



HAL
open science

Imagerie protéomique des neurinomes de l'acoustique et des nerfs normaux. Corrélations anatomopathologiques

Alexandre Karkas

► To cite this version:

Alexandre Karkas. Imagerie protéomique des neurinomes de l'acoustique et des nerfs normaux. Corrélations anatomopathologiques. Médecine humaine et pathologie. Université Grenoble Alpes, 2018. Français. NNT : 2018GREAS048 . tel-02628571

HAL Id: tel-02628571

<https://theses.hal.science/tel-02628571>

Submitted on 26 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA

COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : BIS - Biotechnologie, instrumentation, signal et imagerie pour la biologie, la médecine et l'environnement

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Alexandre KARKAS

Thèse dirigée par **François BERGER (EDISCE)**, UGA préparée au sein du **Laboratoire CLINATEC**

dans l'**École Doctorale Ingénierie pour la santé la Cognition et l'Environnement**

Imagerie protéomique des neurinomes de l'acoustique et des nerfs normaux. Corrélations anatomopathologiques

Imaging of proteomics of acoustic neuromas and normal nerves. Histopathological correlations

Thèse soutenue publiquement le **21 décembre 2018**, devant le jury composé de :

Monsieur FRANÇOIS BERGER

PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP., UNIVERSITE GRENOBLE ALPES, Directeur de thèse

Monsieur FREDERIC VENAIL

PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP., UNIVERSITE DE MONTPELLIER, Rapporteur

Monsieur MICHEL PEOC'H

PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP., UNIVERSITE JEAN MONNET - SAINT-ETIENNE, Rapporteur

Monsieur JEAN-MICHEL PRADES

PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP., UNIVERSITE JEAN MONNET - SAINT-ETIENNE, Examineur

Monsieur EMMANUEL GAY

PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP., CHU GRENOBLE ALPES, Examineur

Monsieur SEBASTIEN SCHMERBER

PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP., CHU GRENOBLE ALPES, Président

Imagerie protéomique des neurinomes de l'acoustique (schwannomes vestibulaires) et des nerfs normaux. Corrélations anatomopathologiques

Alexandre Karkas

Résumé

Objectifs : Analyse protéomique du schwannome vestibulaire (SV) ou neurinome de l'acoustique, du schwannome non vestibulaire (SNV) et du nerf sain (nf s), à l'aide de la spectrométrie de masse et de l'imagerie MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight*).

Matériels et Méthodes : Nous avons mené une étude prospective et qualitative sur des SV, des SNV et des nf s. Les prélèvements provenaient de la Tumorothèque du service d'Anatomopathologie de notre établissement, après consentement signé des patients donateurs. Les échantillons congelés ont été découpés, analysés histologiquement, puis collés sur une lame conductrice de courant et recouverts de matrice acide. Par la suite, le faisceau laser du MALDI a fait subir à l'échantillon une désorption puis une ionisation. Un spectrogramme de masse a été tracé en fonction du temps de vol des biomolécules protéiques ionisées. Les résultats ont été traités par un logiciel afin d'obtenir une imagerie MALDI avec un spectre de couleur de sommation dont l'intensité dépendait du contenu protéique de l'échantillon. La lame a été ré-analysée histologiquement et les résultats comparés à ceux de l'imagerie.

Résultats : Cinquante schwannomes ont été prélevés, parmi lesquels 27 étaient exploitables : 22 SV et 5 SNV. Onze nerfs normaux ont été analysés. Sur les 22 SV analysés, une corrélation imagerie-anatomopathologie quasi totale était présente dans seulement 2 cas (9,1%), une corrélation partielle dans 4 (18,2%) et pas de corrélation dans 16 (72,7%). Le spectrogramme de masse moyen montrait un pic peptidique à 2000 m/z dans 7 cas (31,8%) et à 5000 m/z dans 21 cas (95,5%). Sur les 5 SNV, une corrélation quasi totale était présente dans 3 cas (60%), une corrélation partielle dans 1 (20%) et pas de corrélation dans 1 (20%). Le spectrogramme de

masse montrait un pic peptidique à 2000 m/z dans 2 cas (40%) et à 5000 m/z dans tous les cas (100%). Sur les 11 nfs, une corrélation quasi totale était présente dans 9 cas (81,8%), une corrélation partielle dans 1 (9,1%) et pas de corrélation dans 1 (9,1%). Le spectrogramme de masse ne montrait en aucun cas de pic peptidique à 2000 ou à 5000 m/z. Derrière des zones homogènes en histologie, il existait une grande hétérogénéité en imagerie MALDI et en spectrométrie de masse pour les SV et SNV mais non pour les nfs.

Conclusions : Le manque de corrélation dans le schwannome vestibulaire proviendrait du manque de croissance relativement aux autres schwannomes plus évolués et aux nerfs sains qui présentaient une meilleure corrélation. La présence de deux pics peptidiques détectés uniquement dans le schwannome et non dans le nerf sain ouvre la perspective de possibles biomarqueurs tumoraux et acteurs physiopathologiques qu'il faudra purifier et identifier par séquençage. En cas de présence d'une corrélation imagerie-anatomopathologie, les zones d'intérêt histologique montraient des aspects morphologiques reproductibles sur l'ensemble des échantillons analysés. Il s'agit d'un premier travail sur l'imagerie protéomique MALDI dans le schwannome vestibulaire et le schwannome en général et d'une première comparaison entre l'imagerie protéomique du schwannome et celle du nerf normal. Par ailleurs, et pour la première fois aussi, il a été constaté un polymorphisme protéomique dans le schwannome vestibulaire et le schwannome non vestibulaire, qui était absent dans le tissu nerveux normal, suggérant ainsi la présence de biomarqueurs protéiques pour le schwannome.

Abstract

Objectives: Proteomic analysis of vestibular schwannoma (VS) or acoustic neuroma, non-vestibular schwannoma (NVS), and healthy nerve (hn) using the mass spectrometry and imaging of the MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight).

Materials and Methods: Prospective and qualitative study on VS, NVS, and hn. Samples were provided by the Bank of Tumor of the Pathology department of our institution, after signed consent from donor patients. Frozen samples were sectioned,

analyzed histologically, then glued on a current-conductive slide and sprayed by an acid matrix. Thereafter, the laser beam of the MALDI performed desorption and then ionization of the sample. A mass spectrogram was drawn as a function of the time of flight of ionized protein biomolecules. Results have been transferred to a software to obtain a MALDI imaging with a summation color spectrum which depends on the protein content of the sample. The slide has been reexamined histologically and the results compared to those of the imaging.

Results: Fifty schwannomas have been sampled, of which 27 were exploitable: 22 VS and 5 NVS. Eleven normal nerves were analyzed. Among the 22 analyzed VS, an almost total imaging-pathology correlation was seen in only 2 cases (9.1%), a partial correlation in 4 (18.2%), and no correlation in 16 (72.7%). The mean mass spectrogram showed a peptide spike at 2000 m/z in 7 cases (31.8%) and at 5000 m/z in 21 cases (95.5%). Among the 5 NVS, an almost total correlation was seen in 3 cases (60%), a partial correlation in 1 (20%), and no correlation in 1 (20%). The mass spectrogram showed a peptide spike at 2000 m/z in 2 cases (40%) and at 5000 m/z in all cases (100%). Among the 11 hn, an almost total correlation was seen in 9 cases (81.8%), a partial correlation in 1 (9.1%), and no correlation in 1 (9.1%). The mass spectrogram showed in no case a peptide spike at 2000 or at 5000 m/z. Behind homogeneous areas on histology, there was a great heterogeneity in MALDI imaging and on mass spectrometry, regarding VS and NVS, but not hn.

Conclusions: the lack of correlation in vestibular schwannoma could be due to its lack of growth and evolution compared to other schwannomas and healthy nerves which presented a better correlation. The presence of two peptide spikes detected only in schwannoma and not in healthy nerve opens up the prospect of tumor biomarkers and pathophysiological actors that should be purified and identified by sequencing. In the case of presence of an imaging-pathology correlation, histological areas of interest showed morphological aspects that were reproducible in the whole analyzed samples. This is the first work on proteomic imaging using the MALDI in vestibular schwannoma and in schwannomas in general. This is also a first comparison between proteomic imaging of the schwannoma and that of normal nerve. Besides, and also for the first time, we found a proteomic polymorphism in vestibular schwannoma and non-vestibular schwannoma which were absent in normal nerve tissue thereby suggesting the presence of protein biomarkers for the schwannoma.

Introduction

1) Schwannome vestibulaire ou neurinome de l'acoustique :

Le schwannome vestibulaire est une tumeur bénigne développée aux dépens des cellules de Schwann du nerf vestibulaire. Il peut rarement exister des schwannomes du nerf cochléaire. A noter que les nerfs cochléaire et vestibulaire constituent ensemble le VIII^e nerf crânien, nommé nerf cochléo-vestibulaire [1-3].

Les cellules de Schwann sont des cellules gliales formant la gaine de myéline du système nerveux périphérique, l'équivalent d'oligodendriocytes du système nerveux central. La gaine de myéline joue un rôle d'isolant électrique de l'axone, permettant au signal électrique de se propager de façon conductrice entre deux nœuds de Ranvier en limitant la diminution de l'intensité de la dépolarisation [4] (figure 1).

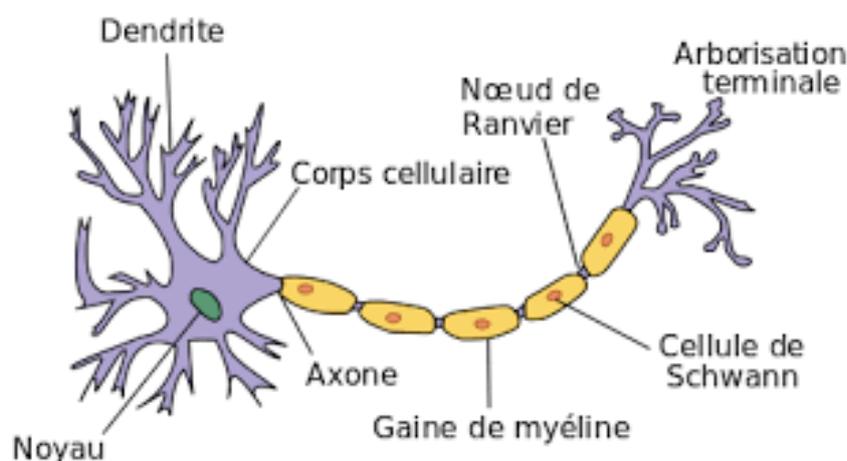


Figure 1. Illustration d'un axone entouré de cellules de Schwann formant la gaine de myéline.

Illustration provenant de <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Neuron.svg>

La zone d'émergence du schwannome vestibulaire (SV) peut être au niveau du ganglion de Scarpa où résident des cellules embryonnaires précurseurs des cellules de Schwann. Elle donnerait naissance aux tumeurs intraméatales, localisées au niveau du conduit auditif interne (CAI) et à point de départ le fond du CAI [1]. La zone

d'émergence peut être aussi au niveau de la zone de transition glio-schwannienne ou root entry zone (REZ) ou encore zone d'Obersteiner. Il s'agit d'une région d'une grande instabilité histologique, susceptible de se transformer en tumeur. Elle donnerait naissance aux tumeurs localisées dans l'angle ponto-cérébelleux (APC), à distance du CAI [1, 2] (figure 2).

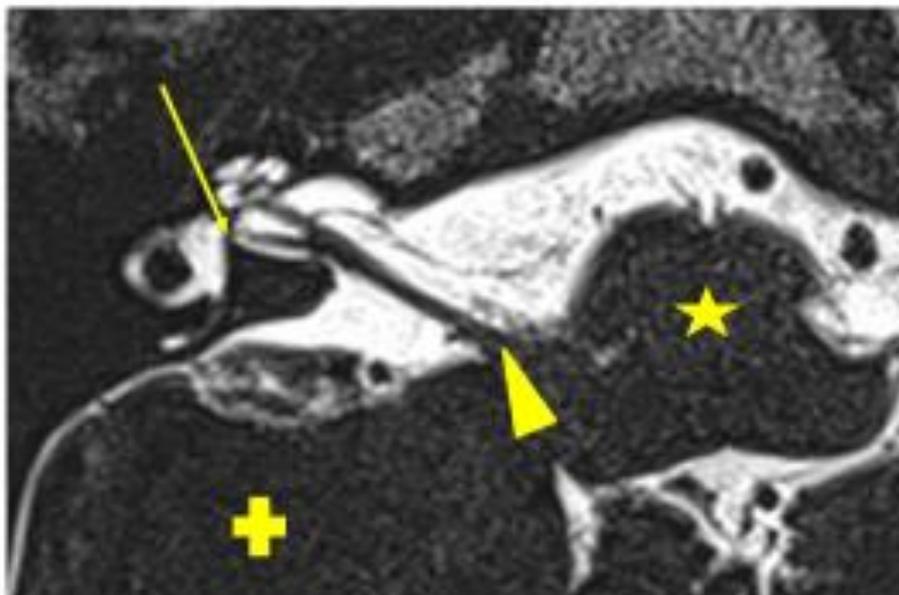


Figure 2 : IRM en coupe axiale montrant le conduit auditif interne droit (séquence T2-CISS). Flèche : ganglion de Scarpa ; tête de flèche : root entry zone ; étoile : tronc cérébral ; croix : cervelet (hémisphère droit). *Image provenant de la banque de données de l'auteur.*

Etiopathogénie : 95% des SV sont sporadiques et 5% s'intègrent dans le cadre d'une neurofibromatose type 2 (NF2). Ceux-ci sont d'origine génétique [3]. Seuls les SV sporadiques ont été analysés dans notre série. Des facteurs environnementaux (téléphone portable) et des facteurs intrinsèques ont été incriminés mais les données actuelles ne sont pas suffisantes pour affirmer leur contribution [1].

Prévalence : elle a augmenté avec l'amélioration du dépistage des petites tumeurs par l'IRM et par l'amélioration de la résolution de cette technique : l'incidence est passée de 7,8 à 12,4 par million d'habitants par an [5]. Les SV constituent 80% des tumeurs de l'APC et 8% des tumeurs intracrâniennes [1].

Anatomopathologie

Macroscopie : il s'agit d'une lésion arrondie, à contours lisses, parfois bosselée, à contour polycyclique, assez molle, de couleur jaunâtre ou gris clair, limitée par une capsule fibreuse. La vascularisation et l'adhérence aux nerfs est variable. Dans les tumeurs volumineuses, le nerf vestibulaire est indissociable de la tumeur. Il peut exister des kystes ou des zones de nécrose intra-tumorales (figures 3 et 4).

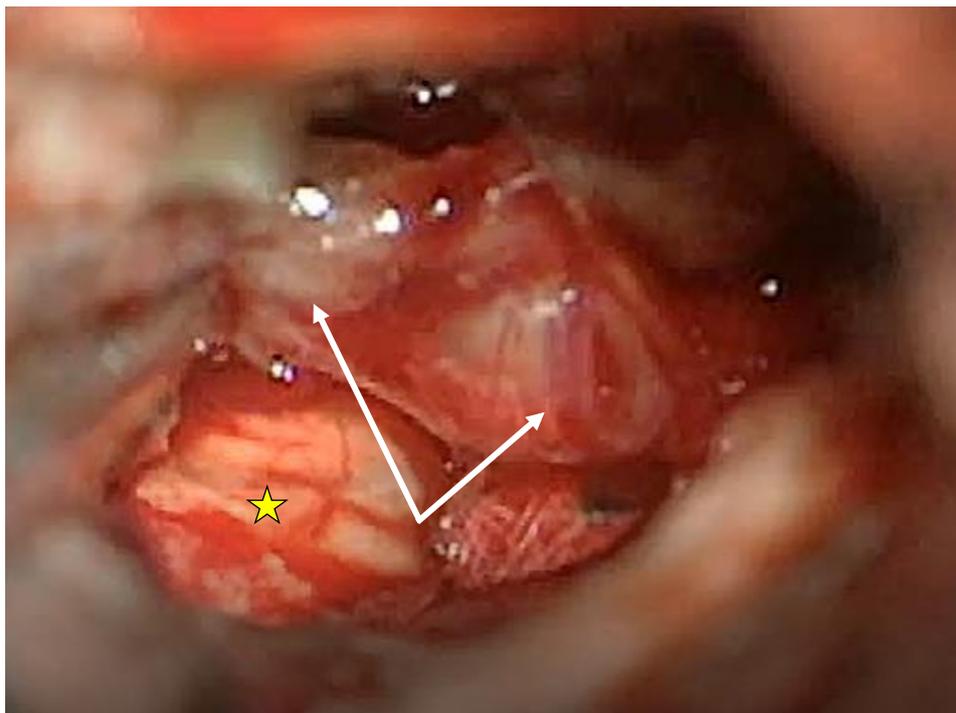


Figure 3. Photo peropératoire d'un schwannome vestibulaire gauche (flèches) exposé par voie translabyrinthique avant exérèse. Étoile : tronc cérébral. *Image provenant de la banque de données de l'auteur.*



Figure 4 : fragments macroscopiques d'un schwannome vestibulaire qui vient d'être réséqué. *Courtoisie du Dr JM DUMOLLARD, service d'Anatomopathologie, CHU de Saint-Étienne.*

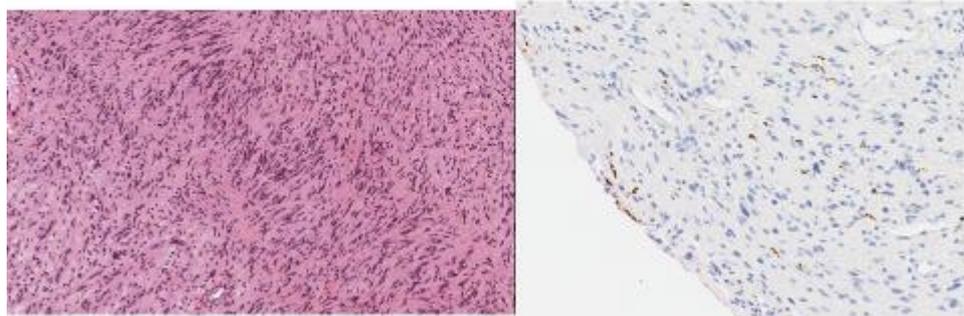
Microscopie : Il s'agit d'une prolifération des cellules de Schwann refoulant en périphérie les filets nerveux résiduels, dont deux formes histologiques classiquement décrites et souvent intriquées au sein de la même tumeur.

