in 1,320 nervous system tumors reveals high mutation frequencies in pleomorphic xanthoastrocytoma, ganglioglioma and extra-cerebellar pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol.* 2011 Mar;121(3):397-405.
66. Dasgupta T, Haas-Kogan DA. The combination of novel targeted molecular agents and radiation in the treatment of pediatric gliomas. *Front Oncol.* 2013;3:110.
67. Dougherty MJ, Santi M, Brose MS, Ma C, Resnick AC, Sievert AJ, et al. Activating mutations in BRAF characterize a spectrum of pediatric low-grade gliomas. *Neuro Oncol.* 2010 Jul;12(7):621-30.
68. Schiffman JD, Hodgson JG, VandenBerg SR, Flaherty P, Polley MY, Yu M, et al. Oncogenic BRAF mutation with CDKN2A inactivation is characteristic of a subset of pediatric malignant astrocytomas. *Cancer Res.* 2010 Jan 15;70(2):512-9.
69. Raabe EH, Lim KS, Kim JM, Meeker A, Mao XG, Nikkhah G, et al. BRAF activation induces transformation and then senescence in human neural stem cells: a pilocytic astrocytoma model. *Clin Cancer Res.* 2011 Jun 1;17(11):3590-9.

70. Rodriguez EF, Scheithauer BW, Giannini C, Ryneerson A, Cen L, Hoesley B, et al. PI3K/AKT pathway alterations are associated with clinically aggressive and histologically anaplastic subsets of pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol.* 2011 Mar;121(3):407-20.
71. Duerr EM, Rollbrocker B, Hayashi Y, Peters N, Meyer-Puttlitz B, Louis DN, et al. PTEN mutations in gliomas and glioneuronal tumors. *Oncogene.* 1998 Apr 30;16(17):2259-64.
72. Lambert SR, Witt H, Hovestadt V, Zucknick M, Kool M, Pearson DM, et al. Differential expression and methylation of brain developmental genes define location-specific subsets of pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol.* 2013 Aug;126(2):291-301.
73. Dias-Santagata D, Lam Q, Vernovsky K, Vena N, Lennerz JK, Borger DR, et al. BRAF V600E mutations are common in pleomorphic xanthoastrocytoma: diagnostic and therapeutic implications. *PLoS One.* 2011;6(3):e17948.
74. Myung JK, Cho H, Park CK, Kim SK, Lee SH, Park SH. Analysis of the BRAF(V600E) Mutation in Central Nervous System Tumors. *Transl Oncol.* 2012 Dec;5(6):430-6.
75. Weber RG, Hoischen A, Ehrler M, Zipper P, Kaulich K, Blaschke B, et al. Frequent loss of chromosome 9, homozygous CDKN2A/p14(ARF)/CDKN2B deletion and low TSC1 mRNA expression in pleomorphic xanthoastrocytomas. *Oncogene.* 2007 Feb 15;26(7):1088-97.
76. Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CM, et al. BRAFV600E-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature.* 2005 Aug 4;436(7051):720-4.
77. Robinson JP, VanBrocklin MW, Guilbeault AR, Signorelli DL, Brandner S, Holmen SL. Activated BRAF induces gliomas in mice when combined with Ink4a/Arf loss or Akt activation. *Oncogene.* 2010 Jan 21;29(3):335-44.
78. Kaulich K, Blaschke B, Numann A, von Deimling A, Wiestler OD, Weber RG, et al. Genetic alterations commonly found in diffusely infiltrating cerebral gliomas are rare or absent in pleomorphic xanthoastrocytomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002 Dec;61(12):1092-9.
79. Kim JH, Huse JT, Huang Y, Lyden D, Greenfield JP. Molecular diagnostics in paediatric glial tumours. *Lancet Oncol.* 2013 Jan;14(1):e19-27.
80. Dahiya S, Haydon DH, Alvarado D, Gurnett CA, Gutmann DH, Leonard JR. BRAF(V600E) mutation is a negative prognosticator in pediatric ganglioglioma. *Acta Neuropathol.* 2013 Jun;125(6):901-10.
