



<http://portaildoc.univ-lyon1.fr>

Creative commons : Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale -  
Pas de Modification 2.0 France (CC BY-NC-ND 2.0)



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>

# THESE

pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le 21 décembre 2018

par

M. BRET David Cyrille

Né le 21/09/1994 à

Pierre Bénite (69)

\*\*\*\*\*

**MISE AU POINT D'UNE PCR MULTIPLEXE POUR DETECTER LES TRANSCRITS DE  
FUSION KIAA1549-BRAF DANS DES ECHANTILLONS FIXES DANS DU FORMOL ET  
INCLUS EN PARAFFINE (FFPE) DE GLIOMES DE BAS GRADES.**

\*\*\*\*\*

JURY

Mme FERRARO PEYRET Carole, MCU-PH

M. BARRITAULT Marc, Praticien Hospitalier

M. LOPEZ Jonathan, MCU-PH

M. DUCRAY François PU-PH

M. LEBLOND Pierre, Praticien spécialiste des CLCC

## UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

- |   |                    |
|---|--------------------|
| • Président de l'Université                                 | Frédéric FLEURY    |
| • Présidence du Conseil Académique                          | Hamda BEN HADID    |
| • Vice-Président du Conseil d'Administration                | Didier REVEL       |
| • Vice-Président de la Commission Recherche                 | Fabrice VALLEE     |
| • Vice-Président de la Formation et de la Vie Universitaire | Philippe CHEVALIER |

### Composantes de l'Université Claude Bernard Lyon 1

#### SANTE

UFR de Médecine Lyon Est	Directeur : Gilles RODE
UFR de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux	Directrice : Carole BURILLON
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directrice : Christine VINCIGUERRA
UFR d'Odontologie	Directrice : Dominique SEUX
Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation (ISTR)	Directeur : Xavier PERROT
Département de formation et centre de recherche en Biologie Humaine	Directrice : Anne-Marie SCHOTT

#### SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. Fabien DE MARCHI
UFR de Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
Polytech Lyon	Directeur : M. Emmanuel PERRIN
I.U.T. LYON 1	Directeur : M. Christophe VITON
Institut des Sciences Financières et d'Assurance (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
ESPE	Directeur : M. Alain MOUGNIOTTE
Observatoire des Sciences de l'Univers	Directrice : Mme Isabelle DANIEL

**UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**

**ISPB -Faculté de Pharmacie Lyon**

**LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES**

**DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUE ET PHARMACIE  
GALENIQUE**

• **CHIMIE ANALYTIQUE, GENERALE, PHYSIQUE ET MINERALE**

Monsieur Raphaël TERREUX (Pr)  
Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)  
Madame Anne DENUZIERE (MCU)  
Monsieur Lars-Petter JORDHEIM (MCU-HDR)  
Madame Christelle MACHON (MCU-PH)  
Monsieur Waël ZEINYEH (MCU)

• **PHARMACIE GALENIQUE -COSMETOLOGIE**

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)  
Madame Stéphanie BRIANCON (Pr)  
Madame Françoise FALSON (Pr)  
Monsieur Hatem FESSI (Pr)  
Monsieur Fabrice PIROT (PU - PH)  
Monsieur Eyad AL MOUAZEN (MCU)  
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)  
Madame Ghania HAMDY-DEGOBERT (MCU-HDR)  
Monsieur Plamen KIRILOV (MCU)  
Madame Giovanna LOLLO (MCU)  
Madame Jacqueline RESENDE DE AZEVEDO (MCU)  
Monsieur Damien SALMON (MCU-PH)

• **BIOPHYSIQUE**

Madame Laurence HEINRICH (MCU)  
Monsieur David KRYZA (MCU-PH-HDR)  
Madame Sophie LANCELOT (MCU - PH)  
Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (Pr)  
Madame Elise LEVIGOUREUX (AHU)

## **DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE**

- **DROIT DE LA SANTE**  
Monsieur François LOCHER (PU – PH)  
Madame Valérie SIRANYAN (MCU - HDR)
  
- **ECONOMIE DE LA SANTE**  
Madame Nora FERDJAOUI MOUMJID (MCU - HDR)  
Madame Carole SIANI (MCU – HDR)  
Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU)
  
- **INFORMATION ET DOCUMENTATION**  
Monsieur Pascal BADOR (MCU - HDR)
  
- **HYGIENE, NUTRITION, HYDROLOGIE ET ENVIRONNEMENT**  
Madame Joëlle GOUDABLE (PU – PH)
  
- **INGENIERIE APPLIQUEE A LA SANTE ET DISPOSITIFS MEDICAUX**  
Monsieur Gilles AULAGNER (PU – PH)  
Madame Claire GAILLARD (MCU)
  
- **QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE**  
Madame Alexandra CLAYER-MONTEMBAULT (MCU)  
Monsieur Vincent GROS (MCU-PAST)  
Madame Audrey JANOLY-DUMENIL (MCU-PH)  
Madame Pascale PREYNAT (MCU PAST)
  
- **MATHEMATIQUES – STATISTIQUES**  
Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU-PH-HDR)  
Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)  
Madame Marie-Paule GUSTIN (MCU - HDR)

## DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE SCIENCES DU MEDICAMENT

- **CHIMIE ORGANIQUE**

Monsieur Pascal NEBOIS (Pr)  
Madame Nadia WALCHSHOFER (Pr)  
Monsieur Zouhair BOUAZIZ (MCU - HDR)  
Madame Christelle MARMINON (MCU)  
Madame Sylvie RADIX (MCU -HDR)  
Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU - HDR)

- **CHIMIE THERAPEUTIQUE**

Monsieur Marc LEBORGNE (Pr)  
Monsieur Thierry LOMBERGET (Pr)  
Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU - HDR)  
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)

- **BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE**

Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (Pr)  
Madame Anne-Emmanuelle HAY DE BETTIGNIES (MCU)  
Madame Isabelle KERZAON (MCU)  
Monsieur Serge MICHALET (MCU)

- **PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT**

Madame Roselyne BOULIEU (PU – PH)  
Madame Catherine RIOUFOL (PU- PH)  
Madame Magali BOLON-LARGER (MCU - PH)  
Madame Christelle CHAUDRAY-MOUCHOUX (MCU-PH)  
Madame Céline PRUNET-SPANO (MCU)  
Madame Florence RANCHON (MCU-PH)  
Monsieur Teddy NOVAIS (AHU)

## DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE

- **TOXICOLOGIE**

Monsieur Jérôme GUITTON (PU – PH)  
Madame Léa PAYEN (PU-PH)  
Monsieur Bruno FOUILLET (MCU)  
Monsieur Sylvain GOUTELLE (MCU-PH-HDR)

- **PHYSIOLOGIE**

Monsieur Christian BARRES (Pr)  
Madame Kiao Ling LIU (MCU)  
Monsieur Ming LO (MCU - HDR)

- **PHARMACOLOGIE**

Monsieur Michel TOD (PU – PH)  
Monsieur Luc ZIMMER (PU – PH)  
Monsieur Roger BESANCON (MCU)  
Monsieur Laurent BOURGUIGNON (MCU-PH)  
Madame Evelyne CHANUT (MCU)  
Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)  
Madame Dominique MARCEL CHATELAIN (MCU-HDR)

- **COMMUNICATION**

Monsieur Ronald GUILLOUX (MCU)

- **ENSEIGNANTS ASSOCIES TEMPORAIRES**

Monsieur Olivier CATALA (Pr-PAST)  
Madame Mélanie THUDEROZ (MCU-PAST)

## DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A

- **IMMUNOLOGIE**

Monsieur Guillaume MONNERET (PU-PH)

Monsieur Sébastien VIEL (MCU-PH)

Madame Morgane GOSSEZ (AHU)

- **HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE**

Madame Christine VINCIGUERRA (PU - PH)

Madame Brigitte DURAND (MCU - PH)

Madame Sarah HUET (AHU)

Monsieur Yohann JOURDY (AHU)

- **MICROBIOLOGIE ET MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE AUX BIOTECHNOLOGIES INDUSTRIELLES**

Monsieur Patrick BOIRON (Pr)

Monsieur Frédéric LAURENT (PU-PH-HDR)

Madame Florence MORFIN (PU – PH)

Monsieur Didier BLAHA (MCU)

Madame Ghislaine DESCOURS (MCU-PH)

Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU-PH)

Madame Emilie FROBERT (MCU - PH)

Madame Véronica RODRIGUEZ-NAVA (MCU-HDR)

- **PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MEDICALE**

Monsieur Philippe LAWTON (Pr)

Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)

Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU - HDR)

## **DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B**

- **BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE - BIOTECHNOLOGIE**

Madame Pascale COHEN (Pr)  
Madame Caroline MOYRET-LALLE (Pr)  
Monsieur Alain PUISIEUX (PU - PH)  
Madame Emilie BLOND (MCU-PH)  
Monsieur Karim CHIKH (MCU - PH)  
Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU - PH-HDR)  
Monsieur Boyan GRIGOROV (MCU)  
Monsieur Hubert LINCET (MCU-HDR)  
Monsieur Olivier MEURETTE (MCU)  
Madame Angélique MULARONI (MCU)  
Madame Stéphanie SENTIS (MCU)  
Monsieur Anthony FOURIER (AHU)

- **BIOLOGIE CELLULAIRE**

Madame Bénédicte COUPAT-GOUTALAND (MCU)  
Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU - HDR)

- **INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON**

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)  
Monsieur Philippe LAWTON (Pr)  
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)  
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)  
Madame Alexandra MONTEBAULT (MCU)  
Madame Angélique MULARONI (MCU)  
Madame Marie-Françoise KLUCKER (MCU-PAST)  
Madame Valérie VOIRON (MCU-PAST)

- **Assistants hospitalo-universitaires sur plusieurs départements pédagogiques (AHU)**

Monsieur Alexandre JANIN

- **Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)**

Madame Camille ROZIER

**Pr** : Professeur

**PU-PH** : Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

**MCU** : Maître de Conférences des Universités

**MCU-PH** : Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier

**HDR** : Habilitation à Diriger des Recherches

**AHU** : Assistant Hospitalier Universitaire

**PAST** : Personnel Associé Temps Partiel

# Table des matières

Table des matières .....	10
Remerciements .....	13
Liste des figures.....	17
Liste des Tableaux .....	21
Liste des Annexes.....	22
Table des abréviations .....	23
Introduction .....	25
1 Revue de la littérature et contexte de l'étude .....	26
1.1 Les tumeurs cérébrales .....	26
1.2 Les Astrocytomes .....	28
1.2.1 Epidémiologie.....	29
1.2.2 Localisation .....	31
1.2.3 Identification.....	31
1.2.4 Apports de la biologie moléculaire.....	35
1.2.5 Traitements et qualité de vie.....	41
1.2.6 Détecter les transcrits de fusion <i>KIAA1549-BRAF</i> .....	42
1.2.7 Généralités sur la qPCR.....	52
2 Article.....	60
	10

<b>Abstract</b> .....	61
<b>Introduction</b> .....	62
<b>Materials and methods</b> .....	65
<i>Patients and tissues specimens</i> .....	65
<i>RNA isolation from FFPE samples and Reverse Transcription-PCR (RT-PCR) process</i> .....	65
<i>Singleplex qPCR</i> .....	66
<i>Multiplex qPCR</i> .....	66
<i>PCR settings</i> .....	67
<i>Data acquisition and interpretation</i> .....	68
<i>Data analysis</i> .....	68
<b>Results</b> .....	69
<i>Study population</i> .....	69
<i>Frequency of KIAA1549-BRAF fusions as determined by singleplex qPCR</i> .....	69
<b>Discussion</b> .....	74
<b>Conclusion</b> .....	76
<b>Acknowledgments</b> .....	77
<b>Conflicts of interest</b> .....	77
<b>References</b> .....	77
<b>3 Résultats complémentaires</b> .....	82

3.1	Compensation .....	82
3.2	Choix de la méthode d'analyse des résultats .....	86
3.3	Coût de la technique multiplexe .....	89
	Conclusion .....	91
4	Annexes .....	94
4.1	Données de l'étude .....	94
5	Bibliographie .....	97

# Remerciements

**A Madame Carole FERRARO PEYRET, Président de thèse,**

Je vous fais part de toute ma gratitude pour avoir accepté de présider la soutenance de cette thèse. Je tiens également à vous remercier pour m'avoir accueilli au sein du secteur de biologie moléculaire dans le cadre de mon stage hospitalier et pour votre aide lors de la réalisation de ma thèse.

**A Monsieur Marc BARRITAU, Directeur de thèse,**

Merci de m'avoir permis de travailler sur ce sujet et de m'avoir encadré et accompagné lors de ce travail. Merci pour toutes ces explications, ce temps consacré et ces réunions tardives toujours captivantes. Merci pour ta patience, tes conseils avisés et ton soutien permanent durant les différentes étapes de ce projet.

**A Monsieur François DUCRAY, Monsieur Pierre LEBLOND et Monsieur Jonathan LOPEZ Membres du Jury,**

Je vous remercie d'avoir pris de votre temps pour venir partager votre expertise et évaluer mon travail. Merci d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse.

**A l'équipe de Biologie Moléculaire du Centre de Biologie et Pathologie Est,**

Merci pour toutes les explications et l'aide que vous m'avez apportées et qui ont rendu possible l'aboutissement de ce travail.

**A l'équipe de la Pharmacie Dumoulin,**

Merci pour tous ces samedis et étés où j'ai travaillé et appris à vos côtés.

**A toutes les personnes ayant participé à ma formation à travers mes différents stages**

**et mon alternance,**

Je voudrais également remercier tous les professionnels qui m'ont permis d'évoluer et de progresser en consacrant du temps à ma formation, en partageant leurs connaissances scientifiques et professionnelles et en me délivrant de précieux conseils qui m'aideront au cours de ma vie professionnelle.

**À tous mes amis de la promotion,**

Aux All Star, je vous remercie pour toutes ces soirées passées ensemble. Ces kilomètres à pied pour rentrer à Grange Blanche... On aura bien profité de notre vie étudiante.

Merci d'avoir rendu ces années de pharma inoubliables et magiques depuis notre petit groupe de P2 !

**Au bureau de l'Hôpital des Nounours 2015/2016,**

Cette année au sein du bureau de l'HDN a été l'une des plus gratifiantes et des plus enrichissantes au cours de mes études. Au-delà de ce formidable projet, ce qui a fait la magie de cette année c'est surtout vous, avec une motivation à toute épreuve et des moments inoubliables.

**A l'équipe des alternants, stagiaires et prestas de Sanofi Chilly-Mazarin,**

Merci pour ces repas partagés ensemble, et pour la bonne ambiance que nous partageons dans notre bureau.

**A la promo 2018/2019 du Master Réglementation et Droit Pharmaceutiques de l'Université de Strasbourg,**

Merci pour cette super ambiance et ces soirées passées ensemble.

**A Joe,**

Je pense que tu peux te retrouver dans plusieurs des groupes que j'ai remerciés plus haut, malgré le fait que l'on se soit connu tardivement, on a partagé beaucoup de nos dernières expériences ensemble. Depuis le froid Canadien en stage hospitalier à Ottawa à notre bureau partagé chez Sanofi en passant par le tourisme (et le séisme) à Mexico « Distrito Federal ». Merci pour tous ces moments de rire et tous nos délires.

A bientôt au Liban !

**A Jordan,**

Merci pour tous ces débats et ces échanges constructifs et réguliers. Tu seras un excellent médecin, j'en suis persuadé.

**A mes amis d'enfance,**

Vous avez été là dans les moments les plus difficiles comme les meilleurs, vous me connaissez mieux que quiconque.

**A mes parents et mon frère,**

Merci pour votre soutien, votre présence et votre patience sans failles. Merci de m'accompagner, de me guider et de m'épauler comme vous le faites depuis toutes ces années. Ce travail est avant tout le vôtre, car sans votre soutien et votre aide, rien de tout cela n'aurait été possible. Vous continuez à m'aider à évoluer chaque jour.

Pour l'éducation et l'amour que vous m'avez apportés. Vous avez su me donner toutes les chances pour réussir.

**A Manon,**

Merci de partager ma vie depuis toutes ces années, pour m'avoir accompagné et supporté

dans les moments difficiles. Merci pour tous ces voyages et ces souvenirs inoubliables vécus côte à côte, j'espère que nous partagerons encore de magnifiques années ensemble.

Et surtout, merci pour ton amour au quotidien qui me fait avancer.

**A la famille Delacour,**

Merci pour votre accueil, votre gentillesse et votre soutien au cours de toutes ces années.

Merci pour ces moments que l'on passe ensemble et tous ces bons petits plats.

# Liste des figures

**Figure 1 : Classification des tumeurs du système nerveux central par l'OMS en 2016.**

(3) ..... 27

**Figure 2 : Distribution des tumeurs par profil histologique au sein des gliomes. (7)..** 29

**Figure 3: Distribution des astrocytomes pilocytiques (sujets masculins et féminins) basée sur les biopsies de 205 patients traités à l'Hôpital Universitaire de Zurich (2).** 30

**Figure 4 : On remarque que les astrocytomes pilocytiques (A) sont des tumeurs qui sont moins aisées à discerner des tissus environnants macroscopiquement par rapport à d'autres tumeurs telles que les glioblastomes (B). (A) Astrocytome Pilocytique : infiltration diffuse de l'hippocampe et des structures environnantes. (B) Glioblastome étendu, diffus et infiltrant le lobe frontal gauche avec une coloration typique dite « whitish-grey » (2).** ..... 31

**Figure 5 : Astrocytome pilocytique dans sa forme biphasique. Histologie (HESx25) :** Présence de zones fibrillaires riches en fibres de Rosenthal (GFAP+) alternant avec des zones plus lâches constituées de cellules oligodendrocytes-like (GFAP-) (astérisque). (11). ..... 33

**Figure 6 : Expression hétérogène de la protéine gliofibrillaire acide (GFAP) par les astrocytomes pylocytiques. Immuno Histo Chimie (IHC) anti-GFAP () (x25) :** forte expression par les cellules tumorales dans les zones fibrillaires visibles en IHC. (11) ..... 34

**Figure 7 : Astrocytome Pilocytique chez un enfant de 11 ans. (a) IRM T2 pondéré axial FLAIR :** on observe le nodule cérébral superficiel hyperdense et le manque de suppression du signal dans la composante kystique. (b) IRM T1 pondéré axial contraste augmenté : on

observe un signal dans la composante nodulaire et un faible signal dans la délimitation du kyste (12)..... 35

**Figure 8 : La voie de signalisation BRAF dans les gliomes.** (A) Chez le sujet sain, l'activation de la kinase Raf dépend de la fixation d'un facteur de croissance (GF) sur un récepteur à tyrosine kinase (RTK) qui permet d'activer Ras qui activera à son tour les protéines kinases de la famille raf. Ces protéines raf permettent, entre autres, d'activer MEK qui régule la prolifération cellulaire et la survie cellulaire. (B) Dans le cas d'un astrocytome pilocytique exprimant une protéine de fusion *KIAA1549-BRAF* (K-B), la protéine mutante résultante peut alors activer MEK sans le signal initial de Ras, menant à une prolifération tumorale incontrôlée. Une situation similaire peut être observée dans d'autres cas plus rares de mutations comme la mutation V600E. (14) ..... 38

**Figure 9 : Représentation schématique de la portion normale du chromosome 7q34 ainsi que des principales fusions *KIAA149-BRAF* possibles** (10) ..... 40

**Figure 10 : Mise en évidence des réarrangements *KIAA1549-BRAF* par la méthode FISH.** Altérations moléculaires *KIAA1549-BRAF* mise en évidence par une détection FISH. (A) cas positif marqué par la présence de fluorescence jaune marquant la présence de fusion *KIAA1549-BRAF* issue de la superposition des fluorescences verte correspondant au gène *KIAA1549* et rouge correspondant au gène *BRAF*. (B) cas négatif montrant uniquement des fluorescences verte correspondant au gène *KIAA1549* et rouge correspondant au gène *BRAF*.(8)..... 44

**Figure 11 : Etapes de la constitution d'une librairie.** L'ARN polyA + est enrichi à l'aide de billes d'oligo (dT), suivi d'une fragmentation et d'une rétro transcription. Les extrémités 5 'et 3' des fragments d'ADNc sont ensuite ligaturés avec des adaptateurs contenant un

code à barres unique et des sites de liaison d'amorces. Enfin, les ADNc ligaturés sont amplifiés par PCR et prêts pour le séquençage. (28)..... 46

**Figure 13 : Présentation des 3 transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* les plus fréquemment retrouvés dans les astrocytomes pycocytiques et de la position des amorces utilisées en qPCR pour les détecter.** Les amorces spécifiques de chacun des transcrits de fusion sont représentées par des flèches et les sondes liées à des fluorochromes par les intervalles FQ à la jonction de la fusion des deux gènes (30). ..... 50

**Figure 14 : Spectre d'absorption et d'émission des fluorochromes des sondes *KIAA1549-BRAF* utilisées dans la méthode multiplexe développée au laboratoire.** On remarque que ces fluorochromes possèdent des pics de fluorescences distincts mais des spectres d'émissions et absorptions larges qui se chevauchent. .... 56

**Figure 15 : Les différentes phases de la qPCR. Le Ct est matérialisé au niveau de la flèche.** (34)..... 58

**Figure 16 : Représentation des CT en fonction de la dilution pour le transcrit de fusion 16-9** ..... 59

**Figure 17: Compensation de couleur réalisée avec les calibrateurs commerciaux pour la sonde de la *GAPDH* (618;660).** On remarque que dans la partie inférieure le signal rose (sonde 16-9) est compensé pour ne laisser apparaître que le signal gris (sonde *GAPDH*). Les différents puits sont peu reproductibles (leur fluorescence est différente)..... 83

**Figure 18: Compensation de couleur réalisée avec les sondes Biosearch Technologies pour la sonde de la *GAPDH* (618 ;660).** On remarque que dans la partie inférieure le signal vert (sonde 16-11) est compensé pour ne laisser apparaître que le signal rose. Les différents puits sont reproductibles car on ne voit aucune dispersion dans les fluorescences.