- Type Antoni A : dense en cellules Schwanniennes qui sont fusiformes, assemblées en palissades juxtaposées, formant les nodules de Verocay (figure 5)

Figure 5. Neurinome (schwannome) type Antoni A

Coloration HES x25

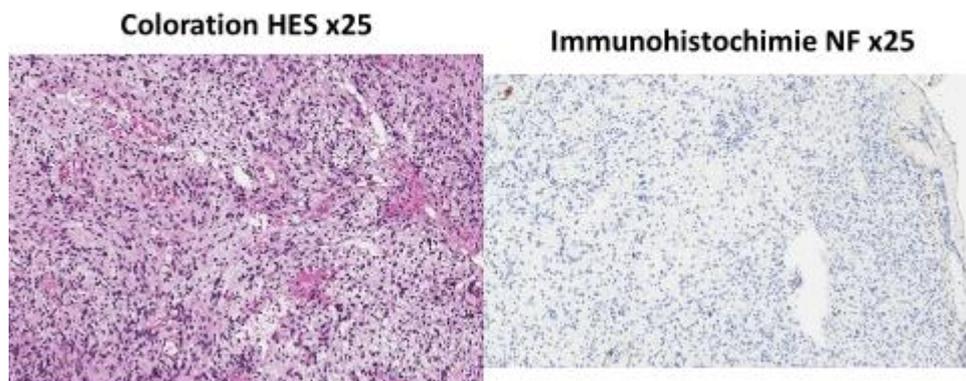
Immunohistochimie NF x40



Courtoisie du Dr JM DUMOLLARD, service d'Anatomopathologie, CHU de Saint-Étienne.

- Type Antoni B : plus lâche, les cellules sont arrondies, pléomorphes, baignant dans un milieu interstitiel lâche (figure 6)

Figure 6. Neurinome (schwannome) type Antoni B



Courtoisie du Dr JM DUMOLLARD, service d'Anatomopathologie, CHU de Saint-Étienne.

La coloration utilisée afin de visualiser le schwannome en microscopie est l'hématoxyline-éosine HE (ou hématoxyline-éosine-safran : HES).

D'autres formes existent rarement :

- Le schwannome cellulaire, très riche en cellules et d'évolutivité rapide.
- Le schwannome malin, exceptionnel en cette localisation dont l'origine est mal connue : transformation maligne ou malignité *de novo*. Certains schwannomes malins ont été décrits après irradiation et dans le cadre de la neurofibromatose type 2. Son pronostic est très réservé [1, 6]. Nous n'en avons pas rencontré dans notre expérience.

Classification

Il existe deux classifications largement utilisées mondialement :

- Classification de Koos (figures 7 et 8) [7] :
 - o Stade I : tumeur intraméatique (dans le CAI)
 - o Stade II : tumeur développée également dans l'APC, mais ne comprimant pas le tronc cérébral

- Stade III : tumeur remplissant l'APC et déformant le tronc cérébral
- Stade IV : tumeur déplaçant le tronc cérébral et le IV^o ventricule

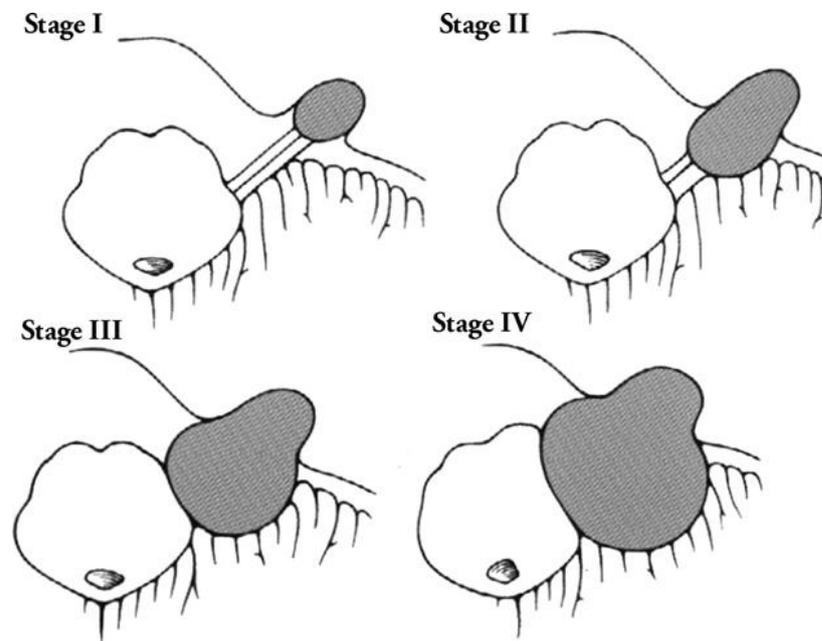
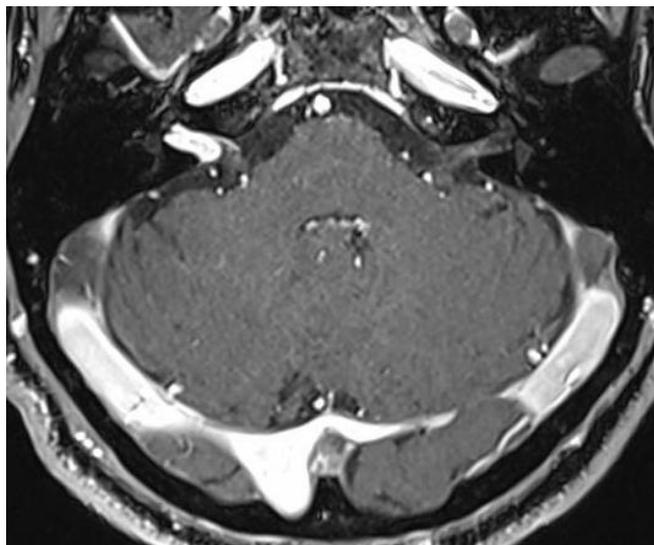
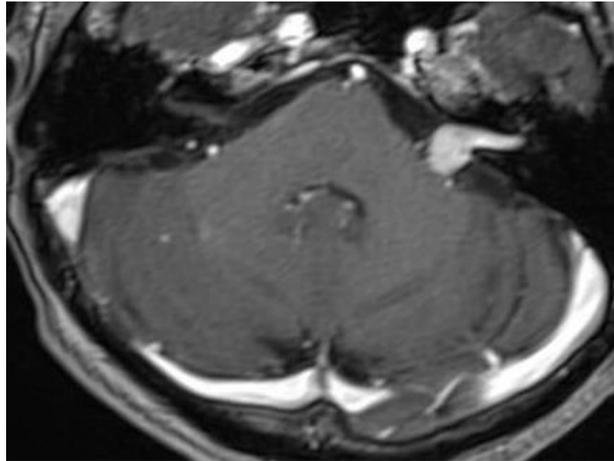


Figure 7 : illustration schématique des 4 stades de neurinome de l'acoustique selon la classification de Koos. *D'après Koos et al. (1976) et Talfer et al. (2010) [7, 8].*



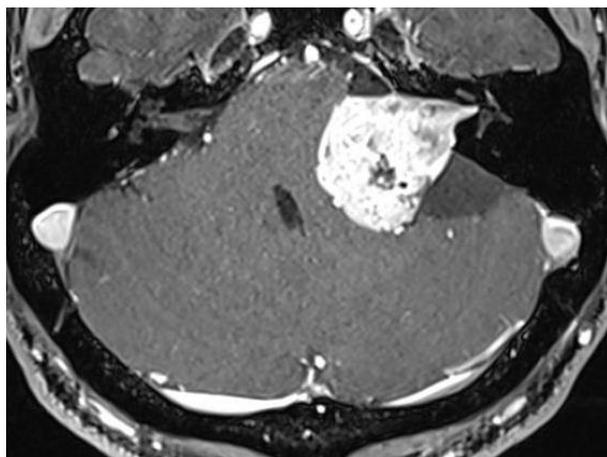
Stade I droit



Stade II gauche



Stade III gauche



Stade IV gauche

Figure 8 : illustration par imagerie des 4 stades de neurinome de l'acoustique selon la classification de Koos (IRM coupe axiale)

séquence T1 + gadolinium). *Images provenant de la banque de données de l'auteur.*

- Consensus de Kyoto [9]
 - Tumeur intraméatique
 - Tumeur extraméatique
 - 1-10 mm
 - 11-20 mm
 - 21-30 mm
 - 31-40mm
 - > 40 mm

Signes cliniques : ce sont la surdité progressive unilatérale ou asymétrique, la surdité brutale, l'acouphène unilatéral, les troubles vestibulaires (déséquilibre, rarement vrais vertiges rotatoires). D'autres signes non otologiques peuvent exister notamment la neuropathie trigémينية. L'atteinte du nerf facial, du nerf abducens et/ou du nerf vague est plus rare. Des signes d'hypertension intracrânienne ou cérébelleux sont des signes de gravité [1, 3].

Examens cliniques et paracliniques : un examen otoscopique, audiométrique et vestibulaire s'impose. Il sera complété par un examen neurologique, en particulier les nerfs crâniens et les épreuves cérébelleuses. Des épreuves fonctionnelles vestibulaires doivent être réalisées afin d'évaluer le degré d'atteinte vestibulaire [1].

Examens radiologiques : l'IRM est le gold standard pour le diagnostic et le suivi radiologique du neurinome. Les séquences essentielles sont le T2 3D (CISS, DRIVE, FIESTA, SPACE, en fonction des machines) et le T1 avec injection de gadolinium.

Traitement : il existe 3 modalités thérapeutiques qui ne seront pas développées car elles s'inscrivent bien au-delà du cadre de cette étude :

- Surveillance clinique et radiologique (*wait and scan*)
- Microchirurgie (double équipe Otoneurologue - Neurochirurgien)
- Radiochirurgie stéréotaxique et radiothérapie fractionnée

Des thérapies ciblées visant des molécules spécifiques au NA sont en cours de développement et relèvent du domaine de la recherche : bevacizumab et vandetanib qui sont des anti-VEGF (*anti-vascular endothelial growth factor*) [10], imatinibe

mésylate qui agit sur le PDGFR (*platelet-derived growth factor receptor*) et le c-Kit exprimés dans le NA [11], sulphorafane qui a une activité antiproliférative contre les cellules de Schwann [12], et siRNA (*short interfering Ribo Nucleic Acid*) délivré via des nanoparticules et ciblant le TNF- α dans le schwannome vestibulaire [13].

2- Protéomique :

La protéomique consiste à étudier l'ensemble des protéines d'un organisme, d'un fluide biologique, d'un organe, d'une cellule ou même d'un compartiment cellulaire.

La protéomique permet la caractérisation du protéome (protéine + génome) à un moment donné et dans un contexte donné. Elle donne des informations précises, reflétant les variations quantitatives et qualitatives de l'expression des protéines en fonction du temps, de leur environnement, d'un état physiologique ou pathologique. Pour chaque condition environnementale, une cellule comporte un protéome adapté. Ainsi, un même gène peut donner naissance à plusieurs protéines et seule une analyse protéique peut illustrer la complexité et variabilité des réels effecteurs biologiques. L'étude du protéome permet de faire le lien entre les informations génomiques et le fonctionnement cellulaire.

Les domaines d'application de la protéomique sont vastes, la découverte et la validation de biomarqueurs est un moteur principal de développement de cette science. Un biomarqueur est une molécule dont le niveau d'expression est spécifique d'un état physiologique ou pathologique. C'est une signature phénotypique. Selon le type de biomarqueurs, ces derniers peuvent permettre de dépister de façon sensible et spécifique une maladie, d'établir un pronostic, parfois de prédire l'efficacité des traitements.

2.a- Spectrométrie de masse :

Actuellement, la spectrométrie de masse (SM) est l'outil le plus performant pour l'analyse protéomique [14]. Elle permet de séparer et d'identifier les protéines selon leur masse.

Il existe plusieurs types de spectromètres de masse. Tous ont en commun les étapes suivantes : préparation et introduction de l'échantillon, ionisation des molécules présentes au sein de l'échantillon, séparation des ions, détection et amplification du

signal, analyse et traitement des données permettant de transformer les informations reçues par le détecteur en spectre de masse.

Tous les spectromètres de masse se décomposent en trois parties distinctes :

- la source où a lieu l'ionisation des molécules,
- le système dispersif (ou analyseur) qui assure la séparation des ions,
- le détecteur qui détecte et mesure l'abondance de chaque ion [14].

Les deux spectromètres mondialement utilisés dans la volatilisation et l'ionisation des peptides/protéines sont l'ESI (*Electro-Spray Ionization*) et le MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*). L'ESI ionise les analytes dans une solution, après digestion des protéines par la trypsine en peptides de plus petit poids moléculaire. Par la suite, les peptides sont séparés par chromatographie ou électrophorèse dans de très fins capillaires et nébulisés par l'électrospray de gouttelettes chargées (ionisées). Après évaporation, les peptides ainsi protonés passent dans le spectromètre.

À la différence de l'ESI, le MALDI utilise l'ionisation des peptides sans les fragmenter (sans digestion enzymatique) et en phase gazeuse : la matrice cristallisée est sublimée dans le spectromètre de masse et est ionisée par des impulsions laser. Le MALDI est en général utilisé pour des échantillons peptidiques simples alors que l'ESI combiné à la chromatographie est réservé aux échantillons protéiques plus complexes.

Il existe 4 méthodes d'analyseurs de masse [14, 15] :

- *Ion trap* : les ions sont enfermés avec l'analyte puis fragmentés et scannés en fonction de leur m/z . C'est une méthode pratique, peu onéreuse mais manque de précision et seul un nombre limité d'ions peut être utilisé.

- *Fourier transform ion cyclotron resonance (FTICR)* : capture les ions sous vide et en champ magnétique puissant. Haute résolution et précision, mais très complexe et onéreux, avec une capacité limitée à fragmenter les peptides ; ne peut être utilisé en routine.

- *Quadrupole* : utilise un champ électrique à 4 pôles permettant une trajectoire stable pour des ions d'un rapport m/z particulier. Très complexe à mettre en œuvre également.

- *Time of Flight (TOF)* : analyse les peptides volatilisés en fonction de leur temps de vol. Simple à mettre en œuvre, excellente précision, haute sensibilité et bonne résolution. [14, 15].

Le spectromètre ESI est le plus souvent associé à l'analyseur *ion trap* ou au quadropole, alors que le spectromètre MALDI est en général associé à l'analyseur TOF. Grâce aux avantages du MALDI (pas de digestion enzymatique préalable, respect du tissu analysé) et du TOF (simplicité, grande précision) Le MALDI-TOF est très largement utilisé dans l'analyse protéomique, aussi nommée « *peptide mapping* ». La technique du MALDI-TOF est détaillée dans le paragraphe suivant (2.b). L'ajout d'un séquençage peptidique au MALDI-TOF pourrait dans certaines conditions permettre l'identification des peptides du tissu analysé (*peptide mass fingerprinting*) [14].

2.b- Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight (MALDI-TOF) :

Le spectromètre de masse MALDI-TOF s'est développé à la fin des années 80 [16]. Ce spectromètre utilise une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI) et un analyseur à temps de vol (TOF).

Dans le MALDI, un laser ultraviolet (UV) est pulsé sur la cible (matrice + échantillon).

L'énergie du laser produit deux phénomènes :

- Désorption : la matrice et l'analyte se vaporisent.
- Ionisation : la matrice transfère ses protons à l'analyte qui s'ionise.

Les ions sont propulsés par une impulsion électromagnétique dans l'analyseur.

Le spectromètre mesure le temps que mettent les différents ions pour parcourir la distance entre la source et le détecteur source. Les molécules les plus lourdes mettront plus de temps à atteindre le détecteur, tandis que les molécules plus légères arriveront plus vite. Une fois les ions arrivés au détecteur, le signal est amplifié et envoyé à un ordinateur qui traite les données et les présente sous forme de spectre. Chaque pic correspond à une protéine. L'axe des ordonnées représente l'intensité relative du signal en unités arbitraires et l'axe des abscisses indique la valeur m/z (rapport masse sur charge). Dans un MALDI, la plupart des analytes sont monochargés mais il arrive d'observer des multichargés.

Certains spectromètres de masse comme celui dont on dispose (MALDI-TOF UltrafleXtreme, Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) possèdent un Réflectron (figure 9). Cet outil permet d'analyser avec une extrême précision des protéines ionisées et fragmentées et ainsi de les identifier en interrogeant des bases de données de type

MASCOT (*Matrix Science*) et BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) [17, 18] dans les cas rares où une fragmentation *in situ* est possible.

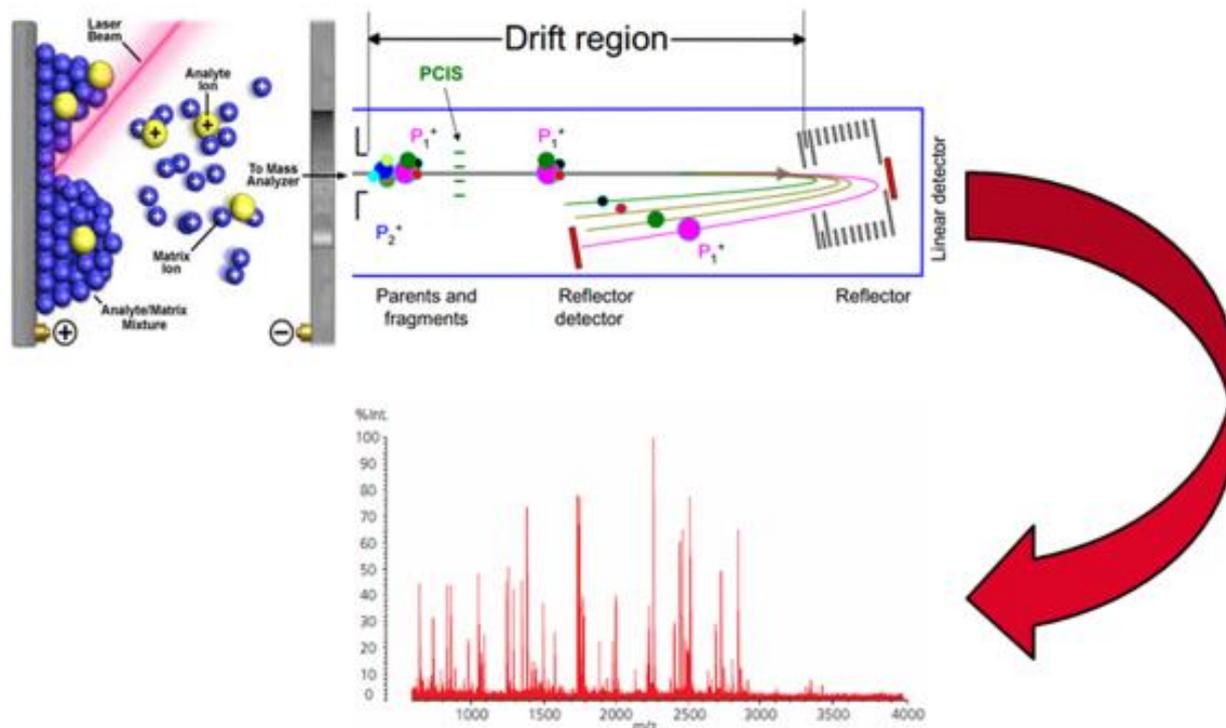


Figure 9 : MALDI-TOF avec Réflectron. Drift region = région de migration. *Illustration provenant du laboratoire Clinatec, Grenoble.*

2.c- Imagerie MALDI-TOF :

L'imagerie MALDI (*MALDI Imaging Mass Spectrometry*, MALDI-IMS), technique apparue fin des années 90, permet l'analyse protéomique de coupes de tissu sur quelques micromètres d'épaisseur [19].