81. von Deimling A, Fimmers R, Schmidt MC, Bender B, Fassbender F, Nagel J, et al. Comprehensive allelotyping and genetic analysis of 466 human nervous system tumors. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2000 Jun;59(6):544-58.
82. Hayashi Y, Iwato M, Hasegawa M, Tachibana O, von Deimling A, Yamashita J. Malignant transformation of a gangliocytoma/ganglioglioma into a glioblastoma multiforme: a molecular genetic analysis. Case report. *J Neurosurg.* 2001 Jul;95(1):138-42.
83. Hirose T, Scheithauer BW, Lopes MB, Gerber HA, Altermatt HJ, VandenBerg SR. Ganglioglioma: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Cancer.* 1997 Mar 1;79(5):989-1003.
84. Fukushima T, Katayama Y, Watanabe T, Yoshino A, Komine C, Yokoyama T. Aberrant TP53 protein accumulation in the neuronal component of ganglioglioma. *J Neurooncol.* 2005 Apr;72(2):103-6.
85. Ramkissoon LA, Horowitz PM, Craig JM, Ramkissoon SH, Rich BE, Schumacher SE, et al. Genomic analysis of diffuse pediatric low-grade gliomas identifies recurrent oncogenic truncating rearrangements in the transcription factor MYBL1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 May 14;110(20):8188-93.

86. Hoischen A, Ehrler M, Fassunke J, Simon M, Baudis M, Landwehr C, et al. Comprehensive characterization of genomic aberrations in gangliogliomas by CGH, array-based CGH and interphase FISH. *Brain Pathol.* 2008 Jul;18(3):326-37.
87. Balss J, Meyer J, Mueller W, Korshunov A, Hartmann C, von Deimling A. Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol.* 2008 Dec;116(6):597-602.
88. Hartmann C, Meyer J, Balss J, Capper D, Mueller W, Christians A, et al. Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta Neuropathol.* 2009 Oct;118(4):469-74.
89. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med.* 2009 Feb 19;360(8):765-73.
90. Capper D, Reuss D, Schittenhelm J, Hartmann C, Bremer J, Sahm F, et al. Mutation-specific IDH1 antibody differentiates oligodendrogliomas and oligoastrocytomas from other brain tumors with oligodendroglioma-like morphology. *Acta Neuropathol.* 2011 Feb;121(2):241-52.
91. Riemenschneider MJ, Jeuken JW, Wesseling P, Reifenberger G. Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. *Acta Neuropathol.* 2010 Nov;120(5):567-84.
92. 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.
93. Raghavan R, Balani J, Perry A, Margraf L, Vono MB, Cai DX, et al. Pediatric oligodendrogliomas: a study of molecular alterations on 1p and 19q using fluorescence in situ hybridization. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2003 May;62(5):530-7.
94. Kreiger PA, Okada Y, Simon S, Rorke LB, Louis DN, Golden JA. Losses of chromosomes 1p and 19q are rare in pediatric oligodendrogliomas. *Acta Neuropathol.* 2005 Apr;109(4):387-92.
95. Prayson RA, Napekoski KM. Composite ganglioglioma/dysembryoplastic neuroepithelial tumor: a clinicopathologic study of 8 cases. *Hum Pathol.* 2012 Jul;43(7):1113-8.
96. Fujisawa H, Marukawa K, Hasegawa M, Tohma Y, Hayashi Y, Uchiyama N, et al. Genetic differences between neurocytoma and dysembryoplastic neuroepithelial tumor and oligodendroglial tumors. *J Neurosurg.* 2002 Dec;97(6):1350-5.
97. Pollack IF, Finkelstein SD, Woods J, Burnham J, Holmes EJ, Hamilton RL, et al. Expression of p53 and prognosis in children with malignant gliomas. *N Engl J Med.* 2002 Feb 7;346(6):420-7.
