

Université de Limoges

ED 615 - Sciences Biologiques et Santé (SBS)

EA3842-CAPTuR

Thèse pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Limoges

Sciences de la Vie et de la Santé

Présentée et soutenue par

Elise DELUCHE-MOURICOUT

Le 21 décembre 2018

Implication des biomarqueurs *NTRK2* et *CHI3L1* dans la nouvelle classification histo-moléculaire des gliomes

Thèse dirigée par le Professeur Fabrice LALLOUE et le Docteur Karine DURAND

JURY :

Président du jury

M. Maxime Lehmann, Professeur des Universités, Université de Strasbourg, CNRS UMR 7213, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg

Rapporteurs

M. Norbert Bakalara, Professeur des Universités, ENSCM, Université de Montpellier, Institut des Neurosciences de Montpellier

M. Maxime Lehmann, Professeur des Universités, Université de Strasbourg, CNRS UMR 7213, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg

Examineurs

M. Hugues Loiseau, Professeur des Universités et Praticien Hospitalier, Université de Bordeaux, Service de Neurochirurgie B Hôpital Pellegrin-Tripode

Mme Barbara Bessette, Maître de conférences Universitaire, EA3842-CAPTuR, Faculté de Médecine, Limoges

Mme Karine Durand, Maître de conférences Universitaire et Praticien Hospitalier, EA3842-CAPTuR, Faculté de Médecine, Limoges

M. Fabrice Lalloué, Professeur des Universités, EA3842 – CAPTuR, Faculté de Médecine, Limoges



A tous ceux qui ont cru en moi et qui m'ont soutenue,



Dans la vie on ne fait pas ce que l'on veut mais on est responsable de ce que l'on est.

Jean Paul Satre

La vie est un mystère qu'il faut vivre, et non un problème à résoudre.

Gandhi



REMERCIEMENTS

AU JURY

Messieurs les Professeurs Norbert Bakalara et Maxime Lehmann.

Vous avez accepté d'être les rapporteurs de ce travail ; je vous en remercie et vous suis reconnaissante de l'intérêt que vous portez à cette recherche. Je remercie le Professeur Bakalara d'assumer la présidence de ce jury de thèse.

Monsieur le Professeur Hugues Loiseau

Je vous remercie chaleureusement d'avoir accepté avec tant de spontanéité d'avoir un regard critique sur ces travaux.

Monsieur le Professeur Fabrice Lalloué

Je te remercie pour ta gentillesse « inaltérable », pour avoir su créer des conditions favorables à l'écriture de cette thèse et pour la confiance que tu m'as accordée tout au long de ces trois années.

Madame le Docteur Karine DURAND

Merci de m'avoir fait bénéficier de tes compétences et d'avoir encadré mes travaux avec tant de bienveillance depuis mon Master 2.

Madame le Docteur Barbara BESSETTE

Merci d'être présente encore aujourd'hui pour évaluer ce travail, depuis mes débuts dans « le monde de la science », tu as toujours été à mes côtés.

Notre complicité scientifique nous a permis de devenir amies et j'en suis heureuse.

A MES CHEFS ET COLLEGUES

Madame le Professeur Marie-Odile JAUBERTEAU

Je vous remercie pour votre disponibilité, pour vos conseils et pour m'avoir accueillie dans votre laboratoire où il est si agréable de travailler et de progresser !

Monsieur le Professeur François LABROUSSE

Vous m'avez transmis votre passion pour l'étude des tumeurs cérébrales. Ce travail en est une illustration. J'espère bien poursuivre dans la voie que vous m'avez ouverte.

Merci pour votre soutien et pour le temps que vous m'avez consacré.



Monsieur le Professeur VERGNENEGRE

Je vous remercie respectueusement pour la confiance stimulante que vous m'avez témoignée. Nos échanges ont toujours été très positifs, encourageants pour une jeune praticienne pour qui l'oncologie a tant d'importance.

Madame le Professeur Nicole TUBIANA-MATHIEU

Je ne vous remercierai jamais assez d'avoir été mon « mentor » dans cette profession, parfois si difficile mais prometteuse. Merci de m'avoir incité à croire en ce que j'entreprenais.

Monsieur le Professeur François CAIRE

Vous m'avez ouvert les portes de votre service, je vous en remercie. Grâce à vous, à vos compétences, j'ai pu mener ces recherches à leur terme, fût-il provisoire !

J'espère que la collaboration que nous avons créée permettra de favoriser le développement de la neuro-oncologie au CHU de LIMOGES.

Madame le Docteur Stéphanie DURAND

Je te remercie de ton aide, de tes conseils, de m'avoir initiée à la bio-informatique. Je suis heureuse que nous ayons d'autres projets à mener ensemble.

MERCI A TOUS LES EQUIPES

A l'équipe EA3842 et en particulier Hafidha et Sofiane. J'ai l'immense chance de travailler avec vous tous depuis le stage de Master 1. J'espère que nous continuerons à partager nos interrogations et surtout de beaux succès.

A l'équipe d'Anatomopathologie du CHU de Limoges et en particulier au Docteur Mathilde DUCHESNE, à Alain CHAUNAVEL, Sandrine ROBERT, Émilie MOUGIN pour votre disponibilité et votre bonne humeur.

A toute l'équipe d'Oncologie Médicale du CHU de Limoges et en particulier au Docteur PESTRE, à Cindy GUIGOUT et Sophie LEOBON. Merci de m'avoir soutenue pour mener à bien mes travaux.

A mes ami(e)s, pour votre présence et tous ces instants précieux que nous passons ensemble.

A mes parents, ma famille, mes parrain et marraine, pour votre amour. Merci de m'avoir aidée, supportée et encouragée pour mener tout de front ...



Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :
« Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France »
disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



LISTE DES ABBREVIATIONS

2-HG	2-hydroxyglutarate
ACP	Analyse en composantes principales
ALA	Aminolevulinic acid
ALT	Allongement alternatif des télomères
ANOCEF	Association des Neuro-Oncologues d'Expression Française
ATRX	Alpha Thalassemia Mental Retardation syndrome X-linked
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
CBTRUS	Central Brain Tumor Registry of the United States
CHI3L1	Protéine 1 de type chitinase-3
CIMP	CpG Island Methylator Phenotype
CpG	5'-cytosine-guanine
CRD	Cystein-rich-domain
CSC	Cellules souches cancéreuses
DD	Death Domain
DNMT1	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
EVs	Vésicules extracellulaires
FGFR3	Fibroblast Growth Factor Receptor 3
FISH	Fluorescence in situ hybridization
FL	Full length
FUBP1	Far Upstream element Binding Protein 1
GBM	Glioblastome
HC	Clustering Hiérarchique
HC-gp-39	Human Cartilage Glycoprotein-39
HPS	Hématoxyline-Phloxine-Safran
HR	Hazard ratio
HSP	Heat Shock Protein
IC	Intervalle de confiance
IDH	Isocitrate déshydrogénase
IHC	Immunohistochimie
ILVs	Vésicules intraluminales
IMRT	Radiothérapie avec modulation d'Intensité
KLRC3	Killer cell lectin-like receptor C3
KO	Knockout
KPS	Indice de Karnofsky
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LOH	Loss Of Heterozygosity



MGMT	Méthylation du promoteur de O6-méthylguanine DNA methyltransferase
MLPA	Amplification multiplex de sondes dépendant d'une ligation
MVB	multi-vésiculaires internes
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NGF	Nerve Growth Factor
NGFR	NGF receptor
NGS	Next Generation sequencing
NK	Natural Killer
NKG2	Natural Killer Group 2
NOS	Not Otherwise Specified
NT	NeuroTrophine
NT3	NeuroTrophine 3
NT4/5	NeuroTrophine 4/5
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PBS	Phosphate buffered saline
PCV	Procarbazine, lomustine et vincristine
PD-L1	Programmed death-ligand 1
PD1	Programmed cell death 1
PLC γ	Phospholipase C γ
PS	Performans status
PS	Peptide signal
RIN	RNA Integrity Number
RT	Radiothérapie
RTOG	Radiation Therapy Oncology Group
SG	Survie globale
SNC	Système nerveux central
SNP	Single Nucléotide Polymorphism
TLDA	TaqManLow Density Array
TMA	Tissue Microarray
TMZ	Témazolomide
TNF	Tumeur Necrosis Factor
Trk	Tropomyosin related kinase
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VMAT	Modulation d'intensité Volumétrique par ArcThérapie
wt	Wildtype
α -KG	α -kétoglutarate



TABLE DES MATIERES

CONTEXTE DU TRAVAIL	14
INTRODUCTION	16
Chapitre I. LES GLIOMES	18
<i>I.1. Épidémiologie</i>	18
<i>I.2. Pronostic des gliomes</i>	19
<i>I.3. Prise en charge thérapeutique des gliomes</i>	20
I.3.1. Chirurgie	20
I.3.2. Radiothérapie	21
I.3.3. Chimiothérapie	21
I.3.4. Glioblastomes et sujets âgés	22
Chapitre II. De la classification histologique à la classification histo-moléculaire des gliomes	23
<i>II.1. Les classifications historiques des gliomes</i>	23
<i>II.2. Les classifications de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS)</i>	23
<i>II.3. La classification OMS 2007</i>	24
<i>II.4. La classification OMS 2016</i>	25
Chapitre III. Les principales altérations moléculaires des gliomes utilisées en diagnostic	30
<i>III.1. Les mutations des gènes IDH1 et IDH2</i>	30
<i>III.2. Les mutations TP53 et ATRX</i>	33
<i>III.3. Codéletion 1p/19q</i>	34
<i>III.4. Méthylation du promoteur de la MGMT</i>	35
Chapitre IV. Schémas thérapeutiques découlant de la classification OMS 2016	37
Chapitre V. Implication du glycome dans les cancers	39
V.1. Généralités sur le glycome	39
V.2. Glycome et cancer	40
V.3. <i>KLRC3</i> et gliomes	41
V.4. <i>CHI3L1</i> et gliomes	41
Chapitre VI. Implication des neurotrophines dans les cancers du système nerveux central	43
VI.1. Les neurotrophines : des gènes aux protéines	43
VI.2. Les récepteurs des neurotrophines	45
VI.2.1. Récepteurs Trks ou récepteurs « Tropomyosin related kinase »	45
VI.2.2. Récepteur p75 ^{NTR}	48
VI.3. Voies de signalisation médiées par Trk et p75 ^{NTR}	50
VI.4. Fonctions physiologiques et pathologiques des neurotrophines	53
VI.4.1. Fonctions physiologiques des récepteurs Trks dans le système nerveux	53
VI.4.2. Fonctions pathologiques des Récepteur Trks dans le système nerveux central	54
Récepteur Trks, neuroblastome et médulloblastome	54
Récepteur Trks et tumeurs gliales	55



Chapitre VII. Application des exosomes en cancérologie	59
<i>VII.1. Communication extracellulaire par vésicules</i>	59
<i>VII.2. Fonction des exosomes dans les gliomes</i>	61
OBJECTIFS DE LA THESE	63
MATERIELS ET METHODES	65
Chapitre I. Constitution d'une banque de prélèvements	66
<i>I.1. Collection d'échantillons tissulaires</i>	66
<i>I.2. Collection de plasma de patients</i>	66
<i>I.3. Déclaration d'éthique</i>	67
Chapitre II. Analyse transcriptomique	68
<i>II.1. Extraction d'ADN</i>	68
<i>II.2. Analyse transcriptomique différentielle par TaqMan Low Density array</i>	68
<i>II.3. Validation des données</i>	70
<i>II.4. Analyse statistique</i>	71
Chapitre III. Analyse protéique	72
<i>III.1. Constitution des « Tissue Microarray »</i>	72
<i>III.2. Analyse immunohistochimique</i>	72
<i>III.3. Détection de mutations de l'IDH par pyroséquençage</i>	74
<i>III.4. Détermination de la perte du bras chromosomique 1p et/ou 19q par Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)</i>	74
Chapitre IV. Production et caractérisation des exosomes	75
<i>IV.1. Purification des exosomes</i>	75
<i>IV.2. Analyse protéique par Western Blot</i>	75
RESULTATS	77
Projet 1 : Signature moléculaire des gliomes	78
Projet 2 : Analyse protéique des biomarqueurs de TrkB et p75^{NTR}	107
Projet 3 : Application clinique par l'utilisation d'exosomes	122
<i>Contexte et Problématique</i>	122
<i>Résultats préliminaires</i>	124
DISCUSSION	127
<i>I.1.1. Place de la classification moléculaire en pratique courante</i>	127
<i>Transcriptome et protéome</i>	129
<i>I.1.2. CHI3L1 : facteur pronostique et cible thérapeutique ?</i>	130
<i>I.1.3. NTRK2 : cible thérapeutique, réalité et perspective</i>	134
<i>I.1.4. Biopsies liquides et exosomes vers de futures applications dans les gliomes.</i>	136



CONCLUSION	139
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	141
ANNEXES	157
<i>I.1.1. Annexe 1- Grille de recueil de données cliniques, radiologiques et histologiques</i>	158
<i>I.1.2. Annexe 2-Custom-made human-specific TaqMan® micro-fluidic cards containing panels of 96 gene expression assays</i>	159
<i>I.1.3. Annexe 3-Principe général de la réaction de Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA).</i>	161



TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 Répartition des tumeurs cérébrales en fonction de l'âge selon le registre CBTRUS ...	18
Figure 2 Algorithme simplifié OMS 2016.....	28
Figure 3 Les mutations IDH1 et IDH2 : un gain de fonction oncométabolique	30
Figure 4 Impact de la méthylation de l'ADN dans les gliomes	31
Figure 5 Répartition des statuts IDH muté au sein des tumeurs cérébrales	32
Figure 6 Phylogénie des mutations IDH, ATRX et TP53.....	33
Figure 7 Les stratégies actuelles de traitement post-opératoire pour les principales entités du gliome classées selon la classification OMS 2016	38
Figure 8 Rôle des glycanes dans le développement et la progression du cancer.....	40
Figure 9. Représentation schématique des protéines de la famille des pro/neurotrophines	44
Figure 10 Interactions entre les neurotrophines et leurs récepteurs	45
Figure 11 Les ARNm des isoformes de TrkA	46
Figure 12 Les ARNm des isoformes de TrkB	47
Figure 13 Représentation schématique des récepteurs Trk A, B et C.....	48
Figure 14 Représentation schématique la protéine p75 ^{NTR}	49
Figure 15 Les différentes formes du récepteur p75 ^{NTR}	50
Figure 16 Représentation schématique des voies de transduction du signal à médiation par le récepteur Trk.....	51
Figure 17 Représentation des voies de transduction du signal médiées par p75 ^{NTR}	52
Figure 18 Représentation schématique de la composition des vésicules extracellulaires	60
Figure 19 Représentation schématiques de vésicules sécrétées.....	61
Figure 20 Principe des sondes d'hydrolyse TaqMan®.....	69
Figure 21 Comparaison de l'expression des gènes au sein d'une biopsie et d'une exérèse chirurgicale.	122
Figure 22 Etude de la sur- et sous- expression des gènes chez une atteinte d'un oligodendrogliome de grade II évoluant en glioblastome.....	123
Figure 23 Taille des exosomes issus du plasma de patients déterminée par diffusion dynamique de la lumière.....	124
Figure 24 Validation du protocole d'extraction des exosomes issus de patients atteints de glioblastomes.....	125
Figure 25 Analyse de l'expression de p75 ^{NTR} , TrkB dans les exosomes.....	125
Figure 26 Quantification relative de l'expression des protéines p75 ^{NTR} et TrkB par rapport aux protéines marqueurs d'exosomes.....	126
Figure 27 Expression génique et des altérations génomiques dans les sous-types de glioblastomes.	128
Figure 28 Relation entre le status IDH, l'expression de CHI3L1 et l'hyperméthylation de l'ADN	131
Figure 29 Intéraction entre YKL-40 et intégrines	133
Figure 30 Protéines de fusion	135
Figure 31 Immunogénicité des tumeurs	137



TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 Taux de survie relatif à 1, 2, 3, 4, 5 et 10 ans selon les principaux groupes histologiques.	20
Tableau 2 Classification OMS 2007	25
Tableau 3 Exemple de diagnostic intégré selon l'International Society of Neuropathology-Haarlem meeting.	26
Tableau 4 Classification OMS 2016	27
Tableau 5 Différences entre glioblastome primaire (ou <i>de novo</i>) et secondaire d'après la classification OMS 2016.	29
Tableau 6 Caractéristiques des préproneurotrophines	44
Tableau 7 Caractéristiques des récepteurs des neurotrophines	46
Tableau 8 Synthèse du pronostic des tumeurs de l'enfant en fonction de l'expression des récepteurs Trk.	55
Tableau 9 Synthèse de l'expression des récepteurs Trk dans les gliomes	57
Tableau 10 Anticorps utilisés pour l'immunohistochimie	73
Tableau 11 Liste des anticorps primaires utilisés en western blot.	76
Tableau 12 Liste des anticorps secondaires utilisés en western blot.	76
Tableau 13 Traitements anti-Trk	134
Tableau 14 Traitements anti-protéines de fusion impliquant Trk.	136



CONTEXTE DU TRAVAIL

Les gliomes sont les tumeurs cérébrales primaires les plus courantes du système nerveux central et sont souvent de pronostic défavorable, d'autant que l'absence de critères indiscutables pour les identifier rend leur diagnostic et leur prise en charge particulièrement difficiles. Les gliomes sont à ce jour classés par l'Organisation Mondiale de la Santé (Louis et al., 2016). Cependant, les patients avec des tumeurs apparemment identiques selon la classification OMS 2016 peuvent encore répondre différemment au traitement en raison d'une hétérogénéité moléculaire non prise en compte.

Aussi l'un des moyens d'améliorer la prise en charge clinique des gliomes est d'identifier de nouveaux biomarqueurs moléculaires qui distingueraient des sous-groupes plus homogènes. Ces biomarqueurs, intégrés dans la classification actuelle, permettraient d'améliorer les connaissances sur la biologie du gliome et offrir des voies thérapeutiques novatrices.

L'oncogénèse des gliomes est régie par de nombreux processus tels que l'inhibition des phénomènes apoptotiques, l'hypoxie et angiogénèse tumorale, la glycosylation, la dérégulation de l'expression génique consécutive à l'activation des voies de transduction du signal. Certains gènes sont ainsi associés à l'agressivité des gliomes comme les gènes impliqués dans l'autophagie ou les gènes de l'hypoxie et de l'angiogénèse. Chacun de ces facteurs est un biomarqueur potentiel, susceptible d'enrichir la classification histo-moléculaire actuelle des gliomes.

Notre équipe (CAPTuR, EA3842) s'intéresse plus spécifiquement aux neurotrophines (NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5) et à leurs récepteurs (TrkA, TrkB, TrkC, p75^{NTR}). Au sein de cette famille, l'implication de TrkB dans les gliomes fait actuellement l'objet d'avancées mais aussi de résultats contradictoires. Par ailleurs, le récepteur p75^{NTR}, capable de se lier aux neurotrophines, semble jouer un rôle dans la progression tumorale et la résistance à l'apoptose (Giraud et al., 2011).

Les gliomes, localisés derrière une barrière hémato-encéphalique partiellement intacte, ne libèrent pas de cellules tumorales circulantes. Ils ne sont donc généralement pas associés à des biomarqueurs détectables au niveau de ces cellules comme c'est le cas pour d'autres types de cancers. Cependant, les gliomes sécrètent, dans la circulation périphérique, des microvésicules circulantes ou exosomes qui peuvent transférer du matériel génétique, interagir avec le micro-environnement des tumeurs et participer à la croissance tumorale (Skog et al., 2008). L'équipe a précédemment montré la présence de TrkB dans les exosomes de glioblastomes (Pinet et al., 2016) et, dans le cancer du poumon, le rôle prépondérant d'un



complexe composé de TrkB/EGFR/sortiline transféré via les exosome qui permet de contrôler les cellules endothéliales et d'activer l'angiogénèse (Wilson et al., 2014).

Ma thèse a donc pour objectif de définir de nouveaux marqueurs des gliomes afin de faciliter le diagnostic et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. A terme, le but est de proposer un diagnostic non invasif de ces biomarqueurs validé dans un essai prospectif multicentrique.



INTRODUCTION





Chapitre I. LES GLIOMES

I.1. Épidémiologie

Les gliomes sont parmi les tumeurs cérébrales primitives de l'adulte les plus fréquentes. La forme la plus agressive, les glioblastomes (GBM), représente 50% des gliomes diffus de l'adulte. L'incidence des gliomes est en perpétuelle augmentation et représente un problème de santé publique.

Le dernier rapport du Central Brain Tumor Registry of the United States (CBTRUS), publié en 2015 sur les données 2008-2012, indique une incidence annuelle, pour les tumeurs cérébrales primitives (bénignes et malignes), de 28,6 cas pour 100 000 habitants (Ostrom et al., 2015).

Néanmoins, l'incidence des gliomes varie considérablement selon le type histologique de la tumeur, l'âge du (de la) patient(e) au moment du diagnostic, le sexe, l'ethnie et l'origine géographique. Dans le monde, les taux d'incidence normalisés selon l'âge (tous gliomes confondus) varient de 4,67 à 5,73 cas pour 100 000 personnes et, plus spécifiquement pour les glioblastomes de 0,59 à 3,69 (Ostrom et al., 2014).

En France, la prévalence des gliomes est d'environ 5 à 8 cas pour 100 000 habitants et 2500 à 3 000 nouveaux cas sont recensés chaque année (Rigau et al., 2011).

L'âge médian au moment du diagnostic varie selon le sous-type de la tumeur. Il est de 64 ans pour un glioblastome (GBM) alors qu'il s'établit vers 40 ans pour les tumeurs de bas grade (Figure 1) (Ostrom et al., 2015).

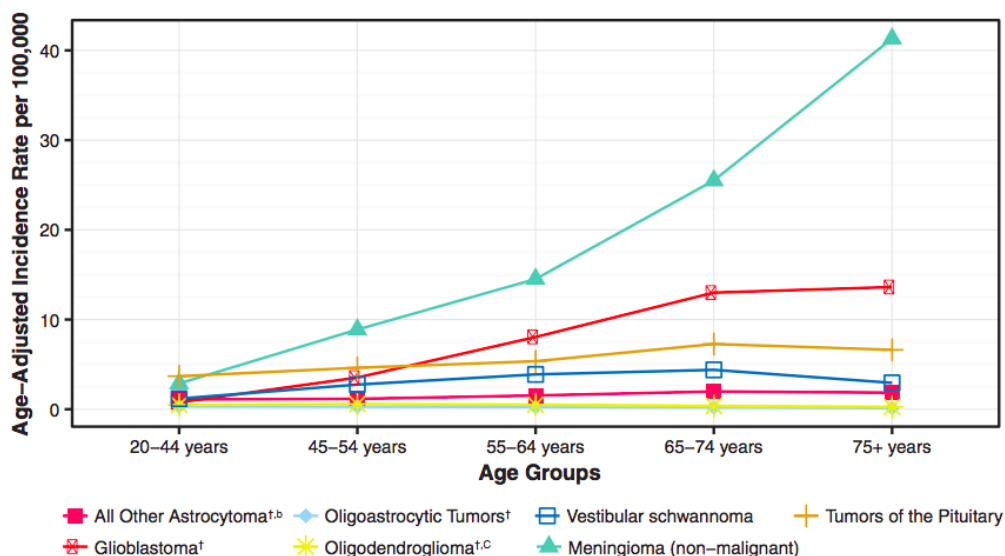


Figure 1 Répartition des tumeurs cérébrales en fonction de l'âge selon le registre CBTRUS

D'après Central Brain Tumor Registry of the United States (Ostrom et al., 2015)



Les facteurs étiologiques sont encore mal connus. Un des facteurs de risque reconnus sont les radiations ionisantes, classées cancérogènes de catégorie 1 (Braganza et al., 2012). Dans 5% des cas, des facteurs génétiques favorisent la survenue des gliomes et/ou glioblastomes (la neurofibromatose de type 1, la sclérose tubéreuse de Bourneville, le syndrome de Li-Fraumeni, le syndrome de Turcot...) (Loiseau et al., 2009). D'autres facteurs de risque comme les traitements hormonaux substitutifs, l'exposition aux champs électromagnétiques - dont ceux générés par les téléphones portables, l'alimentation (nitrates, nitrites) et les pesticides restent sujets à controverse (Loiseau et al., 2009; Ostrom et al., 2014).

I.2. Pronostic des gliomes

Les facteurs de mauvais pronostic sont un état général altéré, évalué par le Performans Status (PS) ou l'indice de Karnofsky (KPS), des comorbidités associées, des déficits focaux et des troubles des fonctions supérieures notamment chez les sujets âgés (Bauchet et al., 2014).

Les facteurs spécifiques des gliomes de bas grade sont un âge supérieur à 40 ans, une épilepsie difficilement contrôlable et une résection incomplète de la tumeur (Ius et al., 2012; Pignatti et al., 2002). Un volume tumoral important, une vitesse de croissance rapide et un franchissement de la ligne médiane (vue en imagerie) participent à un mauvais pronostic (Pallud et al., 2006; Pignatti et al., 2002).

A ces variables, il faut ajouter certaines altérations moléculaires, chromosomiques, épigénétiques ou génétiques qui ciblent les voies de signalisation, le contrôle du cycle cellulaire et le métabolisme cellulaire. Ainsi la présence/absence de mutations, notamment les mutations *IDH* et de codélétions telles 1p/19q, sont au centre de la classification histo-moléculaire 2016 (Louis et al., 2016)(Cf. Les principales altérations moléculaires).

En prenant en compte les données de survie globale du registre CBTRUS (**Tableau 1**), qui est un reflet de la population générale, l'espérance de survie à 5 ans pour les patients atteints de GBM est de 5,1% alors qu'elle s'élève à 79,8% pour ceux souffrant d'oligodendrogliome. La médiane de survie globale des patients porteurs de GBM est de 15,8 mois, malgré un traitement par chimio-radiothérapie (Stupp et al., 2005).



Tableau 1 Taux de survie relatif à 1, 2, 3, 4, 5 et 10 ans selon les principaux groupes histologiques.

Histology	N ^d	1-Year		2-Year		3-Year		4-Year		5-Year		10-Year	
		%	95% CI	%	95% CI	%	95% CI	%	95% CI	%	95% CI	%	95% CI
Pilocytic astrocytoma	3,849	97.9	(97.4-98.4)	96.6	(95.9-97.2)	95.5	(94.8-96.2)	94.7	(93.9-95.5)	94.2	(93.3-95.0)	92.1	(90.8-93.1)
Diffuse astrocytoma	6,635	72.2	(71.1-73.3)	61.5	(60.3-62.7)	55.4	(54.1-56.7)	51.2	(49.9-52.5)	47.9	(46.6-49.3)	37.6	(36.1-39.0)
Anaplastic astrocytoma	4,101	62.1	(60.5-63.6)	44.0	(42.4-45.6)	35.7	(34.1-37.3)	31.2	(29.6-32.8)	27.9	(26.4-29.5)	19.8	(18.2-21.4)
Glioblastoma	33,204	37.2	(36.7-37.7)	15.2	(14.8-15.7)	8.8	(8.5-9.2)	6.3	(6.0-6.6)	5.1	(4.8-5.4)	2.6	(2.4-2.9)
Oligodendroglioma	3,602	93.9	(93.0-94.7)	89.5	(88.4-90.6)	86.2	(84.9-87.3)	82.9	(81.5-84.3)	79.8	(78.2-81.2)	64.0	(61.9-66.1)
Anaplastic oligodendroglioma	1,441	81.5	(79.3-83.4)	68.9	(66.3-71.3)	62.4	(59.6-65.0)	57.0	(54.1-59.7)	52.5	(49.6-55.4)	38.9	(35.6-42.2)
Ependymal tumors	2,929	93.8	(92.8-94.7)	89.7	(88.5-90.9)	86.8	(85.3-88.1)	84.8	(83.2-86.2)	83.4	(81.7-84.9)	79.1	(76.9-81.1)
Oligoastrocytic tumors	2,130	87.6	(86.1-89.0)	77.9	(76.0-79.7)	71.4	(69.2-73.4)	66.1	(63.8-68.3)	62.0	(59.6-64.3)	47.8	(44.8-50.8)
Glioma malignant, NOS	4,717	63.2	(61.8-64.6)	52.7	(51.1-54.2)	49.3	(47.8-50.8)	47.6	(46.0-49.1)	46.1	(44.5-47.7)	41.3	(39.5-43.0)
Neuronal and mixed neuronal-glioma tumors	545	90.5	(87.4-92.8)	83.5	(79.8-86.7)	79.3	(75.1-82.8)	75.8	(71.3-79.6)	75.2	(70.6-79.2)	61.4	(54.7-67.4)
Embryonal tumors	3,040	81.6	(80.1-82.9)	71.5	(69.8-73.1)	66.7	(64.9-68.4)	63.7	(61.9-65.5)	61.2	(59.3-63.1)	54.2	(52.1-56.3)
Medulloblastoma ^e	1,815	88.5	(86.9-89.9)	82.0	(80.1-83.7)	77.5	(75.4-79.5)	74.5	(72.2-76.5)	71.9	(69.5-74.1)	63.3	(60.5-65.9)
Primitive neuroectodermal tumor ^f	710	75.9	(72.6-79.0)	59.6	(55.8-63.2)	53.7	(49.8-57.4)	50.2	(46.3-54.0)	48.0	(44.1-51.8)	42.1	(38.0-46.0)
Atypical teratoid/rhabdoid tumor ^g	219	49.1	(42.2-55.6)	34.3	(27.8-40.9)	30.5	(24.2-37.1)	29.8	(23.4-36.4)	28.9	(22.5-35.5)	26.5	(20.0-33.5)
Other embryonal histologies ^h	296	77.3	(71.9-81.7)	64.4	(58.4-69.8)	59.9	(53.7-65.5)	57.2	(50.9-63.0)	53.5	(47.1-59.5)	50.9	(44.1-57.2)
Meningioma	1,239	82.9	(80.5-85.0)	75.8	(73.0-78.4)	71.0	(67.9-73.8)	68.6	(65.4-71.6)	65.2	(61.8-68.4)	57.5	(53.2-61.5)
Lymphoma	5,172	48.5	(47.1-49.9)	39.9	(38.5-41.4)	35.3	(33.9-36.8)	32.1	(30.7-33.5)	29.9	(28.5-31.3)	22.2	(20.6-23.8)
TOTAL: All Brain and Other Nervous Systemⁱ	77,652	58.1	(57.7-58.4)	44.1	(43.7-44.5)	38.9	(38.6-39.3)	36.2	(35.8-36.6)	34.4	(34.0-34.7)	28.8	(28.4-29.2)

Central Brain Tumor Registry of the United States (Ostrom et al., 2015)

I.3. Prise en charge thérapeutique des gliomes

Les traitements des gliomes reposent sur la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie.

I.3.1. Chirurgie

L'obtention d'un échantillon tumoral par biopsie stéréotaxique ou par chirurgie a un objectif double :

(1) Le premier objectif est celui de permettre un diagnostic, d'établir le grade et l'histologie et de définir le profil moléculaire de la tumeur gliale. Dès lors, la décision de soins palliatifs sans diagnostic histologique devrait être exclue sauf s'il existe un risque majeur à faire la biopsie ou si le pronostic est jugé défavorable (Weller et al., 2017).

(2) L'autre objectif est thérapeutique. Les patients, quel que soit le type de gliome, doivent bénéficier d'une exérèse la plus large possible tout en respectant les fonctions neurologiques, le résidu tumoral post-opératoire ayant un impact sur la survie. Même pour les glioblastomes dont l'exérèse est souvent incomplète, certains auteurs proposent un "seuil pronostique" de résection chirurgicale avec un effet significatif sur la survie sans progression et sur la survie globale (Chaichana et al., 2014; Sanai et al., 2011).

Afin de guider le geste chirurgical et d'obtenir une exérèse optimale, l'IRM fonctionnelle, l'échographie ou la fluorescence par 5-aminolevulinic acid (ALA) per-opératoires sont des



outils performants. De plus, lorsque l'exérèse s'effectue en zone fonctionnelle, la chirurgie éveillée permet une meilleure cartographie cérébrale. La chirurgie éveillée diminue le risque de déficit neurologique persistant sans compromettre l'étendue de la résection, y compris dans les zones éloquentes des gliomes (Duffau, 2013; Duffau et al., 2012). Il est recommandé de contrôler la qualité de la résection par une imagerie cérébrale dans les 24 à 72 heures après la chirurgie (Weller et al., 2017).

I.3.2. Radiothérapie

La radiothérapie améliore le contrôle local avec un rapport bénéfice / risque raisonnable et augmente la survie. La dose et le fractionnement de la radiothérapie sont déterminés par les facteurs diagnostiques et pronostiques précités (âge, KPS, étendue de la résection) (Laperriere et al., 2002). Ainsi, une radiothérapie hypofractionnée est appropriée chez les sujets âgés (Weller et al., 2017).

La radiothérapie doit être débutée dans un délai de 2 à 6 semaines après le geste chirurgical sous réserve de cicatrisation du scalp et plus rapidement, dès 2 semaines, en cas de simple biopsie.

Parmi les techniques d'avenir, la Radiothérapie avec Modulation d'Intensité (IMRT) et l'irradiation avec Modulation d'intensité Volumétrique par ArcThérapie (VMAT) se développent rapidement ainsi que les protocoles de ré-irradiation (Gzell et al., 2017) afin de réduire les effets secondaires.

I.3.3. Chimiothérapie

Les traitements de première ligne reposent sur deux protocoles :

- Le témozolomide (TMZ), agent alkylant de deuxième génération, alkyle les guanines et induit ainsi, lors de la réplication, une erreur d'appariement qui aboutit à une cassure de l'ADN. Cet agent cytotoxique passe la barrière hémato-méningée et entre en synergie avec la radiothérapie.
- Le protocole PCV : procarbazine, lomustine (CCNU) et vincristine

Il n'existe actuellement aucune étude comparant les protocoles PCV au témozolomide. Les recommandations de traitement seront présentées en fonction des données moléculaires dans le Chapitre IV.



I.3.4. Glioblastomes et sujets âgés

Le GBM est plus fréquent chez les adultes de plus de 65 ans. Cependant, pendant de nombreuses années, les patients âgés ont été sous-représentés dans la plupart des études randomisées en raison de critères d'inclusion restrictifs (âge moyen des participants est d'environ 55 ans). Récemment, le témozolomide et la radiothérapie ont montré un avantage de survie et sont maintenant devenus le traitement standard pour les patients GBM de plus de 70 ans (Perry et al., 2017). La prise en charge de la GBM chez les patients âgés est difficile en raison du mauvais pronostic, des comorbidités fréquentes qui coexistent et du risque accru d'effets toxiques du traitement (chirurgie, RT et/ou chimiothérapie) avec un risque alors de sous-traiter ces patients (Zouaoui et al., 2014).

Le problème majeur des échelles pour l'évaluation de l'autonomie des patients (KPS et PS) est leur application en neuro-oncologie et surtout en onco-gériatrie. En effet, le score obtenu par l'application de ces échelles est souvent affecté non par une détérioration réelle de l'état général, mais par un déficit moteur acquis. De plus, ces échelles ne sont pas spécifiques aux patients âgés. Il est donc difficile d'évaluer l'état général des patients âgés atteints de GBM en raison de la difficulté de distinguer les symptômes neuro-oncologiques, liés à la maladie, des symptômes liés à l'âge.

Soubeyran et al. ont conçu un outil de dépistage, le score G8, spécifique aux patients âgés atteints de cancer (Soubeyran et al., 2012). Ce test de dépistage gériatrique rapide ne prend que quelques minutes et a été validé dans l'étude ONCODAGE (Soubeyran et al., 2014). Si des patients atteints de divers types de cancer ont été inclus dans les études (Decoster et al., 2015; Kenis et al., 2014; Liuu et al., 2012, 2014; Martinez-Tapia et al., 2017; Stokoe et al., 2012), le score G8 n'avait pas été évalué pour le gliome ou le glioblastome.

Dans une étude récente, nous mettons en évidence chez 89 patients âgés de 65 ans ou plus, porteurs d'un glioblastome trois groupes pronostiques en fonction du score G8 : un groupe à score élevé (score G8 : 14,5 – 17) ; groupe à score intermédiaire (10,5 – 14) ; et groupe à faible score (< 10,5) (Deluche et al., 2018). En analyse multivariée, le score du G8 est un facteur pronostique indépendant de la survie globale (HR: 55,46 ; IC₉₅ %: 13,42-229,13; p < 0,0001).



Chapitre II. De la classification histologique à la classification histo-moléculaire des gliomes

II.1. Les classifications historiques des gliomes

Bailey et Cushing publient la première description des oligodendrogliomes en 1927 (Bailey and Cushing, 1927) qu'ils complètent par une étude histologique plus précise en 1929 (Bailey and Bucy, 1929). Cette première classification histologique des tumeurs est fondée sur le principe de l'histogenèse et de la théorie des restes embryonnaires. Selon ces auteurs, les tumeurs malignes naissent à partir de cellules embryonnaires arrêtées à différents stades de développement et sont susceptibles de se différencier (Bailey and Bucy, 1929). Ainsi, les cellules d'astrocytomes ressemblent microscopiquement aux astrocytes et celles des oligodendrogliomes aux oligodendrocytes. Au fur et à mesure que les tumeurs deviennent malignes, elles ressemblent à des cellules de moins en moins différenciées.

Cette classification introduit aussi la notion d'histo-pronostique selon laquelle la survie la plus longue est liée à des tumeurs dont la différenciation est la plus marquée. A l'inverse, lorsque les tumeurs sont moins différenciées, l'espérance de vie est plus courte (Bailey and Bucy, 1929).

En 1949, Kernohan propose une nouvelle classification fondée sur le concept d'anaplasie (*ana* : à rebours et *plasia* : formation ou dédifférenciation) (Kernohan and Mabon, 1949). Considérant que les tumeurs dérivent de cellules adultes par anaplasie, Kernohan établit quatre grades de malignité croissante selon les critères histologiques suivants : le nombre de mitoses, le polymorphisme nucléaire, la nécrose et la prolifération vasculaire endothéliale.

II.2. Les classifications de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS)

La première classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), en 1979, reprend les deux systèmes précédents mais réfute le principe d'un « grading » histologique de malignité, sur les arguments suivants : un échantillon n'est pas toujours représentatif de la totalité de la tumeur, et le grade des gliomes peut évoluer dans le temps. Son objectif premier est d'offrir un outil commun aux pathologistes, neurochirurgiens, oncologues et radiothérapeutes et de regrouper les patients en groupes homogènes pour mieux les traiter. Cette classification utilise, une cotation de I à IV fondée sur l'estimation clinique de l'évolution de chaque type de tumeur.



La deuxième édition, en 1993, a reflété les progrès apportés par l'introduction de l'immunohistochimie dans la pathologie diagnostique et ré-introduit le « grading » histologique de malignité (Kleihues et al., 1993).

La classification OMS 2000 est fondée sur des critères morphologiques qualitatifs d'où le taux élevé de discordances inter-observateurs (Kleihues and Sobin, 2000). Le diagnostic histologique repose alors uniquement sur les similitudes des cellules tumorales avec les astrocytes ou les oligodendrocytes normaux. Les tumeurs sont donc classées selon leur type histologique et selon leur degré de malignité (grade de I à IV) qui est fonction de l'état de différenciation cellulaire, de densité cellulaire, de nécrose, de prolifération vasculaire, d'atypies nucléaires, d'activité mitotique et d'images apoptotiques.

II.3. La classification OMS 2007

La classification a depuis subi plusieurs révisions, mais n'a sensiblement pas évolué. Le type histologique tumoral est défini en fonction du type cytologique prédominant et le grade en fonction des signes d'anaplasie. Les principales modifications ont concerné le cadre nosologique des glioblastomes.

La classification OMS 2007 (Louis et al., 2007) distingue sept types histologiques de gliomes astrocytaires auxquels il faut rajouter différentes variantes histologiques, les oligodendrogliomes et les gliomes mixtes (**Tableau 2**).

Les limites de la classification OMS 2007 sont essentiellement liées à des problèmes de reproductibilité qui résultent de trois facteurs principaux :

- la difficulté de distinguer les cellules tumorales du parenchyme résiduel infiltré,
- la difficulté de reconnaître le type précis de la cellule tumorale astrocyte ou oligodendrocyte (sans doute en raison de la gliogenèse à partir de progéniteurs gliaux transformés),
- la possible non-représentativité des prélèvements.

Ainsi, la classification descriptive simple se révèle insuffisante du fait d'une discordance inter- et intra-observateurs oscillant entre 20 et 50%, ce qui rend la prise en charge des patients délicate (Daumas-Duport and Varlet, 2003; Giannini et al., 2001).



Tableau 2 Classification OMS 2007

Tumeurs astrocytaires	
Astrocytome à cellules géantes sous-épendymaire	Grade I
Astrocytome pilocytique	Grade I
Astrocytome pilocytique, variant pilomyxoïde	Grade II
Astrocytome diffus	Grade II
Fibrillaire	
Protoplasmique	
Gémistocytique	
Astrocytome anaplasique	Grade III
Xanthoastrocytome pléiomorphe	Grade II
Glioblastome	Grade IV
Glioblastome à cellules géantes	Grade IV
Gliosarcome	Grade IV
Gliomatose	Grade III
Tumeurs oligodendrogiales	
Oligodendrogliome	Grade II
Oligodendrogliome anaplasique	Grade III
Tumeurs oligoastrocytaires	
Oligoastrocytome	Grade II
Oligoastrocytome anaplasique	Grade III

D'après Figarella et al. (Figarella-Branger et al., 2008)

II.4. La classification OMS 2016

Pour pallier les problèmes de la classification descriptive simple, des profils d'altérations moléculaires ont été établis et ont été utilisés comme aides dès 2001 sans être toutefois systématiquement intégrés dans la classification OMS (Louis et al., 2001). Certains d'entre eux ont été corrélés à des données histologiques et cliniques de sous-groupes tumoraux (Gianini et al., 2001). Les premières altérations décrites dans les gliomes concernaient, dans les tumeurs astrocytaires, l'amplification ou la mutation du proto-oncogène EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) et les altérations de de l'anti-oncogène *TP53 consistant en des mutations du gène et/ou accumulation de la protéine p53*. Pour les oligodendrogliomes, il s'agissait des codélétions des bras chromosomiques 1p et 19q. Aucune anomalie moléculaire spécifique n'a été mise en évidence dans les oligo-astrocytomes (Louis et al., 2001).

L'aboutissement de cette démarche s'est traduite par la classification OMS 2016 qui inclut l'information moléculaire conformément à un ensemble de directives fournies par l' international Society of Neuropathology-Haarlem meeting (Louis et al., 2014).

- Les diagnostics doivent être définis aussi précisément que possible afin d'optimiser la reproductibilité inter-observateurs, la prédiction clinico-pathologique et la planification thérapeutique,



- Le diagnostic final doit être « un diagnostic intégré » (niveau 1) à partir d'une classification histologique (niveau 2), du grade (niveau 3) et des principales altérations moléculaires d'intérêt diagnostique (niveau 4) (**Tableau 3**).

Tableau 3 Exemple de diagnostic intégré selon l'International Society of Neuropathology-Haarlem meeting

	Nomenclature	Example
Layer 1	Integrated diagnosis (incorporating all tissue-based information)	Astrocytoma, IDHmt
Layer 2	Histological classification	Oligoastrocytoma
Layer 3	WHO grade (reflecting natural history)	II
Layer 4	Molecular information	IDH1R132H+, 1p/19q non-deleted, p53+, ATRX loss

IDH: isocitrate dehydrogenase, mt: mutant.

D'après (Louis et al., 2014) .

Dans l'exemple du **Tableau 3**, un oligo-astrocytome de grade II, porteur d'une mutation d'*IDH1*, sans codélétion 1p/19q, avec une surexpression de p53 et avec perte d'expression d'ATRAX est reclassé en astrocytome *IDH* muté (32)

La classification OMS 2016 (**Tableau 4**), est de ce fait plus une mise à jour de la 4^{ème} édition de 2007 qu'une 5^{ème} édition (Louis et al., 2016). Les marqueurs recherchés en routine sont : les mutations *IDH*, la codélétion 1p19q, la perte d'ATRAX et les mutations *TP53* ; un algorithme simplifié peut être proposé (**Figure 2**). L'ensemble de ces marqueurs seront détaillés dans le chapitre III « Les principales altérations moléculaires des gliomes utilisées en diagnostic ».



Tableau 4 Classification OMS 2016

WHO classification of tumours of the central nervous system

Diffuse astrocytic and oligodendroglial tumours		Neuronal and mixed neuronal-glia tumours	
Diffuse astrocytoma, IDH-mutant	9400/3	Dysembryoplastic neuroepithelial tumour	9413/0
Gemistocytic astrocytoma, IDH-mutant	9411/3	Gangliocytoma	9492/0
Diffuse astrocytoma, IDH-wildtype	9400/3	Ganglioglioma	9505/1
Diffuse astrocytoma, NOS	9400/3	Anaplastic ganglioglioma	9505/3
Anaplastic astrocytoma, IDH-mutant	9401/3	Dysplastic cerebellar gangliocytoma (Lhermitte-Duclos disease)	9493/0
Anaplastic astrocytoma, IDH-wildtype	9401/3	Desmoplastic infantile astrocytoma and ganglioglioma	9412/1
Anaplastic astrocytoma, NOS	9401/3	Papillary glioneuronal tumour	9509/1
Glioblastoma, IDH-wildtype	9440/3	Rosette-forming glioneuronal tumour	9509/1
Giant cell glioblastoma	9441/3	Diffuse leptomeningeal glioneuronal tumour	
Gliosarcoma	9442/3	Central neurocytoma	9506/1
Epithelioid glioblastoma	9440/3	Extraventricular neurocytoma	9506/1
Glioblastoma, IDH-mutant	9445/3*	Cerebellar liponeurocytoma	9506/1
Glioblastoma, NOS	9440/3	Paraganglioma	8693/1
Diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant	9385/3*	Tumours of the pineal region	
Oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	9450/3	Pineocytoma	9361/1
Oligodendroglioma, NOS	9450/3	Pineal parenchymal tumour of intermediate differentiation	9362/3
Anaplastic oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	9451/3	Pineoblastoma	9362/3
Anaplastic oligodendroglioma, NOS	9451/3	Papillary tumour of the pineal region	9395/3
Oligoastrocytoma, NOS	9382/3	Embryonal tumours	
Anaplastic oligoastrocytoma, NOS	9382/3	Medulloblastomas, genetically defined	
Other astrocytic tumours		Medulloblastoma, WNT-activated	9475/3*
Pilocytic astrocytoma	9421/1	Medulloblastoma, SHH-activated and TP53-mutant	9476/3*
Piloxytoid astrocytoma	9425/3	Medulloblastoma, SHH-activated and TP53-wildtype	9471/3
Subependymal giant cell astrocytoma	9384/1	Medulloblastoma, non-WNT/non-SHH	9477/3*
Pleomorphic xanthoastrocytoma	9424/3	Medulloblastoma, group 3	
Anaplastic pleomorphic xanthoastrocytoma	9424/3	Medulloblastoma, group 4	
Ependymal tumours		Medulloblastomas, histologically defined	
Subependymoma	9383/1	Medulloblastoma, classic	9470/3
Myxopapillary ependymoma	9394/1	Medulloblastoma, desmoplastic/nodular	9471/3
Ependymoma	9391/3	Medulloblastoma with extensive nodularity	9471/3
Papillary ependymoma	9393/3	Medulloblastoma, large cell / anaplastic	9474/3
Clear cell ependymoma	9391/3	Medulloblastoma, NOS	9470/3
Tanycytic ependymoma	9391/3	Embryonal tumour with multilayered rosettes, C19MC-altered	9478/3*
Ependymoma, RELA fusion-positive	9396/3*	Embryonal tumour with multilayered rosettes, NOS	9478/3
Anaplastic ependymoma	9392/3	Medulloepithelioma	9501/3
Other gliomas		CNS neuroblastoma	9500/3
Chordoid glioma of the third ventricle	9444/1	CNS ganglioneuroblastoma	9490/3
Angiocentric glioma	9431/1	CNS embryonal tumour, NOS	9473/3
Astroblastoma	9430/3	Atypical teratoid/rhabdoid tumour	9508/3
		CNS embryonal tumour with rhabdoid features	9508/3

D'après Louis et al. (Louis et al., 2016)

En pratique, une fois l'histologie déterminée, le statut *IDH* est analysé. En cas de mutation *IDH*, la codéletion *1p19q*, la perte d'*ATRX* et les mutations *TP53* sont recherchées. Dans l'hypothèse d'un glioblastome, ces marqueurs ne sont pas en revanche analysés (Figure 2). A partir de l'ensemble de ces éléments, la tumeur du patient pourra être classée d'un point de vue histo-moléculaire et de là en découlera sa prise en charge (Chapitre IV Schémas thérapeutiques découlant de la classification OMS 2016).



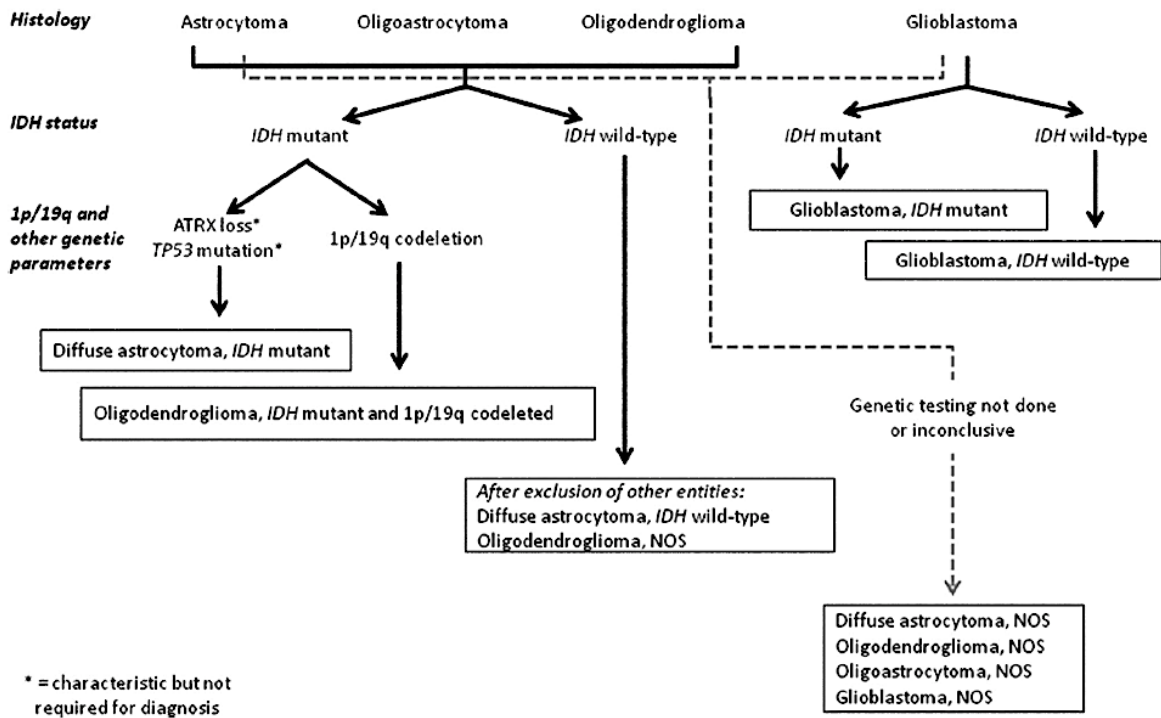


Figure 2 Algorithme simplifié OMS 2016
NOS not otherwise specified (Louis et al., 2016)

La contribution la plus importante de cette classification est donc l'incorporation de caractéristiques moléculaires des tumeurs qui améliore le diagnostic.

En cas de discordance entre analyses, le génotype l'emporte sur le phénotype histologique. Ainsi, une tumeur de « phénotype astrocytaire » et présentant une mutation *IDH* et une codélétion 1p/19q sera classée parmi les « oligodendrogliomes, *IDH*-mutés et codélétés 1p/19q », alors qu'une tumeur « oligodendrogliale » présentant une mutation *IDH*, une perte d'ATR_X et une mutation TP53 sera classée parmi les « astrocytomes diffus, *IDH*-mutés ». Le diagnostic de l'oligodendrogliome nécessite en effet à la fois une mutation *IDH* et une codélétion 1p/19q.

Il est à noter que si le test moléculaire n'est pas disponible ou est non concluant, le diagnostic sera classé NOS (not otherwise specified) par la prise en compte des seules caractéristiques histologiques.

Si les pronostics entre astrocytomes diffus de grade II, astrocytomes anaplasiques de grade III et glioblastomes ont été historiquement décrits comme significativement distincts (Ohgaki and Kleihues, 2005), des études récentes suggèrent que les différences pronostiques, notamment pour les astrocytomes de type II et les astrocytomes de grade III, ne seraient pas aussi marquées lorsque les tumeurs présentent une même anomalie moléculaire (Olar et al., 2015; Reuss et al., 2015) mais cette observation n'est pas systématique (Killela et al., 2014).



Les glioblastomes sont divisés en (1) glioblastomes *IDH*-sauvage ou wildtype (wt) ou *de novo* qui représentent environ 90% des cas et prédominent chez les patients de plus de 55 ans et en (2) glioblastomes *IDH*-mutant ou secondaire à un gliome de grade inférieur, qui apparaissent préférentiellement chez les patients plus jeunes (**Tableau 5**) (Ohgaki and Kleihues, 2013).