..... 83

**Figure 19: Premier essai de compensation de couleur dans le canal 533-580 avec les sondes TaqMan.** On remarque que le signal rose correspondant à la fluorescence du fluorochrome JUN est compensé difficilement par le Light Cycler 480 au profit du signal vert représentant le CAL FLUOR Orange..... 85

**Figure 20 : Deuxième essai de compensation de couleur dans le canal 533-580 avec les sondes Biosearch.** On remarque que le signal rose correspondant à la fluorescence du fluorochrome JUN est mal compensé par le Light Cycler 480 au profit du signal vert représentant le CAL FLUOR Orange..... 85

**Figure 21 : Illustration des méthodes de la (A) Seconde dérivée maximale et (B) des fit points.** La méthode de la seconde dérivée maximale n'est pas opérateur-dépendant et une seule valeur de Ct correspond à une analyse. La méthode des fit points est opérateur-dépendant et plusieurs valeurs de Ct peuvent être rendues pour un même résultat. (37).... 88

## Liste des Tableaux

<b>Tableau 1 : Fréquence de différentes tumeurs du SNC parmi les gliomes. (7).....</b>	<b>28</b>
<b>Tableau 2 Tableau comparatif des techniques utilisées pour la détection des transcrits de fusion <i>KIAA1549-BRAF</i>. (10) .....</b>	<b>43</b>
<b>Tableau 3 : Longueurs d'onde d'absorbance et d'émission des fluorochromes des différentes sondes utilisées dans le cadre de la recherche des transcrits de fusion <i>KIAA1549-BRAF</i> par qPCR multiplexe. ....</b>	<b>55</b>
<b>Tableau 4 : Comparaison des consommations en matériels, réactifs et temps entre les méthodes simplexe et multiplexe.....</b>	<b>89</b>

## Liste des Annexes

<b>Annexe 1 : Composition quantitative d'un tube de qPCR multiplexe selon la méthode décrite dans l'article.</b> Le volume total d'un tube dans notre qPCR multiplexe est de 20µL lorsque l'on a ajouté l'échantillon d'ADNc patient.....	94
<b>Annexe 2 : Tableau des échantillons utilisés dans l'article et les résultats associés. ..</b>	96
<b>Annexe 3 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus avec les deux méthodes (simplexe et multiplexe) sur les 52 échantillons inclus dans l'étude.....</b>	96

# Table des abréviations

ADN: Acide désoxyribonucléique

ADNc: Acide désoxyribonucléique complémentaire

ARN: Acide ribonucléique

CBPE: Centre de Biologie et Pathologie Est

CCC: Compensation de couleur

CGH: Hybridation génomique comparative

CNS: Central nervous system

Ct: Threshold cycle

EGFR: Epidermal growth factor receptor

FFPE: Formalin-fixed paraffin-embedded

FISH: Hybridation in situ en fluorescence

FLAIR: Fluid attenuated inversion recovery

FN: False negative

FP: False positive

GAPDH: Glycéraldéhyde-phosphate déshydrogénase

GF: Facteur de croissance

GFAP: Protéine gliofibrillaire acide

GHE: Groupement Hospitalier Est

HCL: Hopices Civils de Lyon

HPLC: High performance liquid chromatography

IHC: Immuno Histo Chimie

IRM: Imagerie par résonance magnétique

MAPK: Mitogen-activated protein kinases

NFQ: Non-fluorescent quenching

NGS: Next generation sequencing

NPV: Negative predictive value

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

PAs: Pilocytic Astrocytomas

PCR: Réaction en chaîne par polymérase

PPV: Positive predictive value

qPCR: Réaction en chaîne par polymérase en temps réel

RNAseq: Séquençage de l'ARN

RTK: Récepteur à tyrosine kinase

SNC: Système nerveux central

TGF $\alpha$ : Transforming growth factor  $\alpha$

TN: True negative

TP: True positive

WT: Wild-type

# Introduction

L'ensemble du travail lié à cette thèse a été rendu possible par la réalisation de mon stage hospitalier de cinquième année hospitalo-universitaire sous la responsabilité du docteur Carole FERRARO PEYRET au sein du service d'anatomie et de cytologie pathologique dirigé par le Professeur Sophie COLLARDEAU FRACHON. Ce service appartient aux Hospices Civils de Lyon (HCL) et est spécialisé dans l'analyse de tissus (neurologique, digestif, urologique, etc...). Le service est situé au sixième étage du bâtiment du Centre de Biologie et Pathologie Est (CBPE) au sein du Groupement Hospitalier Est (GHE). Le plateau technique inclut et regroupe plusieurs activités dont la biologie moléculaire, l'histopathologie, la cytopathologie. Les analyses réalisées sont d'ordre anatomiques, moléculaires et immunohistochimiques.

Le secteur de biologie moléculaire se situe dans les mêmes locaux que le laboratoire d'anatomie et cytologie-pathologique. Le secteur de biologie moléculaire a pour mission de caractériser les altérations génétiques acquises dans plusieurs types de cancers : gliomes, cancer du poumon, cancer colorectal, etc...

Lors de mon stage, je me suis plus particulièrement attardé sur les gliomes, et j'ai pris part au développement d'une nouvelle technique diagnostique qui fait l'objet de l'article qui étaye ma thèse sous la tutelle du docteur Marc BARRITAUULT. L'objectif du projet était le développement d'une nouvelle technique de diagnostic de biologie moléculaire pour la détection des transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* à partir d'échantillons fixés dans du formol et inclus en paraffine.

La suite de ce document sera organisée de la manière qui suit :

- Une revue bibliographique accompagnée du contexte de la réalisation de l'étude

- L'article en version anglaise
- Une discussion complémentaire à celle disponible dans l'article
- Les données de l'étude sont disponibles en annexe

# 1 Revue de la littérature et contexte de l'étude

## 1.1 Les tumeurs cérébrales

Les tumeurs cérébrales sont les tumeurs les plus courantes chez l'enfant, il s'agit par ailleurs de la seconde cause de cancer dans la population pédiatrique après les leucémies. Ces tumeurs posent des problèmes diagnostics particuliers puisque pour une même histologie une grande hétérogénéité, en termes d'évolution, et donc de pronostic, sera observée. Il est important de noter que la proportion de ces tumeurs est très différente entre les populations adultes et pédiatriques puisque les tumeurs cérébrales représentent 25% des tumeurs chez l'enfant et seulement 2% chez l'adulte.

Les tumeurs cérébrales sont subdivisées en plusieurs sous-catégories en raison de leur hétérogénéité. La classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) repose sur différents critères tels que leur histologie et leur localisation, qui sont deux paramètres importants qui influencent le pronostic (1). Depuis 2016, elle intègre également des critères issus des progrès réalisés en biologie moléculaire et en imagerie, critères qui ont permis de mieux classer certaines tumeurs « inclassables » jusqu'ici. (2). La **Figure 1** expose une vue générale de la classification de l'OMS de 2016 (3).

WHO grades of select CNS tumours			
<b>Diffuse astrocytic and oligodendroglial tumours</b>		Desmoplastic infantile astrocytoma and ganglioglioma	I
Diffuse astrocytoma, IDH-mutant	II	Papillary glioneuronal tumour	I
Anaplastic astrocytoma, IDH-mutant	III	Rosette-forming glioneuronal tumour	I
Glioblastoma, IDH-wildtype	IV	Central neurocytoma	II
Glioblastoma, IDH-mutant	IV	Extraventricular neurocytoma	II
Diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant	IV	Cerebellar liponeurocytoma	II
Oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	II	<b>Tumours of the pineal region</b>	
Anaplastic oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	III	Pineocytoma	I
<b>Other astrocytic tumours</b>		Pineal parenchymal tumour of intermediate differentiation	II or III
Pilocytic astrocytoma	I	Pineoblastoma	IV
Subependymal giant cell astrocytoma	I	Papillary tumour of the pineal region	II or III
Pleomorphic xanthoastrocytoma	II	<b>Embryonal tumours</b>	
Anaplastic pleomorphic xanthoastrocytoma	III	Medulloblastoma (all subtypes)	IV
<b>Ependymal tumours</b>		Embryonal tumour with multilayered rosettes, C19MC-altered	IV
Subependymoma	I	Medulloepithelioma	IV
Myxopapillary ependymoma	I	CNS embryonal tumour, NOS	IV
Ependymoma	II	Atypical teratoid/rhabdoid tumour	IV
Ependymoma, <i>RELA</i> fusion-positive	II or III	CNS embryonal tumour with rhabdoid features	IV
Anaplastic ependymoma	III	<b>Tumours of the cranial and paraspinal nerves</b>	
<b>Other gliomas</b>		Schwannoma	I
Angiocentric glioma	I	Neurofibroma	I
Chordoid glioma of third ventricle	II	Perineurioma	I
<b>Choroid plexus tumours</b>		Malignant peripheral nerve sheath tumour (MPNST)	II, III or IV
Choroid plexus papilloma	I	<b>Meningiomas</b>	
Atypical choroid plexus papilloma	II	Meningioma	I
Choroid plexus carcinoma	III	Atypical meningioma	II
<b>Neuronal and mixed neuronal-glioma tumours</b>		Anaplastic (malignant) meningioma	III
Dysembryoplastic neuroepithelial tumour	I	<b>Mesenchymal, non-meningothelial tumours</b>	
Gangliocytoma	I	Solitary fibrous tumour / haemangiopericytoma	I, II or III
Ganglioglioma	I	Haemangioblastoma	I
Anaplastic ganglioglioma	III	<b>Tumours of the sellar region</b>	
Dysplastic gangliocytoma of cerebellum (Lhermitte-Duclos)	I	Craniopharyngioma	I
		Granular cell tumour	I
		Pituicytoma	I
		Spindle cell oncocytoma	I

**Figure 1 : Classification des tumeurs du système nerveux central par l'OMS en 2016.**  
(3)

Au sein de cette classification, on distingue les gliomes qui sont des tumeurs issues du tissu cérébral et font partie des tumeurs du système nerveux central. Les gliomes sont issus de la prolifération anarchique des cellules gliales dont la fonction est de former un tissu de soutien pour les neurones. Les gliomes peuvent être subdivisés en 3 sous-groupes histologiques (4) (5) :

- Astrocytomes composés d'une prolifération anormale d'aspect astrocytaire
- Oligodendrogliomes constitués d'une prolifération anormale d'aspect oligodendrocytaires
- Ependymomes constitués d'une prolifération anormale de cellules épendymaires

Les astrocytomes et les oligodendrogliomes représentent la majorité des gliomes (4). Au sein de chacun de ces groupes, il existe des sous-familles caractérisées par des pronostics très variables.

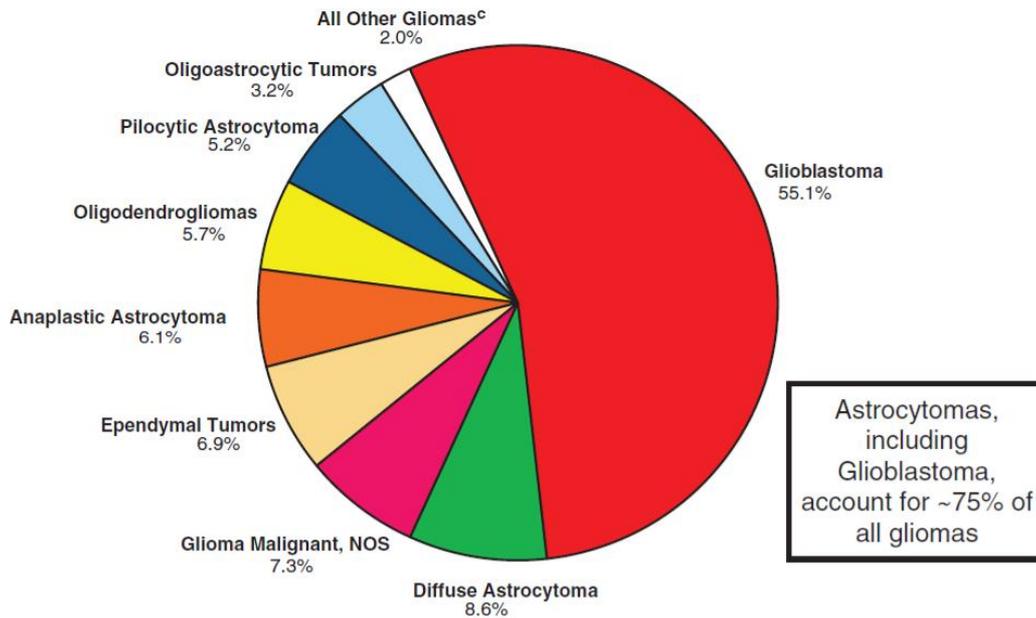
## 1.2 Les Astrocytomes

Les astrocytomes représentent un sous-groupe très vaste et hétérogène. Le pronostic dépend de leur localisation qui conditionne leur exérèse chirurgicale. Les apports récents de la biologie moléculaire ont permis de définir des pronostics en fonction du profil moléculaire de la tumeur (6). Ces avancées permettent d'envisager l'utilisation de thérapies moléculaires ciblées. La classification des astrocytomes en fonction de leur grade selon la classification de l'OMS, et leur fréquence parmi les gliomes est disponible dans le **Tableau 1** (7).

**Tableau 1 : Fréquence de différentes tumeurs du SNC parmi les gliomes. (7)**

<b>Tumeur</b>	<b>Grade de l'OMS</b>	<b>Fréquence au sein de l'ensemble des gliomes</b>
<b>Astrocytome Pilocytique</b>	I	5,2%
<b>Astrocytomes Diffus</b>	II	8,6%
<b>Astrocytomes Anaplasiques</b>	III	6,1%
<b>Glioblastomes</b>	IV	55,1%

Les astrocytomes qui incluent les glioblastomes comptent pour environ 75% de l'ensemble des gliomes (**Figure 2**). Sur la **Figure 2**, les tumeurs astrocytaires sont constituées par les astrocytomes pilocytiques, les astrocytomes diffus, les astrocytomes anaplasiques et les glioblastomes (7).



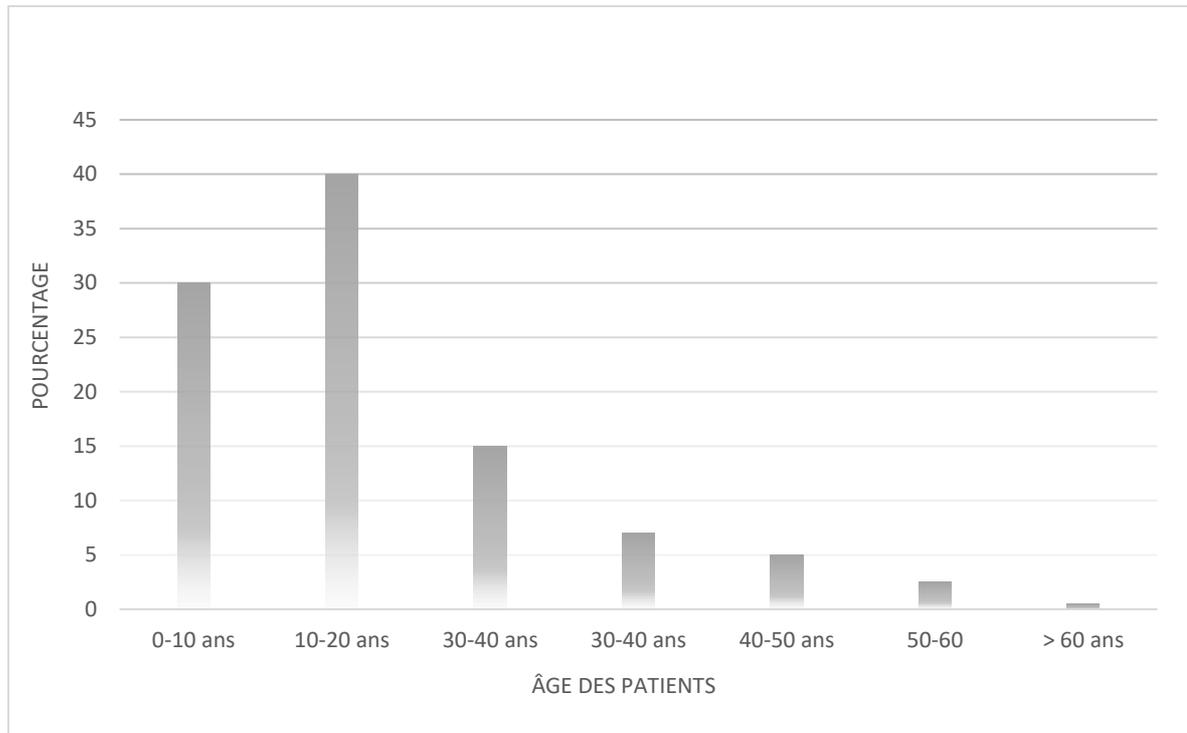
**Figure 2 : Distribution des tumeurs par profil histologique au sein des gliomes. (7)**

### 1.2.1 Epidémiologie

Les astrocytomes sont des tumeurs avec une fréquence plus importante au sein de la population pédiatrique et comptent pour environ 35% de l'ensemble des tumeurs cérébrales primitives chez l'enfant. L'astrocytome le plus fréquent est l'astrocytome pilocytique, qui représente à lui seul 15% de l'ensemble des tumeurs cérébrales de l'enfant (1). Il s'agit du groupe de tumeurs du système nerveux central le plus fréquent chez les enfants et les jeunes adultes (18% chez les patients de moins de 14 ans) (7). Les astrocytomes pilocytiques sont des tumeurs de bas grade (grade I de l'OMS). En effet, ces tumeurs sont caractérisées par une croissance lente et sont généralement peu invasives vis-à-vis des tissus situés autour d'elles. Chez les patients âgés de 10 ans, le taux de survie à un an est supérieur à 90% (3) (8).

Les astrocytomes pilocytiques apparaissent majoritairement au cours des deux premières décennies de vie. En effet, au cours de cette période leur incidence est de 0,84/ 100 000

alors que leur incidence globale est de 0,37/100 000. Malgré leur croissance lente, les astrocytomes pilocytiques présentent un risque de récurrence pour 20% des patients. (2) (7). La proportion de ces tumeurs est donc fortement dépendante de l'âge de la population concernée, comme nous pouvons le constater sur la **Figure 3** (2).



**Figure 3: Distribution des astrocytomes pilocytiques (sujets masculins et féminins) basée sur les biopsies de 205 patients traités à l'Hôpital Universitaire de Zurich (2).**

## 1.2.2 Localisation

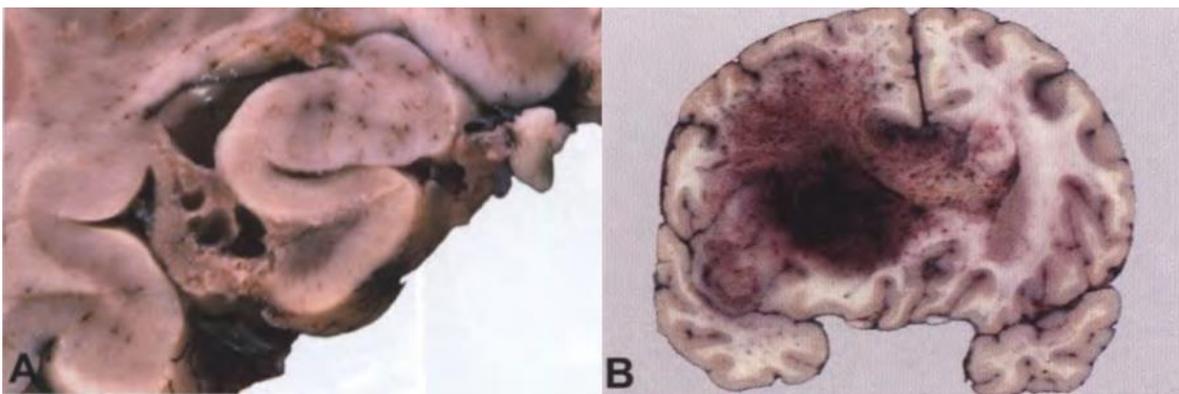
La localisation des astrocytomes pilocytiques peut s'étendre sur l'ensemble de l'axe formé par le système nerveux central. Malgré cette grande diversité, ils se situent pour la plupart au niveau du cervelet et de la ligne médiane cérébrale dans des structures telles que les voies optiques, le tronc cérébral ou l'hypothalamus. En somme, les astrocytomes, dits « cérébelleux », représentent 80% à 85% de tous les astrocytomes (9).

## 1.2.3 Identification

L'identification de ces tumeurs repose entre autres sur l'étude microscopique et macroscopique des biopsies pouvant être réalisées. Il est donc important de pouvoir identifier des caractéristiques distinctives utiles à l'identification des astrocytomes pilocytiques comparativement aux autres tumeurs du système nerveux central.

### 1.2.3.1 Caractéristiques macroscopiques

Macroscopiquement, les astrocytomes pilocytiques sont des tumeurs circonscrites grisâtres ou jaunâtres difficilement discernables vis-à-vis du tissu sain environnant comme nous pouvons le voir sur la **Figure 4** lorsque nous comparons son aspect microscopique par rapport à d'autres tumeurs telles que le glioblastome.



**Figure 4 : On remarque que les astrocytomes pilocytiques (A) sont des tumeurs qui**

**sont moins aisées à discerner des tissus environnants macroscopiquement par rapport à d'autres tumeurs telles que les glioblastomes (B).** (A) Astrocytome Pilocytique : infiltration diffuse de l'hippocampe et des structures environnantes. (B) Glioblastome étendu, diffus et infiltrant le lobe frontal gauche avec une coloration typique dite « whitish-grey » (2).

Les astrocytomes pilocytiques sont des tumeurs de grade I de l'OMS, notamment en raison du fait qu'il s'agit de tumeurs non métastatiques. En effet, ces tumeurs ne produisent pas de métastases et n'envahissent pas les tissus environnants, elles restent généralement bien délimitées.

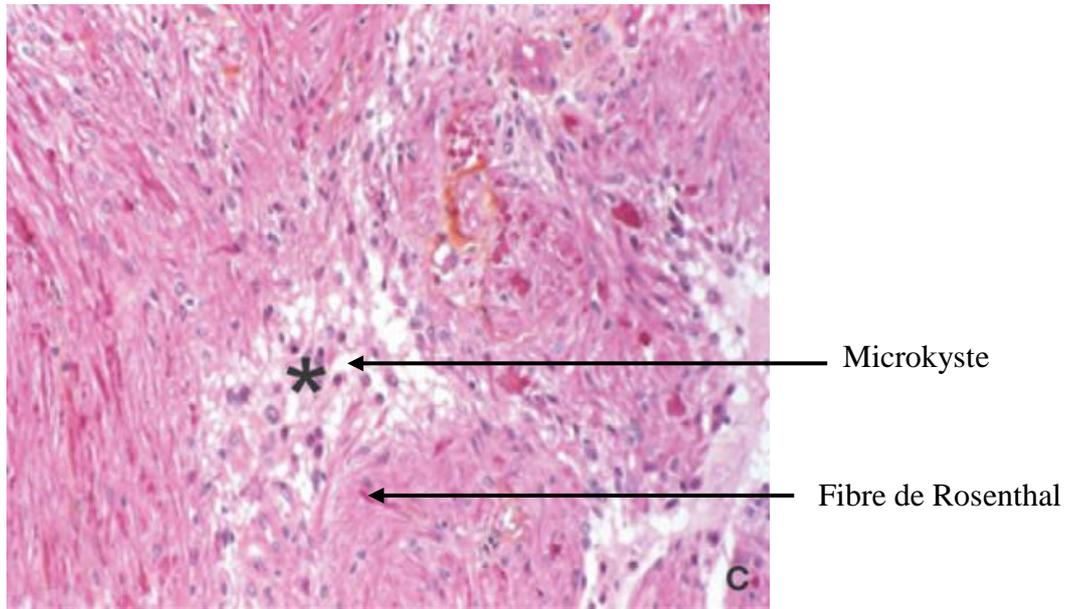
### 1.2.3.2 Caractéristiques microscopiques

Lors de l'analyse microscopique, ces tumeurs peuvent présenter plusieurs motifs cellulaires caractérisés par une prolifération de cellules gliales bipolaires allongées associées à de nombreuses fibres de Rosenthal (10) et des tissus moins denses au sein d'une même tumeur et sont richement vascularisées (2). Les deux éléments caractéristiques de ces tumeurs qui peuvent être observés à l'échelle microscopique sont les fibres de Rosenthal et les microkystes (**Figure 5**) (11).