98. Zhang J, Wu G, Miller CP, Tatevossian RG, Dalton JD, Tang B, et al. Whole-genome sequencing identifies genetic alterations in pediatric low-grade gliomas. *Nat Genet.* 2013 Jun;45(6):602-12.
99. Jones DT, Hutter B, Jager N, Korshunov A, Kool M, Warnatz HJ, et al. Recurrent somatic alterations of FGFR1 and NTRK2 in pilocytic astrocytoma. *Nat Genet.* 2013 Aug;45(8):927-32.
100. Tchoghandjian A, Fernandez C, Colin C, El Ayachi I, Voutsinos-Porche B, Fina F, et al. Pilocytic astrocytoma of the optic pathway: a tumour deriving from radial glia cells with a specific gene signature. *Brain.* 2009 Jun;132(Pt 6):1523-35.
101. Ghosh N, Chaki R, Mandal V, Mandal SC. COX-2 as a target for cancer chemotherapy. *Pharmacol Rep.* 2010 Mar-Apr;62(2):233-44.
102. Jendrossek V. Targeting apoptosis pathways by Celecoxib in cancer. *Cancer Lett.* 2011 May 28;332(2):313-24.
103. Winfield LL, Payton-Stewart F. Celecoxib and Bcl-2: emerging possibilities for anticancer drug design. *Future Med Chem.* 2012 Mar;4(3):361-83.

104. Teicher BA, Korbust TT, Menon K, Holden SA, Ara G. Cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors as modulators of cancer therapies. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1994;33(6):515-22.
105. Pyo H, Choy H, Amorino GP, Kim JS, Cao Q, Hercules SK, et al. A selective cyclooxygenase-2 inhibitor, NS-398, enhances the effect of radiation in vitro and in vivo preferentially on the cells that express cyclooxygenase-2. *Clin Cancer Res*. 2001 Oct;7(10):2998-3005.
106. Mann M, Sheng H, Shao J, Williams CS, Pisacane PI, Sliwkowski MX, et al. Targeting cyclooxygenase 2 and HER-2/neu pathways inhibits colorectal carcinoma growth. *Gastroenterology*. 2001 Jun;120(7):1713-9.
107. Altorki NK, Keresztes RS, Port JL, Libby DM, Korst RJ, Flieder DB, et al. Celecoxib, a selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor, enhances the response to preoperative paclitaxel and carboplatin in early-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2003 Jul 15;21(14):2645-50.
108. Sakai R, Iwamatsu A, Hirano N, Ogawa S, Tanaka T, Mano H, et al. A novel signaling molecule, p130, forms stable complexes in vivo with v-Crk and v-Src in a tyrosine phosphorylation-dependent manner. *Embo J*. 1994 Aug 15;13(16):3748-56.
109. Wang L, Tabu K, Kimura T, Tsuda M, Linghu H, Tanino M, et al. Signaling adaptor protein Crk is indispensable for malignant feature of glioblastoma cell line KMG4. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Nov 3;362(4):976-81.
110. Cornillon J, Campos L, Guyotat D. [Focal adhesion kinase (FAK), a multifunctional protein]. *Med Sci (Paris)*. 2003 Jun-Jul;19(6-7):743-52.
111. Casanova I, Parreno M, Farre L, Guerrero S, Cespedes MV, Pavon MA, et al. Celecoxib induces anoikis in human colon carcinoma cells associated with the deregulation of focal adhesions and nuclear translocation of p130Cas. *Int J Cancer*. 2006 May 15;118(10):2381-9.
112. Casanova I, Bosch R, Lasa A, Parreno M, Cespedes MV, Brunet S, et al. A celecoxib derivative inhibits focal adhesion signaling and induces caspase-8-dependent apoptosis in human acute myeloid leukemia cells. *Int J Cancer*. 2008 Jul 1;123(1):217-26.
113. Kaiserlian D, Rigal D, Abello J, Revillard JP. Expression, function and regulation of the intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on human intestinal epithelial cell lines. *Eur J Immunol*. 1991 Oct;21(10):2415-21.
