

**UNIVERSITÉ PARIS XIII – SORBONNE PARIS NORD**

**École doctorale Sciences, Technologies, Santé Galilée**

---

**Signature moléculaire des métastases cérébrales  
de cancers**  
**Molecular signature of brain metastases**

---

THÈSE DE DOCTORAT  
présentée par

**Thi Thuy NGUYEN**  
INSERM UMRS-942

pour l'obtention du grade de DOCTEUR  
Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

soutenue le 07 Mars 2024 devant le jury d'examen constitué de :

Pr. Philippe Bertheau, Présidente du jury  
Dr. Françoise Farace, Rapportrice  
Pr. Jean-Paul Feugeas, Rapporteur  
Pr. Didier Lutomski, Examineur  
Dr. Camille Tlemsani, Examinatrice  
Pr. BOUSQUET Guilhem, Université Sorbonne Paris Nord, Directeur  
Pr. LE Van Quang, Université de médecine de Ha Noi, Co-directeur

## **Résumé**

Au cours des vingt dernières années, l'incidence des métastases cérébrales a augmenté. Malgré les progrès thérapeutiques, le pronostic des métastases cérébrales reste sombre, avec une médiane de survie de moins de 16 mois. En dehors du problème pharmacologique et compartimental lié au passage de la barrière hémato-encéphalique, la connaissance de la biologie des métastases cérébrales est nécessaire pour permettre leur traitement efficace. Cette biologie reste largement méconnue avec des données limitées obtenues sur des échantillons métastatiques cérébraux, principalement en raison de l'accès difficile de ces localisations.

Mon travail de thèse a consisté à étudier cette biologie de métastases cérébrales sous trois angles d'approche : À partir de données moléculaires obtenues de métastases extra-cérébrales, peut-on identifier des biomarqueurs prédictifs de la survenue de métastases cérébrales ? Peut-on identifier des signatures mutationnelles propres aux métastases cérébrales ? Peut-on identifier une signature transcriptomique commune à des métastases cérébrales dérivées de différents types de cancers ?

À partir d'échantillons exceptionnelles de patients, mais aussi les données génomiques publiées, avec des approches technologiques innovantes et méthodologiques originales, j'ai essayé de répondre successivement à ces trois questions.

## **Summary**

In the last twenty years, incidence of brain metastases has increased. Despite therapeutic advances, brain metastasis prognosis remained poor, with a median survival of less than 16 months. Apart from the pharmacological and compartmental problem related to the passage of the blood-brain barrier, the knowledge of cancer brain metastasis biology is required for their efficacious treatment. This biology remains largely unknown with limited data obtained on brain metastatic samples, mainly because of the difficult access to these locations.

My thesis work consisted in studying this biology of brain metastases from three angles: From molecular data obtained from extracerebral metastases, can we identify biomarkers predictive of the occurrence of brain metastases? Can mutational signatures specific to brain metastases be identified? Can we identify a transcriptomic signature common to brain metastases derived from different types of cancers?

Based on exceptional patient samples, but also published genomic data, with innovative and original methodological approaches, I tried to answer these three questions successively.

## Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier grandement le Professeur Guilhem Bousquet, mon directeur de thèse, qui m'a encadré tout au long de cette thèse. Je voudrais aussi remercier pour sa gentillesse, sa bienveillance, sa disponibilité et son accompagnement. C'est un grand plaisir d'apprendre et de travailler à vos côtés.

Je remercie le Professeur Anne Janin, m'ayant chaleureusement accueillie au sein de l'UMRS 1165, où j'ai pu m'initier à la recherche scientifique et m'y épanouir.

Je remercie le Professeur LE Van Quang, mon directeur de thèse au Viet Nam, pour son accompagnement et son soutien.

Je remercie également Monsieur DAO Van Tu, directeur du département de recherche translationnelle à l'hôpital national du cancer du Viet Nam, qui a fait une collaboration plus de cinq ans avec l'unité de recherche UMR-S942, dans la cadre de la thèse en cotutelle internationale, qui m'a aidé et m'a soutenue durant ma thèse.

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail.

Je tiens à remercier le Professeur Philippe Bertheau, qui me fait l'honneur d'être la Présidente du Jury de cette thèse.

Je remercie chaleureusement Madame le Docteur Françoise Farace, et Monsieur le Professeur Jean-Paul Feugeas qui ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.

Je remercie le Pr Didier Lutomski et le Docteur Camille Tlemsani d'avoir accepté d'être les examinateurs de ma Thèse.

Je remercie bien entendu l'ensemble des membres de l'unité UMR\_S942 pour leur gentillesse et leur accueil toutes ces années.

Enfin, un immense merci à ma famille qui ont supporté mes absences répétées pour me permettre de mener à bien ce projet.