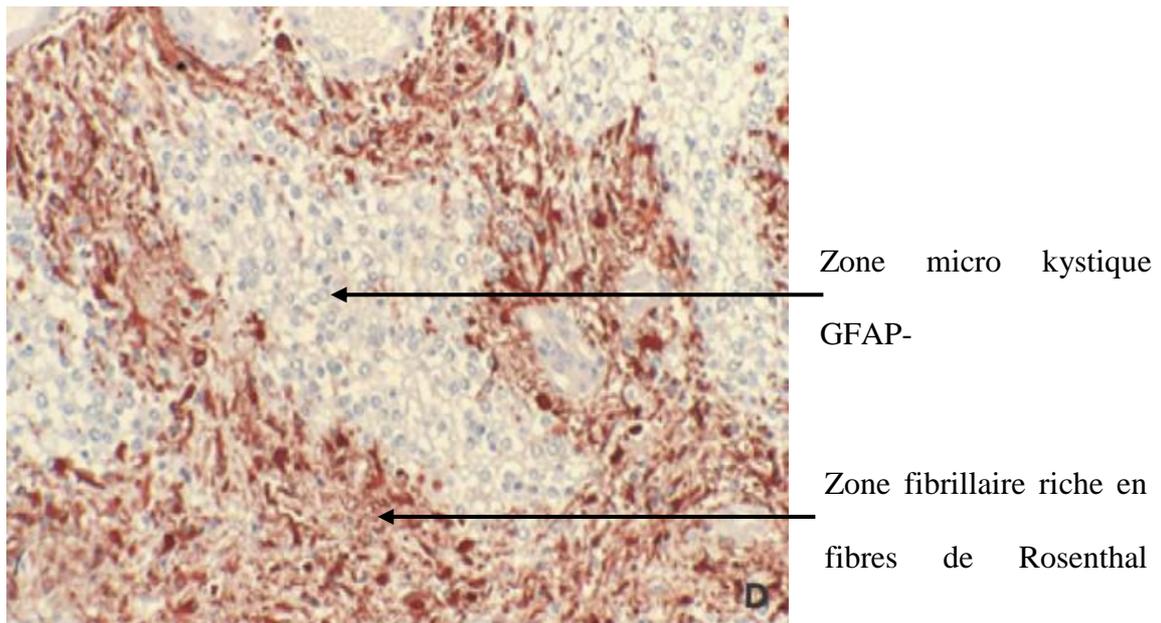
Les fibres de Rosenthal sont des structures intracytoplasmiques éosinophiles qui peuvent avoir une forme effilée, arrondie ou « en tire-bouchon », malgré leur intérêt lors de la recherche du diagnostic, elles ne sont pas toujours présentes ni spécifiques des astrocytomes pilocytiques. Les zones riches en fibres de Rosenthal expriment la protéine gliofibrillaire acide (GFAP) qui peut être marquée à l'aide d'un anticorps dirigé contre les cellules GFAP+, en raison de leur fort caractère éosinophile.

Au contraire, les zones plus lâches et microkystiques sont caractérisées par de petits corps cellulaires qui expriment très faiblement la GFAP (**Figure 6**). Ces tumeurs se caractérisent par un taux de mitose peu important et une cellularité faible, qui sont des facteurs associés

à des tumeurs peu prolifératives et donc peu agressives. (11).



**Figure 5 : Astrocytome pilocytique dans sa forme biphasique. Histologie (HESx25) :** Présence de zones fibrillaires riches en fibres de Rosenthal (GFAP+) alternant avec des zones plus lâches constituées de cellules oligodendrocytes-like (GFAP-) (astérisque). (11).



**Figure 6 : Expression hétérogène de la protéine gliofibrillaire acide (GFAP) par les astrocytomes pilocytiques. Immuno Histo Chimie (IHC) anti-GFAP (x25) : forte expression par les cellules tumorales dans les zones fibrillaires visibles en IHC. (11)**

### 1.2.3.3 Imagerie médicale

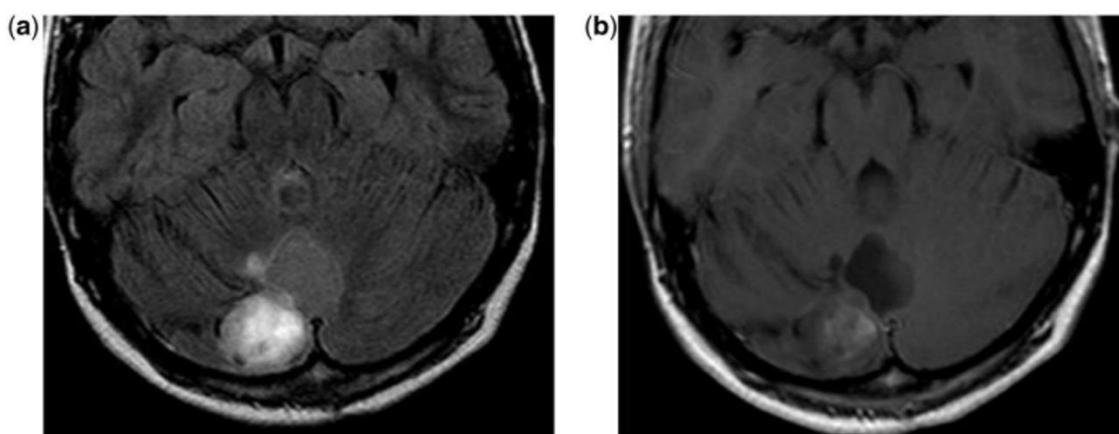
A ce jour, l'examen de référence en imagerie médicale pour le dépistage des astrocytomes pilocytiques est l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Les caractéristiques principales des astrocytomes pilocytiques visibles grâce à l'IRM sont les suivantes (12) :

- Forme kystique
- Présence d'un nodule mural qui est un épaissement de la paroi tumorale, présent dans 2 cas sur 3
- Hétérogénéité typique des tissus
- Calcifications occasionnelles
- Bords homogènes

Dans les cas où l'astrocytome pilocytique ne présente pas de forme kystique, sa

caractérisation est moins aisée puisqu'il est semblable à d'autres tumeurs du système nerveux central (SNC).

Lors de l'analyse des clichés d'IRM, on remarque que la séquence T1 pondérée permet de visualiser les portions solides de la tumeur kystique en gris mate (iso/hypointense) alors que le contenu du kyste est iso/hyperintense. Sur les séquences T2 et la séquence d'inversion récupération (fluid attenuated inversion recovery, FLAIR) la portion solide est hyperintense et apparaît en gris clair (**Figure 7**) (12).



**Figure 7 : Astrocytome Pilocytique chez un enfant de 11 ans.** (a) IRM T2 pondéré axial FLAIR : on observe le nodule cérébral superficiel hyperdense et le manque de suppression du signal dans la composante kystique. (b) IRM T1 pondéré axial contraste augmenté : on observe un signal dans la composante nodulaire et un faible signal dans la délimitation du kyste (12).

#### 1.2.4 Apports de la biologie moléculaire

Malgré l'apport précieux de l'imagerie et de l'observation microscopique afin de poser le diagnostic, il reste des cas difficiles à classer. On peut par exemple citer les cas où la distinction avec un gangliogliome où un gliome infiltrant est difficile. Dans le cas d'un gangliogliome, l'IRM peut présenter une tumeur bien délimitée au sein de l'hémisphère cérébelleux. L'étude microscopique peut montrer une prolifération de cellules gliales bipolaires allongées associées à de nombreuses fibres de Rosenthal (10). Tous ces éléments

habituellement retrouvés dans les astrocytomes pilocytiques rendent le diagnostic en faveur d'un gangliogliome difficile. Par ailleurs, il existe aussi de rares cas où le diagnostic différentiel entre un astrocytome pilocytique et un glioblastome peut aussi poser question.

(13)

Dans ces cas complexes, l'apport de la biologie moléculaire est important afin de confirmer ou d'infirmer une hypothèse diagnostique basée sur l'imagerie et/ou sur l'observation microscopique des tissus.

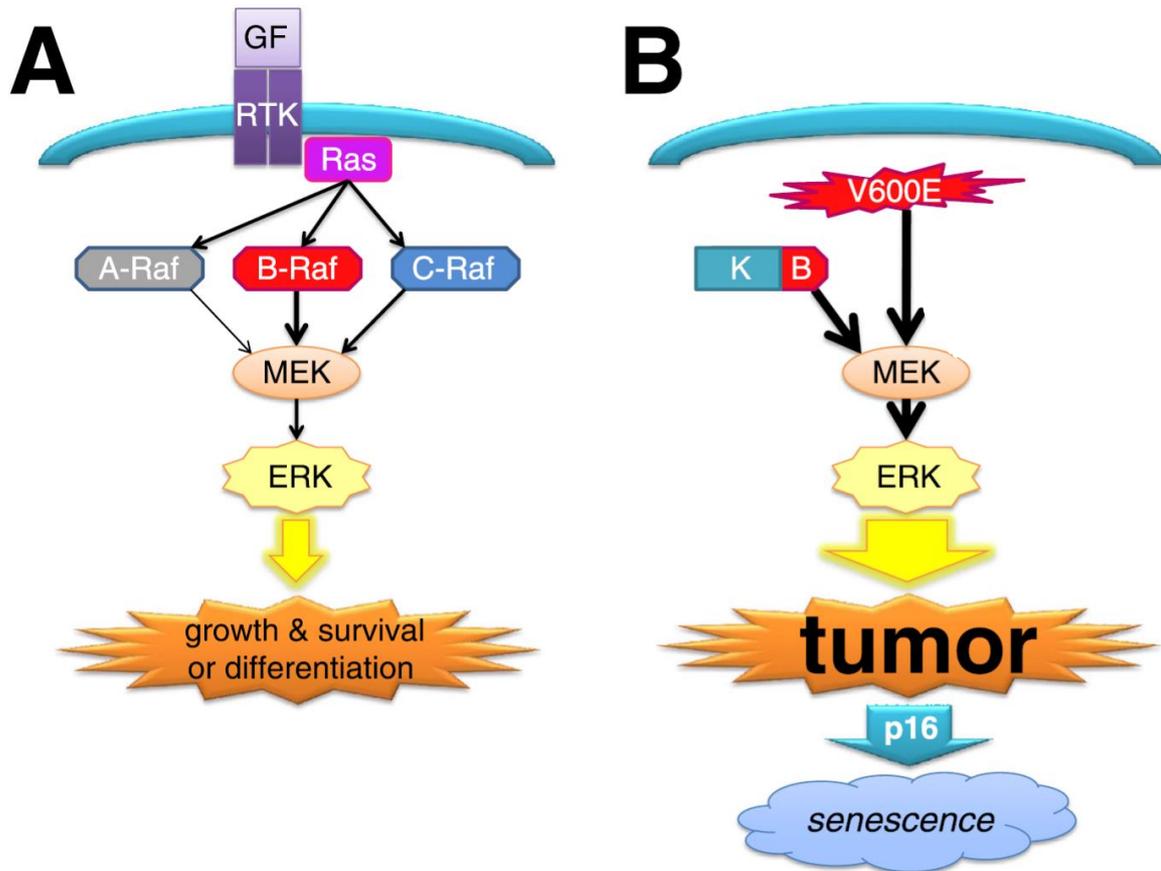
#### **1.2.4.1 Mutation de la voie des Mitogen-activated protein kinases (MAPK)**

Dans 70% des cas d'astrocytomes pilocytiques, (3) il existe une mutation au niveau des gènes codants certaines protéines impliquées dans la voie des MAPK (Mitogen-activated protein kinases) comme l'indique la **Figure 8** (14). La voie des MAPK est une voie de signalisation intracellulaire qui est activée par divers facteurs de croissance comme l'epidermal growth factor receptor (EGFR) ou le transforming growth factor  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ) (15). Elle intervient dans de nombreux évènements de la vie cellulaire comme la prolifération, la différenciation cellulaire, l'apoptose, la sénescence ou la survie cellulaire.

Chez le sujet sain, l'activation de la kinase Ras dépend de la fixation d'un facteur de croissance (GF) sur un récepteur à tyrosine kinase (RTK). Un fois activée, Ras, activera à son tour les protéines kinases de la famille Raf. Ces protéines Raf permettent, entre autres, d'activer MEK qui régule la prolifération cellulaire et la survie cellulaire. BRAF est un activateur plus puissant que CRAF qui est lui-même plus puissant que ARAF. Dans le cas d'un astrocytome pilocytique exprimant une protéine de fusion *KIAA1549-BRAF*, la kinase BRAF est une protéine mutante qui peut alors activer MEK sans le signal initial de Ras, menant à une prolifération tumorale incontrôlée.

Une situation similaire peut être observée dans d'autres cas plus rares de mutations comme la mutation V600E qui correspond à un changement d'acide aminé en position 600 dans BRAF, avec une valine (V) remplacée par un acide glutamique (E). Cette mutation se produit au sein du domaine kinase. La plupart des mutations de *BRAF*, comme la mutation V600E, entraînent une activité kinase augmentée (16).

La voie MEK est une voie pouvant mener à la prolifération cellulaire mais également à la sénescence. En effet, il s'agit d'une voie qui lorsqu'elle est activée de manière aberrante peut mener à une sénescence induite par un oncogène via l'activation de la protéine p16. Lorsque la voie MEK est activée de manière constitutive comme dans les astrocytomes pilocytiques, la protéine p16 est activée pour induire une sénescence induite par un oncogène. On remarque que lorsque l'on a une perte de cette protéine p16, une perte de la faculté de générer cette sénescence induite par un oncogène se produit également (17). Toutefois, le fait que la voie MEK mène à la fois à une prolifération cellulaire et à la sénescence cellulaire est à double tranchant pour ces tumeurs qui sont freinées dans leur prolifération par une sénescence qui les « essouffle » progressivement lorsque la protéine p16 est présente. En somme, lorsqu'il existe une délétion de p16, alors la sénescence tumorale induite par l'activation constitutive de la voie MEK par BRAF est inhibée (14).



**Figure 8 : La voie de signalisation BRAF dans les gliomes.** (A) Chez le sujet sain, l'activation de la kinase Raf dépend de la fixation d'un facteur de croissance (GF) sur un récepteur à tyrosine kinase (RTK) qui permet d'activer Ras qui activera à son tour les protéines kinases de la famille raf. Ces protéines raf permettent, entre autres, d'activer MEK qui régule la prolifération cellulaire et la survie cellulaire. (B) Dans le cas d'un astrocytome pilocytique exprimant une protéine de fusion *KIAA1549-BRAF* (K-B), la protéine mutante résultante peut alors activer MEK sans le signal initial de Ras, menant à une prolifération tumorale incontrôlée. Une situation similaire peut être observée dans d'autres cas plus rares de mutations comme la mutation V600E. (14)

#### 1.2.4.2 Transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF*

La formation des astrocytomes pilocytiques est majoritairement liée à la synthèse d'une protéine de fusion, la protéine *KIAA1549-BRAF*. Cette protéine est issue du réarrangement des gènes *KIAA1549* dont la fonction est inconnue et *BRAF* dont les fonctions au sein de la voie *MAPK* ont été évoquées ci-dessus. Elle résulte d'une duplication en tandem de 2Mb du locus 34 du chromosome 7 (7q34) (18). La duplication

en tandem est un mécanisme au cours duquel les deux gènes *KIAA1549* et *BRAF* situés sur la portion 7q34 sont dupliqués et associés. Lors de la fusion des deux gènes, la région régulatrice N-Terminale de *BRAF* est remplacée par l'extrémité N-Terminale de *KIAA1549*. Au cours de cette opération, *BRAF* perd donc sa région régulatrice. Il y a alors production de transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* qui codent pour une protéine de fusion oncogénique *KIAA1549-BRAF* dont la région kinase située sur le reliquat de *BRAF* est constamment active en raison de l'absence de région régulatrice. C'est ce qui mène *in fine* à l'activation continue de la voie *MAPK*. (19) (20).

La fusion des gènes *KIAA1549* et *BRAF* peut s'opérer à différents niveaux des deux gènes concernés. En effet, diverses combinaisons d'exons peuvent exister car il existe plusieurs points de « cassure » possibles. Les principaux points se situent au sein des introns 14 et 15 sur *KIAA1549* et dans les introns 8 et 10 sur *BRAF*. La **Figure 9** expose les fusions les plus fréquentes existantes (10). Il peut exister d'autres points de cassures menant à des combinaisons d'exons différents et donc à des transcrits de fusions et protéines de fusions différentes.

Les fusions les plus fréquentes sont les suivantes (20) (21) (22) :

- *KIAA1549* exon 16 avec *BRAF* exon 9 (16-9) dans 60% des cas
- *KIAA1549* exon 15 avec *BRAF* exon 9 (15-9) dans 25% des cas
- *KIAA1549* exon 16 avec *BRAF* exon 11 (16-11) dans 10-15% des cas
- Autres combinaisons de fusion dans 0-5% des cas

Chromosome 7q34 Ref | NC 018918.2 |

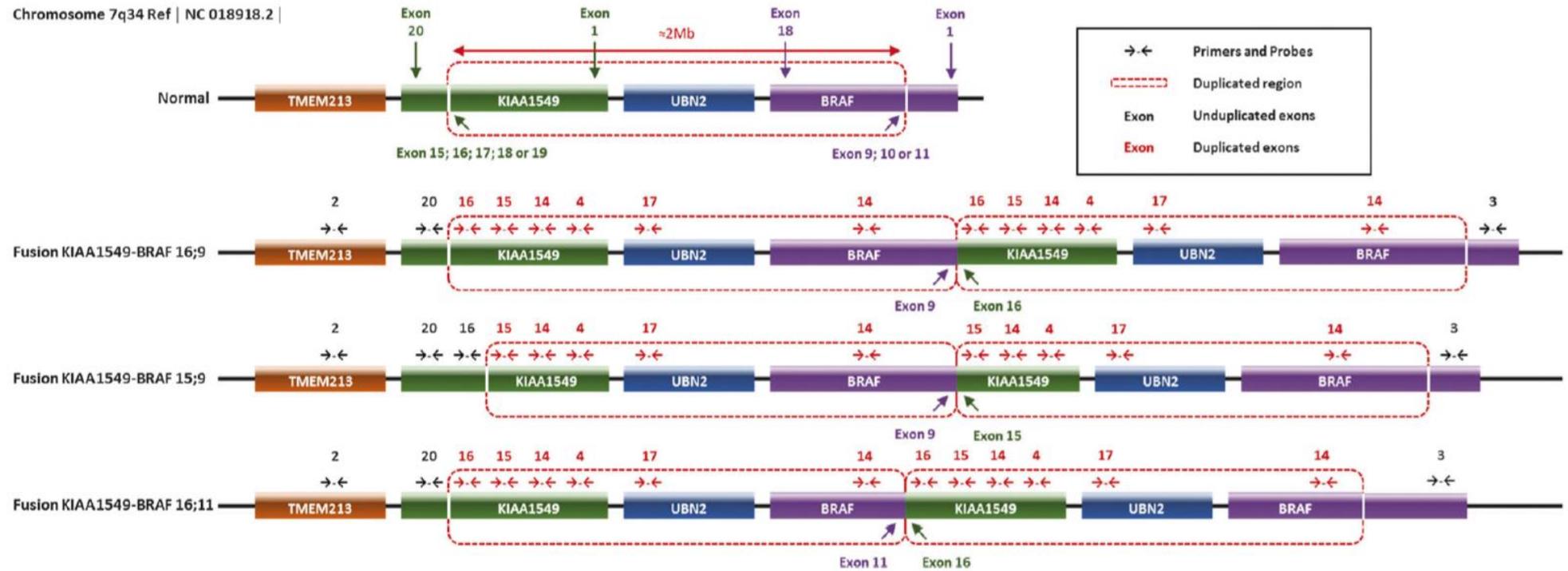


Figure 9 : Représentation schématique de la portion normale du chromosome 7q34 ainsi que des principales fusions *KIAA149-BRAF* possibles (10)

Cette anomalie génétique est retrouvée dans 70% des astrocytomes pilocytiques mais ne peut pas être considérée comme une caractéristique exclusive de ces tumeurs. L'identification de cette duplication en tandem des deux gènes *KIAA1549* et *BRAF* permet toutefois une orientation forte du diagnostic en faveur d'un astrocytome pilocytique. En effet, cette altération génétique, même si elle n'est pas spécifique, est beaucoup moins fréquente au sein d'autres gliomes tels que les gangliogliomes. (10)

### **1.2.5 Traitements et qualité de vie**

Le traitement des tumeurs cérébrales repose sur trois principales voies thérapeutiques constituées par la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Lorsqu'elle est possible, la chirurgie représente le premier geste thérapeutique afin d'obtenir au minimum une biopsie pour investiguer et préciser le diagnostic histologique (nature, grade) et moléculaire de la tumeur. Dans certains cas, une résection complète est possible et de meilleures chances de guérison sont envisageables. Dans le cas des astrocytomes pilocytiques, compte tenu de la faible prolifération tumorale et de leur faible invasion des tissus environnants, le traitement privilégié est la chirurgie avec une résection totale de la tumeur (2). Une thérapie adjuvante peut être indiquée en cas de résection chirurgicale incomplète de la tumeur. La radiothérapie est indiquée chez l'adulte et l'enfant âgé de plus de 10 ans. La chimiothérapie est un traitement privilégié chez les jeunes enfants, mais est également discutée chez l'adulte. L'astrocytome pilocytique fait partie des tumeurs les plus chimio-sensibles au même titre que l'astrocytome anaplasique. Les astrocytomes pilocytiques sont des tumeurs dont le traitement peut être mis en place dans la majorité des cas. Les séquelles de ces tumeurs et de leur traitement peuvent être sévères surtout chez le très jeune enfant et le sujet âgé et/ou en cas d'irradiation étendue. (23)

Un nombre limité d'études aborde la qualité de vie des patients qui ont été traités au cours de l'enfance pour une tumeur du système nerveux central. Cependant, ces études mettent en évidence le fait que les adultes concernés ont significativement plus d'incapacités physiques et/ou intellectuelles et plus de difficultés lors du travail ou de la conduite (24).

### **1.2.6 Détecter les transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF***

A ce jour, plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour mettre en évidence les transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF*. Les principales méthodes pouvant être utilisées sont décrites ci-dessous :

- L'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)
- Le séquençage de l'ARN (RNAseq)
- L'hybridation génomique comparative (CGH)
- Polymérase chain reaction en temps réel (qPCR)
- La PCR digitale
- Le NanoString Ncounter

Ces techniques ne sont pas semblables en termes de sensibilité et spécificité. Elles ne permettent pas toutes de distinguer lequel des différents transcrits de fusion est impliqué dans l'apparition de l'astrocytome pilocytique lorsque le test est positif. C'est par exemple le cas lors de l'utilisation de la technique FISH ou de la technique CGH. Au contraire, l'identification du transcrit de fusion parmi les trois principaux connus (15-9, 16-9 et 16-11) est possible avec les techniques de qPCR (2). De plus, les coûts liés à ces différentes méthodes sont différents : l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), la CGH, le NanoString sont plus coûteuses que la PCR car elles nécessitent un temps technique plus

important ou un matériel dédié et spécifique afin d’être mises en œuvre. Une comparaison de différentes méthodes utilisées pour la mise en évidence des transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* est présentée en **Tableau 2**.