114. Parkos CA, Colgan SP, Diamond MS, Nusrat A, Liang TW, Springer TA, et al. Expression and polarization of intercellular adhesion molecule-1 on human intestinal epithelia: consequences for CD11b/CD18-mediated interactions with neutrophils. *Mol Med*. 1996 Jul;2(4):489-505.
115. Long EO. ICAM-1: getting a grip on leukocyte adhesion. *J Immunol*. 2011 May 1;186(9):5021-3.
116. Gallicchio M, Rosa AC, Dianzani C, Brucato L, Benetti E, Collino M, et al. Celecoxib decreases expression of the adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 in a colon cancer cell line (HT29). *Br J Pharmacol*. 2008 Mar;153(5):870-8.
117. Parfiniewicz B, Pendzich J, Gruchlik A, Hollek A, Weglarz L. Impact of celecoxib on soluble intercellular adhesion molecule-1 and soluble e-cadherin concentrations in human colon cancer cell line cultures exposed to phytic acid and TNF-alpha. *Acta Pol Pharm*. 2012 Nov-Dec;69(6):1283-90.
118. Hindler K, Cleeland CS, Rivera E, Collard CD. The role of statins in cancer therapy. *Oncologist*. 2006 Mar;11(3):306-15.
119. Roy M, Kung HJ, Ghosh PM. Statins and prostate cancer: role of cholesterol inhibition vs. prevention of small GTP-binding proteins. *Am J Cancer Res*. 2011;1(4):542-61.

120. Koyuturk M, Ersoz M, Altioek N. Simvastatin induces proliferation inhibition and apoptosis in C6 glioma cells via c-jun N-terminal kinase. *Neurosci Lett.* 2004 Nov 11;370(2-3):212-7.
121. Girgert R, Vogt Y, Becke D, Bruchelt G, Schweizer P. Growth inhibition of neuroblastoma cells by lovastatin and L-ascorbic acid is based on different mechanisms. *Cancer Lett.* 1999 Apr 1;137(2):167-72.
122. Shellman YG, Ribble D, Miller L, Gendall J, Vanbuskirk K, Kelly D, et al. Lovastatin-induced apoptosis in human melanoma cell lines. *Melanoma Res.* 2005 Apr;15(2):83-9.
123. Kawata S, Yamasaki E, Nagase T, Inui Y, Ito N, Matsuda Y, et al. Effect of pravastatin on survival in patients with advanced hepatocellular carcinoma. A randomized controlled trial. *Br J Cancer.* 2001 Apr 6;84(7):886-91.
124. Larner J, Jane J, Laws E, Packer R, Myers C, Shaffrey M. A phase I-II trial of lovastatin for anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. *Am J Clin Oncol.* 1998 Dec;21(6):579-83.
125. Bouterfa HL, Sattelmeyer V, Czub S, Vordermark D, Roosen K, Tonn JC. Inhibition of Ras farnesylation by lovastatin leads to downregulation of proliferation and migration in primary cultured human glioblastoma cells. *Anticancer Res.* 2000 Jul-Aug;20(4):2761-71.
126. Jiang Z, Zheng X, Lytle RA, Higashikubo R, Rich KM. Lovastatin-induced up-regulation of the BH3-only protein, Bim, and cell death in glioblastoma cells. *J Neurochem.* 2004 Apr;89(1):168-78.
127. Weis M, Heeschen C, Glassford AJ, Cooke JP. Statins have biphasic effects on angiogenesis. *Circulation.* 2002 Feb 12;105(6):739-45.
128. Silverstein RL, Febbraio M. CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci Signal.* 2009;2(72):re3.
129. Han J, Zhou X, Yokoyama T, Hajjar DP, Gotto AM, Jr., Nicholson AC. Pitavastatin downregulates expression of the macrophage type B scavenger receptor, CD36. *Circulation.* 2004 Feb 17;109(6):790-6.