Tableau 5 Différences entre glioblastome primaire (ou *de novo*) et secondaire d'après la classification OMS 2016

	IDH-wildtype glioblastoma	IDH-mutant glioblastoma
Synonym	Primary glioblastoma, IDH-wildtype	Secondary glioblastoma, IDH-mutant
Precursor lesion	Not identifiable; develops de novo	Diffuse astrocytoma Anaplastic astrocytoma
Proportion of glioblastomas	~90%	~10%
Median age at diagnosis	~62 years	~44 years
Male-to-female ratio	1.42:1	1.05:1
Mean length of clinical history	4 months	15 months
Median overall survival		
Surgery + radiotherapy	9.9 months	24 months
Surgery + radiotherapy + chemotherapy	15 months	31 months
Location	Supratentorial	Preferentially frontal
Necrosis	Extensive	Limited
<i>TERT</i> promoter mutations	72%	26%
<i>TP53</i> mutations	27%	81%
<i>ATRX</i> mutations	Exceptional	71%
<i>EGFR</i> amplification	35%	Exceptional
<i>PTEN</i> mutations	24%	Exceptional

D'après Louis et al. (Louis et al., 2016)

L'autre apport de cette classification porte sur le diagnostic des tumeurs précédemment décrites dans le groupe « oligo-astrocytome ». Cette entité a toujours été difficile à définir et souffrait particulièrement d'une discordance inter-observateurs (van den Bent, 2010; Giannini et al., 2001). La caractérisation par le génotype et le phénotype, classe maintenant ces tumeurs soit en astrocytomes *IDH*-muté ou *IDH*-wt soit en oligodendrogliomes.



Chapitre III. Les principales altérations moléculaires des gliomes utilisées en diagnostic

Quatre paramètres moléculaires majeurs sont utilisés en routine : l'absence/la présence de mutations *IDH*, la codélétion chromosomiques 1p/19q, la mutation TP53 engendrant une surexpression protéique nucléaire de P53 et la perte d'ATRAX.

III.1. Les mutations des gènes *IDH1* et *IDH2*

L'isocitrate déshydrogénase (IDH) est impliquée dans le métabolisme cellulaire et notamment dans le cycle de Krebs. La famille IDH se compose du membre IDH1 de localisation cytoplasmique et d'IDH2 et d'IDH3, de localisation mitochondriale. Les deux isoformes principales, IDH1 et IDH2, décarboxylent en présence de NADP⁺ l'isocitrate en α -kétoglutarate (α -KG) avec production de NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate). L' α -KG est impliqué dans la protection cellulaire contre le stress oxydatif.

Les mutations des gènes *IDH1* et *IDH2* entraînent pour les protéines une nouvelle activité enzymatique NADPH-dépendante qui convertit l' α -KG en 2-hydroxyglutarate (2-HG) avec consommation du NADPH (Figure 3)(Cairns et al., 2011).

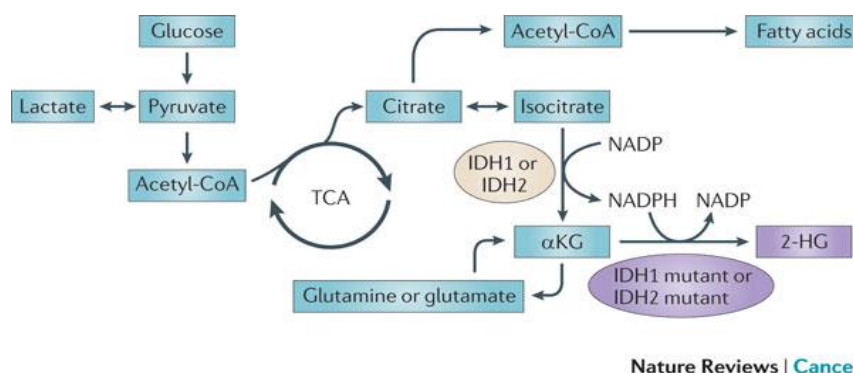


Figure 3 Les mutations *IDH1* et *IDH2* : un gain de fonction oncométabolique
D'après Cairns et al. (Cairns et al., 2011).

Ainsi, 2-HG s'accumule à des niveaux élevés dans les cellules tumorales ce qui induit une hyperméthylation de l'ADN et des histones et conduit à un blocage de la différenciation cellulaire (Lu et al., 2012).

Les principales mutations rapportées dans les gliomes touchent les sites actifs des protéines IDH. Il s'agit de la substitution en 132 d'une arginine par l'histidine (p.Arg132His ou R132H) pour IDH1, la forme la plus courante, et de la substitution en position 172 pour IDH2 (p.Arg172His ou R172H). Aucune mutation n'a été rapportée pour IDH3.



Les mutations *IDH1* et *IDH2* affectent un seul allèle (effet dominant négatif) et sont mutuellement exclusives. Les mutations *IDH1* sont beaucoup plus fréquentes (93% des cas) que celles d'*IDH2*.

La régulation épigénétique de l'expression des gènes par la méthylation de l'ADN et des histones est fréquemment altérée dans les cancers y compris les gliomes (de Souza et al., 2018).

La mutation *IDH1* et la méthylation du promoteur de O⁶-méthylguanine DNA méthyltransférase (MGMT) sont associées à l'hyperméthylation aberrante des séquences régulatrices riches en 5'-cytosine-guanine (CpG) appelée phénotype méthylateur de l'îlot CpG du gliome (G-CIMP ; CpG Island Methylator Phenotype) (Noushmehr et al., 2010).

Ce phénotype induit une susceptibilité au stress oxydatif ce qui contribuerait ainsi à une meilleure chimio- et radio-sensibilité. La mutation *IDH* dans les gliomes associée au phénotype G-CIMP est associée un bon pronostic (**Figure 4**) (Lu et al., 2012; de Souza et al., 2018).

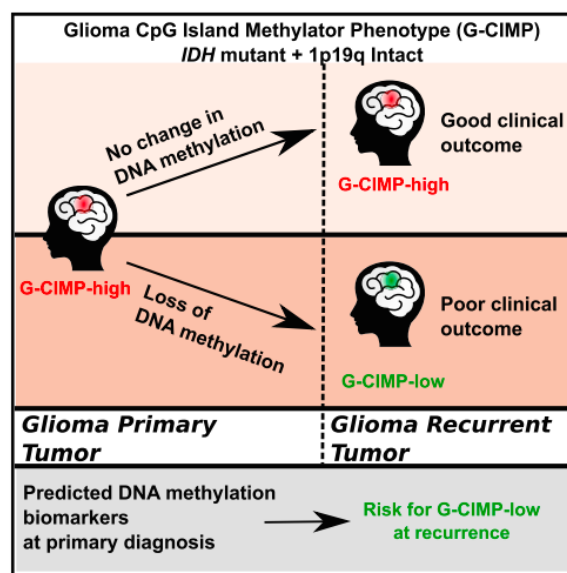


Figure 4 Impact de la méthylation de l'ADN dans les gliomes

Dans les populations *IDH* muté sans codélétion 1p/19q, le maintien d'un phénotype G-CIMP est un facteur de bon pronostic alors que la perte de G-CIMP est un facteur de mauvais pronostic dans les récurrences (de Souza et al., 2018).

L'analyse génomique de 939 échantillons tumoraux, met en évidence une variation de la fréquence des mutations *IDH1/2* en fonction du type histologique (**Figure 5**) (Yan et al., 2009). Aucune mutation *IDH1/2* n'a été mise en évidence dans les astrocytomes pilocytiques (grade I de l'OMS), les épendymomes (OMS grade II) et les médulloblastomes.

Ainsi, le statut *IDH* muté est spécifique des astrocytomes et oligodendrogliomes de grade II à III et des glioblastomes secondaires (**Figure 5**). Ces résultats ont été confirmés dans d'autres études similaires (Hartmann et al., 2009).



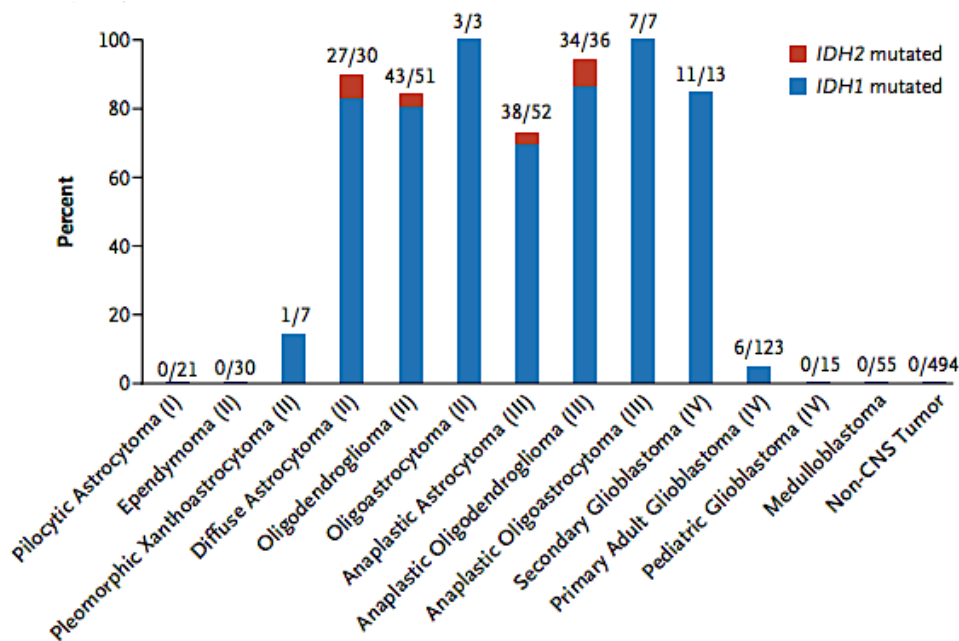


Figure 5 Répartition des statuts IDH muté au sein des tumeurs cérébrales
D'après Yang et al. (Yan et al., 2009)

Les mutations d'*IDH* dans les glioblastomes sont associées à un allongement de survie globale (Hazard ratio : 3,7; IC_{95%} : 2,1-6,5; p <0,001). La survie médiane est de 3,8 ans chez les patients ayant une tumeur avec une mutation *IDH* vs 1,1 an chez les patients avec une tumeur *IDH1*-wt (Parsons et al., 2008). Ces données ont été confirmées par la suite dans l'ensemble des gliomes de grade II à IV, vis-à-vis de la survie globale et de la survie sans progression (Eckel-Passow et al., 2015; Gozé et al., 2014; Leeper et al., 2015; Metellus et al., 2010; Xia et al., 2015).

Les mutations d'*IDH* sont mises en évidence en premier lieu par immunohistochimie, par un anticorps ciblant la protéine de phénotype mutant *IDH1*-R132H, la plus fréquente (Capper et al., 2009). Si l'immunohistochimie est négative, une recherche des mutants rares est effectuée par technique de biologie moléculaire notamment par séquençage Sanger, pyroséquençage ou encore séquençage nouvelle génération (Loussouarn et al., 2012)

Une tumeur est considérée *IDH*-wt seulement si l'ensemble de ces méthodes ne révèlent pas de mutations.

Selon les recommandations de l'ANOCEF, chez les patients de plus de 55 ans présentant un aspect typique de glioblastome à l'imagerie et à l'histologie, le marquage négatif en IHC de *IDH1* R132H est suffisant pour classer la tumeur en glioblastome *IDH*-wt (www.anocef.org).



III.2. Les mutations TP53 et ATRX

L'analyse des arbres phylogénétiques montre que l'acquisition des mutations *IDH* est précoce dans la gliomagenèse alors que les mutations *ATRX* et *TP53* sont plus tardives (Figure 6) (Johnson et al., 2014; Suzuki et al., 2015). Ce fait explique que la perte d'*ATRX* et de *TP53* ne soient recherchées que pour les tumeurs avec *IDH* muté.

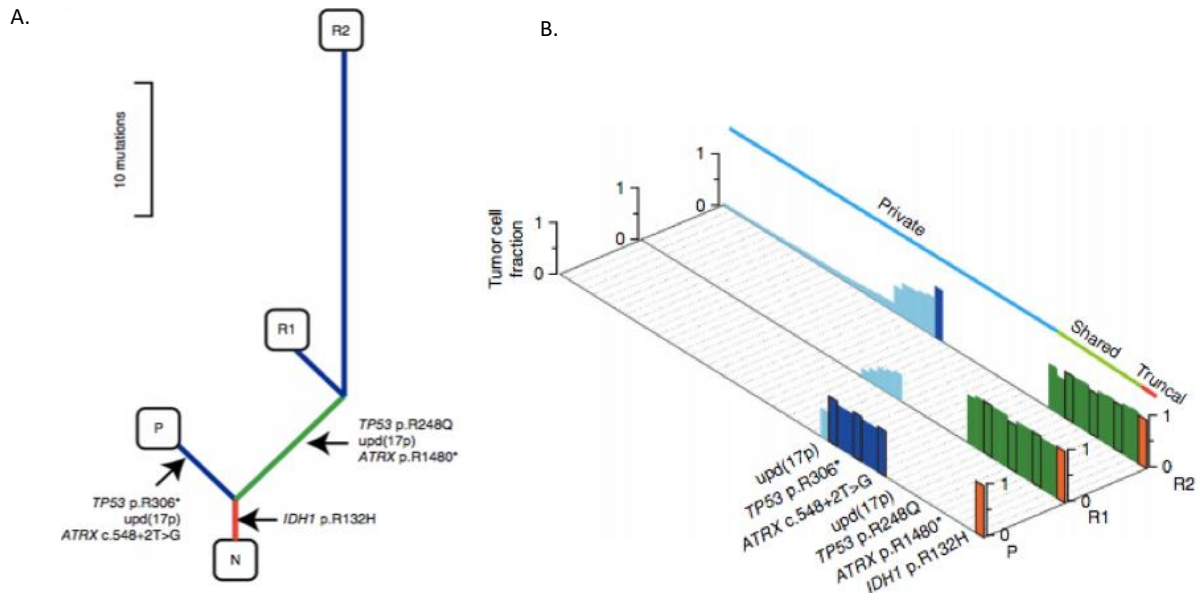


Figure 6 Phylogénie des mutations *IDH*, *ATRX* et *TP53*

A. Arbre phylogénétique montrant les événements des mutations *TP53* et *ATRX* survenant entre les tumeurs primaires et les rechutes (N, normal)

B. Représentation graphique des lésions génétiques dans des échantillons tumoraux avec les mutations partagées par tous les échantillons (en rouge), celles p des sous-ensembles d'échantillons (vert) et les mutations spécifiques non partagées (en bleu) (Suzuki et al., 2015)

La protéine p53, codée par *TP53* localisé en 17p13.1, est impliquée dans la réponse aux dommages de l'ADN soit par l'arrêt du cycle cellulaire entre la phase G1 et la phase S, soit par apoptose. Des mutations ponctuelles de *TP53* conduisent à l'altération de p53, à l'obtention de nouvelles fonctions pro-tumorigènes et inhibent son activité transcriptionnelle (Muller and Vousden, 2013, 2014). La protéine p53 mutée est inactive et s'accumule dans le noyau, ce qui rend particulièrement aisée la détection de cette altération par immunohistochimie en routine diagnostique.

En pratique, la détection de p53 mutée par immunohistochimie est significative si plus de 10 % des noyaux tumoraux sont positifs avec un signal intense (Figarella-Branger et al., 2012; Gillet et al., 2014).

Les mutations *TP53* et *ATRX*, toutes deux mutuellement exclusives de la codélation 1p/19q, sont retrouvées au sein des astrocytomes mutés *IDH* (Figure 6) (Shajani-Yi et al., 2018). En



revanche, les oligodendrogliomes ne présentent pas de mutation *TP53* (Wesseling et al., 2015).

Le gène *ATRX* a été découvert dans le cadre d'une étude évaluant le syndrome de retard lié au chromosome X (Alpha Thalassemia Mental Retardation syndrome X-linked) chez des patients présentant une α -thalassémie, des troubles psychomoteurs sévères, des anomalies urogénitales et des dysmorphies faciales caractéristiques (Gibbons et al., 1995). La protéine *ATRX* existe sous deux isoformes (180 et 280 kDa), elle est fortement enrichie en séquences répétitives et riches en GC (Nandakumar et al., 2017).

Elle joue un rôle de remodelage de la chromatine au niveau des télomères et elle est responsable du phénotype ALT (allongement alternatif des télomères). Elle modifie les régions répétitives situées aux extrémités des chromosomes, les télomères, impliquées dans la régulation de la survie, de la division et de la prolifération des cellules cancéreuses (Eid et al., 2015; Henson et al., 2005; Jiao et al., 2012).

La mutation *ATRX* entraîne la perte de l'expression nucléaire d'*ATRX* en IHC. *ATRX* mutée est fortement associée à la mutation d'*IDH* et de la mutation *TP53* (Leeper et al., 2015; Liu et al., 2012). La perte d'*ATRX* se retrouve préférentiellement dans les tumeurs astrocytaires (Leeper et al., 2015; Liu et al., 2012).

Le statut *ATRX* permet de discriminer deux groupes au sein des astrocytomes *IDH* mutés. Les patients présentant une tumeur avec perte d'expression d'*ATRX* ont une espérance de vie supérieure à ceux conservant une expression d'*ATRX* (55,6 vs 31,8 mois) (Wiestler et al., 2013).

III.3. Codélétion 1p/19q

En pratique clinique, la codélétion 1p/19q est un paramètre moléculaire important et désormais analysé en routine. Cette altération correspond à la perte complète du 1p et 19q, secondaire à une translocation (1;19) (q10;p10) et induit une inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs alors qu'une perte partielle n'est pas significative (Vogazianou et al., 2010).

Les techniques recommandées pour rechercher la codélétion 1p/19q ou la perte d'hétérozygotie (LOH, Loss Of Heterozygosity) sont la FISH (« fluorescence in situ hybridization ») et l'analyse des microsatellites (Weller et al., 2012). Par ailleurs des nouvelles approches, le séquençage de nouvelle génération (NGS, Next Generation sequencing) (Dubink et al., 2016), la MLPA (amplification multiplex de sondes dépendant d'une ligation) (Jeuken et al., 2006) ou des puces SNP (Single Nucléotide Polymorphism) (Harada et al., 2011) ont été développées pour évaluer le gain et la perte chromosomique.



La codélétion 1p/19q est toujours associée à une mutation *IDH* mais la réciproque n'est pas vraie, ce qui suggère que la mutation *IDH* précède la codélétion 1p/19q dans la genèse des gliomes (Jenkins et al., 2006). La codélétion 1p/19q est par ailleurs exclusive de la mutation *TP53* (Okamoto et al., 2004; Suzuki et al., 2015).

La codélétion 1p/19q est un facteur de bon pronostic dans les oligodendrogliomes (Vogazianou et al., 2010; Jenkins et al., 2006; van den Bent et al., 2013; Chamberlain and Born, 2015; Cairncross et al., 2013; Buckner et al., 2014). Ainsi, l'étude RTOG 9402 montre une survie globale pour les patients présentant une codélétion 1p/19q supérieure à celle des patients qui ne sont pas codélétés et ce quel que soit le traitement reçu (PCV plus RT : 14,7 vs 2,6 ans, HR : 0,36, IC_{95%} : 0,23-0,57, p = 0,001; vs RT: 7,3 vs 2,7 ans, HR : 0,40, IC_{95%} : 0,27-0,60, p = 0,001) (Cairncross et al., 2013).

Les codélétions 1p19q sont aussi des facteurs prédictifs de la réponse au traitement par PCV. Dans les tumeurs de grade II (Buckner et al., 2014) et III (van den Bent et al., 2013; Cairncross et al., 2013), le traitement par PCV est devenu la référence en association avec la radiothérapie. Dans les tumeurs de grade III, la médiane survie globale RT+PCV vs RT est 14,7 ans vs 7,3 ans (HR : 0,51; p = 0,007) (Cairncross et al., 2013). A l'inverse, les tumeurs codélétées 1p/19q ne sont pas particulièrement sensibles au TMZ (Baumert et al., 2016).

Des alternatives, non encore validées en routine dans le diagnostic des gliomes et associées à la détection d'ATRX, pourraient supplanter la seule détection des codélétions 1p/19q. Il a été rapporté des mutations récurrentes du gène CIC (homolog of *Drosophila capicua*) situé sur le chromosome 19q et du gène FUBP1 (Far Upstream element Binding Protein 1), localisé en 1p, qui sont associées aux codélétions 1p/19q (Bettegowda et al., 2011). Ces anomalies sont détectées en immunohistochimie.

III.4. Méthylation du promoteur de la MGMT

Parmi les marqueurs moléculaires non screenés pour classifier les tumeurs mais qui pourraient être utiles dans le choix du traitement des gliomes, la méthylation du promoteur de la MGMT (O-6-methylguanine-DNA methyltransferase) est importante dans les glioblastomes et particulièrement chez les sujets âgés.

MGMT code pour un enzyme de la réparation des lésions d'ADN qui enlève des groupements alkyles situés en position O⁶ des résidus guanine et contribue ainsi à la chimiorésistance aux agents alkylants comme le TMZ (Nakamura et al., 2001). L'hyperméthylation du promoteur du gène codant pour la MGMT est responsable de la répression d'expression du gène ce qui restaure la chimio-sensibilité des tumeurs au TMZ (Malmström et al., 2012). Cette régulation épigénétique est donc un facteur prédictif de réponse au traitement par



TMZ. Si l'analyse du statut de méthylation du gène codant pour la MGMT est recommandée, la technique d'analyse n'est cependant pas standardisée, ce qui constitue un inconvénient majeur. En effet, les techniques d'analyse des îlots CpG sur le promoteur sont différentes et conduisent à des résultats non comparables. Une technique, le pyroséquençage, a néanmoins été validée en prospectif (Quillien et al., 2016).



Chapitre IV. Schémas thérapeutiques découlant de la classification OMS 2016

A partir de l'algorithme de la classification 2016 (**Figure 2**), des recommandations thérapeutiques ont été proposées pour chaque sous-groupe (**Figure 7**) (Weller et al., 2017):

- Oligodendrogliomes, IDH-mutés avec codélétion 1p/19q, grade II

Une chirurgie d'exérèse la plus large possible est recommandée.

Une stratégie de surveillance peut se justifier en cas de résection complète ou chez les patients de moins de 40 ans ayant eu une résection incomplète et si la tumeur n'entraîne qu'une épilepsie contrôlée sans déficit associé.

Si un traitement est nécessaire, il comporte la radiothérapie et une chimiothérapie par PCV selon l'essai RTOG 9802 (Buckner et al., 2014). Cette stratégie serait supérieure à un traitement par témozolomide ou radiothérapie seuls qui, eux, sont équivalents entre eux (Baumert et al., 2016; Buckner et al., 2014).

- Oligodendrogliomes, IDH-mutés avec codélétion 1p/19q, grade III

Une chirurgie d'exérèse, la plus large possible, est recommandée. Les essais de EORTC 26951 et RTOG 9802, ont montré l'intérêt d'un traitement par radiothérapie associée au PCV (van den Bent et al., 2013; Cairncross et al., 2013).

- Astrocytome diffus grade II

Il est recommandé une chirurgie avec résection maximale si possible.

Après une résection complète de la tumeur, les patients de moins de 40 ans asymptomatiques, sans déficit neurologique et avec des crises d'épilepsie bien contrôlées peuvent bénéficier d'une simple surveillance. La présence ou l'absence de la mutation IDH oriente le traitement.

En cas de mutation IDH: Les deux principales études EORTC 22033 et RTOG 9802 ont montré un intérêt d'un traitement par radiothérapie associée au PCV même si un traitement alternatif par radiothérapie associée au TMZ en concomitance puis en maintenance peut être proposé (Baumert et al., 2016; Buckner et al., 2014).

En l'absence de mutation IDH: Les tumeurs ont le plus souvent un profil plus agressif. Le type de traitement est mal défini, il peut être discuté un traitement par radiothérapie seule ou associé avec du TMZ en concomitance puis en maintenance (Weller et al., 2017).

- Astrocytome anaplasique grade III

Le standard repose sur une chirurgie d'exérèse maximale.



En cas de mutation *IDH*, les essais de EORTC 26053 et RTOG 9402, ont montré l'intérêt d'un traitement par radiothérapie associée au PCV ou associée au TMZ (Bent et al., 2017; Cairncross et al., 2013).

En l'absence de mutation *IDH*, ces tumeurs ont un profil très agressif similaire au glioblastome. Le type de traitement suit donc le protocole STUPP (Weller et al., 2017).

- Glioblastomes

Le protocole STUPP (Stupp et al., 2005) (radiothérapie avec TMZ en concomitance puis en maintenance) reste le protocole de référence dans les glioblastomes *IDH*-mutés et *IDH*-wt même si les pronostics sont différents (Tabouret et al., 2016).

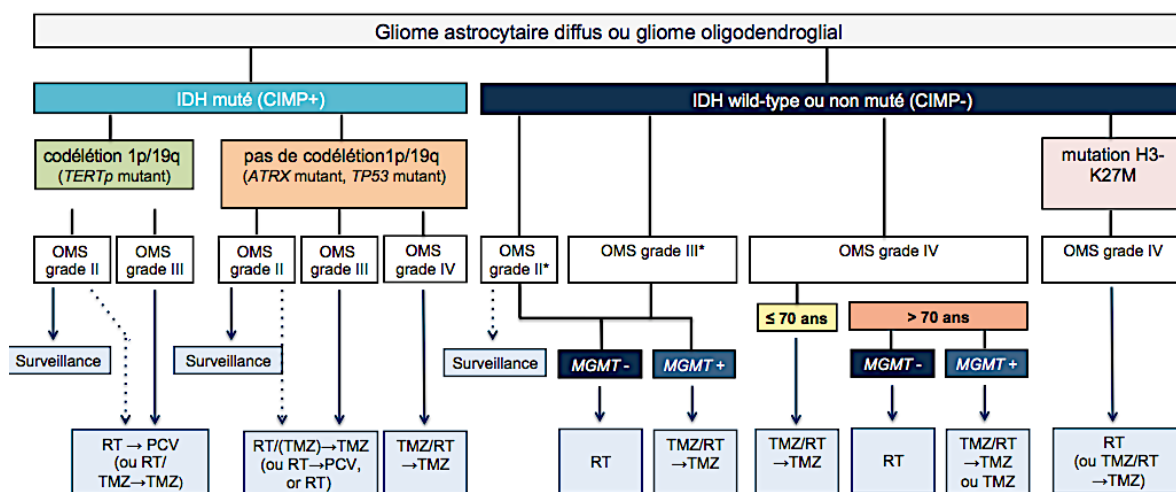


Figure 7 Les stratégies actuelles de traitement post-opératoire pour les principales entités du gliome classées selon la classification OMS 2016

D'après Weller et al. (Weller et al., 2017)

PCV : procarbazine, lomustine et vincristine; RT: radiothérapie; TMZ: témozolomide; TMZ/RT→TMZ, chimio-radiothérapie concomitante puis par maintenance par TMZ.

En France, la recherche de la méthylation MGMT n'est pas intégrée en routine.

Chapitre V. Implication du glycome dans les cancers

Malgré la contribution indéniable de la classification OMS 2016 et la prise en compte des altérations moléculaires, des tumeurs apparemment identiques peuvent évoluer de façon différente en raison d'une hétérogénéité moléculaire (Lin and DeAngelis, 2017). L'un des moyens d'améliorer la prise en charge des gliomes consiste à identifier de nouveaux biomarqueurs moléculaires qui distinguent des sous-groupes plus homogènes de patients. Notre équipe a mis en évidence une signature basée sur l'expression de gènes impliqués dans la glycosylation au cours du processus de différenciation *in vitro* des astrocytes tumoraux (Cheray et al., 2011). Ces gènes représentent donc des biomarqueurs susceptibles d'enrichir la classification actuelle.

Il a été démontré que les motifs glycosylés participent à de nombreux processus biologiques fondamentaux tels que l'inflammation, la surveillance immunitaire, l'adhésion cellulaire, l'interaction cellule-matrice, la signalisation intracellulaire et intercellulaire et le métabolisme cellulaire (Pinho and Reis, 2015). Les glycanes participent aussi à des événements physiopathologiques majeurs au cours de la progression tumorale (Fuster and Esko, 2005).

V.1. Généralités sur le glycome

La glycosylation est une modification post-traductionnelle qui établit une liaison covalente entre des glucides et des protéines (glycoprotéines) ou des lipides (glycolipides). Les enzymes responsables de la constitution et de l'hydrolyse de ces liaisons sont les glycosyltransférases et les glycosidases (Moremen et al., 2012).

Les chaînes d'oses sont liées aux protéines par des liaisons O-glycosidiques ou N-glycosidiques selon leur site d'ancrage sur l'asparagine ou un acide amine hydroxylé.

De plus, les glycanes eux-mêmes peuvent être modifiés par la sulfatation, l'acétylation et/ou la phosphorylation.

Les glycoprotéines et les glycolipides (glycoconjugués) régulent une grande variété d'activités biologiques et cellulaires, y compris la pluripotence, l'embryogenèse, les interactions de cellule à l'environnement de cellule à cellule, et la transduction du signal, le repliement des protéines, et la modulation immunitaire (Varki et al., 2015).

Les autres classes majeures de glycoconjugués incluent les protéoglycanes et les glycosphingolipides.



V.2. Glycome et cancer

La glycosylation aberrante peut être la conséquence ou la cause du cancer. Des études récentes indiquent qu'une partie, sinon la totalité, de la glycosylation aberrante est le résultat d'une transformation oncogénique initiale, ainsi qu'un événement essentiel dans l'induction de l'invasion et de la dissémination métastatique (Hakomori, 2002). Les glycoprotéines exprimées par les cellules tumorales et par les cellules endothéliales favorisent la prolifération cellulaire, l'invasion loco-régionale, le passage et la circulation des cellules tumorales dans le compartiment systémique et leur implantation dans le tissu cible pour générer des métastases à distance (**Figure 8**).

Une glycosylation aberrante se produit dans pratiquement tous les types de cancers et de nombreux épitopes glycosylés constituent des antigènes associés aux tumeurs (Hakomori, 2002; Varki et al., 2015). Les cellules tumorales présentent un large spectre d'altérations de la glycosylation.

Hakomori et Kannagi ont suggéré l'existence de deux mécanismes principaux pour l'expression des antigènes glucidiques associés aux tumeurs, la synthèse incomplète générant des glycanes tronqués et la néosynthèse (Hakomori and Kannagi, 1983).

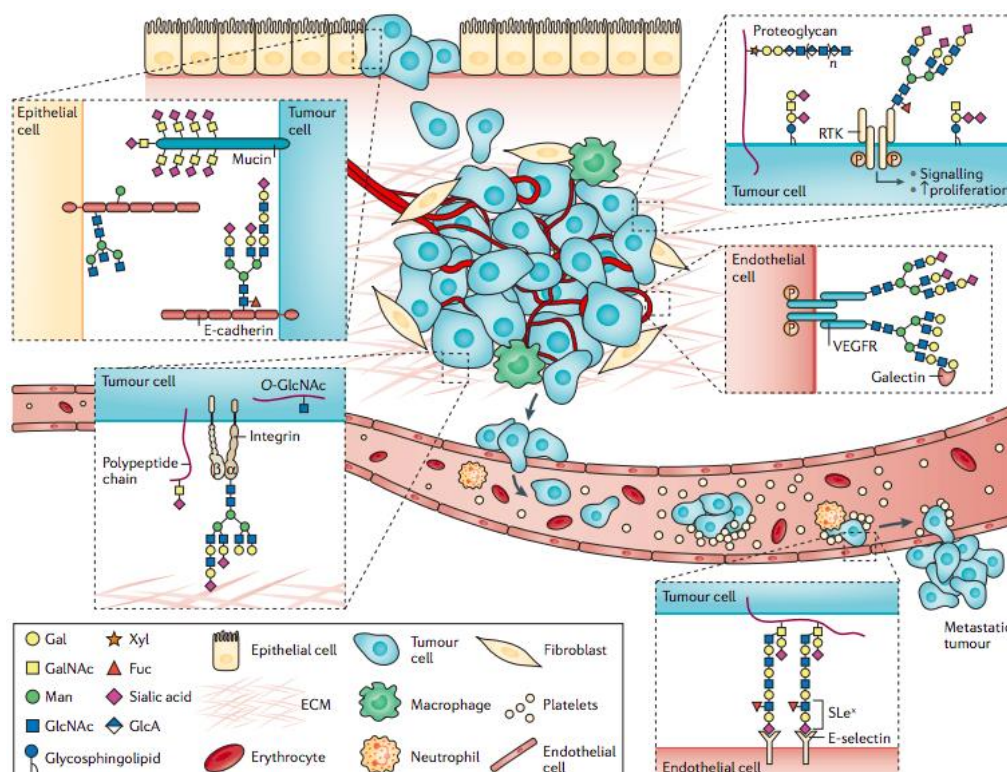


Figure 8 Rôle des glycanes dans le développement et la progression du cancer

Les glycanes jouent des rôles fondamentaux dans les étapes pathologiques clés du développement et de la progression de la tumeur. Dans le processus de dissociation et d'invasion des cellules tumorales, les glycanes interfèrent avec l'adhésion cellule-cellule (Pinho and Reis, 2015)

Dans un précédent travail, l'équipe a mis en évidence, au sein de deux lignées cellulaires de glioblastomes (U87-MG et U251) une signature moléculaire qui pourrait améliorer la caractérisation des cellules les plus agressives et les plus indifférenciées. Parmi les gènes d'intérêt liés à la N-glycosylation, *KLRC3* et *CHI3L1* ont semblé particulièrement pertinents (Cheray et al., 2011). Ce travail était en accord avec une publication précédente qui avait montré l'intérêt d'une glycosignature dans les glioblastomes comprenant *CHI3L1* (Kroes et al., 2007).

V.3. KLRC3 et gliomes

KLRC3, (Killer cell lectin-like receptor C3) appartient à la famille du groupe NKG2 (Natural Killer Group 2), exprimé dans des cellules NK. Cependant, sa fonction n'a pas été encore élucidée.

Dans un précédent travail, la surexpression de trois gènes spécifiques liés à la glycosylation, *CHI3L1*, *KLRC3* et *PRUNE2*, a été mise en évidence dans les lignées cellulaires U87-MG et U251 de glioblastomes (Cheray et al., 2011). Il a été par ailleurs rapporté que l'expression de *KLRC3* était associée à la prolifération cellulaire, à la migration, à la clonogénicité et à la tumorigenèse (Cheray et al., 2016).

Cheray et al. ont montré que le niveau d'expression du gène *KLRC3* était augmenté de plus de 1,7 fois dans les échantillons de gliomes par rapport aux tissus normaux (base de données GENT: Expression des gènes dans les tissus normaux et tumoraux, (Shin et al., 2011)).

V.4. CHI3L1 et gliomes

La protéine 1 de type chitinase-3 (*CHI3L1*) ou YKL-40 (protéine nommée par les trois premiers acides aminés de la partie N-terminale, tyrosine (Y), lysine (K) et leucine (L)) (Johansen et al., 1992) ou HC-gp-39 (human cartilage glycoprotein-39) (Johansen et al., 2006) est une glycoprotéine de 40 kDa de la matrice extracellulaire. Elle est codée par le gène *CHI3L1* situé en 1q31-q32, qui se compose de 10 exons et s'étend sur environ 8 kb (Rehli et al., 1997).

Elle appartient à la famille des glycohydrolases (Bussink et al., 2007), composée des chitinases et de protéines de type chitinase dont *CHI3L1* (Bleau et al., 1999).

CHI3L1 n'a pas d'activité chitinase en raison de la substitution d'un acide glutamique par la leucine dans le domaine catalytique (Renkema et al., 1998) ce qui exclut son rôle en tant qu'enzyme glycolytique. Le rôle physiologique de *CHI3L1* n'est pas entièrement élucidé.

Dans le tissu humain normal adulte, une expression élevée de *CHI3L1* est observée dans les cellules ayant une activité cellulaire intense dans les chondrocytes, les cellules syno-

viales, les neutrophiles et les macrophages au cours de la différenciation cellulaire (Ringsholt et al., 2007). Il est aussi impliqué dans les pathologies inflammatoires telles que la colite ulcéreuse, la polyarthrite rhumatoïde...(Johansen et al., 2009). Ainsi dans les astrocytes, l'expression de CHI3L1 *in vivo*, induite par la présence de macrophages, s'accompagne de changements morphologiques et d'une modification de la motilité des astrocytes (Bonneh-Barkay et al., 2012).

Une méta-analyse de 8 études portant sur 1241 patients atteints de glioblastome a confirmé qu'une forte expression de CHI3L1 était un facteur de mauvais pronostic (HR = 1,46; IC_{95%}, 1,33-1,61; P < 0,001) (Qin et al., 2017). Dans les glioblastomes, l'expression de CHI3L1 est associée à la perte du chromosome 10q et inversement associée à celle de l'EGFR (Horbinski et al., 2010). CHI3L1 est aussi impliqué dans la radiorésistance des lignées cellulaires de glioblastome *in vitro* (Francescone et al., 2011; Saidi et al., 2008) et dans des modèles de xénogreffes de tumeurs cérébrales (Shao et al., 2014).

Du fait de la difficulté d'accès au tissu cérébral, notamment pour le suivi, l'identification de biomarqueurs est recherchée dans le sang. Les taux sériques ou plasmatiques de CHI3L1 sont stables dans l'échantillon pendant 7 jours, et ne présentent pas de variation circadienne significative (Johansen et al., 2008; Tanwar et al., 2002). Ainsi, la concentration sérique de CHI3L1 est considérée comme un biomarqueur pertinent pour surveiller la rechute chez les patients atteints de GBM (Johansen et al., 2006, 2009).

La concentration sanguine de CHI3L1 est inversement liée à la survie dans les GBM (HR : 1,4, p = 0,02) et dans les gliomes de grade III (Hormigo et al., 2006; Iwamoto et al., 2011) et est aussi corrélée à l'imagerie pour les GBM (Hormigo et al., 2006). En revanche, CHI3L1 circulant ne semble pas être un biomarqueur prédictif de la réponse à la radio-chimiothérapie chez les patients atteints de GBM (van Linde et al., 2016).

Chapitre VI. Implication des neurotrophines dans les cancers du système nerveux central

L'addition de résidus glycosylés est également connue pour jouer un rôle dans l'activation de différents types de récepteurs en particulier les récepteurs aux neurotrophines qui ont fait l'objet de nombreuses études au sein de l'équipe.

Les neurotrophines, une famille de facteurs de croissance, et leurs récepteurs sont décrits pour leur implication dans le développement du système nerveux central. Ils semblent être une piste prometteuse comme biomarqueurs des gliomes. La régulation de leur expression est complexe et résulte de plusieurs phénomènes parmi lesquels on retrouve la glycosylation.

La premier membre de la famille des neurotrophines à avoir été découvert est le Nerve Growth Factor (NGF)(Levi-Montalcini, 1952). En 1954, Stanley Cohen, Levi-Montalcini et Viktor Hamburger montrent que l'implantation d'un sarcome de souris dans un embryon de poulet induit une croissance des fibres nerveuses. Cette innervation serait liée à la libération d'un agent soluble libéré par la tumeur, le NGF. Cette découverte vaudra le prix le Prix Nobel de physiologie ou médecine en 1986 à Stanley Cohen et Levi-Montalcini.

Par la suite trois autres neurotrophines ont été décrites : le Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF)(Barde et al., 1982), la NeuroTrophine 3 (NT3) (Hohn et al., 1990) et la NeuroTrophine 4/5 (NT4/5) (Hallböök et al., 1991). La neurotrophine 4 est un variant de la neurotrophine 5.

VI.1. Les neurotrophines : des gènes aux protéines

Issus d'un même gène ancestral, les gènes codant pour les neurotrophines sont très conservés (Hallböök, 1999). NGF et NT-3 ont été formés par la duplication d'un gène ancestral, neurotrophine intermédiaire, tandis que BDNF et NT-4/5 proviennent d'un autre gène ancestral intermédiaire. Les gènes du NGF, du BDNF, du NT3 et du NT4/5 sont localisés respectivement sur les chromosomes 1, 11, 12, et 19 du génome humain (**Tableau 6**).



Tableau 6 Caractéristiques des préproneurotrophines

Gène		ARNm		Protéine			
Nom	Localisation	Exon(s)	N° NCBI	Exon(s)	N° Uniprot	Taille	Homologie
<i>NGF</i>	1p13, 1	3	NM_002506.2	3	P01138	241	84
<i>BDNF</i>	11p13	11	NM_170735.5	1	P23560	247	83
<i>NTF3</i>	12p13	2	NM_002527.4	1	P20783	257	91
<i>NTF4/5</i>	19q13, 3	2	NM_006179.4	2	P34130	210	82

Présentation de la localisation chromosomique des gènes, la taille des transcrits, la taille de la protéine (nombres d'acides aminés) et les numéros d'accèsion dans NCBI et Swissprot.

Les différentes neurotrophines (NT) sont synthétisées par le même processus de maturation (Lessmann et al., 2003) : (1) Les ARNm des NT sont traduits en protéines immatures (ou préproneurotrophines) constituées d'un peptide signal (PS), d'un propeptide et de la protéine mature, (2) le PS (18 à 25 aa) est clivé dans le réticulum endoplasmique, puis (3) la protéine mature est obtenue par clivage du propeptide dans les cellules ou dans les granules de sécrétion (Figure 9).

Les neurotrophines matures s'homodimérisent pour se fixer sur des récepteurs de forte ou de faible affinités (Lessmann et al., 2003).

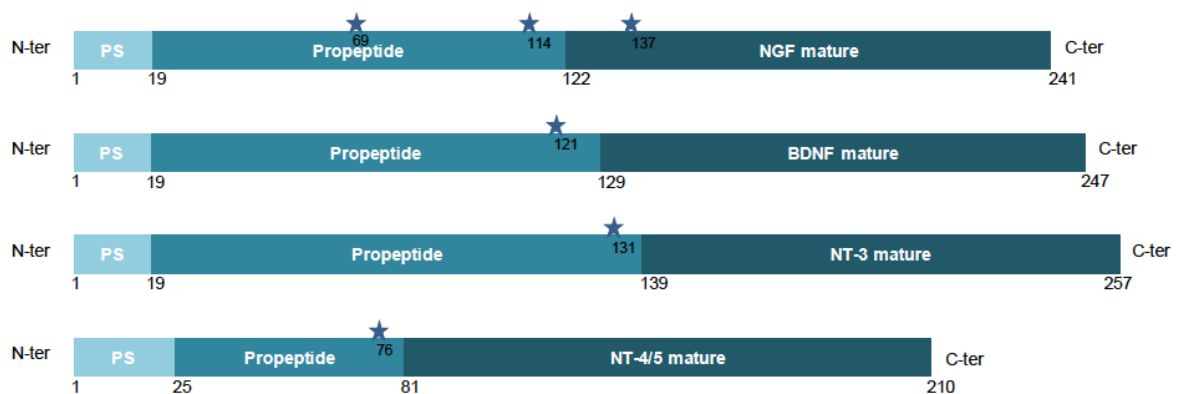


Figure 9. Représentation schématique des protéines de la famille des pro/neurotrophines

D'après Lessmann et al. (Lessmann et al., 2003).

Les protéines sont synthétisées sous forme de précurseurs, les pré-proneurotrophines, possédant un peptide signal, un propeptide et la protéine mature. Les étoiles représentent les sites de N-glycosylation.

VI.2. Les récepteurs des neurotrophines

La sélectivité d'action des NT dépend de deux familles de récepteurs (Hallböök, 1999):

- Les récepteurs Trk (Tropomyosin related kinase) de haute affinité
- Le récepteur p75^{NTR} non spécifique et de faible affinité, membre de la superfamille des récepteurs au TNF (Tumeur Necrosis Factor)

VI.2.1. Récepteurs Trks ou récepteurs « Tropomyosin related kinase »

Trk est découvert lors du clonage d'un oncogène impliqué dans un cancer du côlon, qui contient les 7 premiers des 8 exons de la tropomyosine fusionnée avec les domaines transmembranaire et cytoplasmique d'une nouvelle tyrosine kinase (Martin-Zanca et al., 1986). Ce nouveau proto-oncogène fut logiquement nommé Tropomyosin-related kinase (Trk).

Trois types de récepteurs TrkA, TrkB, TrkC ont été identifiés. Les neurotrophines peuvent se lier spécifiquement à l'un des trois récepteurs (Figure 10). NGF se lie à TrkA, BDNF et NT 4/5 à TrkB et NT3 à TrkC (Kaplan and Miller, 1997; Klein et al., 1991; Lamballe et al., 1991). Il a été démontré que NT3 peut se lier à TrkA et TrkB avec une affinité faible, mais les principales réponses biologiques sont médiées par TrkC (Klein et al., 1993).

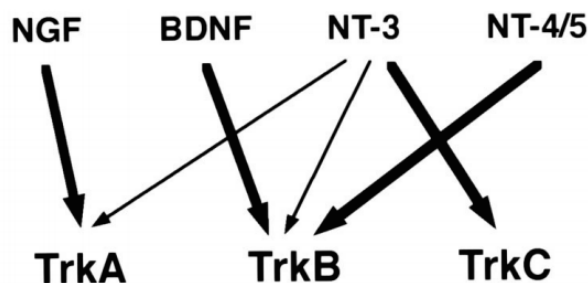


Figure 10 Interactions entre les neurotrophines et leurs récepteurs

D'après (Nakagawara, 2001) : TrkA est le récepteur du NGF, TrkB du BDNF et de NT-4/5, TrkC de la NT-3. NT3 peut se lier avec TrkA, TrkB.

L'arbre phylogénétique des Trk est semblable à celui des neurotrophines (Hallböök, 1999). Ainsi, des Trk ont été formés à partir d'un même gène ancestral ; *TrkA* (*NTRK1*) et *TrkC* (*NTRK3*) sont apparus à partir d'un même gène ancestral intermédiaire à la différence de *TrkB* (*NTRK2*), membre d'une autre branche.

Tableau 7 Caractéristiques des récepteurs des neurotrophines

Récepteur	Nom du gène	Localisation chromosomique	Nombre d'exons	Taille de l'ARNm	N° d'accension NCBI	PM (kDa)	N° d'accension swissprot
TrkA	NTRK1	1q21-q22	17	2663	NM_002529	140	P04629
TrkB	NTRK2	9q22.1	24	5608	NM_006180	145	Q16620
TrkC	NTRK3	15q25	20	2818	NM_002530	145	Q16288

Lors de leur maturation, les ARNm des Trk font l'objet d'un épissage alternatif qui aboutit à de nombreuses isoformes avec des fonctions biologiques différentes (Tableau 7) (Boeshore et al., 1999).

- TrkA existe sous trois isoformes principales, TrkA I, TrkA II, TrkA III (Figure 11).
- × TrkA I, dont l'ARNm est épissé au niveau de l'exon 9 est présent dans les cellules non-neuronales telles les cellules rénales ou pulmonaires (Barker et al., 1993)
- × TrkA II, issu d'un ARNm non épissé, est principalement exprimé dans les cellules neuronales. La conformation de cette isoforme n'affecte ni l'affinité de TrkA pour le NGF, ni la transduction du signal (Barker et al., 1993). Elle participe à la sélectivité de TrkA pour NT-3 (Clary and Reichardt, 1994).
- × TrkA III, dont l'ARNm a été épissé au niveau des exons 6, 7 et 9, a été identifié dans les neuroblastomes en condition d'hypoxie (Tacconelli et al., 2005). Cette forme possède un pouvoir oncogénique indépendant du ligand NGF.

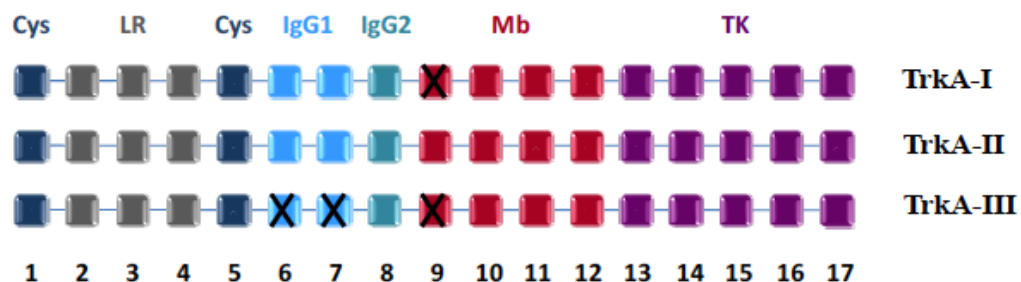


Figure 11 Les ARNm des isoformes de TrkA

L'ARNm de TrkA I est épissé au niveau de l'exon 9 (marquage par une croix), l'ARNm TrkA II est non épissé et l'ARNm de TrkA III épissé au niveau des exons 6, 7 et 9 (marquage par des croix). Cys : domaine riche en cystéine, LR : région riche en leucine, IgG1/2 : région immunoglobuline-like, Mb : domaine transmembranaire, TK : domaine intracellulaire

- TrkB : Parmi les 100 isoformes connues, seules trois formes sont principalement retrouvées chez l'humain (Figure 12) (Luberg et al., 2010):
 - × TrkB-FL (Full length ou TrkB entier ;145 kDa) contient un domaine kinase intracellulaire. L'ARNm de TrkB-FL est épissé au niveau des exons 16 et 19.
 - × TrkB-T1, d'expression ubiquitaire, est tronqué au niveau du domaine transmembranaire (codon stop au niveau de l'exon 16) et donc dépourvu d'activité tyrosine kinase (Stoilov et al., 2002). L'ARNm de TrkB-T1 donne l'isoforme la plus courte.
 - × TrkB-T-shc ou TrkB-T2 comprend un site de liaison à la protéine shc dans son domaine intracellulaire et est exprimé exclusivement au niveau du cerveau (Stoilov et al., 2002). L'ARNm correspondant à TrkB-T2 est épissé au niveau de l'exon 16 et se termine au niveau du codon 19.

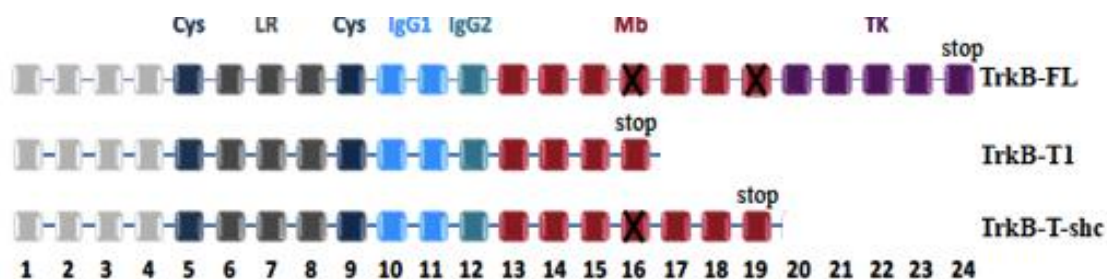


Figure 12 Les ARNm des isoformes de TrkB

L'ARNm de TrkB-FL (Full length) ou TrkB entier est épissé au niveau des exons 16 et 19. L'ARNm de TrkB-T1 donne l'isoforme le plus court (codon stop en 16). L'ARNm de TrkB-T-shc ou TrkB-T2 est épissé au niveau de l'exon 16 et se termine au niveau du codon 19

- TrkC existe sous trois isoformes (Nakagawara, 2001).
 - × TrkC-FL, considérée comme « normale », comporte un domaine intracellulaire à activité tyrosine kinase. Une de ces isoformes présente une insertion de 14 acides aminés dans le domaine kinasique.
 - × Il a été aussi décrit une forme non-catalytique TrkC-T1, dépourvue du domaine tyrosine kinase.

Les Trks ont une structure commune ; ils comportent généralement 3 domaines (**Figure 13**):

- Un domaine extracellulaire avec le site de fixation du ligand (environ 40 acides aminés) qui comporte deux domaines riches en cystéine encadrant trois domaines riches en leucine et deux domaines immunoglobuline-like,
- Un domaine transmembranaire unique relié à une séquence cytoplasmique,

- Une partie intracellulaire qui contient l'activité tyrosine kinase.

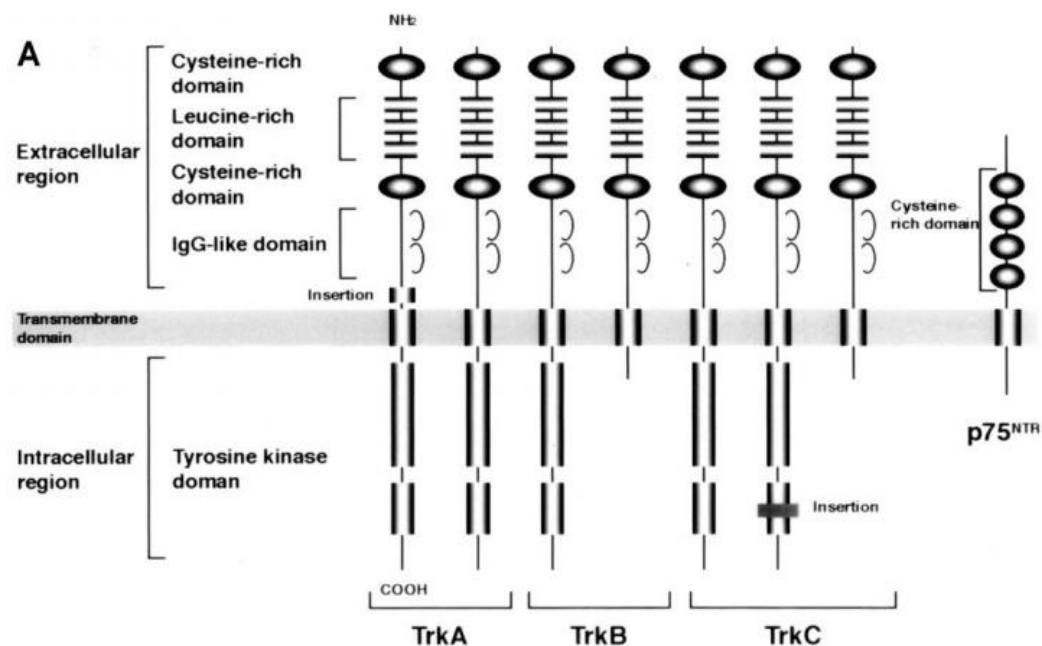


Figure 13 Représentation schématique des récepteurs Trk A, B et C.