**Tableau 2 Tableau comparatif des techniques utilisées pour la détection des transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF*. (10)**

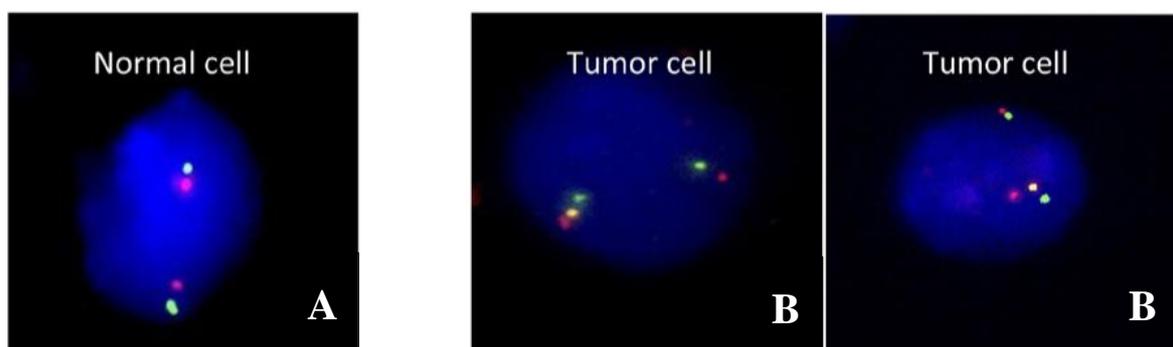
	PCR digitale	RNAseq	Nanostring	FISH	CGH
<b>Matériel</b>	ADN	ARN	ARN	Section de tissus	ADN
<b>Quantité</b>	Faible (2 – 10 ng)	Elevée (100 – 200 ng)	Modérée (50 – 100 ng)	Faible	Elevée (500 ng)
<b>Succès sur des échantillons congelés ou FFPE</b>	Elevé dans les deux	Elevé sur les échantillons congelés	Elevé sur les échantillons congelés	Modéré pour les deux	Elevé sur les échantillons congelés
<b>Sensibilité</b>	Très élevée	Modérée	Modérée	Dépend de l’opérateur	Faible
<b>Spécificité</b>	Faible à modérée	Très élevée	Elevée	Dépend de l’opérateur	Elevée
<b>Nombre de cibles détectées</b>	Faible à modéré	Très élevé	Très élevé	NA	Très élevé
<b>Quantification</b>	Oui, absolue	Oui	Oui	Non	Non

### 1.2.6.1 L’hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)

Lors de la recherche des transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* par hybridation *in situ* par fluorescence (FISH), deux séquences nucléotidiques situées respectivement sur les gènes *KIAA1549* et *BRAF* sont détectées par deux sondes nucléotidiques marquées avec deux composés fluorescents de couleurs différentes. Dans la **Figure 10** (8) (6), la sonde s’hybridant à *BRAF* est marquée par une fluorescence rouge et celle s’hybridant à *KIAA1549* par une fluorescence verte. En l’absence de transcrits de fusion, seules les couleurs rouge et verte sont observables, mais en présence de transcrits de fusion, les gènes

*KIAA1549* et *BRAF* sont fusionnés et la proximité entre leurs sondes fluorescentes provoque la superposition de leurs fluorescences respectives et déclenche donc l'apparition d'une troisième couleur. On peut noter l'apparition de la fluorescence jaune dans l'image (A) de la **Figure 10**, issue de la superposition des fluorescences rouge et verte des deux sondes s'hybridant aux transcrits de fusion *KIAA1549* et *BRAF* (25) (26) (6).

La méthode FISH est une méthode présentant une résolution de 5 à 10 Mb. Il s'agit d'une méthode largement utilisée par les laboratoires mais qui est coûteuse et nécessite un temps technique important (27). Par ailleurs, il s'agit d'une méthode opérateur-dépendant qui ne permet pas l'exploration simultanée de plusieurs transcrits de fusion (10).



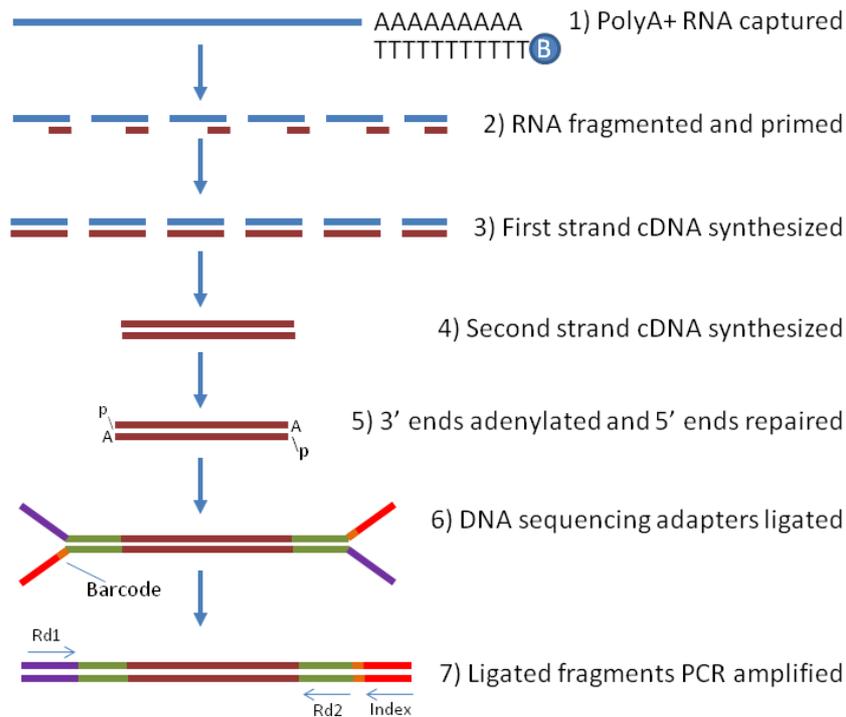
**Figure 10 : Mise en évidence des réarrangements *KIAA1549-BRAF* par la méthode FISH.** Altérations moléculaires *KIAA1549-BRAF* mise en évidence par une détection FISH. (A) cas positif marqué par la présence de fluorescence jaune marquant la présence de fusion *KIAA1549-BRAF* issue de la superposition des fluorescences verte correspondant au gène *KIAA1549* et rouge correspondant au gène *BRAF*. (B) cas négatif montrant uniquement des fluorescences verte correspondant au gène *KIAA1549* et rouge correspondant au gène *BRAF*.(8)

### 1.2.6.2 Le séquençage de l'ARN (RNAseq)

Le RNAseq est une méthode de séquençage de nouvelle génération ou next generation sequencing (NGS). Cette méthode permet la détection des transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* (10). Elle repose tout d'abord sur la préparation de bibliothèques. Ces bibliothèques sont constituées comme suit (**Figure 11**) (28) :

- Fragmentation des ARN messagers en plus petites sections d'acides désoxyribonucléiques (ADN) pour permettre le séquençage
- Rétrotranscription, les acides désoxyribonucléiques complémentaires (ADNc) sont transcrits à partir des ARN en utilisant des hexamères aléatoires ou des amorces d'oligo(dT)
- Ligation des adaptateurs, les extrémités 5' et 3' des ADNc sont réparées et des adaptateurs sont ajoutés pour permettre l'hybridation
- Nettoyage de la librairie et amplification, les librairies sont enrichies et amplifiées par PCR
- Quantification des librairies et séquençage, un automate séquence les librairies

Des codes-barres peuvent être ajoutés pendant la préparation de la librairie. Ceci permet un séquençage simultané de plusieurs librairies lors d'une seule analyse. (28) (29)



**Figure 11 : Etapes de la constitution d'une librairie.** L'ARN polyA + est enrichi à l'aide de billes d'oligo (dT), suivi d'une fragmentation et d'une rétro transcription. Les extrémités 5 'et 3' des fragments d'ADNc sont ensuite ligaturés avec des adaptateurs contenant un code à barres unique et des sites de liaison d'amorces. Enfin, les ADNc ligaturés sont amplifiés par PCR et prêts pour le séquençage. (28)

Cette technique a été utilisée comme gold standard par Appay et coll, 2018 (10). Elle sert de référence pour déterminer la sensibilité et la sensibilité des autres techniques telles que la PCR digitale. Cette méthode permet l'exploration d'un grand nombre de cibles à la fois, déterminée à la base près, mais elle nécessite des prélèvements de bonne qualité, ce que nous ne pouvons pas toujours obtenir à partir d'échantillons congelés. Cette méthode requiert également un équipement onéreux et un temps de manipulation important (10) (29).

### 1.2.6.3 L'hybridation génomique comparative (CGH)

La CGH est une méthode de cytogénétique moléculaire capable de détecter et localiser des

déséquilibres alléliques. En effet, chacune des deux copies d'une paire de chromosomes présente en théorie les mêmes segments. Or, dans certaines pathologies des délétions ou duplications peuvent se produire, se traduisant respectivement par des pertes ou des gains sur les profils de CGH. La CGH permet de diagnostiquer ces pathologies et d'identifier les régions chromosomiques impliquées.

Dans cette technique, de l'ADN tumoral du patient ainsi que de l'ADN sain de référence ne provenant en général pas du patient sont extraits et marqués par des fluorochromes de couleurs différentes (30). L'ADN tumoral est marqué avec un fluorochrome Cy5 et l'ADN sain avec un autre fluorochrome Cy3.

Ensuite, les ADNs sains et tumoraux initialement marqués vont alors s'hybrider de manière compétitive sur une lame sur laquelle est fixée des fragments d'ADN normaux. Cette étape d'hybridation est longue (40 heures) suivie d'une étape de lavage pour éliminer l'ADN non hybridé. (30)

Les lames sont ensuite examinées grâce à un scanner numérique (Agilent DNA microarray scanner) avant d'être analysées bio informatiquement. Les fluorescences détectées suite à cette réaction permettent de définir si une délétion ou une duplication est présente, et quels chromosomes sont impliqués (31).

Il y a compétition entre les ADNs tumoraux et sains et la quantité de chacun de ceux-ci qui s'hybridera en une région donnée sera fonction de la quantité relative de séquences homologues à cette région. Dans le cas d'une mutation *KIAA1549-BRAF* on observera une augmentation de la fluorescence du fluorochrome Cy3 correspondant à une duplication de la région 7q34 en raison de la compétition ayant eu lieu entre les différents ADNs.

Cette méthode a été utilisée dans plusieurs études pour la recherche des transcrits de fusion

*KIAA1549-BRAF* (30) (32) (33).

Cette technique présente une résolution élevée de l'ordre de 2 à 100 kb mais reste cependant coûteuse et est peu utilisée dans les laboratoires de biologie médicale. Cette technique ne permet de détecter que les anomalies non équilibrées, toutes les anomalies équilibrées ne seront pas détectées. De plus elle ne permet pas de définir avec précision le transcrit de fusion présent, contrairement aux méthodes de NGS ou de qPCR décrites ci-dessous et présente une faible sensibilité et une spécificité élevée (10).

#### **1.2.6.4 La polymerase chain reaction en temps réel (qPCR)**

L'étape préliminaire aux analyses réalisées par qPCR est une étape de rétro transcription permettant de synthétiser le brin d'ADNc simple brin (ADN complémentaire) à partir de l'ARN messager via une réaction de rétrotranscription.

Lorsque l'ADNc est disponible, la technique de polymerase chain reaction en temps réel (qPCR) permet de détecter de façon précise un transcrit de fusion à l'aide de couples d'amorces sélectionnés pour s'hybrider de façon spécifique sur *KIAA1549* et sur *BRAF* (**Figure 12**). Selon les méthodes décrites (30), des sondes d'hydrolyses spécifiques des différents transcrits de fusions sont également utilisées afin de marquer la zone de jonction entre les séquences correspondantes à *KIAA1549* et à *BRAF*. Ces sondes permettent ensuite lorsqu'elles sont hydrolysées de libérer de la fluorescence qui confirme la présence d'un des transcrits de fusion spécifiquement chez le patient.

Lorsqu'une méthode de qPCR simplexe est mise en œuvre, un seul couple d'amorces et une seule sonde sont affectés à un seul puit. Un même échantillon biologique est donc testé dans différents puits pour chacun des transcrits de fusion. Si une fluorescence est détectée dans l'un de ces puits, alors le patient est positif à ce transcrit de fusion.

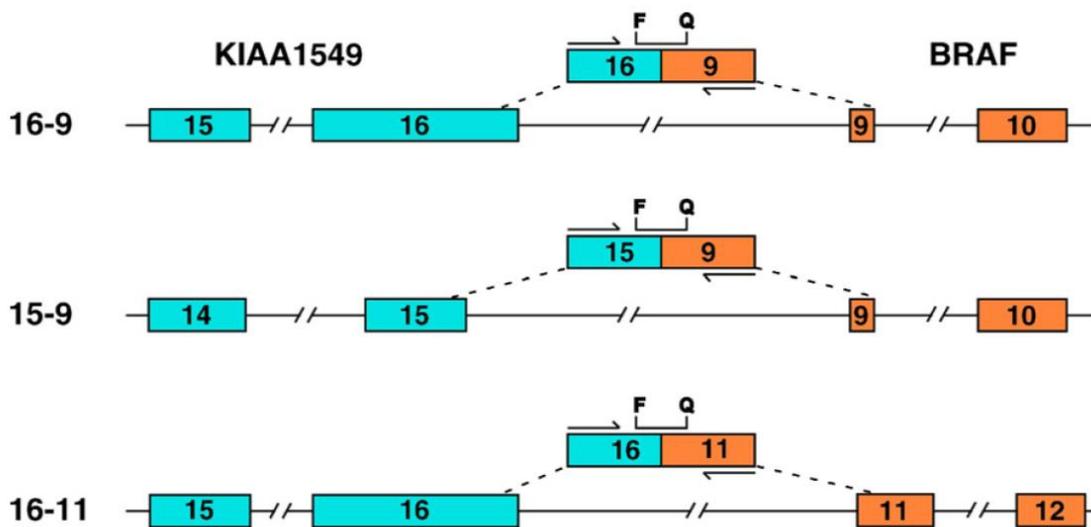
Dans le service d'anatomie et de cytologie pathologique du Centre de Biologie Est des HCL où j'ai réalisé mon stage, 4 PCR en temps réel sont mises en œuvre afin d'identifier et de distinguer les trois transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* les plus fréquents : 15-9, 16-9 et 16-11, la 4<sup>ième</sup> Q-PCR étant réalisée pour un gène de référence, *GAPDH*. En effet, la *GAPDH* est un gène universel qui est exprimé en abondance dans chaque cellule de chaque être vivant. C'est ce gène qui a été choisi au laboratoire afin de servir de gène de référence, qui permet de valider les résultats *in fine* (26).

La première étape consiste à extraire les ARNm à partir du tissu tumoral puis à synthétiser les ADNc correspondants à l'aide d'une reverse transcriptase. Pour réaliser la qPCR elle-même, l'ADNc d'un patient est introduit dans un mélange réactionnel, le « mix » de PCR qui contient les éléments essentiels à la réalisation de celle-ci (**Annexe 1**). Les amorces et les sondes marquées par un fluorochrome sont spécifiques de chaque transcrite de fusion. La technique décrite consistait à réaliser plusieurs qPCR simples, chaque qPCR permettant de détecter soit un des transcrits de fusion soit la glyceraldéhyde-phosphate déshydrogénase (*GAPDH*); un seul fluorochrome est utilisé puisque chaque amplicon est détecté dans des puits différents. Il faut donc réaliser trois milieux réactionnels différents avec les amorces et sondes permettant d'analyser pour chaque patient les trois différentes séquences correspondant aux principaux transcrits de fusion (15-9, 16-9 et 16-11) et à la *GAPDH*.

L'objectif de mon stage de 5<sup>ième</sup> année hospitalo-universitaire était d'adapter la technique de détection par qPCR simplexe existante afin de pouvoir détecter les différentes séquences et de pouvoir amplifier les amplicons des principaux transcrits de fusion et de la *GAPDH* en une seule réaction, donc de mettre au point une qPCR multiplexe. En effet, la mise au point d'une telle méthode présente de nombreux avantages : diminution de la

quantité de réactifs utilisés, diminution de la quantité d'ADNc de patient utilisée et diminution de la durée de la manipulation. Ce travail a abouti à l'article présenté dans ce document.

La qPCR est une méthode présentant une résolution de 100-500pb. Cette méthode peut être considérée comme abordable car elle ne nécessite pas de matériel dédié, rapide et présente des sensibilités et sensibilités supérieures à 90% par rapport à la méthode FISH (30). La recherche est cependant restreinte aux réarrangements qui sont connus car il est nécessaire de réaliser un design des sondes en amont (**Figure 12**).



**Figure 12 : Présentation des 3 transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* les plus fréquemment retrouvés dans les astrocytomes pycocytiques et de la position des amorces utilisées en qPCR pour les détecter.** Les amorces spécifiques de chacun des transcrits de fusion sont représentées par des flèches et les sondes liées à des fluorochromes par les intervalles FQ à la jonction de la fusion des deux gènes (30).

#### 1.2.6.5 La PCR digitale

Récemment, une technique de PCR digitale a été mise au point pour la détection des transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* (10). La PCR digitale est capable de détecter une

variation du nombre de copie entre les exons situés en 5' et les exons en 3' des points de cassures des gènes *KIAA1549* et *BRAF* suite à la duplication en tandem. Plus précisément, cette étude mesure le ratio entre le nombre de copies de l'exon 3 et l'exon 14 de *BRAF* et entre l'exon 20 et les exons 4, 14, 15 ou 16 de *KIAA1549*. Selon le numéro des exons concernés et le niveau de l'augmentation du nombre de copies de ces exons, on peut confirmer la présence d'une duplication entre les gènes et donc l'existence de transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* ainsi que le pourcentage de cellules tumorales. On ne peut cependant pas définir quels exons sont concernés spécifiquement. (10).

La PCR digitale présente une spécificité et une sensibilité de 100% par rapport à la méthode de RNAseq (10). Cette méthode est rapide et fonctionne pour détecter d'autres anomalies génétiques d'intérêt à partir de l'échantillon testé.

#### **1.2.6.6 NanoString nCounter**

Le système d'analyse nCounter développé par NanoString utilise une technologie basée sur l'utilisation de sondes nucléotidiques marquées par des codes-barres moléculaires constitués de 6 fluorochromes de 4 couleurs différentes. Chaque code barre est caractérisé par une suite de « couleurs » propre et associé à une cible spécifique correspondant à une cible d'intérêt. Une seconde sonde, dite de capture, est marquée à la biotine. Elle permet de fixer les séquences d'ADN ou d'ARN à laquelle elle s'hybride sur un support de comptage. Une analyse automatisée par caméra est ensuite réalisée pour identifier les codes-barres purifiés via leur combinaison de couleur. L'avantage de cette technique est qu'elle ne nécessite aucune enzyme ni de préparation de librairie pour une analyse. Les codes-barres permettent de rechercher et de quantifier jusqu'à 800 cibles différentes dans un même milieu réactionnel, à partir de 100ng d'ADN.

Les résultats obtenus en utilisant cette méthode sont caractérisés par une sensibilité de 97% et une spécificité de 98% par rapport à la méthode FISH (27) (27). Cependant, un investissement dans du matériel très spécifique et coûteux est requis (27).

## **1.2.7 Généralités sur la qPCR**

### **1.2.7.1 La qPCR**

Le travail de cette thèse vise à améliorer cette étape. En effet, il s'agit de modifier la qPCR simplexe utilisée par le laboratoire pour aboutir à une qPCR multiplexe afin d'optimiser les temps opératoires et les coûts liés à cette technique. Le principe d'une qPCR multiplexe est d'utiliser un set de plusieurs couples d'amorces et de sondes afin de pouvoir amplifier simultanément plusieurs amplicons au cours d'une seule réaction de PCR. Chacune des séquences d'ADN correspond à un transcrite de fusion et est reconnu par une sonde avec un fluorochrome émettant dans une longueur d'onde différente.

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique *in vitro* permettant d'amplifier l'ADN. Il s'agit donc d'une technique qui permet d'obtenir un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN déterminée au préalable. Chaque cycle de PCR peut se diviser en 3 différentes étapes :

- La dénaturation, qui permet de séparer les 2 brins constituant l'ADN. Cette étape est généralement réalisée en augmentant la température.
- L'hybridation, qui est l'étape au cours de laquelle les amorces se fixent à l'ADN, de part et d'autre de la séquence que l'on souhaite amplifier.
- L'élongation, qui permet, grâce à une ADN polymérase, la synthèse du brin d'ADN complémentaire

La répétition de ces trois étapes permet l'amplification, de manière exponentielle, de la séquence d'ADN cible.

La particularité de la PCR en temps réel (qPCR) repose sur le fait qu'elle permet le suivi de la quantité d'ADN présente dans la réaction à tout moment. Ceci est rendu possible grâce à l'usage de sondes fluorescentes, qui se fixent dans notre cas, sur une séquence d'ADN précise correspondant aux différents transcrits de fusion et à la *GAPDH*. Une sonde se compose de deux parties principales : un fluorophore (reporter) qui émet naturellement une fluorescence lorsqu'il est excité à certaines longueurs d'ondes, et un désactivateur (quencher) qui inhibe la fluorescence du fluorophore. Ainsi, tant que ces deux parties sont liées, le signal fluorescent est inhibé. Lorsque la sonde reconnaît la séquence d'ADN qui lui est spécifique (les séquences correspondant aux différents transcrits de fusion dans notre cas), elle s'hybride à l'ADN mais n'émet pas de fluorescence. C'est au cours de la phase d'élongation que le signal fluorescent va pouvoir être détecté. En effet, l'ADN polymérase élonge les amorces qui se sont liées à l'ADN pendant la phase d'hybridation et va cliver les sondes qui se trouvent sur l'ADN grâce à son activité exonucléase 5'-3'. Cela va alors libérer le reporter du quencher et provoquer l'apparition de la fluorescence.

Les séquences des sondes et amorces ainsi que les fluorochromes liés aux sondes sont les suivants (cf. **Figure 12** p.50) :

- **Pour le transcrit 15-9 :**

- Amorces sens au niveau de l'exon 15 de *KIAA1549* (15-*KIAA*) : 5' CGT CCA CAA CTC AGC CTA CA 3'

- Amorces anti-sens au niveau de l'exon 9 de *BRAF* (9-*BRAF*) : 5' CCT CCA TCA CCA CGA AAT CCT T 3'

- Une sonde au niveau de la jonction entre l'exon 15 de *KIAA1549* et l'exon 9 de *BRAF* : 5' FAM TCG GAT GCC CAG ACT TG 3'

- **Pour le transcrit 16-9 :**

- Amorces sens au niveau de l'exon 16 de *KIAA1549* (16- *KIAA*) : 5' GCC CAG ACG GCC AAC A 3'

- Amorces anti-sens au niveau de l'exon 9 de *BRAF* (9- *BRAF*) : 5' CCT CCA TCA CCA CGA AAT CCT T 3'

- Sonde au niveau de la jonction entre l'exon 16 de *KIAA1549* et l'exon 9 de *BRAF* : 5' CAL Fluor Red CCC TGC AGT GAC TTG AT 3'

- **Pour le transcrit 16-11 :**

- Amorces sens au niveau de l'exon 16 de *KIAA1549* (16- *KIAA*) : 5' GCC CAG ACG GCC AAC A 3'

- Amorces anti-sens au niveau de l'exon 11 de *BRAF* (11- *BRAF*) : 5' ATC CGA GTC CCG TCT ACC AA 3'

- Sonde au niveau de la jonction entre l'exon 16 de *KIAA1549* et l'exon 11 de *BRAF* : 5' CAL Fluor Orange CCC TGC AGT AAA ACA C 3'

- **Pour la *GAPDH* :**

- Amorces sens : 5' CAT CCA TGA CAA CTT TGG TAT CGT 3'

- Amorces anti-sens : 5' GGG TGG CAG TGA TGG CAT 3'

- Sonde : 5' Quasar ACT CAT GAC CAC AGT CC 3'

### 1.2.7.2 Compensation de couleur

Il a tout d'abord fallu réaliser une compensation de couleur (CCC) pour que le système optique du Light Cycler 480 (Roche) puisse distinguer les différentes longueurs d'ondes de fluorescences émises par les quatre fluorochromes que nous avons utilisés dans la technique multiplexe et qui sont présentés ci-dessous dans le **Tableau 3**.