130. Piechota M, Banaszewska A, Dudziak J, Slomczynski M, Plewa R. Highly upregulated expression of CD36 and MSR1 in circulating monocytes of patients with acute coronary syndromes. *Protein J.* 2012 Aug;31(6):511-8.
131. Brown MD, Sacks DB. IQGAP1 in cellular signaling: bridging the GAP. *Trends Cell Biol.* 2006 May;16(5):242-9.
132. Mataraza JM, Briggs MW, Li Z, Entwistle A, Ridley AJ, Sacks DB. IQGAP1 promotes cell motility and invasion. *J Biol Chem.* 2003 Oct 17;278(42):41237-45.
133. Lin SJ, Chen YH, Lin FY, Hsieh LY, Wang SH, Lin CY, et al. Pravastatin induces thrombomodulin expression in TNFalpha-treated human aortic endothelial cells by inhibiting Rac1 and Cdc42 translocation and activity. *J Cell Biochem.* 2007 Jun 1;101(3):642-53.
134. Hanahan D, Bergers G, Bergsland E. Less is more, regularly: metronomic dosing of cytotoxic drugs can target tumor angiogenesis in mice. *J Clin Invest.* 2000 Apr;105(8):1045-7.
135. Kerbel RS, Kamen BA. The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2004 Jun;4(6):423-36.
136. Bergers G, Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer.* 2008 Aug;8(8):592-603.
137. Jain RK, Duda DG, Willett CG, Sahani DV, Zhu AX, Loeffler JS, et al. Biomarkers of response and resistance to antiangiogenic therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2009 Jun;6(6):327-38.
138. Loges S, Mazzone M, Hohensinner P, Carmeliet P. Silencing or fueling metastasis with VEGF inhibitors: antiangiogenesis revisited. *Cancer Cell.* 2009 Mar 3;15(3):167-70.

139. Browder T, Butterfield CE, Kraling BM, Shi B, Marshall B, O'Reilly MS, et al. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Res.* 2000 Apr 1;60(7):1878-86.
140. Klement G, Baruchel S, Rak J, Man S, Clark K, Hicklin DJ, et al. Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity. *J Clin Invest.* 2000 Apr;105(8):R15-24.
141. Hamano Y, Sugimoto H, Soubasakos MA, Kieran M, Olsen BR, Lawler J, et al. Thrombospondin-1 associated with tumor microenvironment contributes to low-dose cyclophosphamide-mediated endothelial cell apoptosis and tumor growth suppression. *Cancer Res.* 2004 Mar 1;64(5):1570-4.
142. Takahashi N, Haba A, Matsuno F, Seon BK. Antiangiogenic therapy of established tumors in human skin/severe combined immunodeficiency mouse chimeras by anti-endoglin (CD105) monoclonal antibodies, and synergy between anti-endoglin antibody and cyclophosphamide. *Cancer Res.* 2001 Nov 1;61(21):7846-54.
143. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2008 Jan;8(1):59-73.
144. Banissi C, Ghiringhelli F, Chen L, Carpentier AF. Treg depletion with a low-dose metronomic temozolomide regimen in a rat glioma model. *Cancer Immunol Immunother.* 2009 Oct;58(10):1627-34.
145. Tanaka H, Matsushima H, Nishibu A, Clausen BE, Takashima A. Dual therapeutic efficacy of vinblastine as a unique chemotherapeutic agent capable of inducing dendritic cell maturation. *Cancer Res.* 2009 Sep 1;69(17):6987-94.
146. Pasquier E, Kavallaris M, Andre N. Metronomic chemotherapy: new rationale for new directions. *Nat Rev Clin Oncol.* 2010 Aug;7(8):455-65.
147. Colleoni M, Rocca A, Sandri MT, Zorzino L, Masci G, Nole F, et al. Low-dose oral methotrexate and cyclophosphamide in metastatic breast cancer: antitumor activity and correlation with vascular endothelial growth factor levels. *Ann Oncol.* 2002 Jan;13(1):73-80.