Domaine extracellulaire : deux domaines riches en cystéine encadrant trois domaines riches en leucine suivis de deux domaines immunoglobuline-like, un domaine transmembranaire unique et une partie intracellulaire (Nakagawara, 2001)

VI.2.2. Récepteur p75^{NTR}

La protéine p75 a été initialement identifiée en 1973 comme étant le récepteur du NGF qui fut logiquement appelé p75^{NGFR} (NGF receptor) (Herrup and Shooter, 1973). Avec la découverte des autres membres de la famille des neurotrophines, il est apparu que p75^{NGFR} était un récepteur des neurotrophines de faible affinité présent dans tous les types cellulaires, d'où le nom p75^{NTR} (Neurotrophin Receptor) (Chao et al., 1986; Rodríguez-Tébar et al., 1992). En 2001, p75^{NTR} fut identifié comme récepteur des proneurotrophines avec une affinité 5 fois supérieure à celle mesurée pour les neurotrophines (Lee et al., 2001).

p75^{NTR} est composé (**Figure 14**):

- d'un domaine extracellulaire qui comporte des sites de N- et O- glycosylation et quatre domaines riches en cystéines (cystein-rich-domain), caractéristiques de la superfamille du récepteur du TNF
- d'un domaine transmembranaire
- d'une partie intracellulaire unique sans activité catalytique qui contient en C-terminal des domaines de mort cellulaire « Death Domain » (DD 1-6)

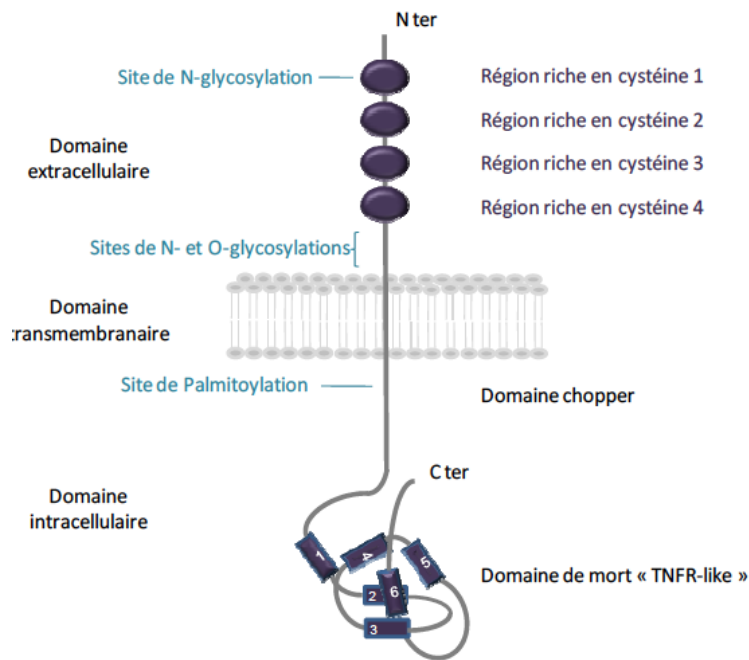


Figure 14 Représentation schématique la protéine p75^{NTR}

p75^{NTR} est un récepteur transmembranaire composé d'un domaine extracellulaire qui contient quatre domaines riches en cystéine, d'un domaine intracellulaire et d'un domaine intracellulaire contenant un domaine de mort (Roux and Barker, 2002).

Des formes tronquées de p75^{NTR} sont produites soit par épissage alternatif et soit par protéolyse (Roux and Barker, 2002) (Figure 15).

- L'épissage alternatif de l'ARNm génère une isoforme sans régions riches en cystéines qui ne peut fixer les neurotrophines.
- Le clivage de p75^{NTR} par une protéase extracellulaire entraîne la libération de deux fragments, un fragment extracellulaire composé des 4 régions riches en cystéines (p75-ECD) toujours capable de lier les neurotrophines et un fragment C-terminal (p75-CTF). Le clivage de p75-CTF par une sécrétase intracellulaire produit p75-ICD, un facteur de signalisation.

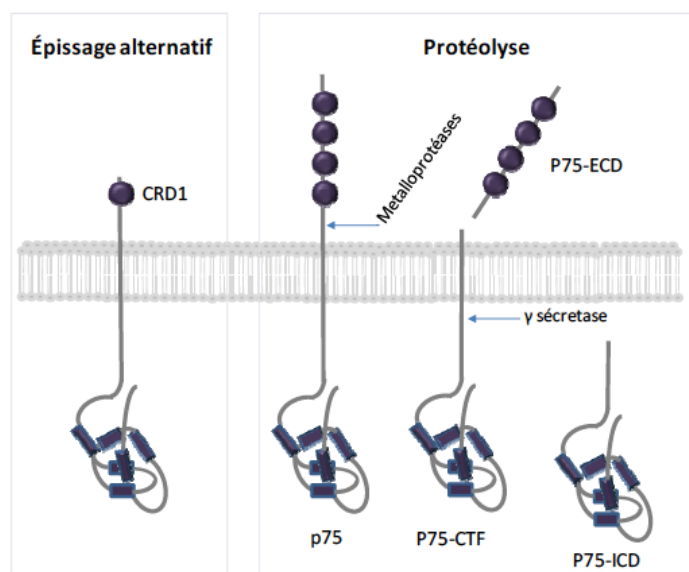


Figure 15 Les différentes formes du récepteur p75^{NTR}

Les formes sont générées soit par épissage alternatif soit par protéolyse. p75-ECD (Extracellular Domain), p75-CTF (C Terminal Fragment), p75-ICD (Intracellular Domain)

Le récepteur p75^{NTR} régule l'activité des récepteurs Trk. En présence de p75^{NTR}, NT3 présente une affinité moindre pour TrkA et TrkB, et NT4/5 une affinité moindre pour TrkB. La présence de p75^{NTR} augmente donc la spécificité de TrkA et TrkB pour leurs ligands primaires, NGF et BDNF (Huang and Reichardt, 2003). Ainsi, la spécificité des réponses neuronales aux neurotrophines peut être modulée par le type de récepteur, l'épissage différentiel et l'absence ou la présence de p75^{NTR}.

VI.3. Voies de signalisation médiées par Trk et p75^{NTR}

En présence de leur ligand, les récepteurs Trk se dimérisent dans une conformation compatible avec la trans-autophosphorylation du domaine tyrosine kinase (Huang and Reichardt, 2003). Les récepteurs Trk sont activés spécifiquement par les formes matures de la neurotrophine. Par ailleurs, les récepteurs Trk contiennent dans leur partie cytoplasmique plusieurs tyrosines supplémentaires qui sont autant de substrats d'autophosphorylation (Huang and Reichardt, 2003). Les principales voies activées par les récepteurs Trk sont Ras-Raf-MAPK, PI3K/Akt, PLCγ (Phospholipase C γ) et leurs effecteurs en aval (**Figure 16**).

L'activation médiée par les récepteurs Trk conduit à une variété de réponses biologiques, telles que la prolifération et la survie, la croissance et le remodelage des axones et des dendrites, l'assemblage et le remodelage du cytosquelette, le trafic membranaire et les modifications des fonctions synaptiques.

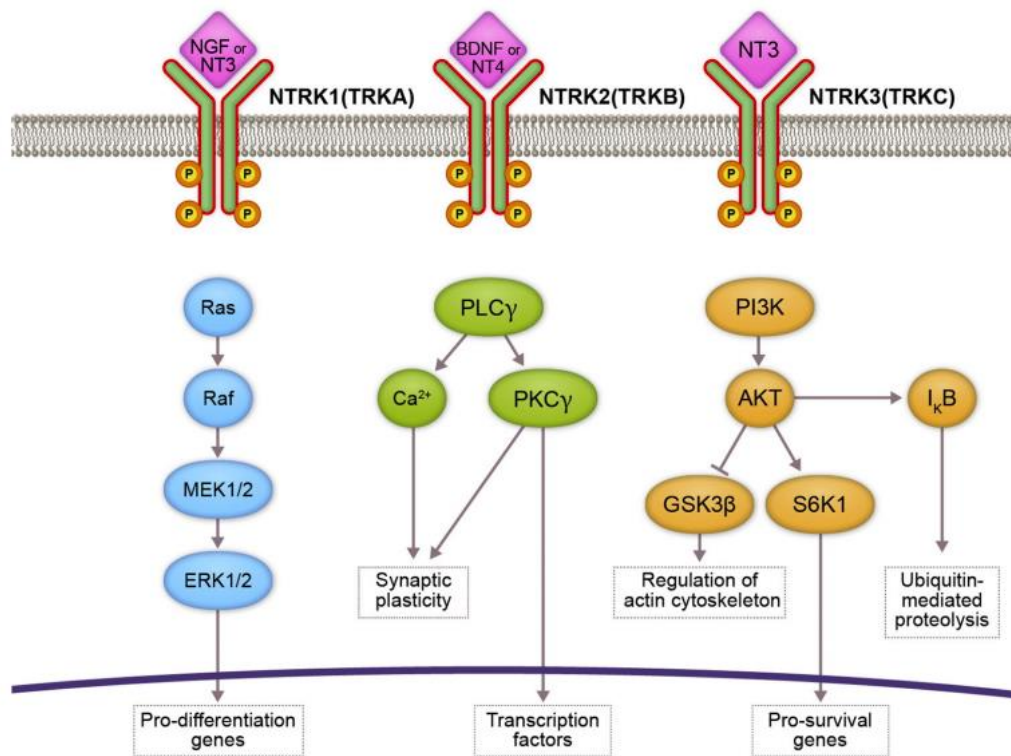


Figure 16 Représentation schématique des voies de transduction du signal à médiation par le récepteur Trk

D'après Khotskaya et al. (Khotskaya et al., 2017)

La liaison des neurotrophines aux récepteurs Trk conduit au recrutement de protéines interagissant avec des résidus phosphotyrosines spécifiques dans les domaines cytoplasmiques des récepteurs Trk. Ces interactions déclenchent l'activation de voies de signalisation, telles que Ras, PI3-kinase et PLC les voies métaboliques et aboutissent finalement à l'activation de l'expression des gènes, à la survie et à la croissance neuronales.

Comme les autres membres de la famille des récepteurs du TNF, $p75^{\text{NTR}}$ ne possède pas d'activité catalytique propre. De ce fait, la signalisation de $p75^{\text{NTR}}$ s'effectue par le recrutement de protéines adaptatrices intracellulaires menant à l'activation de diverses voies de signalisation (**Figure 17**). Les voies de signalisation, aboutissent selon le contexte cellulaire, à la survie ou la mort cellulaire par apoptose et à la réduction de la migration. En outre, une communication croisée a été rapportée entre les récepteurs Trk et $p75^{\text{NTR}}$ (**Figure 17**) (Huang and Reichardt, 2003).

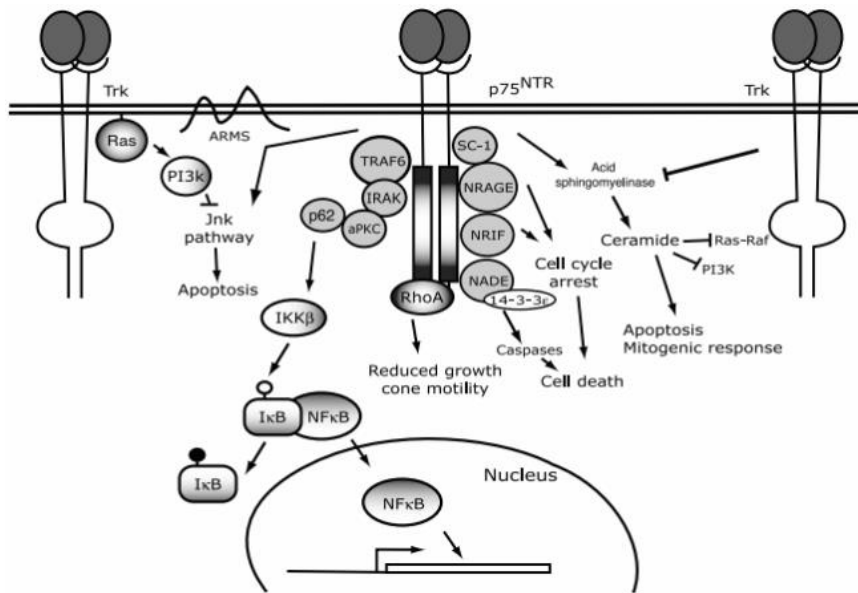


Figure 17 Représentation des voies de transduction du signal médiées par p75^{NTR}

p75^{NTR} interagit avec les protéines qui initient des voies de signalisation de survie, de mort, un arrêt du cycle cellulaire, la neuritogenèse ou la migration cellulaire. La liaison de neurotrophines à p75^{NTR} a également été montrée pour activer la voie Jnk, qui peut être inhibée par l'activation de la voie Ras-PI 3-kinase par les récepteurs Trk (Huang and Reichardt, 2003) .

VI.4. Fonctions physiologiques et pathologiques des neurotrophines

VI.4.1. Fonctions physiologiques des récepteurs Trks dans le système nerveux

Afin d'évaluer le rôle spécifique des neurotrophines et de leurs récepteurs dans le développement du système nerveux, des expérimentations ont été menées sur les souris Knockout (KO) homozygotes.

Souris KO pour TrkA

Les souris n'exprimant pas le gène TrkA sont viables à la naissance mais meurent dans le premier mois. Elles présentent une perte importante de cellules neuronales dans les ganglions sympathiques, la racine dorsale et le ganglion trijumeau. L'axe passant TrkA joue donc un rôle crucial dans le développement du système nerveux nociceptif (Smeyne et al., 1994).

Souris KO pour TrkB, NT-4/5 et le BDNF

Les souris KO pour TrkB se développent à la naissance mais les animaux ne montrent pas d'activité alimentaire, et la plupart meurent de faim. L'examen neuro-anatomique a révélé des déficiences neuronales dans les systèmes nerveux central (noyau moteur facial et moelle épinière) et périphérique (ganglions trigéminals et ganglions de la racine dorsale).

L'axe passant TrkB semble jouer un rôle dans le développement précoce des neurones sensoriels impliqués dans la perception tactile et le système nerveux central (Klein et al., 1993).

L'abolition de BDNF provoque de graves déficiences dans la coordination et l'équilibre, associées à une dégénérescence neuronale dans plusieurs ganglions sensoriels, y compris le ganglion vestibulaire (Ernfors et al., 1994a).

Les souris déficientes en NT4 sont viables avec un développement adulte normal mais présentent une perte de neurones sensoriels. Chez les souris dépourvues à la fois de NT-4/5 et de BDNF, la perte de neurones sensoriels est plus sévère qu'avec chaque mutation seule (Liu et al., 1995).

Souris KO pour l'axe TrkC

Les souris mutantes présentent de graves défauts dans les mouvements des membres, et la plupart meurent peu de temps après la naissance. Une partie des neurones sensoriels et sympathiques périphériques a été perdue chez les souris KO alors que les motoneurones n'étaient pas affectés. L'axe passant par TrkC participe donc à la formation de la proprioception (Ernfors et al., 1994b).

Souris KO pour p75^{NTR}



Les souris KO pour p75^{NTR} restent viables et fertiles mais présentent une diminution de l'innervation sensorielle associée à une perte neurale (Lee et al., 1992). p75^{NTR} induit la survie ou la mort dans les populations neuronales définies et grâce à des ligands spécifiques (Teng and Hempstead, 2004).

VI.4.2. Fonctions pathologiques des Récepteur Trks dans le système nerveux central **Récepteur Trks, neuroblastome et médulloblastome**

Le neuroblastome, tumeur du système nerveux périphérique, représente 10% des tumeurs solides chez l'enfant. Il est soit « à risque faible » et de bon pronostic et peut spontanément régresser, soit « à risque élevé » et de mauvais pronostic caractérisé par une amplification de *MYCN* (Brodeur, 2003, 2018) (**Tableau 8**). *MYCN* ou *N-myc* fait partie de la famille des facteurs de transcription MYC qui participent à la régulation de nombreux processus cellulaires comme la survie, la prolifération et la différenciation (Ruiz-Pérez et al., 2017).

- Une expression élevée de TrkA est associée à des caractéristiques favorables, tels un âge jeune, un stade précoce de la maladie, une absence d'amplification de *MYCN* et à un bon pronostic. A l'inverse, une faible expression de TrkA associée à une amplification de *MYCN* est retrouvée dans les tumeurs de mauvais pronostic (Nakagawara et al., 1992). Ces résultats suggèrent que TrkA joue un rôle dans la régression ou la différenciation des neuroblastomes (Kramer et al., 1997). L'isoforme TrkA III, spécifiquement mis en évidence dans les neuroblastomes, est capable de s'autoactiver et d'antagoniser les fonctions des autres isoformes de TrkA, augmentant ainsi la tumorigenèse et l'angiogenèse *in vivo* (Tacconelli et al., 2005).
- TrkB et son ligand BDNF sont fortement exprimés dans les neuroblastomes de pronostic défavorable et sont fréquemment associés à une amplification de *MYCN* (Nakagawara et al., 1994). TrkB est associé à une invasion cellulaire, des métastases, une résistance aux médicaments, et une expression des facteurs angiogéniques (Ho et al., 2002).
- TrkC est exprimé de façon prédominante sans amplification de *MYCN* dans les neuroblastomes biologiquement favorables (Yamashiro et al., 1996).

Le médulloblastome est une tumeur maligne sous-tentorielle de la région postérieure de l'encéphale, fréquente chez l'enfant. Dans ces tumeurs, l'activation de TrkC est prépondérante : elle est caractéristique d'un bon pronostic par induction de l'apoptose (Grotzer et al., 2000; Segal et al., 1994) (**Tableau 8**).

Tableau 8 Synthèse du pronostic des tumeurs de l'enfant en fonction de l'expression des récepteurs Trk

	Pronostic	TrkA	TrkB	TrkC
Neuroblastome	Favorable	↑ + absence d'amplification <i>MYCN</i>	ND	↑ + absence d'amplification <i>MYCN</i>
	Défavorable	↓ + amplification <i>MYCN</i> ↑ isoforme <i>TrkAIII</i>	↑ + amplification <i>MYCN</i>	ND
Médulloblastome	Favorable	ND	ND	↑
	Défavorable	ND	ND	↓

ND : non documenté ; ↑ : niveau d'expression élevée ; ↓ : faible niveau d'expression

Récepteur Trks et tumeurs gliales

Parallèlement, compte tenu de l'expression physiologique des Trks dans le système nerveux et des résultats obtenus dans les neuroblastomes et les médulloblastomes, l'expression des Trks a été étudiée dans les tumeurs gliales de l'adulte.

Dès 1998, Wang et al. ont montré une expression de TrkA, TrkB, TrkC dans les astrocytomes contrairement aux oligodendrogliomes mais aucune corrélation significative entre l'expression des Trks et le grade histologique, l'âge et le sexe n'avait été retrouvée (Wang et al., 1998). Wadhwa et al., dans une population restreinte (n = 10), ont observé une corrélation inverse entre l'expression des récepteurs et le grade tumoral et ont fait l'hypothèse qu'une surexpression de Trk pourrait contribuer à la progression des formes précoces vers des formes plus agressives. Dans les formes avancées, il y aurait une régulation négative des deux récepteurs TrkA et TrkB (Wadhwa et al., 2003).

Assimakopoulou confirme que les récepteurs TrkA, TrkB et TrkC (indépendamment du grade) sont retrouvés dans les astrocytomes et suggère un mécanisme potentiel de transformation maligne dans les astrocytomes de bas grade (Assimakopoulou et al., 2007).

Gliomes, TrkA et NGF

Wadhwa et al suggèrent qu'une expression de TrkA liée à une tumeur de bas grade contribuerait à leur progression vers des formes plus agressives (Wadhwa et al., 2003). Ces résultats sont confortés par les données de Moser et al. qui ont démontré que NGF a une activité proliférative dans les cellules endothéliales du cerveau et qu'une activation de la voie NGF/TrkA participerait à la croissance des cellules de gliome (Moser et al., 2004).

Dans la lignée cellulaire C6 issue de gliomes, NGF induit une inhibition de la croissance et une activation de la différenciation cellulaire (Kimura et al., 2002; Pflug et al.). L'inhibition cellulaire par NGF est activée par un mécanisme d'autophagie (Hansen et al., 2007).

Gliomes, TrkB et BDNF

TrkB et son ligand BDNF sont exprimés dans la lignée C6 issus de gliomes murins et au sein de tissus astrocytaires (Assimakopoulou et al., 2007; Wadhwa et al., 2003; Wang et al., 1998; Xiong et al., 2013a, 2013b, 2015).

Contrairement à Wadhwa (Wadhwa et al., 2003), Xiong et al. ont montré que les taux de TrkB et de son ligand sont élevés dans les gliomes de haut grade (vs bas grade vs contrôle) (n= 42) et dans les lignes cellulaires issus de gliomes murins (C6). TrkB et son ligand sont aussi associés avec p75^{NTR} et la sortiline (Xiong et al., 2013b, 2015).

Ces résultats sont en accord avec ceux publiés par Teng et al. qui avaient montré que pro-BDNF induisait une apoptose neuronale via l'activation d'un complexe associant le récepteur de p75^{NTR} et la sortiline (Teng et al., 2005).

Dans les vaisseaux du tissu normal, il n'est pas retrouvé de TrkB à la différence de ceux situés à proximité des glioblastomes. Ainsi, l'expression du récepteur TrkB détecté dans l'endothélium des vaisseaux tumoraux peut être une composante importante de la cascade angiogénique requise pour l'évolution des tumeurs astrocytaires (Assimakopoulou et al., 2007).

L'activation des récepteurs TrkB et TrkC améliore la viabilité cellulaire par l'activation des voies ERK et Akt (Lawn et al., 2015).

Gliomes et TrkC

TrkC est un récepteur de dépendance et, en tant que tel, induit la mort apoptotique avec intervention de la caspase en l'absence de NT-3 dans les cellules immortalisées (cultures primaires HEK293T). A l'inverse, l'activité pro-apoptotique est inhibée par la présence de NT-3 (Tauszig-Delamasure et al., 2007).

Récemment notre équipe a montré l'expression de TrkC et NT-3 dans des lignées cellulaires issus de GBM (U87MG, M059K, M059J et LN-18). Une augmentation significative de TrkC-FL, TrkC-T1 et de NT-3 a été observée dans les cellules U87MG cultivées en hypoxie avec une augmentation de la phosphorylation (Jawhari et al., 2017).

Tableau 9 Synthèse de l'expression des récepteurs Trk dans les gliomes

	TrkA	TrkB	TrkC
Expression dans les gliomes	Oui	Oui	Oui
Liée au grade	Oui	Contradictoire	Oui
	↑ Bas grade ↓ Haut grade (Wadhwa et al., 2003; Wang et al., 1998)	↑ Bas grade - ↓ Haut grade (Wadhwa et al., 2003) ↓ Bas grade - ↑ Haut grade (Xiong et al., 2015) Indépendant (Assimakopoulou et al., 2007; Wang et al., 1998)	↓ Bas grade ↑ Haut grade (Jawhari et al., 2017; Wang et al., 1998)
Expression dans les astrocytomes	Oui (Assimakopoulou et al., 2007; Wadhwa et al., 2003; Wang et al., 1998)	Oui (Assimakopoulou et al., 2007; Wadhwa et al., 2003; Wang et al., 1998; Xiong et al., 2013b, 2013a, 2015)	Oui (Jawhari et al., 2017; Wang et al., 1998)
Expression dans les oligodendrogliomes	Non (Wang et al., 1998)	Non (Wang et al., 1998)	Non (Wang et al., 1998)
Association à d'autres récepteurs	p75 ^{NTR}	p75 ^{NTR} /Sortiline	p75 ^{NTR}
Action		Contradictoire	Contradictoire

↑ : niveau d'expression élevée ; ↓ : faible niveau d'expression

Gliomes et p75^{NTR}

p75^{NTR} joue un rôle essentiel dans la capacité de migration et d'infiltration et ce de manière dépendante des neurotrophines (Ahn et al., 2016; Giraud et al., 2011; Johnston et al., 2007; Wang et al., 2008, 2015).

Xiong et al. montrent que le pro-BDNF endogène lié à p75^{NTR} et la sortiline inhibent la croissance et la migration des cellules de gliome (Xiong et al., 2013b). Ces données sont en apparence contradictoires avec des études précédentes (Johnston et al., 2007; Wang et al., 2015).

La fonction de p75^{NTR} dans la migration des cellules dépend du ligand. La liaison de p75^{NTR} aux neurotrophines matures induit une invasion cellulaire (Johnston et al., 2007). En revanche, lorsque la pro-neurotrophine, le pro-BDNF, se lie à p75^{NTR} et à la sortiline, elle agit comme un suppresseur de tumeur en inhibant la migration et l'infiltration cellulaire (Xiong et

al., 2013b). Ces résultats sont en accord avec ceux publiés par Teng et al. qui avaient montré que pro-BDNF induisait une apoptose neuronale via l'activation d'un complexe récepteur de p75^{NTR} et de sortiline (Teng et al., 2005).

Les cellules souches cancéreuses (CSC), expriment p75^{NTR} comme les autres récepteurs aux neurotrophines et leurs ligands (Forsyth et al., 2014). L'inhibition de p75^{NTR} par siRNA ou l'absence de clivage par les sécrétases diminue la prolifération des cellules initiatrices de tumeurs cérébrales. Inversement, une stimulation par NGF exogène stimule leur prolifération via le clivage de p75^{NTR} libérant le domaine intracellulaire (Forsyth et al., 2014; Wang et al., 2008).

Nos travaux ont permis de mettre en évidence le transfert des récepteurs des neurotrophines via des microvésicules circulantes, les exosomes. Ce transfert de récepteurs oncogéniques entre cellules permettrait aux cellules les plus agressives d'exercer un contrôle et de conférer leur agressivité aux autres cellules du microenvironnement. Ce mécanisme de dissémination de l'agressivité tumoral dépend des exosomes qui constituent donc une source de biomarqueurs circulants.

Chapitre VII. Application des exosomes en cancérologie

VII.1. Communication extracellulaire par vésicules

Au sein de l'équipe, il a été montré que l'expression de CHI3L1 et de TrkB a été détectée dans le sang, dans des nanovésicules, appelés exosomes, qui, par la communication intercellulaire, participent au processus de tumorigenèse (Pinet et al., 2016).

Le terme « exosome » est proposé en 1981 pour désigner des vésicules de 40-120 nm de diamètre à activité nucléotidase, sécrétées par différents types cellulaires et ayant une composition lipidique différente de la membrane plasmique suggérant une origine différente et plus complexe qu'un simple bourgeonnement membranaire (Trams et al., 1981). Une origine endocytaire est finalement proposée pour expliquer la formation des exosomes.

Depuis, de nombreuses appellations ont été proposées, en fonction du contexte et du type cellulaire étudié : corps apoptotiques, vésicules de bourgeonnement, microvésicules, oncosomes, exosomes, ectosomes...

Un consortium international a finalement adopté un terme générique englobant tous ces termes sous le nom de vésicules extracellulaires (Extracellular Vesicles, EVs) et trois grandes classes d'EVs sont formellement reconnues : les exosomes, les microvésicules et les corps apoptotiques.

Les exosomes contiennent des protéines, des lipides et des acides nucléiques (ADN, ARN et microARN) et sont caractérisés par des marqueurs protéiques tels que les tétraspanines CD63 et CD9, Alix, TSG101, HSP90 (Heat Shock Protein) (**Figure 18**). Une base de données , « Exocarta » (<http://www.exocarta.org/>), répertorie toutes ces données.



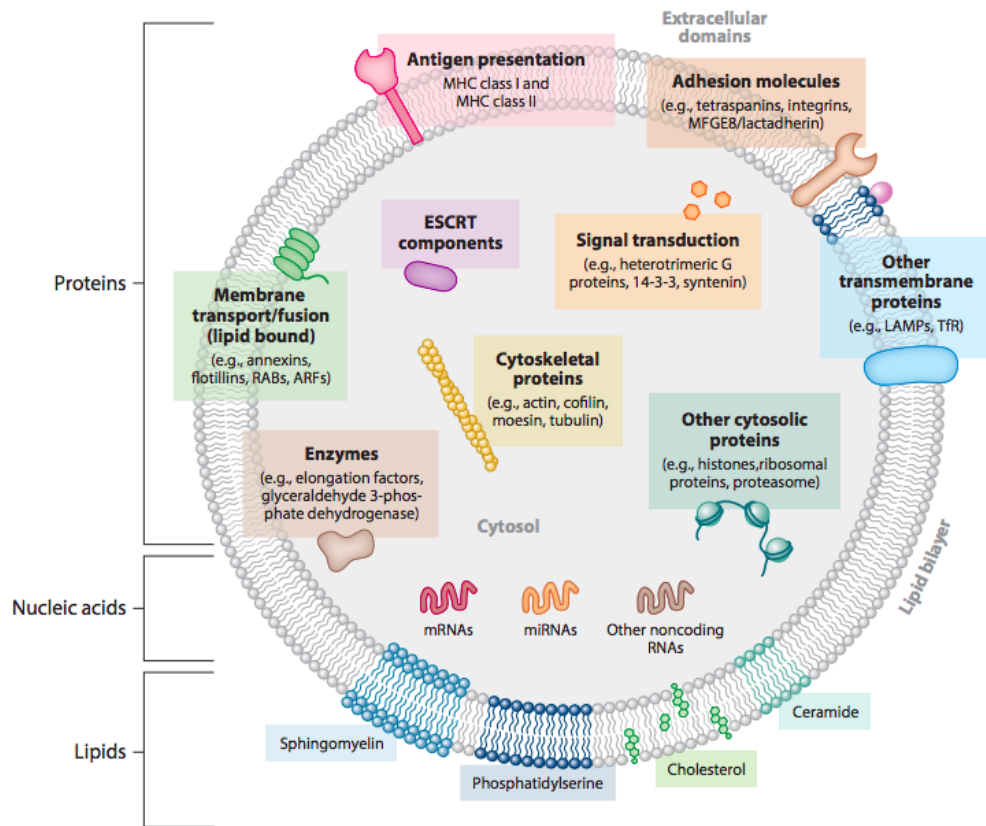


Figure 18 Représentation schématique de la composition des vésicules extracellulaires
 D'après Colombo et al. (Colombo et al., 2014)

La biogenèse des exosomes se déroule en trois grandes étapes (**Figure 19**): (1) la maturation d'un endosome précoce en endosome tardif avec une accumulation de vésicules intraluminales (ILVs) dans les endosomes ou compartiments multi-vésiculaires internes (MVB), (2) des invaginations de la membrane des MVB qui conduit à la formation de vésicules intraluminales, (3) la fusion des MVBs et de leurs contenus avec le lysosome induisant leurs dégradations ou avec la membrane plasmique, libérant leurs contenus dans le milieu extracellulaire.

Les exosomes sont être produits par tout type cellulaire *in vitro* et sont retrouvés dans des fluides biologiques tels que le sang, l'urine, la salive ou le liquide céphalo-rachidien (Colombo et al., 2014).

Les exosomes sont responsables du transfert de différentes molécules d'une cellule à une autre, comme les protéines, les enzymes, les ligands, les récepteurs, l'ADN, les ADN complémentaires (ADNc), les ARNm ou les microARN (miR) (Colombo et al., 2014).

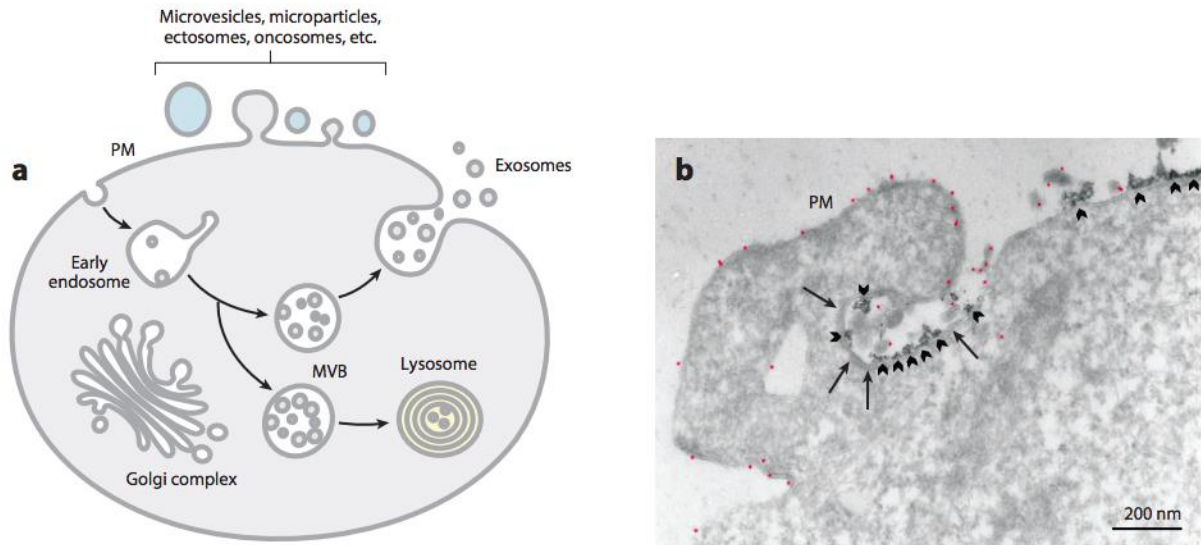


Figure 19 Représentation schématiques de vésicules sécrétées

(a) Représentation schématique des vésicules membranaires libérées par les cellules eucaryotes, soit par bourgeonnement direct de la membrane plasmique (PM) (microvésicules), soit par fusion de compartiments multi-vésiculaires internes (MVB) avec la PM (exosomes)
 (b) Image en microscopie électronique de la fusion d'un MVB avec le PM (flèches)(Colombo et al., 2014)

VII.2. Fonction des exosomes dans les gliomes

Les EVs ont la capacité de communiquer entre les différents compartiments du microenvironnement tumoral et influencent finalement les cellules voisines. Dans le cancer du sein, il a été observé que les EVs peuvent libérer des microARN (miARN) qui reprogramment le transcriptome de la cellule cible en inhibant les ARNm spécifiques ce qui conduit à la transformation des cellules épithéliales en cellules tumorales (Melo et al., 2014).

Les gliomes étant isolés de la circulation systémique par la barrière hémato-encéphalique, ils ne libèrent pas de cellules tumorales circulantes et donc pas de biomarqueurs détectables associés à ce processus, contrairement à d'autres pathologies cancéreuses. Le changement du microenvironnement en modifiant le phénotype des cellules de support environnantes ce qui favorise la progression et l'invasion tumorales (Gourlay et al., 2017). L'incubation de cellules avec des EVs dérivés de GBM de profil mésenchymateux produit effectivement un changement phénotypique des cellules monocytaires (modification des protéines de surface cellulaire, de la sécrétion de cytokine modifiée...) (de Vrij et al., 2015).

Les ARNm et les protéines concentrés dans les EVs issues de GBM sont transférés aux cellules du microenvironnement tumoral et modifient leur biologie (Skog et al., 2008). Ceci est notamment le cas pour le variant tronqué du récepteur à l'EGF (EGFRvIII) qui, transféré à

des cellules de glioblastome dépourvues de ce récepteur, permet l'activation des voies de signalisation passant par les MAPK et AKT (Al-Nedawi et al., 2008).

Les ARNm dérivés de EVs des glioblastomes sont distingués de ceux des EVs dérivés de cellules saines par rétrocontrôle négatif de certains gènes (Noerholm et al., 2012). A l'inverse, certains ARNm sont surexprimés comme miR-21 (Akers et al., 2013; Noerholm et al., 2012).

Sur la base d'études *in vitro* et *in vivo*, il a été démontré que les exosomes libérés par les cellules cancéreuses hypoxiques sont impliqués dans le développement et la progression des GBM et stimuler l'angiogenèse de ces derniers (Kucharzewska et al., 2013).

Les exosomes ont été isolés à partir d'échantillons sanguins et du liquide céphalo-rachidien (LCR) de patients atteints de gliomes, ce qui met en évidence que les exosomes sont capables de franchir la barrière hémato-encéphalique et de passer dans la circulation sanguine (Gonda et al., 2013). L'isolement des EVs à partir de sang ou de LCR pourrait être effectué plusieurs fois au cours du traitement d'un patient et pourrait servir de source de biomarqueurs. Ainsi, des marqueurs EGFRvIII, IDH1/IDH2 et miR-21 ont déjà été identifiés dans le sang (Gonda et al., 2013; Gourlay et al., 2017).

Dans des travaux précédents du laboratoire, nous avons mis en évidence que TrkB via les EVs contribue au transfert d'agressivité dans le cancer du poumon et les glioblastomes (Pinet et al., 2016; Wilson et al., 2014). Dans le cancer du poumon, la sortiline, transférée par les exosomes, contrôle les cellules endothéliales et active l'angiogenèse en agissant avec TrkB et l'EGFR (Vincent et al., 2015; Wilson et al., 2014). Dans les GBM, le transfert de TrkB, via les exosomes de GBM, module l'agressivité des cellules inactivées pour CHI3L1 (Pinet et al., 2016).

OBJECTIFS DE LA THESE

De ces constats relevés par cet état de l'art, nous devons retenir 7 points:

- Les gliomes sont des tumeurs cérébrales primitives présentant une hétérogénéité cellulaire et peu de critères diagnostiques indiscutables sont pris en compte ce qui rend leur diagnostic et leur prise en charge particulièrement difficiles. Ainsi peu d'avancées thérapeutiques ont été notées au cours de cette dernière décennie.
- Depuis la classification OMS 2016, les profils d'altérations moléculaires (mutation *IDH*, codéletion 1p19q, mutation *ATRX*, mutation *TP53*) sont intégrés dans la prise en charge diagnostique et thérapeutique des patients.
- Malgré la contribution majeure de cette classification, la prise en charge des patients n'est que partiellement améliorée. En effet, la survie des patients avec un gliome de bas grade *IDH*-wt peut être similaire à celle des patients avec un glioblastome *IDH*-wt. A l'inverse, des patients peuvent avoir une survie très longue au sein d'une même population *IDH*-wt, alors même que cette dernière est considérée de très mauvais pronostic. Il est donc nécessaire de préciser le profil moléculaire de ce sous-groupe.
- Depuis plusieurs années, de nombreux travaux de recherche fondamentale et/ou appliquée ont permis de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques de l'oncogenèse d'identifier de nouveaux marqueurs spécifiques des gliomes. Ces marqueurs sont en général des altérations moléculaires (génomiques, génétiques, épigénétiques, transcriptomiques ou protéomiques...).
- Parmi les marqueurs, les gènes, *KLRC3* et *CHI3L1*, impliqués dans des glycosignatures présentent un intérêt certain. Si le rôle de *KLRC3* reste encore à établir dans la gliomagenèse, celui de *CHI3L1* est mieux défini. Il est impliqué dans la radio-résistance, est un facteur de mauvais pronostic avec une expression élevée dans les glioblastomes.
- Par ailleurs, les neutrophines et leurs récepteurs appartiennent à une famille de protéines dont l'intérêt en tant que biomarqueurs est actuellement reconnu dans de nombreux cancers. Deux membres semblent particulièrement prometteurs : p75^{NTR} et TrkB. Il a été montré que p75^{NTR} surexprimé est associé à un groupe de gliomes de mauvais pronostic et qu'il est impliqué dans la prolifération de cellules souches, l'invasion et de l'agressivité tumorale des tumeurs gliales. Nous avons vu que le rôle de TrkB reste un sujet de controverse.
- Si classiquement, les analyses moléculaires utilisent souvent des tissus issus d'une biopsie chirurgicale, elles ne permettent pas toujours d'appréhender l'hétérogénéité cellulaire de la tumeur d'origine et ne reflètent alors que partiellement cette dernière.



Il est donc utile de développer un test diagnostique et pronostic non invasif afin d'assurer une meilleure prise en charge des patients. Dans le cas des gliomes, les exosomes sont représentatifs de la tumeur d'origine et pourraient ainsi aider à leur prise en charge.

De ces observations émergent plusieurs questions fondamentales :

1. Peut-on identifier de nouveaux biomarqueurs par une nouvelle signature moléculaire des gliomes, qui pourraient être intégrés dans la classification actuelle ?
2. Les marqueurs moléculaires peuvent-ils être analysés en routine en immunohistochimie ? Leur niveau d'expression génique est-il dans ce cas similaire à leur expression protéique ?
3. Les marqueurs moléculaires peuvent-ils être mis en évidence dans les exosomes et participer au diagnostic différentiel des gliomes ?

Pour tenter de répondre à ces questions, le projet a été divisé en 3 axes qui comportent les objectifs décrits:

1^{er} axe : Diagnostic moléculaire d'une signature des gliomes par analyse génomique

1. Analyse de l'expression différentielle de 92 gènes selon le grade tumoral par TaqMan-Low Density Array (TLDA) dans des gliomes de patients des CHU de Limoges et de Montpellier (1993-2012).
2. Analyse bio-informatique du clustering hiérarchique
3. Validation par des cohortes indépendantes (TCGA et REMBRANDT).
4. Corrélation des données obtenues avec les données clinico-pathologiques.

2^{ème} axe : Analyse protéique des biomarqueurs les plus pertinents

1. Analyse immunohistochimique au moyen de « tissue microarray » à partir des gliomes de l'axe 1.
2. Corrélation entre les données protéiques et génomiques.

3^{ème} axe : Application clinique par l'utilisation d'exosomes

1. Élaboration d'un protocole de recherche clinique pour un essai prospectif multicentrique (Bordeaux, Montpellier, Poitiers, Limoges) d'analyse des exosomes
2. Analyse des biomarqueurs au sein des exosomes

MATERIELS ET METHODES



Chapitre I. Constitution d'une banque de prélèvements

I.1. Collection d'échantillons tissulaires

Les patients, diagnostiqués pour une tumeur cérébrale primitive, ont été sélectionnés entre 1993 et 2012 après consultation des dossiers médicaux, de la base de données (DIAMIC®) du service d'Anatomie Pathologique du CHU de LIMOGES et de la base de données du service d'Anatomie Pathologique du CHU de MONTPELLIER.

Les critères d'inclusion sont un âge minimum de 18 ans et la disponibilité des données cliniques et de survie. Les données cliniques ont été regroupées dans un questionnaire standardisé comprenant les caractéristiques du patient, l'histoire de la maladie, la prise en charge initiale, les données anatomopathologiques et la fin de la prise en charge (**Annexe 1-Grille de recueil de données cliniques, radiologiques et histologiques**).

Les échantillons tumoraux étaient initialement des biopsies et/ou des pièces opératoires. Une partie de chaque échantillon a été congelée dans l'azote liquide et conservé à -80°C dans la «Plate-forme Tumorotheque-Oncogénétique» et ce jusqu'à utilisation. Une autre partie a été fixée dans une solution de formol-zinc (formaldéhyde 30%, chlorure de sodium 9 g/L, sulfate de zinc 3 g/L) et inclus en paraffine.

Pour l'analyse immunohistochimique, des coupes de tumeur (sections de 4 µm) ont été colorées par l'hématoxyline-phloxine-safran (HPS).

Un tissu cérébral issu du parenchyme cérébral d'une métastase du cancer du sein d'une femme de 50 ans a été utilisé comme témoin. Seul le tissu situé le plus loin de la métastase a été conservé et une analyse histologique a été réalisée pour confirmer l'absence de tissu tumoral.

Le diagnostic anatomopathologique a été effectué selon les classifications de 2016 et a été établi en double lecture par le Pr. Labrousse (responsable des collections de Limoges) et le Dr Duchesne (CHU de LIMOGES) et par les Pr. Rigau (responsable de collection de Montpellier) et Lehmann (responsable du CRB-CHUM).

I.2. Collection de plasma de patients

Une collection prospective de plasma de patients atteints de gliomes a été constituée en collaboration avec le service de neurochirurgie du CHU de LIMOGES. Des échantillons de sang (2 tubes EDTA de 5-7 ml chacun/patient) provenant de patients avec une suspicion de



tumeur gliale sont prélevés avant la chirurgie et/ou après chirurgie. Une lettre d'information a été remise systématiquement au patient et son consentement éclairé recueilli. Dans les 2 heures suivant le prélèvement, le plasma a été récupéré par centrifugation à 2000 g pendant 15 min et conservé à -80°C. Des échantillons sanguins de contrôle ont été recueillis sur des bénévoles en bonne santé appariés en âge à chaque patient.

I.3. Déclaration d'éthique

Tous les échantillons ont été utilisés conformément aux lois françaises sur la bioéthique concernant les informations sur les patients et leur consentement. Les blocs ont été obtenus auprès de la Biobanque tumorale (CRBiolim) du CHU de Limoges, après approbation du projet de recherche par le comité institutionnel (AC-2013-1853, DC-2011-1264) et du centre de ressources biologiques de l'Hôpital Universitaire de Montpellier (CRB-CHUM ; <http://www.chu-montpellier.fr>; Biobank ID: BB-0033-00031).

Le protocole de recueil des plasmas de patients a été validé par le comité d'éthique du CHU de Limoges (Référence: 141-2014-08.3).

Chapitre II. Analyse transcriptomique

II.1. Extraction d'ADN

La nature et la densité tumorale des échantillons tumoraux ont été contrôlées après coupe au cryostat de 4 µm d'épaisseur et coloration par l'HPS.

Les tissus (4 à 40 mg) ont été pulvérisés avec des billes en céramique CK14 (Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France) dans un tampon de lyse (QiaZol, Lysis Reagent, Qiagen®, Courtabœuf, France), à l'aide d'un broyeur par oscillation (Précellys24®, Ozyme), selon le protocole du fournisseur.

L'extraction des ARN repose sur une chromatographie échangeuse d'ions réalisée à température ambiante, en utilisant le Kit RNeasy® Lipid Tissue Mini (prélèvements > 10 mg) ou Micro (Qiagen®) (prélèvements <10 mg).

La pureté et la concentration des ARN ont été déterminées par spectrophotométrie Nano-drop ND-1000 UV-Vis Spectrophotomètre (Labtech, Palaiseau, France). Les densités optiques (DO) ont été mesurées à 260 nm (acides nucléiques) et 280 nm (protéines). La pureté est correcte si le ratio (DO260/DO280) se situe entre 1,8 et 2.

L'intégrité des ARN a été contrôlée par électrophorèse capillaire sur puce (RNA 6000 Nano Kit, Bioanalyzer 2100, Agilent Technologies, Massy, France). Chaque échantillon est caractérisé par le ratio 28S/18S et un nombre d'intégrité d'ARN ou RIN (RNA Integrity Number)(Schroeder et al., 2006). Les ARN extraits avaient une concentration moyenne de 430,5 ng/µL (81-1832 ng/µL), un ratio DO260/280 compris entre 1,8 et 2 et une moyenne des RIN de 6,5.

La rétrotranscription a été réalisée à partir de 1 µg d'ARN totaux, à l'aide du High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit® (Life Technologies, Saint Aubin, France) selon le protocole du fabricant. La réaction comporte une étape d'hybridation (10 min à 25°C) suivie d'une étape d'élongation (2h à 37°C) et d'une étape de dénaturation (5 min à 85°C). Les ADNc obtenus ont été stockés à -80°C jusqu'à utilisation.

II.2. Analyse transcriptomique différentielle par TaqMan Low Density array

L'analyse transcriptomique différentielle par TaqMan Low Density array (TLDA) repose sur l'analyse simultanée par PCR en temps réel des niveaux d'expression de plusieurs gènes grâce à l'utilisation de sondes TaqMan® spécifiques, comparables à celles utilisées en



qPCR. Ces sondes sont marquées avec un «rapporteur» fluorescent fixé en 5' dont l'émission de fluorescence est inhibée par la proximité d'un bloqueur («quencher») en 3'. Lorsque la sonde s'hybride correctement sur sa cible d'ADN, l'activité exonucléase 5'-3' de la polymérase en cours de progression clive l'extrémité 5' de la sonde et libère le rapporteur de l'action inhibitrice du «quencher». Le rapporteur émet alors un signal fluorescent proportionnel au nombre de sondes correctement hybridées et permet de suivre en temps réel l'augmentation du nombre de copies polymérisées à chaque cycle (**Figure 20**).

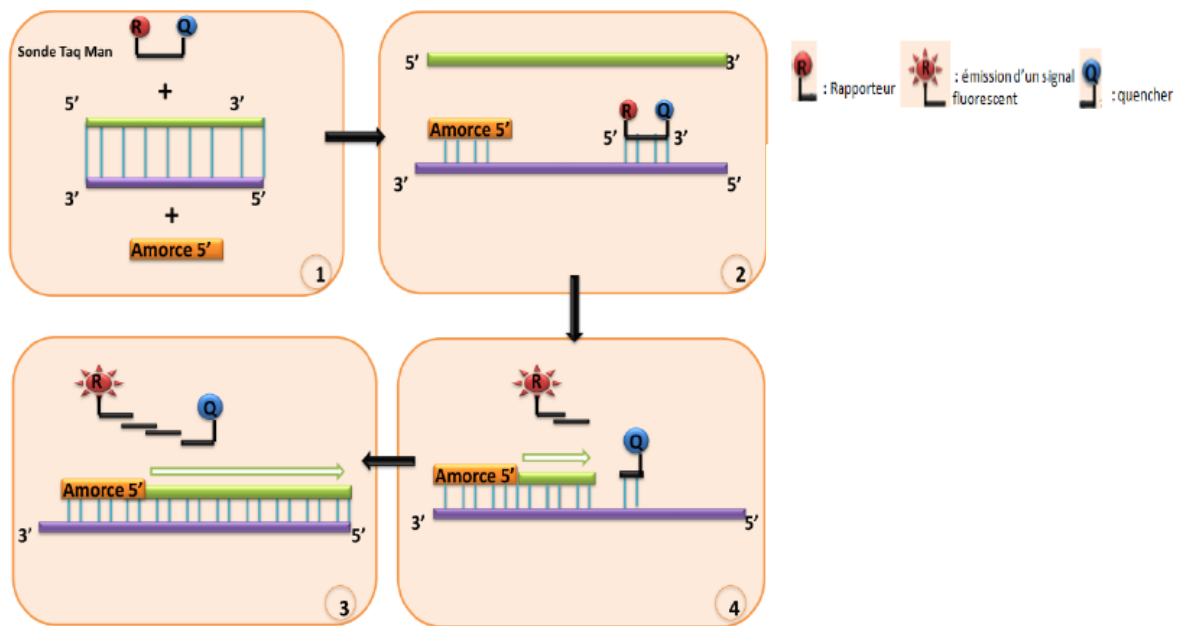


Figure 20 Principe des sondes d'hydrolyse TaqMan®

Les sondes présentent à l'extrémité 5' un fluorochrome rapporteur (R) et à leur extrémité 3' un «quencher» non fluorescent (Q) qui induit l'extinction de la fluorescence émise par le rapporteur. L'hydrolyse de la sonde par l'activité 5' exonucléase de la polymérase provoque la séparation du fluorochrome et du quencher entraînant ainsi l'émission d'un signal fluorescent (schéma établi d'après sesep.uvsq.fr).

La quantification simultanée de l'expression de 96 gènes, (92 gènes d'intérêt et 4 gènes de référence) a été réalisée à l'aide de cartes microfluidiques (Life Technologies) sur lesquelles chaque puits contient un couple d'amorces et une sonde d'hydrolyse TaqMan®, spécifiques d'un gène (Annexe 2-Custom-made human-specific TaqMan® micro-fluidic cards containing panels of 96 gene expression assays). La carte a été centrifugée 2 fois pendant 1 min à 12000 rpm puis scellée avant d'être chargée dans l'appareil ABI Prism 7900 (Life Technologies). La réaction de qPCR est précédée d'une phase de décontamination (2 min à 50°C) puis se déroulent une activation de la polymérase (10 min à 95°C), 40 cycles de dénaturation (30 s à 97°C) et d'hybridation-élongation (1 min à 59,7°C). L'amplification et l'analyse sont effectuées dans un thermocycleur ABI PRISM 7900Fast (Life Technologies).

La reproductibilité inter-manipulation a été vérifiée sur 4 échantillons analysés deux fois et la reproductibilité intra-manipulation vérifiée par amplification d'un gène en duplicat (*PRUNE2* et l'alias *KIAA0367*).

La quantification de l'expression des gènes a été réalisée par la méthode comparative des cycles seuil ou Ct (threshold cycle). Le Ct, ou nombre de cycles de PCR nécessaires pour générer un signal qui atteint le seuil fixé, a été calculé avec le logiciel RQ Manager 1.2.1 (Life Technologies). L'expression relative des gènes est déterminée par la méthode comparative du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001).

La méthode du $\Delta\Delta Ct$ calcule le ratio d'expression d'un gène cible entre 2 échantillons, en normalisant avec un ou plusieurs gènes de référence. Quatre gènes de ménage codant pour GAPDH, HPRT, 18S ou la $\beta 2$ -microglobuline ont été amplifiés par RT-qPCR (de Kok et al., 2005). L'algorithme NormFinder a été utilisé pour déterminer le gène optimal (*HPRT*) parmi les quatre gènes de ménage.

1. Les différences ΔCt entre les valeurs de Ct du gène cible et les gènes de référence sont déterminées pour l'échantillon à analyser (éch) et le contrôle ou tissu témoin (cont), décrit dans le paragraphe 2.

$$\Delta Ct_{(éch)} = Ct_{(cible\ éch)} - Ct_{(référence\ éch)} \text{ et } \Delta Ct_{(cont)} = Ct_{(cible\ cont)} - Ct_{(référence\ cont)}.$$

2. $\Delta\Delta Ct$ est calculé entre le contrôle et l'échantillon : $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(cont)} - \Delta Ct_{(éch)}$.

3. Le ratio d'expression normalisé d'un gène cible ou RQ (Relative Quantification) est déterminé par la formule $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Les données ont été traitées par le logiciel Applied Biosystems SDS Version 2.1 et analysées par le logiciel RQ Manager Version 1.2 (Life Technologies).

II.3. Validation des données

La classification des gliomes par analyse en composantes principales (ACP) et clustering hiérarchique (HC) sur la base des données d'expression obtenues sur les patients inclus dans l'étude a été validée dans une cohorte indépendante de données d'ARN-seq des glioblastome et gliomes de bas grades extraite du projet Atlas du génome du cancer (TCGA) (gdac.broadinstitute.org). Toutes les données cliniques ont été téléchargées à partir du portail TCGA (<http://www.xenabrowser.net/>).