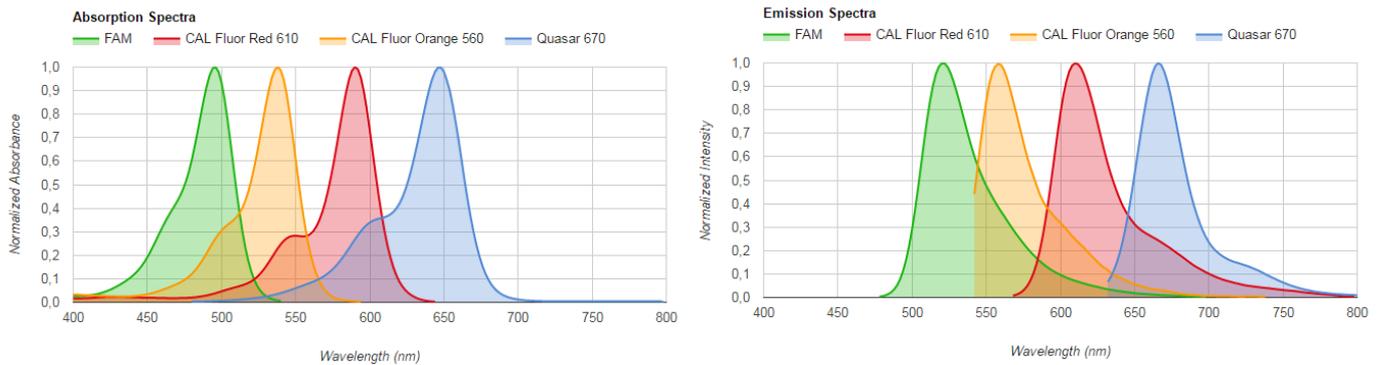
**Tableau 3 : Longueurs d'onde d'absorbance et d'émission des fluorochromes des différentes sondes utilisées dans le cadre de la recherche des transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* par qPCR multiplexe.**

Fluorophore	$\lambda$ absorbance maximum	$\lambda$ émission maximum
<i>Sondes utilisées dans l'article</i>		
FAM	490 nm	530 nm
CAL Fluor Orange 560	540 nm	560 nm
CAL Fluor Red 610	585 nm	610 nm
Quasar 670	645 nm	670 nm
<i>Autres sondes testées</i>		
JUN	533 nm	610 nm
CY5	645 nm	660 nm

En effet, malgré des longueurs d'ondes maximales d'émission et d'absorption distinctes pour chaque fluorochrome (**Tableau 3**), chacun des fluorochromes possède un spectre large d'émission comme nous pouvons le voir sur la **Figure 13**. C'est pourquoi il est nécessaire de réaliser une compensation de couleur afin de permettre au système optique du Light Cycler 480 de distinguer les signaux émis par chaque fluorochrome. Ce réglage permet de définir les paramètres d'acquisition de la fluorescence émise par chaque fluorochrome de façon à acquérir des signaux distincts les uns des autres et à s'affranchir des « bords » des spectres qui fausseraient les résultats.

Le principe de la compensation consiste à mesurer à différentes longueurs d'onde, l'intensité de fluorescence de chacun des fluorochromes de façon séparée afin de pouvoir déterminer dans le signal mesuré la part relative à chacun des fluorochromes lorsque ceux-ci sont mélangés.

SPECTRAL OVERLAY CHARTS



**Figure 13 : Spectre d'absorption et d'émission des fluorochromes des sondes *KIAA1549-BRAF* utilisées dans la méthode multiplexe développée au laboratoire.** On remarque que ces fluorochromes possèdent des pics de fluorescences distincts mais des spectres d'émissions et absorptions larges qui se chevauchent.

Dans le cadre de notre étude, nous avons réalisé plusieurs essais de compensations de couleurs en utilisant différents « jeux » de fluorochromes :

- Des calibrateurs commerciaux achetés auprès de Biosearch Technologies. Des réplicats de chacun des calibrateurs correspondant à chacun des quatre fluorochromes et des réplicats de blancs ont été réalisés pour mener à bien cette compensation de couleur.
- Les sondes achetées auprès de Biosearch Technologies utilisées dans l'article. Les couples sondes-amorces ont été utilisées avec des contrôles positifs et un mix dans les conditions normales de qPCR. Des réplicats de chacun des contrôles positifs correspondant à chacun des quatre fluorochromes et les réplicats de blancs ont été réalisés pour mener à bien cette compensation de couleur.

- Des sondes achetées auprès de ThermoFisher marquées avec des fluorochromes différents de ceux utilisés dans l'article. Les réplicats de chacun des contrôles positifs correspondant à chacun des quatre fluorochromes et les réplicats de blancs ont été réalisés pour mener à bien cette compensation de couleur.

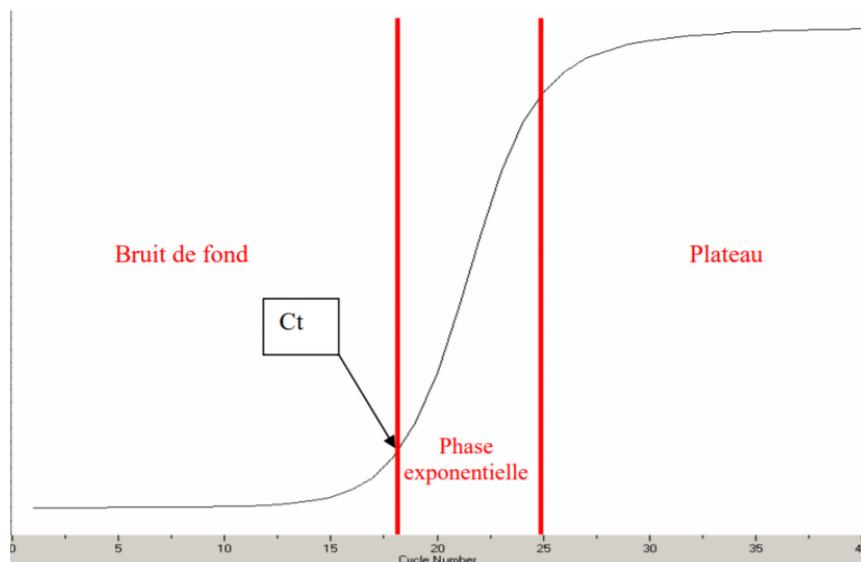
Les fluorochromes que nous avons utilisés étaient couplés aux sondes suivantes :

- La sonde 15-9 était marquée avec un fluorochrome FAM (490 ;530)
- La sonde 16-9 était marquée avec un fluorochrome JUN (533 ; 610)
- La sonde 16-11 était marquée avec un fluorochrome CAL FLUOR Orange (540 ;560)
- La sonde GAPDH était marquée avec un fluorochrome CY5 (645 ;660)

### **1.2.7.3 Calcul des cycles seuils (Cycles threshold = Ct)**

Lors de la réalisation d'une PCR quantitative en temps réel, les données de fluorescence sont enregistrées à chaque cycle de la PCR et sont proportionnelles à l'amplification de la cible à cet instant. Plus l'échantillon est concentré en molécules cibles initialement, moins le nombre de cycles nécessaires pour atteindre un point pour lequel le signal fluorescent est significativement supérieur au bruit de fond sera élevé. Ce point est défini comme le cycle seuil ou threshold cycle (Ct) et apparaît en début de phase exponentielle (**Figure 14**). Ce concept de Ct est le prérequis de la précision et de la reproductibilité de la technique. Si l'on suit la fluorescence au cours du temps d'une PCR en temps réel, on identifie l'accroissement de la fluorescence détectée et donc de la quantité de fragments issus de la PCR en 3 phases successives détaillées ci-dessous :

- Phase de bruit de fond : La quantité de fragments amplifiée est trop faible pour engendrer un signal fluorescent supérieur au bruit de fond.
- Phase exponentielle : La quantité de fragments amplifiés génère un signal fluorescent dépassant le seuil de détection de l'appareil. Pendant cette phase le nombre de produits amplifiés double à chaque cycle.
- Phase de plateau (ou de saturation) : certains composants de la réaction (comme la quantité d'enzyme) deviennent limitants. Le système ne permet plus une amplification exponentielle (34)



**Figure 14 : Les différentes phases de la qPCR. Le Ct est matérialisé au niveau de la flèche. (34)**

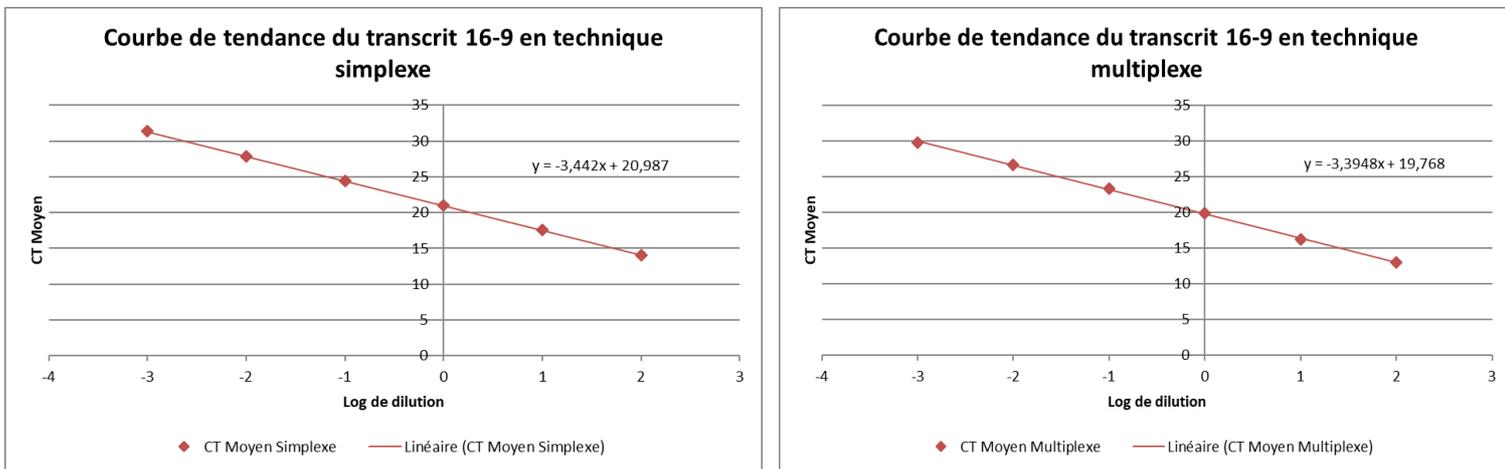
#### 1.2.7.4 Calcul de l'efficacité

L'efficacité de la PCR a été déterminée à partir de la pente de la droite de régression logarithmique du Ct en fonction de la concentration de la dilution utilisée selon la formule (35) :

$$Efficacité = \frac{-1}{Pente}$$

De façon à rendre possible le calcul de l'efficacité des deux méthodes, une gamme de dilution à partir des témoins positifs a été effectuée afin de pouvoir tracer la courbe de tendance pour la détection de chacun des transcrits et de la *GAPDH* en technique simplexe et multiplexe. La gamme de dilution réalisée se compose de dilutions allant de  $10^2$  ng/ $\mu$ L d'ADNc à  $10^{-3}$  ng/ $\mu$ L d'ADNc et le facteur de dilution utilisé est de 10.

La **Figure 15** montre la droite de régression logarithmique ainsi que son équation, obtenues lors de la représentation des Ct en fonction de la concentration de la dilution pour



le transcrit 16-9 en qPCR simplexe et multiplexe.

**Figure 15 : Représentation des CT en fonction de la dilution pour le transcrit de fusion 16-9**

## 2 Article

### **A multiplex PCR assay for the detection of *KIAA1549-BRAF* Fusion Transcripts in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Pediatric Low-Grade Gliomas**

David Bret 1,2

Valentin Chappuis 1,2

Delphine Poncet 1, 2

François Ducray 2, 4, 5

Karen Silva 3

Fabrice Mion 1

Alexandre Vasiljevic 2,3

Carole Ferraro-Peyret 1, 2

Carmine Mottolese 6

Pierre Leblond 7,

Didier Frappaz 7

Nathalie Streichenberger 2,3

David Meyronet 2, 3, 5

Pierre-Paul Bringuier 1, 2

Marc Barritault 1, 2, 5 ; marc.barritault@chu-lyon.fr ; +33(0)4.27.85.62.34 ; ORCID 0000-

0003-3311-4058 ;

(1) Hospices Civils de Lyon, Groupement Hospitalier Est, Service de Cytologie et d'Anatomie Pathologique, Département de Biopathologie Moléculaire, 59 Boulevard Pinel, 69394, Lyon, Cedex, France.

(2) Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France

(3) Hospices Civils de Lyon, Groupement Hospitalier Est, Service de Cytologie et d'Anatomie Pathologique, Département de Neuropathologie, 59 Bvd Pinel, 69394, Lyon, Cedex, France.

(4) Hospices Civils de Lyon, Hôpital Neurologique, Service de Neuro-oncologie, 59 Bvd Pinel, 69394, Lyon, Cedex, France.

(5) Department of Cancer Cell Plasticity, Cancer Research Centre of Lyon, INSERM U1052, CNRS UMR 5286, Lyon, France.

(6) Department of Neurosurgery, Hospital Wertheimer, Bron, France

(7) Department of Oncology, Institut d'Hématologie et d'Oncologie Pédiatrique, Lyon, France.

## **Abstract**

Genomic duplications and fusion involving *BRAF* and *KIAA1549* that create fusion proteins with constitutive *BRAF* kinase activity are a hallmark of pilocytic astrocytomas. Indeed, the detection of *KIAA1549-BRAF* fusion transcripts is of paramount importance to classify these tumors and to identify patients who could benefit from *BRAF* inhibitors. In a

clinical setting, the available material for molecular analysis from these pediatric tumors is often limited to formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue. Currently the gold standard method to identify *KIAA1549-BRAF* fusion transcripts is the RNAseq that is far from being implemented in all routine laboratories yet and that can be difficult to perform on low-quality FFPE samples. The three most frequent *KIAA1549-BRAF* fusion transcripts: *KIAA1549-BRAF*: 15-9, 16-11 and 16-9 represent up to 95% of *KIAA1549-BRAF* fusion transcripts which are detected in 70% of pilocytic astrocytomas (PAs) using for example a singleplex qPCR assay. The aim of the present study was to develop a cost-effective multiplex qPCR FFPE-compatible assay to detect these *KIAA1549-BRAF* fusion transcripts. We compared performance of the assay to the ongoing singleplex method on a collection of 52 low-grade pediatric PAs. The results showed that the 2 methods are comparable. The multiplex method had 97% sensitivity and 100% specificity compared to the singleplex method, and agreement between the two techniques was almost perfect (Cohen's kappa: 0.96). The qPCR efficiency was slightly higher in the multiplex technique than in the singleplex for all the fusion transcripts and for *GAPDH*. It consumed four times less cDNA, cost less, and required twice less hands-on technical time showing that it could be beneficial to implement it in a clinical setting.

## Introduction

Pediatric brain tumors are the second most frequent childhood malignancy occurring after leukemia. Despite advances in chemotherapy, radiotherapy surgery and supportive care management, brain tumors remain one of the main causes of cancer-related death in children <sup>1</sup>. Pilocytic astrocytomas (PAs) are a group of relatively benign (WHO grade I) slow-growing and well demarcated glial tumors <sup>2</sup> with a 10-year survival greater than 90%

<sup>3</sup>. PAs represent 5.4% of all gliomas and they are more common during the first two decades of life; they are the most frequent central nervous system tumor in children (18.0% among patients <14 years of age) <sup>4</sup>. In addition, PAs are the most frequent gliomas in children without significant sex predilection <sup>5</sup>. This tumor affects different central nervous system (CNS) locations. Mostly situated in the cerebellum and cerebral midline structures (optic pathways, brain stem or hypothalamus), they can also be located anywhere else in the neuraxis <sup>6</sup>.

PAs are gliomas characterized by the presence of mutations in genes coding for proteins involved in the mitogen-activated protein kinases (MAPK) pathway <sup>7,8</sup>. The 2 Mb tandem duplication of 7q34 is the most common genetic alteration leading to PAs <sup>9</sup>, it is present in more than 70% of PAs <sup>5</sup>. The N-terminal regulating region of *BRAF* is replaced by the N-terminal part of *KIAA1549*. Without this regulatory part, the *BRAF* kinase domain is uncontrolled and the MAPK pathway is constitutively activated <sup>10,11</sup>. This duplication results in the presence of oncogenic *BRAF* fusion proteins due to the fusion between the *KIAA1549* and the *BRAF* genes. The gene fusion can combine different exons of *KIAA1549* and *BRAF* resulting in numerous fusion transcripts rendering their detection difficult in a single experiment <sup>5</sup>. Dominant break points were related between *KIAA1549* exon 16 with *BRAF* exon 9 (16–9) in 60% of the cases, *KIAA1549* exon 15 with *BRAF* exon 9 (15–9) in 25% of the cases and *KIAA1549* exon 16 with *BRAF* exon 11 (16–11) in 10-15% of the cases (11). Other fusion sites exist but are less common and account for less than 10% of the cases <sup>12,13</sup>.

Even if they are slow growing and relatively benign tumors, the decisive diagnosis of PA is important to differentiate PAs from other more aggressive diffuse gliomas like astrocytomas with higher WHO grade or glioblastoma (WHO grade IV) <sup>14,15</sup>. In fact,

because of similar midline location and pathological aspects, it can be difficult on some biopsies to differentiate PAs from diffuse, higher grade gliomas. Indeed, H3K28M mutant gliomas are now considered as grade IV but this mutation is only found in a small subset of midline gliomas <sup>14</sup>. Furthermore, gangliogliomas, mixed glial and neuronal tumors may include cell types resembling PAs, eosinophilic granular bodies and Rosenthal fibers. *BRAF* V600E mutation occurs in 20 to 60% of these tumors that in some cases are anaplastic, grade III <sup>2</sup>.

Various methods are used to detect *KIAA1549-BRAF* fusion transcripts such as RNAseq, which is the gold standard in fresh frozen material <sup>3</sup>, fluorescence in situ hybridization (FISH) <sup>16-18</sup>, array comparative genomic hybridization (CGH) <sup>19</sup>, and western blot <sup>20</sup>. Recently, Nanostring nCounter System and droplet digital PCR (ddPCR) were used to perform a multiplex detection of pediatric low grade glioma fusion transcripts and duplications <sup>21,22</sup> but those methods require dedicated and expensive equipment. On formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue samples, previous publications describe a singleplex quantitative polymerase chain reaction (qPCR) with sensitivity and specificity exceeding 90% that has since then being routinely used <sup>8,17,23</sup>.

The aim of this project was to develop a new method to detect *KIAA1549-BRAF* fusion transcripts using a multiplex quantitative polymerase chain reaction (qPCR). We assessed the diagnostic performances and cost-effectiveness characteristics of this new method compared to the singleplex method.

## Materials and methods

### *Patients and tissues specimens*

Fifty-two FFPE tissue samples from patients diagnosed with a PA and reviewed by the national neuropathology boards GENOP and RENOCLIP 24 were selected for the study. Patients were ongoing surgery from November 2013 to July 2018. Their tumor samples were retrieved from the archives of the Lyon teaching hospitals neuropathology department (Centre de Pathologie Est, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France). All the specimens were acquired in accordance with the French ethical rules. The blocks were FFPEs stored at room temperature and all samples were macro dissected to contain at least 30% of cancer cells.

### *RNA isolation from FFPE samples and Reverse Transcription-PCR (RT-PCR) process*

Paraffin removal was performed by incubating the samples in increasing concentrations of methyl (50%, 70%, and 100%) for 5 minutes followed by three decreasing concentrations of ethanol (100%, 70%, and 50%) for 5 minutes. RNA extraction was performed using QIAGEN RNeasy FFPE kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Qualification of the extracted RNA and concentration measurement was performed using a NanoDrop One microvolume UV-Vis spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA; ref: ND-ONE-W).

The cDNA synthesis was carried out using the QIAGEN RNA Reverse Transcription Kit (20  $\mu$ L final volume) and random hexamers (Qiagen GmbH, Hilden, Germany; ref: 205313) using 500 ng RNA whenever possible or 12  $\mu$ L of RNA if concentration was less

than 42 ng/μL.

RNA extraction and cDNA synthesis were conducted in the same way for both singleplex and multiplex qPCR; only the final step differed between the two methods. It was therefore not possible to test both techniques in parallel, but they were performed as close as possible but not exactly in parallel.

### *Singleplex qPCR*

The singleplex qPCR method is described by Tian *et al.* <sup>23</sup>; it is based on the detection of the three most frequent *KIAA1549-BRAF* fusion transcripts (15-9, 16-9, and 16-11) through a singleplex qPCR using fluorescent hydrolysis probes bound to a 5-carboxyfluorescein (FAM) fluorochrome at the 5' end and non-fluorescent quenching (NFQ) combined with a minor groove binder (MGB) at the 3' end. Herein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) was used as the reference gene for the PCR reaction. High performance liquid chromatography (HPLC)-purified primers were purchased from Eurofins Genomics (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany) and probes from Thermo Fisher Scientific (ref: 4316034). Sequences of primers and probes used are described in Table 1.

### *Multiplex qPCR*

The hydrolysis probes sequences were the same as the singleplex qPCR except for *GAPDH*, for which a new probe was designed (Table 1). The probes were labeled with FAM, CAL Fluor Orange 560, CAL Fluor Red 610, and Quasar 670 for *KIAA1549-BRAF* fusion transcripts 15-9, 16-11, 16-9 fusion transcripts and *GAPDH*, respectively. Probes and *GAPDH* primers were purchased from Biosearch Technologies (Petaluma, CA, USA).