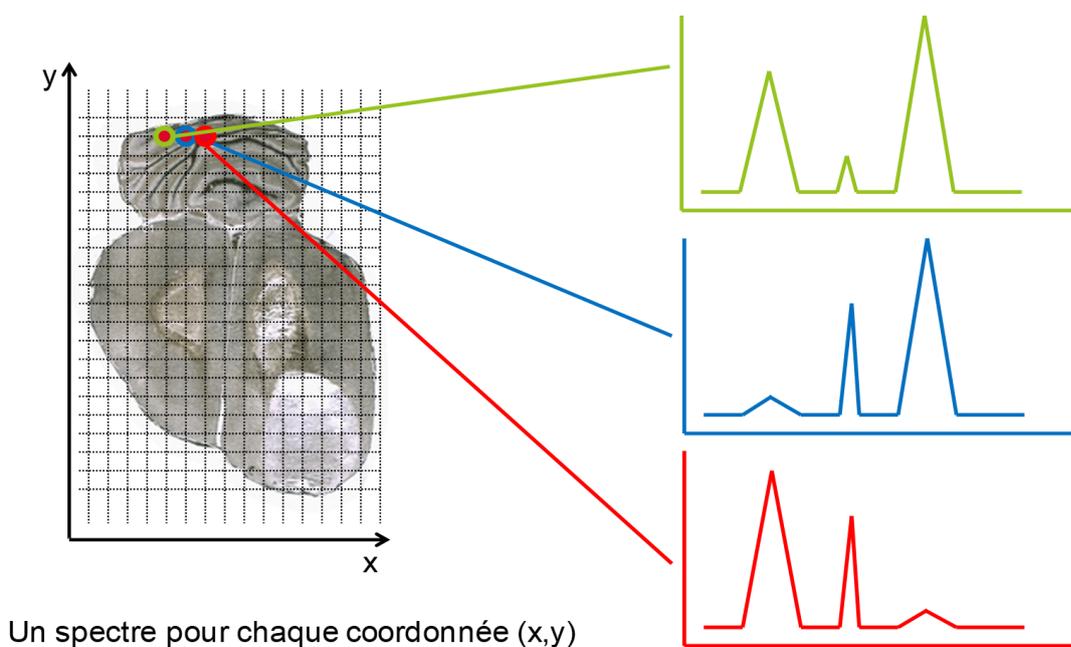
En MALDI-IMS, il y a acquisition d'un spectre pour chacun des points d'un échantillon dont la résolution est choisie par l'opérateur ; la résolution spatiale maximale actuelle est de 10 μ m. Chaque spectre peut contenir des centaines de pics, correspondant aux différentes molécules détectées avec une intensité.

Le processus d'ionisation MALDI étant compétitif, une molécule facilement ionisable, même si elle est présente en faible quantité dans l'échantillon, aura un pic plus intense qu'une molécule abondante mais difficilement ionisable. Une comparaison d'intensité pour une même molécule présente dans différents échantillons reste possible.

Ces spectres sont traités par un logiciel d'imagerie MALDI spécifique. La sommation des spectres de chaque point de l'échantillon donne un spectre moyen. Pour une

valeur m/z particulière de ce spectre moyen, le logiciel permet de représenter grâce à une échelle de couleur l'intensité de son signal en chacun des points de l'échantillon (figure 10).

L'imagerie MALDI explore ainsi la distribution spatiale et la répartition semi-quantitative des composés dans des tissus biologiques. L'analyse directe des tissus, la cartographie protéique, apporte des informations moléculaires sur les échantillons tumoraux et microenvironnements jusqu'alors inaccessibles. Les analyses comparatives où les pics m/z spécifiques se corrèlent à des données cliniques ouvrent de nouvelles voies de recherche pour une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques, à la découverte de nouveaux biomarqueurs diagnostiques ou pronostiques, pour aboutir *in fine* à une meilleure prise en charge clinique.



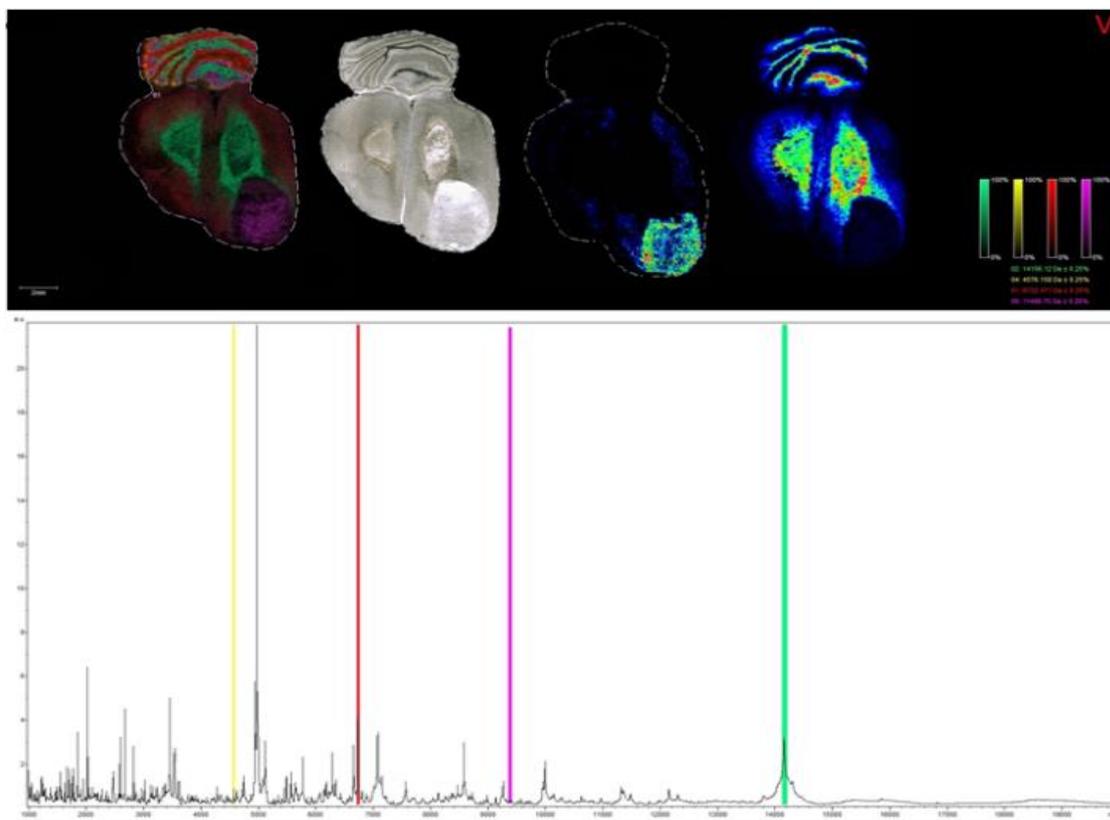


Figure 10 : Imagerie MALDI d'un encéphale de rat.

Pour chacun des points de l'échantillon, un spectre est donné (en haut). La sommation de ces spectres réalise un spectre moyen. Les images illustrent la répartition spatiale des valeurs m/z sélectionnées (en bas). *Illustration provenant du laboratoire Clinatéc, Grenoble.*

Objectifs de l'étude

Il existe peu d'études sur l'analyse protéomique du schwannome vestibulaire et à notre connaissance aucune étude sur l'imagerie MALDI du schwannome vestibulaire ou même du schwannome en général [18, 20, 21]. Notre but est d'analyser le profil protéomique de ces tumeurs et de le comparer avec leurs caractéristiques anatomopathologiques. Nous avons également tenté de rechercher des zones hétérogènes (ayant des caractéristiques morphologiques différentes) en spectrométrie de masse et à l'imagerie MALDI qui paraissent homogènes en étude anatomopathologique. Notre but est aussi de rechercher si les zones d'intérêt anatomopathologique présentent des aspects morphologiques bien définis et reproductibles à l'imagerie MALDI.

D'autre part, nous avons voulu comparer l'imagerie protéomique du SV à celle du nerf normal. Cette comparaison aura pour but de caractériser certains aspects protéomiques présents dans le schwannome et non pas dans le tissu nerveux sain. Ce profil protéomique pourrait servir à identifier des biomarqueurs du schwannome vestibulaire sporadique et de cible pour une éventuelle thérapeutique médicale dans le futur.

Matériels et Méthodes

Il s'agit d'une étude **prospective** et **qualitative** concernant l'analyse protéomique et l'examen anatomopathologique des schwannomes et des nerfs normaux. Nous avons obtenu un consentement éclairé et signé de la part de tous les patients chez qui un prélèvement de schwannome ou de nerf sain a été réalisé pour la Tumorotheque / Centre de Ressources Biologiques CRB42-TTK (*Archived Tumor Cells*). La préparation du SV à analyser se déroule en deux étapes, la 1^{ère} dans le Service d'Anatomopathologie du CHU de Saint-Etienne et la 2^{nde} au Laboratoire Clinatéc à Grenoble. La technique de préparation et d'analyse protéomique du SV est décrite ci-après. Après exérèse tumorale, la majorité du schwannome est fixée dans du formol puis analysée en routine pour objectiver le diagnostic anatomopathologique et une petite partie est sélectionnée à l'examen macroscopique systématique initial comme pour toute pièce d'exérèse chirurgicale et réservée à l'état frais pour cryopréservation sans ajout de sérum physiologique, ou de tout autre substance chimique. Cet échantillon est rapidement congelé par immersion dans l'azote liquide en conformité des procédures de qualité, correspondant en pratique à moins d'une heure de délai entre la réception du prélèvement et son conditionnement, puis transféré à la Tumorotheque pour cryoconservation à -80°C. Tous les transports intermédiaires sont effectués en azote liquide, en conformité avec les procédures règlementaires. Le jour de la préparation à l'analyse, le neurinome est retiré du congélateur et collé sur un support à l'aide d'une colle OCT (*Optimal Cutting Temperature compound*) puis sectionné au « cryostat », un cryomicrotome à -20°C +/- 4°C afin de recueillir des lamelles tissulaires tumorales d'une épaisseur de 12 µm correspondant aux zones d'intérêt retenues par l'examen extemporané de contrôle sur une lame miroir immédiatement précédente aux coupes destinées à l'étude et colorée à l'HES.

La lamelle tissulaire tumorale est posée sur une lame ITO (*Indium and Tin Oxide*, conducteur d'électricité). Par la suite, les lames ITO ainsi préparées sont transférées au Laboratoire Clinatéc dans de la carboglace à -80°C. Les lames sont déshydratées au méthanol. Ensuite, la lame est placée dans un dessiccateur (cloche sous vide) pendant 30 minutes pour une déshydratation maximale. Une fois celle-ci terminée, la lamelle de schwannome est mise dans une machine qui sert à déposer la matrice (*Matrix Sprayer*, ImagePrep, Bruker Daltonics) et pulvérise le produit d'une façon

homogène sur l'ensemble du schwannome présent sur la lame ITO. La matrice utilisée est le DHB (*Di-Hydro-benzoic acid*) qui sert à ioniser ultérieurement les protéines du neurinome aux protons H⁺. La lame ITO contenant le schwannome couvert de matrice est placée dans le spectromètre de masse MALDI après avoir marqué des repères sur la lame. Un faisceau laser à azote qui émet dans l'ultraviolet à 337 nm cible d'une façon régulière et homogène le neurinome qui va dans un 1^{er} temps subir une désorption (vaporisation avec la matrice) et dans un 2^{ème} temps une ionisation par transfert des protons de la matrice au schwannome avec volatilisation des ions moléculaires (Figure 11).

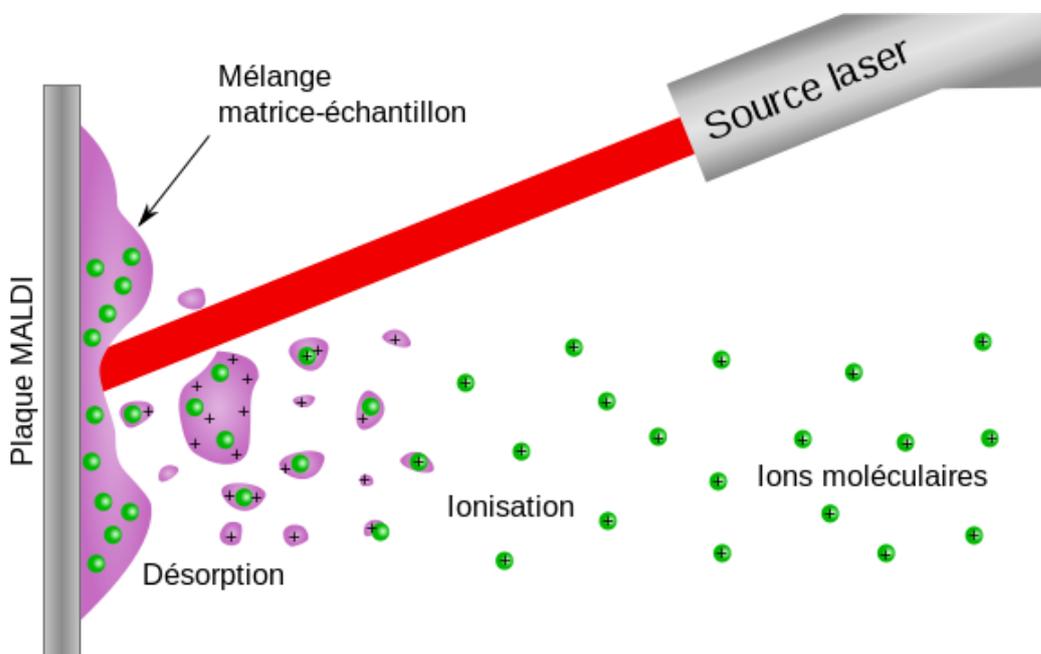


Figure 11 illustrant le principe du MALDI : désorption – ionisation au laser.

Illustration provenant de https://fr.wikipedia.org/wiki/Désorption-ionisation_laser_assistée_par_matrice.

Les protéines du schwannome ainsi ionisées sont propulsées dans l'analyseur et le spectromètre calcule le temps de vol de chaque protéine en fonction de son poids moléculaire. Une fois les ions arrivés au détecteur, le signal est amplifié et envoyé à un ordinateur relié au MALDI qui traite les données et les présente sous forme de spectre à l'aide d'un logiciel nommé FlexImaging (Bruker Daltonics). Les pics recueillis

correspondent à un ou plusieurs peptides/protéines et le spectrogramme ainsi obtenu reflète la moyenne du contenu protéique de l'ensemble de l'échantillon présent sur la lame analysée *et non* d'un site particulier ou d'une zone d'intérêt particulière sur la lame. Ce spectrogramme est par la suite à nouveau traité par le logiciel FlexImaging afin d'obtenir une imagerie MALDI. La sommation des spectres de chaque point de l'échantillon donne un spectre moyen. Pour une valeur m/z (masse/charge) particulière de ce spectre moyen, le logiciel permet de représenter grâce à une échelle de couleur l'intensité de son signal en chacun des points de l'échantillon. De la même manière, les caractéristiques morphologiques de l'imagerie MALDI sont la moyenne des spectres de couleur des peptides présents sur la lame et ne reflètent pas un spectre de couleur d'un peptide en particulier. Ceci s'appelle *Multiplex Imaging* en technique MALDI et combine tous les signaux peptidiques ionisés de la lame en question. Ceci permet d'obtenir une cartographie protéique semi-quantitative (teneur en protéines) du schwannome analysé.

Corrélation avec les critères histologiques du schwannome

La partie du schwannome fixée au formol a été analysée en anatomopathologie afin de pouvoir préciser ses caractéristiques histologiques (zones d'intérêt) : type du schwannome (Antoni A et Antoni B), densité cellulaire, noyaux hyperchromatiques, vascularisation tumorale, nécrose tumorale, présence d'hémorragie, présence de cellules inflammatoires, œdème tissulaire et enfin présence de filets nerveux sains résiduels. La présence d'hémorragie fût en plus objectivée par la coloration de Perls qui mettait en évidence des dépôts d'hémosidérine. En outre, une étude immunohistochimique a été réalisée pour tous les échantillons, principalement pour évaluer l'index de prolifération cellulaire, et ce à l'aide de l'anticorps anti-Ki67. L'antigène Ki67, équivalent du marqueur MIB-1 [22], est présent au niveau du noyau des cellules prolifératives et persiste tout au long des différentes phases du cycle cellulaire : G1, S, G2 et M ; Il est absent en phase G0. Il est détecté par l'anticorps anti-Ki-67 en immunohistochimie. L'index de marquage par le Ki-67 représente le pourcentage de noyaux colorés par l'anticorps anti-Ki-67.

Une lame miroir à la lame du schwannome frais-congelé, découpé et fixé sur la lame ITO, est colorée à l'HES et examinée au microscope par un anatomopathologiste

comme indiqué précédemment afin d'être certain de sa pertinence non seulement diagnostique : présence de tissu tumoral sur le plan de coupe, mais aussi technique : absence ou le minimum possible d'artéfacts acquis lors des manipulations de congélation et de section au cryostat. La lame ITO est préparée et analysée au MALDI pour l'obtention de son spectrogramme de masse et de son imagerie protéomique MALDI. Comme décrit précédemment sur la figure 10, pour chacun des points de l'échantillon tumoral, un spectre est donné ; la sommation de ces spectres réalise le spectre moyen de toute la lame analysée, illustré par la répartition spatiale des valeurs m/z.