Pour valider les résultats de survie, deux cohortes ont été téléchargées à partir des bases de données TCGA et REMBRANDT (<http://www.betastasis.com/glioma/rembrandt/>) et les résultats actuels ont été comparés à ces cohortes.

II.4. Analyse statistique

L'analyse des données a été effectuée selon la méthode $\Delta\Delta Ct$ avec la normalisation des données brutes aux gènes domestiques. L'algorithme de NormFinder a été utilisé pour déterminer le gène optimal de normalisation parmi les quatre gènes de ménage utilisés (Andersen et al., 2004). Des analyses exploratoires des données d'expression de l'ARNm ont été effectuées dans R (version 3.4.2) (<https://www.R-project.org>). L'analyse en composantes principales (PCA) a été réalisée avec le package FactoMineRet, le clustering hiérarchique (HC) avec le package ComplexHeatmap. À partir du niveau d'expression des 92 gènes, un sous-ensemble de gènes capables de distinguer les différents grades a été sélectionné sur la base de deux analyses statistiques: i) des gènes présentant une différence significative entre les tumeurs de grade II, III et IV ($p < 0,05$), et ii) des gènes fortement corrélés avec les tumeurs de grade II, III ou IV selon la fonction catdes du package FactoMineR ($p < 0,05$).

Les données ont été analysées à l'aide de Statview® (SAS Institute, Inc., Cary, NC, États-Unis) et R (www.r-project.org). Les résultats quantitatifs ont été exprimés en moyenne \pm écart-type. Les pourcentages et les médianes ont été comparés à l'aide de tests paramétriques ou non paramétriques pour les variables ordinales en fonction de la taille des groupes (test de Mann-Whitney, test de Kruskal-Wallis, test de Student). La survie globale (SG) a été calculée à partir de la date de la chirurgie initiale / biopsie jusqu'à la date du décès ou la date du dernier suivi. Les courbes de survie ont été obtenues en utilisant la méthode de Kaplan-Meier. Les variables pertinentes associées à la SG ont été examinées à l'aide de la régression des risques proportionnels de Cox univariés et, le cas échéant, multivariés. Pour les modèles multivariés, un critère d'inclusion univarié de $p \leq 0,2$ a été retenu. Les tests ou les comparaisons ont été considérés comme significatifs lorsque $p \leq 0,05$.

Chapitre III. Analyse protéique

III.1. Constitution des « Tissue Microarray »

La technique de « tissue microarray » (TMA) ou “puce à tissus” consiste à prélever des carottes de tissu tumoral inclus en paraffine, au sein de zones repérées sur les coupes histologiques correspondantes colorées à l’HPS. Dans la mesure du possible, deux carottes de 2 mm de diamètre par contingent tumoral ont été utilisées pour éviter la perte d’information en cas de décollement des spots.

Ces carottes ont été prélevées manuellement à l’aide d’un stylet, déposées selon un bloc receveur constitué de paraffine vierge et pouvant contenir 24 échantillons. Les blocs ont été laissés 12h à 37°C pour solidariser les carottes avec le bloc de paraffine receveur et placés à 4°C avant la coupe au microtome.

III.2. Analyse immunohistochimique

Des coupes de 5 µm d’épaisseur ont été déposées sur lames Superfrostplus® et incubées une nuit à 37°C. Deux analyses sont faites, un contrôle coloré par l’HPS et un par immunohistochimie (IHC).

Un prétraitement a été effectué afin d’éliminer la paraffine et de réhydrater les tissus : 2 bains de toluène (10 minutes) puis 2 bains d’éthanol absolu (5 minutes) puis un bain de 1 minute à l’eau courante et enfin un bain dans PBS1X jusqu’à utilisation des lames.

La perméabilisation des membranes et le démasquage des antigènes sont réalisés par immersion dans du tampon citrate (pH = 7) puis passage au four micro-ondes : 3 cycles de 5 minutes à 750 W (pour les antigènes cytoplasmiques) ou 4 cycles de 5 minutes à 750 W (pour les antigènes nucléaires). Après refroidissement de 3 h, les lames sont immergées dans du PBS1X jusqu’à utilisation.

La deuxième étape comprend l’inhibition des peroxydases endogènes grâce à un bain de Méthanol-5% H₂O₂ (10minutes). Les lames sont rincées à l’eau distillée (1minute) puis dans 2 bains de PBS1X (3 minutes).

Afin de limiter les réactions non spécifiques, la saturation des sites antigéniques est réalisée dans du PBS1X–BSA 3% (30 minutes) puis l’incubation avec l’anticorps primaire dilué dans du PBS1X–BSA 3 % une nuit (**Tableau 10**). Après 3 lavages par PBS1X (5 minutes), les lames sont incubées 30 minutes avec l’anticorps secondaire du système Envision anti-souris (K4001-DAKO) ou anti-lapin (K4003-DAKO) qui correspond à un polymère couplé à la HRP



(Peroxydase de raifort / Horseradish Peroxydase). Cette étape est suivie de 3 lavages en PBS1X (5 minutes).

L'étape de révélation est obtenue par la DAB (DiAminoBenzidine), substrat de l'HRP. L'HRP catalyse la conversion de la DAB en un produit chromogène marron. La réaction est stoppée par lavage intensif des lames à l'eau courante.

Afin de mieux distinguer les constituants tissulaires, une étape de contre coloration à l'hématoxyline (coloration des noyaux) est requise, suivie d'un bain au carbonate de lithium afin d'accentuer le contraste.

Les tissus sont ensuite déshydratés par 2 bains successifs dans l'éthanol absolu puis un bain de toluène, dans lequel les lames peuvent rester jusqu'au montage.

Le montage s'effectue entre lame et lamelle à l'aide du milieu de montage Eukit (03989, Fluka). Les lames sont conservées dans du milieu de montage non aqueux. Les lames ont été analysées par le logiciel IMAGE J et en manuel en double lecture avec des pathologistes.

Des contrôles négatifs isotypiques ont été réalisés pour chaque anticorps.

Les marquages avec les anticorps ont été évalués avec le score de Hirsch (Hirsch et al., 2003), score semi-quantitatif obtenu en multipliant un score d'intensité de marquage (1 : absence de marquage ou quelques traces, 2 : marquage faible, 3 : marquage modéré et 4 : marquage fort) par le pourcentage de cellules marquées.

Tableau 10 Anticorps utilisés pour l'immunohistochimie

Protéine	Espèce hôte	Fournisseur	Localisation du marquage	Tissu de mise au point des anticorps	Dilution
HER2	Lapin	Ventana	Membranaire	Sein	
IDH1 R-132	Souris	OPTISTAIN	Cytoplasmique	Cerveau	1/100
Nestine	Souris	Merck Millipore	Cytosplasmique	Cerveau	1/10000
OLIG2	Lapin	IBL	Nucléaire	Cerveau	1/200
P53	Souris	DAKO	Nucléaire	Cerveau	1/50
PDL1	Lapin	Diagomics	Membranaire/cytoplasmique	Poumon	1/200
TrkB	Lapin	R&D System	Membranaire/cytoplasmique	Cerveau	1/200
P75	Lapin	Santa Cruz	Membranaire/cytoplasmique	Cerveau	1/300
TrkC	Lapin	Novus Biological	Membranaire/cytoplasmique	Cerveau / poumon	1/100
CHI3L1	Lapin	Gentex	Cytoplasmique	Cerveau	1/200
KLRC3	Lapin	Sigma Aldrich	Cytoplasmique	Cerveau	1/50
TRKA	Lapin	Cell signaling	Cytoplasmique	Cerveau	1/400

III.3. Détection de mutations de l'IDH par pyroséquençage

Dix nanogrammes d'ADN génomique tumoral ont été amplifiés à l'aide du kit PCR Pyromark (Qiagen) Toutes les expériences ont été réalisées conformément à la description des auteurs Wang et al. (Wang et al., 2016).

III.4. Détermination de la perte du bras chromosomique 1p et/ou 19q par Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

La technique MLPA a été utilisée selon les recommandations du fabricant (SALSA® MLPA® P088-C2 Oligodendroglioma kit, MRC Holland). Après une étape de dénaturation de l'ADN, les couples d'oligonucléotides sont hybridés à leur séquence cible puis liés par une ligase. Ces produits de ligation sont amplifiés par PCR multiplex grâce aux amorces universelles. Les amplifiats sont ensuite séparés selon leur taille par électrophorèse capillaire sur un séquenceur capillaire ABI 3130XL (Applied Biosystems) et les hauteurs de pic ont été quantifiées par le logiciel Genemapper (Applied Biosystems). La quantification est relative (quantification de l'échantillon du patient par rapport à un témoin négatif sain) (Jeuken et al., 2006; Mesturoux et al., 2016) (Annexe 3-Principe général de la réaction de Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)).

Chapitre IV. Production et caractérisation des exosomes

IV.1. Purification des exosomes

La purification des exosomes tumoraux est adaptée du protocole de Théry et al. (Théry et al., 2006). Toutes les étapes s'effectuent à 4°C. La collecte d'exosomes se fait par centrifugations différentielles à partir de 0,9 mL de plasma.

L'échantillon subit une première centrifugation à 300 g pendant 15 minutes. Une fois le surnageant récupéré, il subit une deuxième centrifugation à 17000g pendant 30 minutes afin d'éliminer les débris cellulaires.

Le surnageant obtenu est ensuite filtré sur une membrane poreuse (pores de 0,2 µm de diamètre) puis ultracentrifugé à 120 000 g pendant 1h10. Le culot contenant les exosomes est alors repris soit :

- dans du tampon RIPA (30 µl) en vue d'une analyse western blot. Les tubes sont placés sur la glace pendant 15 min avec 30 µl de tampon RIPA. Le tout est ensuite centrifugé 25 min à 10 000g pour récupérer le surnageant contenant les protéines. Les échantillons sont stockés à -20°C
- dans le PBS1X pour une analyse de la taille des particules. Les culots d'exosomes obtenus sont mis en suspension dans du PBS 1X (500 µl) et sont ensuite injectés dans la « chambre optique » de l'appareil NanoSight NS300 (MALVERN).

IV.2. Analyse protéique par Western Blot

La concentration en protéines totales est déterminée selon la technique de Bradford (Sigma Aldrich, France) par spectrométrie à 595 nm. Une gamme étalon de la réaction est réalisée avec une solution de BSA (Sigma Aldrich) de concentration connue (de 0 µg/mL à 20 µg/mL).

40 µg de protéines sont préparés dans du tampon Laemmli (Biorad, France). Les échantillons sont dénaturés à 95°C pendant 5 min puis déposés sur un gel pré-coulé avec un gradient de polyacrylamide (4 à 15%) contenant du SDS (10%) (BioRad, France). Un marqueur de poids moléculaire (Fisher, France) est utilisé comme référence.

La migration protéique est réalisée dans le tampon de migration (BioRad) sous 100 Volts pendant environ 90 min. Après migration, le transfert est réalisé sur une membrane de PVDF (Pall) préalablement activée quelques minutes dans un bain de méthanol (Sigma Aldrich, France) puis équilibrée dans le tampon de transfert (Tris/Glycine/méthanol, BioRad). Le gel



de polyacrylamide est équilibré quelques minutes dans le tampon de transfert avant d'être mis en contact avec la membrane selon les instructions du fabricant (BioRad). Le transfert s'effectue à 64mA, 8V (30 minutes). L'efficacité du transfert est vérifiée par coloration au rouge ponceau.

Afin d'éviter les fixations non spécifiques des anticorps, une saturation des membranes est effectuée avec une solution de TBS1X/tween 0,1% pendant 30 min sous agitation à température ambiante.

Les membranes de PVDF sont ensuite incubées la nuit à 4°C sous agitation avec l'anticorps primaire spécifique de la protéine d'intérêt, dilué dans du TBS1X/Tween 0,1%/BSA 5% (**Tableau 11**). Les membranes sont rincées 3 fois en TBS1X/Tween 0,1% (10 min) puis incubées avec l'anticorps secondaire couplé HRP (Horseradish Peroxydase) correspondant, à l'hôte de l'anticorps primaire. Les anticorps secondaires sont dilués dans du TBS1X/Tween 0,1% (**Tableau 12**).

Les protéines sont détectées par chimiluminescence (Millipore, France) et grâce à une Gbox (Genesnap Syngene, Cambridge, UK) qui possède une caméra sensible aux photons émis. Pour quantifier les protéines contenues dans chaque lysat protéique, les membranes sont réhybridées avec un anticorps dirigé contre CD63 et CD81, spécifiques des exosomes.

La quantification des protéines de chaque échantillon est réalisée en comparant l'intensité de coloration de la protéine d'intérêt à CD63 ou CD81 par le logiciel image J.

Tableau 11 Liste des anticorps primaires utilisés en western blot.

Anticorps	Taille kDa	Hôte	Dilution	Fournisseur
CD63	60-70	souris	1/500	Abcam
TrkB	145-95	souris	1/100	R&D System
p75 ^{NTR}	75	lapin	1/300	Santa-Cruz
CD81	20	lapin	1/200	Santa-Cruz

Tableau 12 Liste des anticorps secondaires utilisés en western blot.

Anticorps	Hôte	Dilution	Fournisseur
Anti mousse HRP	Mouton	1/1000	DAKO
Anti rabbit HRP	Mouton	1/1000	DAKO

RESULTATS



Projet 1 : Signature moléculaire des gliomes

Publication en révision dans British Journal of Cancer, IF : 5.92

Article 1 : Molecular subgroups based on *CHI3L1*, *NTRK2*, *1p/19q* and *IDH* status predict prognosis in glioma

Les sous-groupes moléculaires fondés sur le statut *CHI3L1*, *NTRK2*, *1p / 19q* et *IDH* prédisent le pronostic des gliomes

Communications affichées :

- [1] E. Deluche et al., 'Molecular subtypes of gliomas defined by gene expression profiling (337P)', Ann. Oncol., vol. 28, no. suppl_5, Sep. 2017.
- [2] E. Deluche et al., 'Gene expression profiling to identify new prognostic markers in glioma.', J. Clin. Oncol., vol. 36, no. 15_suppl, pp. e14054–e14054, May 2018.

L'un des moyens d'améliorer la prise en charge clinique des gliomes est la recherche de nouveaux biomarqueurs moléculaires qui distingueraient des sous-groupes plus homogènes, indépendants des caractéristiques histologiques de la tumeur. Ces biomarqueurs qui pourraient être intégrés dans la classification actuelle de l'Organisation Mondiale de la Santé (Louis et al., 2016) sont susceptibles d'une part d'avoir une valeur pronostique et/ou prédictive, et d'autre part d'améliorer la compréhension de la biologie des gliomes tout en offrant de nouvelles voies thérapeutiques novatrices.

La complexité et l'hétérogénéité des gliomes et notamment du glioblastome dépend pour partie de l'existence de cellules souches cancéreuses (CSCs) responsables de la radio- et chimio-résistance dans les glioblastomes. Nos travaux antérieurs *in vitro* sur des lignées de glioblastome ont permis d'identifier plusieurs gènes impliqués dans la glycosylation qui favorisent le maintien et l'auto-renouvellement des CSCs et constituent par conséquent une signature propre aux CSCs. Dans ces conditions, notre étude s'est intéressée aux principaux gènes impliqués dans le maintien du caractère souche, à ceux liés à la glycosylation issus du screening précédent, aux gènes associés à l'hypoxie, ou encore aux gènes des récepteurs des neurotrophines. Les travaux précédents de l'équipe ont montré que 2 récepteurs des neurotrophines TrkB et p75^{NTR} sont exprimés dans le glioblastome et pourraient contribuer à diffuser l'agressivité tumorale lors de leur transfert par les exosomes (Giraud et al., 2011; Pinet et al., 2016). *CHI3L1* est un gène impliqué dans la glycosylation, qui a été caractérisé dans nos travaux précédents comme étant associé aux cellules souches cancéreuses et est majoritairement surexprimé dans les lignées cellulaires issues de glioblastomes (Che-



ray et al., 2011). Une forte expression de *CHI3L* dans les glioblastomes, liée au profil mésenchymateux (Ku et al., 2011) et impliqué dans la radiorésistance (Francescone et al., 2011; Saidi et al., 2008) est facteur de mauvais pronostic. Il existe un lien étroit entre ces deux gènes puisqu'il a été montré que l'inactivation de *CHI3L1* induit une perte d'agressivité et conduit à une modification de l'expression de TrkB (Pinet et al., 2016).

L'un de nos objectifs était de déterminer l'expression différentielle d'un panel de gènes en fonction des différents sous-type histologiques de gliomes afin d'identifier de nouveaux biomarqueurs. Le deuxième objectif était d'évaluer si ces biomarqueurs potentiels pouvaient permettre de compléter la classification OMS 2016.

L'analyse conjointe de 64 patients d'une cohorte de deux centres (Limoges et Montpellier) et de 671 patients de la cohorte TCGA, a mis en évidence deux groupes pronostiques constitués par un panel d'expression différentielle de 26 gènes, les patients de mauvais pronostic avec une survie globale médiane de $23,0 \pm 9,6$ mois (groupe A) et les patients de bon pronostic avec une survie globale médiane de $115,0 \pm 6,6$ mois (groupe B) ($p = 0,007$). Cette stratification en deux groupes pronostiques a été confirmée quels que soient le grade de la tumeur ($P < 0,0001$) et le groupe moléculaire de la tumeur (*IDH* muté ou normal et présence ou absence de codélétion 1p19) ($P < 0,0001$)

A partir de ces groupes moléculaires, les deux gènes précédemment cités, *CHI3L1* et *NTRK2* ont émergé comme biomarqueurs. Ainsi, une faible expression de *CHI3L1* et une forte expression de *NTRK2* sont associées au grade II, alors qu'une forte expression de *CHI3L1* et une faible expression *NTRK2* sont associés au grade IV ($P < 0,0001$). Une analyse multivariée a permis de confirmer que ces biomarqueurs sont indépendants du statut *IDH* et du grade tumoral.

Dans ces conditions, nous proposons d'inclure dans la prise en charge des gliomes ces deux gènes en combinaison avec les stratifications *IDH* et codélétion 1p19q déjà connues. L'apport de ces deux gènes dans la classification actuelle est significatif en particulier pour deux groupes homogènes de patients dont le profil histo-moléculaire peut être ainsi mieux discriminé: (1) un groupe de très bon pronostic caractérisé par *IDH muté*, une codélétion 1p19q, une faible expression de *CHI3L1* et une forte expression de *NTRK2* et (2) un groupe de très mauvais pronostic avec une absence de mutation *IDH* et de codélétion 1p19q, une forte expression de *CHI3L1* et une faible expression de *NTRK2*.



L'intégration de ces gènes à la classification récente permettrait de modifier et d'améliorer la prise en charge clinique des patients en proposant des thérapies ciblées et adaptées au statut *CHI3L1* et *NTRK2* des tumeurs. En cas de surexpression de *NTRK2*, un traitement anti-NTRK2 peut être proposé au patient. Alors que pour les tumeurs notamment de grade IV avec une surexpression de *CHI3L1*, un traitement anti-CHI3L1 pourrait être envisagé en association avec le protocole STUPP.



Molecular subgroups based on *CHI3L1*, *NTRK2*, *1p/19q* and *IDH* statuses predict prognosis in glioma

Running title: *CHI3L1*, *NTRK2*, *1p/19q* and *IDH* statuses in glioma

Authors: Deluche Elise^{1,2}, Bessette Barbara^{1*}, Durand Stephanie^{3,4*}, Caire François⁵, Rigau Valérie⁶, Robert Sandrine^{1,7}, Chaunavel Alain^{1,7}, Forestier Lionel⁴, Labrousse François^{1,7}, Jauberteau Marie-Odile^{1,8}, Durand Karine^{1,7}, and Lalloué Fabrice¹

Affiliations:

1. EA3842 CAPTuR, University of Limoges, Faculty of Medicine, 2 Rue du Docteur Marcland, 87025 Limoges, France
2. Department of Medical Oncology, Limoges University Hospital, 2 rue Martin Luther King, 87042 Limoges, France
3. Bioinformatics team, BISCEM platform, CBRS, 2 rue du Docteur Marcland, 87025 Limoges, France
4. EA7500 PEREINE, University of Limoges, 123 av. Albert Thomas, 87060 Limoges, France
5. Department of Neurosurgery, Limoges University Hospital, 2 rue Martin Luther King, 87042 Limoges, France
6. Department of Neuropathology and INSERM U1051, Hospital Saint Eloi - Gui de Chauillac, 80 av. Augustin Fliche, 34090, Montpellier, France
7. Department of Pathology, Limoges University Hospital, 2 rue Martin Luther King, 87042 Limoges, France
8. Department of Immunology, Limoges University Hospital, 2 rue Martin Luther King, 87042, Limoges, France

* These authors contributed equally to this work

ABSTRACT

Background: The aim of this study was to identify prognostic markers to complement the current molecular classification. The identification of new biomarkers should allow improvements in patient care.

Methods: Gene expression profiling was performed using the TaqMan Low Density Array and hierarchical clustering using 96 selected genes in 64 patients with newly diagnosed glioma. The expression dataset was validated on large independent cohorts from The Cancer Genome Atlas (TCGA) and REMBRANDT databases.

Results: A cohort of primary glioma patients was assembled that encompassed all histological grades. Tissues were radiotherapy-naive and chemotherapy-naive surgical specimens (n = 64).

A differential expression panel of 26 genes discriminated between two prognostic groups: patients with poor prognosis with a median overall survival (OS) of 23.0 ± 9.6 months (group A) and patients with good prognosis with a median OS of 115.0 ± 6.6 months (group B) ($P = 0.007$). Hierarchical clustering of the TCGA cohort validated the prognostic value of these 26 genes ($P < 0.0001$). Three molecular groups based on statuses of *CHI3L1*, *NTRK2*, *1p/19q* and *IDH* were identified and independently associated with overall survival.

Conclusion: We propose complementation of the current classification by including *NTRK2* and *CHI3L1* for glioma management.



BACKGROUND

Gliomas are the most common primary brain tumors of the central nervous system. Overall age-adjusted incidence rates vary from 4.67 to 5.73 per 100 000 persons.¹ Gliomas are to date classified according to the World Health Organization (WHO).² However, despite the undeniable contribution of this classification, patients with tumors of same histologic appearance may still have different outcomes due to unknown molecular heterogeneity.³

One of the ways to improve the clinical management of gliomas is to identify new molecular biomarkers that distinguish more homogeneous subgroups of patients regardless of histological tumor characteristics. These biomarkers could be integrated into the current classification and complete knowledge of glioma biology to provide opportunities for novel treatment.

Isocitrate dehydrogenase (IDH) mutation is a key biomarker integrated into the molecular classification of glioma. Numerous studies have revealed that the presence of *IDH* mutations is prognostically relevant.⁴ *IDH* mutations, estimated to occur in 70–90% of diffuse low-grade gliomas (grades II-III), affect the epigenetic regulation of the genome and are strongly implicated in both tumorigenesis and prognosis.^{5,6} Nevertheless, *IDH* mutations are also expressed in 10% of glioblastoma as reported by Louis et al.² While *IDH* mutations are a hallmark of astrocytoma and oligodendroglioma, WHO grades II and III, they are also identified in glioblastoma (GBM), WHO grade IV, where they are associated with a better prognosis as compared to GBM, *IDH* wild type.^{7–9} Moreover, even if *IDH* wild-type tumors and patients have a poorer outcome than those with the *IDH* mutation, patients in the latter group may still have different outcomes.¹⁰ Thus, genes associated with *IDH* status need to be investigated to develop a more convenient method for predicting prognosis. In the present study, the purpose was to screen expression levels of set of genes to identify those with prognosis relevance.

Besides conventional genes involved in different mechanisms such as signaling pathways, hypoxia, and angiogenesis, we included two families of genes that could be potential candidate prognostic biomarkers: glycosylation-related genes and neurotrophin receptor genes. In a previous study, we highlighted that eight glycosylation-related genes were overexpressed in glioblastoma cell lines.¹¹ Among them, *CHI3L1*, a gene encoding YKL-40, a marker of the glioblastoma mesenchymal subtype, was overexpressed in glioblastoma cancer stem cells.¹² Its inactivation induces a loss of aggressiveness and leads to modification of neurotrophin receptor expression.¹³ Neurotrophin receptors include the Trk receptor family, which is composed of Trk A, B, and C receptors encoded by the *NTRK1*, *NTRK2*, and *NTRK3* genes, respectively. These receptors and p75^{NTR} are already known to be involved in differentiation, proliferation, survival, and apoptosis.^{14–16} Furthermore, TrkB and TrkC receptors promote the growth of brain tumor-initiating cells and p75^{NTR} is expressed in grades III and IV where it



promotes glioma invasion.^{17,18} Our previous studies showed that TrkB and p75^{NTR} are expressed in glioblastoma and could be required for tumor aggressiveness.^{13,19} Thus, genes encoding Trks and glycosylation-related genes could be of interest to complement the current *IDH* mutation-based classification. In the present study, we included the most relevant glycosylation-related genes and main neurotrophin receptors, since neither class has been evaluated in the current classification and the link to *IDH* status is not clearly established.²⁰⁻²³

The objective of this study was to define new prognostic markers that could be integrated into the current molecular classification of glioma.



MATERIALS AND METHODS

Patients and tumor samples

Glioma samples were obtained from 64 adult patients who underwent surgery at Limoges and Montpellier University Hospitals from 1993 to 2013 and before any treatment such as chemotherapy and radiotherapy. This study benefited from the expertise of Prof. Labrousse (collection manager of Limoges), Prof. Rigau (collection manager of Montpellier), and Prof. Sylvain Lehmann (CRB-CHUM manager). Gliomas were classified according to the 2016 WHO classification².

Inclusion criteria were minimum age of 18 years and availability of clinical and survival data.

After control of the nature and the tumor density to avoid bias gliomas were classified according to the 2016 WHO classification. One half of the surgical specimen was snap-frozen in liquid nitrogen upon surgical removal and stored at -80°C until RNA isolation. The other half was fixed in 4% paraformaldehyde at the time of resection and then embedded in paraffin. Tumor sections were stained with hematoxylin phloxine saffron. Control brain tissues were collected from the cerebral parenchyma of a breast cancer metastasis in a 50-year-old woman. Only the tissue located farthest away from the metastasis was retained, and histological analysis was carried out to confirm the absence of tumor tissue.

Clinical and survival data were obtained by a retrospective query, and all samples were used in accordance with French bioethics laws regarding patient information and consent. Paraffin-embedded blocks were obtained from the Tumor Biobank (CRBiolim) of Limoges University Hospital, following research project approval by the Institutional Review Board (AC-2013-1853, DC-2011-1264), and from the Biological Resource Center of Montpellier University Hospital (CRB-CHUM; <http://www.chu-montpellier.fr>; Biobank ID: BB-0033- 00031)

Detection of *IDH* mutations by pyrosequencing

Ten nanogrammes of tumoral genomic DNA were amplified in a 25 µL PCR reaction using the Pyromark PCR kit (Qiagen), PCR and sequencing primers obtained from Wang et al. published method.

²⁴All experiments were performed as described by the authors.

Determination of 1p and/or 19q chromosomic arm loss or retention by Multiplex-Ligation-Proximity-Assay (MLPA)

The MLPA technic was used to analyze 1p and 19q chromosomic arms loss or retention, according to the manufacturer recommendations (SALSA® MLPA® P088-C2 Oligodendroglioma kit, MRC Holland). Probe sequences and locations are available on the manufacturer site. Briefly, after MLPA experiments, denatured fragments were separated according to their size by capillary electrophoresis



on an ABI 3130XL capillary sequencer (Applied Biosystems) and peak heights were quantified by the Genemapper software (Applied Biosystems). Data analysis was performed using a homemade Microsoft Excel matrix as previously described.^{25,26}

Total RNA extraction from human tumor samples

Before RNA extraction, 5 µm-thick frozen tissue sections were histologically reviewed by a neuropathologist to ensure that they contained a minimum of 60% of tumor cells. Tumor tissue (4–40 mg) was pulverized with ceramic balls CK14 (Ozyme) in a lysis buffer (QiaZol, Lysis Reagent, Qiagen) using a Precellys 24 homogenizer (Precellys24[®], Ozyme). RNA purification was then performed on lysed tissues according to the manufacturer's protocol (Qiagen). RNA concentration was determined by spectrophotometry (NanoDrop ND1000, Labtech), and integrity was assessed by capillary electrophoresis (RNA 6000 Nano Kit, Bioanalyzer 2100, Agilent Technologies). All samples used in this study presented an RNA Integrity Number (R.I.N.) greater than 6. Complementary DNA (cDNA) was synthesized from 1 µg of total RNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit[®] (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol.

TaqMan Low Density Array (TLDA)

TLDA design: The custom-made TLDA card contained four identical 96-gene sets including glioma markers, genes coding for neurotrophins and their receptors, and genes involved in different mechanisms such as glycosylation, autophagy, receptor tyrosine kinase signaling, hypoxia, and angiogenesis (Applied Biosystems). The complete list is available in Supplementary Table S1. Each card contained housekeeping genes: *HPRT1*, *18S*, *GAPDH*, and *β2-microglobulin*. The inter-experiment reproducibility was verified on four samples analyzed twice, and the intra-experiment reproducibility was verified by the duplicate amplification of a single gene (*PRUNE2* or *KIAA0367*). The amplification protocol and data analysis were carried out as previously described by Ermonval et al.²⁷

TLDA analysis: Gene expression profiling: Data analysis was performed using the $\Delta\Delta C_t$ method with normalization of the raw data to housekeeping genes.²⁸ The NormFinder algorithm was used to determine the optimal normalizer gene among the four housekeeping genes used. Subsequently, after normalization of the data to *HPRT1*, the mean of the pooled samples of normal brain was used for the calculation of fold-changes (tumor/normal ratio). The significance of differences in means between \log_2 -transformed fold-changes was tested using a two-tailed Student t test after confirming homoscedasticity by Fisher test. Significance was set at $P < 0.05$. Exploratory analyses of mRNA expression



data were conducted in R (version 3.4.2) (<https://www.R-project.org>) after \log_2 transformation of fold-changes. In particular, principal component analysis (PCA) was performed with the FactoMineR package²⁹ and hierarchical clustering (HC) with the ComplexHeatmap package.³⁰

The International Society Of Neuropathology--Haarlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading recommends to evaluate grade before molecular analysis.³¹ Thus, from the expression level of the 92 genes, a subset of genes able to discriminate between WHO grades was selected on the basis of two statistical analyses: i) genes showing a significant difference between grade II, III, and IV tumors by t test ($P < 0.05$), and ii) genes highly correlated with grade II, III, or IV tumors according to the catdes function of the FactoMineR package ($P < 0.05$).

Validation gene expression profiling

The classification of gliomas by PCA and HC based on our expression dataset was validated in an independent cohort of glioblastoma and grade II-III datasets of The Cancer Genome Atlas (TCGA) project. Normalized (RSEM method) and batch corrected RNAseq expression data corresponding to whole of gliomas (named GBMLGG cohort) were downloaded from Firehose portal of Broad Institute (gdac.broadinstitute.org). Clinical information, IDH mutation and 1p19q status were also retrieved from the Broad GDAC portal. All clinical data were downloaded from the TCGA Portal (<http://www.xenabrowser.net/>). Gliomas were classified according to the 2016 WHO classification².

Validation survival analysis

To validate the survival results, two cohorts were downloaded from the TCGA and REMBRANDT databases (<http://www.betastasis.com/glioma/rembrandt/>), and the present results were compared with these cohorts. The median cut-off chosen was previously described in the literature to distinguish between the low and high expression of a gene.³²

Statistical analysis

Data were analyzed using Statview® (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) and R (www.r-project.org). Quantitative results were expressed as means \pm SD. Percentages and medians were compared using parametric or non-parametric tests for ordinal variables depending on the size of the groups (Chi-squared test, Mann-Whitney test, Kruskal-Wallis test, Student's t test). The overall survival (OS) was calculated from the date of initial surgery/biopsy to the date of death or date of last



follow-up. Logistic regression was used to analyze the factors associated with *IDH* status. Survival curves were obtained using the Kaplan-Meier method. Relevant variables associated with OS were examined using univariate and, where applicable, multivariate Cox proportional hazards regression. For the multivariate models, a univariate inclusion criterion of $P \leq 0.2$ was used. Tests or comparisons were considered significant when $P \leq 0.05$.



RESULTS

Clinical and histological characteristics of the French cohort

TLDA analysis was performed in radiotherapy- and/or chemotherapy-naive glioma surgical specimens. Sixty-four patients (26 women and 38 men; median age: 47.5 years; range: 22–81) were included in the final analyses. The main clinical and histological data from this treatment-naive population are shown in Supplementary Table S2. The population comprised patients with glioma grades ranging from grade II to grade IV (n = 18 grade II; n = 25 grade III; n = 21 grade IV). Thirty-six tumors exhibited the *IDH* mutation, and 28 were *IDH* wild-type.

Gene selection in the French cohort

Ninety-two preselected genes were analyzed in the cohort described above.

Univariate analysis showed that the expression of 29 genes was significantly different between grades ($P < 0.05$). Venn diagram analysis showed that there were no shared genes between all three glioma grades and grades II/III and III/IV, whereas one was shared between selected genes in grades II/III and II/IV, and 12 between grades III/IV and II/IV (Figure 1, left).

To assess the relevance of these 92 genes, we performed multivariate analysis (PCA) and identified 30 genes highly correlated with grade. Venn diagram analysis showed that there were no shared genes between all three grades and between grades II and III, while five were shared between grades II and IV, and five between grades III and IV (Figure 1, right).

The two aforementioned gene lists thus generated a shared set of 26 genes highly associated with grade (Figure 1). A new PCA analysis performed with these 26 genes confirmed their ability to separate lower grades (grades II–III) from grade IV gliomas (see Supplementary Figure S1 left).

Hierarchical clustering (HC) of the French cohort using the 26-gene signature

Using this final 26-gene set, hierarchical clustering was performed. Results classified the 64 tumors into two groups (groups A and B) (Figure 2) with distinct clinical and histological characteristics ($P < 0.05$). Group A (n = 31) contained astrocytoma (50%), grade IV (80%), and *IDH* wild-type (40%) tumors, whereas group B (n = 33) contained oligodendroglioma (57%), grade II (77%), and *IDH*-mutated tumors (60%) ($P < 0.05$).

Patients in group B were younger ($P = 0.0024$) and received less radiotherapy than those in group A ($P = 0.04$). There was no difference between the two groups in tumor localization, surgery, or chemotherapy ($P > 0.05$) (see Supplementary Table S2).

Group A was defined by high expression of *EGF*, *NGF*, *FLT4*, *KDR*, *AREG*, *NTRK1*, *VEFGA* and *CHI3L1* and low expression of *SYP*, *INA*, *ST3GAL5*, *OLIG2*, *KLRC3*, *NTSR2*, *PINK1*, *NRG3*, *ERBB4*,



NTRK2-bis, *NTRK2-variant*, *AKT3*, *PARK2*, *NANOG*, *NTRK3*, *NRG2*, *BRAF* and *NRG4*, whereas group B was defined by the opposite pattern of expression of these genes.

Group A identified patients with a poor prognosis with a median survival of 23.0 ± 9.6 months, whereas group B identified patients with a good prognosis with a median survival of 115.0 ± 6.6 months ($P = 0.007$) (Figure 2B).

Validation of clustering in an independent dataset (TCGA cohort)

To compare our data with other available datasets and to confirm our results in a larger population, we analyzed the 26 selected genes by PCA (Supplementary Figure S2) in an independent glioma cohort (TCGA cohort).

In French cohort, we highlighted two groups A and B defined by the dendrograms of hierarchical clustering. The definition of these two groups was reinforced by hierarchical clustering in TCGA cohort which clearly distinguished them using the same 26-gene signatures as our French cohort.

The cohort included 671 tumors: only primary glioblastoma (de novo, untreated) ($n = 157$), grade II ($n = 249$) and grade III ($n = 265$) glioma.

With a median age of 46 years (range: 18–89), the TCGA cohort was similar to our cohort.

Clinical data including age, tumor grade, and tumor histology are reported in Supplementary Figure S2.

Group A ($n = 283$) contained mainly astrocytoma, grade IV, and *IDH* wild-type tumors, whereas group B ($n = 388$) contained oligodendroglioma, grade II and *IDH*-mutated tumors ($P < 0.001$) (Figure 3A). The patients in group B were younger ($P < 0.001$) than those in group A. Expression levels of genes (defined by median values) in groups A and B in the TCGA cohort were similar to those in our French cohort except for *NGF*. Patients in group A had poor prognosis with a median survival of 16.8 ± 2.0 months, whereas patients in group B had a good prognosis with a median survival of 105.0 ± 17.3 months ($P < 0.0001$) (Data not shown).

This stratification in two prognosis groups was confirmed whatever grade of tumor ($P < 0.0001$) (Figure 3 B) and molecular group of tumor (*IDH* and 1p19 codeletion status) ($P < 0.0001$) (Figure 3C).

Independent prognostic biomarkers

Among the 26 selected genes, we identified four that appeared to be relevant because they were significantly differentially expressed between the groups and might influence prognosis: *NTRK3* (median: 10.27), *NTRK2* (median: 14.76), *CHI3L1* (median: 8.98) and *KLRC3* (median: 7.58). The most significant gene was *CHI3L1*.



The level of expression of these genes (defined by median thresholds) was subsequently analyzed independently. In the French (Figure 4 A, D, G, J) and TCGA cohorts (Figure 4 B, E, H, K), low expression of *NTRK3*, *NTRK2*, and *KLRC3* and high expression of *CHI3L1* were linked to poor prognosis ($P < 0.05$). An independent database (REMBRANDT cohort, $n = 336$), for which hierarchical clustering was not performed, validated our results (Figure 4 C, F, I, L).

In a preliminary analysis, we noted that in our French cohort, independent of the *IDH* mutation status and codeletion 1p19q status, poorer survival was associated only with high *CHI3L1* expression and low *NTRK2* expression.

Grades and *CHI3L1/NTRK2* levels were significantly associated ($P < 0.0001$): low *CHI3L1* and high *NTRK2* were associated to grade II whereas high *CHI3L1* and low *NTRK2* were associated to grade IV.

Molecular combined groups based on the presence and/or absence of the four tumor markers (*IDH* status, 1p19q co-deletion status, and *CHI3L1* and *NTRK2* expression) were used to classify the 671 glioma cases in the TCGA cohort according to prognosis (univariate analysis).

Twelve subsets were identified (Figure 5A). Then, we identified three molecular combined groups independently of type and grade of glioma by gathering similar prognostic populations considering all the parameters (Figure 5B): (1) better prognosis group with 1p19q co-deletion, *IDH*-mutated, low *CHI3L1* expression, and high *NTRK2* expression, (2) poorer prognosis group with *IDH*-wild-type, high *CHI3L1* expression whatever *NTRK2* expressions and (3) an intermediate prognostic group with the other combinations.

Compared to usual information's (*IDH* mutated and 1p19q codeletion status), we defined a better prognostic group with low *CHI3L1* and high *NTRK2* expressions (154 months vs 134 months). In addition, median survival in group *IDH*-mutated, 1p19q co-deletion, low *CHI3L1* expression, and high *NTRK2* expression ($n = 81$) was significantly higher than group *IDH*-mutated, 1p19q co-deletion, and other association of *CHI3L1* and *NTRK2* expression ($n = 105$) (154 months vs 78 months, $P = 0.0001$) (Fig. 5A).

The median survival was similar in intermediate (80 months) and poor prognosis (14 months vs 15 months) groups considering or not usual information (Figure 5B and 5C).

Grade II was mostly found in our good prognostic group (64% vs. 7% in poor prognostic group) whereas grade IV was predominant in our poor prognostic group (62% vs. 0% in good prognostic group) (Figure 6).



Multivariate Cox model analysis revealed independent markers of prognosis: age of diagnosis (HR : 1.039, 95% CI: 1.028-1.051, $P < 0.0001$), grade of glioma ($P < 0.05$), and molecular combined group ($P < 0.05$). (Supplementary Table S4).

Multivariate logistic regression analysis demonstrated that *CHI3L1*, *NTRK2*, grade and 1p19q codeletion seemed to be predictor for *IDH* mutation ($P \leq 0.0001$) (Supplementary Table S5).



DISCUSSION

In this study, we analyzed a 96-gene set to complement the recently published molecular classification of glioma. A 26-gene signature identified two molecular subgroups significantly correlated with patient survival and validated on an independent TCGA cohort. Since radiotherapy can modify gene expression³³, we analyzed only the glioma samples resected from patients free from radiotherapy and chemotherapy.

One of the ways to improve the management of glioma is to improve prognosis more precisely histology.^{34,35} Previous studies evaluated the impact of the molecular classification in glioma; however, only a few studies evaluated its impact across low and high grades. These latter studies showed that gene expression profiling provides additional information to distinguish between glioma subtypes.^{36–38} The present study identified specific genes involved in glycosylation and genes coding for neurotrophins and their receptors in the same molecular signature and associated them with *IDH* mutational status. For the first time, we propose that *CHI3L1* and *NTRK2* be inserted into the current glioma classification to complement and improve it.

NTRK2 and *NTRK3* encode neurotrophin receptors, which are well known to play an important role in brain tumor pathogenesis.¹⁴ In the present work, although *NTRK3* expression was significantly increased in grade II and III, its expression was not associated with *IDH* mutation status and it had no prognostic value. These results are consistent with data demonstrating that *NTRK3* expression is not correlated with prognosis in glioma³⁹, in contrast to medulloblastoma in which it has a clear prognostic value.⁴⁰ Similarly, the *NTRK2* level was significantly higher in grade II than in grade IV ($P < 0.05$). Moreover, in the grade III and IV subgroups, the survival rate was worse with negative expression of *NTRK2* than with positive expression.³⁹ These results may be related to the role of *NTRK2* in invasiveness and gliomagenesis in early astrocytoma.^{41–43}

We confirmed in our glioma collection that *CHI3L1* expression significantly differed between grade II,III and glioblastoma and was correlated with survival, as reported by Steponaitis et al.⁴⁴ *CHI3L1* encodes a cancer stem cell marker and is more highly expressed in glioblastoma than in normal brain.^{45,46} Previously, we observed using glioblastoma cell lines that *CHI3L1* and *KLRC3* might be cancer stem cell biomarkers in glioma, based on the results of glycosylation-related gene expression analysis, and may be potential biomarkers of aggressiveness.¹¹ A recent meta-analysis gathering 1241 glioblastoma patients confirmed our results by showing that high *CHI3L1* expression was associated with poor prognosis (HR = 1.46; 95% CI, 1.33–1.61; $P < 0.001$).⁴⁵

Thus, the present study suggests that changes in *CHI3L1* expression level are associated with prognosis. Since recent work demonstrated that *CHI3L1* is less expressed in *IDH*-mutated glioblastoma²⁰, we



chose to determine by multivariate analysis whether *IDH* status was connected with other independent molecular factors, which could be used to circumvent the variability in *IDH* levels and thereby improve outcome prediction. The relationship between *IDH* status and *NTRK2*²³ or *CHI3L1*²² has not yet been studied in grade II and III and was only reported in glioblastoma.

We established different prognostic subgroups based on *CHI3L1*, *NTRK2* expression levels associated with *IDH* status and *1p19q* co-deletion status. *IDH* mutation, *1p19q* co-deletion, low *CHI3L1* expression and high *NTRK2* expression defined patients with a good prognosis, whereas *IDH* wild-type, absence of *1p19q* co-deletion, high *CHI3L1*, and low *NTRK2* expression defined patients with a worse prognosis. Molecular analysis was also used to discriminate between patient groups based on *IDH* status and *1p19q* co-deletion status, as described previously^{7,47}

Our data are in agreement with those showing that *IDH* wild-type glioblastoma overexpression of *NTRK2* is associated with better OS (P = 0.049; HR: 0.66).²³ Moreover, *NTRK2* was associated with peroxisome proliferator-activated receptors α (PPAR α), which is overexpressed and correlated with a good prognosis in *IDH* wild-type primary glioblastoma²¹. Furthermore, the overexpression of *CHI3L1* was associated with mesenchymal subtype in glioblastoma (defined by *IDH* wild-type).²²

CHI3L1 expression and *IDH* status might depend on epigenetic mechanisms such as DNA methylation remodeling.⁴⁸ Indeed, introducing the *IDH* mutation into primary human astrocytes alters specific histone marks, induces extensive DNA hypermethylation, in a manner consistent with G-CIMP (glioma-CpG island methylator phenotype), which is associated with better clinical outcome of patients, as described in glioma.⁴⁹ In addition, G-CIMP-positive tumors may be less aggressive because of silencing of key mesenchymal genes in glioblastoma.⁵⁰ Since promoter methylation of *CHI3L1* leads to the loss of mesenchymal properties⁵¹, it has been suggested that a relationship may exist between *CHI3L1* expression and *IDH* methylation in which the *IDH* mutation induces *CHI3L1* promoter methylation.⁴⁹ The hypermethylation phenotype of *CHI3L1* could also result in *CHI3L1* low expression and good prognosis. However, in this study, some patients with *IDH* mutations had different gene profiles with high *CHI3L1* expression and an intermediate prognosis. In this case, the variations in *CHI3L1* expression and patient outcome may reflect another methylation mechanism involving additional pathways, such as those comprising phospho-c-jun and DNMT1.⁵¹ Unlike *CHI3L1* expression, the role of methylation in the NTRK family has not been demonstrated in glioma.³⁹

Based on the data presented here, we suggest that *CHI3L1* and *NTRK2* seemed to separate distinct molecular subgroups that could be integrated into the current classification and might to guide clinical decision in glioma management (Figure 6). Subsequently, *CHI3L1*-targeted therapy could be used to



treat patients/tumors with molecular profiles associated with a poor prognosis (*IDH* wild-type, *1p19* codeletion absent, high *CHI3L1*, and low *NTRK2*). Indeed, it have already reported that *CHI3L1* targeting affords an effective treatment of glioma in animal models^{52,53}. In the future, better treatment outcomes for patients with a worse prognosis (*IDH* wild-type, absence of *1p19* co-deletion, high *CHI3L1* expression, and low *NTRK2* expression) might be obtained by associating conventional chemotherapy with *CHI3L1*-targeted inhibitors or *NTRK2*-targeted inhibitors (Clinical trial : NCT02097810).

In clinical practice, *CHI3L1* and *NTRK2* status could be investigated in tumors by using frozen tissues or in the future by using formalin-fixed paraffin-embedded sections. If *NTRK2* is overexpressed, an anti-*NTRK2* treatment might be proposed to the patient. Whereas for tumors with *IDH* wildtype, *CHI3L1* expression analysis would seem relevant prior to searching for *NTRK2* expression. In the case of *CHI3L1* overexpression, anti-*CHI3L1* treatment might be considered.

To conclude, it appears increasingly necessary to associate the results of histological examinations with molecular marker analysis. *CHI3L1* and *NTRK2*, whose expression is associated with *1p19q* co-deletion and *IDH* status, could assist in glioma management by guiding therapeutic choice.



REFERENCES

- 1 Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, Deltour I, Fisher JL, Langer CE *et al.* The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review. *Neuro-Oncol* 2014; **16**: 896–913.
- 2 Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK *et al.* The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol (Berl)* 2016; **131**: 803–820.
- 3 Lin AL, DeAngelis LM. Reappraising the 2016 WHO classification for diffuse glioma. *Neuro-Oncol* 2017; **19**: 609–610.
- 4 Weller M, Wick W, Aldape K, Brada M, Berger M, Pfister SM *et al.* Glioma. *Nat Rev Dis Primer* 2015; **1**: 15017.
- 5 Guo C, Pirozzi CJ, Lopez GY, Yan H. Isocitrate dehydrogenase mutations in gliomas: mechanisms, biomarkers and therapeutic target. *Curr Opin Neurol* 2011; **24**: 648–652.
- 6 Malzkorn B, Wolter M, Riemenschneider MJ, Reifenberger G. Unraveling the glioma epigenome: from molecular mechanisms to novel biomarkers and therapeutic targets. *Brain Pathol Zurich Switz* 2011; **21**: 619–632.
- 7 Cancer Genome Atlas Research Network, Brat DJ, Verhaak RGW, Aldape KD, Yung WKA, Salama SR *et al.* Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *N Engl J Med* 2015; **372**: 2481–2498.
- 8 Sanson M, Marie Y, Paris S, Idbaih A, Laffaire J, Ducray F *et al.* Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2009; **27**: 4150–4154.
- 9 Leu S, von Felten S, Frank S, Vassella E, Vajtai I, Taylor E *et al.* IDH/MGMT-driven molecular classification of low-grade glioma is a strong predictor for long-term survival. *Neuro-Oncol* 2013; **15**: 469–479.
- 10 Aibaidula A, Chan AK-Y, Shi Z, Li Y, Zhang R, Yang R *et al.* Adult IDH wild-type lower-grade gliomas should be further stratified. *Neuro-Oncol* 2017; **19**: 1327–1337.
- 11 Cheray M, Petit D, Forestier L, Karayan-Tapon L, Maftah A, Jauberteau M-O *et al.* Glycosylation-related gene expression is linked to differentiation status in glioblastomas undifferentiated cells. *Cancer Lett* 2011; **312**: 24–32.
- 12 Ku BM, Lee YK, Ryu J, Jeong JY, Choi J, Eun KM *et al.* CHI3L1 (YKL-40) is expressed in human gliomas and regulates the invasion, growth and survival of glioma cells. *Int J Cancer* 2011; **128**: 1316–1326.
- 13 Pinet S, Bessette B, Vedrenne N, Lacroix A, Richard L, Jauberteau M-O *et al.* TrkB-containing exosomes promote the transfer of glioblastoma aggressiveness to YKL-40-inactivated glioblastoma cells. *Oncotarget* 2016; **7**: 50349–50364.
- 14 Chao MV. Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* 2003; **4**: 299.
- 15 Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 2006; **361**: 1545.
- 16 Jawhari S, Bessette B, Hombourger S, Durand K, Lacroix A, Labrousse F *et al.* Autophagy and TrkC/NT-3 signaling joined forces boost the hypoxic glioblastoma cell survival. *Carcinogenesis* 2017; **38**: 592–603.
- 17 Xiong J, Zhou L, Yang M, Lim Y, Zhu Y, Fu D *et al.* ProBDNF and its receptors are upregulated in glioma and inhibit the growth of glioma cells in vitro. *Neuro-Oncol* 2013; **15**: 990–1007.
- 18 Lawn S, Krishna N, Pisklakova A, Qu X, Fenstermacher DA, Fournier M *et al.* Neurotrophin signaling via TrkB and TrkC receptors promotes the growth of brain tumor-initiating cells. *J Biol Chem* 2015; **290**: 3814–3824.
- 19 Giraud S, Loum E, Bessette B, Mathonnet M, Lalloué F. P75 neurotrophin receptor is sequestered in the Golgi apparatus of the U-87 MG human glioblastoma cell line. *Int J Oncol* 2011; **38**: 391–399.
- 20 Batista KMP, Vega IF, de Eulate-Beramendi SA, Morales JCG, Kurbanov A, Asnel D *et al.* Prognostic significance of the markers IDH1 and YKL40 related to the subventricular zone. *Folia Neuropathol* 2015; **1**: 52–59.



- 21 Haynes HR, White P, Hares KM, Redondo J, Kemp KC, Singleton WGB *et al.* The transcription factor PPAR α is overexpressed and is associated with a favourable prognosis in IDH-wildtype primary glioblastoma. *Histopathology* 2017; **70**: 1030–1043.
- 22 Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD *et al.* An integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR and NF1. *Cancer Cell* 2010; **17**: 98.
- 23 Jungk C, Mock A, Exner J, Geisenberger C, Warta R, Capper D *et al.* Spatial transcriptome analysis reveals Notch pathway-associated prognostic markers in IDH1 wild-type glioblastoma involving the subventricular zone. *BMC Med* 2016; **14**: 170.
- 24 Wang H-Y, Tang K, Liang T-Y, Zhang W-Z, Li J-Y, Wang W *et al.* The comparison of clinical and biological characteristics between IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *J Exp Clin Cancer Res CR* 2016; **35**: 86.
- 25 Mesturoux L, Durand K, Pommepuy I, Robert S, Caire F, Labrousse F. Molecular Analysis of Tumor Cell Components in Pilocytic Astrocytomas, Gangliogliomas, and Oligodendrogliomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM* 2016; **24**: 496–500.
- 26 Jeuken J, Cornelissen S, Boots-Sprenger S, Gijzen S, Wesseling P. Multiplex ligation-dependent probe amplification: a diagnostic tool for simultaneous identification of different genetic markers in glial tumors. *J Mol Diagn JMD* 2006; **8**: 433–443.
- 27 Ermonval M, Petit D, Le Duc A, Kellermann O, Gallet P-F. Glycosylation-related genes are variably expressed depending on the differentiation state of a bioaminergic neuronal cell line: implication for the cellular prion protein. *Glycoconj J* 2009; **26**: 477–493.
- 28 Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nat Protoc* 2008; **3**: 1101.
- 29 Husson F, Josse J, Le S. *FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis*. 2008.
- 30 Gu Z, Eils R, Schlesner M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinforma Oxf Engl* 2016; **32**: 2847–2849.
- 31 Louis DN, Perry A, Burger P, Ellison DW, Reifenberger G, von Deimling A *et al.* International Society Of Neuropathology--Haarlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading. *Brain Pathol Zurich Switz* 2014; **24**: 429–435.
- 32 Gao K-M, Chen X, Zhang J, Wang Y, Yan W, You Y-P. A pseudogene-signature in glioma predicts survival. *J Exp Clin Cancer Res CR* 2015; **34**.
- 33 Li S, Shi J, Gao H, Yuan Y, Chen Q, Zhao Z *et al.* Identification of a gene signature associated with radiotherapy and prognosis in gliomas. *Oncotarget* 2014; **5**: 88974–88987.
- 34 Nutt CL, Mani DR, Betensky RA, Tamayo P, Cairncross JG, Ladd C *et al.* Gene expression-based classification of malignant gliomas correlates better with survival than histological classification. *Cancer Res* 2003; **63**: 1602–1607.
- 35 Shirahata M, Iwao-Koizumi K, Saito S, Ueno N, Oda M, Hashimoto N *et al.* Gene expression-based molecular diagnostic system for malignant gliomas is superior to histological diagnosis. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2007; **13**: 7341–7356.
- 36 Gravendeel LA, Kouwenhoven MC, Gevaert O, de Rooi JJ, Stubbs AP, Duijm JE *et al.* Intrinsic gene expression profiles of gliomas are a better predictor of survival than histology. *Cancer Res* 2009; **69**: 9065–9072.
- 37 Li A, Walling J, Ahn S, Kotliarov Y, Su Q, Quezado M *et al.* Unsupervised analysis of transcriptomic profiles reveals six glioma subtypes. *Cancer Res* 2009; **69**: 2091–2099.
- 38 Ceccarelli M, Barthel FP, Malta TM, Sabedot TS, Salama SR, Murray BA *et al.* Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma. *Cell* 2016; **164**: 550–563.
- 39 Palani M, Arunkumar R, Vanisree AJ. Methylation and Expression Patterns of Tropomyosin-Related Kinase Genes in Different Grades of Glioma. *NeuroMolecular Med* 2014; **16**: 529–539.
- 40 Rutkowski S, von Bueren A, von Hoff K, Hartmann W, Shalaby T, Deinlein F *et al.* Prognostic relevance of clinical and biological risk factors in childhood medulloblastoma: results of patients treated in the prospective multicenter trial HIT'91. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2007; **13**: 2651–2657.