**Table 1:** Primer and probe sequences used for the multiplex analysis of *KIAA1549-BRAF* transcripts

Assay	Sequence	size (bp)	maximal $\lambda$ absorption; $\lambda$ emission
<b>15-9</b>			
Probe	5' FAM TCG GAT GCC CAG ACT TG 3'		465; 510
Forward	5' CGT CCA CAA CTC AGC CTA CA 3'	68	
Reverse	5' CCT CCA TCA CCA CGA AAT CCT T 3'		
<b>16-11</b>			
Probe	5' CAL Fluor Orange 560 CCC TGC AGT AAA ACA C 3'		533; 580
Forward	5' GCC CAG ACG GCC AAC A 3'	53	
Reverse	5' ACT CGA GTC CCG TCT ACC AA 3'		
<b>16-9</b>			
Probe	5' CAL Fluor Red 610 CCC TGC AGT GAC TTG AT 3'		533; 610
Forward	5' GCC CAG ACG GCC AAC A 3'	64	
Reverse	5' CCT CCA TCA CCA CGA AAT CCT T 3'		
<b>GAPDH</b>			
Probe	5'Quasar 670 ACTCATGACCACAGTCC 3'		618; 660
Forward	5' CATCCATGACAACCTTTGGTATCGT 3'	93	
Reverse	5' GGG TGG CAG TGA TGG CAT 3'		

### *PCR settings*

Primers were used at a final concentration of 0.9  $\mu$ mol/L and probes at 0.25  $\mu$ mol/L in a final volume of 20  $\mu$ L containing 10  $\mu$ L of 2X ABsolute qPCR mix (Thermo Fisher Scientific; ref: AB1133A) and 1 $\mu$ L of cDNA for both singleplex and multiplex qPCR. qPCR performed using a Light Cycler 480 II instrument (Life Sciences, Roche Applied Science, Branford, CT, USA; ref: 05015278001), and under the following conditions for

both singleplex and multiplex qPCR: 95°C for 15 minutes, then 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute for 50 cycles, and finally 37°C for 10 seconds. Fluorescence was recorded and cycle threshold ( $C_T$ ) were calculated by the Roche Light Cycler 480 Software using the second derivative maximum method <sup>25</sup>.

### *Data acquisition and interpretation*

A no-template negative control was added at each step (RNA extraction, RT-PCR, and qPCR) and experiments were validated only when all three negative controls showed an absence in signal amplification. Specimens were run in triplicate and the mean of replicates was then used as a single value for the  $C_T$  analysis. Samples presenting *GAPDH*  $C_T > 40$ , were considered as non-amplifiable, and were classified as inconclusive. For the three *KIAA1549-BRAF* fusion transcripts and the *GAPDH*, the qPCR efficiencies of the singleplex and multiplex techniques were obtained by analyzing six successive 1:10 dilutions of positive controls and calculated according to the recommendations of Tichopad *et al.* (2003) <sup>26</sup>.

### *Data analysis*

Results were classified as true positive (TP), true negative (TN), false positive (FP), or false negative (FN), and accordingly specificity, sensitivity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) were calculated. Concordance was estimated using Cohen's Kappa coefficient as follows <sup>27</sup>:

$$\kappa = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e} \text{ where } P_o = \frac{TP + TN}{TP + TN + FP + FN} \text{ and } P_e = \frac{(TP + FN)(TP + FP) + (TN + FN)(TN + TP)}{(TP + TN + FP + FN)^2}.$$

Correlations, linear regressions and slope determinations were performed with Microsoft excel tool.

The proportions of three main *KIAA1549-BRAF* fusion transcripts observed herein were compared to that observed in the study reported by Jones *et al.*<sup>11</sup> using the Pearson's Chi-squared test and R software (v3.4.3).

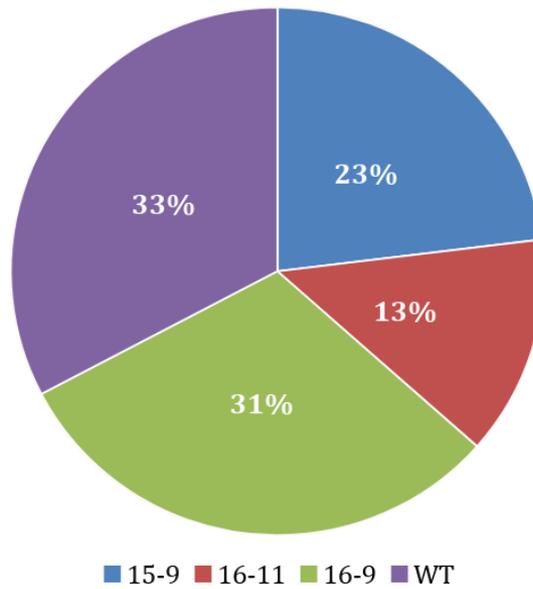
## Results

### *Study population*

Among the 82 low-grade PAs in patients who had undergone biopsy or surgery between 2013 and 2018, there was a sufficient quantity of material for 52 (63%) samples that were included in the present study. After extraction RNA quality and quantity was variable between samples; the median RNA concentration was 125 ng/ $\mu$ L (range: 4.4-2361 ng/ $\mu$ L), the mean 260/280 nm ratio was 1.9 (range: 1.5-3.1) and the mean 260/230 nm ratio was 1.7 (range: 0.2-2.3).

### *Frequency of KIAA1549-BRAF fusions as determined by singleplex qPCR*

Using the singleplex technique, 12 samples (23%) were found to have a *KIAA1549-BRAF* 15-9 fusion transcript, 16 (31%) with 16-9, 7 (13%) with 16-11, and 17 (33%) without (Figure 1 and Table 2). Compared to the relative proportions reported by Jones *et al.*: (16% of 15-9; 5% of 16-11; 46% of 16-9 and 34% of wild-type – WT) no significant difference was observed ( $p = 0.2$ ). The results and mean  $C_T$  for each sample are presented in Table 3. The qPCR efficiency of the singleplex method was 1.97 for the 15-9 *KIAA1549-BRAF* fusion transcript, 1.95 for both the 16-9 and the 16-11 fusion transcripts, and 1.98 for the *GAPDH*.



**Figure 1:** Distribution of *KIAA1549-BRAF* fusion transcripts in the 52 samples used to compare singleplex *versus* multiplex methods.

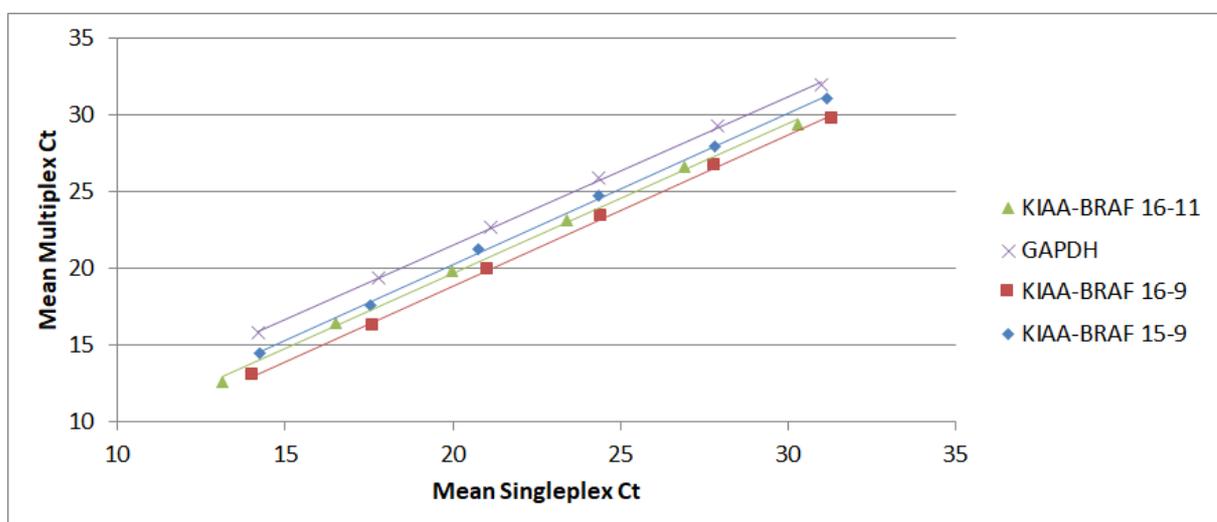
*Frequency of KIAA1549-BRAF fusions as determined by multiplex qPCR.*

**Table 2:** Identification of *KIAA1549-BRAF* fusion transcripts by the two tested methods.

		Simplex			
		15-9	16-9	16-11	WT
Multiplex	15-9	12			
	16-9		15		
	16-11			7	
	WT		1		17

Using the multiplex technique, 12 samples (23%) were found to have a *KIAA1549-BRAF* 15-9 fusion transcript, 15 (29%) with 16-9, 7 (13%) with 16-11, and 18 (35%) without (Table 2). Compared to singleplex, only 1 out of the 52 PAs tested in multiplex samples was discordant; it was found to have *KIAA1549-BRAF* 16-9 fusion transcript by singleplex but was found to be negative in multiplex. The mean  $C_T$  was high (39.88) and the extracted

RNA concentration was low (9.7 ng/ $\mu$ L). The qPCR efficiency of the multiplex method was 1.99, 1.97, 1.98, and 2.02 for the 15-9, 16-9, and 16-11 *KIAA1549-BRAF* fusion transcripts and *GAPDH* respectively. Taking singleplex technique as the gold standard, the sensitivity of the multiplex technique was 97%, specificity was 100%, positive predictive value was 100%, and negative predictive value was 0.94%. The Kappa coefficient was 0.96. A plot comparing the  $C_T$ s obtained during efficiencies determinations is available in Figure 2 and shows correlations between values superior to  $R^2=0.99$ .



**Figure 2:** Plot comparing the mean  $C_t$  of technical triplicate for singleplex vs multiplex of the serial dilutions. For each target gene, the linear regression curve is presented.

### *Cost-efficiency, sample and reagent consumption*

For example, in the case of an assay involving 3 patients, the consumption of qPCR master mix and primers in the multiplex qPCR technique were respectively 4.3 and 3.6 times less than in the singleplex technique. However, the consumption of probes remained identical. The multiplex assay consumed 3  $\mu$ L (1  $\mu$ L per replicate) of cDNA sample instead of 12  $\mu$ L (4  $\mu$ L per replicate) per sample for the singleplex technique out of the 20 $\mu$ L available after the RT-PCR. In average, to perform the singleplex qPCR technique, about twice of hand-

on manipulation time were necessary. The instrument reaction time in the Light Cycler 480 was 50 minutes for both technics. When working with 96 well plates, only 6 samples could be analyzed simultaneously whereas up to 26 samples could fit on a multiplex run (see supplementary table 1).

**Table 3:** Description of the DNA quality and amplification obtained using singleplex or multiplex methods.

Sample	RNA Concentration (ng/ $\mu$ L)			Singleplex		Multiplex	
		260/280 nm ratio	260/230 nm ratio	Mean target Ct	Mean <i>GAPDH</i> Ct	Mean target Ct	Mean <i>GAPDH</i> Ct
<i>KIAA1549-BRAF-15-9</i> (n=12)							
1	1365,1	1,8	2,3	38,3	29,9	36,3	29,7
2	63,6	1,6	0,8	38,9	31,4	37,4	30,7
3	51,4	1,9	1,6	39,7	38,3	37,7	30,7
4	24,0	1,8	1,6	39,0	34,4	37,7	32,0
5	26,6	1,8	1,2	38,7	33,0	37,8	31,8
6	80,0	1,5	0,8	39,7	35,7	38,1	32,9
7	54,0	2,0	2,1	40,0	32,0	36,6	30,8
8	21,1	2,0	1,8	37,5	27,3	37,3	28,5
9	81,4	2,0	1,7	38,4	31,3	37,0	30,5
10	66,7	1,9	1,8	37,7	29,8	36,6	29,1
11	59,3	1,9	1,7	36,8	29,9	35,3	29,9
12	59,3	1,9	1,7	37,8	30,7	36,0	29,1
<i>KIAA1549-BRAF -16-11</i> (n=7)							
13	2361,2	1,8	2,3	35,1	29,7	35,3	28,1
14	98,7	1,9	1,4	35,5	30,4	33,6	29,5
15	18,1	2,2	1,9	38,8	32,1	34,9	31,0
16	54,6	2,0	2,2	35,0	31,1	33,5	29,7
17	26,2	2,0	1,6	35,6	31,0	33,7	29,7

18	26,2	2,0	1,6	36,4	30,8	34,2	29,8
19	38,0	1,9	1,8	37,9	35,0	34,7	32,8
<i>KIAA1549-BRAF -16-9 (n=16)</i>							
20	165,7	1,9	1,9	38,8	34,0	36,3	31,6
21	179,7	2,0	2,0	36,5	30,7	35,2	29,1
22	26,6	1,9	1,5	38,8	33,2	35,5	31,3
23	15,5	2,1	0,2	37,1	25,5	34,3	24,6
24	61,0	1,9	1,5	39,5	33,4	35,6	32,0
25	19,4	2,0	1,8	39,8	34,2	35,5	31,8
26	9,7	1,6	0,9	39,8	38,9	Undet.	33,9
27	22,3	2,0	1,6	39,3	34,1	34,9	32,4
28	68,7	2,0	1,9	39,9	32,4	35,9	31,0
29	164,1	2,0	2,1	39,4	32,5	35,0	31,3
30	68,0	1,9	1,8	37,4	30,5	35,1	29,9
31	68,0	1,9	1,8	38,6	30,6	35,4	29,2
32	81,5	2,0	1,9	37,8	30,4	35,2	29,9
33	93,5	2,0	1,9	37,9	30,8	35,1	29,8
34	93,5	2,0	1,9	39,4	30,8	37,8	28,3
35	23,3	1,8	1,6	35,3	28,7	33,9	28,3
WT (n=17)							
36	66,7	1,9	1,5		25,1		24,8
37	33,5	1,8	1,4		30,1		29,4
38	46,2	2,0	1,7		31,9		30,9
39	66,7	1,9	1,5		26,2		25,6
40	19,2	1,9	1,0		34,6		32,0
41	46,2	2,0	1,7		30,5		29,2
42	4,4	2,7	0,8		38,8		34,3
43	15,4	2,1	1,7		32,2		30,6
44	12,8	1,8	0,8		35,3		32,6
45	22,4	2,1	2,0		34,7		32,9
46	11,2	1,6	0,9		33,3		31,8

47	22,9	2,1	2,0	33,5	31,9
48	40,2	2,0	1,8	29,2	28,0
49	141,9	1,8	1,4	29,1	28,8
50	21,5	1,9	1,6	34,2	32,2
51	13,8	2,1	1,4	35,6	32,7
52	5,5	3,1	1,4	31,9	30,8

## Discussion

The multiplex qPCR technique, out of the 52 samples we tested, we had 12 (23%) samples diagnosed with a *KIAA1549-BRAF* 15-9 fusion transcript, 15 (29%) with 16-9, 7 (13%) with 16-11 and 17 (33%) without (Table 2). We had only one discordant result between the two technics.

The proportion of fusion transcripts included did not perfectly match the reported prevalence but seemed close enough to allow the comparison. Indeed, the null hypothesis that there were no significant differences between the proportions of our samples and the ones reported by Jones et al. was not rejected with a p-value of 0.2<sup>11</sup>.

Singleplex qPCR is a simple tool to set up, suitable for low quality and quantity samples. Interestingly, only 6 samples showed *GAPDH*  $C_T > 35$  in the singleplex assay. Out of these, five showed low RNA concentrations (<15 ng/ $\mu$ l) or low 260/230 nm ratios (<0.9). In half of these samples no fusion transcripts could be identified suggesting, that when *GAPDH*  $C_T > 35$ , the absence of a *KIAA1549-BRAF* fusion transcript should not be interpreted as a negative result but rather as an inconclusive sample. Compared to original description of the singleplex technique, all samples were analyzed regardless of their RNA quality and quantity.

The comparison between the results of the singleplex and the multiplex techniques showed that there was only one sample with discordant result. This sample which was diagnosed with the 16-9 transcript fusion transcript in singleplex and was diagnosed as WT in multiplex. This sample mean  $C_T$  was high and had a low RNA concentration. Unfortunately, we didn't have enough material to perform the analysis of this sample a second time to confirm the diagnosis.

The efficiencies were similar between the two techniques and they were slightly higher in the multiplex than the singleplex method. The linearity between the  $C_T$  acquired during the efficiency's determination in singleplex and multiplex presented a coefficient of determination  $R^2 > 0.99$  for all of the three *KIAA1549-BRAF* fusion transcripts and the *GAPDH*. These results are in favor of a good reproducibility between techniques. However, the  $C_T$ s obtained for efficiencies comparison were slightly greater in the multiplex technique for 15-9 and 16-11 fusion transcripts (0.5 and 0.1 respectively), it could lead to a slightly lower sensitivity in samples presenting low quantities of transcripts.

The sensitivity and specificity of the multiplex technique compared to the singleplex is compatible for the diagnosis applications this technique was designed for. This technique seems to fit the requirements for qualitative diagnosis applications. With a Cohen's kappa of 0.96, agreement between the two techniques is almost perfect<sup>28</sup>.

Importantly, by combining *GAPDH* and *KIAA1549-BRAF* fusion transcripts in a single assay, we could ascertain the presence of amplifiable cDNA in each well, thus increasing quality control when analyzing results and opening also the way to improved normalization. One possible evolution of the multiplex assay described herein could be to add other probes in order to detect the remaining rare *KIAA1549-BRAF* fusion transcripts

(15-11, 17-10, 11-11, 18-10, 19-9, and 16-10) that cannot be currently detected. Few routine laboratories own qPCR instrument with enough fluorescence possibilities, which only the latest generations offer. An alternative would be the development of similar tests regrouping other uncommon *KIAA1549-BRAF* fusion transcripts, three at a time, in order to test negative specimens for the most frequent transcripts sequentially. Even if the settings of the singleplex technique is easier and quicker than the multiplex one, this technique is time and sample consuming because of the repetition of each of the test required to detect the three *KIAA1549-BRAF* fusion transcripts and the *GAPDH*. Owing to the generalization of the qPCR devices supporting multiplex settings, it seemed to be interesting to develop a multiplex qPCR technique sparing the precious materials that can allow to perform other analysis when required.

Other methods have been recently developed such as Nanostring nCounter System and Droplet Digital PCR to perform a detection of pediatric low grade glioma fusion transcripts and duplications<sup>21,22</sup>. These techniques have shown encouraging results but they require expensive devices to be implemented. Moreover, even if the Droplet Digital PCR is able to detect all the *KIAA1549-BRAF* fusion transcripts, it is not possible to determine specifically the fusion transcript.

## **Conclusion**

Here we propose a new multiplex technic for the detection of the three most frequent *KIAA1549-BRAF* fusion transcripts, showing equal analytical performance as the singleplex technic. The multiplex technique allows increased throughput, better cost-efficiency and more importantly sparing the use of precious samples. Likewise, the combination of *GAPDH* and *KIAA1549-BRAF* fusion transcripts in a single assay could

ascertain the presence of amplifiable cDNA in each well, thus increasing quality control when analyzing results and opening also the way to improved normalization whenever necessary. This multiplex qPCR assay should be considered as the first, efficient and affordable step in the diagnosis process for PAs. In case of the absence of frequent transcript fusion detection of and of a clinical need, further analysis looking for rare *KIAA1549-BRAF* fusion transcripts should eventually be performed.

## **Acknowledgments**

CRB

INCa pathology networks : RENOCLIP and GENOCLIP

Grants : Cassandra Association

DRCI

Laboratory technicians of HCL

Biogenet

## **Conflicts of interest**

None

## **References**

1. Taha H, Yehia M, Mahmoud M, El-Beltagy M, Ghabriel M, El-Naggar S. Incidence of *kiaa1549-braf* fusion gene in Egyptian pediatric low grade glioma. Clin Transl Med. 2015 Dec;4(1).

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* [Internet]. 2016 Jun 9 [cited 2018 Jun 11];131(6):803–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27157931>
3. Collins VP, Jones DTW, Giannini C. Pilocytic astrocytoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol*. 2015 Jun;129(6):775–88.
4. Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, Liu M, Blanda R, Kromer C, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro Oncol*. 2015 Oct;17(suppl 4):iv1-iv62.
5. Weltgesundheitsorganisation. WHO classification of tumours of the central nervous system. Revised 4th. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, editors. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2016. 408 p. (World Health Organization classification of tumours).
6. Ichimura K, Nishikawa R, Matsutani M. Molecular markers in pediatric neuro-oncology. *Neuro Oncol*. 2012 Sep;14(suppl 4):iv90-iv99.
7. Jones DTW, Hutter B, Jäger N, Korshunov A, Kool M, Warnatz H-J, et al. Recurrent somatic alterations of FGFR1 and NTRK2 in pilocytic astrocytoma. *Nat Genet*. 2013 Aug;45(8):927–32.
8. Horbinski C. To BRAF or not to BRAF: is that even a question anymore? *J Neuropathol Exp Neurol*. 2013;72(1):2–7.
9. Venneti S, Huse JT. The Evolving Molecular Genetics of Low-grade Glioma: *Adv Anat Pathol*. 2015 Mar;22(2):94–101.

10. Pfister S, Janzarik WG, Remke M, Ernst A, Werft W, Becker N, et al. BRAF gene duplication constitutes a mechanism of MAPK pathway activation in low-grade astrocytomas. *J Clin Invest*. 2008 May;118(5):1739–49.
11. Jones DTW, Kocialkowski S, Liu L, Pearson DM, Bäcklund LM, Ichimura K, et al. Tandem duplication producing a novel oncogenic BRAF fusion gene defines the majority of pilocytic astrocytomas. *Cancer Res* [Internet]. 2008 Nov 1 [cited 2018 Mar 5];68(21):8673–7. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-08-2097>
12. Lin A, Rodriguez FJ, Karajannis MA, Williams SC, Legault G, Zagzag D, et al. BRAF alterations in primary glial and glioneuronal neoplasms of the central nervous system with identification of 2 novel KIAA1549:BRAF fusion variants. *J Neuropathol Exp Neurol* [Internet]. 2012 Jan;71(1):66–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22157620>
13. Dahiya S, Yu J, Kaul A, Leonard JR, Gutmann DH. Novel BRAF Alteration in a Sporadic Pilocytic Astrocytoma. *Case Rep Med*. 2012;2012:1–4.
14. Meyronet D, Esteban-Mader M, Bonnet C, Joly M-O, Uro-Coste E, Amiel-Benouaich A, et al. Characteristics of H3 K27M-mutant gliomas in adults. *Neuro Oncol* [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2018 Jun 6];19(8):1127–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28201752>
15. Cykowski MD, Allen RA, Kanaly AC, Fung K-M, Marshall R, Perry A, et al. The differential diagnosis of pilocytic astrocytoma with atypical features and malignant glioma: an analysis of 16 cases with emphasis on distinguishing molecular features. *J Neurooncol*. 2013 Dec;115(3):477–86.