148. Garcia AA, Hirte H, Fleming G, Yang D, Tsao-Wei DD, Roman L, et al. Phase II clinical trial of bevacizumab and low-dose metronomic oral cyclophosphamide in recurrent ovarian cancer: a trial of the California, Chicago, and Princess Margaret Hospital phase II consortia. *J Clin Oncol.* 2008 Jan 1;26(1):76-82.
149. Kong DS, Lee JI, Kim WS, Son MJ, Lim do H, Kim ST, et al. A pilot study of metronomic temozolomide treatment in patients with recurrent temozolomide-refractory glioblastoma. *Oncol Rep.* 2006 Nov;16(5):1117-21.
150. Kato H, Ichinose Y, Ohta M, Hata E, Tsubota N, Tada H, et al. A randomized trial of adjuvant chemotherapy with uracil-tegafur for adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med.* 2004 Apr 22;350(17):1713-21.
151. Tan J, Cang S, Ma Y, Petrillo RL, Liu D. Novel histone deacetylase inhibitors in clinical trials as anti-cancer agents. *J Hematol Oncol.* 2010;3:5.
152. Dowling RJ, Zakikhani M, Fantus IG, Pollak M, Sonenberg N. Metformin inhibits mammalian target of rapamycin-dependent translation initiation in breast cancer cells. *Cancer Res.* 2007 Nov 15;67(22):10804-12.
153. Barriere G, Tartary M, Rigaud M. Metformin: a rising star to fight the epithelial mesenchymal transition in oncology. *Anticancer Agents Med Chem.* 2013 Feb;13(2):333-40.
154. Kim J, Tang JY, Gong R, Kim J, Lee JJ, Clemons KV, et al. Itraconazole, a commonly used antifungal that inhibits Hedgehog pathway activity and cancer growth. *Cancer Cell.* 2010 Apr 13;17(4):388-99.
155. Kesari S, Schiff D, Doherty L, Gigas DC, Batchelor TT, Muzikansky A, et al. Phase II study of metronomic chemotherapy for recurrent malignant gliomas in adults. *Neuro Oncol.* 2007 Jul;9(3):354-63.

156. Krzyzanowska MK, Tannock IF, Lockwood G, Knox J, Moore M, Bjarnason GA. A phase II trial of continuous low-dose oral cyclophosphamide and celecoxib in patients with renal cell carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2007 Jun;60(1):135-41.
157. Fontana A, Galli L, Fioravanti A, Orlandi P, Galli C, Landi L, et al. Clinical and pharmacodynamic evaluation of metronomic cyclophosphamide, celecoxib, and dexamethasone in advanced hormone-refractory prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2009 Aug 1;15(15):4954-62.
158. de Weerd O, van de Donk NW, Veth G, Bloem AC, Hagenbeek A, Lokhorst HM. Continuous low-dose cyclophosphamide-prednisone is effective and well tolerated in patients with advanced multiple myeloma. *Neth J Med*. 2001 Aug;59(2):50-6.
159. Buckstein R, Kerbel RS, Shaked Y, Nayar R, Foden C, Turner R, et al. High-Dose celecoxib and metronomic "low-dose" cyclophosphamide is an effective and safe therapy in patients with relapsed and refractory aggressive histology non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2006 Sep 1;12(17):5190-8.
160. Sterba J, Valik D, Mudry P, Kepak T, Pavelka Z, Bajciova V, et al. Combined biodifferentiating and antiangiogenic oral metronomic therapy is feasible and effective in relapsed solid tumors in children: single-center pilot study. *Onkologie*. 2006 Jul;29(7):308-13.
161. Zapletalova D, Andre N, Deak L, Kyr M, Bajciova V, Mudry P, et al. Metronomic chemotherapy with the COMBAT regimen in advanced pediatric malignancies: a multicenter experience. *Oncology*. 2012;82(5):249-60.
162. Choi LM, Rood B, Kamani N, La Fond D, Packer RJ, Santi MR, et al. Feasibility of metronomic maintenance chemotherapy following high-dose chemotherapy for malignant central nervous system tumors. *Pediatr Blood Cancer*. 2008 May;50(5):970-5.