- 41 Assimakopoulou M, Kondyli M, Gatzounis G, Maraziotis T, Varakis J. Neurotrophin receptors expression and JNK pathway activation in human astrocytomas. *BMC Cancer* 2007; **7**: 202.
- 42 DeWitt J, Ochoa V, Urschitz J, Elston M, Moisyadi S, Nishi R. Constitutively active TrkB confers an aggressive transformed phenotype to a neural crest derived cell line. *Oncogene* 2014; **33**: 977–985.
- 43 Wadhwa S, Nag TC, Jindal A, Kushwaha R, Mahapatra AK, Sarkar C. Expression of the neurotrophin receptors Trk A and Trk B in adult human astrocytoma and glioblastoma. *J Biosci* 2003; **28**: 181–188.
- 44 Steponaitis G, Skiriutė D, Kazlauskas A, Golubickaitė I, Stakaitis R, Tamašauskas A *et al.* High CHI3L1 expression is associated with glioma patient survival. *Diagn Pathol* 2016; **11**: 42.
- 45 Qin G, Li X, Chen Z, Liao G, Su Y, Chen Y *et al.* Prognostic Value of YKL-40 in Patients with Glioblastoma: a Systematic Review and Meta-analysis. *Mol Neurobiol* 2017; **54**: 3264–3270.
- 46 Thuy MNT, Kam JKT, Lee GCY, Tao PL, Ling DQ, Cheng M *et al.* A novel literature-based approach to identify genetic and molecular predictors of survival in glioblastoma multiforme: Analysis of 14,678 patients using systematic review and meta-analytical tools. *J Clin Neurosci* 2015; **22**: 785–799.
- 47 Eckel-Passow JE, Lachance DH, Molinaro AM, Walsh KM, Decker PA, Sicotte H *et al.* Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors. *N Engl J Med* 2015; **372**: 2499–2508.
- 48 Kessler T, Sahm F, Sadik A, Stichel D, Hertenstein A, Reifenberger G *et al.* Molecular differences in IDH wildtype glioblastoma according to MGMT promoter methylation. *Neuro-Oncol* 2018; **20**: 367–379.
- 49 Turcan S, Rohle D, Goenka A, Walsh LA, Fang F, Yilmaz E *et al.* IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature* 2012; **483**: 479–483.
- 50 Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, Phillips HS, Pujara K, Berman BP *et al.* Identification of a CpG Island Methylator Phenotype that Defines a Distinct Subgroup of Glioma. *Cancer Cell* 2010; **17**: 510–522.
- 51 Heiland DH, Ferrarese R, Claus R, Dai F, Masilamani AP, Kling E *et al.* c-Jun-N-terminal phosphorylation regulates DNMT1 expression and genome wide methylation in gliomas. *Oncotarget* 2016; **8**: 6940–6954.
- 52 Faibish M, Francescone R, Bentley B, Yan W, Shao R. A YKL-40-neutralizing antibody blocks tumor angiogenesis and progression: a potential therapeutic agent in cancers. *Mol Cancer Ther* 2011; **10**: 742–751.
- 53 Akiyama Y, Ashizawa T, Komiyama M, Miyata H, Oshita C, Omiya M *et al.* YKL-40 downregulation is a key factor to overcome temozolomide resistance in a glioblastoma cell line. *Oncol Rep* 2014; **32**: 159–16



FIGURES AND LEGENDS

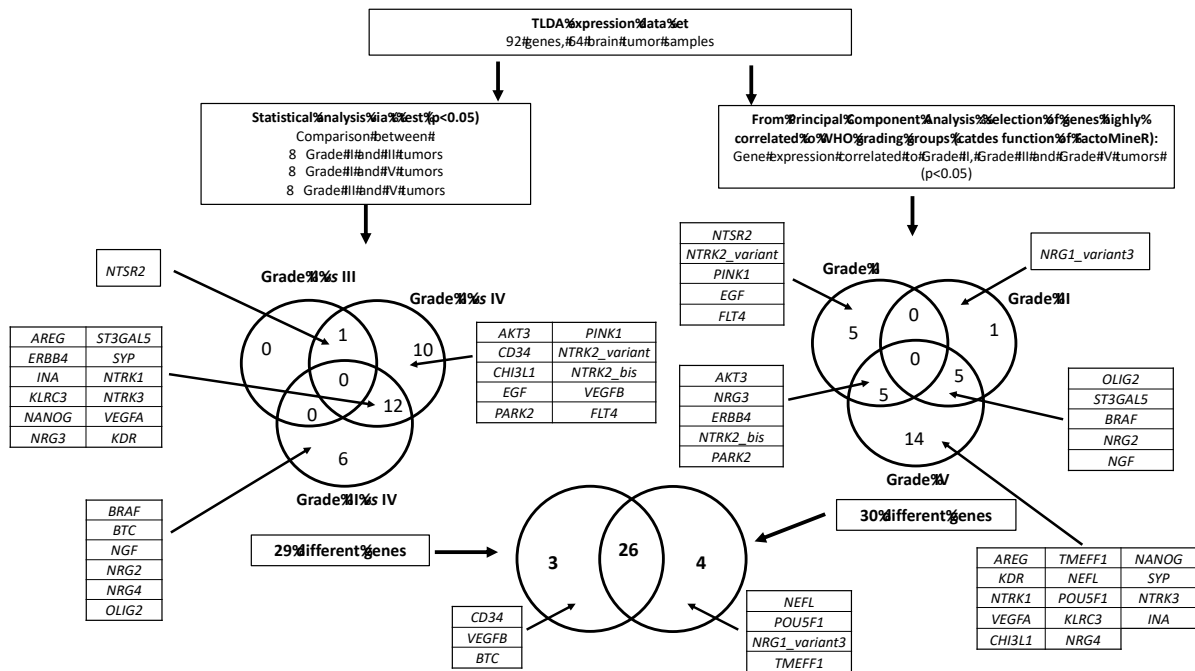


Figure 1 : Venn diagram of gene selection in the French cohort: Intersections between sets indicate the numbers of shared genes, whereas the numbers of specific genes are shown in set-specific areas. From 64 tumor samples, 92 genes were analyzed, and 26 genes were selected from the cross-section of two statistical methods (t test and principal component analysis).



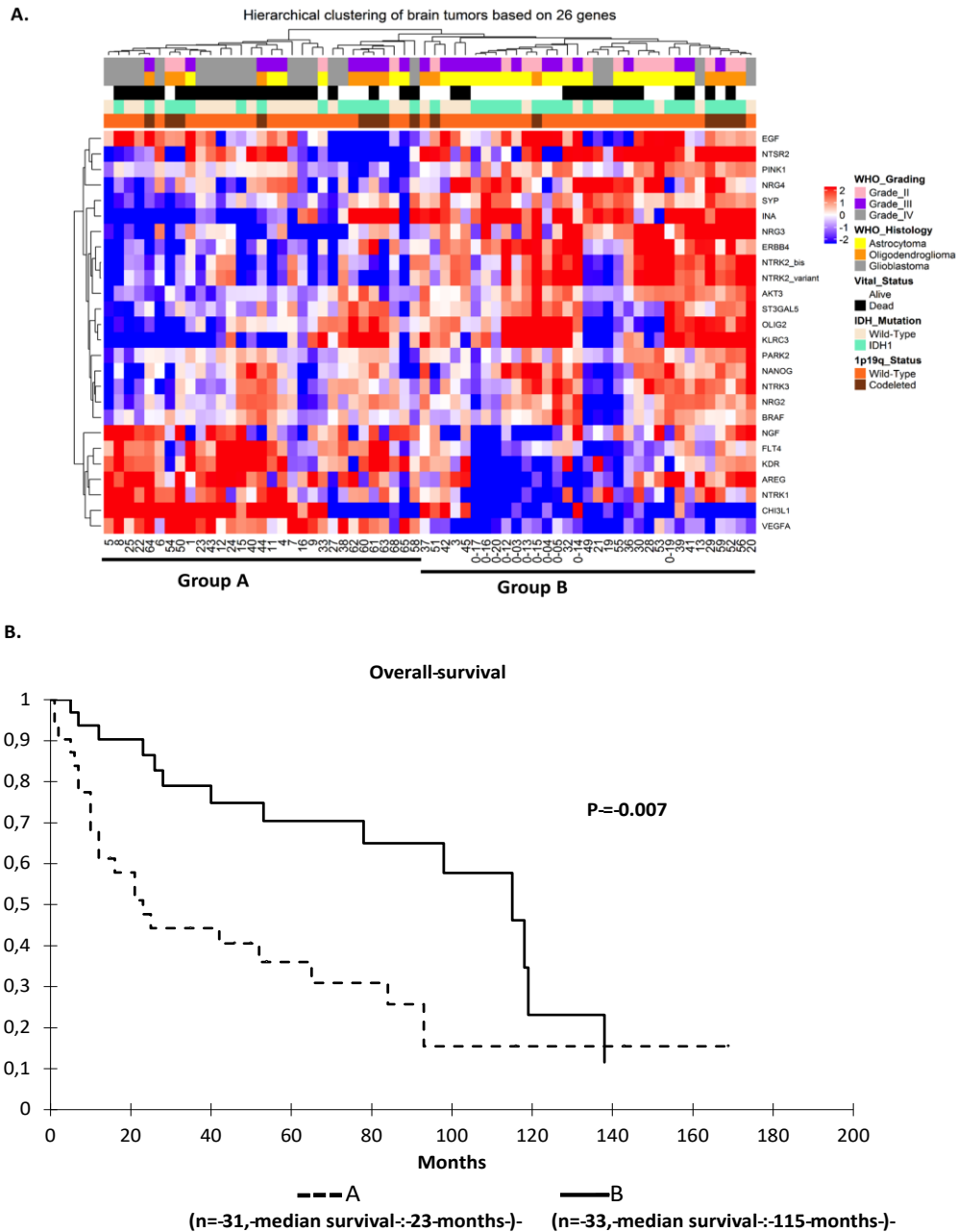


Figure 2:
 A. Hierarchical clustering of brain tumors based on the expression profile of 26 genes in the French cohort:

Log₂-transformed and mean-centered fold-change values from 26 genes fulfilling the criteria of statistically significant deregulation between two different stages of glioma ($P < 0.05$). Red and blue colors indicate transcript levels above and below the median values, respectively. Tumor samples are identified by a number, and genes by their symbols. Each column indicates the gene expression profile of a sample, and each line indicates the variations in the level of expression of a given gene among tumor samples. The length of the branches on the trees forming the dendrograms on the top of each panel reflects the degree of similarity between samples. Subdivision of samples into two groups according dendrogram is subsequently used for survival analysis.

B. Overall survival in the French cohort by Kaplan Meier analysis: Survival group A (dotted line) defined unfavorable prognosis, and survival group B (solid line) defined favorable prognosis ($P = 0.007$). P-values were calculated using the log-rank test.



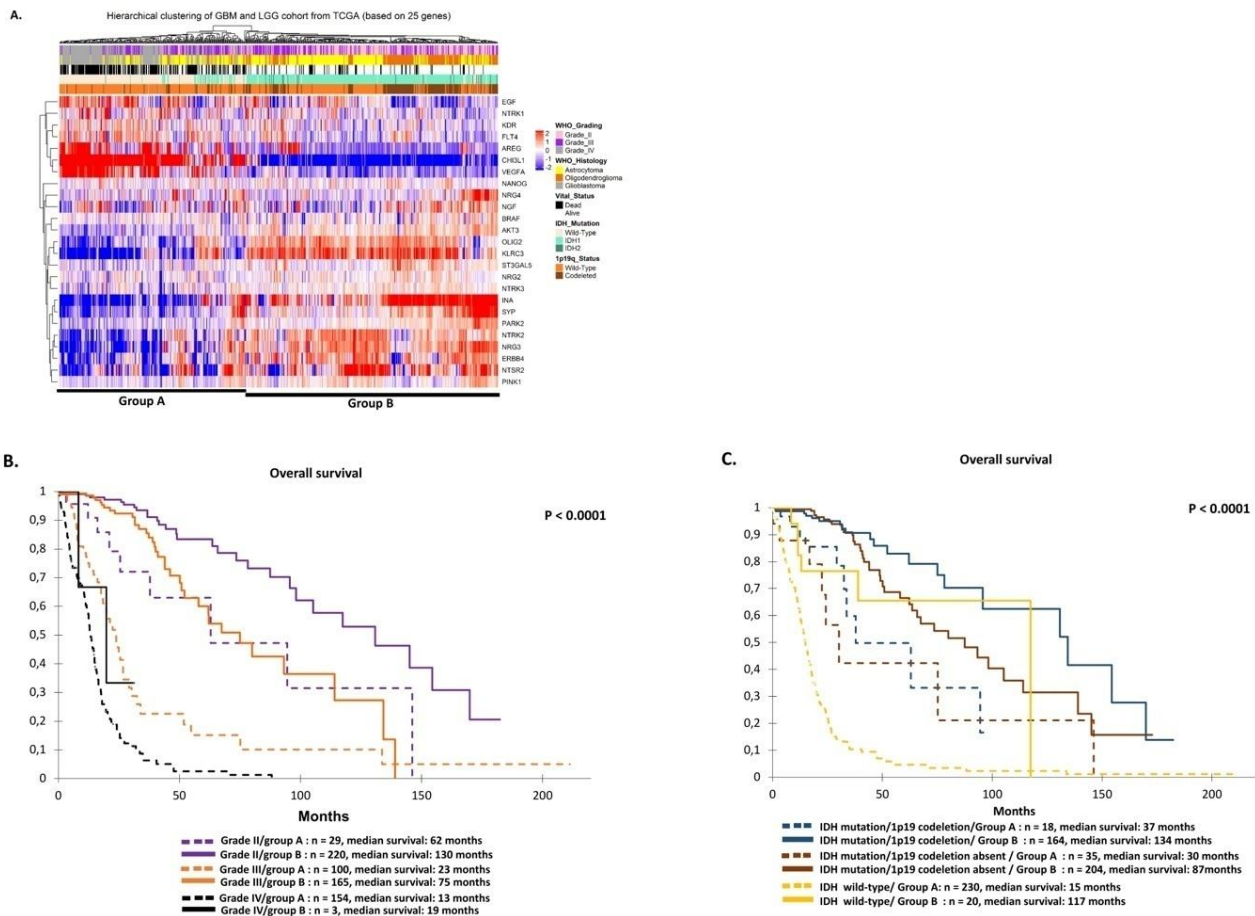


Figure 3

A. Hierarchical clustering of brain tumors based on the TCGA cohort: Hierarchical clustering of 671 gliomas based on 26 genes – fold change values (as compared to normal brain) was generated using Pearson correlation distance measure and average linkage. Analysis on TCGA samples was been performed in the same way of Figure 2A.

B. Overall survival curves according to grade and 26-genes signature in the French cohort Independently of the grade survival group A (dotted line) defined unfavorable prognosis, and survival group B (solid line) defined favorable prognosis ($P < 0.0001$) by Kaplan Meier analysis. P-values were calculated using the log-rank test.

C. Kaplan-Meier overall survival curves of molecular groups and 26-genes signatures in the French cohort. Independently of the grade survival group A (dotted line) defined unfavorable prognosis, and survival group B (solid line) defined favorable prognosis ($P < 0.0001$). P-values were calculated using the log-rank test.



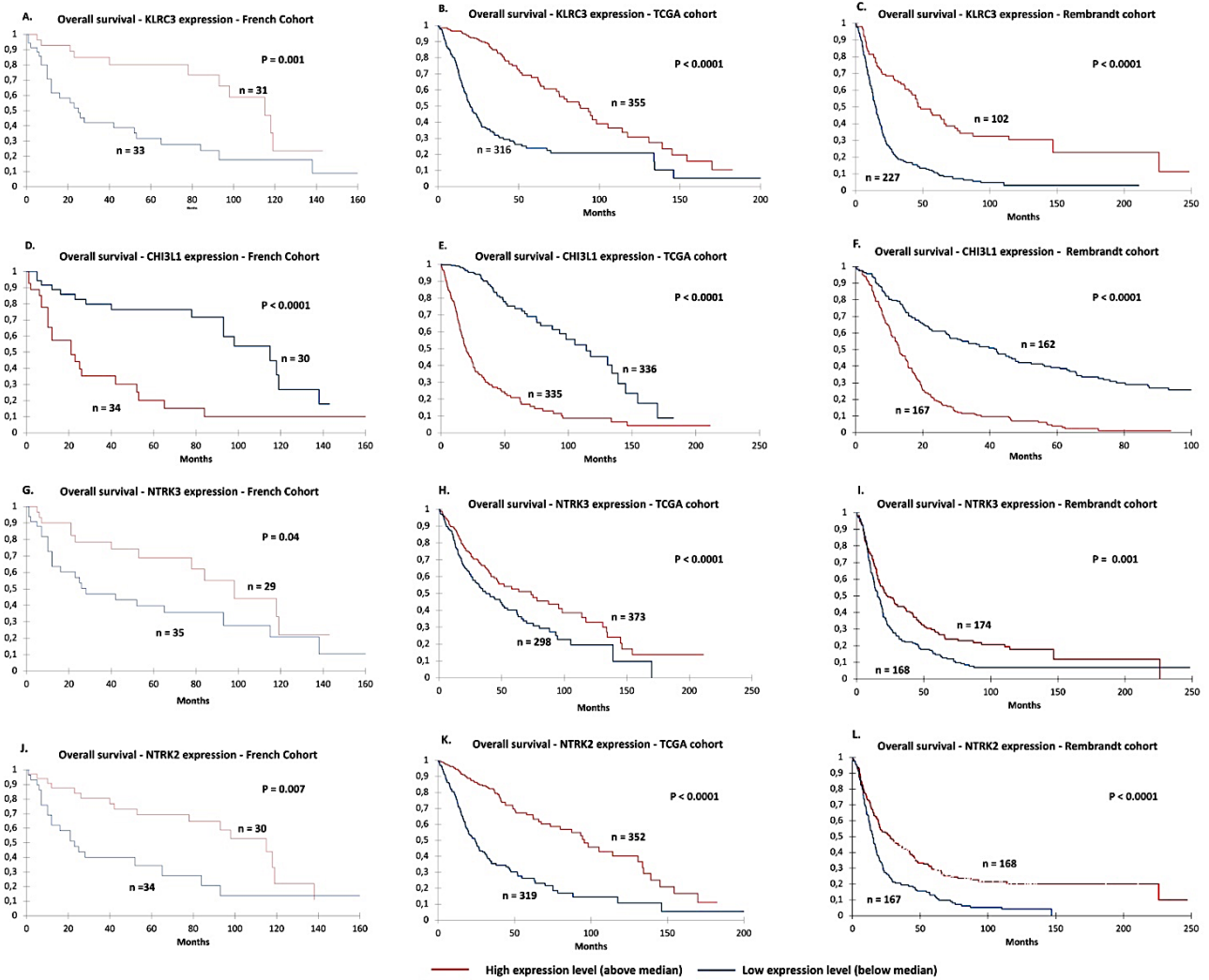


Figure 4: Overall survival according to gene differential expression by by Kaplan Meier analysis: Differential expression of KLRC3, CHI3L1, NTRK3, and NTRK2 in glioma from the French, TCGA, and REMBRANDT cohorts. Red line represents high expression of gene (above the median), and blue line low expression (below the median). P-values were calculated using the log-rank test.



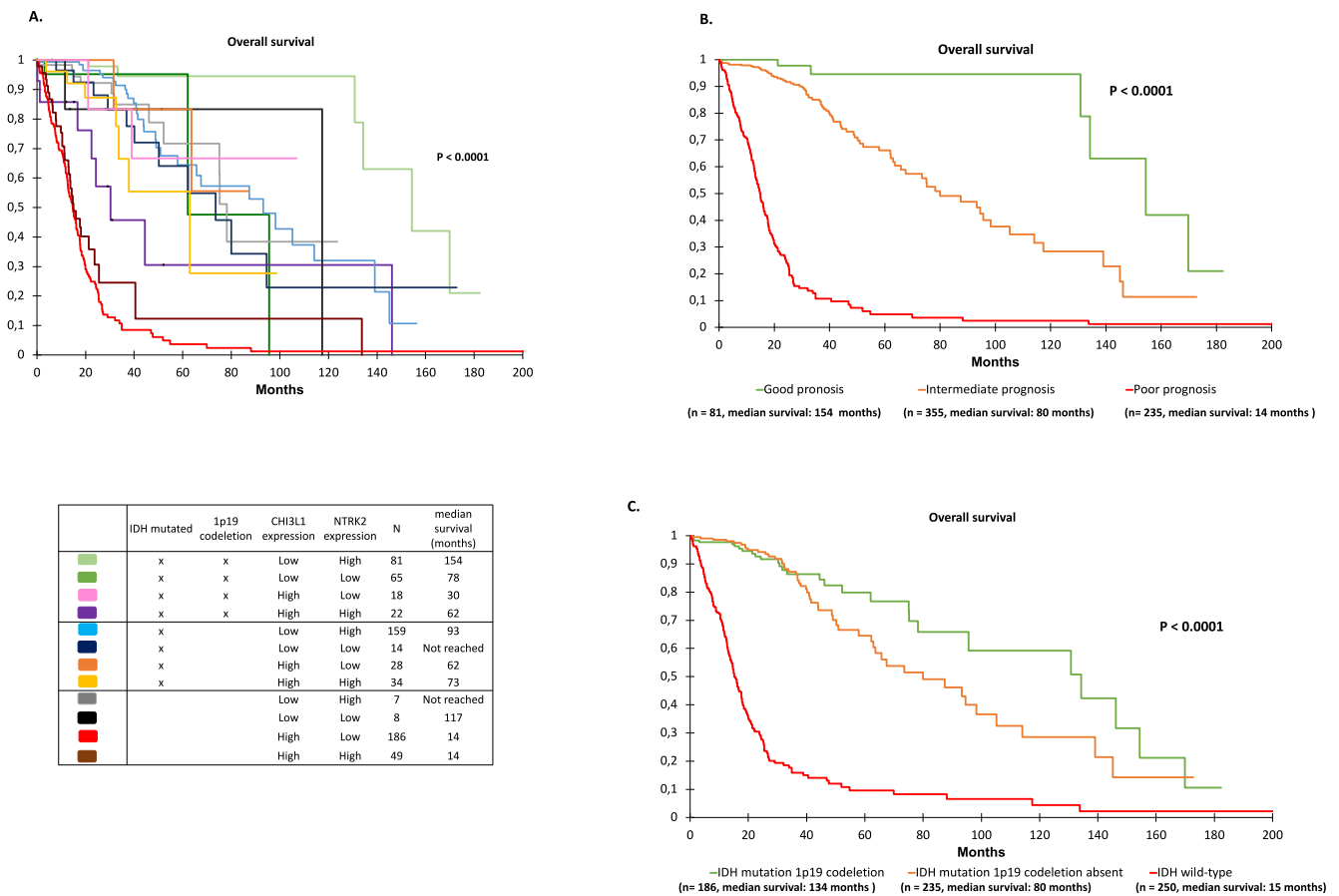


Figure 5

A. Overall survival in each glioma molecular group according to IDH status and 1p19q codeletion by Kaplan Meier analysis: Three groups were identified different prognosis ($P < 0.0001$) P-values were calculated using the log-rank test.

B. Overall Survival in each Glioma Molecular groups by Kaplan Meier analysis

Nine groups were identified with different prognosis ($P < 0.0001$). P-values were calculated using the log-rank test.

C. Overall Survival in three Glioma Molecular groups by Kaplan meier analysis. Three molecular groups were identified: a poor prognosis group combining *IDH*-wildtype status, no codeletion 1p19q, high *CHI3L1* expression and low *NTRK2* expression ; a very good prognosis group combining *IDH*-mutated, codeletion 1p19q, low *CHI3L1* expression and high *NTRK2* expression and intermediate prognostic group combining the other associations ($P < 0.0001$). P-values were calculated using the log-rank test.



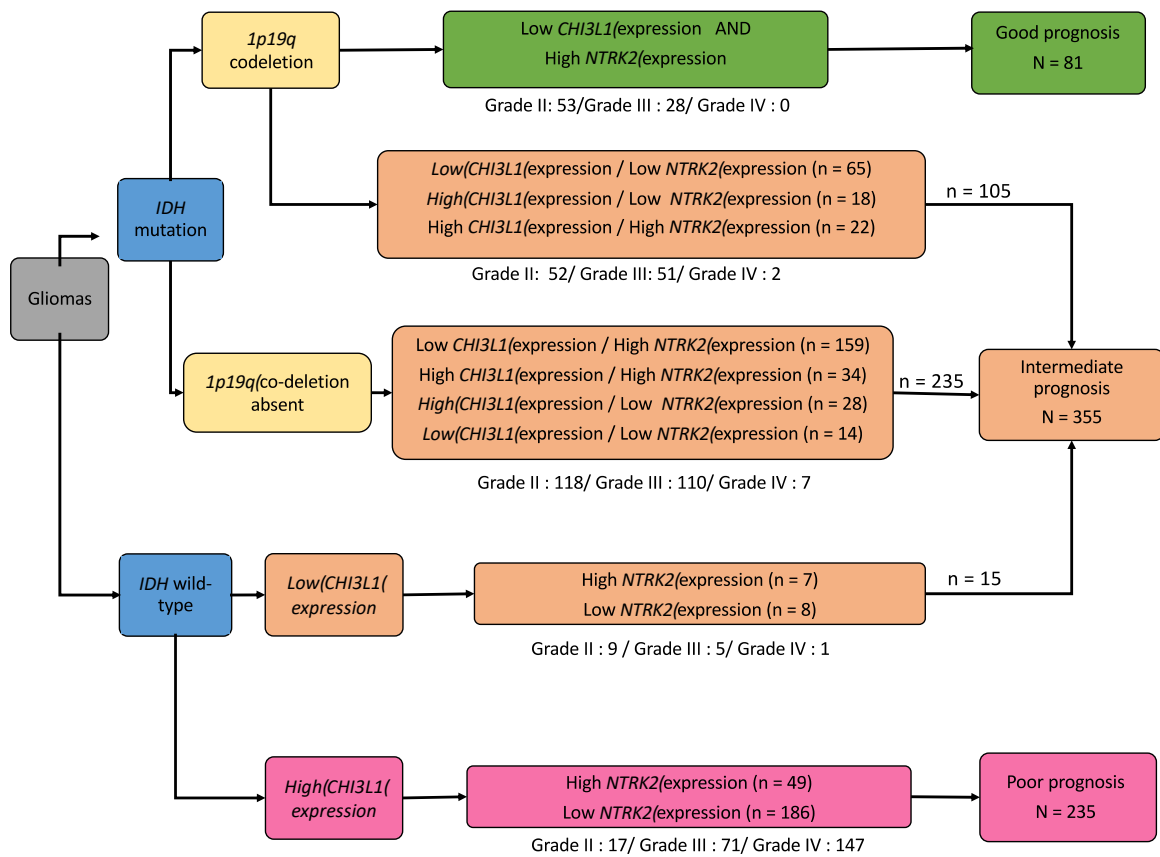
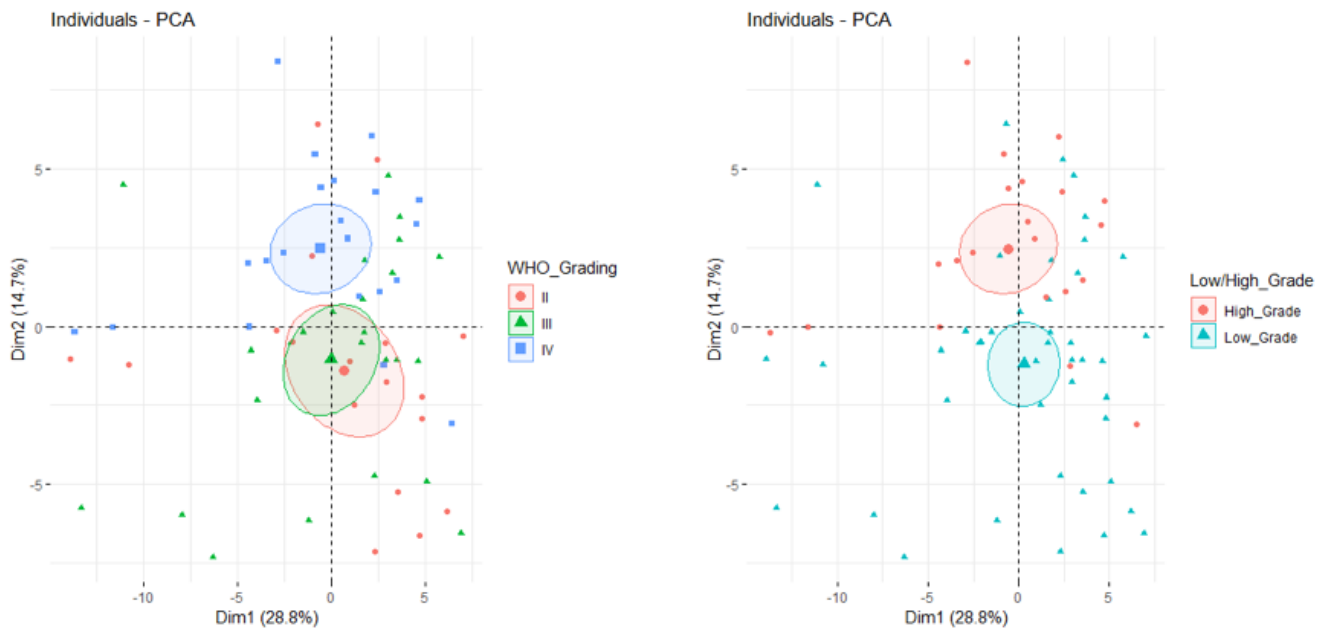


Figure 6: Schematic flow chart summarizing the conclusions of the study. Three molecular subgroups based on *IDH* mutation, *1p/19q* co-deletion, and *CHI3L1* and *NTRK2* gene expression statuses were identified and showed distinct clinical presentations with different prognoses.

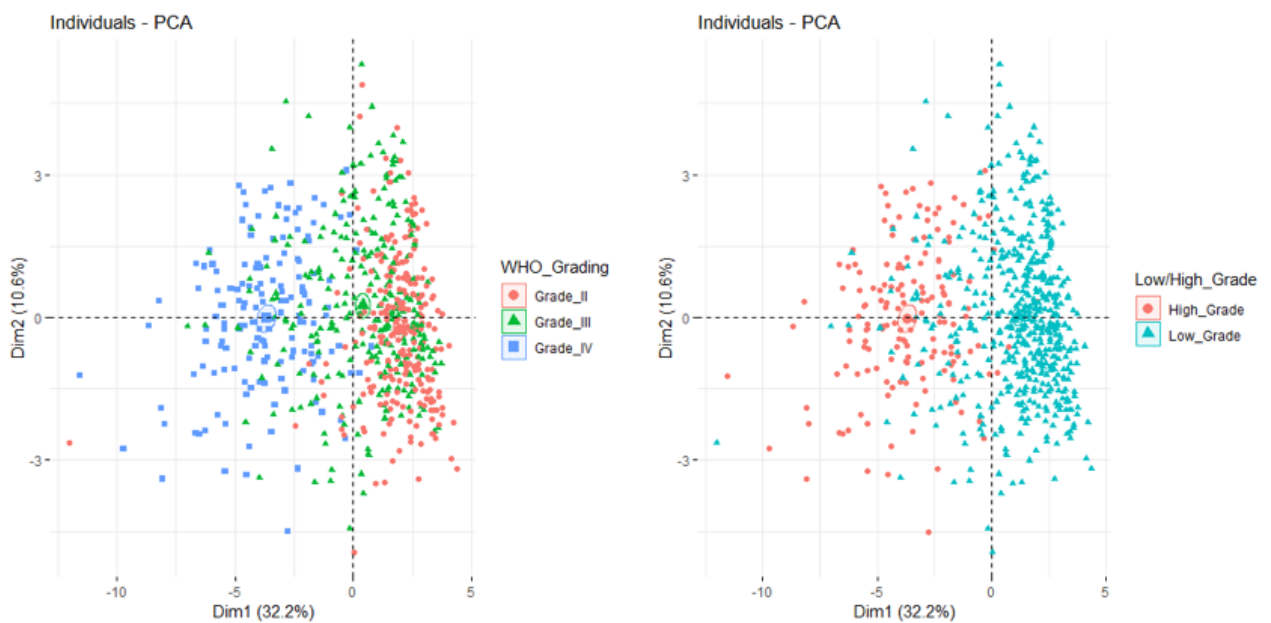


Supplementary Figure S1: Classification of gliomas by principal component analysis in the French cohort



Principal component analysis of the French cohort of gliomas based on the expression of 26 genes.

Supplementary Figure S2: Classification of gliomas by principal component analysis in the TCGA cohort



Principal component analysis of an independent dataset of gliomas (TCGA cohort) based on the expression of 26 genes



Supplementray S1 : Annexe 2-Custom-made human-specific TaqMan® micro-fluidic cards containing panels of 96 gene expression assays

Supplementary Table S2: Clinical and histological characteristics of the French cohort according to molecular group

Characteristics	Total	Group A	Group B	P-value
N	64	31	33	
Age, years				
Median	47.5	55.0	40.0	0.0024
Range	22–81	26–81	22–80	
Sex				
Female/male	26/38	12/19	14/19	0.7
Surgical approach, n (%)				
Complete resection	29 (45)	11 (35)	18(54)	0.12
Subtotal resection	35 (55)	20 (65)	15(46)	
Histology, n (%)				
Astrocytoma (II/III/IV)	7/22/21	4/4/17	8/13/4	0.0002
Oligodendroglioma (II/III)	6/8	0/6	6/2	
<i>IDH</i> mutant/ <i>IDH</i> wild-type	36/28	14/17	22/11	0.04
1p19q codeletion: yes/no	14/50	6/25	8/25	0.6
Localization, n (%)				
Frontal	30 (46)	15 (48)	15 (45)	0.2
Temporal	19 (30)	7 (23)	12 (37)	
Parietal	11 (18)	8 (25)	3 (9)	
Occipital	4 (6)	1 (4)	3 (9)	
Radiotherapy in first line, n (%)	44 (69)	25 (80)	19 (63)	0.04
Chemotherapy in first line, n (%)	35 (54)	20 (64)	15 (51)	0.1

P-value was calculated for all patients in the histology and localization groups by chi-square test.

Supplementary Table S3: Clinical and histological characteristics of the TCGA cohort

Characteristics	Total	Group A	Group B	P-value
Number	671	283	388	
Age, years				
Median	46.0	58.0	38.0	< 0.001
Range	18–89	21–89	18–87	
Histology				
Astrocytomas (II/III/IV)	141/186/152	22/90/149	119/96/3	< 0.001
Oligodendrogliomas (II/III)	105/79	7/10	98/69	
<i>IDH</i> mutant/ <i>IDH</i> wild-type	421/250	53/230	368/20	< 0.001
1p19q codeletion: yes/no	197/474	31/252	166/222	< 0.001



Supplementary Table S4 Univariate and Multivariate Cox Proportional-Hazards Models for gliomas in TCGA cohort

	No. of Patients	Overall survival			
		Univariate		Multivariate	
		HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p
Age at diagnosis	671	1.067 (1.05-1.07)	< 0.0001	1.033 (1.02-1.04)	< 0.0001
Histologic type					
Astrocytoma	487	Reference	< 0.0001	Reference	
Oligodendroglioma	184	0.075 (0.0001- 0.14)		0.775 (0.37-1.59)	0.489
Grade					
II	246	Reference		Reference	
III	265	3.185 (2.16-4.69)	< 0.0001	1.93 (1.28-2.91)	0.002
IV	152	19.313 (13.01 -28.67)	< 0.0001	3.65 (2.17-6.14)	< 0.0001
Molecular group					
Poor prognosis group	235	29.129 (12.80-66.26)	< 0.0001	7.55 (2.69-21.20)	0.0001
Intermediate group	355	3.347 (1.455- 7.702)	0.004	2.69 (1.07-6.77)	0.035
Good prognosis group	81	Reference		Reference	

Supplementary Table S5: Multivariate logistic regression model for IDH mutation

Factors	OR (95% CI)	p
Grade (II vs III vs IV)	0.101 (0.04- 0.2)	< 0.0001
<i>CHI3L1</i> expression (Low vs High)	11.8 (6.0-23.2)	< 0.0001
<i>NTRK2</i> expression (Low vs High)	0.3 (0.2-0.5)	0.0001
<i>1p19</i> codeletion (present vs absent)	25.0 (13.7-468.8)	< 0.0001

OR: Odds ratio; CI: confidence interval



Article 2

TrkB and p75^{NTR}, two biomarkers of aggressiveness in glioma

TrkB and p75^{NTR}, deux biomarqueurs d'agressivité dans les gliomes

Publication en cours de finalisation

Les neurotrophines et leurs récepteurs font l'objet de recherches fondamentales au sein de l'équipe EA3842-CAPTUR. Les études précédentes ont démontré que TrkB et p75^{NTR} sont exprimés dans les glioblastomes. Ces 2 récepteurs ont également été caractérisés dans les exosomes. Leur transfert via ces microvésicules extracellulaires permettrait de disséminer les propriétés d'agressivité de certaines cellules et ainsi d'accroître l'agressivité des cellules cibles (Giraud et al., 2011; Pinet et al., 2016).

La fonction de TrkB et de son ligand BDNF a été précisée dans les neuroblastomes. TrkB est fortement exprimé dans les neuroblastomes de pronostic défavorable et fréquemment associé à une amplification de *MYCN* (Nakagawara et al., 1994). Son expression est associée à l'invasion cellulaire, à des métastases, à une résistance aux médicaments et à l'expression accrue des facteurs angiogéniques (Ho et al., 2002).

TrkB et de son ligand BDNF ont été retrouvés dans la lignée cellulaires de gliomes murins C6 glioma et au sein de tissus astrocytaires (Assimakopoulou et al., 2007; Wadhwa et al., 2003; Wang et al., 1998; Xiong et al., 2013a, 2013b, 2015). Cependant, l'implication de TrkB dans les gliomes reste l'objet de controverses : l'expression de TrkB a été corrélée à une faible-malignité (Wadhwa et al., 2003), parfois elle a été corrélée à un grade élevé de malignité (Xiong et al., 2015). Enfin, certains auteurs n'ont mis en évidence aucun lien avec le grade tumoral (Assimakopoulou et al., 2007; Wang et al., 1998).

Dans le travail précédent (article 1), nous avons mis en évidence que les changements du niveau d'expression du gène *NTRK2* améliorerait la stratification des gliomes. Dans cette étude, nous avons cherché à quantifier le niveau d'expression protéique de TrkB et de son co-récepteur p75^{NTR} chez 89 patients (dont 42 analysés précédemment par transcriptomique). Cette étude immunohistochimique a été menée avec un anticorps dirigé contre le domaine extracellulaire de TrkB afin de garantir la détection de toutes les isoformes de ce récepteur.



L'objectif est double (1) corrélérer le lien entre l'expression de ces deux marqueurs dans les cellules tumorales avec l'agressivité tumorale et le statut *IDH* de celle-ci, (2) déterminer le degré de corrélation entre l'expression différentielle des transcrits et des protéines .

Dans cette étude, nous montrons qu'une expression élevée de TrkB et p75^{NTR} est liée à l'agressivité tumorale (glioblastome) et ce de façon indépendante du statut *IDH*. Pour la première fois, nous démontrons que TrkB est exprimé dans les oligodendrogliomes contrairement aux résultats obtenus par Wang et al. (Wang et al., 1998). La co-expression de TrkB et p75^{NTR} identifie une tumeur de grade IV.

Nos résultats montrent également une corrélation inverse entre l'expression transcriptomique et protéomique de TrkB à la différence de Xiong et al. (Xiong et al., 2015). Cette observation n'est pas valable pour CHI3L1 puisque l'augmentation du niveau d'expression du transcrit est directement corrélée à celle de la protéine (données non présentées).

Les divergences enregistrées sur TrkB ne nous ont pas permis de trouver une base de données incluant une population plus importante afin de conforter ou d'infirmer nos résultats.

Les divergences entre les données du transcriptome et du protéome peuvent résulter d'anomalies techniques, (tel des biais dans les méthodes de détection), des cinétiques de synthèse et de dégradation des transcrits, de leur stabilité intrinsèque *in vivo* et *ex vivo*, des effecteurs pouvant moduler la traduction des ARNm en protéines (Modelska et al., 2015).

Actuellement l'analyse du transcriptome s'effectue sur le tissu congelé alors que l'analyse protéomique s'effectue sur tissus inclus en paraffine. Une des pistes à explorer, pour évaluer de manière fiable le lien entre les deux techniques, sera d'extraire l'ARN à partir du tissu paraffiné.



TrkB and p75^{NTR}, two biomarkers of aggressiveness in glioma

Authors: Deluche Elise^{1,2}, Duchesne Mathilde³, Durand Stephanie^{4,5}, Bentayeb Hafidha¹, Robert Sandrine^{1,3}, Barbara Bessette¹, Chauvanel Alain^{1,3}, Sadaa Sofiane¹, Caire François⁶, Rigau Valérie⁷, Labrousse François^{1,3}, Jauberteau Marie-Odile^{1,8}, Durand Karine^{1,3}, and Lalloué Fabrice¹

Affiliations:

1. EA3842 CAPTuR, University of Limoges, Faculty of Medicine, 2 Rue du Docteur Marcland, 87025 Limoges, France
2. Department of Medical Oncology, Limoges University Hospital, 2 rue Martin Luther King, 87042 Limoges, France
3. Department of Pathology, Limoges University Hospital, 2 rue Martin Luther King, 87042 Limoges, France
4. Bioinformatics team, BISCEM platform, CBRS, 2 rue du Docteur Marcland, 87025 Limoges, France
5. EA7500 PEREINE, University of Limoges, 123 av. Albert Thomas, 87060 Limoges, France
6. Department of Neurosurgery, Limoges University Hospital, 2 rue Martin Luther King, 87042 Limoges, France
7. Department of Neuropathology and INSERM U1051, Hospital Saint Eloi - Gui de Chauillac, 80 av. Augustin Fliche, 34090, Montpellier, France
8. Department of Immunology, Limoges University Hospital, 2 rue Martin Luther King, 87042, Limoges, France

Background: The purpose of this study was to clarify the expression of neurotrophin receptors TrkB and p75^{NTR} in gliomas of all grades and distinct histology according to WHO classification. Then we evaluated the relation between transcriptome and proteome expression.

Methods: Adult patients with glioma and controls were included and their tissues analyzed by immunohistochemistry (IHC). The Hirsch score was used to evaluate the expression level of TrkB and p75^{NTR}. Expression of ARNm were analysed by qRT-PCR.

Results: Eighty-nine cases were analyzed by IHC (84 patients). The level of expression of TrkB and p75^{NTR} increased significantly according to the grade ($p = 0.0014$ and $p = 0.02$, respectively) regardless of histological type and *IDH* status. The combined use of p75^{NTR} and TrkB improved the differentiation of grade II tumors from grade III ($p = 0.04$) and IV tumors ($p = 0.003$). There was an inverse correlation between protein and mRNA for TrkB ($r = 0.61$, $p < 0.001$). Kaplan–Meier method revealed that high TrkB and p75^{NTR} expression correlated significantly with shorter overall survival ($p = 0.022$ and $p = 0.03$).

Conclusion: Overexpression of TrkB and p75^{NTR} was associated with a poor prognostic factor in glioma regardless of their histology.



INTRODUCTION

Gliomas are the most common primary brain tumors of the central nervous system and are often of unfavorable prognosis. Gliomas are currently classified by the World Health Organization (1). One way to improve the clinical management of gliomas is to identify molecular biomarkers that distinguish subgroups independent of the histological features.

As the involvement of Trk receptors and their ligand in tumor pathogenesis was reevaluated in gliomas, TrkA, TrkB and TrkC and their ligand NGF, BDNF, and neurotrophin 3 (NT3) seem to be promising biomarkers of glioma (2–5). Among them, TrkB and its ligand BDNF were highly expressed in unfavorable prognostic neuroblastomas (6,7). In the same way, TrkB expression was associated with cellular invasion, metastasis, drug resistance, and expression of angiogenic factors (8). Conversely, in glioma, the role of TrkB remains a subject of controversies (2,5,9–12) but it was observed to be related to proliferation (13). TrkB can act directly or indirectly on p75 neurotrophin receptor (p75^{NTR}) (14,15). Overexpressed p75^{NTR} is associated with a group of poorly prognostic gliomas and is implicated in stem cell proliferation, invasion, and tumor aggressiveness of glial tumors (16). In previous studies conducted on cell lines, we showed that TrkB and p75^{NTR} could be required for tumor aggressiveness (17,18). We highlighted previously that *NTRK2* was an independent marker associated with overall survival.

The development in neuroblastoma xenografts of TrkB inhibitors (GNF.4256; CEP.751) as treatments (19,20) led us to suppose if this approach could be applied to gliomas. Then, we assessed the expression of TrkB and p75^{NTR} in gliomas to clarify the expression of neurotrophin receptors TrkB and p75^{NTR} in gliomas of all grades and distinct histology according to the WHO classification. In a second aim we evaluated the relation between transcriptome and proteome expression of TrkB.



MATERIALS AND METHODS

Patients and tumor samples

Glioma samples were obtained from 53 adult patients who underwent surgery at Limoges and Montpellier University Hospitals from 1993 to 2013. Gliomas, initially classified according to the 2007 classification, were refined according 2016 WHO grading. All patients were naïve for chemotherapy and radiotherapy. Clinical and survival data were obtained for all patients followed until death or censored at the date of last follow up.

In addition, we compared our cohort with a commercially available tissue microarrays (Biomax Inc., Rockville, MD, USA; cat. No. GL807, [http:// www.biomax.us](http://www.biomax.us)) consisting in 34 cases of tumor (2 anaplastic oligodendroglioma, 23 astrocytoma, 9 glioblastoma) and 5 normal tissues.

Immunohistochemistry

One part of the surgical specimen was fixed in 4% paraformaldehyde at the time of resection and then embedded in paraffin and sections were cut and stained with hematoxylin-eosin-saffron (HPS). The other part was snap-frozen in liquid nitrogen upon surgical removal and stored at -80°C until molecular analysis.

For immunohistochemistry (IHC), the tissue microarrays (TMA) were assembled using a tissue-arraying instrument (MiniCore, Excilone, Plaisir, France). In each case, we collected a mean of three 2-mm tissue cores from areas of the tumor representative in terms of their histological subtype. Whenever possible, duplicate cores per case were used to prevent loss of information. We cut 5 mm-thick paraffin sections from TMA blocks.

Two analyzes are made, a control colored by the HPS and one with the antibody of interest. Commercially available antibodies were utilized for TrkB (Clone 75133, MAB397, R&D System, dilution: 1/200) and p75^{NTR} ((H-137): sc-8317, Santa Cruz, dilution: 1/300) according to the protocols supplied by the antibody manufacturers.

The staining of each tissue core was scored as described by Hirsh and al. (21). A semiquantitative grading score was obtained by multiplying the intensity of staining (0 = negative, 1 = trace, 2 = weak,



3 = intermediate, 4 = strong) by the percentage of tumor cells stained (0 to 100%) for scores ranging from 0 to 400. The final score is an average among the two core samples for each patient and the scores for two independent and blind readings. The expression level of each protein was defined by median score.

Total RNA extraction from human tumor samples

Tumor tissue (4–40 mg) was incubated with ceramic balls CK14 (Ozyme) and lysis buffer (QiaZol, Lysis Reagent, Qiagen) and then pulverized using a Precellys 24 homogenizer (Précellys24[®], Ozyme). RNA concentration was estimated by spectrophotometry (NanoDrop ND1000, Labtech). RNA quality was assessed by capillary electrophoresis (RNA 6000 Nano Kit, Bioanalyzer 2100, Agilent Technologies) and only samples with RNA Integrity Number (R.I.N.) greater than 6 were used for analysis.

Quantitative and qualitative RT-PCR

The expression levels of *p75^{NTR}* and *TrkB* genes in glioma tissues were determined by RT-qPCR. Complementary DNA (cDNA) was synthesized from 1 µg of total RNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit[®] (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol. The data were analyzed using the 2- $\Delta\Delta$ Ct method (22). Quantitative data were normalized relative to *HPRT1*.

Ethics statement

The use of human tissue in the present study was approved by the Ethics Committee of Limoges University Hospital (AC-2013-1853, DC-2011-1264). Paraffin-embedded blocks were obtained from the Tumor Biobank (CRBiolim) of Limoges University Hospital and from the Biological Resource Center of Montpellier University Hospital (CRB-CHUM; <http://www.chu-montpellier.fr>; Biobank ID: BB-0033-00031).

Statistical analysis



Data were analyzed using Statview® (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) and R (www.r-project.org). Quantitative results were expressed as means \pm SD. Percentages and medians were compared using parametric or non-parametric tests for ordinal variables depending on the size of the groups (Mann-Whitney test, Kruskal-Wallis test, Student's t test). Principal component analysis (PCA) and analysis of similarity (ANOSIM) were performed with Past v3.15 software.

The overall survival (OS) was calculated from the date of initial surgery/biopsy to the date of death or date of last follow-up. Tests or comparisons were considered significant when $P \leq 0.05$.



RESULTS

Histological characteristics of tumors including in TMA

Eighty-four patients (31 women and 53 men; median age: 44 years; range: 18–81) were included (Table 1). The population comprised patients with astrocytoma ranging from grade II to grade IV (grade II, $n = 19$; grade III, $n = 31$; grade IV, $n = 16$), oligodendroglioma ranging from grade II to grade III (grade II, $n = 5$ and grade III, $n = 8$) and 5 normal tissues.

Expression of TrkB and p75^{NTR} in glioma tissues

Immunostaining for TrkB was detected at base level in the neuronal cytoplasm of control tissues. The semi-quantitative analysis revealed that the immunohistological expression of TrkB significantly increased from grade II glioma to glioblastoma ($P = 0.0014$). Thus, strong staining for TrkB was in glioblastoma tissues and low staining in grade II glioma (Figure 1). Low expression of TrkB was characterized by a mean score at 12 (0-50) whereas high expression by a mean score at 151 (50-340).

Strong staining for p75^{NTR} occurred in glioblastoma tissues and low staining in grade II glioma tissues. The semi-quantitative analysis revealed that p75^{NTR} immunostaining was increased according to the grade of tumor ($P = 0.02$) (Figure 1). Low expression of p75^{NTR} was characterized by a mean score at 21 (0-60) whereas high expression by a mean score at 151 (50-340).

Immunostaining of TrkB and p75^{NTR} were similar in astrocytoma and oligodendroglioma tumor ($P > 0.05$) and were *IDH* status-independent ($P > 0.05$).

Correlation between combination of TrkB, p75^{NTR} and grade

Weak correlation existed between the presence of p75^{NTR} and TrkB ($R = 0.42$, $P = 0.002$).

Differences were visualized by PCA among the grades; the expression of these two markers increased with the grading: the highest p75^{NTR} and TrkB expressions were associated with grade IV whereas lower expressions were related with grade II. ANOSIM indicated that there exists at least dissimilarity among three groups. Normal tissue and glioma grade II were significantly different from glioma grade



IV ($P = 0.0001$ and $P = 0.003$ respectively) when combination of p75^{NTR} and TrkB data expression were used (Figure 1B).

Correlation between mRNA and protein expression

When we examined the presence of TrkB detected by immunostaining intensity and mRNA assessment in 42 tumoral tissues, an inverse correlation between protein was noted ($R = 0.61$, $p < 0.001$).

No correlation was found between protein and mRNA for p75^{NTR} ($p > 0.05$).

TrkB and p75^{NTR} predicts prognosis in glioma

Univariate analysis using Kaplan–Meier method revealed that high TrkB and p75^{NTR} expressions correlated significantly with shorter overall survival ($p = 0.022$ and $p = 0.03$, Figure 3). The median survival was 118 months for patients whose tumor had high level of TrkB or high level of p75^{NTR}, whereas the median survival was 52 months for those with low expression of TrkB or 78 months with low expression of p75^{NTR} (figure 3).



DISCUSSION

Gliomas are now classified based on molecular markers as *IDH1/2* mutation, *1p19q* codeletion, incorporated in the 2016 WHO classification of tumors. We examined our patients according this molecular approach and we quantitatively assessed the role played by two neurotrophin factors TrkB and p75^{NTR}. This study showed in a consistent population (n = 84) that the overexpression of TrkB detected by immunohistochemistry was associated with a poor prognosis of high grade glioma, irrespective of their histology.