Une fois la technique du MALDI terminée, la même lame analysée au MALDI est examinée au microscope par un anatomopathologiste après coloration à l'HES afin d'y préciser les zones d'intérêt histologique. Cet examen histologique est réalisé en aveugle, c'est-à-dire sans avoir connaissance de l'aspect morphologique à l'imagerie MALDI. Les résultats de l'imagerie sont ensuite comparés aux caractéristiques histologiques de l'échantillon afin de tenter de trouver une corrélation entre imagerie MALDI et anatomopathologie.

Des schwannomes provenant d'autres localisations (cervicaux, thoraciques, périphériques [membres]) ont servi de population comparative : ils étaient plus volumineux, ce qui reflète un temps de croissance plus long que le neurinome de l'acoustique à cause du plus grand espace disponible en extracrânien. Pour cette raison, il était intéressant de savoir si l'évolution longue du schwannome entraînait un spectrogramme protéique et une imagerie MALDI différents.

Dans un 2^{ème} temps, nous avons analysé selon la même technique des échantillons provenant de nerfs normaux. Ces nerfs ont été obtenus lors d'un geste chirurgical (chirurgie otologique, cervico-faciale ou thoracique) sans pour autant compromettre la fonction de l'organe innervé par ce nerf. En fait, il s'agissait de nerfs qui ne pouvaient être gardés ou qui étaient devenus non fonctionnels, donc inutiles.

Tous les nerfs dits normaux ont été analysés au préalable en anatomopathologie à l'aide d'une lame miroir avant de passer au MALDI afin de préciser l'absence de tout envahissement tumoral ou autre atteinte pathologique. Une fois la technique du MALDI terminée, la même lame est réexaminée au microscope après coloration à l'HES.

Une spectrométrie de masse MALDI puis une imagerie protéomique ont été réalisées. Les résultats ainsi obtenus ont été comparés à ceux des schwannomes. Cette comparaison avait pour but de caractériser certains pics protéiques au spectrogramme et de mettre en évidence certains aspects morphologiques de l'imagerie MALDI présents dans le schwannome et non dans le tissu nerveux sain.

Résultats

A- Données concernant les schwannomes et les nerfs sains

Cinquante schwannomes ont été prélevés et analysés. Trente-six étaient des schwannomes vestibulaires et 14 provenaient d'autres localisations. Sur les 50 schwannomes, **27 étaient exploitables pour l'étude** ; les 23 autres présentaient des imprécisions ou certaines données manquantes, comme par exemple la non correspondance entre la lame MALDI et la lame HE. Parmi les 27 schwannomes, **22** étaient des **schwannomes vestibulaires (SV)** et **5** provenaient **d'autres localisations** qui seront détaillées plus bas.

Les 22 SV provenaient de 8 femmes et 14 hommes, d'un âge moyen de 54,5 ans (22-76 ans). La distribution des stades du neurinome de l'acoustique selon la classification de KOOS était :

- stade I : 0 patient
- stade II : 9 patients
- stade III : 6 patients
- stade IV : 7 patients

Les SV ont été réséqués par voie translabyrinthique dans 17 cas, par voie rétrosigmoïde dans 4 cas et par voie rétrolabyrinthique dans 1 cas. L'analyse anatomopathologique affirmait dans tous les cas le diagnostic de schwannome (neurinome). En effet, après coloration à l'HES, l'analyse montrait d'une façon reproductible une tumeur bénigne, constituée de cellules fusiformes, d'agencement fasciculé (Antoni A dans 17/22 cas). Il coexistait également des cellules de forme arrondie avec des plages interstitielles qui prédominaient dans 5/22 cas (type B). Le cytoplasme était souvent mal délimité en fonction du plan de coupe ; il était en général éosinophile. Les noyaux étaient ovoïdes et parfois hyperchromatiques (condensés), mais ne

présentaient pas d'atypie ni d'activité mitotique notable. Le stroma pouvait être œdémateux, contenant souvent des cellules inflammatoires (13/22 cas), des trames de fibres collagènes, et des vaisseaux dont les parois pouvant être épaissies. Des dépôts d'hémosidérine pouvaient être mis en évidence dans 7/22 cas après coloration de Perls. L'hémosidérine étant un produit de dégradation de l'hémoglobine, reflétait la présence d'un saignement intra-tumoral. La nécrose tumorale n'était retrouvée que dans 1/22 cas. L'étude immunohistochimique à l'aide du marqueur de prolifération MIB1 (Ki67) montrait un indice de prolifération très faible (0,1 à 1%), sauf dans 2 cas où il était à 2% et 3%, mais restait considéré comme faible.

Le tableau I résume les données des 22 patients opérés de SV.

N°	Sexe	Âge chir	Date chir	Stade	Abord	Antoni	Indice prolif	Nécrose tumorale	Cellules inflamm	Hémosid
1=P25	M	42	10/03/2014	II	Translab	A	<0,1%	non	non	non
2=P26	F	70	02/04/2014	III	Translab	B	<0,1%	non	oui	non
3=P27	F	70	02/04/2014	III	Translab	B	<0,1%	non	oui	non
4=P29	M	39	30/10/2015	IV	Rétrosigm	A	<0,1%	oui	oui	non
5=P30	F	55	24/08/2015	II	Translab	A	<0,1%	non	non	non
6=P31	M	33	02/07/2014	II	Translab	A	3%	non	oui	non
7=P33	M	69	23/01/2017	IV	Rétrosigm	A	<1%	non	non	non
8=P34	M	33	06/03/2017	IV	Translab	B	<1%	non	oui	oui
9=P35	M	76	27/03/2017	IV	Rétrolab	A	<1%	non	non	non
10=P37	M	55	07/12/2011	III	Translab	A	<1%	non	non	non
11=P38	M	49	16/01/2012	IV	Translab	A	<1%	non	oui	non
12=P39	F	66	09/04/2014	II	Translab	A	<0,1%	non	non	non
13=P40	M	45	28/11/2008	III	Translab	B	<1%	non	oui	oui
14=P41	M	57	21/01/2009	II	Translab	A	<1%	non	non	non
15=P42	F	45	30/06/2009	II	Translab	A	<0,1%	non	oui	oui
16=P43	F	68	30/09/2009	II	Translab	A	<1%	non	non	non
17=P45	F	63	06/04/2011	III	Translab	A	<1%	non	oui	oui
18=P46	M	51	07/09/2011	II	Translab	A	<0,1%	non	oui	non
19=P47	M	22	12/09/2011	IV	Translab	A	<1%	non	oui	oui
20=P49	M	70	16/03/2016	II	Rétrosigm	A	<1%	non	oui	oui
21=P50	F	54	14/06/2017	IV	Translab	A	<1%	non	non	oui
22=P58	M	66	02/10/2017	III	Rétrosigm	B	2%	non	oui	non

Tableau I. Données des patients ayant été opérés d'un schwannome vestibulaire.

Âge chir = âge lors de la chirurgie. Date chir = date de la chirurgie. Stade = stade de la tumeur. Abord = voie d'abord chirurgicale. Translab = voie translabyrinthique. Rétrolab = voie rétrolabyrinthique. Rétrosigm = voie rétrosigmoïde. Antoni = type histologique d'Antoni. prolif = prolifératif. inflamm = inflammatoires. Hémosid = hémossidéine détectée après coloration de Perls.

Les 5 schwannomes provenant d'autres localisations (cervicaux, thoraciques et périphériques [membres]) étaient plus volumineux que les schwannomes vestibulaires, faisant tous plus de 30 mm de grand axe. Pour cette raison, ils servaient de population comparative pour le spectrogramme protéique et l'imagerie MALDI. Le tableau II résume les données des 5 patients opérés de schwannomes NON vestibulaires.

N°	Sexe	Âge chir	Date chir	Provenance	Antoni	Ind prolif	Nécrose tumorale	Cellules infl	Hémosid
1=P28	M	53	22/04/2014	plèvre	B	<1%	non	non	non
2=P32	M	56	19/01/2017	nerf ulnaire	B	<1%	non	oui	oui
3=P36	M	22	12/04/2017	nerf sciatique	B	3%	non	non	non
4=P44	M	19	28/01/2011	rétrolaryngé	B	<2%	non	non	non
5=P48	M	55	16/09/2011	muscle scalène	B	<1%	non	non	non

Tableau II. Données des patients ayant été opérés d'un schwannome NON vestibulaire. La classification d'Antoni étant propre aux schwannomes vestibulaires, il s'agit ici d'une « *assimilation* » à un type d'Antoni en fonction de la densité cellulaire et des cellules fusiformes (équivalent d'Antoni A) ou des plages interstitielles et des cellules arrondies (équivalent d'un type mixte à prédominance d'Antoni B).

Les nerfs normaux (sains) étaient au nombre de 11 et provenaient de 9 patients. Il faut insister sur le fait que tous les nerfs étaient macroscopiquement exempts de toute pathologie et que l'analyse anatomopathologique a montré un tissu nerveux strictement normal. Le tableau III résume les données des 11 patients chez qui les prélèvements nerveux ont été réalisés.

N°	Sexe	Âge chir	Date chir	Nerf	Type de chirurgie
1=P51	M	59	06/04/2017	plexus cervical pr	cervicotomie exploratrice post-curage
2=P52a	F	75	20/06/2017	grand auriculaire	parotidectomie (ad pléomorphe)
3=P52b	F	75	20/06/2017	grand auriculaire	parotidectomie (ad pléomorphe)
4=P53a	M	71	12/07/2017	corde du tympan	tympanoplastie otite chronique
5=P53b	M	71	12/07/2017	corde du tympan	tympanoplastie otite chronique
6=P54	M	62	08/09/2017	grand auriculaire	curage ganglionnaire cervical cou N0
7=P55	F	71	22/09/2017	plexus cervical pr	curage ganglionnaire cervical cou N0
8=P56	F	44	22/09/2017	intercostal	lambeau muscle grand pectoral
9=P57	M	81	29/09/2017	plexus cervical pr	curage ganglionnaire cervical cou N0
10=P59	M	63	03/10/2017	grand auriculaire	parotidectomie (tumeur de Whartin)
11=P60	F	51	11/09/2017	supratrochléaire	voie sourcilière sinus frontal

Tableau III. Provenance des 11 nerfs normaux. Pr = profond. Ad = adénome.

B- Corrélations entre MALDI et analyse histologique concernant les schwannomes vestibulaires et les schwannomes non vestibulaires (témoins)

B.1. Schwannomes vestibulaires

Pour chaque SV parmi les 22 analysés, nous avons réalisé des illustrations comparatives entre 1) l'image MALDI (spectre de couleur moyen) et 2) l'image histologique de la même lame à la fin de la technique MALDI après coloration HE, contenant le détail de l'analyse anatomopathologique. Les caractéristiques à l'imagerie MALDI et anatomopathologiques sont ainsi comparées côte à côte sur une même illustration (figures 12 et 13). N.B : concernant le spectre de couleur MALDI, le noir est le moins intense donc le moins riche en protéine et le blanc est le plus intense donc le plus riche en protéines. Nous avons montré en bas de chaque illustration le spectrogramme de masse moyen de l'échantillon.

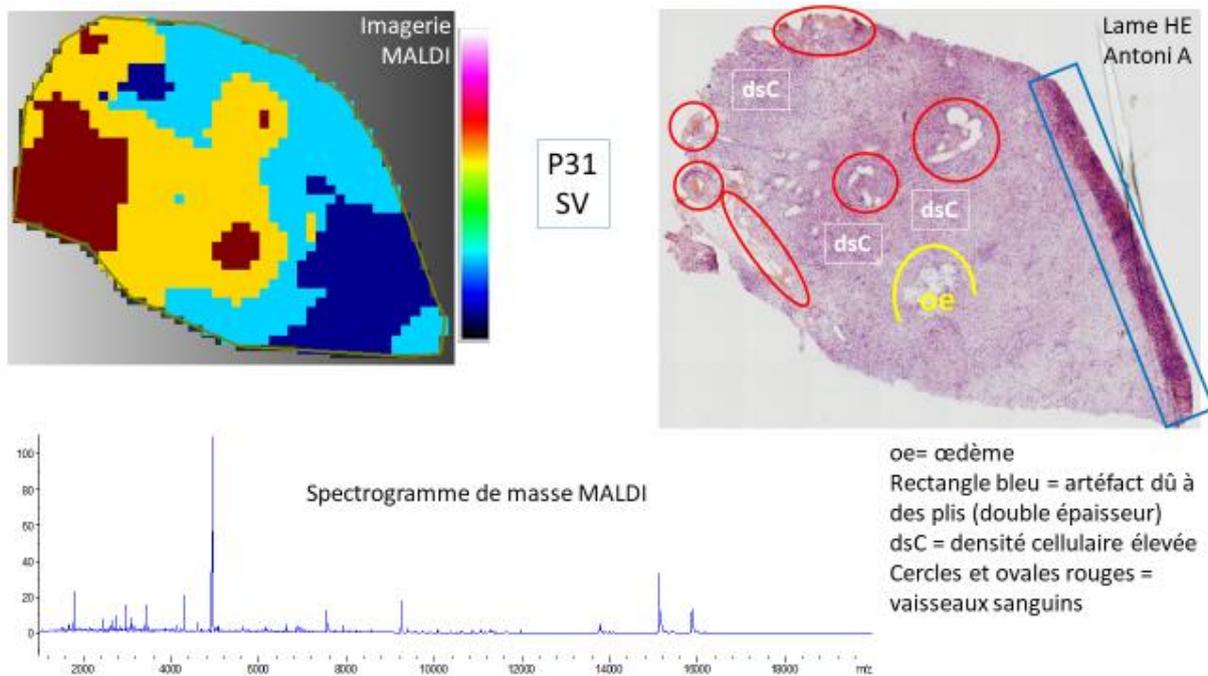


Figure 12 : Sur cet exemple de SV correspondant au patient 31, il existe une cohérence entre :

- Œdème et zone marron (signal quasi-absent en imagerie)
- Densité cellulaire et couleur jaune
- Zones cellulaires moins denses et couleur bleu

En revanche, nous n'avons pas retrouvé de cohérence entre :

- Vaisseaux sanguins et imagerie MALDI
- Artéfact (double épaisseur) et imagerie MALDI

On peut déduire sur cet échantillon qu'il existe une corrélation **partielle** entre l'imagerie MALDI et l'analyse anatomopathologique. A noter que sur le spectrogramme de masse moyen de ce SV, nous pouvons constater un pic maximal à 5000 m/z. Chaque pic correspond à une ou plusieurs protéine/peptide du schwannome analysé, puisqu'il s'agit d'un balayage des spectres peptidiques présents sur toutes les zones de l'échantillon. L'axe des ordonnées représente l'intensité relative du signal (concentration en peptides/protéines) et l'axe des abscisses indique la valeur m/z (rapport masse sur charge). Nous avons explorés en priorité les pics peptidiques ≥ 30 unités arbitraires (UA).

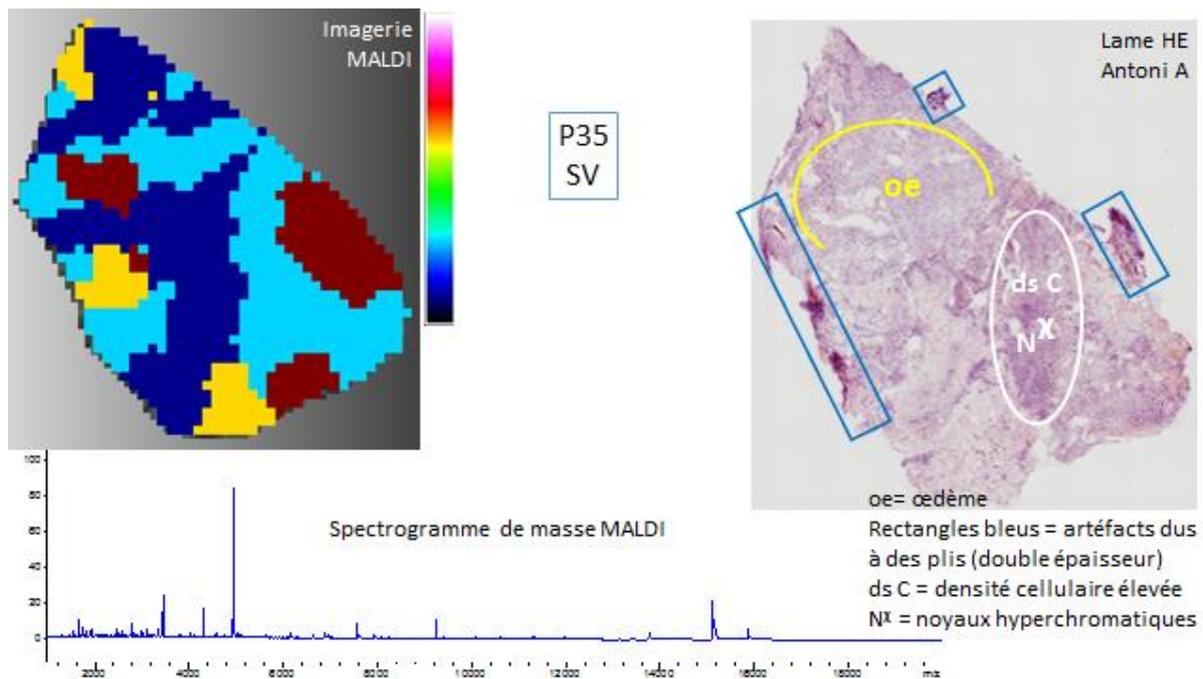


Figure 13 : sur cet exemple de SV correspondant au patient 35, il n'existe aucune cohérence entre les caractéristiques anatomopathologies et l'imagerie MALDI, à part et d'une façon probabiliste, une cohérence entre densité cellulaire avec noyaux hyperchromatiques et couleur bleu clair. On peut déduire qu'il n'existe pas sur cet échantillon de corrélation entre l'imagerie MALDI et l'analyse anatomopathologique. En plus, des zones de tissu tumoral qui sont homogènes sur la lame HE, paraissent hétérogènes sur l'imagerie MALDI (spectres de couleurs différents). En d'autres termes, il existe un polymorphisme en imagerie et en spectrométrie (diversité des pics) qui n'est pas retrouvé en histologie.

Le tableau IV ci-dessous décrit le nombre de SV ayant une corrélation entre l'imagerie MALDI et l'anatomopathologie, ainsi que la présence ou l'absence d'un pic ≥ 30 Unités Arbitraires (UA) à 2000 m/z, 5000 m/z ou sur une autre localisation.