16. Ida CM, Lambert SR, Rodriguez FJ, Voss JS, Mc Cann BE, Seys AR, et al. BRAF alterations are frequent in cerebellar low-grade astrocytomas with diffuse growth pattern. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2012;71(7):631–639.
17. Park S-H, Won J, Kim S-I, Lee Y, Park C-K, Kim S-K, et al. Molecular Testing of Brain Tumor. *J Pathol Transl Med*. 2017 May;51(3):205–23.
18. Becker AP, Scapulatempo-Neto C, Carloni AC, Paulino A, Sheren J, Aisner DL, et al. KIAA1549: BRAF gene fusion and FGFR1 hotspot mutations are prognostic factors in pilocytic astrocytomas. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2015;74(7):743–754.
19. Pećina-Šlaus N, Gotovac K, Kafka A, Tomas D, Borovečki F. Genetic changes observed in a case of adult pilocytic astrocytoma revealed by array CGH analysis. *Mol Cytogenet*. 2014 Dec;7(1).
20. Bar EE, Lin A, Tihan T, Burger PC, Eberhart CG. Frequent gains at chromosome 7q34 involving BRAF in pilocytic astrocytoma. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2008 Sep;67(9):878–87.
21. Ryall S, Arnoldo A, Krishnatry R, Mistry M, Khor K, Sheth J, et al. Multiplex Detection of Pediatric Low-Grade Glioma Signature Fusion Transcripts and Duplications Using the NanoString nCounter System. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2017 Jul;76(7):562–70.
22. Appay R, Fina F, Macagno N, Padovani L, Colin C, Baretts D, et al. Duplications of KIAA1549 and BRAF screening by Droplet Digital PCR from formalin-fixed paraffin-embedded DNA is an accurate alternative for KIAA1549-BRAF fusion detection in pilocytic astrocytomas. *Mod Pathol* [Internet]. 2018 Oct 25 [cited 2018 Oct 11];31(10):1490–501. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41379-018-0050-6>

23. Tian Y, Rich BE, Vena N, Craig JM, MacConaill LE, Rajaram V, et al. Detection of KIAA1549-BRAF Fusion Transcripts in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Pediatric Low-Grade Gliomas. *J Mol Diagnostics* [Internet]. 2011;13(6):669–77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmoldx.2011.07.002>
24. Meyronet D, Silva K, Figarella-Branger D, Godfraind C, Delisle M-B, Muraige C-A, et al. [National network of paediatric central nervous system tumours reviewing by the Groupe d'Étude de Neuropathologie Oncologique Pédiatrique (GENOP)]. *Ann Pathol* [Internet]. 2014 Feb [cited 2018 Oct 11];34(1):74–86. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0242649814000030>
25. Luu-The V, Paquet N, Calvo E, Cumps J. Improved real-time RT-PCR method for high-throughput measurements using second derivative calculation and double correction. *Biotechniques* [Internet]. 2005 Feb [cited 2018 Oct 11];38(2):287–93. Available from: <https://www.future-science.com/doi/10.2144/05382RR05>
26. Tichopad A, Dilger M, Schwarz G, Pfaffl MW. Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Res.* 2003 Oct;31(20):e122.
27. Cohen J. A Coefficient of Agreement for Nominal Scales. *Educ Psychol Meas* [Internet]. 1960 Apr 2 [cited 2018 Jul 17];20(1):37–46. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/001316446002000104>
28. Landis JR, Koch GG. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics.* 1977 Mar;33(1):159.

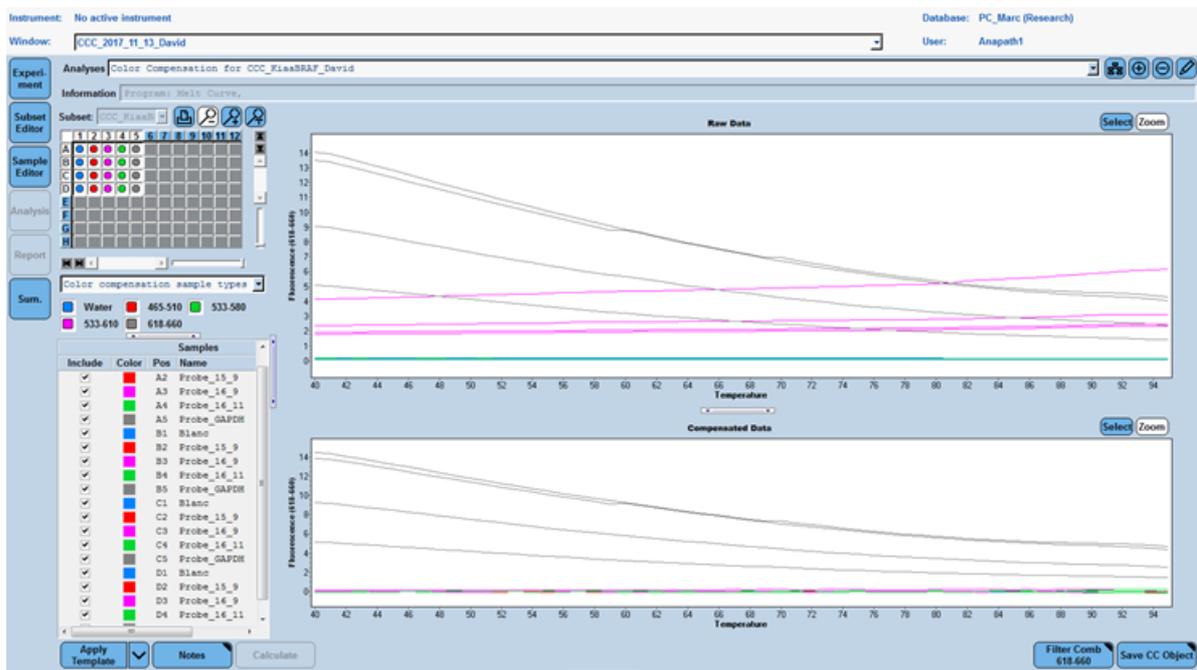
## 3 Résultats complémentaires

Lors de la réalisation de cette étude, de nombreux défis se sont présentés. En effet, le développement de cette nouvelle technique de qPCR multiplexe a nécessité des ajustements afin d'aboutir à un résultat exploitable. Cette partie présente les étapes que nous n'avons pas décrit dans l'article.

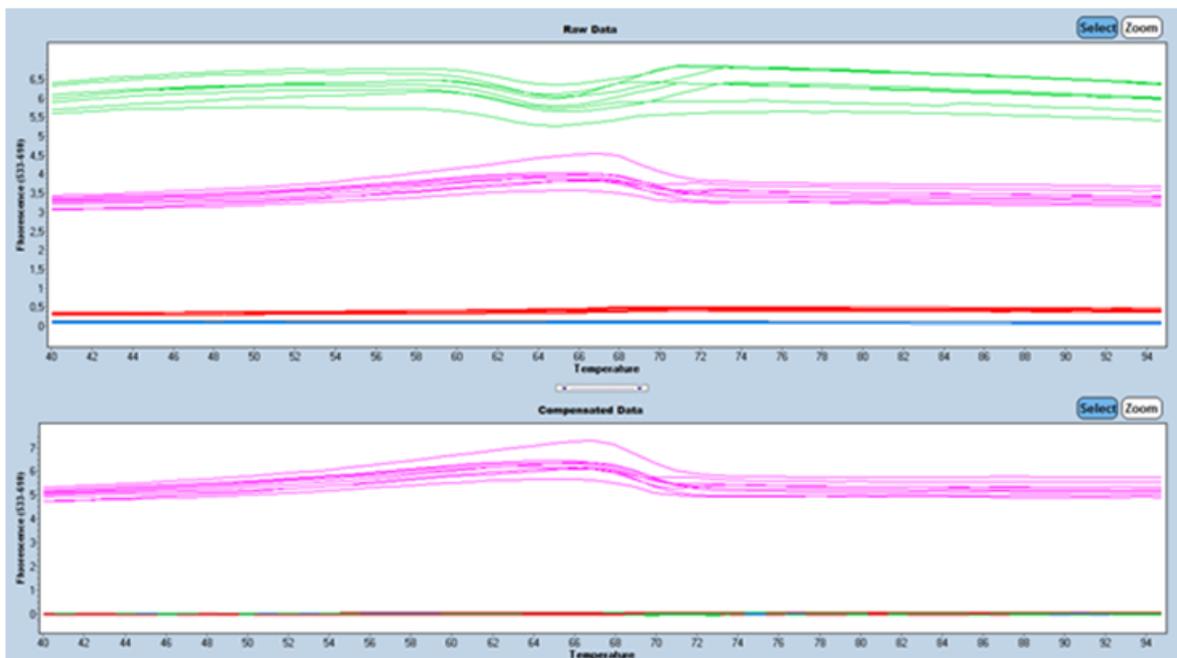
### 3.1 Compensation

Après avoir réalisé ces essais nous avons remarqué que les compensations de couleurs les plus exploitables étaient celles réalisées avec les sondes de la PCR multiplexe lors de réactions de qPCR avec des témoins positifs et en utilisant des conditions identiques à celles utilisées pour les manipulations de qPCR.

En effet, lors de l'utilisation des calibrateurs commerciaux nous avons observé une moins bonne reproductibilité entre les différents réplicats. Ceci a pu mener à une moins bonne compensation des données brutes par la suite. Les résultats des compensations étaient moins reproductibles lors de l'utilisation des calibrateurs commerciaux par rapport à l'utilisation de contrôles positifs comme le montrent les **Figure 16** et **Figure 17** qui représentent les compensations de couleurs pour la sonde de la *GAPDH* réalisées avec les calibrateurs puis les sondes Biosearch Technologies.

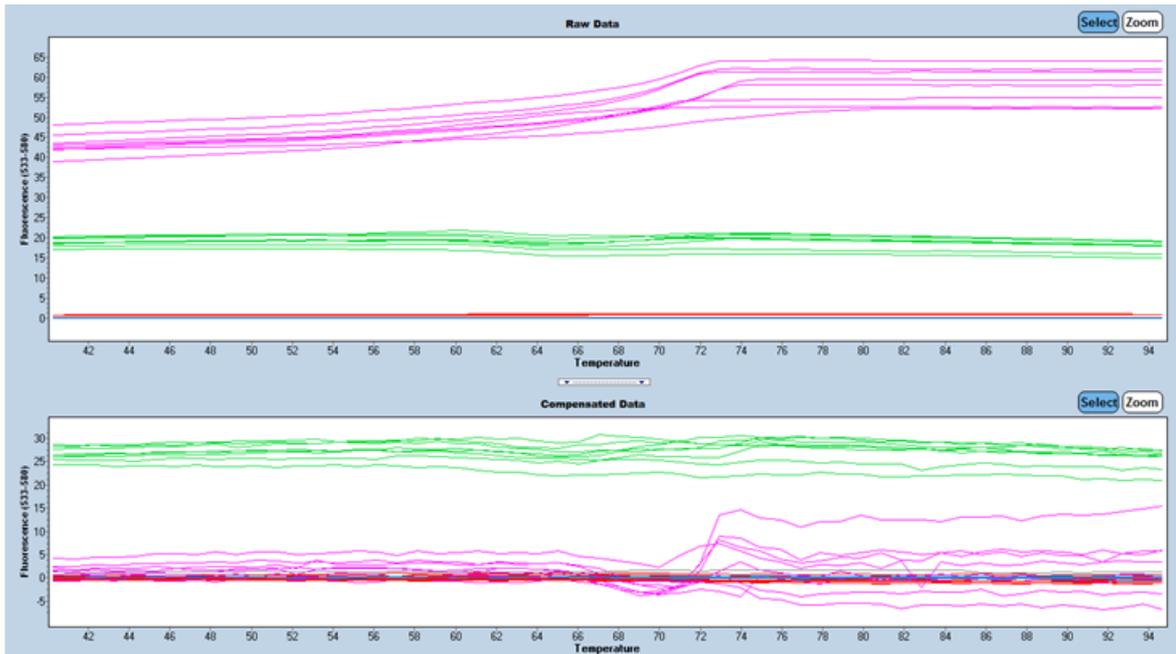


**Figure 16: Compensation de couleur réalisée avec les calibrateurs commerciaux pour la sonde de la GAPDH (618;660).** On remarque que dans la partie inférieure le signal rose (sonde 16-9) est compensé pour ne laisser apparaître que le signal gris (sonde GAPDH). Les différents puits sont peu reproductibles (leur fluorescence est différente)

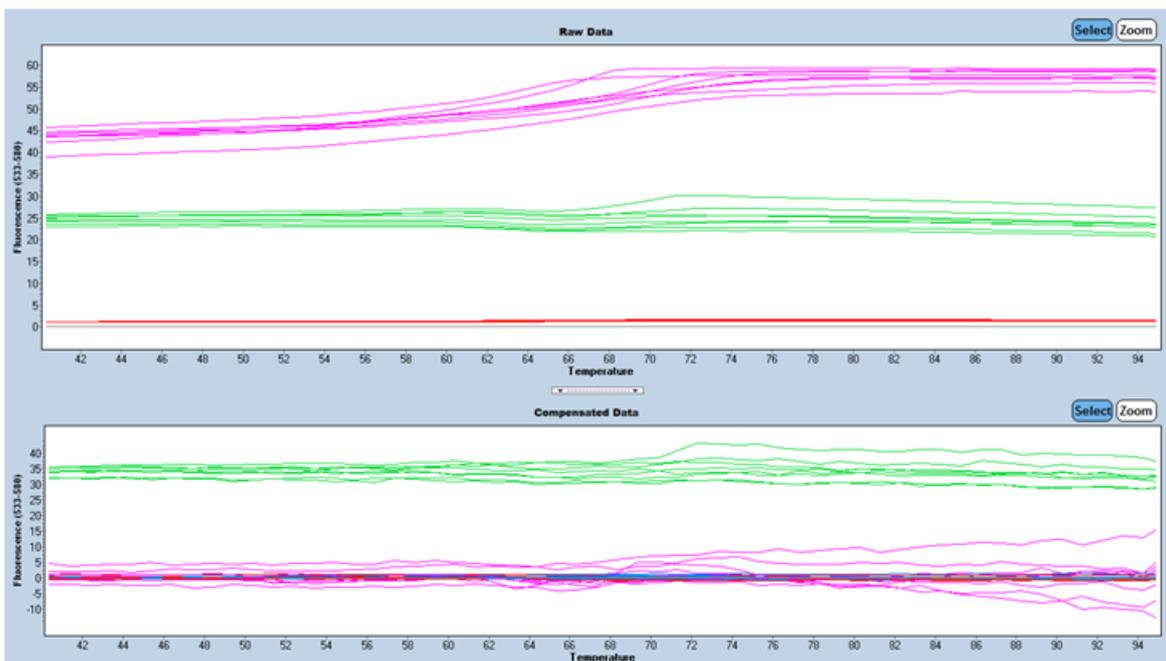


**Figure 17: Compensation de couleur réalisée avec les sondes Biosearch Technologies pour la sonde de la GAPDH (618 ;660).** On remarque que dans la partie inférieure le signal vert (sonde 16-11) est compensé pour ne laisser apparaître que le signal rose. Les différents puits sont reproductibles car on ne voit aucune dispersion dans les fluorescences.

De la même manière, lors de nos essais avec les sondes Thermo Fisher, nous avons obtenu de moins bons résultats que lorsque nous avons utilisé les sondes Biosearch Technologies. Il semblerait qu'il existe une incompatibilité entre le fluorochrome JUN lié à la sonde 16-9 et le fluorochrome CAL FLUOR orange lié à la sonde 16-11. Lorsque ces deux fluorochromes sont utilisés pour paramétrer la compensation de couleur sur le Light Cycler 480, il est difficile pour l'appareil de compenser le signal du fluorochrome JUN de couleur rose sur les **Figure 18** et **Figure 19** pour ne laisser que le signal vert correspondant au CAL FLUOR Orange : dans la longueur d'onde d'émission 580nm où seul le fluorochrome CAL FLUOR Orange lié à la sonde 16-11 devrait apparaître à l'issue de la compensation, une fluorescence rose persiste (**Figure 18** et **Figure 19**). Nous avons réalisé l'essai deux fois afin de confirmer ce résultat, et chacune des figures ci-dessous représente l'un des essais.



**Figure 18: Premier essai de compensation de couleur dans le canal 533-580 avec les sondes TaqMan.** On remarque que le signal rose correspondant à la fluorescence du fluorochrome JUN est compensé difficilement par le Light Cycler 480 au profit du signal vert représentant le CAL FLUOR Orange.



**Figure 19 : Deuxième essai de compensation de couleur dans le canal 533-580 avec les sondes Biosearch.** On remarque que le signal rose correspondant à la fluorescence du fluorochrome JUN est mal compensé par le Light Cycler 480 au profit du signal vert

représentant le CAL FLUOR Orange.

Finalement, la compensation de couleur ayant été retenue pour la suite des mises au point afin de corriger les données brutes issues du Light Cyclor 480 est celle réalisée dans les conditions de qPCR avec les sondes Biosearch Technologies (**Figure 19**).

### 3.2 Choix de la méthode d'analyse des résultats

Dans l'article que nous avons rédigé le Ct est déterminé selon la méthode de la seconde dérivée maximale proposée par le Light Cyclor 480 (36).

Cette méthode a été choisie afin de garantir la meilleure reproductibilité dans l'analyse des résultats car elle se fait automatiquement et indépendamment de l'expérience de l'utilisateur. En effet, il est possible de paramétrer davantage l'appareil afin de fixer manuellement des seuils de positivité en fonction de chacun des essais réalisés. Ceci pourra être réalisé par la suite en routine afin de rendre la méthode plus efficiente et pourrait permettre une plus grande fiabilité pour l'interprétation des résultats lors de la phase post analytique en raison de la détection de l'ensemble des transcrits de fusion et de la GAPDH au sein d'un même tube.

Toutefois, l'utilisation de la fonction seconde dérivée maximale proposée par le Light Cyclor 480 nous semblait la plus appropriée car elle permet une standardisation de l'analyse des résultats. En effet, ceci permet de conserver la meilleure comparabilité entre les résultats obtenus avec les deux techniques (simplexe et multiplexe) pour un même échantillon et autorise la comparaison entre les échantillons. Cependant, il faut noter que cette méthode est liée à l'utilisation du Light Cyclor 480 dans la mesure où d'autres appareils de qPCR utilisent pour la plupart la méthode des fit points comme méthode de

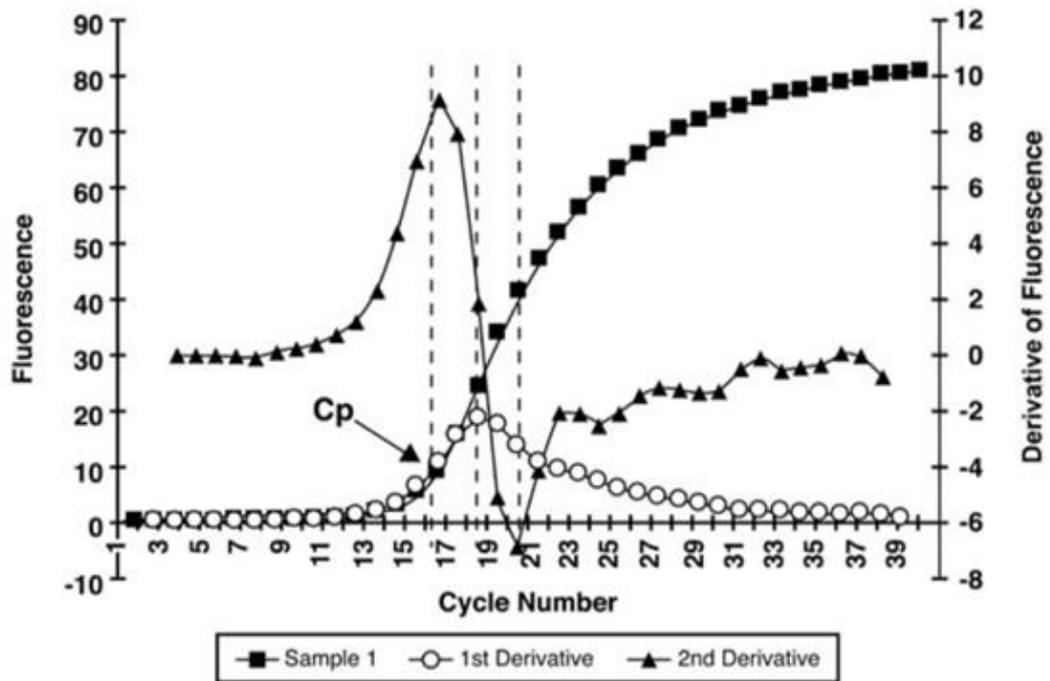
référence.

La méthode des fit points est une méthode d'analyse des résultats basée sur l'intervention de l'opérateur puisque c'est l'opérateur qui va ajuster le seuil de positivité appliqué sur les données issues d'une qPCR. Cette méthode est réalisée en traçant une ligne parallèle à l'axe des x dans la région log-linéaire de la courbe d'intensité de fluorescence en temps réel et est donc subjective.

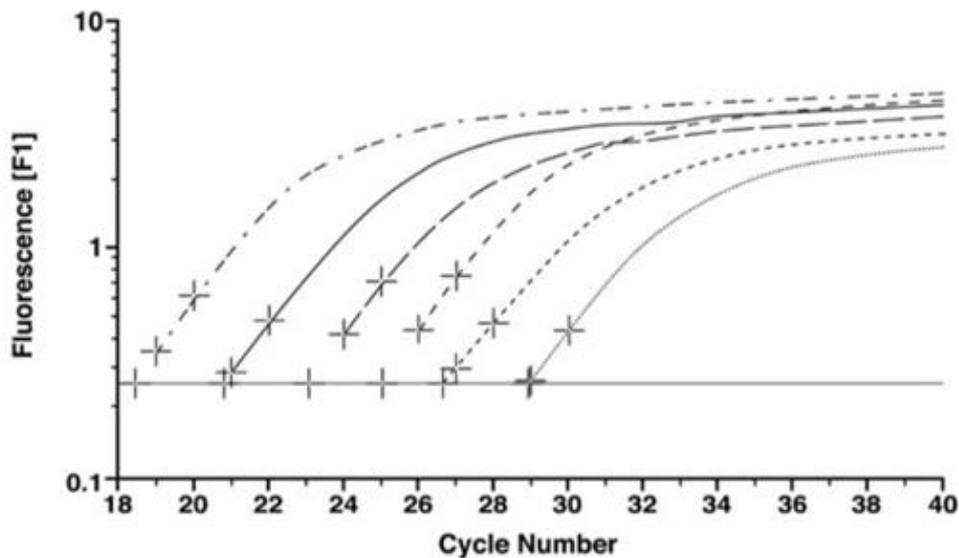
Au contraire, la méthode de la seconde dérivée maximale est une méthode d'analyse des résultats indépendante de l'opérateur puisqu'elle repose sur une base mathématique. Dans ce cas, une seule valeur est obtenue. Cette valeur n'est en aucun cas subjective puisqu'elle correspond à la valeur lue sur l'axe des abscisses (Ct) correspondante à la valeur maximale de la seconde dérivée mathématique de la coupe expérimentale de qPCR obtenue à l'issue de l'analyse. (37)

Une illustration des deux méthodes est proposée en **Figure 20** :

### A. Illustration of Derivative Method



### B. Illustration of Fit Point Method



**Figure 20 : Illustration des méthodes de la (A) Seconde dérivée maximale et (B) des fit points.** La méthode de la seconde dérivée maximale n'est pas opérateur-dépendant et une seule valeur de Ct correspond à une analyse. La méthode des fit points est opérateur-dépendant et plusieurs valeurs de Ct peuvent être rendues pour un même résultat. (37)

La méthode de la seconde dérivée maximale est une méthode qui donne des résultats plus

justes par rapport à la méthode des fit points (37).