Selecting the neurotrophin receptor TrkB, we observed high expression levels in high grade glioma, as the published data of Xiong et al. that observed that the level of TrkB and its ligand were higher in high grade gliomas vs low grade vs control (n = 42) (5). Otherwise, these results have been also found in cell lines derived from murine gliomas (5). Moreover, BDNF-induced activation of TrkB increases the viability of brain-tumor stem cells isolated from gliomas through activation different pathways, whereas TrkB knockdown reduces proliferation of brain-tumor stem cells isolated (23).

Conversely, Wang et al. showed an expression of TrkA, TrkB, TrkC in astrocytomas unlike oligodendrogliomas without correlation between Trks expression and histological grade (2). Then, Wadhwa et al. observed with a small population (n = 10) an inverse correlation between TrkB and tumor grade and hypothesized that overexpression of TrkB might contribute to the progression of early forms to more aggressive forms in astrocytomas (9). In advanced forms, downregulation could act both on TrkA and TrkB receptors. Finally and similarly, Assimakopoulou et al. indicated that independently of grade that TrkA, TrkB, and TrkC receptors are found in astrocytomas but suggested a potential malignant transformation mechanism in low grade astrocytomas (12).

In this study, we showed the interest to associate the dual receptor system TrkB and p75^{NTR} to better identify the grade. TrkB and its ligand have been shown to be associated with p75^{NTR} (5,10) which plays a key role in migration and infiltration capacity and is dependent on neurotrophins (15,18,24–26). When p75^{NTR} binds to mature neurotrophins, it induces cell invasion (15). In contrast, when the immature form (pro-BDNF) binds p75^{NTR}, it acts as a tumor suppressor by inhibiting cell migration



and infiltration (5). Furthermore, TrkB and TrkC receptors promoted the growth of brain tumor-initiating cells and p75^{NTR} is expressed in high grade glioma where it promoted glioma invasion (5,23). Moreover, cancer stem cells express p75^{NTR} like other neurotrophin receptors and their ligands (27). Inhibition of p75^{NTR} by siRNA or lack of cleavage by secretases decreases the proliferation of brain tumor-initiating cells (25,27).

This study highlighted that TrkB could play a role particularly as it was recently provided evidence for a potential role of TrkB inhibition as a strategy to reduce cell proliferation and potentiate the effects of chemotherapy in medulloblastoma (28), Ewing sarcoma (29) and glioma (30).

An inverse correlation between transcriptome and proteome for TrkB was noted. Various studies had shown discordance between them and there is still debate for this point (31–33).

The correlation between transcriptome and proteome data could be due to detection bias, degradation of transcripts or/and proteins or side effects resulting from molecules that inhibit transcription and translation. In our study, the method used could explain these discordances, as molecular signature required RNA extracted from snap frozen tissue whereas for tumor histology analyzed formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) were used. To clearly evaluate the correlation between transcriptome and proteome and avoid intra-tumoral heterogeneity, analysis methods on FFPE RNA are under investigation.

To conclude, overexpressions of TrkB and p75^{NTR} were associated with a poor prognostic in high grade glioma regardless of their histology and these markers can be integrated into an independent composite score.



BIBLIOGRAPHY

1. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2016 Jun;131(6):803–20.
2. Wang Y, Hagel C, Hamel W, Müller S, Kluwe L, Westphal M. Trk A, B, and C are commonly expressed in human astrocytes and astrocytic gliomas but not by human oligodendrocytes and oligodendroglioma. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1998 Oct;96(4):357–64.
3. Hansen K, Wagner B, Hamel W, Schweizer M, Haag F, Westphal M, et al. Autophagic cell death induced by TrkA receptor activation in human glioblastoma cells. *J Neurochem*. 103(1):259–75.
4. Jawhari S, Bessette B, Hombourger S, Durand K, Lacroix A, Labrousse F, et al. Autophagy and TrkC/NT-3 signaling joined forces boost the hypoxic glioblastoma cell survival. *Carcinogenesis*. 2017 Jun;38(6):592–603.
5. Xiong J, Zhou L, Yang M, Lim Y, Zhu Y, Fu D, et al. ProBDNF and its receptors are upregulated in glioma and inhibit the growth of glioma cells in vitro. *Neuro-Oncol*. 2013 Aug;15(8):990–1007.
6. Nakagawara A, Azar CG, Scavarda NJ, Brodeur GM. Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Mol Cell Biol*. 1994 Jan;14(1):759–67.
7. Hua Z, Gu X, Dong Y, Tan F, Liu Z, Thiele CJ, et al. PI3K and MAPK pathways mediate the BDNF/TrkB-increased metastasis in neuroblastoma. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med*. 2016 Oct 17;
8. Ho R, Eggert A, Hishiki T, Minturn JE, Ikegaki N, Foster P, et al. Resistance to chemotherapy mediated by TrkB in neuroblastomas. *Cancer Res*. 2002 Nov 15;62(22):6462–6.
9. Wadhwa S, Nag TC, Jindal A, Kushwaha R, Mahapatra AK, Sarkar C. Expression of the neurotrophin receptors Trk A and Trk B in adult human astrocytoma and glioblastoma. *J Biosci*. 2003 Mar;28(2):181–8.
10. Xiong J, Zhou LI, Lim Y, Yang M, Zhu Y-H, Li Z-W, et al. Mature brain-derived neurotrophic factor and its receptor TrkB are upregulated in human glioma tissues. *Oncol Lett*. 2015 Jul;10(1):223–7.
11. Xiong J, Zhou L, Lim Y, Yang M, Zhu Y-H, Li Z-W, et al. Mature BDNF promotes the growth of glioma cells in vitro. *Oncol Rep*. 2013 Dec;30(6):2719–24.
12. Assimakopoulou M, Kondyli M, Gatzounis G, Maraziotis T, Varakis J. Neurotrophin receptors expression and JNK pathway activation in human astrocytomas. *BMC Cancer*. 2007 Oct 31;7:202.
13. Wislet S, Vandervelden G, Rogister B. From Neural Crest Development to Cancer and Vice Versa: How p75NTR and (Pro)neurotrophins Could Act on Cell Migration and Invasion? *Front Mol Neurosci* [Internet]. 2018 Aug 23 [cited 2018 Sep 9];11. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6115613/>
14. Pramanik S, Sulistio YA, Heese K. Neurotrophin Signaling and Stem Cells-Implications for Neurodegenerative Diseases and Stem Cell Therapy. *Mol Neurobiol*. 2017 Nov;54(9):7401–59.
15. Johnston AL, Lun X, Rahn JJ, Liacini A, Wang L, Hamilton MG, et al. The p75 neurotrophin receptor is a central regulator of glioma invasion. *PLoS Biol*. 2007;5(8):e212.
16. Alshehri MM, Robbins SM, Senger DL. The Role of Neurotrophin Signaling in Gliomagenesis: A Focus on the p75 Neurotrophin Receptor (p75NTR/CD271). *Vitam Horm*. 2017;104:367–404.
17. Pinet S, Bessette B, Vedrenne N, Lacroix A, Richard L, Jauberteau M-O, et al. TrkB-containing exosomes promote the transfer of glioblastoma aggressiveness to YKL-40-



inactivated glioblastoma cells. *Oncotarget*. 2016 Jul 2;7(31):50349–64.

18. Giraud S, Loum E, Bessette B, Mathonnet M, Lalloué F. P75 neurotrophin receptor is sequestered in the Golgi apparatus of the U-87 MG human glioblastoma cell line. *Int J Oncol*. 2011;38(2):391–399.
19. Croucher JL, Iyer R, Li N, Molteni V, Loren J, Gordon WP, et al. TrkB Inhibition by GNF-4256 Slows Growth and Enhances Chemotherapeutic Efficacy in Neuroblastoma Xenografts. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2015 Jan;75(1):131–41.
20. Evans AE, Kisselbach KD, Liu X, Eggert A, Ikegaki N, Camoratto AM, et al. Effect of CEP-751 (KT-6587) on neuroblastoma xenografts expressing TrkB. *Med Pediatr Oncol*. 2001 Jan;36(1):181–4.
21. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA, Di Maria MV, Veve R, Bremmes RM, et al. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2003 Oct 15;21(20):3798–807.
22. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif*. 2001 Dec;25(4):402–8.
23. Lawn S, Krishna N, Pisklakova A, Qu X, Fenstermacher DA, Fournier M, et al. Neurotrophin signaling via TrkB and TrkC receptors promotes the growth of brain tumor-initiating cells. *J Biol Chem*. 2015 Feb 6;290(6):3814–24.
24. Wang T-C, Luo S-J, Lin C-L, Chang P-J, Chen M-F. Modulation of p75 neurotrophin receptor under hypoxic conditions induces migration and invasion of C6 glioma cells. *Clin Exp Metastasis*. 2015 Jan;32(1):73–81.
25. Wang L, Rahn JJ, Lun X, Sun B, Kelly JJP, Weiss S, et al. Gamma-Secretase Represents a Therapeutic Target for the Treatment of Invasive Glioma Mediated by the p75 Neurotrophin Receptor. *PLOS Biol*. 2008 Nov 25;6(11):e289.
26. Ahn BY, Saldanha-Gama RFG, Rahn JJ, Hao X, Zhang J, Dang N-H, et al. Glioma invasion mediated by the p75 neurotrophin receptor (p75NTR/CD271) requires regulated interaction with PDLIM1. *Oncogene*. 2016 Mar 17;35(11):1411.
27. Forsyth PA, Krishna N, Lawn S, Valadez JG, Qu X, Fenstermacher DA, et al. p75 neurotrophin receptor cleavage by α - and γ -secretases is required for neurotrophin-mediated proliferation of brain tumor-initiating cells. *J Biol Chem*. 2014;289(12):8067–8085.
28. Thomaz A, Jaeger M, Buendia M, Bambini-Junior V, Gregianin LJ, Brunetto AL, et al. BDNF/TrkB Signaling as a Potential Novel Target in Pediatric Brain Tumors: Anticancer Activity of Selective TrkB Inhibition in Medulloblastoma Cells. *J Mol Neurosci MN*. 2016 Jul;59(3):326–33.
29. Heinen TE, Dos Santos RP, da Rocha A, Dos Santos MP, Lopez PL da C, Silva Filho MA, et al. Trk inhibition reduces cell proliferation and potentiates the effects of chemotherapeutic agents in Ewing sarcoma. *Oncotarget*. 2016 Jun 7;7(23):34860–80.
30. Pinheiro KV, Alves C, Buendia M, Gil MS, Thomaz A, Schwartzmann G, et al. Targeting tyrosine receptor kinase B in gliomas. *Neuro-Oncol*. 2017 Jan 1;19(1):138–9.
31. Chen G, Gharib TG, Huang C-C, Taylor JMG, Misek DE, Kardias SLR, et al. Discordant Protein and mRNA Expression in Lung Adenocarcinomas. *Mol Cell Proteomics*. 2002 Apr 1;1(4):304–13.
32. Modelska A, Quattrone A, Re A. Molecular portraits: the evolution of the concept of transcriptome-based cancer signatures. *Brief Bioinform*. 2015 Nov 1;16(6):1000–7.
33. Zhang B, Wang J, Wang X, Zhu J, Liu Q, Shi Z, et al. Proteogenomic characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2014 Sep 18;513(7518):382–7.



FIGURES AND LEGENDS

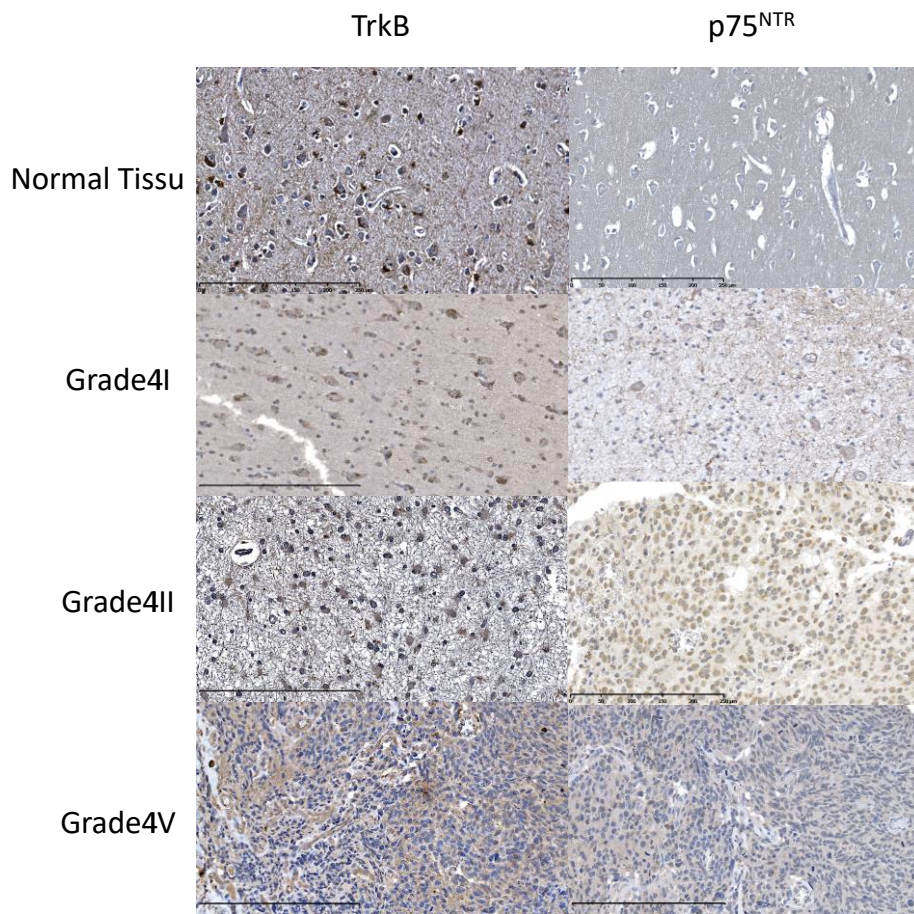


Figure 1 Immunohistochemical staining of TrkB and p75^{NTR} in the formalin-fixed, paraffin-embedded normal brain and glioma tissues (x20).



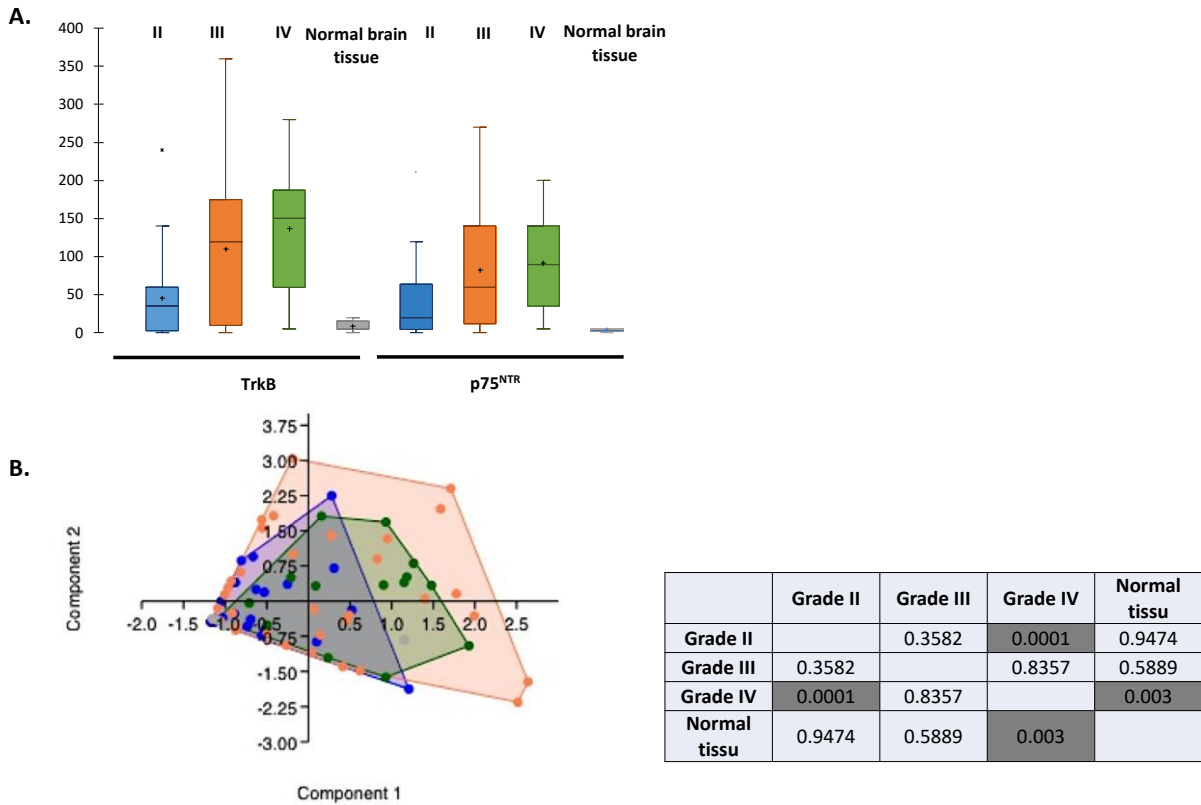


Figure 2 (A) Expression (Hirsch score) of TrkB and p75^{NTR} according to the grade of tumor– (B) Principal components analysis using expression patterns of TrkB and p75^{NTR} of 84 samples Each grade was represented by a color : grade II (blue), grade III (orange), grade IV (green). (C)ANOSIM analysis indicated that there exists at least a level of dissimilarity among three groups (II, III and IV grades) when combination of TrkB and p75^{NTR} data expression were used

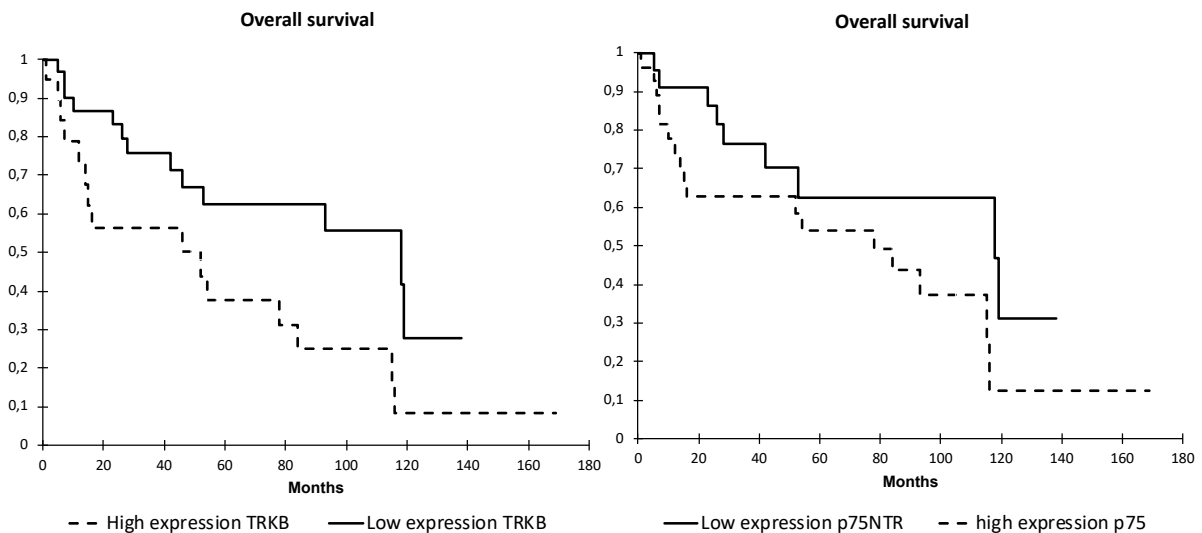


Figure 3. Overall survival according expression of TrkB and p75^{NTR} by Kaplan Meier methods.



Projet 3 : Application clinique par l'utilisation d'exosomes

Contexte et Problématique

Notre première étude portant sur l'analyse transcriptomique différentielle de plusieurs gènes dans les gliomes nous a permis de caractériser deux gènes d'intérêt *CHI3L1* et *NTRK2* qui sont susceptibles de compléter la classification actuelle des gliomes. Dans cette étude, seuls les prélèvements issus de résection chirurgicale avant tout traitement ont été analysés. En effet, l'utilisation de biopsies ne permet qu'imparfaitement d'appréhender la tumeur d'origine dans sa globalité. Ainsi, Sottoriva et al., à partir de l'analyse de 11 glioblastomes, ont observé par un échantillonnage multiple, une hétérogénéité génomique intra-tumorale, liée à la présence de plusieurs sous-types cellulaires au sein d'une même tumeur (Sottoriva et al., 2013). Cette hétérogénéité peut en partie expliquer l'échec des thérapeutiques actuelles. Nos travaux préliminaires nous ont permis de mettre en évidence cette variabilité du niveau d'expression des gènes codant pour *CHI3L1*, *TrkA*, *TrkB-FL*, *TrkB-T1* et *TrkC* entre une biopsie et un fragment de résection chirurgicale ($p = 0,0001$). (Figure 21).

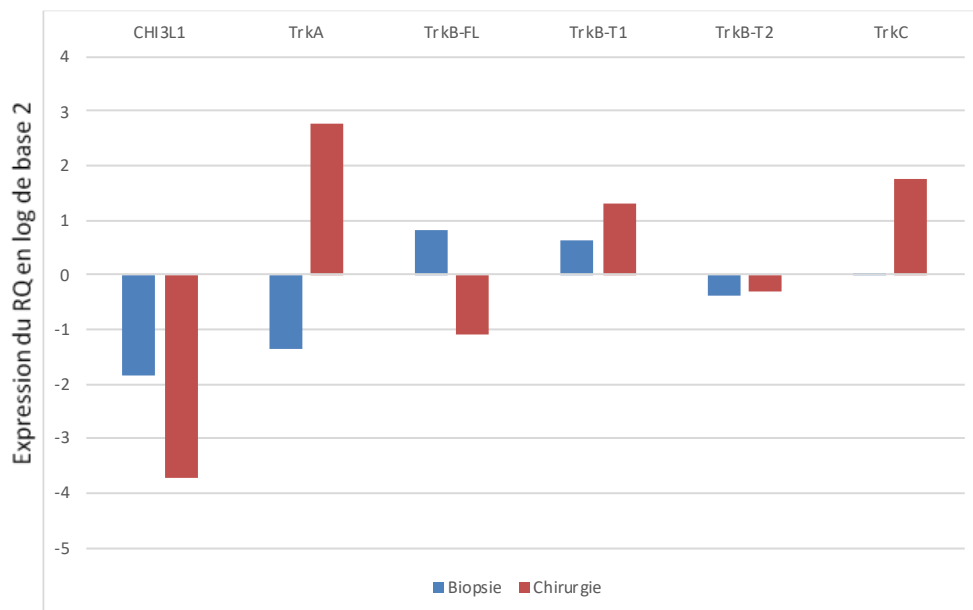


Figure 21 Comparaison de l'expression des gènes au sein d'une biopsie et d'une exérèse chirurgicale.

La sur- et sous- expression des gènes ont été déterminées par TLDA. En bleu, les résultats obtenus sur la biopsie et en rouge sur la pièce opératoire. L'expression des gènes a été calculée par la formule $RQ = 2^{-(moyenne \Delta\Delta Ct)}$ en utilisant le tissu sain comme référence.

Par ailleurs, nous avons mis en évidence une variation de l'expression des gènes, au cours de l'évolution de la tumeur chez une patiente porteuse d'un oligodendrogliome de grade II



évoluant en 4 ans en glioblastome. Le profil diffère de manière significative entre la tumeur initiale et la récurrence ($p < 0,0001$), confirmant les profils que nous avons mis en évidence. Les transcrits alternatifs de *NTRK2* codant pour les 3 isoformes TrkB-FL, TrkB-T1 et TrkB-T2 sont surexprimés dans la tumeur de grade II. A l'inverse, ils sont sous-exprimés dans le glioblastome tandis que l'expression de *CHI3L1* est fortement augmentée dans le glioblastome (Figure 22).

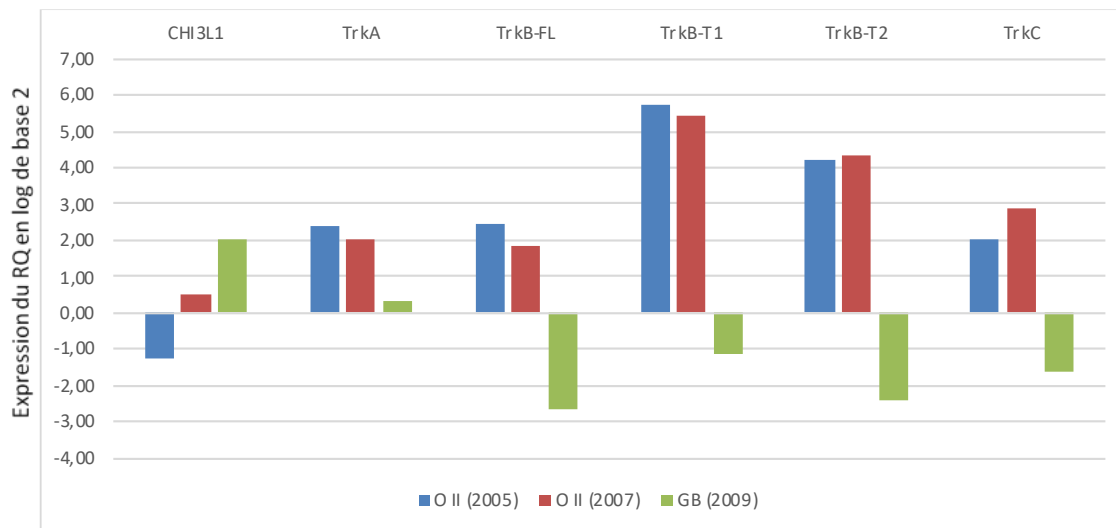


Figure 22 Etude de la sur- et sous- expression des gènes chez une atteinte d'un oligodendrogliome de grade II évoluant en glioblastome
 Les échantillons d'oligodendrogliomes de grade II (OII collectés en 2005 et 2007) et glioblastome (GBM, prélevé en 2009) ont été étudiés et comparés par TLDA. L'expression des gènes est calculée par la formule $RQ = 2^{-(\text{moyenne } \Delta\Delta Ct)}$ en utilisant le tissu sain comme référence.

Ces résultats préliminaires suggèrent qu'il est nécessaire de disposer d'un moyen non invasif d'évaluer le profil d'expression protéique ou génique de la tumeur (1) afin d'appréhender la tumeur dans sa totalité et à un instant donné et (2) de suivre son évolution au cours du temps en s'affranchissant de nouvelles biopsies ce qui permettra d'optimiser la prise en charge des patients. Dans ce contexte, l'utilisation de biopsies liquides tels que les exosomes, sources de biomarqueurs circulants à valeur diagnostique (Skog et al., 2008) et/ou prédictive, pourrait guider la stratégie thérapeutique.

L'équipe EA3852 a démontré, dans le cancer bronchique non à petites cellules, que TrkB était présent dans les exosomes (Wilson et al., 2014). TrkB est également exprimé dans les exosomes sécrétés par des lignées cellulaires de glioblastomes ; il est retrouvé dans le plasma de patients atteints d'un glioblastome (Pinet et al., 2016). L'inactivation de *CHI3L1* induit une diminution des concentrations cellulaires de TrkB, sortiline et p75^{NTR}, associée à un phénotype de faible agressivité (Pinet et al., 2016). Cependant, cette étude n'a porté que



sur un nombre restreint de patients (n = 11) tous atteints de glioblastome. A notre connaissance, aucun travail n'a étudié, à ce jour, p75^{NTR} et TrkB dans les exosomes en fonction de l'agressivité de gliomes.

Nous avons donc choisi d'évaluer la présence de TrkB et p75^{NTR} au sein des exosomes dans un panel histologique varié de tumeurs cérébrales (gliomes de grade II, III et IV, métastases cérébrales).

Résultats préliminaires

Dans un premier temps nous avons vérifié l'homogénéité et la taille des exosomes (diamètre entre 30-130 nm à partir du plasma de patients et de témoins sains, par NanoSight NS300 (MALVERN) (**Figure 23**). Le profil montre que nos échantillons ont une taille variant de 20 à 110 nm avec un pic à 60 nm ce qui est compatible avec la présence d'exosomes.

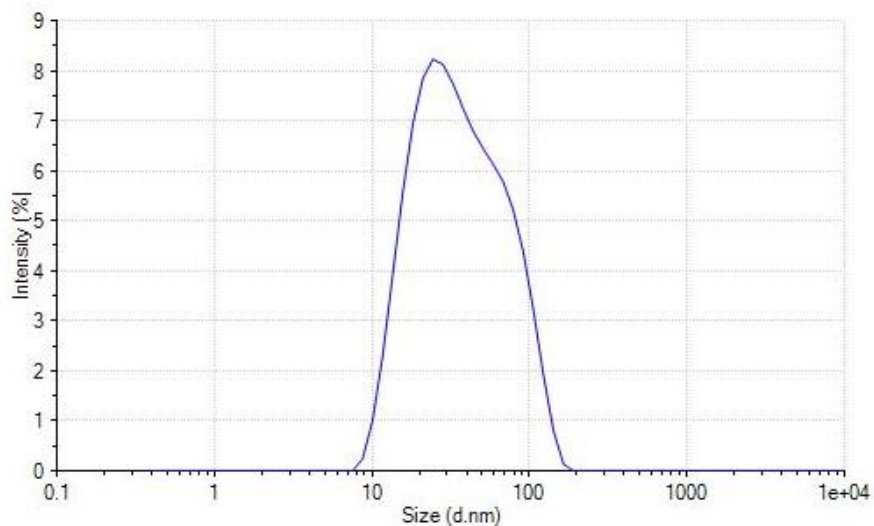


Figure 23 Taille des exosomes issus du plasma de patients déterminée par diffusion dynamique de la lumière
NanoSight NS300 (MALVERN)

De plus, les exosomes tumoraux ont été identifiés par l'expression des tétraspanines CD81 et CD63 considérées comme spécifiques des exosomes (**Figure 24**).



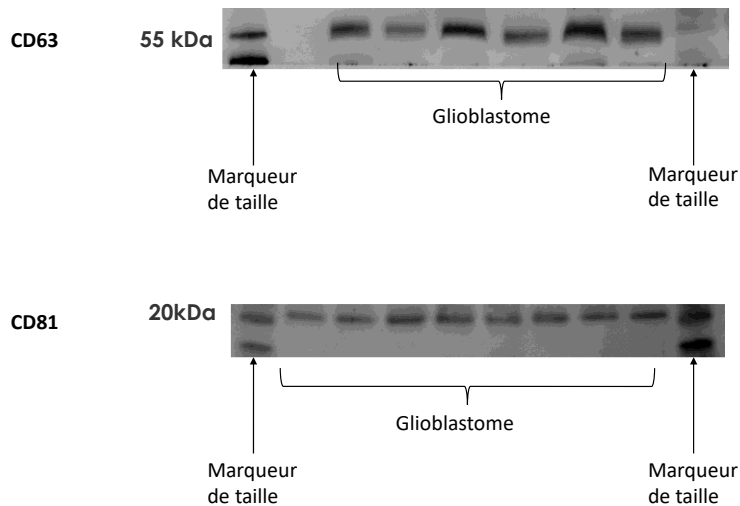


Figure 24 Validation du protocole d'extraction des exosomes issus de patients atteints de glioblastomes
 Expression des tétraspanines CD63 et CD81(détection par Western Blot)

La quantification relative des protéines TrkB et p75^{NTR} (ratio expression des protéines/expression CD81) montre une expression élevée dans les métastases, les astrocytomes grade III et les glioblastomes et une expression faible dans les astrocytomes de grade II. Des variations dans les exosomes sécrétés par les glioblastomes reflètent l'hétérogénéité tumorale de ceux-ci. Les effectifs sont trop faibles pour calculer des différences significatives entre les groupes (**Figure 25**). TrkB et p75^{NTR} sont retrouvés exprimés au sein des exosomes de témoins avec un ratio qui est proche, dans le cas de p75^{NTR}, proche des tumeurs de grade II. Les lignées cellulaires, OCI-LY3, issus de lymphomes, ont été utilisées comme contrôle positif. Le contrôle négatif correspond à un échantillon dépourvu d'exosomes.

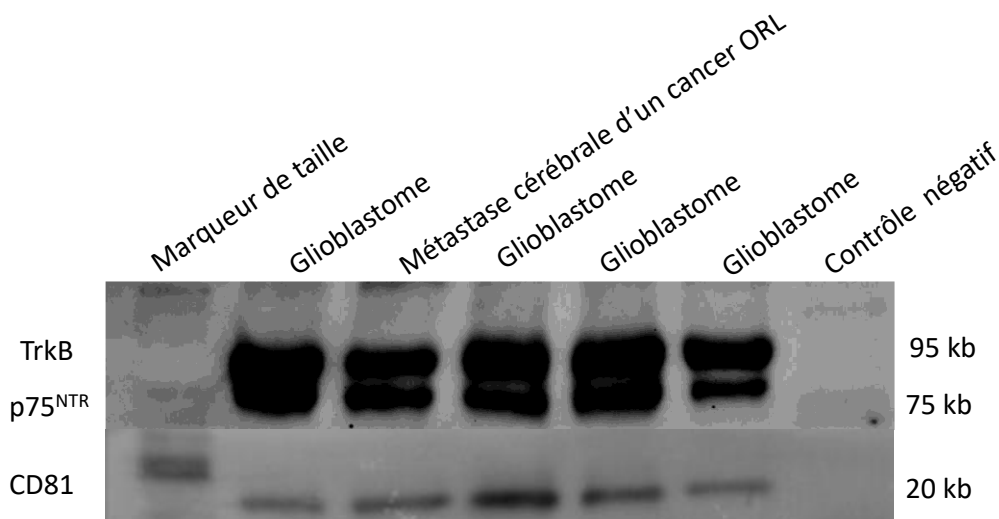
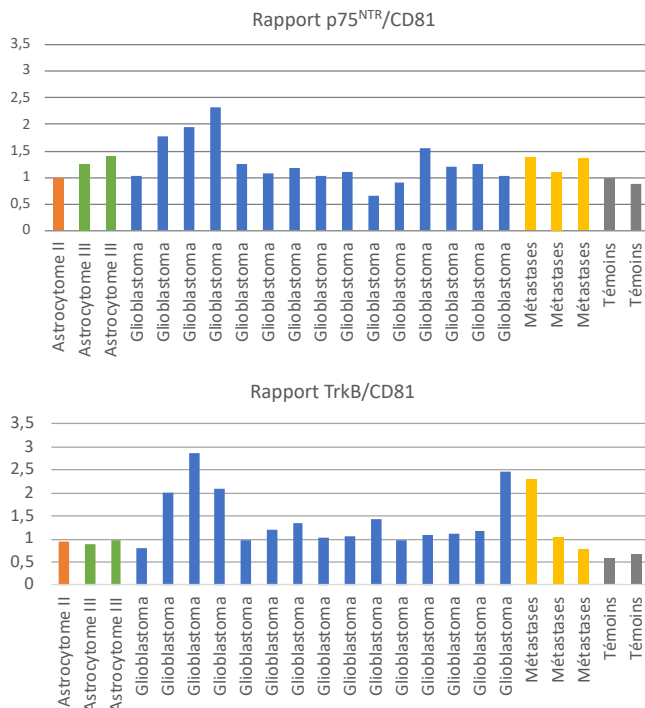


Figure 25 Analyse de l'expression de p75^{NTR}, TrkB dans les exosomes





	Quantification relative p75 ^{NTR}	Quantification relative TrkB
Témoins	0,97	0,55
Astrocytome II	0,97	0,81
Astrocytome III	1,28	0,928
GB	1,32	1,44
Métastases	1,27	1,37

Figure 26 Quantification relative de l'expression des protéines p75^{NTR} et TrkB par rapport aux protéines marqueurs d'exosomes.

En conclusion, les résultats montrent que TrkB et p75^{NTR} sont détectables dans les exosomes de patients mais aussi dans ceux des témoins sains. Cependant, leur niveau d'expression est faible chez les sujets sains en comparaison aux sujets atteints de gliomes. L'augmentation de l'expression de ces deux marqueurs est corrélée à l'agressivité de la tumeur même si une hétérogénéité est constatée au sein des glioblastomes.

Une étude prospective (Etude BORNEO : **Bi**Omarqueurs **R**ecepteurs **NE**urotrophines **Exo**somes) est proposée en collaboration avec le CHU de Limoges, le CH de Brive, le CHU de Poitiers, l'Institut Bergonié (Bordeaux) et l'Institut du cancer de Montpellier (ICM). L'objectif est d'étudier chez un plus grand nombre de patients porteurs de gliomes (grades II, III et IV) l'expression d'ARNm et/ou de protéines dans les exosomes en pré-opératoire. Le nombre de sujets à inclure est de 40 patients. Une partie de cette étude est financée par le Cancéropôle GSO via l'appel à projet Emergence (2017-E15).



DISCUSSION

I.1.1. Place de la classification moléculaire en pratique courante

Nos premiers résultats ont montré qu'il est possible de définir une signature moléculaire des gliomes ayant une valeur pronostique. De plus, ces travaux ont permis d'isoler 2 marqueurs, *CHI3L1* et *NTRK2*, à partir des 26 gènes sélectionnés dont les variations d'expression pourraient être pertinentes dans la stratification des gliomes. L'étude de l'impact de la classification moléculaire au sein des gliomes tous grades confondus (Ceccarelli et al., 2016; Gravendeel et al., 2009; Li et al., 2009), de tumeurs de bas grade (Cancer Genome Atlas Research Network et al., 2015) et de haut grade (Brennan et al., 2013; Phillips et al., 2006) a montré que le profil d'expression génique apporte des informations supplémentaires qui permettent de distinguer des sous-types particuliers.

En s'appuyant sur l'analyse du transcriptome complet des cellules de GBM, quatre sous-types ont pu être distingués (classique, mésenchymal ou mésenchymateux, proneural et neural), chacun de ces sous-types étant associé à des altérations génomiques spécifiques et des réponses au traitement distinctes (Figure 24)(Verhaak et al., 2010). Certains de ces sous-types possèdent des profils moléculaires originaux. Pour exemple, le sous-type classique est caractérisé par l'amplification de EGFR et l'absence de mutation p53 tandis que le sous-type mésenchymateux n'exprime pas NF1 et présente une surexpression du marqueur CHI3L1/YKL40.



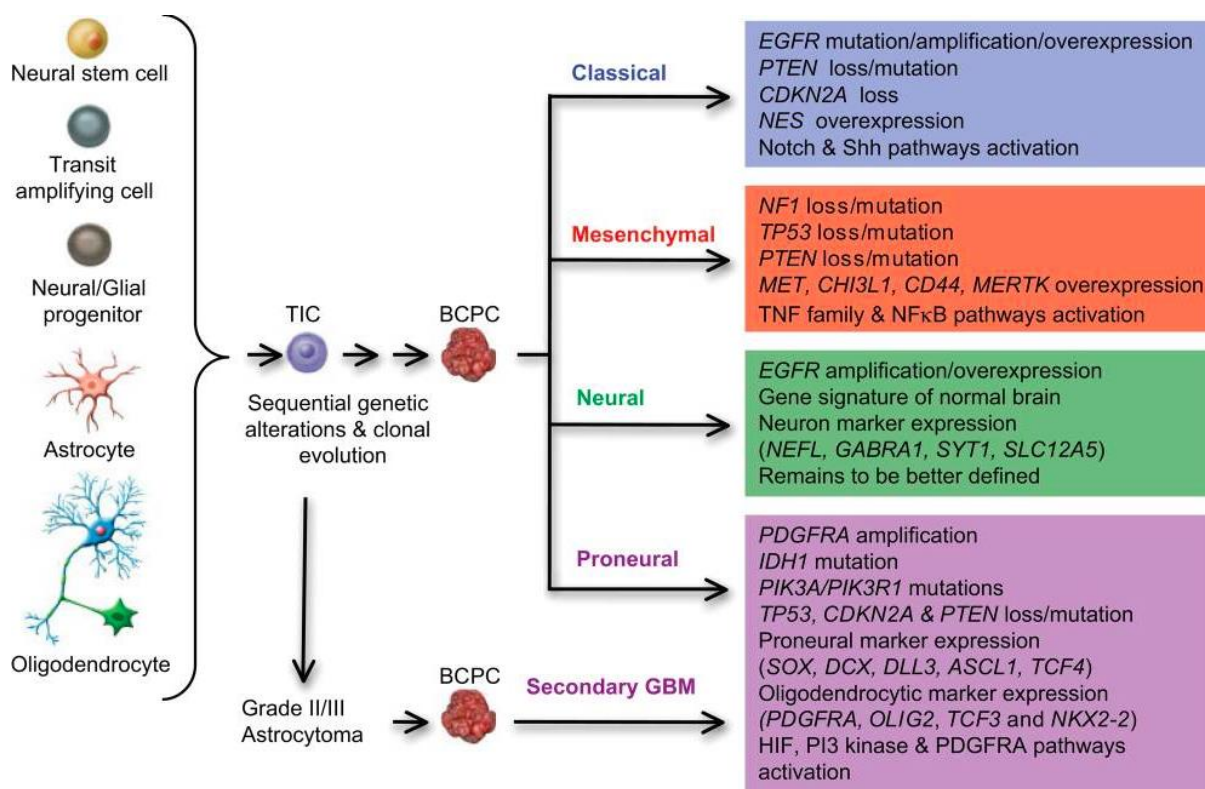


Figure 27 Expression génique et des altérations génomiques dans les sous-types de glioblastomes.

Certaines cellules normales du cerveau subissent des altérations génétiques qui conduisent à une population de cellules initiateuses de tumeurs (TIC), qui peuvent accumuler des modifications génétiques et épigénétiques et devenir des cellules propageant le cancer (BCPC). Ces cellules sont responsables de la formation de glioblastomes (GBM) multifformes; EGFR, récepteur du facteur de croissance épidermique; PTEN, homologue phosphatase et tensine; TNF, facteur de nécrose tumorale; PDGFRA, récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes; IDH, isocitrate déshydrogénase; PI3K, phosphoinositol 3 – kinase; HIF, facteur induisant une hypoxie (Van Meir et al., 2010).

Ces études n'ont cependant jamais étudié l'apport combiné des marqueurs *CHI3L1* et *NTRK2* pour compléter le diagnostic des tumeurs gliales et en préciser le pronostic. L'originalité de notre travail est donc de proposer une intégration de ces biomarqueurs en tenant compte de la classification OMS 2016. En effet, même au sein d'une classe bien définie selon des critères histo-moléculaires de 2016 (oligodendrogliome, 1p19q codéleté, *IDH* muté), la biologie moléculaire apporte encore des informations afin de mieux distinguer des sous-groupes de patients avec notamment *CHI3L1* (Kamoun et al., 2016).

L'utilité clinique immédiate de la stratification des patients selon les signatures d'expression est peut-être limitée par l'hétérogénéité existant au sein d'une tumeur (Suzuki et al., 2015) notamment dans les glioblastomes. Par ailleurs, l'expression des gènes est modifiée par des stimuli externes telles que la radiothérapie (Li et al., 2014), raison pour laquelle nous avons



choisi de travailler sur une population constituée de patients ayant bénéficié d'une chirurgie (avant tout traitement par radiothérapie et/ou chimiothérapie).

Une des limites de notre travail est de ne pas avoir pu intégrer des données récentes de la biologie moléculaire telles que la mutation des histones H3.1 ou H3.3, les mutations du promoteur de *TERT*, la codélétion 10p10q ou le gène de fusion *FGFR3*... Néanmoins, ces anomalies ne sont pas intégrées de manière systématique dans l'algorithme de l'OMS 2016.

La seconde question soulevée par nos résultats et les études précédentes (Gravendeel et al., 2009; Nutt et al., 2003; Shirahata et al., 2007) concerne la capacité à diagnostiquer et à caractériser des gliomes sur la seule base du génotype sans apport de l'examen histologique. En effet, la présence d'une variabilité inter-observateur dans l'analyse histologique est responsable d'un certain nombre de lacunes dans la classification des gliomes (Kros et al., 2007).

Même si peu d'études de profilage génomique ont comparé l'apport des signatures moléculaires versus l'histologie seul, leurs résultats confirment que la signature moléculaire est supérieure à l'histologie seule dans l'établissement du pronostic (Gravendeel et al., 2009; Nutt et al., 2003; Shirahata et al., 2007). Cependant ces publications sont parues avant l'apparition de la nouvelle classification OMS 2016 qui propose un diagnostic intégré histomoléculaire.

En 2016, Tabouret et al. ont reclassé, selon les critères OMS 2016, 1041 tumeurs incluses dans la cohorte française POLA identifiées par histologie (Tabouret et al., 2016). Ce reclassement a conduit à des modifications quel que soit le groupe histologique. Ainsi, pour les gliomes initialement classés « oligoastrocytomes de grade III », 50 % des tumeurs ont été reclassées en glioblastomes *IDH* muté ou *IDH* wt. Ce reclassement a permis de montrer que la classification 2016 de l'OMS a une meilleure valeur pronostique (Tabouret et al., 2016).

Pour l'instant, en l'absence d'élément nouveau, le diagnostic intégré (classification phénotypique et génotypique combinée) doit toujours être considéré afin de comprendre la signification nosologique et clinique des changements génétiques spécifiques (Louis et al., 2016; Reifenberger et al., 2017). Néanmoins, il est probable que dans l'avenir les futures classifications OMS des gliomes s'appuieront de plus en plus sur un large screening génomique au détriment de l'analyse histologique.

Transcriptome et protéome

Bien que nous ayons mis en évidence dans ce travail une corrélation positive entre l'expression du gène *CHI3L1* et de la protéine, nous avons constaté une discordance pour



TrkB. Contrairement à Xiong et al. qui ont observé que les niveaux des ARNm de TrkB et de son ligand étaient plus élevés dans les gliomes de haut grade par rapport à ceux de bas grade et aux témoins (n = 42)(Xiong et al., 2015), nos résultats montrent une expression élevée de la protéine TrkB dans les gliomes de haut grade alors que le niveau des transcrits de faible.

Dans la littérature, on constate que les divergences entre les données du transcriptome et du protéome sont assez courantes dans différents cancers. Ce phénomène a été observé à la fois dans les échantillons de tumeurs et les lignées cellulaires (Chen et al., 2002; Modelska et al., 2015; Zhang et al., 2014). Par ailleurs, la méthode d'analyse de l'expression des transcrits peut être remise en cause. En effet, l'ARNm, nécessaire à l'analyse de la signature moléculaire, provient de tissus congelés, alors que la détection des protéines s'effectue à partir de blocs de paraffine. Afin d'évaluer la corrélation ou l'absence de corrélation entre le transcriptome et le protéome et d'éviter l'hétérogénéité tumorale, des méthodes d'analyse transcriptomique sur tissu paraffiné sont à l'étude. Ainsi une même section pourrait être analysée simultanément pour le transcriptome et le protéome.

L'étude que nous avons menée sur deux cohortes indépendantes (TCGA et REMBRANDT) et un travail récent (Xiao et al., 2017) confortent nos résultats obtenus sur l'analyse transcriptomique. A l'inverse, peu de données existent sur l'expression protéique de TrkB et sont discordantes (**Tableau 9**). Cette discordance pourrait aussi être due à un mécanisme de répression transcriptionnelle ou une amplification protéique, à l'action des miRNA, ou à la présence de protéines régulatrices comme cela a été mis en évidence dans d'autres cancer (Chen et al., 2002; Kalinichenko et al., 2008; Koussounadis et al., 2015).

I.1.2. *CHI3L1* : facteur pronostique et cible thérapeutique ?

Nous avons montré, en accord avec la littérature (Ducray et al., 2008; Nutt et al., 2005; Pelloski et al., 2005; Shostak et al., 2003; Steponaitis et al., 2016; Zhang et al., 2010), par des analyses moléculaires et par immunohistochimie, que *CHI3L1* était surexprimé dans les glioblastomes. Cette surexpression est associée à un mauvais pronostic.

Cependant, nous montrons pour la première fois, que *CHI3L1* est un facteur pronostique indépendant du statut *IDH*. L'expression de *CHI3L1* et le statut *IDH* pourraient néanmoins être étroitement liés et interconnectés par des mécanismes épigénétiques tels que le remodelage de l'ADN en fonction de la méthylation. En effet, la mutation *IDH* induit une hyperméthylation aberrante des séquences régulatrices CpG et provoque une méthylation du promoteur de *CHI3L1* (Turcan et al., 2012). Noshmehr et al. ont montré que les tumeurs G-CIMP-hyperméthylées sont moins agressives en raison de la désactivation de gènes comme



CHI3L1 (Noushmehr et al., 2010). D'autre part, la méthylation du promoteur de *CHI3L1* est associée à la perte des propriétés mésenchymateuses (Heiland et al., 2016). Ainsi, l'hyperméthylation du promoteur du gène *CHI3L1* pourrait entraîner une faible expression du gène *CHI3L1* et donc contribuerait à un bon pronostic des gliomes. Ces observations étaient en accord avec les données de notre étude.

Cependant, dans notre étude, certaines tumeurs présentaient une absence de mutation *IDH* avec une expression faible de *CHI3L1*. L'hypothèse avancée pour expliquer l'hyperméthylation du promoteur de *CHI3L1* et/ou d'une diminution d'expression de *CHI3L1* est l'activation des voies de signalisation impliquant phospho-c-jun et DNMT1 (Heiland et al., 2016). La phosphorylation de c-jun en lien avec l'expression de DNMT1 entraînerait une perte du profil mésenchymateux des gliomes en induisant une hyperméthylation du promoteur de *CHI3L1* (Figure 28).

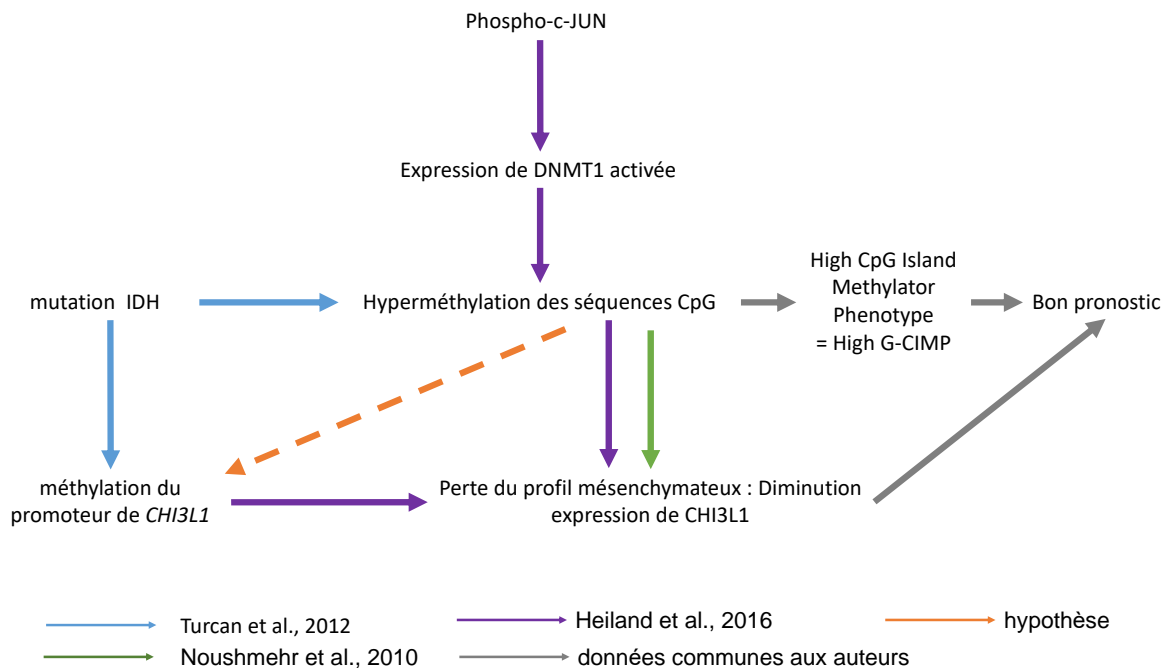


Figure 28 Relation entre le statut IDH, l'expression de *CHI3L1* et l'hyperméthylation de l'ADN
DNMT1 : DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1

Ces travaux illustrent l'importance de la régulation de l'expression de *CHI3L1* dans les gliomes et son rôle pronostique. Parallèlement, notre étude suggère que *CHI3L1* pourrait devenir une cible thérapeutique dans au moins deux sous-classes de patients en s'appuyant



sur la reclassification des gliomes, proposée dans notre article 1 et fondée sur l'expression de *NTRK2* et *CHI3L1*.

(1) chez les patients mutés *IDH* et codélétés 1p19q, avec surexpression de *CHI3L1* et sous-expression de *NTRK2*, une sensibilité moindre au traitement par PCV est supposée. Un traitement alternatif ou combiné avec un anti-CHI3L1 serait susceptible d'améliorer le pronostic.

(2) chez les patients *IDH* wild-type avec surexpression de *CHI3L1*. Une thérapie anti-CHI3L1 pourrait être proposée en association au protocole STUPP. En effet, il a été montré que l'inhibition de CHI3L1 entraînait une restauration partielle de la sensibilité au TMZ dans des lignées cellulaires de glioblastomes (Akiyama et al., 2014).

Il existe différentes stratégies pour inhiber l'action de CHI3L1 (YKL-40) en agissant sur l'interaction de CHI3L1 avec le couple de récepteurs membranaires syndécan-1/intégrine $\alpha\beta3$. La protéine $\alpha\beta3$ de la famille des intégrines reconnaît le motif RGD (Arg-Gly-Asp) qui permet l'interaction entre l'intégrine $\alpha\beta3$ et son ligand ce qui va déclencher une cascade de signalisation via FAK vers ERK-1 et ERK-2 (**Figure 29**). Cette voie conduit à une expression élevée du VEGF, une augmentation de l'angiogenèse et de la radiorésistance (Shao, 2013). Dans ce contexte, le cilengitide, inhibiteur sélectif des intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$, a été évalué dans un essai de phase III CENTRIC. Cependant, il n'a pas été mis en évidence de bénéfice (survie sans progression et survie globale) de cette molécule ajoutée au protocole STUPP dans des glioblastomes MGMT méthylé (Stupp et al., 2014). Il serait intéressant de réévaluer le bénéfice du cilengitide dans cette étude en reclassant les patients à partir du nouvel algorithme que nous avons proposé.