N°	Corrélation	Pic à \approx 2000	Pic à 5000	Autre pic
1=P25	non	non	oui	
2=P26	oui	oui	oui	
3=P27	partielle	non	oui	
4=P29	non	non	oui	
5=P30	non	oui	oui	
6=P31	partielle	non	oui	15000
7=P33	non	non	oui	
8=P34	non	non	oui	
9=P35	non	non	oui	
10=P37	non	oui	oui	> 9000
11=P38	non	non	oui	> 9000
12=P39	non	non	oui	
13=P40	non	oui	oui	
14=P41	non	non	oui	
15=P42	non	non	oui	3000, >9000
16=P43	non	non	oui	3000
17=P45	partielle	non	oui	3000, >15000
18=P46	non	oui	oui	
19=P47	non	oui	oui	
20=P49	partielle	oui	oui	3000
21=P50	non	non	oui	
22=P58	oui	non	Non	3500
Total	2 oui, 4 partielle	7 oui	21 oui	

D'après le tableau IV, on peut déduire que dans seulement 2 cas (9,1%), il existait une corrélation quasi totale entre l'imagerie MALDI et l'anatomopathologie, dans 4 cas (18,2%) une corrélation partielle et dans 16 cas (72,7%) aucune corrélation.

Quant aux pics peptidiques, ils étaient présents sur les 2000 m/z dans 7 cas (31,8%) et sur les 5000 m/z dans 21 cas (95,5%). Concernant le pic à 2000, nous n'avons pas trouvé de lien entre les aspects histologiques et la présence ou l'absence de ce pic. Le seul SV qui ne présentait pas de pic à 5000 présentait une forte corrélation anatomopathologie – imagerie MALDI et un index de prolifération à 2%, donc légèrement plus élevé que la moyenne des autres SV.

B.2. Schwannomes d'autres localisations (non vestibulaires)

Pour chaque schwannome non vestibulaire (SNV) parmi les 5 analysés, nous avons réalisé des illustrations comparatives entre 1) l'image MALDI et 2) l'image histologique de la même lame à la fin du MALDI après coloration HE, avec le détail de l'analyse anatomopathologique. (figures 14 et 15).

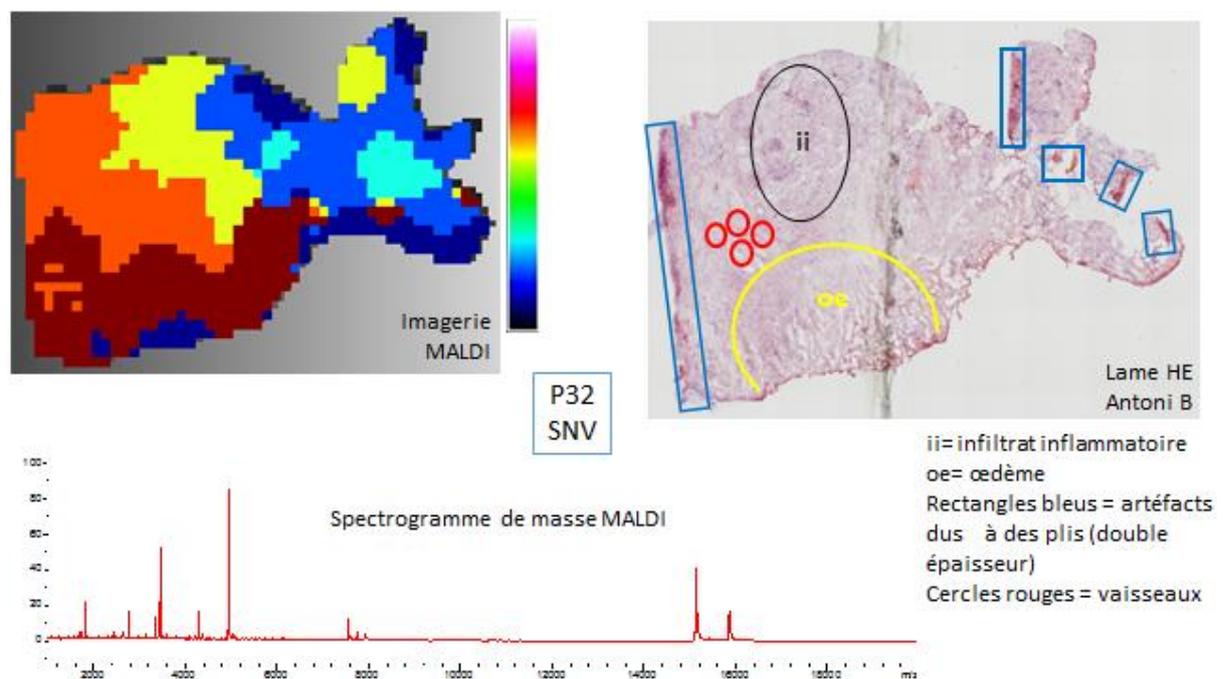


Figure 14 : Sur cet exemple de SNV correspondant au patient 32, il existe une cohérence entre :

- Œdème et couleur marron
- Vaisseaux sanguins et couleur orange
- Cellules inflammatoires et couleur jaune

En revanche, nous n'avons pas retrouvé de cohérence entre :

- Artéfacts (double épaisseur) et imagerie MALDI
- Tissu tumoral et imagerie MALDI

On peut déduire que la corrélation est **partielle** entre l'imagerie MALDI et l'anatomopathologie sur cet échantillon. Des zones de tissu tumoral paraissant homogènes sur la lame HE, paraissent hétérogènes sur l'imagerie MALDI (spectres de couleurs différents) et en spectrométrie de masse (diversité de pics peptidiques).

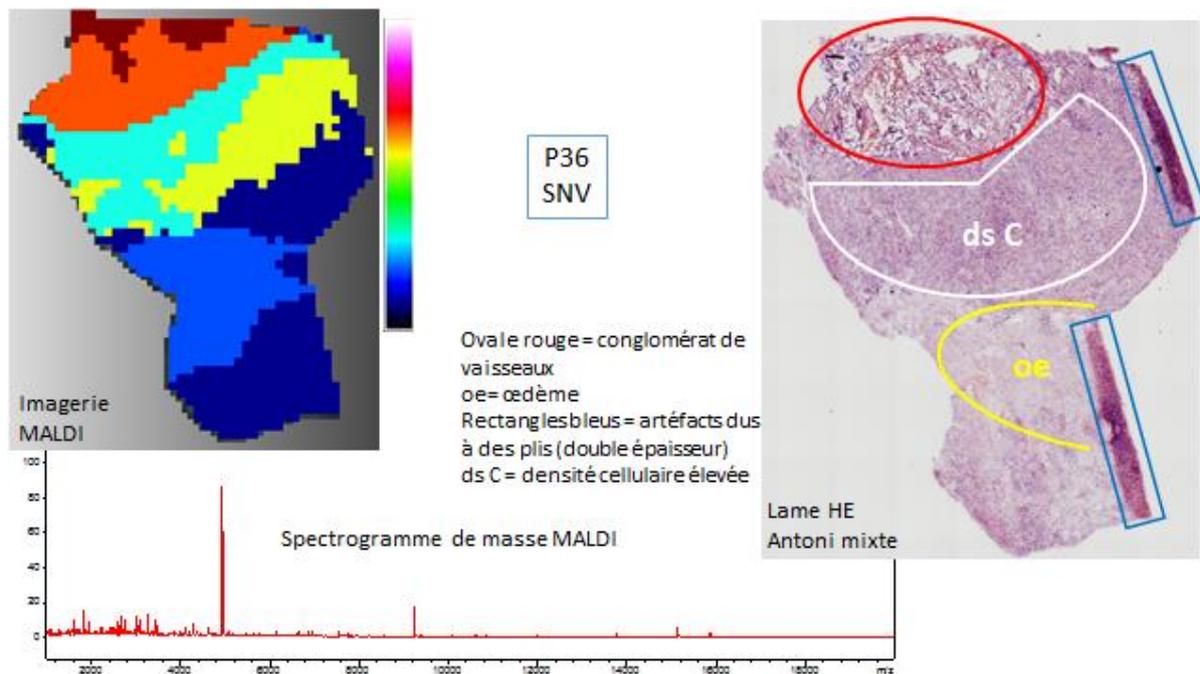


Figure 15 : Sur cet exemple de SNV correspondant au patient 36, il existe une cohérence entre :

- Vaisseaux sanguins et couleur orange
- Œdème et couleur bleu
- Densité cellulaire élevée et couleurs claires (bleu turquoise et jaune)

On peut donc considérer qu'il existe sur cet échantillon une forte corrélation entre l'imagerie MALDI et l'anatomopathologie, car toutes les caractéristiques histologiques sur la lame HE correspondent bien à des spectres de couleur différents sur le MALDI.

Le tableau V ci-dessous décrit le nombre de SNV ayant une corrélation entre l'imagerie MALDI et l'anatomopathologie, ainsi que la présence ou l'absence d'un pic ≥ 30 Unités Arbitraires (UA) à 2000 m/z, 5000 m/z ou sur une autre localisation.

N°	Corrélation	Pic à ≈2000	Pic à 5000	Autre pic
1=P28	oui	non	oui	
2=P32	partielle	non	oui	3500, 15000
3=P36	oui	non	oui	
4=P44	oui	oui	oui	3500
5=P48	non	oui	oui	>4000
Total	3 oui, 1 partielle	2 oui	5 oui	

D'après le tableau V, on peut déduire que dans 3 cas, il existait une corrélation quasi totale entre l'imagerie MALDI et l'anatomopathologie (60%), dans 1 cas (20%) une corrélation partielle et dans 1 cas (20%) aucune corrélation n'était constatée.

Quant aux pics peptidiques, ils étaient présents sur les 2000 m/z dans 2 cas (40%) et sur les 5000 m/z dans 5 cas (100%). Nous n'avons pas trouvé de lien entre les aspects histologiques et la présence ou l'absence du pic à 2000.

On peut donc conclure que le pic peptidique à 5000 m/z est reproductible sur la quasi-totalité des schwannomes, qu'ils soient vestibulaires ou d'autres localisations.

C-Corrélations entre MALDI et analyse histologique concernant les nerfs sains

Pour chaque nerf sain (nf s) parmi les 11 analysés, nous avons réalisé des illustrations comparatives entre 1) l'image MALDI et 2) l'image histologique de la même lame à la fin du MALDI après coloration HE, avec le détail de l'analyse anatomopathologique, en y ajoutant le spectrogramme de masse correspondant (figure 16).

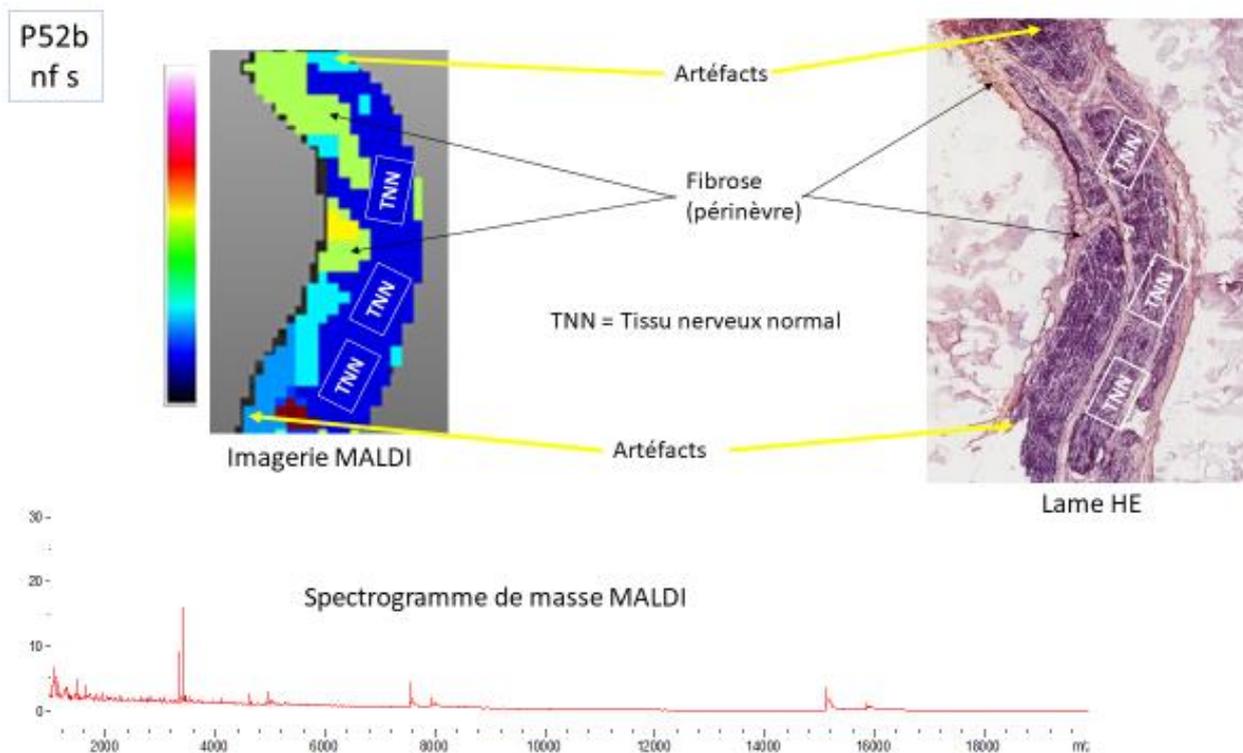


Figure 16 : Sur cet exemple de nerf sain correspondant au patient 52, il existe également une forte cohérence entre :

- Tissu nerveux normal et couleur bleu
- Périnèvre (tissu fibreux) et couleur vert clair
- Artéfacts (arrachement et plis) et couleur bleu ciel

Pour cet échantillon de nerf sain, on peut donc considérer qu'il existe une corrélation quasi-totale entre l'imagerie MALDI et l'anatomopathologie, puisque toutes les caractéristiques histologiques sur la lame HE correspondent bien à des spectres de couleur différents et reproductibles sur le MALDI. En revanche, le polymorphisme sur l'imagerie et sur le spectrogramme est beaucoup moins visible que dans les schwannomes (SV et SNV).

Le tableau VI ci-dessous décrit le nombre de n f s ayant une corrélation entre l'imagerie MALDI et l'anatomopathologie, ainsi que la présence ou l'absence d'un pic ≥ 30 Unités Arbitraires (UA) à 2000 m/z, 5000 m/z ou sur une autre localisation.

N°	Corrélation	Pic à ≈2000	Pic à 5000	Autre pic
1=P51	oui			
2=P52a	oui			
3=P52b	oui			
4=P53a	oui			
5=P53b	oui			
6=P54	non			
7=P55	oui			
8=P56	partielle			
9=P57	oui			
10=P59	oui			
11=P60	oui			
Total	9 oui, 1 partielle			

D'après le tableau VI, on peut déduire que dans 9 cas (81,8%), il existait une corrélation quasi-totale et reproductible entre l'imagerie MALDI et l'anatomopathologie, dans 1 cas (9,1%) une corrélation partielle et dans seulement 1 cas (9,1%) aucune corrélation n'était constatée. Quant aux pics peptidiques, il n'en existait **aucun significatif** sur les 2000 m/z ni sur les 5000 m/z ni d'ailleurs sur tout autre localisation.

En conclusion, le tissu nerveux sain a montré une très faible intensité (couleur bleu) à l'imagerie MALDI alors même que le périnèvre (tissu fibreux) avoisinant montrait des intensités bien plus importantes (vert clair, voire jaune par endroits). Ceci serait expliqué par l'absence de nombreuses protéines (ou peptides) présentes dans le schwannome et absentes dans le nerf normal, d'où également l'absence de pic peptidique significatif au spectrogramme de masse.

Par ailleurs, et à l'examen histologique, outre l'absence de tissu tumoral dans les nerfs sains, il n'a pas été noté la présence de cellules inflammatoires.

D- Dénominateur commun pour tous les schwannomes (SV et SNV)

Nous avons constaté sur les 22 SV et 5 SNV que des zones homogènes sur les lames HE correspondaient à des sites assez hétérogènes en spectrométrie de masse et en imagerie MALDI. Autrement dit, derrière un monomorphisme tissulaire en analyse anatomopathologique, il existe un polymorphisme protéomique jusque-là non révélé dans ces tumeurs qui ont toujours été considérées assez uniformes sur le plan

histologique et clinique, voire même radiologique, à part les schwannomes kystiques. Les figures 17 et 18 montrent un exemple d'homogénéité histologique confrontée à une hétérogénéité protéomique sur un SV et un SNV, respectivement.

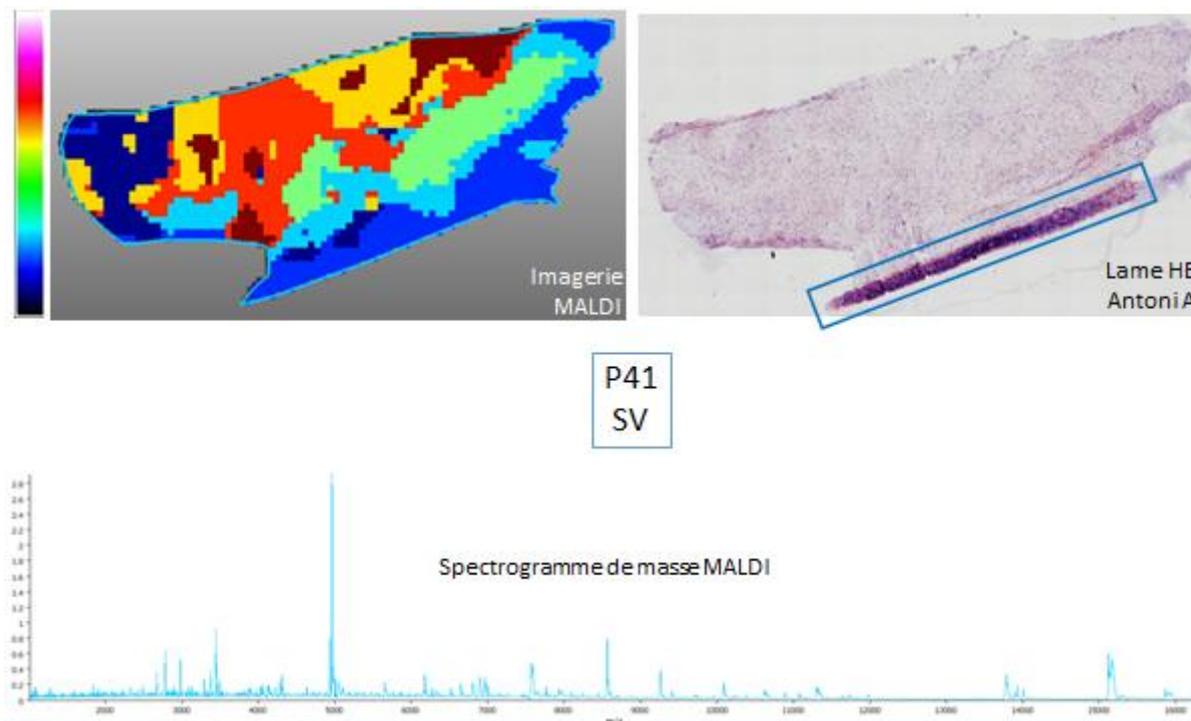


Figure 17 : Sur cet exemple de SV correspondant au patient 41, on peut voir sur la lame HE et en éliminant l'artéfact (rectangle bleu) un tissu homogène et monomorphe alors que le MALDI montre un polymorphisme très important : hétérogénéité sur l'image MALDI et large spectre de nombreux pics peptidiques sur le spectrogramme de masse.