### 3.3 Coût de la technique multiplexe

Il est intéressant de s'attarder sur la réalisation de la technique et la consommation de réactifs. En effet, en comparant la consommation des deux techniques (**Tableau 4**) nos résultats sont les suivants :

**Tableau 4 : Comparaison des consommations en matériels, réactifs et temps entre les méthodes simplexe et multiplexe.**

	Singleplex	Multiplex	Facteur d'amélioration S/M
<b>Matériel</b>			
ADNc par échantillon (triplicats)	12 $\mu$ L	3 $\mu$ L	4
Contrôles négatifs (pour chacun des mix : T0 extraction, T0 RT, T0 qPCR)	12 $\mu$ L	3 $\mu$ L	4
Controls positifs (pour chaque sonde : C+15-9, C+16-9, C+16-11, C+ <i>GAPDH</i> )	4 $\mu$ L	4 $\mu$ L	1
<b>Consommation en réactifs pour 3 échantillons</b>			
Amorces	71,8 $\mu$ L	19,8 $\mu$ L	3.6
Sondes	22 $\mu$ L	22 $\mu$ L	1
qPCR Master Mix	480 $\mu$ L	110 $\mu$ L	4.4
<b>Temps</b>			
Temps de manipulation ( $\leq$ 8 échantillons)	40 min	20 min	2
Temps de réaction (par run)	50 min	50 min	1
<b>Débit sur une plaque de 96 puits</b>			
Nombre d'échantillons maximal par run	6	29	4.8

Comme nous pouvons le voir dans le **Tableau 4**, la consommation en réactifs et en temps est réduite pour la méthode multiplexe par rapport à la méthode simplexe. Mais c'est surtout la consommation de tissus issus de prélèvements réalisés sur les patients qui rend cette technique plus pertinente. En effet, la consommation en échantillons est quatre fois

moins importante lors de l'utilisation de la technique multiplexe par rapport à la technique simplexe. Ceci permet d'épargner le matériel précieux pour d'éventuelles analyses complémentaires.

## Conclusion

THESE SOUTENUE PAR : M. BRET David Cyrille

Les duplications génomiques et la fusion impliquant les gènes *BRAF* et *KIAA1549* mènent à la création de protéines de fusion ayant une activité constitutive de la kinase *BRAF*. Ces transcrits de fusion sont une caractéristique des astrocytomes pilocytiques. En effet, la détection des transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* est d'une importance capitale pour la classification de ces tumeurs et l'identification des patients susceptibles de bénéficier des inhibiteurs de *BRAF*.

En milieu clinique, le matériel disponible pour l'analyse moléculaire de ces tumeurs pédiatriques est souvent limité à un tissu inclus dans des échantillons fixés dans du formol et inclus en paraffine. Actuellement, la méthode de référence pour identifier les transcriptions de fusion *KIAA1549-BRAF* est la méthode RNAseq, qui n'a pas encore été mise en œuvre dans tous les laboratoires de routine et qui peut être difficile à réaliser sur des échantillons de qualité inférieure comme le sont les fixés dans du formol et inclus en paraffine.

Les trois transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* les plus fréquents : *KIAA1549-BRAF* : 15-9, 16-11 et 16-9 représentent jusqu'à 95% des transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* détectés dans 70% des astrocytomes pilocytiques en utilisant, par exemple, une réaction en chaîne par polymérase quantitative simplexe. Le but de la présente étude était de développer un test de réaction en chaîne par polymérase quantitative multiplexe compatible avec les échantillons fixés dans du formol et inclus en paraffine pour détecter les 3 transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* les plus fréquents.

Nous avons comparé les performances de notre test à la méthode simplexe en cours sur une collection de 52 astrocytomes pilocytiques pédiatriques de bas grade. Les résultats ont montré que les 2 méthodes sont comparables. La méthode multiplexe a montré une sensibilité de 97% et une spécificité de 100% par rapport au simplexe. L'efficacité de la réaction en chaîne par polymérase quantitative quantitative était légèrement plus élevée dans la technique multiplexe que dans le simplexe pour tous les transcrits de fusion et pour le *GAPDH*. Notre technique consomme quatre fois moins d'ADNc, est moins onéreuse et demande deux fois moins de temps technique, ce qui montre qu'elle pourrait être implémentable en milieu clinique.

L'objectif du projet était le développement d'une nouvelle technique de diagnostic de biologie moléculaire pour la détection des transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* à partir d'échantillons fixés dans du formol et inclus en paraffine. La conduite de ce projet m'a permis de proposer une nouvelle technique de détection des trois transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* avec des performances analytiques équivalentes à la technique simplexe utilisée en routine au laboratoire du Centre de Biologie et Pathologie Est (CBPE). Cette nouvelle technique possède un rapport cout-efficacité supérieur et nécessite moins de matériel que la méthode précédente. Par ailleurs, la réalisation de la réaction pour les trois transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* et le *GAPDH* et dans un même tube permet de s'assurer de la présence d'ADNc amplifiable dans chacun des puits de la plaque. Ceci permet un contrôle qualité renforcé lors de la phase analytique. Cette méthode pourrait donc être considérée comme une méthode accessible de premier recours pour la détection des transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF*. D'autres méthodes pourraient être mises au point pour retester les échantillons négatifs dans cet essai avec les transcrits de fusion plus rares.

Dans le cadre de ce travail, j'ai été amené à travailler sur différents aspects liés au développement d'une nouvelle technique de biologie moléculaire. Tout d'abord la mise au point d'une nouvelle technique, puis son évaluation par rapport à la technique actuellement utilisée sur des échantillons de patients et enfin la rédaction d'un article scientifique Cette expérience enrichissante techniquement et scientifiquement a également été pour moi une formation importante pour mon futur exercice professionnel car elle m'a permis de travailler avec différentes équipes sur un même projet. Il s'agit pour moi d'un aspect très important de ce travail qui a été rendu possible par l'investissement fort de tous les acteurs qui y ont pris part.

Le Président de la thèse,

Nom : FERRARO PEYRET Carole

Signature :



Vu et permis d'imprimer, Lyon, le 21.11.18

Vu, la Directrice de l'Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Faculté de Pharmacie

Pour le Président de l'Université Claude Bernard Lyon 1,



Professeure C. VINCIGUERRA

## 4 Annexes

### 4.1 Données de l'étude

Les **Annexe 1**, **Annexe 2** et **Annexe 3** disponibles ci-dessous correspondent à des données présentées dans l'article.

REACTIF	CONCENTRATION DANS LE MIX	UL/TUBE
ECHANTILLON ADNC		2
H2O	qsp 18ul	4,2
QPCR MIX	1	10,0
MIX AMORCES (SENS+ANTISENS)	0,9 µM	1,8
SONDE GAPDH	0,25µM	0,5
SONDE 15-9	0,25µM	0,5
SONDE 16-9	0,25µM	0,5
SONDE 16-11	0,25µM	0,5
VOLUME TOTAL		20

**Annexe 1 : Composition quantitative d'un tube de qPCR multiplexe selon la méthode décrite dans l'article.** Le volume total d'un tube dans notre qPCR multiplexe est de 20µL lorsque l'on a ajouté l'échantillon d'ADNc patient.

SAMPLE	RNA Concentration (ng/µL)	SINGLEPLEX		MULTIPLEX			
		260/280 nm ratio	260/230 nm ratio	Mean target Ct	Mean <i>GAPDH</i> Ct	Mean target Ct	Mean <i>GAPDH</i> Ct
<b><i>KIAA1549-BRAF-15-9</i> (N=12)</b>							
<b>1</b>	1365,1	1,8	2,3	38,3	29,9	36,3	29,7
<b>2</b>	63,6	1,6	0,8	38,9	31,4	37,4	30,7
<b>3</b>	51,4	1,9	1,6	39,7	38,3	37,7	30,7
<b>4</b>	24,0	1,8	1,6	39,0	34,4	37,7	32,0
<b>5</b>	26,6	1,8	1,2	38,7	33,0	37,8	31,8

6	80,0	1,5	0,8	39,7	35,7	38,1	32,9
7	54,0	2,0	2,1	40,0	32,0	36,6	30,8
8	21,1	2,0	1,8	37,5	27,3	37,3	28,5
9	81,4	2,0	1,7	38,4	31,3	37,0	30,5
10	66,7	1,9	1,8	37,7	29,8	36,6	29,1
11	59,3	1,9	1,7	36,8	29,9	35,3	29,9
12	59,3	1,9	1,7	37,8	30,7	36,0	29,1
<b>KIAA1549-BRAF -16-11 (N=7)</b>							
13	2361,2	1,8	2,3	35,1	29,7	35,3	28,1
14	98,7	1,9	1,4	35,5	30,4	33,6	29,5
15	18,1	2,2	1,9	38,8	32,1	34,9	31,0
16	54,6	2,0	2,2	35,0	31,1	33,5	29,7
17	26,2	2,0	1,6	35,6	31,0	33,7	29,7
18	26,2	2,0	1,6	36,4	30,8	34,2	29,8
19	38,0	1,9	1,8	37,9	35,0	34,7	32,8
<b>KIAA1549-BRAF -16-9 (N=16)</b>							
20	165,7	1,9	1,9	38,8	34,0	36,3	31,6
21	179,7	2,0	2,0	36,5	30,7	35,2	29,1
22	26,6	1,9	1,5	38,8	33,2	35,5	31,3
23	15,5	2,1	0,2	37,1	25,5	34,3	24,6
24	61,0	1,9	1,5	39,5	33,4	35,6	32,0
25	19,4	2,0	1,8	39,8	34,2	35,5	31,8
26	9,7	1,6	0,9	39,8	38,9	Undet.	33,9
27	22,3	2,0	1,6	39,3	34,1	34,9	32,4
28	68,7	2,0	1,9	39,9	32,4	35,9	31,0
29	164,1	2,0	2,1	39,4	32,5	35,0	31,3
30	68,0	1,9	1,8	37,4	30,5	35,1	29,9
31	68,0	1,9	1,8	38,6	30,6	35,4	29,2
32	81,5	2,0	1,9	37,8	30,4	35,2	29,9
33	93,5	2,0	1,9	37,9	30,8	35,1	29,8
34	93,5	2,0	1,9	39,4	30,8	37,8	28,3
35	23,3	1,8	1,6	35,3	28,7	33,9	28,3

WT (N=17)					
36	66,7	1,9	1,5	25,1	24,8
37	33,5	1,8	1,4	30,1	29,4
38	46,2	2,0	1,7	31,9	30,9
39	66,7	1,9	1,5	26,2	25,6
40	19,2	1,9	1,0	34,6	32,0
41	46,2	2,0	1,7	30,5	29,2
42	4,4	2,7	0,8	38,8	34,3
43	15,4	2,1	1,7	32,2	30,6
44	12,8	1,8	0,8	35,3	32,6
45	22,4	2,1	2,0	34,7	32,9
46	11,2	1,6	0,9	33,3	31,8
47	22,9	2,1	2,0	33,5	31,9
48	40,2	2,0	1,8	29,2	28,0
49	141,9	1,8	1,4	29,1	28,8
50	21,5	1,9	1,6	34,2	32,2
51	13,8	2,1	1,4	35,6	32,7
52	5,5	3,1	1,4	31,9	30,8

**Annexe 2 : Tableau des échantillons utilisés dans l'article et les résultats associés.**

INDIVIDUAL MARKERS DETECTION		SIMPLEX			
MULTIPLEX		15-9	16-9	16-11	WT
		15-9	12		
	16-9		15		
	16-11			7	
	<b>WT</b>		<b>1</b>		<b>17</b>

**Annexe 3 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus avec les deux méthodes (simplexe et multiplexe) sur les 52 échantillons inclus dans l'étude.**

## 5 Bibliographie

1. Chastagner P, Klein O, Bernier V, Doz F. Tumeurs cérébrales primitives de l'enfant. EMC - Pédiatrie - Maladies infectieuses. janv 2009;4(4):1-18.
2. Weltgesundheitsorganisation. WHO classification of tumours of the central nervous system. Revised 4th edition. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, rédacteurs. Lyon : International Agency for Research on Cancer; 2016. 408 p. (World Health Organization classification of tumours).
3. 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 Neuropathologica. juin 2016;131(6):803-20.
4. Gladson CL, Prayson RA, Liu WM. The Pathobiology of Glioma Tumors. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease. janv 2010;5(1):33-50.
5. Alcantara Llaguno SR, Parada LF. Cell of origin of glioma: biological and clinical implications. Br J Cancer. 6 déc 2016;115(12):1445-50.
6. Becker AP, Scapulatempo-Neto C, Carloni AC, Paulino A, Sheren J, Aisner DL, et al. KIAA1549: BRAF gene fusion and FGFR1 hotspot mutations are prognostic factors in pilocytic astrocytomas. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology. 2015;74(7):743-754.
7. Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, Liu M, Blanda R, Kromer C, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. Neuro-Oncology. oct 2015;17(suppl 4):iv1-62.
8. Collins VP, Jones DTW, Giannini C. Pilocytic astrocytoma: pathology, molecular

mechanisms and markers. *Acta Neuropathologica*. juin 2015;129(6):775-88.

9. Ichimura K, Nishikawa R, Matsutani M. Molecular markers in pediatric neuro-oncology. *Neuro-Oncology*. 1 sept 2012;14(suppl 4):iv90-9.
10. Appay R, Fina F, Macagno N, Padovani L, Colin C, Baretts D, et al. Duplications of KIAA1549 and BRAF screening by Droplet Digital PCR from formalin-fixed paraffin-embedded DNA is an accurate alternative for KIAA1549-BRAF fusion detection in pilocytic astrocytomas. *Modern Pathology* [En ligne]. 25 mai 2018 [cité le 19 sept 2018]; Disponible: <http://www.nature.com/articles/s41379-018-0050-6>
11. Bouvier C, Fernandez C, Meyronet D, Figarella-Branger D. Examens cytologique, histologique, immunohistochimique et génétique des tumeurs du système nerveux central. :23.
12. Raz E, Zagzag D, Saba L, Mannelli L, Di Paolo PL, D'Ambrosio F, et al. Cyst with a mural nodule tumor of the brain. *Cancer Imaging*. 10 août 2012;12(1):237-44.
13. Cykowski MD, Allen RA, Kanaly AC, Fung K-M, Marshall R, Perry A, et al. The differential diagnosis of pilocytic astrocytoma with atypical features and malignant glioma: an analysis of 16 cases with emphasis on distinguishing molecular features. *Journal of Neuro-Oncology*. déc 2013;115(3):477-86.
14. Horbinski C. To BRAF or not to BRAF: is that even a question anymore? *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 2013;72(1):2–7.
15. Katz M, Amit I, Yarden Y. Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta*. août 2007;1773(8):1161-76.
16. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of

the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 27 juin 2002;417(6892):949-54.

17. Jacob K, Quang-Khuong D-A, Jones DTW, Witt H, Lambert S, Albrecht S, et al. Genetic Aberrations Leading to MAPK Pathway Activation Mediate Oncogene-Induced Senescence in Sporadic Pilocytic Astrocytomas. *Clin Cancer Res*. 15 juill 2011;17(14):4650-60.

18. Landis JR, Koch GG. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics*. mars 1977;33(1):159.

19. Pfister S, Janzarik WG, Remke M, Ernst A, Werft W, Becker N, et al. BRAF gene duplication constitutes a mechanism of MAPK pathway activation in low-grade astrocytomas. *Journal of Clinical Investigation*. 1 mai 2008;118(5):1739-49.

20. Jones DTW, Kocialkowski S, Liu L, Pearson DM, Backlund LM, Ichimura K, et al. Tandem Duplication Producing a Novel Oncogenic BRAF Fusion Gene Defines the Majority of Pilocytic Astrocytomas. *Cancer Research*. 1 nov 2008;68(21):8673-7.

21. Lin A, Rodriguez FJ, Karajannis MA, Williams SC, Legault G, Zagzag D, et al. BRAF alterations in primary glial and glioneuronal neoplasms of the central nervous system with identification of 2 novel KIAA1549:BRAF fusion variants. *J Neuropathol Exp Neurol*. janv 2012;71(1):66-72.

22. Dahiya S, Yu J, Kaul A, Leonard JR, Gutmann DH. Novel *BRAF* Alteration in a Sporadic Pilocytic Astrocytoma. *Case Reports in Medicine*. 2012;2012:1-4.

23. [En ligne]. RESERVES IU--TD. Orphanet: Astrocytome; [cité le 30 oct 2018]. Disponible: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC\\_Exp.php?Lng=FR&Expert=94](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=FR&Expert=94)

24. Odame I, Duckworth J, Talsma D, Beaumont L, Furlong W, Webber C, et al.

Osteopenia, physical activity and health-related quality of life in survivors of brain tumors treated in childhood. *Pediatric Blood & Cancer*. mars 2006;46(3):357-62.

25. Ida CM, Lambert SR, Rodriguez FJ, Voss JS, Mc Cann BE, Seys AR, et al. BRAF alterations are frequent in cerebellar low-grade astrocytomas with diffuse growth pattern. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2012;71(7):631–639.

26. Park S-H, Won J, Kim S-I, Lee Y, Park C-K, Kim S-K, et al. Molecular Testing of Brain Tumor. *Journal of Pathology and Translational Medicine*. 15 mai 2017;51(3):205-23.

27. Ryall S, Arnoldo A, Krishnatry R, Mistry M, Khor K, Sheth J, et al. Multiplex Detection of Pediatric Low-Grade Glioma Signature Fusion Transcripts and Duplications Using the NanoString nCounter System. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. juill 2017;76(7):562-70.

28. Corney DC. RNA-seq Using Next Generation Sequencing. *Materials and Methods* [En ligne]. 27 août 2013 [cité le 14 nov 2018];3. Disponible: <http://www.labome.com/method/RNA-seq-Using-Next-Generation-Sequencing.html>

29. Jones DTW, Hutter B, Jäger N, Korshunov A, Kool M, Warnatz H-J, et al. Recurrent somatic alterations of FGFR1 and NTRK2 in pilocytic astrocytoma. *Nat Genet*. août 2013;45(8):927-32.

30. Tian Y, Rich BE, Vena N, Craig JM, MacConaill LE, Rajaram V, et al. Detection of KIAA1549-BRAF Fusion Transcripts in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Pediatric Low-Grade Gliomas. *The Journal of Molecular Diagnostics*. nov 2011;13(6):669-77.

31. Kallioniemi A, Kallioniemi O, Sudar D, Rutovitz D, Gray J, Waldman F, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors.

Science. 30 oct 1992;258(5083):818-21.

32. Pećina-Šlaus N, Gotovac K, Kafka A, Tomas D, Borovečki F. Genetic changes observed in a case of adult pilocytic astrocytoma revealed by array CGH analysis. *Molecular Cytogenetics* [En ligne]. déc 2014 [cité le 2 mars 2018];7(1). Disponible: <http://molecularcytogenetics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13039-014-0095-2>
33. Bar EE, Lin A, Tihan T, Burger PC, Eberhart CG. Frequent gains at chromosome 7q34 involving BRAF in pilocytic astrocytoma. *J Neuropathol Exp Neurol*. sept 2008;67(9):878-87.
34. principes-de-la-PCRq.pdf [En ligne]. [cité le 14 nov 2018]. Disponible: [https://www.institutcochin.fr/core\\_facilities/genome-sequencing-studies/pcr-quantitative/la-theorie-de-la-pcr-quantitative/files/principes-de-la-PCRq.pdf](https://www.institutcochin.fr/core_facilities/genome-sequencing-studies/pcr-quantitative/la-theorie-de-la-pcr-quantitative/files/principes-de-la-PCRq.pdf)
35. Tichopad A, Dilger M, Schwarz G, Pfaffl MW. Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Res*. 15 oct 2003;31(20):e122.
36. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*. déc 2001;25(4):402-8.
37. Luu-The V, Paquet N, Calvo E, Cumps J. Improved real-time RT-PCR method for high-throughput measurements using second derivative calculation and double correction. *BioTechniques*. févr 2005;38(2):287-93.

**L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon et l'Université Claude Bernard Lyon 1 n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.**

**L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon est engagé dans une démarche de lutte contre le plagiat. De ce fait, une sensibilisation des étudiants et encadrants des thèses a été réalisée avec notamment l'incitation à l'utilisation d'une méthode de recherche de similitudes.**

**BRET David Cyrille**

**Mise au point d'une PCR multiplexe pour détecter les transcrits de fusion KIAA1549-BRAF dans des échantillons fixés dans du formol et inclus en paraffine (FFPE) de gliomes de bas grades.**

*A multiplex PCR assay for the detection of KIAA1549-BRAF Fusion Transcripts in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Pediatric Low-Grade Gliomas*

**Th. D. Pharm., Lyon 1, 2018, p.**

Les duplications génomiques et la fusion impliquant les gènes *BRAF* et *KIAA1549* codent des protéines de fusion ayant une activité constitutive de la kinase *BRAF*. Ces transcrits de fusion sont une caractéristique des astrocytomes pilocytiques. En effet, ils sont présents dans 70% des astrocytomes pilocytiques. Ainsi la détection des transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* permet la classification de ces tumeurs et l'identification des patients susceptibles de bénéficier d'un traitement par inhibiteurs de *BRAF*. En pratique, pour le diagnostic, le matériel disponible pour l'analyse moléculaire de ces tumeurs pédiatriques est souvent limité à un tissu issu d'une biopsie ou d'une pièce opératoire et incluse dans des échantillons fixés dans du formol et inclus en paraffine (FFPE). Actuellement, la méthode de référence pour identifier les transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* est la méthode RNAseq, qui n'a pas encore été mise en œuvre dans tous les laboratoires de routine et qui peut être difficile à réaliser sur des échantillons inclus en FFPE. Les trois transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* les plus fréquents : *KIAA1549-BRAF*: 15-9, 16-11 et 16-9 représentent environ 95% des transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* détectés dans les astrocytomes pilocytiques en utilisant. Ces transcrits sont actuellement recherchés par une méthode de réaction en chaîne par polymérase quantitative (qPCR) simplexe dans le laboratoire de biopathologie moléculaire du Centre de Pathologie Est des Hospices Civils de Lyon. L'objectif de la présente étude a été de développer un test de qPCR multiplexe compatible avec les échantillons FFPE pour détecter les 3 transcrits de fusion *KIAA1549-BRAF* les plus fréquents. Nous avons comparé notre test à la méthode simplexe sur une série de 52 astrocytomes pilocytiques pédiatriques de bas grade. Les résultats ont montré que les 2 méthodes sont similaires en termes de sensibilité et spécificité. La méthode multiplexe a montré une sensibilité de 97% et une spécificité de 100% par rapport à la méthode simplexe. L'efficacité de la qPCR était légèrement plus élevée dans la technique multiplexe que dans la simplexe pour tous les transcrits de fusion et pour le gène de ménage *GAPDH*. Notre technique consomme quatre fois moins d'ADNc, est moins onéreuse et demande deux fois moins de temps technique, ce qui montre qu'elle pourrait être implémentable en routine.

#### **MOTS CLES**

Astrocytome Pilocytique  
Biologie moléculaire  
qPCR  
Transcrit de fusion *KIAA1549-BRAF*

#### **JURY**

Dr FERRARO PEYRET Carole  
Dr. BARRITAUULT Marc  
Pr DUCRAY François  
Dr LOPEZ Jonathan  
Dr. LEBLOND Pierre

#### **DATE DE SOUTENANCE**

Vendredi 21 décembre 2018

#### **ADRESSE DE L'AUTEUR**

3, lotissement les Acacias, 42800 Saint Joseph