163. Andre N, Rome A, Coze C, Padovani L, Pasquier E, Camoin L, et al. Metronomic etoposide/cyclophosphamide/celecoxib regimen given to children and adolescents with refractory cancer: a preliminary monocentric study. *Clin Ther*. 2008 Jul;30(7):1336-40.
164. Andre N, Abed S, Orbach D, Alla CA, Padovani L, Pasquier E, et al. Pilot study of a pediatric metronomic 4-drug regimen. *Oncotarget*. 2011 Dec;2(12):960-5.
165. Lopez-Aguilar E, Sepulveda-Vildosola AC, Betanzos-Cabrera Y, Rocha-Moreno YG, Gascon-Lastiri G, Rivera-Marquez H, et al. Phase II study of metronomic chemotherapy with thalidomide, carboplatin-vincristine-fluvastatin in the treatment of brain stem tumors in children. *Arch Med Res*. 2008 Oct;39(7):655-62.
166. Andre N, Banavali S, Snihur Y, Pasquier E. Has the time come for metronomics in low-income and middle-income countries? *Lancet Oncol*. 2013 May;14(6):e239-48.
167. Sareddy GR, Geeviman K, Ramulu C, Babu PP. The nonsteroidal anti-inflammatory drug celecoxib suppresses the growth and induces apoptosis of human glioblastoma cells via the NF-kappaB pathway. *J Neurooncol*. 2011 Jan;106(1):99-109.
168. Kang KB, Wang TT, Woon CT, Cheah ES, Moore XL, Zhu C, et al. Enhancement of glioblastoma radioresponse by a selective COX-2 inhibitor celecoxib: inhibition of tumor angiogenesis with extensive tumor necrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007 Mar 1;67(3):888-96.
169. Gaiser T, Becker MR, Habel A, Reuss DE, Ehemann V, Rami A, et al. TRAIL-mediated apoptosis in malignant glioma cells is augmented by celecoxib through proteasomal degradation of survivin. *Neurosci Lett*. 2008 Sep 12;442(2):109-13.
170. Xiao H, Zhang Q, Lin Y, Reddy BS, Yang CS. Combination of atorvastatin and celecoxib synergistically induces cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells. *Int J Cancer*. 2008 May 1;122(9):2115-24.
171. Xiao H, Yang CS. Combination regimen with statins and NSAIDs: a promising strategy for cancer chemoprevention. *Int J Cancer*. 2008 Sep 1;123(5):983-90.

172. Baranova IN, Bocharov AV, Vishnyakova TG, Kurlander R, Chen Z, Fu D, et al. CD36 is a novel serum amyloid A (SAA) receptor mediating SAA binding and SAA-induced signaling in human and rodent cells. *J Biol Chem*. 2010 Mar 12;285(11):8492-506.
173. Wittchen ES. Endothelial signaling in paracellular and transcellular leukocyte transmigration. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009;14:2522-45.
174. Lebedeva T, Dustin ML, Sykulev Y. ICAM-1 co-stimulates target cells to facilitate antigen presentation. *Curr Opin Immunol*. 2005 Jun;17(3):251-8.
175. Kaul A, Chen YH, Emmett RJ, Gianino SM, Gutmann DH. Conditional KIAA1549:BRAF mice reveal brain region- and cell type-specific effects. *Genesis*. 2013 Jul 24.
176. Gao J, Jia WD, Li JS, Wang W, Xu GL, Ma JL, et al. Combined inhibitory effects of celecoxib and fluvastatin on the growth of human hepatocellular carcinoma xenografts in nude mice. *J Int Med Res*. 2010 Jul-Aug;38(4):1413-27.
177. Reifenberger G, Kaulich K, Wiestler OD, Blumcke I. Expression of the CD34 antigen in pleomorphic xanthoastrocytomas. *Acta Neuropathol*. 2003 Apr;105(4):358-64.