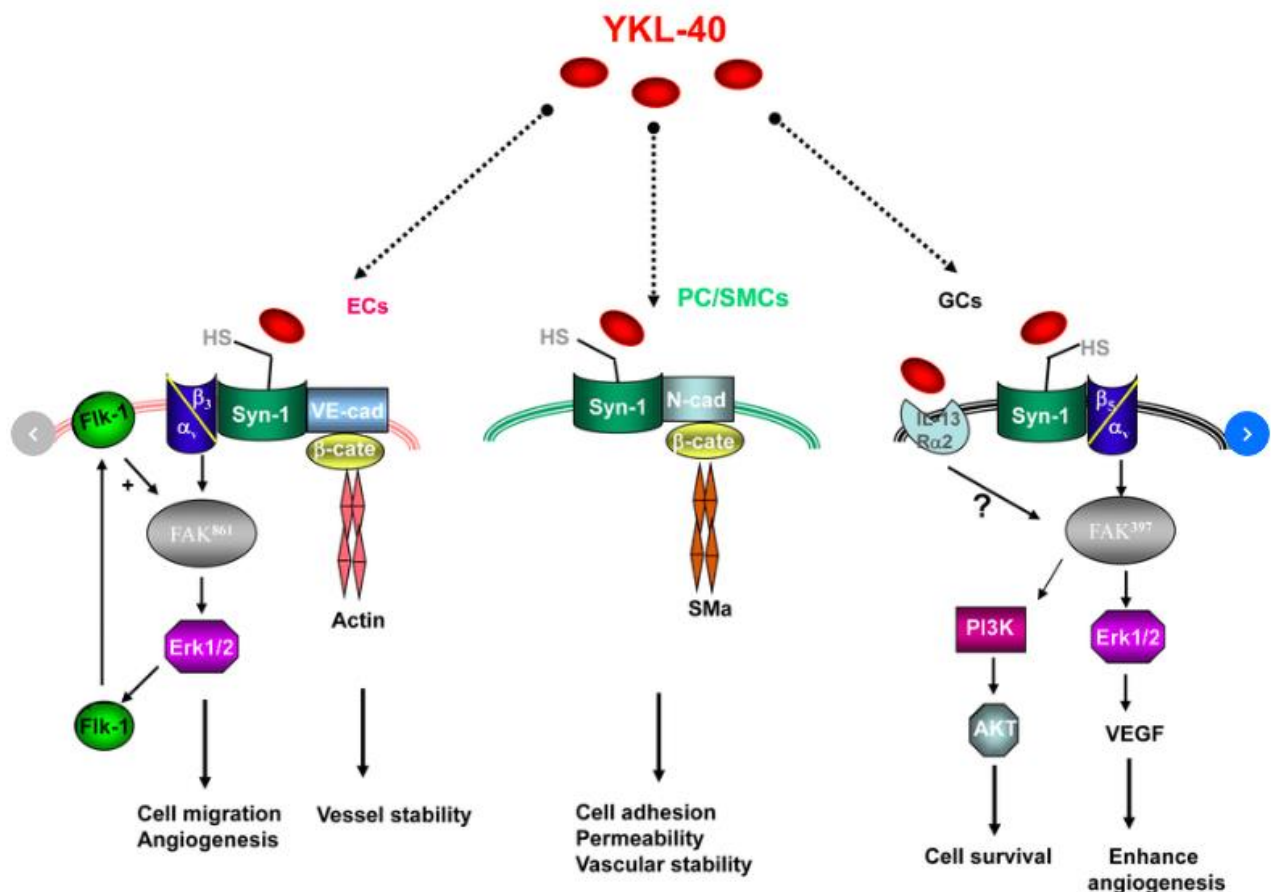


Figure 29 Interaction entre YKL-40 et intégrines

YKL-40 (CHI3L1) induit des voies de signalisation dans les cellules endothéliales (ECs), les cellules des péricytes / muscles lisses (PC/ SMC) et les cellules de glioblastome (GCs). YKL-40 active via l'interaction du syndecan-1 (Syn-1) et de l'intégrine $\alpha\beta_3$, entraîne une signalisation intracellulaire via FAK et ERK 1/2, ainsi que plusieurs processus favorisant la tumeur incluant l'expression de VEGFR 2), une motilité cellulaire accrue et une angiogénèse (Shao, 2013)

D'autres essais cliniques (AVAGLIO et RTOG 0825) ont testé l'inhibition directe du VEGF par un anti-VEGF (bévacicumab). Le bévacizumab améliore la survie sans progression des patients sans modifier la survie globale (Chinot et al., 2014; Gilbert et al., 2014). L'impact de la concentration plasmatique initiale de CHI3L1 a été étudié dans l'étude AVAGLIO (Boisen et al., 2017). Les résultats montrent que les patients avec un CHI3L1 plasmatique initialement faible (< 39 ng/ml) avaient une survie sans progression plus longue que les patients possédant un CHI3L1 plasmatique plus élevée (HR :0,71, IC_{95%}: 0,57-0,87). Cependant tous les sous-types de glioblastome n'ont pas bénéficié du traitement par bévacizumab dans cette étude et paradoxalement, le sous-type mésoenchymateux ne présentait pas d'amélioration de la survie sans progression.



I.1.3. NTRK2 : cible thérapeutique, réalité et perspective

Notre étude suggère que *NTRK2*, en tant que gène d'intérêt, pourrait être utilisé comme facteur pronostique chez les patients mutés *IDH* et codélétés 1p19q avec une sous-expression de *CHI3L1* et une surexpression de *NTRK2*. Ainsi, une désescalade thérapeutique pourrait être discutée chez ces malades de très bon pronostic. A l'inverse, chez les patients *IDH* wild-type avec une sous-expression de *CHI3L1* et une surexpression de *NTRK2*, une thérapie anti-*NTRK2* pourrait être proposée en association au protocole STUPP. A noter, qu'il existe des traitements anti-Trk (**Tableau 13**) dans d'autres types de cancers. Ces molécules sont très souvent des inhibiteurs pan-Trks car elles ciblent le domaine tyrosine kinase très conservé entre TrkA, TrkB et TrkC.

Tableau 13 Traitements anti-Trk

Drug name	Direct gene targets	Company	References
Crizotinib ^a	NTRK1, ALK, MET, ROS1	Pfizer	Vaishnavi et al. (2013)
Regorafenib ^a	NTRK1, BRAF, KDR, KIT, PDGFRA, PDGFRB, RAF1, RET, FGFR1, FGFR2	Bayer	(Regorafenib FDA label)
Dovitinib	NTRK1, FGFR1, FGFR, FLT1, FLT3, FLT4, KDR, KIT, RET	Novartis Pharmaceuticals	Sarker et al. (2008)
Lestaurtinib	NTRK1, NTRK2, NTRK3, JAK2, FLT3	Teva Pharmaceutical	(Festuccia et al., 2007a; Festuccia et al., 2007b)
BMS-754807	NTRK1, NTRK2, IGF1R, MET	Bristol-Myers Squibb	Carboni et al. (2009)
Danuserib	NTRK1, ABL1, AURKA, AURKB, FGFR1, RET	Nerviano Medical Sciences	Zhang et al. (2014)
ENMD-2076	NTRK1, AURKA, AURKB, FLT1, FLT3, FLT4, KDR, FGFR, RET	CASI Pharmaceuticals	Fletcher et al. (2011)
Midostaurin	ETV6-NTRK3, FLT1, FLT3, PDGFRA, PDGFRB, KDR, KIT	Novartis Pharmaceuticals	Chi et al. (2012)
PHA-848125 AC	NTRK1, CDK1, CDK2, CDK4, CDK5, CDK7	Nerviano Medical Sciences	Weiss et al. (2012)
BMS-777607	NTRK1, NTRK2, MET, FLT3, KDR	Aslan Pharmaceuticals	Schroeder et al. (2009)
Altiratinib	NTRK1, NTRK2, NTRK3, MET, KDR	Deciphera Pharmaceuticals	Smith et al. (2015)
AZD7451	NTRK1, NTRK2, NTRK3	AstraZeneca	Tatematsu et al. (2014)
MK5108	NTRK1, NTRK2, AURKA, AURKB, AURKC	Merck	Shimomura et al. (2010)
PF-03814735	NTRK1, AURKA, AURKB, FLT1, MET, FGFR1, PTK2	Pfizer	Jani et al. (2010)
SNS-314	NTRK1, NTRK2, AURKA, AURKB, FLT4, CSF1R, DDR2, RAF1	Sunesis Pharmaceuticals	Arbitrario et al. (2010)

^a Crizotinib and regorafenib are FDA approved for other indications.

D'après Khotskaya et al. (Khotskaya et al., 2017)

Par ailleurs, il existe des protéines de fusion impliquant la famille Trk qui deviennent alors des cibles thérapeutiques notamment dans les gliomes. Il a été montré que la région 3' du gène de Trk peut fusionner avec la séquence 5' d'un gène partenaire grâce un réarrangement intra-chromosomique ou inter-chromosomique ce qui aboutit à une protéine de fusion ou protéine chimère qui est généralement constitutivement active ou surexprimée (Lange and Lo, 2018). En l'absence de ligand, les protéines Trk normales sont incapables de se dimériser et ne peuvent donc activer les voies de signalisation en aval. Dans le cas d'une protéine de fusion-Trk, la dimérisation se produit de manière indépendante du ligand, car le partenaire de fusion contient le domaine de dimérisation (**Figure 30**). Cette dimérisation anormale conduit à l'activation constitutive de la kinase et à la signalisation en aval. Elle confère aux cellules tumorales un avantage en termes de survie et de prolifération cellulaire en leur permettant d'échapper aux thérapies ciblant un récepteur unique.



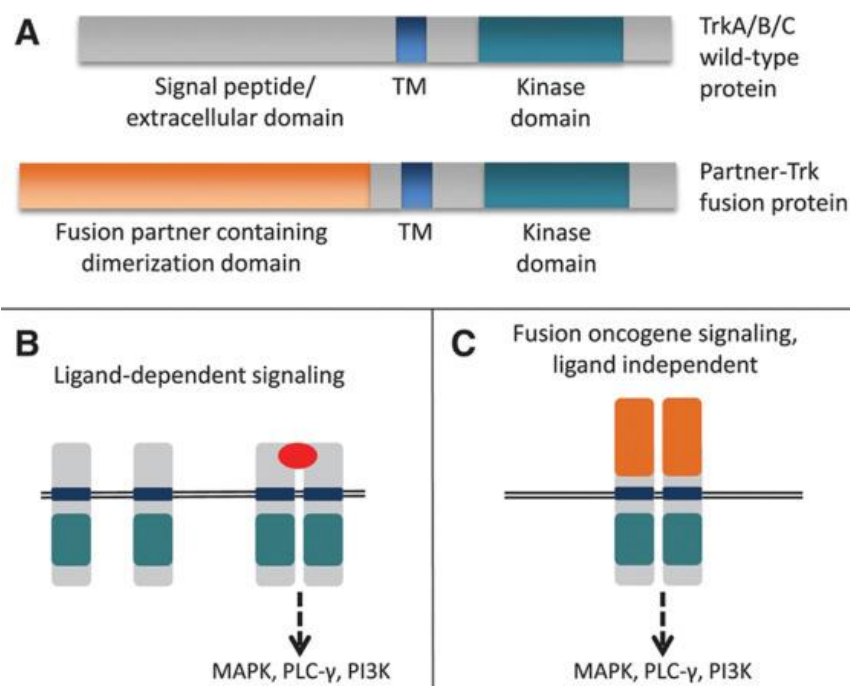


Figure 30 Protéines de fusion

(A) La protéine chimérique -Trk est composée du domaine tyrosine kinase intracellulaire avec activité ATPase du récepteur Trk normal, d'un domaine transmembranaire (TM), et d'un domaine extracellulaire en lien avec le partenaire de fusion. Il est à noter que la fusion présentée ici inclut le domaine TM, bien que des protéines de fusion Trk dépourvues du domaine TM aient également été décrites.

(B) En l'absence de ligand, à gauche, les protéines Trk ne dimérisent ni n'activent les voies de signalisation en aval. En présence de ligand (cercle rouge), les protéines Trk se dimérisent, conduisant à l'activation de la voie en aval.

La ligne double représente la membrane cellulaire.

(C) Les oncogènes de fusion se dimérisent de manière indépendante du ligand, ce qui conduit à une activation constitutive et à une signalisation en aval. D'après (Farago et al., 2015))

Ces protéines de fusion sont retrouvées aussi bien dans les gliomes de bas grade que dans les glioblastomes (Amatu et al., 2016) et font l'objet d'un ciblage thérapeutique. Parmi les traitements possibles ciblant les protéines de fusion (**Tableau 14**), l'entrectinib, un puissant inhibiteur oral des tyrosines kinases TrkA/B/C, ROS1 et ALK, a été évalué dans deux études de phase I chez des patients atteints de tumeurs solides avancées ou métastatiques (y compris chez des patients présentant des métastases cérébrales). L'entrectinib a été bien toléré et les effets indésirables de grades 1/2 sont réversibles après diminution de la dose (Ardini et al., 2016; Liu et al., 2018).

L'entrectinib induit *in vitro* l'inhibition de la croissance de la lignée cellulaire SH-SY5Y transfectée avec TrkB et dérivée de neuroblastome améliore l'efficacité du TMZ *in vitro* et *in vivo* (xénogreffes de souris)(Iyer et al., 2016).



Dans les glioblastomes, le larotrectinib (LOXO-101) semble être efficace chez les patients présentant des fusions de Trk (Schram et al., 2017) et une étude de phase II, NAVIGATE, est en cours (NCT02576431). L'utilisation de ces nouveaux inhibiteurs des Trks dans le cadre d'un schéma thérapeutique modifié reposant sur la détection des nouveaux biomarqueurs que nous avons caractérisés ouvre de nouvelles perspectives en matière de prise en charge des patients.

Tableau 14 Traitements anti-protéines de fusion impliquant Trk

Drug name	Direct gene targets	Development PHASE	Company
LOXO-101	NTRK1, NTRK2, NTRK3	Phase 2	Loxo Oncology
Entrectinib	NTRK1, NTRK2, NTRK3, ALK, ROS1	Phase 2	Ignyta
Cabozantinib ^a	NTRK2, KDR, MET, RET, KIT, FLT1, FLT3, FLT4, AXL	Phase 2	Exelixis
Merestinib	NTRK1, NTRK2, NTRK3, MET, AXL, ROS1, MKNK1, MKNK2, FLT3, TEK, DDR1, DDR2	Phase 2	Eli Lilly and Company
TSR-011	NTRK1, NTRK2, NTRK3, ALK	Phase 1/2	Tesaro
DS-6051b	NTRK1, NTRK2, NTRK3, ROS1	Phase 1	Daiichi-Sankyo
PLX7486	NTRK1, NTRK2, NTRK3, CSF1R	Phase 1	Plexxicon
MGCCD516	NTRK1, NTRK2, NTRK3, DDR2, MET, KIT, KDR, PDGFR,	Phase 1	Mirati Therapeutics

^a Cabozantinib is FDA approved for other indications.

D'après Khotskaya et al. (Khotskaya et al., 2017)

1.1.4. Biopsies liquides et exosomes vers de futures applications dans les gliomes.

Dans ce travail nous montrons que TrkB et p75^{NTR} sont abondants dans les exosomes de patients atteints de gliomes. A la différence du travail précédent de Pinet *et al.*, il n' a pas été mis en évidence de différences significatives d'expression entre les sujets sains et les patients. Néanmoins, le niveau d'expression de ces deux marqueurs est inférieur dans les exosomes de sujets sains comparativement à ceux des patients. Ces résultats sont concordants avec la littérature où il est mis en évidence que la protéine VEGF-A est présente dans les exosomes normaux et pathologiques mais est surexprimée dans les exosomes pathologiques (Treppe et al., 2017). Enfin, il est retrouvé une variation d'expression de TrkB et de p75^{NTR} selon la nature et le degré d'agressivité de la tumeur (métastases, gliomes de bas et haut grade).

Ces résultats préliminaires concernant l'application et l'utilisation des exosomes et de leur contenu pour identifier des biomarqueurs pronostiques sont encourageants et offrent des perspectives de suivi non invasif. En effet, en utilisant les exosomes il serait possible de s'affranchir de nouvelles biopsies pour appréhender le profil des gliomes, souvent difficiles d'accès. Réaliser des biopsies multiples pour appréhender l'intégralité des profils moléculaires est alors difficilement envisageable en routine. Ces informations sont néanmoins nécessaires pour permettre l'étude de l'évolution clonale et de l'hétérogénéité tumorale à l'aide de l'analyse des profils moléculaires notamment dans les GBM multifocaux (Abou-El-Ardat et



al., 2017). La présence de biomarqueurs circulants au sein des exosomes simplifie alors la mise en évidence d'anomalies génétiques.

Dans le domaine de l'immunothérapie, certains des biomarqueurs que nous avons étudiés pourraient également présenter un intérêt majeur en tant que biomarqueur compagnon. L'immunothérapie a fait la preuve de son efficacité dans de nombreux cancers comme le cancer du poumon, le cancer du rein et le mélanome. Bien que le glioblastome soit moins immunogène que le cancer du poumon, l'immunothérapie est en plein développement avec notamment les inhibiteurs des checkpoints (anti-PD1 et anti-PDL-1), car il semble que l'efficacité de ces nouveaux anticorps dépendent plus de la charge mutationnelle de la tumeur que de l'immunogénicité (Goodman et al., 2017).

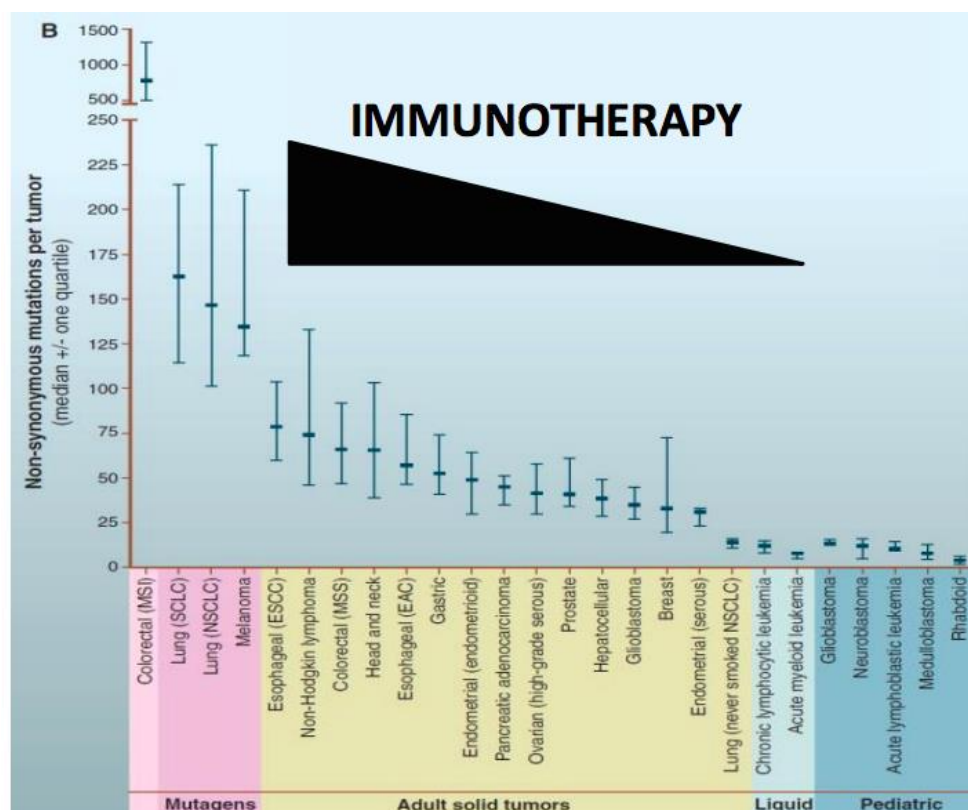


Figure 31 Immunogénicité des tumeurs
D'après (Vogelstein et al., 2013)

Il a été montré que PD-L1 est surexprimé dans le glioblastome (Zhang et al., 2015) et que p75^{NTR} associé à PD-L1 pouvaient être impliqués dans les phénomènes de résistance tumorale (Furuta et al., 2014). Ces derniers auteurs ont ainsi montré que dans les cellules de mélanome, la surexpression du récepteur PD-L1 et p75^{NTR} supprime l'activation des lymphocytes T cytotoxiques. L'inhibition du signal de p75^{NTR} dans des cellules cancéreuses renforcerait alors l'effet anti-tumoral des anticorps bloquants anti-PD-L1 et anti-PD-1. Dans des



résultats préliminaires non présentés, nous avons montré que p75^{NTR} et PD-L1 étaient exprimés dans les exosomes. Il nous faudra confirmer s'il existe une co-expression de ces marqueurs et si ces 2 marqueurs sont associés au sein des mêmes exosomes. Dans ce cas, l'expression combinée de ces marqueurs pourrait éventuellement être utilisée comme biomarqueurs compagnon afin de tester d'éventuelles immunothérapies.



CONCLUSION

Les gliomes sont des tumeurs cérébrales primitives présentant encore peu de critères diagnostiques indiscutables, ce qui rend leur prise charge particulièrement difficile. La classification actuelle des gliomes repose sur une approche histo-moléculaire. Cependant, la distinction de sous-groupes plus homogènes reste complexe et imposerait d'enrichir cette classification avec de nouveaux biomarqueurs.

Nos travaux apportent des éléments forts pour proposer une intégration des biomarqueurs *CHI3L1* et *NTRK2* dans la classification OMS 2016. Alors que *CHI3L1* est surexprimé dans les glioblastomes et sous exprimé dans les gliomes de bas grade, la relation inverse est observée pour *NTRK2*. En conséquence, nous proposons un arbre diagnostique incluant la combinaison de ces deux marqueurs.

La prise en compte de ces biomarqueurs participerait, dans une classification moléculaire des gliomes, à l'adaptation des traitements à des populations plus homogènes de patients, notamment en distinguant :

- 1) Les patients peu répondeurs aux traitements existants bénéficiaires d'un traitement plus intensif et/ou plus ciblé ;
- 2) Les patients avec un pronostic favorable et pour lesquels l'intensité des traitements serait diminuée, afin d'améliorer leur qualité de vie.

Un des axes à explorer est le transfert d'agressivité tumorale via les exosomes qui autorisent une communication intercellulaire avec échange de matériel protéique ou génétique. Nous proposons que TrkB et son co-récepteur p75 soient monitorés pour un suivi de l'évolution des gliomes. Nos données fournissent un rationnel pour la mise en place d'un essai prospectif visant à les analyser dans une cohorte plus importante de patients porteurs de gliomes. Des témoins sains et des métastases cérébrales devront être aussi inclus dans cette étude.

Une des alternatives pour analyser les exosomes, serait d'évaluer leur présence dans l'urine ou la salive des malades, ce qui constituerait une méthode encore moins invasive que la prise de sang. En effet, un des axes à explorer est l'analyse de la variation des altérations moléculaires sous l'influence des traitements administrés et l'apparition de mécanismes de résistance.



Parallèlement, le traitement des gliomes repose sur le triptyque : chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie conventionnelle. À ce jour, aucun essai testant de nouvelles approches thérapeutiques n'a abouti à une amélioration de la survie globale des patients.

L'une des perspectives de nos travaux est de proposer un nouvel axe de recherche sur PD-L1 qui pourrait agir comme co-récepteur de p75^{NTR} et/ou TrkB dans les exosomes. Ces recherches déboucheraient sur des essais de combinaisons thérapeutiques impliquant l'immunothérapie et les thérapies ciblées. Il serait par ailleurs envisageable de définir un biomarqueur compagnon PD-L1/ p75^{NTR} et/ou TrkB soit pour prédire la réponse aux traitements soit pour suivre la modulation du système immunitaire par les cellules tumorales selon un processus d'« immuno-monitoring ».

Enfin, une des pistes les plus abouties dans l'utilisation des exosomes est leur application thérapeutique comme vaccin. L'objectif est alors d'induire une réponse lymphocytaire contre des antigènes tumoraux. Utiliser les exosomes « chargés » avec des antigènes exprimés par la tumeur qui pourraient être les couples PD-L1/ de p75^{NTR} et/ou TrkB s'inscrit dans une perspective volontaire de thérapie ciblée.

Nos travaux et résultats montrent la nécessité de trouver, non seulement de nouveaux biomarqueurs, mais également de nouvelles méthodes d'identification des cellules tumorales, des exosomes et des biomarqueurs qu'ils transportent, pour mettre au point de nouvelles applications thérapeutiques.



RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Abou-El-Ardat, K., Seifert, M., Becker, K., Eisenreich, S., Lehmann, M., Hackmann, K., Rump, A., Meijer, G., Carvalho, B., Temme, A., et al. (2017). Comprehensive molecular characterization of multifocal glioblastoma proves its monoclonal origin and reveals novel insights into clonal evolution and heterogeneity of glioblastomas. *Neuro-Oncol.* *19*, 546–557.
2. Ahn, B.Y., Saldanha-Gama, R.F.G., Rahn, J.J., Hao, X., Zhang, J., Dang, N.-H., Alshehri, M., Robbins, S.M., and Senger, D.L. (2016). Glioma invasion mediated by the p75 neurotrophin receptor (p75NTR/CD271) requires regulated interaction with PDLIM1. *Oncogene* *35*, 1411.
3. Akers, J.C., Ramakrishnan, V., Kim, R., Skog, J., Nakano, I., Pingle, S., Kalinina, J., Hua, W., Kesari, S., Mao, Y., et al. (2013). MiR-21 in the extracellular vesicles (EVs) of cerebrospinal fluid (CSF): a platform for glioblastoma biomarker development. *PloS One* *8*, e78115.
4. Akiyama, Y., Ashizawa, T., Komiyama, M., Miyata, H., Oshita, C., Omiya, M., Iizuka, A., Kume, A., Sugino, T., Hayashi, N., et al. (2014). YKL-40 downregulation is a key factor to overcome temozolomide resistance in a glioblastoma cell line. *Oncol. Rep.* *32*, 159–166.
5. Al-Nedawi, K., Meehan, B., Micallef, J., Lhotak, V., May, L., Guha, A., and Rak, J. (2008). Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat. Cell Biol.* *10*, 619–624.
6. Amatu, A., Sartore-Bianchi, A., and Siena, S. (2016). NTRK gene fusions as novel targets of cancer therapy across multiple tumour types. *ESMO Open* *1*, e000023.
7. Andersen, C.L., Jensen, J.L., and Ørntoft, T.F. (2004). Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Res.* *64*, 5245–5250.
8. Ardini, E., Menichincheri, M., Banfi, P., Bosotti, R., De Ponti, C., Pulci, R., Ballinari, D., Ciomei, M., Texido, G., Degrassi, A., et al. (2016). Entrectinib, a Pan-TRK, ROS1, and ALK Inhibitor with Activity in Multiple Molecularly Defined Cancer Indications. *Mol. Cancer Ther.* *15*, 628–639.
9. Assimakopoulou, M., Kondyli, M., Gatzounis, G., Maraziotis, T., and Varakis, J. (2007). Neurotrophin receptors expression and JNK pathway activation in human astrocytomas. *BMC Cancer* *7*, 202.
10. Bailey, P., and Bucy, P.C. (1929). Oligodendrogliomas of the brain. *J. Pathol. Bacteriol.* *32*, 735–751.
11. Bailey, P., and Cushing, H. (1927). A classification of the tumours of the glioma group on a histogenetic basis, with a correlated study of prognosis. *Br. J. Surg.* *14*, 554–555.
12. Barde, Y.A., Edgar, D., and Thoenen, H. (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* *1*, 549–553.
13. Barker, P.A., Lomen-Hoerth, C., Gensch, E.M., Meakin, S.O., Glass, D.J., and Shooter, E.M. (1993). Tissue-specific alternative splicing generates two isoforms of the trkA receptor. *J. Biol. Chem.* *268*, 15150–15157.
14. Bauchet, L., Zouaoui, S., Darlix, A., Menjot de Champfleury, N., Ferreira, E., Fabbro, M., Kerr, C., and Taillandier, L. (2014). Assessment and treatment relevance in elderly glioblastoma patients. *Neuro-Oncol.* *16*, 1459–1468.
15. Baumert, B.G., Hegi, M.E., van den Bent, M.J., von Deimling, A., Gorlia, T., Hoang-Xuan, K., Brandes, A.A., Kantor, G., Taphoorn, M.J.B., Hassel, M.B., et al. (2016). Temozolomide chemotherapy versus radiotherapy in high-risk low-grade glioma (EORTC 22033-26033): a randomised, open-label, phase 3 intergroup study. *Lancet Oncol.* *17*, 1521–1532.
16. Bent, M.J. van den, Baumert, B., Erridge, S.C., Vogelbaum, M.A., Nowak, A.K., San-



- son, M., Brandes, A.A., Clement, P.M., Baurain, J.F., Mason, W.P., et al. (2017). Interim results from the CATNON trial (EORTC study 26053-22054) of treatment with concurrent and adjuvant temozolomide for 1p/19q non-co-deleted anaplastic glioma: a phase 3, randomised, open-label intergroup study. *The Lancet* 390, 1645–1653.
17. van den Bent, M.J. (2010). Interobserver variation of the histopathological diagnosis in clinical trials on glioma: a clinician's perspective. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 120, 297–304.
 18. van den Bent, M.J., Brandes, A.A., Taphoorn, M.J.B., Kros, J.M., Kouwenhoven, M.C.M., Delattre, J.-Y., Bernsen, H.J.J.A., Frenay, M., Tijssen, C.C., Grisold, W., et al. (2013). Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy in newly diagnosed anaplastic oligodendroglioma: long-term follow-up of EORTC brain tumor group study 26951. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 31, 344–350.
 19. Bettgowda, C., Agrawal, N., Jiao, Y., Sausen, M., Wood, L.D., Hruban, R.H., Rodriguez, F.J., Cahill, D.P., McLendon, R., Riggins, G., et al. (2011). Mutations in CIC and FUBP1 Contribute to Human Oligodendroglioma. *Science* 333, 1453–1455.
 20. Bleau, G., Massicotte, F., Merlen, Y., and Boisvert, C. (1999). Mammalian chitinase-like proteins. *EXS* 87, 211–221.
 21. Boeshore, K.L., Luckey, C.N., Zigmond, R.E., and Large, T.H. (1999). TrkB isoforms with distinct neurotrophin specificities are expressed in predominantly nonoverlapping populations of avian dorsal root ganglion neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 4739–4747.
 22. Boisen, M.K., Holst, C.B., Consalvo, N., Chinot, O.L., and Johansen, J.S. (2017). Plasma YKL-40 as a biomarker for bevacizumab efficacy in patients with newly diagnosed glioblastoma in the phase 3 randomized AVAglio trial. *Oncotarget* 9, 6752–6762.
 23. Bonne-Barkay, D., Bissel, S.J., Kofler, J., Starkey, A., Wang, G., and Wiley, C.A. (2012). Astrocyte and macrophage regulation of YKL-40 expression and cellular response in neuroinflammation. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 22, 530–546.
 24. Braganza, M.Z., Kitahara, C.M., Berrington de González, A., Inskip, P.D., Johnson, K.J., and Rajaraman, P. (2012). Ionizing radiation and the risk of brain and central nervous system tumors: a systematic review. *Neuro-Oncol.* 14, 1316–1324.
 25. Brennan, C.W., Verhaak, R.G.W., McKenna, A., Campos, B., Nounmehr, H., Salama, S.R., Zheng, S., Chakravarty, D., Sanborn, J.Z., Berman, S.H., et al. (2013). The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 155, 462–477.
 26. Brodeur, G.M. (2003). Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat. Rev. Cancer* 3, 203–216.
 27. Brodeur, G.M. (2018). Spontaneous regression of neuroblastoma. *Cell Tissue Res.* 372, 277–286.
 28. Buckner, J.C., Pugh, S.L., Shaw, E.G., Gilbert, M.R., Barger, G., Coons, S., Ricci, P., Bullard, D., Brown, P.D., Stelzer, K., et al. (2014). Phase III study of radiation therapy (RT) with or without procarbazine, CCNU, and vincristine (PCV) in low-grade glioma: RTOG 9802 with Alliance, ECOG, and SWOG. *J. Clin. Oncol.* 32, 2000–2000.
 29. Bussink, A.P., Speijer, D., Aerts, J.M.F.G., and Boot, R.G. (2007). Evolution of mammalian chitinase(-like) members of family 18 glycosyl hydrolases. *Genetics* 177, 959–970.
 30. Cairncross, G., Wang, M., Shaw, E., Jenkins, R., Brachman, D., Buckner, J., Fink, K., Souhami, L., Laperriere, N., Curran, W., et al. (2013). Phase III trial of chemoradiotherapy for anaplastic oligodendroglioma: long-term results of RTOG 9402. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 31, 337–343.
 31. Cairns, R.A., Harris, I.S., and Mak, T.W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nat. Rev. Cancer* 11, 85–95.
 32. Cancer Genome Atlas Research Network, Brat, D.J., Verhaak, R.G.W., Aldape, K.D., Yung, W.K.A., Salama, S.R., Cooper, L.A.D., Rheinbay, E., Miller, C.R., Vitucci, M., et al. (2015). Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *N. Engl. J. Med.* 372, 2481–2498.
 33. Capper, D., Zentgraf, H., Balss, J., Hartmann, C., and von Deimling, A. (2009). Mono-



- clonal antibody specific for IDH1 R132H mutation. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 118, 599–601.
34. Ceccarelli, M., Barthel, F.P., Malta, T.M., Sabedot, T.S., Salama, S.R., Murray, B.A., Morozova, O., Newton, Y., Radenbaugh, A., Pagnotta, S.M., et al. (2016). Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma. *Cell* 164, 550–563.
35. Chaichana, K.L., Jusue-Torres, I., Navarro-Ramirez, R., Raza, S.M., Pascual-Gallego, M., Ibrahim, A., Hernandez-Hermann, M., Gomez, L., Ye, X., Weingart, J.D., et al. (2014). Establishing percent resection and residual volume thresholds affecting survival and recurrence for patients with newly diagnosed intracranial glioblastoma. *Neuro-Oncol.* 16, 113–122.
36. Chamberlain, M.C., and Born, D. (2015). Prognostic significance of relative 1p/19q codeletion in oligodendroglial tumors. *J. Neurooncol.* 125, 249–251.
37. Chao, M.V., Bothwell, M.A., Ross, A.H., Koprowski, H., Lanahan, A.A., Buck, C.R., and Sehgal, A. (1986). Gene transfer and molecular cloning of the human NGF receptor. *Science* 232, 518–521.
38. Chen, G., Gharib, T.G., Huang, C.-C., Taylor, J.M.G., Misek, D.E., Kardia, S.L.R., Giordano, T.J., Iannettoni, M.D., Orringer, M.B., Hanash, S.M., et al. (2002). Discordant Protein and mRNA Expression in Lung Adenocarcinomas. *Mol. Cell. Proteomics* 1, 304–313.
39. Cheray, M., Petit, D., Forestier, L., Karayan-Tapon, L., Maftah, A., Jauberteau, M.-O., Battu, S., Gallet, F.P., and Lalloué, F. (2011). Glycosylation-related gene expression is linked to differentiation status in glioblastomas undifferentiated cells. *Cancer Lett.* 312, 24–32.
40. Cheray, M., Bessette, B., Lacroix, A., Mélin, C., Jawhari, S., Pinet, S., Deluche, E., Clavère, P., Durand, K., Sanchez-Prieto, R., et al. (2016). KLRC3, a Natural Killer receptor gene, is a key factor involved in glioblastoma tumorigenesis and aggressiveness. *J. Cell. Mol. Med.* n/a-n/a.
41. Chinot, O.L., Wick, W., Mason, W., Henriksson, R., Saran, F., Nishikawa, R., Carpentier, A.F., Hoang-Xuan, K., Kavan, P., Cernea, D., et al. (2014). Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 370, 709–722.
42. Clary, D.O., and Reichardt, L.F. (1994). An alternatively spliced form of the nerve growth factor receptor TrkA confers an enhanced response to neurotrophin 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 11133–11137.
43. Colombo, M., Raposo, G., and Théry, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30, 255–289.
44. Coutton, C., Vieville, G., Satre, V., Devillard, F., and Amblard, F. (2012). Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) et sondes « à façon » entièrement synthétiques. Guide pratique, recommandations et expérience au CHU de Grenoble. *IRBM* 33, 227–235.
45. Dumas-Duport, C., and Varlet, P. (2003). [Dysembryoplastic neuroepithelial tumors]. *Rev. Neurol. (Paris)* 159, 622–636.
46. Decoster, L., Van Puyvelde, K., Mohile, S., Wedding, U., Basso, U., Colloca, G., Rossoft, S., Overcash, J., Wildiers, H., Steer, C., et al. (2015). Screening tools for multidimensional health problems warranting a geriatric assessment in older cancer patients: an update on SIOG recommendations†. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 26, 288–300.
47. Deluche, E., Leobon, S., Lamarche, F., and Tubiana-Mathieu, N. (2018). First validation of the G-8 geriatric screening tool in older patients with glioblastoma. *J. Geriatr. Oncol.* 0.
48. Dubbink, H.J., Atmodimedjo, P.N., Kros, J.M., French, P.J., Sanson, M., Idbaih, A., Wesseling, P., Enting, R., Spliet, W., Tijssen, C., et al. (2016). Molecular classification of anaplastic oligodendroglioma using next-generation sequencing: a report of the prospective randomized EORTC Brain Tumor Group 26951 phase III trial. *Neuro-Oncol.* 18, 388–400.



49. Ducray, F., Idbaih, A., de Reyniès, A., Bièche, I., Thillet, J., Mokhtari, K., Lair, S., Marie, Y., Paris, S., Vidaud, M., et al. (2008). Anaplastic oligodendrogliomas with 1p19q codeletion have a proneural gene expression profile. *Mol. Cancer* 7, 41.
50. Duffau, H. (2013). The reliability of asleep-awake-asleep protocol for intraoperative functional mapping and cognitive monitoring in glioma surgery. *Acta Neurochir. (Wien)* 155, 1803–1804.
51. Duffau, H., Gallot, M., Spittler, A., and Gardien, M. (2012). La chirurgie éveillée des tumeurs cérébrales. /data/revues/02423960/00300004/267/.
52. Eckel-Passow, J.E., Lachance, D.H., Molinaro, A.M., Walsh, K.M., Decker, P.A., Sicotte, H., Pekmezci, M., Rice, T., Kosel, M.L., Smirnov, I.V., et al. (2015). Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors. *N. Engl. J. Med.* 372, 2499–2508.
53. Eid, R., Demattei, M.-V., Episkopou, H., Augé-Gouillou, C., Decottignies, A., Grandin, N., and Charbonneau, M. (2015). Genetic Inactivation of ATRX Leads to a Decrease in the Amount of Telomeric Cohesin and Level of Telomere Transcription in Human Glioma Cells. *Mol. Cell. Biol.* 35, 2818–2830.
54. Ernfors, P., F Lee, K., and Jaenisch, R. (1994a). Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits. *Nature* 368, 147–150.
55. Ernfors, P., Lee, K.F., Kucera, J., and Jaenisch, R. (1994b). Lack of neurotrophin-3 leads to deficiencies in the peripheral nervous system and loss of limb proprioceptive afferents. *Cell* 77, 503–512.
56. Farago, A.F., Le, L.P., Zheng, Z., Muzikansky, A., Drilon, A., Patel, M., Bauer, T.M., Liu, S.V., Ou, S.-H.I., Jackman, D., et al. (2015). Durable Clinical Response to Entrectinib in NTRK1-Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* 10, 1670–1674.
57. Figarella-Branger, D., Colin, C., Coulibaly, B., Quilichini, B., Paula, A.M.D., Fernandez, C., and Bouvier, C. (2008). Classification histologique et moléculaire des gliomes.
58. Figarella-Branger, D., Labrousse, F., and Mohktari, K. (2012). Référentiel gliomes diffus de l'adulte de grade OMS II, III et IV : anatomie pathologique et biologie. *Ann. Pathol.* 32, 318–327.
59. Forsyth, P.A., Krishna, N., Lawn, S., Valadez, J.G., Qu, X., Fenstermacher, D.A., Fournier, M., Potthast, L., Chinnaiyan, P., Gibney, G.T., et al. (2014). p75 neurotrophin receptor cleavage by α - and γ -secretases is required for neurotrophin-mediated proliferation of brain tumor-initiating cells. *J. Biol. Chem.* 289, 8067–8085.
60. Francescone, R.A., Scully, S., Faibish, M., Taylor, S.L., Oh, D., Moral, L., Yan, W., Bentley, B., and Shao, R. (2011). Role of YKL-40 in the angiogenesis, radioresistance, and progression of glioblastoma. *J. Biol. Chem.* 286, 15332–15343.
61. Fuster, M.M., and Esko, J.D. (2005). The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nat. Rev. Cancer* 5, 526–542.
62. Giannini, C., Scheithauer, B.W., Weaver, A.L., Burger, P.C., Kros, J.M., Mork, S., Graeber, M.B., Bauserman, S., Buckner, J.C., Burton, J., et al. (2001). Oligodendrogliomas: Reproducibility and Prognostic Value of Histologic Diagnosis and Grading. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 60, 248–262.
63. Gibbons, R.J., Picketts, D.J., Villard, L., and Higgs, D.R. (1995). Mutations in a putative global transcriptional regulator cause X-linked mental retardation with alpha-thalassemia (ATR-X syndrome). *Cell* 80, 837–845.
64. Gilbert, M.R., Dignam, J.J., Armstrong, T.S., Wefel, J.S., Blumenthal, D.T., Vogelbaum, M.A., Colman, H., Chakravarti, A., Pugh, S., Won, M., et al. (2014). A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 370, 699–708.
65. Gillet, E., Alentorn, A., Doukouré, B., Mundwiler, E., van Thuijl, H.F., van Thuijl, H., Reijneveld, J.C., Medina, J.A.M., Liou, A., Marie, Y., et al. (2014). TP53 and p53 statuses and their clinical impact in diffuse low grade gliomas. *J. Neurooncol.* 118, 131–139.
66. Giraud, S., Loum, E., Bessette, B., Mathonnet, M., and Lalloué, F. (2011). P75 neuro-



trophin receptor is sequestered in the Golgi apparatus of the U-87 MG human glioblastoma cell line. *Int. J. Oncol.* 38, 391–399.

67. Gonda, D.D., Akers, J.C., Kim, R., Kalkanis, S.N., Hochberg, F.H., Chen, C.C., and Carter, B.S. (2013). Neuro-oncologic applications of exosomes, microvesicles, and other nano-sized extracellular particles. *Neurosurgery* 72, 501–510.

68. Goodman, A.M., Kato, S., Bazhenova, L., Patel, S.P., Frampton, G.M., Miller, V., Stephens, P.J., Daniels, G.A., and Kurzrock, R. (2017). Tumor Mutational Burden as an Independent Predictor of Response to Immunotherapy in Diverse Cancers. *Mol. Cancer Ther.* molcanther.0386.2017.

69. Gourlay, J., Morokoff, A.P., Luwor, R.B., Zhu, H.-J., Kaye, A.H., and Stylli, S.S. (2017). The emergent role of exosomes in glioma. *J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas.* 35, 13–23.

70. Gozé, C., Blonski, M., Le Maistre, G., Bauchet, L., Dezamis, E., Page, P., Varlet, P., Capelle, L., Devaux, B., Taillandier, L., et al. (2014). Imaging growth and isocitrate dehydrogenase 1 mutation are independent predictors for diffuse low-grade gliomas. *Neuro-Oncol.* 16, 1100–1109.

71. Gravendeel, L.A., Kouwenhoven, M.C., Gevaert, O., de Rooij, J.J., Stubbs, A.P., Duijm, J.E., Daemen, A., Bleeker, F.E., Bralten, L.B., and Kloosterhof, N.K. (2009). Intrinsic gene expression profiles of gliomas are a better predictor of survival than histology. *Cancer Res.* 69, 9065–9072.

72. Grotzer, M.A., Janss, A.J., Phillips, P.C., and Trojanowski, J.Q. (2000). Neurotrophin receptor TrkC predicts good clinical outcome in medulloblastoma and other primitive neuroectodermal brain tumors. *Klin. Padiatr.* 212, 196–199.

73. Gzell, C., Back, M., Wheeler, H., Bailey, D., and Foote, M. (2017). Radiotherapy in Glioblastoma: the Past, the Present and the Future. *Clin. Oncol. R. Coll. Radiol. G. B.* 29, 15–25.

74. Hakomori, S. (2002). Glycosylation defining cancer malignancy: New wine in an old bottle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 10231–10233.

75. Hakomori, S., and Kannagi, R. (1983). Glycosphingolipids as tumor-associated and differentiation markers. *J. Natl. Cancer Inst.* 71, 231–251.

76. Hallböök, F. (1999). Evolution of the vertebrate neurotrophin and Trk receptor gene families. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9, 616–621.

77. Hallböök, F., Ibáñez, C.F., and Persson, H. (1991). Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron* 6, 845–858.

78. Hansen, K., Wagner, B., Hamel, W., Schweizer, M., Haag, F., Westphal, M., and Lamszus, K. (2007). Autophagic cell death induced by TrkA receptor activation in human glioblastoma cells. *J. Neurochem.* 103, 259–275.

79. Harada, S., Henderson, L.B., Eshleman, J.R., Gocke, C.D., Burger, P., Griffin, C.A., and Batista, D.A.S. (2011). Genomic Changes in Gliomas Detected Using Single Nucleotide Polymorphism Array in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue: Superior Results Compared with Microsatellite Analysis. *J. Mol. Diagn.* 13, 541–548.

80. Hartmann, C., Meyer, J., Balss, J., Capper, D., Mueller, W., Christians, A., Felsberg, J., Wolter, M., Mawrin, C., Wick, W., et al. (2009). 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. (Berl.)* 118, 469–474.

81. Heiland, D.H., Ferrarese, R., Claus, R., Dai, F., Masilamani, A.P., Kling, E., Weybrock, A., Kling, T., Nelander, S., and Carro, M.S. (2016). c-Jun-N-terminal phosphorylation regulates DNMT1 expression and genome wide methylation in gliomas. *Oncotarget* 8, 6940–6954.

82. Henson, J.D., Hannay, J.A., McCarthy, S.W., Royds, J.A., Yeager, T.R., Robinson, R.A., Wharton, S.B., Jellinek, D.A., Arbuckle, S.M., Yoo, J., et al. (2005). A robust assay for alternative lengthening of telomeres in tumors shows the significance of alternative leng-



thening of telomeres in sarcomas and astrocytomas. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 11, 217–225.

83. Herrup, K., and Shooter, E.M. (1973). Properties of the β Nerve Growth Factor Receptor of Avian Dorsal Root Ganglia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70, 3884–3888.

84. Hirsch, F.R., Varella-Garcia, M., Bunn, P.A., Di Maria, M.V., Veve, R., Bremmes, R.M., Barón, A.E., Zeng, C., and Franklin, W.A. (2003). Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 21, 3798–3807.

85. Ho, R., Eggert, A., Hishiki, T., Minturn, J.E., Ikegaki, N., Foster, P., Camoratto, A.M., Evans, A.E., and Brodeur, G.M. (2002). Resistance to chemotherapy mediated by TrkB in neuroblastomas. *Cancer Res.* 62, 6462–6466.

86. Hohn, A., Leibrock, J., Bailey, K., and Barde, Y.A. (1990). Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* 344, 339–341.

87. Horbinski, C., Wang, G., and Wiley, C.A. (2010). YKL-40 is directly produced by tumor cells and is inversely linked to EGFR in glioblastomas. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 3, 226–237.

88. Hormigo, A., Gu, B., Karimi, S., Riedel, E., Panageas, K.S., Edgar, M.A., Tanwar, M.K., Rao, J.S., Fleisher, M., DeAngelis, L.M., et al. (2006). YKL-40 and matrix metalloproteinase-9 as potential serum biomarkers for patients with high-grade gliomas. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 12, 5698–5704.

89. Huang, E.J., and Reichardt, L.F. (2003). Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 609–642.

90. Ius, T., Isola, M., Budai, R., Pauletto, G., Tomasino, B., Fadiga, L., and Skrap, M. (2012). Low-grade glioma surgery in eloquent areas: volumetric analysis of extent of resection and its impact on overall survival. A single-institution experience in 190 patients: clinical article. *J. Neurosurg.* 117, 1039–1052.

91. Iwamoto, F.M., Hottinger, A.F., Karimi, S., Riedel, E., Dantis, J., Jahdi, M., Panageas, K.S., Lassman, A.B., Abrey, L.E., Fleisher, M., et al. (2011). Serum YKL-40 is a marker of prognosis and disease status in high-grade gliomas. *Neuro-Oncol.* 13, 1244–1251.

92. Iyer, R., Wehrmann, L., Golden, R.L., Naraparaju, K., Croucher, J.L., MacFarland, S.P., Guan, P., Kolla, V., Wei, G., Cam, N., et al. (2016). Entrectinib is a potent inhibitor of Trk-driven neuroblastomas in a xenograft mouse model. *Cancer Lett.* 372, 179–186.

93. Jawhari, S., Bessette, B., Hombourger, S., Durand, K., Lacroix, A., Labrousse, F., Jauberteau, M.O., Ratinaud, M.H., and Verdier, M. (2017). Autophagy and TrkC/NT-3 signaling joined forces boost the hypoxic glioblastoma cell survival. *Carcinogenesis* 38, 592–603.

94. Jenkins, R.B., Blair, H., Ballman, K.V., Giannini, C., Arusell, R.M., Law, M., Flynn, H., Passe, S., Felten, S., Brown, P.D., et al. (2006). 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.* 66, 9852–9861.

95. Jeuken, J., Cornelissen, S., Boots-Sprenger, S., Gijzen, S., and Wesseling, P. (2006). Multiplex ligation-dependent probe amplification: a diagnostic tool for simultaneous identification of different genetic markers in glial tumors. *J. Mol. Diagn. JMD* 8, 433–443.

96. Jiao, Y., Killela, P.J., Reitman, Z.J., Rasheed, B.A., Heaphy, C.M., de Wilde, R.F., Rodriguez, F.J., Rosenberg, S., Oba-Shinjo, S.M., Marie, S.K.N., et al. (2012). Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas. *Oncotarget* 3, 709–722.

97. Johansen, J.S., Williamson, M.K., Rice, J.S., and Price, P.A. (1992). Identification of proteins secreted by human osteoblastic cells in culture. *J. Bone Miner. Res.* 7, 501–512.

98. Johansen, J.S., Jensen, B.V., Roslind, A., Nielsen, D., and Price, P.A. (2006). Serum YKL-40, a new prognostic biomarker in cancer patients? *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*



- Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol. 15, 194–202.
99. Johansen, J.S., Lottenburger, T., Nielsen, H.J., Jensen, J.E.B., Svendsen, M.N., Kolterup, G., and Christensen, I.J. (2008). Diurnal, weekly, and long-time variation in serum concentrations of YKL-40 in healthy subjects. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* 17, 2603–2608.
100. Johansen, J.S., Schultz, N.A., and Jensen, B.V. (2009). Plasma YKL-40: a potential new cancer biomarker? *Future Oncol. Lond. Engl.* 5, 1065–1082.
101. Johnson, B.E., Mazor, T., Hong, C., Barnes, M., Aihara, K., McLean, C.Y., Fouse, S.D., Yamamoto, S., Ueda, H., Tatsuno, K., et al. (2014). Mutational analysis reveals the origin and therapy-driven evolution of recurrent glioma. *Science* 343, 189–193.
102. Johnston, A.L., Lun, X., Rahn, J.J., Liacini, A., Wang, L., Hamilton, M.G., Parney, I.F., Hempstead, B.L., Robbins, S.M., Forsyth, P.A., et al. (2007). The p75 neurotrophin receptor is a central regulator of glioma invasion. *PLoS Biol* 5, e212.
103. Kalinichenko, S.V., Kopantzev, E.P., Korobko, E.V., Palgova, I.V., Zavalishina, L.E., Bateva, M.V., Petrov, A.N., Frank, G.A., Sverdlov, E.D., and Korobko, I.V. (2008). Pcd4 protein and mRNA level alterations do not correlate in human lung tumors. *Lung Cancer* 62, 173–180.
104. Kamoun, A., Idbaih, A., Dehais, C., Elarouci, N., Carpentier, C., Letouzé, E., Colin, C., Mokhtari, K., Jouvét, A., Uro-Coste, E., et al. (2016). Integrated multi-omics analysis of oligodendroglial tumours identifies three subgroups of 1p/19q co-deleted gliomas. *Nat. Commun.* 7, 11263.
105. Kaplan, D.R., and Miller, F.D. (1997). Signal transduction by the neurotrophin receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 213–221.
106. Kenis, C., Decoster, L., Van Puyvelde, K., De Grève, J., Conings, G., Milisen, K., Flamaing, J., Lobelle, J.-P., and Wildiers, H. (2014). Performance of two geriatric screening tools in older patients with cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 32, 19–26.
107. Kernohan, J.W., and Mabon, R.F. (1949). A simplified classification of the gliomas. *Proc. Staff Meet. Mayo Clin.* 24, 71–75.
108. Khot'skaya, Y.B., Holla, V.R., Farago, A.F., Mills Shaw, K.R., Meric-Bernstam, F., and Hong, D.S. (2017). Targeting TRK family proteins in cancer. *Pharmacol. Ther.* 173, 58–66.
109. Killela, P.J., Pirozzi, C.J., Healy, P., Reitman, Z.J., Lipp, E., Rasheed, B.A., Yang, R., Diplas, B.H., Wang, Z., Greer, P.K., et al. (2014). Mutations in IDH1, IDH2, and in the TERT promoter define clinically distinct subgroups of adult malignant gliomas. *Oncotarget* 5, 1515–1525.
110. Kimura, S., Yoshino, A., Katayama, Y., Watanabe, T., and Fukushima, T. (2002). Growth control of C6 glioma in vivo by nerve growth factor. *J. Neurooncol.* 59, 199–205.
111. Kleihues, P., and Sobin, L.H. (2000). World Health Organization classification of tumors. *Cancer* 88, 2887.
112. Kleihues, P., Burger, P.C., and Scheithauer, B.W. (1993). Definitions and explanatory notes. In *Histological Typing of Tumours of the Central Nervous System*, (Springer), pp. 11–51.
113. Klein, R., Nanduri, V., Jing, S.A., Lamballe, F., Tapley, P., Bryant, S., Cordon-Cardo, C., Jones, K.R., Reichardt, L.F., and Barbacid, M. (1991). The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell* 66, 395–403.
114. Klein, R., Smeyne, R.J., Wurst, W., Long, L.K., Auerbach, B.A., Joyner, A.L., and Barbacid, M. (1993). Targeted disruption of the trkB neurotrophin receptor gene results in nervous system lesions and neonatal death. *Cell* 75, 113–122.
115. de Kok, J.B., Roelofs, R.W., Giesendorf, B.A., Pennings, J.L., Waas, E.T., Feuth, T., Swinkels, D.W., and Span, P.N. (2005). Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 85, 154–159.
116. Koussounadis, A., Langdon, S.P., Um, I.H., Harrison, D.J., and Smith, V.A. (2015). Relationship between differentially expressed mRNA and mRNA-protein correlations in a



xenograft model system. *Sci. Rep.* 5.