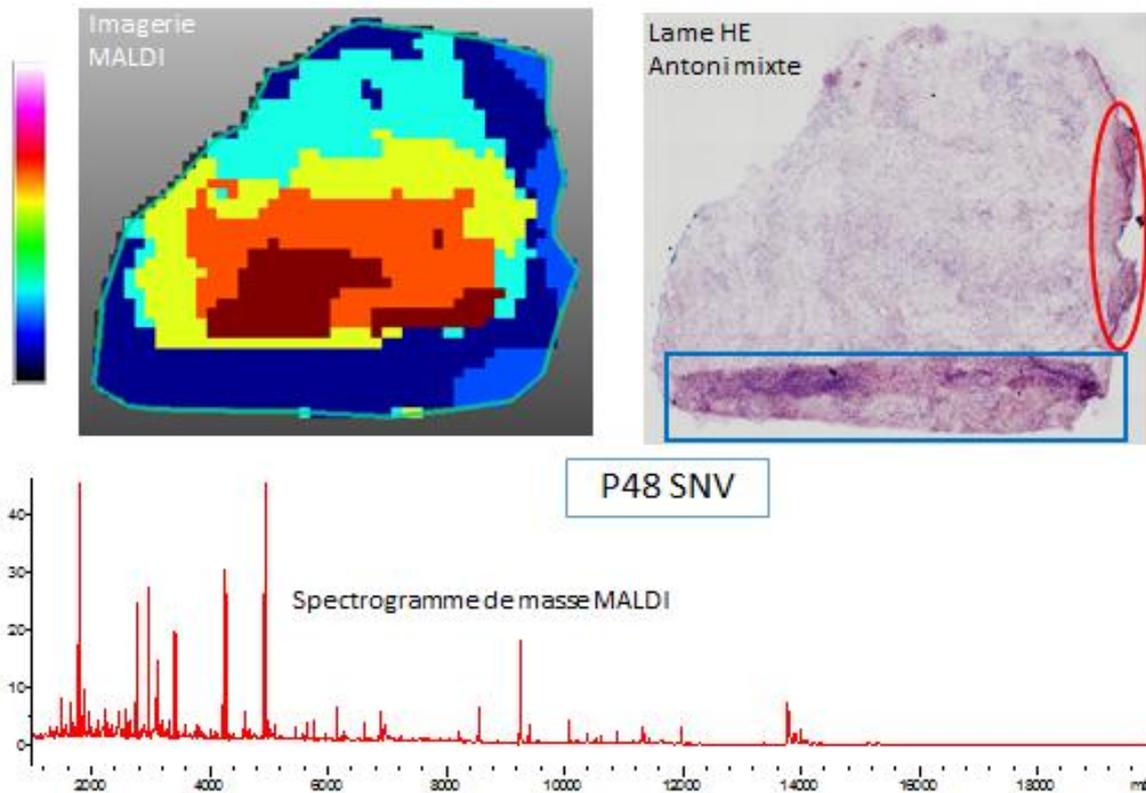


Figure 18 : Sur cet exemple de SNV correspondant au patient 48, on peut voir sur la lame HE et en éliminant l'artéfact (rectangle bleu) et la zone vascularisée (ovale rouge) un tissu homogène et monomorphe alors que le MALDI montre un polymorphisme très important : hétérogénéité sur l'image MALDI et large spectre de nombreux pics peptidiques sur le spectrogramme de masse.

En revanche, sur les nerfs sains, nous n'avons pas retrouvé un tel polymorphisme puisque le monomorphisme tissulaire se reproduisait également sur les images MALDI. Quant au spectrogramme de masse, il était beaucoup moins hétérogène et moins riche en pics peptidiques que celui des schwannomes (figures 19 et 20).

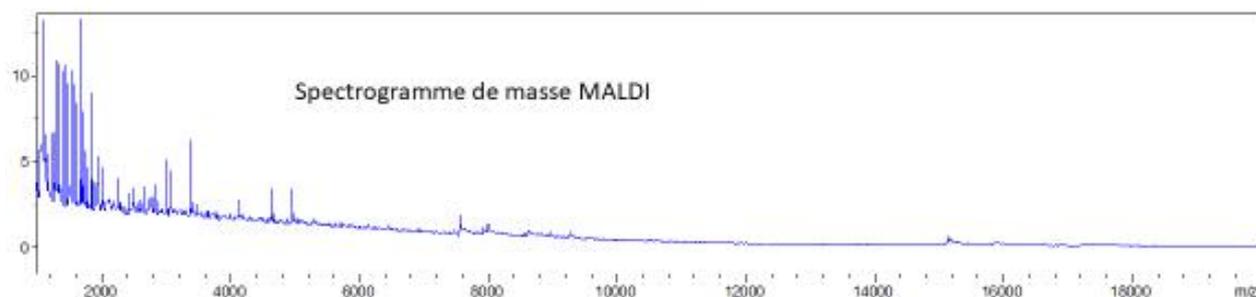
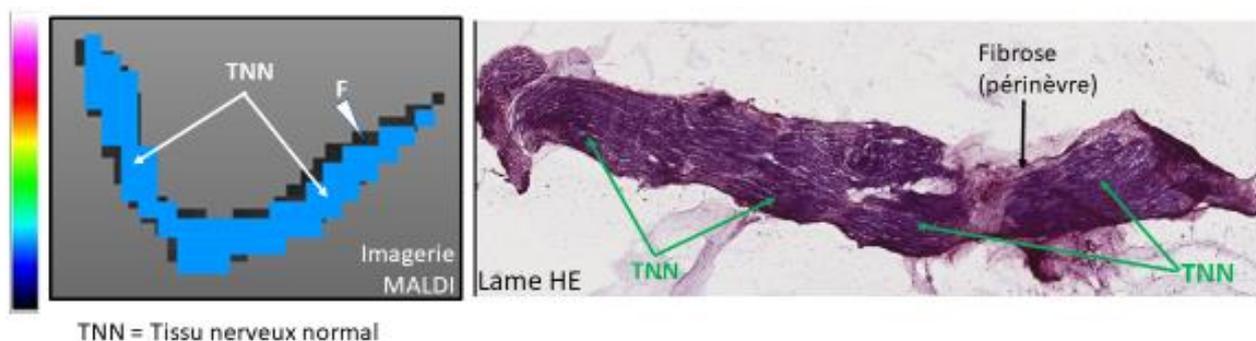


Figure 19 : Sur cet exemple de nerf sain correspondant à l'échantillon 53a, on peut voir sur la lame HE un tissu homogène et monomorphe à part une petite zone de fibrose. De la même manière, l'image MALDI est très homogène avec la couleur bleue largement dominante. Le spectrogramme de masse montre un spectre pauvre en pics peptidiques, comparé à celui des neurinomes ; Les pics présents avant 2000 m/z correspondent à des artefacts. F = fibrose.

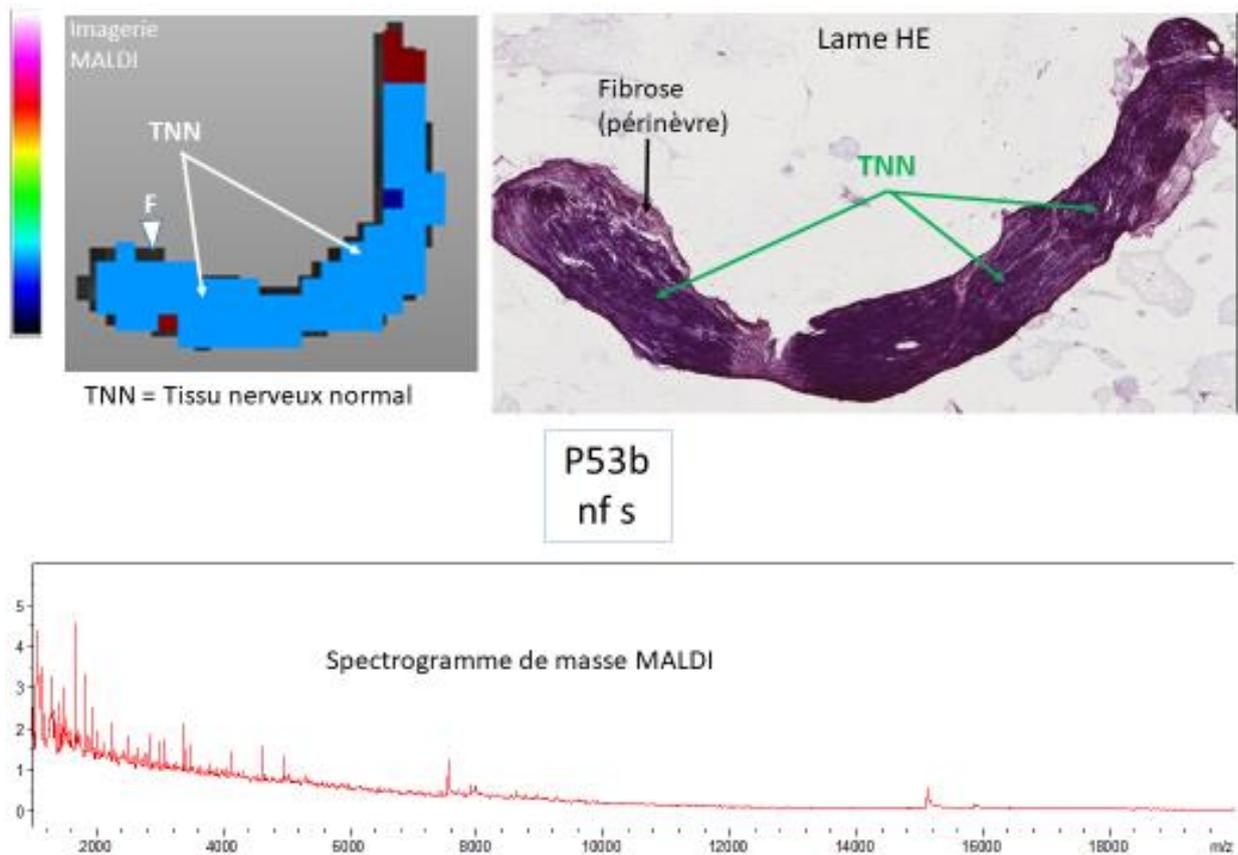


Figure 20 : Sur cet exemple de nerf sain correspondant à l'échantillon 53b, on retrouve les mêmes constatations que sur l'échantillon P53a : monomorphisme histologique et protéomique.

Discussion

Le schwannome vestibulaire est une tumeur qui est désormais bien codifiée sur le plan diagnostique et thérapeutique. Le diagnostic repose sur la clinique et l'imagerie en préopératoire. Il est étayé par l'aspect macroscopique en peropératoire, mais ne peut être objectivé d'une façon certaine qu'après analyse anatomopathologique en postopératoire.

L'intérêt du MALDI est double :

- Une lame de schwannome peut avoir un aspect histologique assez homogène après avoir éliminé les artéfacts mécaniques mais présenter un aspect hétérogène sur l'imagerie MALDI. Il s'agit là d'un complément à l'analyse anatomopathologique pouvant montrer dans le futur des variantes jusque-là non décelées et par conséquent déchiffrer de nouvelles caractéristiques morphologiques du schwannome, puisque derrière le monomorphisme histologique du schwannome, et dans une certaine mesure clinique et radiologique, nous retrouvons un polymorphisme et une grande diversité dans le profil protéomique du schwannome par rapport au tissu nerveux sain.
- Le MALDI-TOF est une méthode spectrométrique de masse capable de fragmenter les biomolécules d'un tissu sans avoir besoin d'une digestion enzymatique au préalable. L'imagerie MALDI est une technique qualitative montrant la distribution au sein du tissu (donc *in situ*) des différentes biomolécules en fonction de leur contenu protéique : plus la zone tissulaire est riche en protéines, plus elle sera intense en imagerie [17]. A noter que les pics obtenus au spectrogramme correspondent à des peptides qui pourraient être identifiés par des procédés récents mais cela dépasse le cadre de notre étude. A l'encontre du spectrogramme et de l'imagerie du MALDI, l'analyse anatomopathologique ne peut identifier des protéines, sauf si certaines d'entre elles, déjà connues, sont recherchées en immunohistochimie.

Par ailleurs, nous cherchions à savoir si des zones d'intérêt en analyse anatomopathologique (type d'Antoni, dépôts d'hémosidérine, noyaux hyperchromatiques, cellules inflammatoires, vaisseaux sanguins, oedème) avaient d'une façon assez reproductible le même aspect en imagerie MALDI. Ceci ne fut pas le cas pour les SV, puisque parmi les 22 échantillons analysés, seuls 2 présentaient une corrélation quasi-totale et 4 une corrélation partielle. En revanche, les SNV ont présenté plus fréquemment une corrélation MALDI-anatomopathologie et les nerfs normaux présentaient cette corrélation dans la grande majorité des cas. Le nombre d'échantillons des SNV étant limité, il est difficile d'en tirer des conclusions certaines, mais il semble que la corrélation est beaucoup plus importante dans les schwannomes d'autres localisations que dans les schwannomes vestibulaires. Une explication à ces résultats serait que les SNV, étant localisés dans des endroits plus spacieux que l'angle ponto-cérébelleux, ont eu le temps d'évoluer plus longtemps que les SV et auraient probablement exprimé des biomolécules (peptides, protéines) non présentes dans le SV. En d'autres termes, le SV, même les stades III et IV, reste une forme peu évoluée et « précoce » du schwannome en général. Il est connu que le schwannome a une croissance très lente avec un index de prolifération très bas [22]. Un autre élément en faveur de cette hypothèse est le fait que tous les SNV sont assimilables au type Antoni mixte à prédominance du type B ; cela laisse penser à des remaniements intra-tumoraux et des phénomènes vasculo-exsudatifs liés à l'évolution du schwannome, menant à la formation d'espaces interstitiels assez larges et lâches (densité cellulaire faible) entraînant un effet de masse local qui se manifeste par les signes cliniques révélateurs du schwannome.

Un écueil du MALDI est que le degré de précision est moindre que sur une lame histologique. Ce manque de précision a été retrouvé surtout en cas d'absence de corrélation imagerie MALDI – anatomopathologie, mais aussi dans les cas de corrélation partielle, voire dans quelques rares cas de corrélation considérée totale. L'imprécision est probablement liée aux microtraumatismes que subit l'échantillon de schwannome depuis sa préparation jusqu'à sa manipulation dans le MALDI : la conservation du tissu tumoral à -80°C entraîne la cristallisation des molécules aqueuses intra-tumorales bien que l'échantillon envoyé à l'état frais pour congélation paraisse sec. En outre, la section au cryomicrotome, même avec un opérateur bien expérimenté, peut entraîner des micro-lacérations au sein de l'échantillon tissulaire,

sans compter que le plan de coupe peut ne pas être superposable au plan axial de l'échantillon. Par ailleurs, le méthanol, la matrice acide et le faisceau laser pourraient avoir un effet néfaste, même infime, sur les tissus, d'autant plus que l'échantillon est séché et par conséquent toute l'énergie du laser est absorbée par les tissus, en sachant que la contrainte thermique est censée être minime. Cet effet néfaste ne doit pas être généralisé à toutes les analyses du MALDI mais il toucherait au moins une partie des lames préparées comme nous avons pu le constater sur nos propres échantillons. Un autre élément expliquant l'imprécision de l'imagerie MALDI serait le manque de résolution spatiale (en général 25-50 μm) des images récupérées qui reste une limitation connue de cette technologie et que l'on tente d'améliorer [23]. Un dernier facteur responsable de l'imprécision de l'imagerie MALDI est le manque de sensibilité de cette technique : seule une partie des protéines volatilisées (ayant subi la désorption) pourra s'ioniser par la matrice ; autrement dit, un certain pourcentage des protéines de l'échantillon du schwannome seront détectées au final par le MALDI ; ceci s'applique aussi bien sur le spectromètre de masse que sur l'imagerie [23].

Par ailleurs, l'altération des tissus après congélation, préparation et passage au MALDI pourrait non seulement favoriser l'imprécision de l'imagerie MALDI, mais aussi rendre plus difficile l'interprétation anatomopathologique de ces tissus. En effet, la congélation tissulaire à elle seule causerait des artefacts de cristallisation rendant la qualité optique de l'examen histologique moindre que sur un tissu fixé non congelé. Par la suite, les microtraumatismes tissulaires décrits précédemment provoquent une altération des tissus pouvant être responsables d'une interprétation anatomopathologique relativement moins précise comparée à un tissu non manipulé. La figure 21 montre un exemple d'altération tissulaire après préparation et passage au MALDI : cette altération affecte la précision de l'imagerie MALDI, et rend plus délicate l'interprétation histologique du tissu altéré.