178. Blumcke I, Giencke K, Wardelmann E, Beyenburg S, Kral T, Sarioglu N, et al. The CD34 epitope is expressed in neoplastic and malformative lesions associated with chronic, focal epilepsies. *Acta Neuropathol*. 1999 May;97(5):481-90.
179. 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.
180. Wang C, Yu G, Liu J, Wang J, Zhang Y, Zhang X, et al. Downregulation of PCDH9 predicts prognosis for patients with glioma. *J Clin Neurosci*. 2012 Apr;19(4):541-5.
181. 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.
182. Verhaak RG, 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.
183. Schwartzenuber 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 Feb 9;482(7384):226-31.
184. Khuong-Quang DA, Buczkowicz P, Rakopoulos P, Liu XY, 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*. 2012 Sep;124(3):439-47.
185. Gielen GH, Gessi M, Hammes J, Kramm CM, Waha A, Pietsch T. H3F3A K27M mutation in pediatric CNS tumors: a marker for diffuse high-grade astrocytomas. *Am J Clin Pathol*. 2013 Mar;139(3):345-9.
186. Chan KM, Fang D, Gan H, Hashizume R, Yu C, Schroeder M, et al. The histone H3.3K27M mutation in pediatric glioma reprograms H3K27 methylation and gene expression. *Genes Dev*. 2013 May 1;27(9):985-90.
187. Wu G, Broniscer A, McEachron TA, Lu C, Paugh BS, Becksfors J, et al. Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas. *Nat Genet*. 2012 Mar;44(3):251-3.
188. 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 Oct 16;22(4):425-37.

189. Capper D, Preusser M, Habel A, Sahm F, Ackermann U, Schindler G, et al. Assessment of BRAF V600E mutation status by immunohistochemistry with a mutation-specific monoclonal antibody. *Acta Neuropathol.* 2011 Jul;122(1):11-9.
190. Fontebasso AM, Bechet D, Jabado N. Molecular biomarkers in pediatric glial tumors: a needed wind of change. *Curr Opin Oncol.* 2013 Nov;25(6):665-73.
191. Neuzillet C, Tijeras-Raballand A, de Mestier L, Cros J, Faivre S, Raymond E. MEK in cancer and cancer therapy. *Pharmacol Ther.* 2013 Oct 9.
192. Sosman JA, Kim KB, Schuchter L, Gonzalez R, Pavlick AC, Weber JS, et al. Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *N Engl J Med.* 2012 Feb 23;366(8):707-14.
193. Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV, Jouary T, Gutzmer R, Millward M, et al. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet.* 2012 Jul 28;380(9839):358-65.
194. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med.* 2011 Jun 30;364(26):2507-16.
195. Cheng Y, Zhang G, Li G. Targeting MAPK pathway in melanoma therapy. *Cancer Metastasis Rev.* 2013 Apr 13.
196. Nicolaidis TP, Li H, Solomon DA, Hariono S, Hashizume R, Barkovich K, et al. Targeted therapy for BRAFV600E malignant astrocytoma. *Clin Cancer Res.* 2011 Dec 15;17(24):7595-604.
197. Chamberlain MC. Salvage therapy with BRAF inhibitors for recurrent pleomorphic xanthoastrocytoma: a retrospective case series. *J Neurooncol.* 2013 Sep;114(2):237-40.
198. Sievert AJ, Lang SS, Boucher KL, Madsen PJ, Slaunwhite E, Choudhari N, et al. Paradoxical activation and RAF inhibitor resistance of BRAF protein kinase fusions characterizing pediatric astrocytomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Apr 9;110(15):5957-62.
199. Lito P, Rosen N, Solit DB. Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. *Nat Med.* 2013 Nov;19(11):1401-9.
200. Flaherty KT, Robert C, Hersey P, Nathan P, Garbe C, Milhem M, et al. Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med.* 2012 Jul 12;367(2):107-14.
201. Flaherty KT, Infante JR, Daud A, Gonzalez R, Kefford RF, Sosman J, et al. Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N Engl J Med.* 2012 Nov;367(18):1694-703.

ANNEXE