117. Kramer, K., Cheung, N.-K.V., Gerald, W.L., LaQuaglia, M., Kushner, B.H., LeClerc, J.-M., LeSauter, L., and Saragovi, H.U. (1997). Correlation of MYCN amplification, Trk-A and CD44 expression with clinical stage in 250 patients with neuroblastoma. *Eur. J. Cancer* 33, 2098–2100.
118. Kroes, R.A., Dawson, G., and Moskal, J.R. (2007). Focused microarray analysis of glyco-gene expression in human glioblastomas. *J. Neurochem.* 103 Suppl 1, 14–24.
119. Kros, J.M., Gorlia, T., Kouwenhoven, M.C., Zheng, P.-P., Collins, V.P., Figarella-Branger, D., Giangaspero, F., Giannini, C., Mokhtari, K., Mørk, S.J., et al. (2007). Panel review of anaplastic oligodendroglioma from European Organization For Research and Treatment of Cancer Trial 26951: assessment of consensus in diagnosis, influence of 1p/19q loss, and correlations with outcome. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 66, 545–551.
120. Ku, B.M., Lee, Y.K., Ryu, J., Jeong, J.Y., Choi, J., Eun, K.M., Shin, H.Y., Kim, D.G., Hwang, E.M., Yoo, J.C., et al. (2011). CHI3L1 (YKL-40) is expressed in human gliomas and regulates the invasion, growth and survival of glioma cells. *Int. J. Cancer* 128, 1316–1326.
121. Kucharzewska, P., Christianson, H.C., Welch, J.E., Svensson, K.J., Fredlund, E., Ringnér, M., Mörgelin, M., Bourseau-Guilmain, E., Bengzon, J., and Belting, M. (2013). Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 7312–7317.
122. Lamballe, F., Klein, R., and Barbacid, M. (1991). trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell* 66, 967–979.
123. Lange, A.M., and Lo, H.-W. (2018). Inhibiting TRK Proteins in Clinical Cancer Therapy. *Cancers* 10.
124. Laperriere, N., Zuraw, L., Cairncross, G., and Cancer Care Ontario Practice Guidelines Initiative Neuro-Oncology Disease Site Group (2002). Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* 64, 259–273.
125. Lawn, S., Krishna, N., Pisklakova, A., Qu, X., Fenstermacher, D.A., Fournier, M., Vrionis, F.D., Tran, N., Chan, J.A., Kenchappa, R.S., et al. (2015). Neurotrophin signaling via TrkB and TrkC receptors promotes the growth of brain tumor-initiating cells. *J. Biol. Chem.* 290, 3814–3824.
126. Lee, K.F., Li, E., Huber, L.J., Landis, S.C., Sharpe, A.H., Chao, M.V., and Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the gene encoding the low affinity NGF receptor p75 leads to deficits in the peripheral sensory nervous system. *Cell* 69, 737–749.
127. Lee, R., Kermani, P., Teng, K.K., and Hempstead, B.L. (2001). Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294, 1945–1948.
128. Leeper, H.E., Caron, A.A., Decker, P.A., Jenkins, R.B., Lachance, D.H., and Giannini, C. (2015). IDH mutation, 1p19q codeletion and ATRX loss in WHO grade II gliomas. *Oncotarget* 6, 30295–30305.
129. Lessmann, V., Gottmann, K., and Malsangio, M. (2003). Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog. Neurobiol.* 69, 341–374.
130. Levi-Montalcini, R. (1952). Effects of mouse tumor transplantation on the nervous system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 55, 330–344.
131. Li, A., Walling, J., Ahn, S., Kotliarov, Y., Su, Q., Quezado, M., Oberholtzer, J.C., Park, J., Zenklusen, J.C., and Fine, H.A. (2009). Unsupervised analysis of transcriptomic profiles reveals six glioma subtypes. *Cancer Res.* 69, 2091–2099.
132. Li, S., Shi, J., Gao, H., Yuan, Y., Chen, Q., Zhao, Z., Wang, X., Li, B., Ming, L., Zhong, J., et al. (2014). Identification of a gene signature associated with radiotherapy and prognosis in gliomas. *Oncotarget* 5, 88974–88987.
133. Lin, A.L., and DeAngelis, L.M. (2017). Reappraising the 2016 WHO classification for diffuse glioma. *Neuro-Oncol.* 19, 609–610.
134. van Linde, M.E., van der Mijl, J.C., Pham, T.V., Knol, J.C., Wedekind, L.E., Hovinga,



- K.E., Aliaga, E.S., Buter, J., Jimenez, C.R., Reijneveld, J.C., et al. (2016). Evaluation of potential circulating biomarkers for prediction of response to chemoradiation in patients with glioblastoma. *J. Neurooncol.* 129, 221–230.
135. Liu, D., Offin, M., Harnicar, S., Li, B.T., and Drilon, A. (2018). Entrectinib: an orally available, selective tyrosine kinase inhibitor for the treatment of NTRK, ROS1, and ALK fusion-positive solid tumors. *Ther. Clin. Risk Manag.* 14, 1247–1252.
136. Liu, X., Ernfors, P., Wu, H., and Jaenisch, R. (1995). Sensory but not motor neuron deficits in mice lacking NT4 and BDNF. *Nature* 375, 238–241.
137. Liu, X.-Y., Gerges, N., Korshunov, A., Sabha, N., Khuong-Quang, D.-A., Fontebasso, A.M., Fleming, A., Hadjadj, D., Schwartzentruber, J., Majewski, J., et al. (2012). Frequent ATRX mutations and loss of expression in adult diffuse astrocytic tumors carrying IDH1/IDH2 and TP53 mutations. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 124, 615–625.
138. Liuu, E., Canoui-Poitrine, F., Tournigand, C., Laurent, M., Chaubet, M., Caillet, P., Le Thuaut, A., Vincent, H., Culine, S., and Paillaud, E. (2012). External validation of the G-8 geriatric screening tool to identify vulnerable elderly cancer patients: The ELCAPA-02 study. *J. Geriatr. Oncol.* 3, S45–S46.
139. Liuu, E., Canoui-Poitrine, F., Tournigand, C., Laurent, M., Caillet, P., Le Thuaut, A., Vincent, H., Culine, S., Audureau, E., Bastuji-Garin, S., et al. (2014). Accuracy of the G-8 geriatric-oncology screening tool for identifying vulnerable elderly patients with cancer according to tumour site: The ELCAPA-02 study. *J. Geriatr. Oncol.* 5, 11–19.
140. Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif* 25, 402–408.
141. Loiseau, H., Huchet, A., Rué, M., Cowppli-Bony, A., and Baldi, I. (2009). Épidémiologie des tumeurs cérébrales primitives. *Rev. Neurol. (Paris)* 165, 650–670.
142. Louis, D.N., Holland, E.C., and Cairncross, J.G. (2001). Glioma classification: a molecular reappraisal. *Am. J. Pathol.* 159, 779–786.
143. Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., Scheithauer, B.W., and Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 114, 97–109.
144. Louis, D.N., Perry, A., Burger, P., Ellison, D.W., Reifenberger, G., von Deimling, A., Aldape, K., Brat, D., Collins, V.P., Eberhart, C., et al. (2014). International Society Of Neuropathology--Haarlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 24, 429–435.
145. Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Kleihues, P., and Ellison, D.W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 131, 803–820.
146. Loussouarn, D., Le Loupp, A.-G., Frenel, J.-S., Leclair, F., Von Deimling, A., Aumont, M., Martin, S., Campone, M., and Denis, M.G. (2012). Comparison of immunohistochemistry, DNA sequencing and allele-specific PCR for the detection of IDH1 mutations in gliomas. *Int. J. Oncol.* 40, 2058–2062.
147. Lu, C., Ward, P.S., Kapoor, G.S., Rohle, D., Turcan, S., Abdel-Wahab, O., Edwards, C.R., Khanin, R., Figueroa, M.E., Melnick, A., et al. (2012). IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature* 483, 474–478.
148. Luberg, K., Wong, J., Weickert, C.S., and Timmusk, T. (2010). Human TrkB gene: novel alternative transcripts, protein isoforms and expression pattern in the prefrontal cerebral cortex during postnatal development. *J. Neurochem.* 113, 952–964.
149. Malmström, A., Grønberg, B.H., Marosi, C., Stupp, R., Frappaz, D., Schultz, H., Abacioglu, U., Tavelin, B., Lhermitte, B., Hegi, M.E., et al. (2012). Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 13, 916–926.
150. Martinez-Tapia, C., Paillaud, E., Liuu, E., Tournigand, C., Ibrahim, R., Fossey-Diaz,



- V., Culine, S., Canoui-Poitrine, F., and Audureau, E. (2017). Prognostic value of the G8 and modified-G8 screening tools for multidimensional health problems in older patients with cancer. *Eur. J. Cancer* 83, 211–219.
151. Martin-Zanca, D., Hughes, S.H., and Barbacid, M. (1986). A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. *Nature* 319, 743–748.
152. Melo, S.A., Sugimoto, H., O'Connell, J.T., Kato, N., Villanueva, A., Vidal, A., Qiu, L., Vitkin, E., Perelman, L.T., Melo, C.A., et al. (2014). Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis. *Cancer Cell* 26, 707–721.
153. Mesturoux, L., Durand, K., Pommepuy, I., Robert, S., Caire, F., and Labrousse, F. (2016). Molecular Analysis of Tumor Cell Components in Pilocytic Astrocytomas, Gangliogliomas, and Oligodendrogliomas. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. AIMM* 24, 496–500.
154. Metellus, P., Coulibaly, B., Colin, C., de Paula, A.M., Vasiljevic, A., Taieb, D., Barlier, A., Boisselier, B., Mokhtari, K., Wang, X.W., et al. (2010). Absence of IDH mutation identifies a novel radiologic and molecular subtype of WHO grade II gliomas with dismal prognosis. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 120, 719–729.
155. Modelska, A., Quattrone, A., and Re, A. (2015). Molecular portraits: the evolution of the concept of transcriptome-based cancer signatures. *Brief. Bioinform.* 16, 1000–1007.
156. Moremen, K.W., Tiemeyer, M., and Nairn, A.V. (2012). Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 448.
157. Moser, K.V., Reindl, M., Blasig, I., and Humpel, C. (2004). Brain capillary endothelial cells proliferate in response to NGF, express NGF receptors and secrete NGF after inflammation. *Brain Res.* 1017, 53–60.
158. Muller, P.A.J., and Vousden, K.H. (2013). p53 mutations in cancer. *Nat. Cell Biol.* 15, 2–8.
159. Muller, P.A.J., and Vousden, K.H. (2014). Mutant p53 in Cancer: New Functions and Therapeutic Opportunities. *Cancer Cell* 25, 304–317.
160. Nakagawara, A. (2001). Trk receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer and neural development. *Cancer Lett.* 169, 107–114.
161. Nakagawara, A., Arima, M., Azar, C.G., Scavarda, N.J., and Brodeur, G.M. (1992). Inverse relationship between trk expression and N-myc amplification in human neuroblastomas. *Cancer Res.* 52, 1364–1368.
162. Nakagawara, A., Azar, C.G., Scavarda, N.J., and Brodeur, G.M. (1994). Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Mol. Cell. Biol.* 14, 759–767.
163. Nakamura, M., Watanabe, T., Yonekawa, Y., Kleihues, P., and Ohgaki, H. (2001). Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C → A:T mutations of the TP53 tumor suppressor gene. *Carcinogenesis* 22, 1715–1719.
164. Nandakumar, P., Mansouri, A., and Das, S. (2017). The Role of ATRX in Glioma Biology. *Front. Oncol.* 7.
165. Noerholm, M., Balaj, L., Limperg, T., Salehi, A., Zhu, L.D., Hochberg, F.H., Breakefield, X.O., Carter, B.S., and Skog, J. (2012). RNA expression patterns in serum microvesicles from patients with glioblastoma multiforme and controls. *BMC Cancer* 12, 22.
166. Noushmehr, H., Weisenberger, D.J., Diefes, K., Phillips, H.S., Pujara, K., Berman, B.P., Pan, F., Pieloski, C.E., Sulman, E.P., Bhat, K.P., et al. (2010). Identification of a CpG Island Methylator Phenotype that Defines a Distinct Subgroup of Glioma. *Cancer Cell* 17, 510–522.
167. Nutt, C.L., Mani, D.R., Betensky, R.A., Tamayo, P., Cairncross, J.G., Ladd, C., Pohl, U., Hartmann, C., McLaughlin, M.E., and Batchelor, T.T. (2003). Gene expression-based classification of malignant gliomas correlates better with survival than histological classification. *Cancer Res.* 63, 1602–1607.
168. Nutt, C.L., Betensky, R.A., Brower, M.A., Batchelor, T.T., Louis, D.N., and Stemmer-



- Rachamimov, A.O. (2005). YKL-40 is a differential diagnostic marker for histologic subtypes of high-grade gliomas. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 11, 2258–2264.
169. Ohgaki, H., and Kleihues, P. (2005). Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 64, 479–489.
170. Ohgaki, H., and Kleihues, P. (2013). The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 19, 764–772.
171. Okamoto, Y., Di Patre, P.-L., Burkhard, C., Horstmann, S., Jourde, B., Fahey, M., Schüler, D., Probst-Hensch, N.M., Yasargil, M.G., Yonekawa, Y., et al. (2004). Population-based study on incidence, survival rates, and genetic alterations of low-grade diffuse astrocytomas and oligodendrogliomas. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 108, 49–56.
172. Olar, A., Wani, K.M., Alfaro-Munoz, K.D., Heathcock, L.E., van Thuijl, H.F., Gilbert, M.R., Armstrong, T.S., Sulman, E.P., Cahill, D.P., Vera-Bolanos, E., et al. (2015). IDH mutation status and role of WHO grade and mitotic index in overall survival in grade II-III diffuse gliomas. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 129, 585–596.
173. Ostrom, Q.T., Bauchet, L., Davis, F.G., Deltour, I., Fisher, J.L., Langer, C.E., Pekmezci, M., Schwartzbaum, J.A., Turner, M.C., Walsh, K.M., et al. (2014). The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review. *Neuro-Oncol.* 16, 896–913.
174. Ostrom, Q.T., Gittleman, H., Fulop, J., Liu, M., Blanda, R., Kromer, C., Wolinsky, Y., Kruchko, C., and Barnholtz-Sloan, J.S. (2015). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro-Oncol.* 17 Suppl 4, iv1–iv62.
175. Pallud, J., Mandonnet, E., Duffau, H., Kujas, M., Guillevin, R., Galanaud, D., Taillandier, L., and Capelle, L. (2006). Prognostic value of initial magnetic resonance imaging growth rates for World Health Organization grade II gliomas. *Ann. Neurol.* 60, 380–383.
176. Parsons, D.W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J.C.-H., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I.-M., Gallia, G.L., et al. (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 321, 1807–1812.
177. Pelloski, C.E., Mahajan, A., Maor, M., Chang, E.L., Woo, S., Gilbert, M., Colman, H., Yang, H., Ledoux, A., Blair, H., et al. (2005). YKL-40 expression is associated with poorer response to radiation and shorter overall survival in glioblastoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 11, 3326–3334.
178. Perry, J.R., Laperriere, N., O’Callaghan, C.J., Brandes, A.A., Menten, J., Phillips, C., Fay, M., Nishikawa, R., Cairncross, J.G., and Roa, W. (2017). Short-course radiation plus temozolomide in elderly patients with glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 376, 1027–1037.
179. Pflug, B.R., Colangelo, A.M., Tornatore, C., and Mocchetti, I. TrkA induces differentiation but not apoptosis in C6-2B glioma cells. *J. Neurosci. Res.* 64, 636–645.
180. Phillips, H.S., Kharbanda, S., Chen, R., Forrester, W.F., Soriano, R.H., Wu, T.D., Misra, A., Nigro, J.M., Colman, H., Soroceanu, L., et al. (2006). Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* 9, 157–173.
181. Pignatti, F., van den Bent, M., Curran, D., Debruyne, C., Sylvester, R., Therasse, P., Afra, D., Cornu, P., Bolla, M., Vecht, C., et al. (2002). Prognostic factors for survival in adult patients with cerebral low-grade glioma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 20, 2076–2084.
182. Pinet, S., Bessette, B., Vedrenne, N., Lacroix, A., Richard, L., Jauberteau, M.-O., Battu, S., and Lalloué, F. (2016). TrkB-containing exosomes promote the transfer of glioblastoma aggressiveness to YKL-40-inactivated glioblastoma cells. *Oncotarget* 7, 50349–50364.
183. Pinho, S.S., and Reis, C.A. (2015). Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat. Rev. Cancer* 15, 540–555.
184. Qin, G., Li, X., Chen, Z., Liao, G., Su, Y., Chen, Y., and Zhang, W. (2017). Prognostic Value of YKL-40 in Patients with Glioblastoma: a Systematic Review and Meta-analysis.



Mol. Neurobiol. 54, 3264–3270.

185. Quillien, V., Lavenu, A., Ducray, F., Joly, M.-O., Chinot, O., Fina, F., Sanson, M., Carpentier, C., Karayan-Tapon, L., Rivet, P., et al. (2016). Validation of the high-performance of pyrosequencing for clinical MGMT testing on a cohort of glioblastoma patients from a prospective dedicated multicentric trial. *Oncotarget* 7, 61916–61929.
186. Rehli, M., Krause, S.W., and Andreesen, R. (1997). Molecular characterization of the gene for human cartilage gp-39 (CHI3L1), a member of the chitinase protein family and marker for late stages of macrophage differentiation. *Genomics* 43, 221–225.
187. Reifenberger, G., Wirsching, H.-G., Knobbe-Thomsen, C.B., and Weller, M. (2017). Advances in the molecular genetics of gliomas — implications for classification and therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 14, 434–452.
188. Renkema, G.H., Boot, R.G., Au, F.L., Donker-Koopman, W.E., Strijland, A., Muijsers, A.O., Hrebicek, M., and Aerts, J.M. (1998). Chitotriosidase, a chitinase, and the 39-kDa human cartilage glycoprotein, a chitin-binding lectin, are homologues of family 18 glycosyl hydrolases secreted by human macrophages. *Eur. J. Biochem.* 251, 504–509.
189. Reuss, D.E., Mamatjan, Y., Schrimpf, D., Capper, D., Hovestadt, V., Kratz, A., Sahn, F., Koelsche, C., Korshunov, A., Olar, A., et al. (2015). IDH mutant diffuse and anaplastic astrocytomas have similar age at presentation and little difference in survival: a grading problem for WHO. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 129, 867–873.
190. Rigau, V., Zouaoui, S., Mathieu-Daudé, H., Darlix, A., Maran, A., Trétarre, B., Bes-saoud, F., Bauchet, F., Attaoua, R., Fabbro-Peray, P., et al. (2011). French brain tumor database: 5-year histological results on 25 756 cases. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 21, 633–644.
191. Ringsholt, M., Høgdall, E.V.S., Johansen, J.S., Price, P.A., and Christensen, L.H. (2007). YKL-40 protein expression in normal adult human tissues--an immunohistochemical study. *J. Mol. Histol.* 38, 33–43.
192. Rodríguez-Tébar, A., Dechant, G., Götz, R., and Barde, Y.A. (1992). Binding of neurotrophin-3 to its neuronal receptors and interactions with nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *EMBO J.* 11, 917–922.
193. Roux, P.P., and Barker, P.A. (2002). Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog. Neurobiol.* 67, 203–233.
194. Ruiz-Pérez, M.V., Henley, A.B., and Arsenian-Henriksson, M. (2017). The MYCN Protein in Health and Disease. *Genes* 8.
195. Saidi, A., Javerzat, S., Bellahcène, A., De Vos, J., Bello, L., Castronovo, V., Deprez, M., Loiseau, H., Bikfalvi, A., and Hagedorn, M. (2008). Experimental anti-angiogenesis causes upregulation of genes associated with poor survival in glioblastoma. *Int. J. Cancer* 122, 2187–2198.
196. Sanai, N., Polley, M.-Y., McDermott, M.W., Parsa, A.T., and Berger, M.S. (2011). An extent of resection threshold for newly diagnosed glioblastomas. *J. Neurosurg.* 115, 3–8.
197. Schram, A.M., Taylor, B.S., Hechtman, J.F., Benayed, R., Wang, L., Hanusch, B., Young, R., Grommes, C., Ku, N., Hyman, D.M., et al. (2017). Abstract LB-302: Potential role of larotrectinib (LOXO-101), a selective pan-TRK inhibitor, in NTRK fusion-positive recurrent glioblastoma. *Cancer Res.* 77, LB-302-LB-302.
198. Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M., and Ragg, T. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol. Biol.* 7, 3.
199. Segal, R.A., Goumnerova, L.C., Kwon, Y.K., Stiles, C.D., and Pomeroy, S.L. (1994). Expression of the neurotrophin receptor TrkC is linked to a favorable outcome in medulloblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 12867–12871.
200. Shajani-Yi, Z., de Abreu, F.B., Peterson, J.D., and Tsongalis, G.J. (2018). Frequency of Somatic TP53 Mutations in Combination with Known Pathogenic Mutations in Colon Adenocarcinoma, Non-Small Cell Lung Carcinoma, and Gliomas as Identified by Next-Generation Sequencing. *Neoplasia N. Y. N* 20, 256–262.



201. Shao, R. (2013). YKL-40 acts as an angiogenic factor to promote tumor angiogenesis. *Front. Physiol.* 4.
202. Shao, R., Francescone, R., Ngernyuang, N., Bentley, B., Taylor, S.L., Moral, L., and Yan, W. (2014). Anti-YKL-40 antibody and ionizing irradiation synergistically inhibit tumor vascularization and malignancy in glioblastoma. *Carcinogenesis* 35, 373–382.
203. Shin, G., Kang, T.-W., Yang, S., Baek, S.-J., Jeong, Y.-S., and Kim, S.-Y. (2011). GENT: gene expression database of normal and tumor tissues. *Cancer Inform.* 10, 149–157.
204. Shirahata, M., Iwao-Koizumi, K., Saito, S., Ueno, N., Oda, M., Hashimoto, N., Takahashi, J.A., and Kato, K. (2007). Gene expression-based molecular diagnostic system for malignant gliomas is superior to histological diagnosis. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 13, 7341–7356.
205. Shostak, K., Labunskyy, V., Dmitrenko, V., Malisheva, T., Shamayev, M., Rozumenko, V., Zozulya, Y., Zehetner, G., and Kavsan, V. (2003). HC gp-39 gene is upregulated in glioblastomas. *Cancer Lett.* 198, 203–210.
206. Skog, J., Würdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D.H., Gainche, L., Curry, W.T., Carter, B.S., Krichevsky, A.M., and Breakefield, X.O. (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat. Cell Biol.* 10, 1470–1476.
207. Smeyne, R.J., Klein, R., Schnapp, A., Long, L.K., Bryant, S., Lewin, A., Lira, S.A., and Barbacid, M. (1994). Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene. *Nature* 368, 246–249.
208. Sottoriva, A., Spiteri, I., Piccirillo, S.G.M., Touloumis, A., Collins, V.P., Marioni, J.C., Curtis, C., Watts, C., and Tavaré, S. (2013). Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 4009–4014.
209. Soubeyran, P., Fonck, M., Blanc-Bisson, C., Blanc, J.-F., Ceccaldi, J., Mertens, C., Imbert, Y., Cany, L., Vogt, L., Dauba, J., et al. (2012). Predictors of early death risk in older patients treated with first-line chemotherapy for cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 30, 1829–1834.
210. Soubeyran, P., Bellera, C., Goyard, J., Heitz, D., Curé, H., Rousselot, H., Albrand, G., Servent, V., Jean, O.S., van Praagh, I., et al. (2014). Screening for Vulnerability in Older Cancer Patients: The ONCODAGE Prospective Multicenter Cohort Study. *PLoS ONE* 9.
211. de Souza, C.F., Sabedot, T.S., Malta, T.M., Stetson, L., Morozova, O., Sokolov, A., Laird, P.W., Wiznerowicz, M., Iavarone, A., Snyder, J., et al. (2018). A Distinct DNA Methylation Shift in a Subset of Glioma CpG Island Methylator Phenotypes during Tumor Recurrence. *Cell Rep.* 23, 637–651.
212. Steponaitis, G., Skiriutė, D., Kazlauskas, A., Golubickaitė, I., Stakaitis, R., Tamašauskas, A., and Vaitkienė, P. (2016). High CHI3L1 expression is associated with glioma patient survival. *Diagn. Pathol.* 11, 42.
213. Stoilov, P., Castren, E., and Stamm, S. (2002). Analysis of the human TrkB gene genomic organization reveals novel TrkB isoforms, unusual gene length, and splicing mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 1054–1065.
214. Stokoe, J.M., Pearce, J., Sinha, R., and Ring, A. (2012). G8 and VES-13 scores predict chemotherapy toxicity in older patients with cancer. *J. Geriatr. Oncol.* 3, S81.
215. Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J.B., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., et al. (2005). Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 352, 987–996.
216. Stupp, R., Hegi, M.E., Gorlia, T., Erridge, S.C., Perry, J., Hong, Y.-K., Aldape, K.D., Lhermitte, B., Pietsch, T., Grujcic, D., et al. (2014). Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 15, 1100–1108.
217. Suzuki, H., Aoki, K., Chiba, K., Sato, Y., Shiozawa, Y., Shiraishi, Y., Shimamura, T.,



- Niida, A., Motomura, K., Ohka, F., et al. (2015). Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas. *Nat. Genet.* *47*, 458–468.
218. Tabouret, E., Nguyen, A.T., Dehais, C., Carpentier, C., Ducray, F., Idbaih, A., Mokhtari, K., Jouvret, A., Uro-Coste, E., Colin, C., et al. (2016). Prognostic impact of the 2016 WHO classification of diffuse gliomas in the French POLA cohort. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *132*, 625–634.
219. Tacconelli, A., Farina, A.R., Cappabianca, L., Gulino, A., and Mackay, A.R. (2005). Alternative TrkAIII splicing: a potential regulated tumor-promoting switch and therapeutic target in neuroblastoma. *Future Oncol. Lond. Engl.* *1*, 689–698.
220. Tanwar, M.K., Gilbert, M.R., and Holland, E.C. (2002). Gene expression microarray analysis reveals YKL-40 to be a potential serum marker for malignant character in human glioma. *Cancer Res.* *62*, 4364–4368.
221. Tauszig-Delamasure, S., Yu, L.-Y., Cabrera, J.R., Bouzas-Rodriguez, J., Mermet-Bouvier, C., Guix, C., Bordeaux, M.-C., Arumäe, U., and Mehlen, P. (2007). The TrkC receptor induces apoptosis when the dependence receptor notion meets the neurotrophin paradigm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 13361–13366.
222. Teng, K.K., and Hempstead, B.L. (2004). Neurotrophins and their receptors: signaling trios in complex biological systems. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *61*, 35–48.
223. Teng, H.K., Teng, K.K., Lee, R., Wright, S., Tevar, S., Almeida, R.D., Kermani, P., Torkin, R., Chen, Z.-Y., Lee, F.S., et al. (2005). ProBDNF Induces Neuronal Apoptosis via Activation of a Receptor Complex of p75NTR and Sortilin. *J. Neurosci.* *25*, 5455–5463.
224. Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., and Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr. Protoc. Cell Biol. Chapter 3*, Unit 3.22.
225. Trams, E.G., Lauter, C.J., Salem, N., and Heine, U. (1981). Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* *645*, 63–70.
226. Treps, L., Perret, R., Edmond, S., Ricard, D., and Gavard, J. (2017). Glioblastoma stem-like cells secrete the pro-angiogenic VEGF-A factor in extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles* *6*.
227. Turcan, S., Rohle, D., Goenka, A., Walsh, L.A., Fang, F., Yilmaz, E., Campos, C., Fabius, A.W.M., Lu, C., Ward, P.S., et al. (2012). IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature* *483*, 479–483.
228. Van Meir, E.G., Hadjipanayis, C.G., Norden, A.D., Shu, H.-K., Wen, P.Y., and Olson, J.J. (2010). Exciting New Advances in Neuro-Oncology. *CA. Cancer J. Clin.* *60*, 166–193.
229. Varki, A., Kannagi, R., Toole, B., and Stanley, P. (2015). Glycosylation Changes in Cancer. In *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, P. Stanley, G.W. Hart, M. Aebi, A.G. Darvill, T. Kinoshita, N.H. Packer, J.H. Prestegard, et al., eds. (Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press), p.
230. Verhaak, R.G.W., Hoadley, K.A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M.D., Miller, C.R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J.P., et al. (2010). An integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR and NF1. *Cancer Cell* *17*, 98.
231. Vincent, F., Naves, T., Wilson, C.M., Lalloué, F., Jauberteau, M.O., Bonnaud, F., and Melloni, B. (2015). Sortilin mediates the release and transfer of exosomes in human lung cancer A549 cells. *Rev. Mal. Respir.* *32*, 324.
232. Vogazianou, A.P., Chan, R., Bäcklund, L.M., Pearson, D.M., Liu, L., Langford, C.F., Gregory, S.G., Collins, V.P., and Ichimura, K. (2010). Distinct patterns of 1p and 19q alterations identify subtypes of human gliomas that have different prognoses. *Neuro-Oncol.* *12*, 664–678.
233. Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V.E., Zhou, S., Diaz, L.A., and Kinzler, K.W. (2013). Cancer Genome Landscapes. *Science* *339*, 1546–1558.
234. de Vrij, J., Maas, S.L.N., Kwappenberg, K.M.C., Schnoor, R., Kleijn, A., Dekker, L., Luiders, T.M., de Witte, L.D., Litjens, M., van Strien, M.E., et al. (2015). Glioblastoma-



derived extracellular vesicles modify the phenotype of monocytic cells. *Int. J. Cancer* 137, 1630–1642.

235. Wadhwa, S., Nag, T.C., Jindal, A., Kushwaha, R., Mahapatra, A.K., and Sarkar, C. (2003). Expression of the neurotrophin receptors Trk A and Trk B in adult human astrocytoma and glioblastoma. *J. Biosci.* 28, 181–188.

236. Wang, H.-Y., Tang, K., Liang, T.-Y., Zhang, W.-Z., Li, J.-Y., Wang, W., Hu, H.-M., Li, M.-Y., Wang, H.-Q., He, X.-Z., et al. (2016). The comparison of clinical and biological characteristics between IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* 35, 86.

237. Wang, L., Rahn, J.J., Lun, X., Sun, B., Kelly, J.J.P., Weiss, S., Robbins, S.M., Forsyth, P.A., and Senger, D.L. (2008). Gamma-Secretase Represents a Therapeutic Target for the Treatment of Invasive Glioma Mediated by the p75 Neurotrophin Receptor. *PLOS Biol.* 6, e289.

238. Wang, T.-C., Luo, S.-J., Lin, C.-L., Chang, P.-J., and Chen, M.-F. (2015). Modulation of p75 neurotrophin receptor under hypoxic conditions induces migration and invasion of C6 glioma cells. *Clin. Exp. Metastasis* 32, 73–81.

239. Wang, Y., Hagel, C., Hamel, W., Müller, S., Kluwe, L., and Westphal, M. (1998). Trk A, B, and C are commonly expressed in human astrocytes and astrocytic gliomas but not by human oligodendrocytes and oligodendroglioma. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 96, 357–364.

240. Weller, M., Stupp, R., Hegi, M.E., van den Bent, M., Tonn, J.C., Sanson, M., Wick, W., and Reifenberger, G. (2012). Personalized care in neuro-oncology coming of age: why we need MGMT and 1p/19q testing for malignant glioma patients in clinical practice. *Neuro-Oncol.* 14, iv100–iv108.

241. Weller, M., van den Bent, M., Tonn, J.C., Stupp, R., Preusser, M., Cohen-Jonathan-Moyal, E., Henriksson, R., Le Rhun, E., Balana, C., Chinot, O., et al. (2017). European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Lancet Oncol.* 18, e315–e329.

242. Wesseling, P., van den Bent, M., and Perry, A. (2015). Oligodendroglioma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 129, 809–827.

243. Wiestler, B., Capper, D., Holland-Letz, T., Korshunov, A., Deimling, A. von, Pfister, S.M., Platten, M., Weller, M., and Wick, W. (2013). ATRX loss refines the classification of anaplastic gliomas and identifies a subgroup of IDH mutant astrocytic tumors with better prognosis. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 126, 443–451.

244. Wilson, C.M., Naves, T., Vincent, F., Melloni, B., Bonnaud, F., Lalloué, F., and Jauberteau, M.-O. (2014). Sortilin mediates the release and transfer of exosomes in concert with two tyrosine kinase receptors. *J. Cell Sci.* 127, 3983–3997.

245. Xia, L., Wu, B., Fu, Z., Feng, F., Qiao, E., Li, Q., Sun, C., and Ge, M. (2015). Prognostic role of IDH mutations in gliomas: a meta-analysis of 55 observational studies. *Oncotarget* 6, 17354–17365.

246. Xiao, Z.X., Chen, R.Q., Hu, D.X., Xie, X.Q., Yu, S.B., and Chen, X.Q. (2017). Identification of repaglinide as a therapeutic drug for glioblastoma multiforme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 488, 33–39.

247. Xiong, J., Zhou, L., Lim, Y., Yang, M., Zhu, Y.-H., Li, Z.-W., Zhou, F.H., Xiao, Z.-C., and Zhou, X.-F. (2013a). Mature BDNF promotes the growth of glioma cells in vitro. *Oncol. Rep.* 30, 2719–2724.

248. Xiong, J., Zhou, L., Yang, M., Lim, Y., Zhu, Y., Fu, D., Li, Z., Zhong, J., Xiao, Z., and Zhou, X.-F. (2013b). ProBDNF and its receptors are upregulated in glioma and inhibit the growth of glioma cells in vitro. *Neuro-Oncol.* 15, 990–1007.

249. Xiong, J., Zhou, L.I., Lim, Y., Yang, M., Zhu, Y.-H., Li, Z.-W., Fu, D.-L., and Zhou, X.-F. (2015). Mature brain-derived neurotrophic factor and its receptor TrkB are upregulated in human glioma tissues. *Oncol. Lett.* 10, 223–227.

250. Yamashiro, D.J., Nakagawara, A., Ikegaki, N., Liu, X.G., and Brodeur, G.M. (1996). Expression of TrkC in favorable human neuroblastomas. *Oncogene* 12, 37–41.



251. Yan, H., Parsons, D.W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B.A., Yuan, W., Kos, I., Batinic-Haberle, I., Jones, S., Riggins, G.J., et al. (2009). IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *N. Engl. J. Med.* 360, 765–773.
252. Zhang, B., Wang, J., Wang, X., Zhu, J., Liu, Q., Shi, Z., Chambers, M.C., Zimmerman, L.J., Shaddox, K.F., Kim, S., et al. (2014). Proteogenomic characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 513, 382–387.
253. Zhang, L., Zhang, Z., Liu, Y., Xue, Y., and Parney, I. (2015). Programmed death-ligand 1 (PD-L1) may play a role in malignant glioma infiltration. *Med. Hypotheses* 85, 127–129.
254. Zhang, W., Kawanishi, M., Miyake, K., Kagawa, M., Kawai, N., Murao, K., Nishiyama, A., Fei, Z., Zhang, X., and Tamiya, T. (2010). Association between YKL-40 and adult primary astrocytoma. *Cancer* 116, 2688–2697.
255. Zouaoui, S., Darlix, A., Fabbro-Peray, P., Mathieu-Daudé, H., Rigau, V., Fabbro, M., Bessaoud, F., Taillandier, L., Ducray, F., Bauchet, F., et al. (2014). Oncological patterns of care and outcomes for 265 elderly patients with newly diagnosed glioblastoma in France. *Neurosurg. Rev.* 37, 415–423; discussion 423-424.



ANNEXES



I.1.1. Annexe 1- Grille de recueil de données cliniques, radiologiques et histologiques

CARACTERISTIQUE DES PATIENTS	<p>Sexe : masculin/féminin Antécédents personnels : tabagisme/HTA /syndrome dépressif/ troubles neurologiques/cancer/ aucun Antécédents familiaux Date de naissance Main dominante : droite/gauche</p>
HISTOIRE DE LA MALADIE	<p>Date de diagnostic radiologique initial Age au diagnostic initial Localisation initiale: frontale/temporale /occipitale/pariétale/autre Mode de découverte : crise comitiale / confusion / HTIC / déficit neurologique Latéralisation : droit/gauche/autre Scanner et/ou IRM : taille/effet de masse/ œdème /nécrose/prise de contraste</p>
PRISE EN CHARGE INITIALE	<p>Biopsies : oui/non Corticothérapie : oui/non Traitement épileptique : oui/ non Chirurgie : oui/non Exérèse complète/incomplète Résidu post-opératoire : oui/non Classification OMS 2007 Altérations moléculaires : perte 1p19q/ 10p10q, méthylation de <i>MGMT</i>, amplification <i>EGFR</i>, présence <i>EGFRvIII</i> Chimiothérapie : oui/non /molécules utilisées Radiothérapie : oui / non</p>
PRISE EN CHARGE A LA PREMIERE RECIDIVE	<p>Date de diagnostic radiologique Mode de découverte : symptomatique/ IRM de contrôle Latéralisation : droit/ gauche/autre Localisation : frontale/temporale/occipitale/pariétale/autre IRM : taille/ effet de masse/ œdème/ nécrose/ prise de contraste Chimiothérapie : oui/non /molécules utilisées Biopsies : oui/non Chirurgie : oui/non Exérèse complète/incomplète Résidu post-opératoire : oui /non Chimiothérapie : oui/non /molécules utilisées Radiothérapie : oui / non</p>
PRISE EN CHARGE DE LA Xième RECIDIVE	<p>Date de diagnostic radiologique Mode de découverte : symptomatique /IRM de contrôle Chirurgie : oui/non Exérèse complète/ incomplète Résidu post-opératoire oui /non Radiothérapie : oui/non Chimiothérapie : oui/non</p>
FIN DE PRISE EN CHARGE	<p>Date des dernières nouvelles Date du décès Cause du décès</p>



I.1.2. Annexe 2-Custom-made human-specific TaqMan® micro-fluidic cards containing panels of 96 gene expression assays

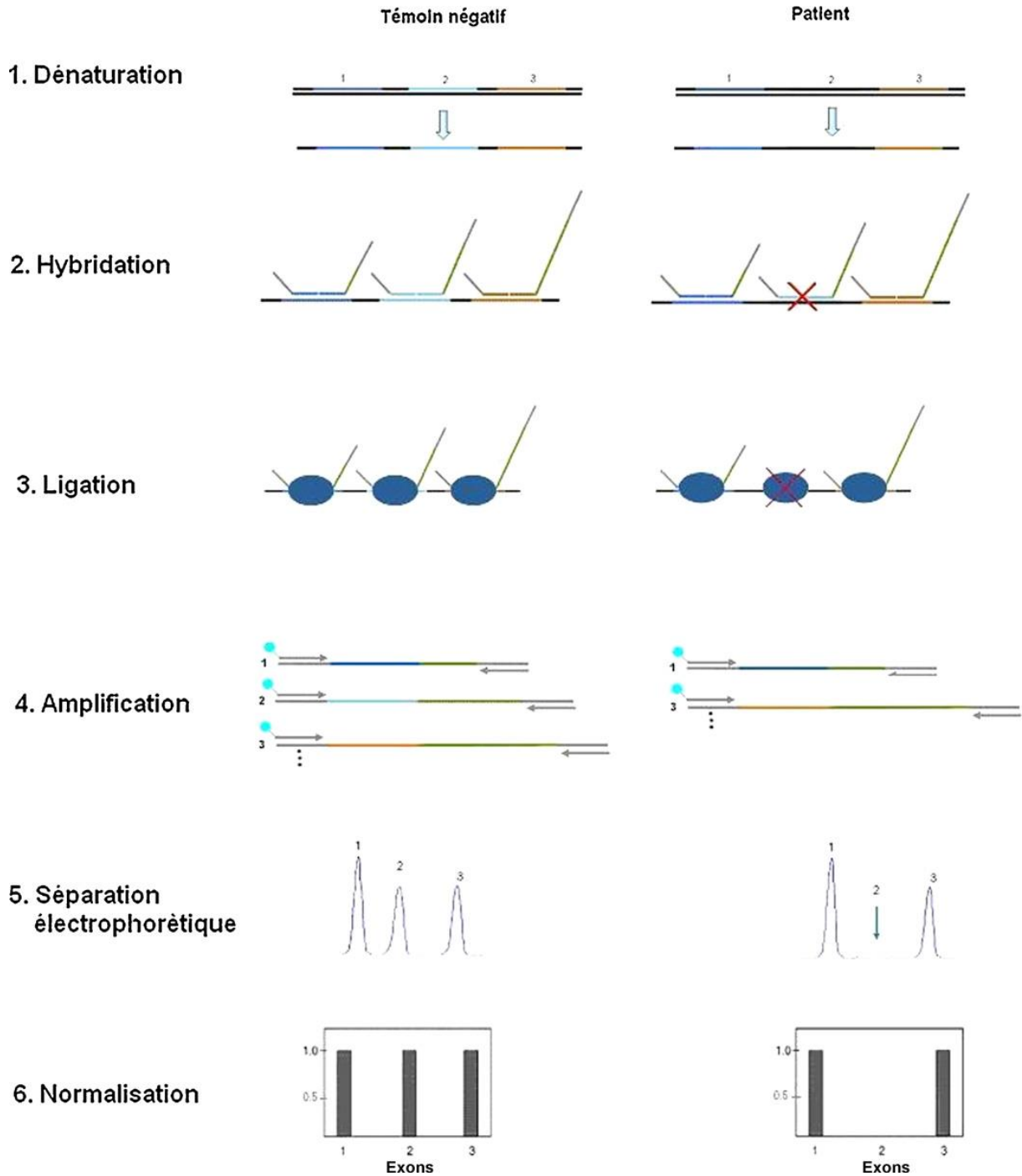
Function	Gene name	Gene symbol	GenBank no.	Human assay ID	Function	Gene name	Gene symbol	GenBank no.	Human assay ID	
Receptors	EGFRa	EGFR	NM_005228	Hs01076078_m1	Neurotrophin pathways	NTRK1	NTRK1	NM_001007792.1	Hs01021011_m1	
	EGFRb	EGFRb	NM_201282	AI89KGC		NTRK2	NTRK2	NM_001007097.1	Hs00178811_m1	
	EGFRc	EGFRc	NM_201283	AIAAZL5		NTRK2	NTRK2 T1 (NTRK2 bis)	NM_001007097.1	Hs01093110_m1	
	EGFRD	EGFRD	NM_201284	AIBJXSD		NTRK2	NTRK2 FL (NTRK2 variant)	NM_006180.3	Hs01093096_m1	
	EGFRvIII	EGFRvIII	custom-designed	AICSVYL		NTRK3	NTRK3	NM_001007156.2	Hs00176797_m1	
	ERB-2	ERRB2	NM_004448	Hs01001580_m1		P75	P75	NM_002507.3	Hs00609977_m1	
	ERB-3	ERRB3	NM_001982	Hs00951464_m1		SORTILIN 1	SORT1	NM_001205228.1	Hs00361760_m1	
	ERB-3	sERRB3	NM_001005915.1	Hs00176538_m1		NEUROTENSIN	NTS	NM_006183.4	Hs00175048_m1	
	ERB-4	ERB4	NM_005235	Hs00955525_m1		NEUROTENSIN RECEPTOR 1	NTSR1	NM_002531.2	Hs00901551_m1	
	MET	MET	NM_000245	Hs01565584_m1		NEUROTENSIN RECEPTOR 2	NTSR2	NM_012344.3	Hs00892563_m1	
	EGF	EGF	NM_001963	Hs01099999_m1		HIF-a	HIF-a	NM_001243084.1	Hs00153153_m1	
	Ligands	TGF-a	TGF-a	NM_003236		Hs00608187_m1	Hypoxia	HIF-b	HIF-b	NM_001197325.1
AMPHIREGULIN		AREG	NM_001657	Hs00950669_m1	VEGF-A	VEGF-A		NM_001025366.2	Hs00900055_m1	
EPIREGULIN		EREG	NM_001432	Hs00914313_m1	VEGF-2	KDR		NM_001243733.1	Hs00173634_m1	
BETACELLULIN		BTC	NM_001729	Hs01101204_m1	VEGF-3	FLT4		NM_005429.2	Hs00153458_m1	
HEPARIN-BINDING GROWTH FACTOR		HB-EGF	NM_001945	Hs00181813_m1	VEGF-D	VEGF-D		NM_004469.4	Hs01128657_m1	
NEUREGULIN 1		NRG1-1	NM_001160001.1....	Hs00247620_m1	VEGFR-I	VEGFR-I		NM_001159920.1	Hs01052961_m1	
		NRG1-2	NM_001160002.1	Hs01108479_m1	VEGFR-II	VEGFR-II		NM_002253.2	Hs00911700_m1	
		NRG1-3	NM_013959.3	Hs01103792_m1	VEGFR-III	VEGFR-III		NM_002020.4	Hs01047677_m1	
NEUREGULIN 2		NRG2	NM_001184935.1	Hs00171706_m1	Autophagy	LC3		LC3	NM_032514.3	Hs01076567_g1
NEUREGULIN 3		NRG3	NM_001165972.1	Hs01377907_m1		BNIP3		BNIP3	NM_004052.2	Hs00969291_m1
NEUREGULIN 4		NGR4	NM_138573.3	Hs00945535_m1		BECLIN		BECLIN	NM_003766.3	Hs00186838_m1
TOMOREGULIN		TMEFF- 1	NM_003692.4	Hs00902905_m1		PINK1		PINK1	NM_032409.2	Hs00260868_m1
TOMOREGULIN (ERB4)		TMEFF- 2	NM_016192.2	Hs01086906_m1		PARKIN		PARK2	NM_004562.2	Hs01038325_m1
KRAS		KRAS	NM_033360.2	Hs00364284_g1		NIX		NIX	NM_004331.2	Hs01087963-m1
NRAS	NRAS	NM_002524.4	Hs00180035_m1	ATG5		ATG5	NM_004849.2	Hs00169468_m1		



Function	Gene name	Gene symbol	GenBank no.	Human assay ID	Function	Gene name	Gene symbol	GenBank no.	Human assay ID
Intracellular signaling	BRAF	BRAF	NM_004333.4	Hs00269944_m1	Autophagy	P62	P62	NM_001142298.1	Hs01061917_g1
	PIK3CA	PIK3CA	NM_006218.2	Hs00907957_m1	Glycosylation	CHI3L1	CHI3L1	NM_001276.2	Hs00609691_m1
	AKT1	AKT1	NM_004562.2	Hs00178289_m1		KLRC3	KLRC3	NM_002261.2	Hs00749702_s1
	AKT2	AKT2	NM_013987.2	Hs01086102_m1		ST3GAL5	ST3GAL5	NM_001042437.1	Hs00187405_m1
	AKT3	AKT3	NM_013988.2	Hs00987350_m1		ATHL1	ATHL1	NM_025092.4	Hs00228253_m1
	CDC42	CDC42	NM_001791	Hs00918044_g1		ST8SIA1	ST8SIA1	NM_003034.3	Hs00268157_m1
	RHOA	RHOA	NM_001664	Hs00357608_m1		PRUNE2/KIAA0367	PRUNE2/KIAA0367	NM_015225.2	Hs00322421_m1
	RAC1	RAC-1	NM_018890	Hs01588892_g1		GLT25D2	GLT25D2	NM_015101.2	Hs00362851_m1
	INTERNEXIN-A	INA	NM_032727.3	Hs00190771		GAA	GAA	NM_000152.3	Hs00164635_m1
	IDH1	IDH1	NM_005896.2	Hs01855675_s1		CD133	CD133	NM_001145847.1	Hs01009250_m1
	IDH2	IDH2	NM_002168.2	Hs00158033_m1		38261	38261	NM_001173531.1	Hs04260367_gH
Glioma markers	GFAP	GFAP	NM_001131019.2	Hs00909233_m1	Stem cell markers	SOX-2	SOX-2	NM_003106.3	Hs01053049_s1
	NESTINE	NESTINE	NM_006617.1	Hs04187831_g1		CXR4	CXCR4	NM_001008540.1	Hs00607978_s1
	OLIG2	OLIG2	NM_005806.3	Hs00300164_s1		SSEA1	SSEA1	NM_002033.3	Hs01106466_s1
	NEUROFILAMENT	NEFL	NM_006158	Hs00196245_m1		NANOG	NANOG	NM_024865.2	Hs04260366_g1
	SYNAPTOPHYSIN	SYP	NM_003179.2	Hs00300531_m1		HPRT	HPRT	NM_000194.2	Hs02800695_m1
	CD34	CD34	NM_001025109.1 NM_001773.2	Hs00990732_m1	Housekeeping genes	18S	18S	NR_003286.2	Hs03928985_g1
	P53	P53	NM_000546.5	Hs01034249_m1		BETA 2-MICROGLOBULIN	B2M	NM_004048.2	Hs00984230_m1
	NOTCH2	NOTCH2	NM_001200001.1 NM_024408.3	Hs01050702_m1		GAPDH	GAPDH	NM_001256799.1	Hs02758991_g1
	BDNF	BDNF	NM_001143809.1	Hs03805848_m1					
	NERVE GROWTH FACTOR	NGF	NM_002506.2	Hs01113193_m1					
	NT3	NT3	NM_001102654.1	Hs00267375_s1					
NTF4	NT4	NM_006179.4	Hs01921834_s1						



I.1.3. Annexe 3-Principe général de la réaction de Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA).



D'après (Coutton et al., 2012)





Implication des biomarqueurs NTRK2 et CHI3L1 dans la nouvelle classification histomoléculaire des gliomes

Les gliomes, tumeurs cérébrales primaires du système nerveux central, sont souvent de pronostic défavorable, d'autant plus que l'absence de critères indiscutables pour les identifier rend leur diagnostic et leur prise en charge particulièrement difficiles. L'analyse conjointe, d'une cohorte française de 64 patients porteurs de gliomes et d'une cohorte internationale de 671 patients issus du TCGA, a permis de mettre en évidence deux groupes pronostiques constitués par un panel d'expression différentielle de 26 gènes ($p = 0,007$). Cette stratification en deux groupes pronostiques a été confirmée quels que soient le grade et le groupe moléculaire de la tumeur ($p < 0,0001$). Nous avons établi une nouvelle stratégie diagnostique à partir de la classification moléculaire des gliomes en intégrant deux biomarqueurs pronostiques *CHI3L1* et *NTRK2*. L'analyse multivariée confirme que ces biomarqueurs sont indépendants du statut *IDH* et du grade tumoral. Si nous avons mis en évidence par l'analyse protéique de *CHI3L1* une concordance avec les transcrits, les résultats divergent pour TrkB. Ainsi, une expression élevée de TrkB et son corécepteur $p75^{\text{NTR}}$ serait liée à l'agressivité tumorale indépendamment du statut *IDH*. Enfin, TrkB et $p75^{\text{NTR}}$ sont présents aussi bien dans les exosomes issus du plasma de témoins sains et de patients atteints de gliomes mais leur expression augmente en fonction de l'agressivité de la tumeur

Mots-clés : gliomes, NTRK2, CHI3L1, transcriptome, protéome, exosomes

Implication of two biomarkers NTRK2 and CHI3L1 in the new histo-molecular classification of gliomas

Gliomas, primary brain tumours of the central nervous system, are often of poor prognosis. The absence of clear criteria to identify them makes their diagnosis and management particularly difficult. The combined analysis of a cohort of 64 glioma patients and an international cohort of 671 patients from the TCGA revealed two prognostic groups of a differential expression panel of 26 genes ($p = 0.007$). This stratification into two prognostic groups was confirmed independently of the grade and molecular group of the tumor ($p < 0.0001$). We have established a new diagnostic strategy based on the molecular classification of gliomas by integrating two prognostic biomarkers *CHI3L1* and *NTRK2*. Multivariate analysis confirms that these biomarkers are independent of *IDH* status and tumor grade. While we have demonstrated by the protein analysis of *CHI3L1* concordance with the transcripts, the results are different for TrkB. Therefore, a high expression of TrkB and its $p75^{\text{NTR}}$ co-receptor would be associated with tumor aggressiveness regardless of *IDH* status. Lastly, TrkB and $p75^{\text{NTR}}$ are present in exosomes from plasma of healthy controls and glioma patients, but their expression increases with the aggressiveness of tumor.

Keywords : glioma, NTRK2, CHI3L1, transcriptome, proteome, exosome