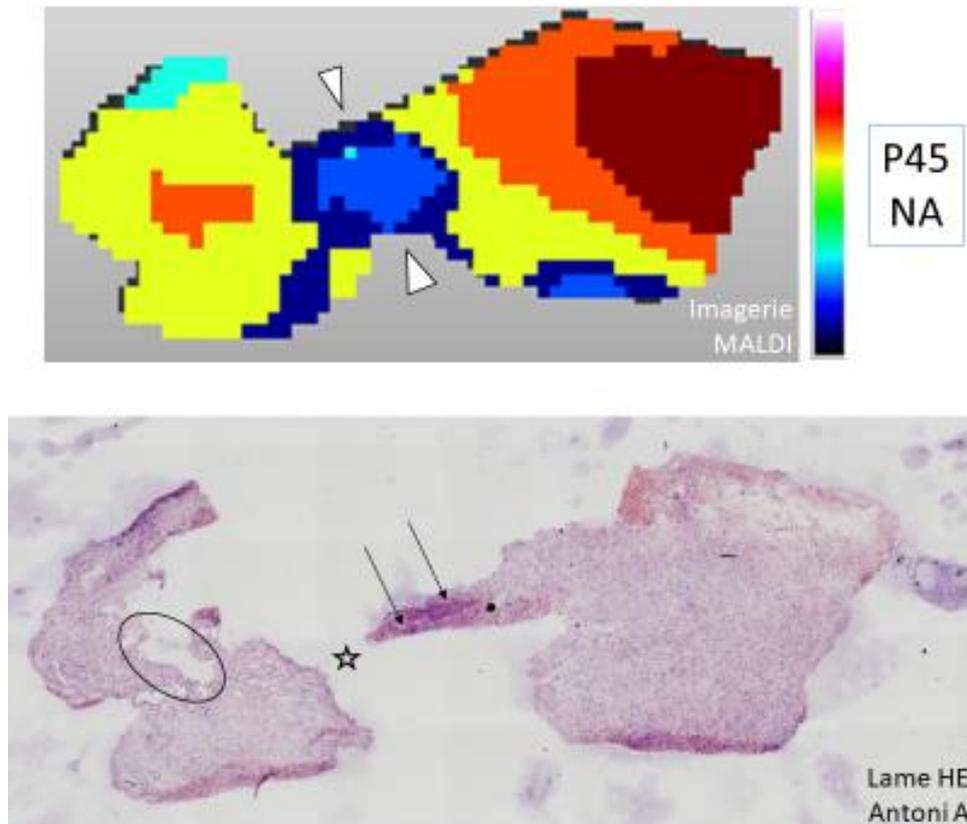


Figure 21. Illustration des altérations affectant la qualité de l'imagerie MALDI et de la lame HE dans l'échantillon 45 (SV). Têtes de flèche = image virtuelle (bleu) puisqu'il n'existe pas de tissu à ce niveau ; étoile = le tissu a été sectionné en deux alors qu'il était intact avant manipulation et passage au MALDI ; deux flèches = artéfact lié à un pli entraînant une double épaisseur ; ovale = artéfact lié à une cavitation dans le tissu.

S'agissant de notre première expérience dans la préparation et la manipulation du schwannome et du nerf normal, nous travaillons à améliorer toutes les étapes de notre technique afin de pouvoir augmenter la précision de nos résultats.

Dans la population des nerfs normaux, une corrélation imagerie MALDI – anatomopathologie a été retrouvée dans tous sauf un seul cas. Une fois de plus, il s'agit là d'un tissu ayant atteint sa « maturité » et bien évolué dans le temps. La répartition des peptides/protéines a été homogène et assez reproductible sur 10 des 11 échantillons, avec une bonne corrélation entre le spectre de couleur sur l'imagerie et les variantes sur la lame histologique : périnèvre, tissu nerveux sain et artéfacts de préparation.

Sur les échantillons de schwannome **où la corrélation imagerie MALDI – anatomopathologie était forte**, les variantes histologiques montraient d'une façon assez reproductible le même spectre de couleur :

- Cellules inflammatoires : couleur claire (jaune) très probablement à cause de la sécrétion de protéines de l'inflammation.
- Œdème : couleur foncée (marron ou bleu) en raison de la présence d'un tissu lâche avec peu de protéines.
- Vaisseaux sanguins : couleur très claire (orange) probablement à cause des protéines adhérant aux parois vasculaires.
- Hémorragie : couleur foncée (marron) en raison de la présence de globules rouges non lysés (pas de sécrétion de protéines).
- Tissu tumoral dense : couleurs claires (bleu ciel et jaune).
- Tissu tumoral lâche : couleurs plus foncées (bleu) car moins riche en protéines.

A rappeler que nous n'avons pas retrouvé de spectre spécifique à la présence des noyaux hyperchromatiques.

Notre travail, en plus d'être l'un des rares à analyser le spectre protéomique du SV, son originalité réside dans le fait qu'il soit, à notre connaissance, le premier à utiliser l'**imagerie** protéomique MALDI dans le schwannome et le premier à en avoir recherché la corrélation entre imagerie protéomique et caractéristiques anatomopathologiques. Par ailleurs, nous avons comparé l'imagerie protéomique du schwannome avec celle du nerf normal. Notre étude est **descriptive** et ne vise pas à montrer sa supériorité à l'analyse anatomopathologique qui reste l'examen ultime pour confirmer ou infirmer un diagnostic pathologique. Certains résultats ont été décevants, en particulier dans le SV où peu de corrélation a été retrouvée entre l'imagerie MALDI et l'analyse anatomopathologique. Ces résultats pourraient être expliqués par la précocité d'évolution du SV par rapport au SNV et au nerf sain où une corrélation beaucoup plus importante a pu être constatée. Cette bonne corrélation ainsi que la bonne reproductibilité des aspects morphologiques sur l'imagerie correspondant à des zones d'intérêt bien précises du SNV et du nerf sain sont les éléments encourageants de notre étude. Un autre élément très encourageant est la découverte du polymorphisme protéomique en imagerie et en spectrométrie au sein d'une même

coupe tissulaire présentant un monomorphisme histologique. A côté de cette hétérogénéité protéomique des schwannomes qui n'est pas retrouvée dans les nerfs normaux, les spectrogrammes nous montrent un pic aux alentours de 5 kDa (5000m/z) qui est présent dans le schwannome et qui n'est jamais retrouvé dans le nerf normal. Ce résultat est important puisqu'il apporte une signature potentielle de la transformation du schwannome. Une analyse spécifique serait utile pour l'identifier.

L'analyse protéomique au MALDI nous a permis d'identifier certaines zones riches en protéines (en imagerie) ou certaines protéines/peptides (au spectrogramme de masse). Les caractéristiques morphologiques à l'imagerie ayant pu être corrélées à des zones d'intérêt précises, pourraient servir d'éléments de référence pour d'autres schwannomes. Ceci ouvre la perspective de possibles biomarqueurs et acteurs physiopathologiques qu'il faudra purifier et identifier par séquençage et en interrogeant sur les bases de données BLAST ou MASCOT. Ces biomarqueurs, s'ils peuvent être identifiés, pourraient être traités par des thérapies ciblées, visant par exemple à contrôler la croissance d'un reliquat de schwannome après chirurgie d'exérèse subtotale.

La revue de la littérature sur l'analyse protéomique des schwannomes vestibulaires retrouve peu d'articles sur ce sujet et aucun article sur l'imagerie MALDI. Une étude (Kazemizadeh Go et al. 2016) [20] analysant le liquide cébrospinal (LCS) des patients opérés d'un SV a montré une modification de la concentration (dérégulation) de 13 protéines identifiées en spectrométrie de masse, par rapport au LCS de patients non porteurs de SV. Par ailleurs, et parmi les SV, 13 autres protéines étaient dérégulées chez les patients avec un statut auditif classe D, comparé au statut auditif classe B selon la classification de *l'American Academy of Otolaryngology-Head & Neck Surgery* [24]. Seo et al. (2014) [18] ont comparé l'analyse protéomique du SV avec celle du nerf normal par spectrométrie de masse à l'aide du MALDI-TOF. Vingt-neuf protéines étaient dérégulées dans le SV, dont 7 liées à l'apoptose. Certaines accélèrent l'apoptose et les autres l'inhibent, ce qui expliquerait la croissance assez lente du schwannome. Ceci expliquerait également la présence de deux types de schwannome : Antoni A et Antoni B, ce dernier étant considéré une dégénérescence apoptotique du type A. L'expression excessive des protéines liées à l'apoptose serait responsable de cette dégénérescence [18]. Seo et al. [18] se sont basés sur les travaux d'Abe et al. (2000) [22] qui ont utilisé la technique TUNEL (*Tdt-mediated dUtp-*

biotin Nick-End Labeling) pour objectiver la présence d'apoptose dans les schwannomes, en plus de la détection de macrophages qui réalisent la phagocytose des cellules apoptotiques [22]. Par contre, dans notre étude, la présence assez fréquente d'infiltrats inflammatoires reflète au moins en partie un début de nécrose tumorale plutôt qu'une apoptose, même si de véritables foyers de nécrose (résultat ultime du processus) n'ont été objectivés que dans un seul cas. En fait, la nécrose implique des phénomènes inflammatoires qui l'accompagnent alors que ces phénomènes n'existent pas dans l'apoptose qui par définition est la mort programmée des cellules. Martiane et al. (2012) [21] ont réalisé une analyse protéomique par MALDI-TOF sur une lignée cellulaire de schwannome ; il a été constaté une dérégulation de 6 protéines impliquées dans la signalisation de récepteurs de schwannomes nommés P2Y ; ces récepteurs ont pu être ciblés par l'UTP (Uridine Tri-Phosphate) qui a entraîné une déformation des cellules de Schwann [21].

La spectrométrie de masse existe depuis plus de 50 ans, mais c'est à la fin des années 1990 que R. Caprioli a trouvé les applications de l'imagerie MALDI dans l'analyse des biomolécules dans les coupes tissulaires [19, 25]. Son intérêt actuel s'étend à l'oncologie, l'anatomopathologie, la pharmacologie et même la chirurgie [26]. Selon Addie et al (2015), l'avantage du MALDI est que la coupe tissulaire reste intacte, même après analyse spectrométrique, permettant ainsi une analyse histologique et une imagerie sur la même lame [26]. Dans notre expérience, bien que certaines de nos lames ont subi des microtraumatismes et des petites déformations lors de la préparation et du passage au MALDI, nous avons réussi à réaliser une comparaison directe entre les caractéristiques morphologiques et les éléments histologiques de la même coupe tissulaire.

Selon les mêmes auteurs [26], un autre avantage du MALDI est l'imagerie de multiples molécules non identifiées dans une coupe tissulaire. Ceci entraîne une connaissance de la distribution moléculaire dans une structure tissulaire microscopique. Par exemple, une section tissulaire contenant du tissu sain et du tissu tumoral présents sur une même lame microscopique montrera un spectrogramme de masse différent (*cell-type-specific molecular profile*) et une imagerie MALDI distincte (*cell-type-specific spectral profile*) [26]. L'analyse histologique et l'analyse spectrométrique peuvent par la suite être corrélées aux données cliniques. Dans notre expérience, nous n'avons pas pu comparer sur une seule et même lame les aspects morphologiques au MALDI

d'un schwannome et d'un nerf normal, mais comme le montrent nos résultats, il sera facile de distinguer un tissu tumoral d'un tissu sain car ces deux tissus ont présenté des caractéristiques très différentes au spectrogramme de masse (absence de pic à 5000 m/z pour le nerf sain) et en imagerie MALDI (spectres de couleur très hétérogène pour le schwannome et homogène pour le nerf sain).

En outre, et au sein même du tissu tumoral, l'imagerie MALDI peut différer d'une zone à l'autre alors que l'aspect histologique est le même, comme discuté précédemment et comme le montre les figures 17 et 18. Par conséquent, l'imagerie MALDI peut révéler des zones moléculaires différentes dans une zone paraissant homogène histologiquement, d'où l'avantage de cette technique par rapport à l'histologie dans ce domaine, nommé « *intrasample molecular details beyond histology* » dans la littérature anglo-saxonne [26]. Cette capacité à trouver des différences moléculaires à l'intérieur du même tissu histologique a été nommée « microdissection virtuelle » et pourrait augmenter la précision des données dans un tissu tumoral et aider à trouver des biomarqueurs [26]. A titre d'exemple, des signaux protéiques ont été mis en évidence dans le mélanome malin et sont des biomarqueurs associés à la survie et le degré de récurrence de la pathologie [27]. L'hétérogénéité tumorale est une caractéristique essentielle des processus cancéreux. Elle a été décrite essentiellement à l'échelon génomique, mais aussi protéique. Les études « *single cell* » montrent qu'elle est majeure et représente probablement un moteur essentiel de la résistance thérapeutique [28-30]. La description de cette hétérogénéité dans le schwannome est une donnée nouvelle, en particulier pour une tumeur bénigne.

Toutes ces perspectives commencent à trouver leur intérêt potentiel dans la recherche préclinique, voire clinique. L'analyse MALDI pourrait trouver sa place dans les centres hospitaliers afin de compléter les informations fournies par l'examen anatomopathologique. Il est enfin essentiel d'insister sur le fait que l'imagerie MALDI met l'accent sur des capacités innovantes mais ne remplace en aucun cas des techniques bien établies et reconnues, en particulier l'analyse histologique [26].

Il existe d'autres techniques de coloration cellulaire ou tissulaire ciblées sur la densité protéique. Dieckmann-Schuppert et al. [31] ont décrit en 1997 une méthode de dosage de la concentration des protéines *solubles* ou des protéines intracellulaires ou tissulaires. Les protéines sont détectées sur un support en cellulose, séchées puis

colorées au noir d'Amido (*Amido Black*) qui est un colorant des acides aminés présents dans la protéine. Par la suite, la concentration des protéines est mesurée par spectrophotométrie ou par Western blot. Cette technique sert à doser le taux de protéines *totales* dans l'échantillon analysé et n'est pas comparable au MALDI puisqu'elle ne distingue pas les peptides les uns des autres. Les cellules en culture ou les tissus analysés ne sont pas *in situ* comme c'est le cas du MALDI puisqu'ils doivent être fixés au formol et ensuite baigner dans de l'acétate de cellulose [31].

De nombreux biomarqueurs qui s'expriment dans le schwannome ont déjà été identifiés et ciblés. Le schwannome comme toutes les tumeurs, induit la formation de vaisseaux sanguins (angiogenèse) et maintient leur croissance. Il a été démontré que le schwannome vestibulaire exprimait le facteur angiogénique VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) et que ce facteur corrélait avec la croissance du SV [32, 33]. Le bevacizumab (AVASTIN) et le vandetanib (CAPRELSA) sont des anti-VEGF et ont été utilisés contre des lignées cellulaires de schwannome (*human HEI193 and murine Nf2-/- cell lines*) ; les anti-VEGF ont provoqué une augmentation de la nécrose dans la 1^{ère} lignée et de l'apoptose dans la 2^{ème}, ainsi qu'une réduction de la croissance tumorale de 50% en deux semaines en agissant sur la vascularisation tumorale [10]. Une autre étude sur des patients ayant une NF-2 a montré une réduction du volume tumoral dans la majorité des cas traités par bevacizumab et une amélioration de l'audition chez certains patients [34]. Un autre travail a démontré l'expression de deux tyrosines kinases : PDGFR (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor*) dans le cytoplasme et c-Kit dans le noyau et le cytoplasme, et ce dans une grande partie de SV humains archivés et fixés, ainsi que dans des lignées cellulaires de SV (HEI193) ; ces tyrosines kinases ont été ciblées par l'imatinibe mésylate (GLEEVEC ou GLIVEC) qui a une action dose-dépendante sur la croissance tumorale [11]. Kim et al. (2016) [12] ont étudié l'effet du sulphorafane (isothiocyanate présent dans les légumes crucifères) sur des lignées cellulaires de cellules schwannomateuses ; ils ont trouvé une activité antiproliférative sur les cellules tumorales, ainsi qu'un effet pro-apoptotique et un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M *in vitro* et *in vivo* (souris implantées d'allogreffes de schwannomes), le mécanisme étant une inhibition d'acétylases et une régulation des kinases présentes dans le schwannome [12]. Ren et al. (2017) [13] ont étudié les protéines

transmembranaires du schwannome : α -v-intégrine et NRP-1 (neuropiline-1) qui sont des récepteurs de surface ; ils ont aussi montré que le siRNA (*short interfering Ribonucleic Acid*) délivré via des nanoparticules qui interagissent avec les protéines transmembranaires occupait les récepteurs du TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*). Le TNF- α est une cytokine pro-inflammatoire qui contribue à la surdité neurosensorielle dans le SV par désorganisation des fibres nerveuses du nerf cochléaire et par destruction des cils des cellules ciliées externes et internes [35] ; l'arrêt de sécrétion de cette cytokine par blocage de ses récepteurs dans le SV interrompt la cascade inflammatoire du schwannome et pourrait avoir un effet protecteur pour l'audition [13]. A noter que la cytokine FGF-2 (*Fibroblast Growth Factor-2*) semble avoir au contraire un effet protecteur de l'audition puisqu'elle sa concentration est 3,5 fois plus élevée dans les sécrétions des SV des patients avec bonne audition que dans les sécrétions des SV des patients avec mauvaise audition [36].

Soares et al. (2016) [37] ont révélé la présence de vésicules extracellulaires sécrétées par les cellules schwannomateuses ; ces vésicules contiennent le profil génétique de la cellule d'origine (ADN et ARN) et contribuent à la perte d'audition dans le SV par atteinte du ganglion spiral et des cellules ciliées ; l'atteinte était moins importante quand les cultures cellulaires ont été traitées par l'héparine, qui a un effet agrégateur sur les vésicules extracellulaires [37].

La protéine NF2 et sa fonction

Le gène NF2, localisé sur le chromosome 22 (bras long q12) a été découvert en 1993 ; il s'agit d'un gène suppresseur de tumeur [3]. Des mutations de ce gène ont été également retrouvées dans les schwannomes vestibulaires sporadiques. La protéine du gène NF2, nommée merline ou schwannomine, a un rôle de régulation de la prolifération cellulaire et un rôle suppresseur de croissance [3]. La merline interagit avec le CD44 (*Cluster of Differentiation*) qui est un récepteur transmembranaire formé d'acide hyaluronique. A forte densité cellulaire, la merline devient hypophosphorylée et s'active en réponse avec l'acide hyaluronique entourant les cellules. A faible densité cellulaire, la merline est phosphorylée et devient inactive, induisant ainsi une prolifération cellulaire et par la suite la formation tumorale. Des enzymes du type kinase entraînent la phosphorylation de la merline. Il a été démontré que la voie métabolique de cette kinase est activée dans le schwannome vestibulaire [3]. La

compréhension des mécanismes d'action de la merline et de ses interactions avec d'autres protéines, ainsi que de la régulation du gène NF2, contribuera au développement de nouvelles thérapies au schwannome. Les pics peptidiques présents d'une façon assez reproductible sur les spectrogrammes des schwannomes analysés dans notre travail (peptides à 2 et à 5 kDa) et absents sur le spectrogramme des nerfs normaux correspondent probablement à des peptides régulateurs de croissance tumorale ou à des enzymes qui interagissent avec ces régulateurs. Il ne s'agit très probablement pas de la merline car celle-ci a un poids moléculaire bien plus élevé que les peptides retrouvés dans notre étude (2 et 5 KDa) et avoisine les 70 KDa [38]. Ces protéines pourront être identifiées par d'autres procédés dans le futur, ne faisant pas l'objet du travail actuel.

La protéine SMARCB1/INI1 est codée par le gène suppresseur de tumeur localisé sur le chromosome 22q12, adjacent au gène NF2 [39, 40]. La plupart des schwannomes sporadiques expriment cette protéine [39, 40]. Toutefois, dans la majorité des cas de schwannomatose familiale et des schwannomes liés à la NF2 et dans certains cas de schwannomes épithélioïdes sous-cutanés, on retrouve une perte d'expression ou un aspect mosaïque d'expression de cette protéine en immunohistochimie INI1 [39, 40]. La cause biochimique est une délétion ou une insertion d'acides aminés à l'intérieur de la protéine, entraînant ainsi une altération de la protéine SMARCB1/INI1 [41]. L'analyse protéomique à l'aide du MALDI pourrait trouver sa place dans la détection des altérations biochimiques de cette protéine, par rapport à une protéine non altérée.

Marqueurs immunohistochimiques de croissance cellulaire

Une augmentation du taux du Ki-67, une protéine servant d'index de prolifération nucléaire, est corrélée au taux de croissance des SV solides [42, 43]. Des taux élevés d'index de prolifération ont été associés à un taux de récurrence tumorale plus important, mais la corrélation n'était pas statistiquement significative [44]. Des études de fixation au TEP-FDG scan n'ont pas pu démontrer une relation statistiquement significative entre la fixation au TEP et le taux du Ki-67. La raison est que le SV croît très lentement et que seule une petite partie des cellules tumorales est en phase de mitose active

(phase S) [3, 45]. Dans notre série, l'index de prolifération cellulaire Ki-67 était présent à un taux très faible dans tous les schwannomes, même les plus volumineux et les non vestibulaires. Le taux du Ki-67 (index de prolifération) est beaucoup plus bas dans les schwannomes kystiques, reflétant ainsi que la croissance clinique et l'effet de masse du schwannome kystique est liée à l'accumulation des kystes et non pas à la rapidité de la croissance cellulaire tumorale [46, 47].

D'autres tumeurs ont été analysées en imagerie MALDI. Ait Belkacem et al (2014) ont comparé les éléments histologiques du glioblastome multiforme avec leurs caractéristiques morphologiques en imagerie MALDI [17]. Les auteurs ont trouvé une corrélation importante et reproductible entre anatomopathologie et imagerie, comme peut en témoigner leur interprétation des résultats : les spectres de couleur Multiplexing étaient distincts pour des zones histologiquement différentes : tissu nerveux sain, zone nécrotique et zone tumorale périnécrotique. En outre, ils ont constaté que certains peptides/protéines étaient surexprimés dans la tumeur par rapport au tissu sain, en spectrométrie de masse et en imagerie correspondant au pic peptidique étudié : hémoglobine α (14,982 m/z), calcycline (10 092,78 m/z) et thymosine β -4 (4964,5 m/z) [17]. Cette signature protéomique tumorale avec des poids moléculaires bien déterminés, avait déjà été en partie décrite dans le glioblastome [48].

Agar et al (2010) ont retrouvé des différences de spectres protéiques entre tissu nerveux normal, gliome et méningiome en analysant les échantillons par le MALDI-TOF en se basant sur un classifieur linéaire (*Support Vector Machine*) [49]. Ils ont également pu distinguer en imagerie MALDI un méningiome de grade I d'un grade II et d'un grade III selon la classification de l'OMS. Ils ont même pu déceler une évolution d'un grade II à un grade III chez un patient avant que l'examen histologique puisse le faire [49].

Une analyse protéomique (Guran et al 2017) sur le mélanome par imagerie MALDI a pu retrouver des différences morphologiques entre cette tumeur et le tissu cutané normal [50]. Les auteurs ont trouvé en plus une corrélation entre les aspects anatomopathologiques (tissu tumoral en croissance cellulaire, régression spontanée précoce et régression spontanée tardive) et les caractéristiques morphologiques en imagerie MALDI. Des pics peptidiques étaient surexprimés dans le tissu tumoral par rapport au tissu cutané sain [50].

En somme, ces trois types de tumeur ont montré une meilleure corrélation anatomopathologique-morphologique à l'imagerie MALDI que le schwannome vestibulaire. Toutefois, le glioblastome et le mélanome sont des tumeurs malignes : leur croissance et leur multiplication cellulaire sont beaucoup plus importantes que celles du schwannome, pouvant probablement justifier le manque de corrélation anatomopathologique-morphologique dans le SV. Quant au méningiome, les grades II et III sont plus évolués que le méningiome bénin (grade I) et que le schwannome puisque le grade II correspond au méningiome atypique (invasion encéphalique ou cellularité augmentée, 4-19 mitoses/400x, ratio noyau/cytoplasme élevé) et le grade III correspond au méningiome anaplasique (≥ 20 mitoses/400x ou histologie sarcomateuse ou carcinomateuse) [51].

Conclusions

Il s'agit d'un premier travail sur l'imagerie protéomique MALDI dans le schwannome vestibulaire et le schwannome en général. Il s'agit également d'une première comparaison entre l'imagerie protéomique du schwannome et celle du nerf normal. Notre étude est descriptive et qualitative. Nous avons constaté pour la première fois que dans les schwannomes vestibulaires et non vestibulaires, derrière les zones homogènes de l'anatomopathologie, il existait des zones hétérogènes et un grand polymorphisme dans le profil protéomique détecté à l'imagerie MALDI et au spectrogramme de masse. Ce polymorphisme protéomique n'a pas été retrouvé dans le nerf sain, suggérant ainsi la présence d'une diversité de protéines présentes dans le schwannome et non dans le tissu nerveux normal. La description de cette hétérogénéité dans le neurinome est une donnée nouvelle, en particulier pour une tumeur bénigne. D'autre part, nous n'avons pas trouvé de corrélation entre les caractéristiques morphologiques sur l'imagerie et les zones d'intérêt sur l'histologie du même échantillon de schwannome vestibulaire. En revanche, cette corrélation a pu être constatée à un certain degré dans le schwannome non vestibulaire, malgré le nombre réduit d'échantillons. Cette corrélation a surtout été retrouvée et d'une façon reproductible dans le nerf sain. L'absence de cohérence imagerie MALDI – analyse anatomopathologique dans le schwannome vestibulaire serait due à une évolution précoce et un stade « débutant » de cette tumeur par rapport au schwannome non

vestibulaire et au nerf sain. En cas de présence d'une corrélation imagerie-anatomopathologie, les zones d'intérêt histologique montraient des aspects morphologiques reproductibles sur l'ensemble des échantillons analysés. Par ailleurs, nous avons retrouvé au spectrogramme de masse un pic peptidique significatif à 5000 m/z présent dans 95,5% des schwannomes vestibulaires et non vestibulaires et un autre inconstant à 2000 m/z. Ces deux pics étaient constamment absents dans le nerf sain. Une identification du peptide à 5 kDa est une perspective importante de notre travail, autant pour disposer d'un biomarqueur potentiel mais aussi d'un acteur physiopathologique dans le schwannome. Des améliorations techniques seront à apporter dans le futur afin d'optimiser la précision des résultats obtenus et un nombre plus important d'échantillons sera nécessaire afin d'étayer nos conclusions.

Références bibliographiques

1. Darrouzet V F-VV, Liguoro D. Neurinome de l'acoustique. Oto-rhino-laryngologie. 20-250-A-10. 2006 ed.: EMC (Elsevier Masson SAS).
2. Karkas A, Lamblin E, Meyer M, Gay E, Ternier J, Schmerber S. Trigeminal nerve deficit in large and compressive acoustic neuromas and its correlation with MRI findings. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2014;151:675-80.
3. Welling DB PM, Akhmametyeva EM, Chang LS. Biology and Genetics of Vestibular Schwannomas in Tumors of the Cerebellopontine Angle. Bambakidis NC, Megerian CA, Spetzler RE. *Surgery of the Cerebellopontine Angle.* BC Decker; 2009. p. 119-34.
4. Fields RD, Stevens-Graham B. New insights into neuron-glia communication. *Science.* 2002;298:556-62.
5. Tos M, Charabi S, Thomsen J. Incidence of vestibular schwannomas. *Laryngoscope.* 1999;109:736-40.
6. Son EI, Kim IM, Kim SP. Vestibular schwannoma with malignant transformation: a case report. *J Korean Med Sci.* 2001;16:817-21.
7. Koos WT SR, Bock FW. Microsurgery of cerebellopontine angle tumors. In: Koos WT BF, Spetzler RF, editors. *Clinical Microsurgery.* Georg Thieme; 1976. p. 91-112.
8. Talfer S, Dutertre G, Conessa C, Desgeorges M, Poncet JL. Surgical treatment of large vestibular schwannomas (stages III and IV). *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis.* 2010;127:63-9.
9. Kanzaki J, Tos M, Sanna M, Moffat DA, Monsell EM, Berliner KI. New and modified reporting systems from the consensus meeting on systems for reporting results in vestibular schwannoma. *Otol Neurotol.* 2003;24:642-8; discussion 8-9.
10. Wong HK, Lahdenranta J, Kamoun WS, Chan AW, McClatchey AI, Plotkin SR, et al. Anti-vascular endothelial growth factor therapies as a novel therapeutic approach to treating neurofibromatosis-related tumors. *Cancer Res.* 2010;70:3483-93.
11. Altuna X, Lopez JP, Yu MA, Arandazi MJ, Harris JP, Wang-Rodriguez J, et al. Potential role of imatinib mesylate (Gleevec, STI-571) in the treatment of vestibular schwannoma. *Otol Neurotol.* 2011;32:163-70.

12. Kim BG, Fujita T, Stankovic KM, Welling DB, Moon IS, Choi JY, et al. Sulforaphane, a natural component of broccoli, inhibits vestibular schwannoma growth in vitro and in vivo. *Sci Rep.* 2016;6:36215.
13. Ren Y, Sagers JE, Landegger LD, Bhatia SN, Stankovic KM. Tumor-Penetrating Delivery of siRNA against TNF α to Human Vestibular Schwannomas. *Sci Rep.* 2017;7:12922.
14. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature.* 2003;422:198-207.
15. Han X, Aslanian A, Yates JR, 3rd. Mass spectrometry for proteomics. *Curr Opin Chem Biol.* 2008;12:483-90.
16. Karas M, Bahr U. Laser desorption ionization mass spectrometry of bioorganic molecules. *Methods Mol Biol.* 1993;17:215-28.
17. Ait-Belkacem R, Berenguer C, Villard C, Ouafik L, Figarella-Branger D, Chinot O, et al. MALDI imaging and in-source decay for top-down characterization of glioblastoma. *Proteomics.* 2014;14:1290-301.
18. Seo JH, Park KH, Jeon EJ, Chang KH, Lee H, Lee W, et al. Proteomic analysis of vestibular schwannoma: conflicting role of apoptosis on the pathophysiology of sporadic vestibular schwannoma. *Otol Neurotol.* 2015;36:714-9.
19. Caprioli RM, Farmer TB, Gile J. Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Anal Chem.* 1997;69:4751-60.
20. Kazemizadeh Gol MA LT, Levine SC, Adams ME. Quantitative Proteomics of Vestibular Schwannoma Cerebrospinal Fluid: A Pilot Study. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2016;154:902-6.
21. Martiane T, Carrascal M, Lamarca A, Segura M, Durany N, Masgrau R, et al. UTP affects the Schwannoma cell line proteome through P2Y receptors leading to cytoskeletal reorganisation. *Proteomics.* 2012;12:145-56.
22. Abe M, Kawase T, Urano M, Mizoguchi Y, Kuroda M, Kasahara M, et al. Analyses of proliferative potential in schwannomas. *Brain Tumor Pathol.* 2000;17:35-40.
23. Diologent L, Franck J, Wisztorski M, Treizebre A, Focsa C, Fournier I, et al. On the origin of increased sensitivity and mass resolution using silicon masks in MALDI. *Anal Chem.* 2014;86:1404-13.
24. Arts HA, Telian SA, El-Kashlan H, Thompson BG. Hearing preservation and facial nerve outcomes in vestibular schwannoma surgery: results using the middle cranial fossa approach. *Otol Neurotol.* 2006;27:234-41.
25. Chaurand P, Stoeckli M, Caprioli RM. Direct profiling of proteins in biological tissue sections by MALDI mass spectrometry. *Anal Chem.* 1999;71:5263-70.
26. Addie RD, Balluff B, Bovee JV, Morreau H, McDonnell LA. Current State and Future Challenges of Mass Spectrometry Imaging for Clinical Research. *Anal Chem.* 2015;87:6426-33.
27. Hardesty WM, Kelley MC, Mi D, Low RL, Caprioli RM. Protein signatures for survival and recurrence in metastatic melanoma. *J Proteomics.* 2011;74:1002-14.
28. Almendro V, Marusyk A, Polyak K. Cellular heterogeneity and molecular evolution in cancer. *Annu Rev Pathol.* 2013;8:277-302.
29. McGranahan N, Swanton C. Biological and therapeutic impact of intratumor heterogeneity in cancer evolution. *Cancer Cell.* 2015;27:15-26.
30. McGranahan N, Swanton C. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. *Cell.* 2017;168:613-28.
31. Dieckmann-Schuppert A, Schnittler HJ. A simple assay for quantification of protein in tissue sections, cell cultures, and cell homogenates, and of protein immobilized on solid surfaces. *Cell Tissue Res.* 1997;288:119-26.
32. Caye-Thomasen P, Baandrup L, Jacobsen GK, Thomsen J, Stangerup SE. Immunohistochemical demonstration of vascular endothelial growth factor in vestibular schwannomas correlates to tumor growth rate. *Laryngoscope.* 2003;113:2129-34.
33. Koutsimpelas D, Stripf T, Heinrich UR, Mann WJ, Brieger J. Expression of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in sporadic vestibular schwannomas correlates to growth characteristics. *Otol Neurotol.* 2007;28:1094-9.

34. Plotkin SR, Stemmer-Rachamimov AO, Barker FG, 2nd, Halpin C, Padera TP, Tyrrell A, et al. Hearing improvement after bevacizumab in patients with neurofibromatosis type 2. *N Engl J Med*. 2009;361:358-67.
35. Dilwali S, Landegger LD, Soares VY, Deschler DG, Stankovic KM. Secreted Factors from Human Vestibular Schwannomas Can Cause Cochlear Damage. *Sci Rep*. 2015;5:18599.
36. Dilwali S, Lysaght A, Roberts D, Barker FG, 2nd, McKenna MJ, Stankovic KM. Sporadic vestibular schwannomas associated with good hearing secrete higher levels of fibroblast growth factor 2 than those associated with poor hearing irrespective of tumor size. *Otol Neurotol*. 2013;34:748-54.
37. Soares VY, Atai NA, Fujita T, Dilwali S, Sivaraman S, Landegger LD, et al. Extracellular vesicles derived from human vestibular schwannomas associated with poor hearing damage cochlear cells. *Neuro Oncol*. 2016;18:1498-507.
38. Schmucker B, Ballhausen WG, Kressel M. Subcellular localization and expression pattern of the neurofibromatosis type 2 protein merlin/schwannomin. *Eur J Cell Biol*. 1997;72:46-53.
39. Jo VY, Fletcher CDM. SMARCB1/INI1 Loss in Epithelioid Schwannoma: A Clinicopathologic and Immunohistochemical Study of 65 Cases. *Am J Surg Pathol*. 2017;41:1013-22.
40. Patil S, Perry A, Maccollin M, Dong S, Betensky RA, Yeh TH, et al. Immunohistochemical analysis supports a role for INI1/SMARCB1 in hereditary forms of schwannomas, but not in solitary, sporadic schwannomas. *Brain Pathol*. 2008;18:517-9.
41. Kohashi K, Oda Y. Oncogenic roles of SMARCB1/INI1 and its deficient tumors. *Cancer Sci*. 2017;108:547-52.
42. Labit-Bouvier C, Crebassa B, Bouvier C, Andrac-Meyer L, Magnan J, Charpin C. Clinicopathologic growth factors in vestibular schwannomas: a morphological and immunohistochemical study of 69 tumours. *Acta Otolaryngol*. 2000;120:950-4.
43. Niemczyk K, Vaneecloo FM, Lecomte MH, Lejeune JP, Lemaitre L, Skarzynski H, et al. Correlation between Ki-67 index and some clinical aspects of acoustic neuromas (vestibular schwannomas). *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2000;123:779-83.
44. Light JP, Roland JT, Jr., Fishman A, Miller DC, Cohen NL. Atypical and low-grade malignant vestibular schwannomas: clinical implications of proliferative activity. *Otol Neurotol*. 2001;22:922-7.
45. Bassett DE, Jr., Eisen MB, Boguski MS. Gene expression informatics--it's all in your mine. *Nat Genet*. 1999;21:51-5.
46. Charabi S, Klinken L, Tos M, Thomsen J. Histopathology and growth pattern of cystic acoustic neuromas. *Laryngoscope*. 1994;104:1348-52.
47. Charabi S, Mantoni M, Tos M, Thomsen J. Cystic vestibular schwannomas: neuroimaging and growth rate. *J Laryngol Otol*. 1994;108:375-9.
48. Schwartz SA, Weil RJ, Thompson RC, Shyr Y, Moore JH, Toms SA, et al. Proteomic-based prognosis of brain tumor patients using direct-tissue matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Cancer Res*. 2005;65:7674-81.
49. Agar NY, Malcolm JG, Mohan V, Yang HW, Johnson MD, Tannenbaum A, et al. Imaging of meningioma progression by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem*. 2010;82:2621-5.
50. Guran R, Vanickova L, Horak V, Krizkova S, Michalek P, Heger Z, et al. MALDI MSI of MeLiM melanoma: Searching for differences in protein profiles. *PLoS One*. 2017;12:e0189305.
51. Kresak J. WHO grading of meningiomas. <http://www.pathologyoutlines.com/topic/cnstumorwhomeningioma.html> [Internet]. 2017.

J'en profite pour remercier Messieurs les Rapporteurs d'avoir révisé mon manuscrit en très peu de temps et m'avoir apporté des commentaires très constructifs.

Je remercie vivement Messieurs les Membres du Jury pour avoir accepté volontiers cette tâche.

Je suis reconnaissant à mon épouse et ma fille qui m'ont « supporté » durant toute la rédaction de la thèse. Elles sont source d'inspiration dans mon travail et de bonheur dans ma vie.