## Table des matières

I. INTRODUCTION .....	12
1. Epidémiologie et biologie des métastases cérébrales .....	12
1.1. Epidémiologie des métastases cérébrales .....	12
1.2. Biologie des métastases cérébrales .....	12
2. Traitements des métastases cérébrales.....	15
La méthode osmotique.....	18
L'utilisation d'ultrasons .....	18
L'administration intra-nasale.....	18
L'utilisation de nanoparticules.....	20
Les anticorps bispécifiques utilisant transporteurs actifs de la BHE .....	20
3. Génomique des métastases cérébrales et méthodes d'analyses fonctionnelles du génome.....	24
3.1. NGS .....	31
3.2. La PCR (Polymerase Chain Reaction) .....	32
3.3. cDNA Microarray.....	33
II. DOMAINE DE RECHERCHE.....	35
1. À partir de données moléculaires obtenues de métastases extra-cérébrales, peut-on identifier des biomarqueurs prédictifs de la survenue de métastases cérébrales ?.....	35
1.1. Matérielles et méthodes .....	35
Données patientes .....	35
Microdissection laser de cellules tumorales de ganglions lymphatiques métastatiques et traitement des données transcriptomiques.....	36
RT-qPCR et validation de l'expression de l'ARNm <i>PROM2</i> dans les ganglions lymphatiques métastatiques.....	38
Expression in situ de <i>PROM2</i> dans les ganglions lymphatiques métastatiques .....	38
Analyses statistiques .....	39
1.2. Résultats.....	40
Caractéristiques de la cohorte de développement des patients.....	40
Expression du gène <i>PROM2</i> dans les ganglions lymphatiques métastatiques de patients atteints de métastases cérébrales .....	43
L'expression de la protéine <i>PROM2</i> dans les ganglions lymphatiques métastatiques est associée au risque de métastases cérébrales .....	46

L'expression de <i>PROM2</i> est faible dans les ganglions lymphatiques régionaux sans métastases à distance associées.....	46
Une cohorte de validation confirme <i>PROM2</i> comme biomarqueur des métastases à distance .....	48
1.3. Discussions.....	54
1.4. Conclusion et perspective .....	55
2. Y-a-t-il des signatures mutationnelles propres aux métastases cérébrales ?.....	56
2.1. Matérielles et méthodes .....	56
Stratégie de recherche et critères de sélection .....	56
Critères d'admissibilité.....	57
Stratégie de recherche .....	58
Sélection des études .....	58
Protocole et enregistrement .....	58
Évaluation de la qualité .....	58
Analyse statistique .....	59
2.2. Résultats.....	60
Sélection des études, caractéristiques et évaluation de la qualité .....	60
Profils de mutation génétique dans les métastases cérébrales du cancer du sein .....	70
L'hétérogénéité de la prévalence des mutations génétiques entre les études était moins marquée pour les échantillons de métastases cérébrales .....	95
Altérations du nombre de copies et perte d'hétérozygotie dans les métastases cérébrales du cancer du sein.....	113
Les mutations <i>ESR1</i> , <i>ERBB2</i> , <i>EGFR</i> , <i>PTEN</i> , <i>BRCA2</i> et <i>NOTCH1</i> pourraient être liées à des processus métastatiques dans le cerveau. ....	121
2.3. Discussions.....	126
2.4. Conclusion et perspective .....	131
3. Peut-on identifier une signature moléculaire transcriptomique commune à des métastases cérébrales dérivées de différents types de cancers ?.....	133
3.1. Matériels et méthodes .....	133
Les échantillons métastatiques de patients .....	133
Microdissection laser de cellules cancéreuses et analyses transcriptomiques.....	134
Analyse bio-informatique des données transcriptomiques.....	134
RT-qPCR et la validation de l'expression de l'ARNm Kallikrein 6 dans des échantillons métastatiques.....	135

Expression de <i>KLK6</i> dans des échantillons métastatiques.....	135
Lignées cellulaires de cancer du sein et de lymphome .....	136
Modèles murins de métastases cérébrales .....	136
Évaluation de l'expression de <i>KLK6</i> sur les métastases cérébrales de souris et les métastases extra-cérébrales .....	137
Analyses statistiques .....	137
3.2. Résultats .....	138
Caractéristique de 155 patients avec analyses transcriptomiques d'échantillons métastatiques.....	138
Une signature commune aux métastases cérébrales des patientes atteintes d'un cancer du sein, d'un mélanome ou d'un lymphome .....	140
La surexpression de <i>KLK6</i> est liée à la localisation métastatique cérébrale .....	149
En modélisant la propagation métastatique cérébrale chez la souris, <i>KLK6</i> est-il un facteur adaptatif? .....	153
3.3. Discussions.....	155
3.4. Conclusion et perspective .....	159
<b>Bibliographies.....</b>	<b>160</b>

## Table des figures

Figure 1. Étapes de la formation de métastases cérébrales .....	12
Figure 2. Unité neurovasculaire de (a) barrière hémato-encéphalique normale (BHE) et (b) barrière hémato-tumorale (BHT) .....	15
Figure 3 . Résumé des différentes façons de surmonter la BHE .....	19
Figure 4. Injections intrathécales de trastuzumab associé au méthotrexate .....	23
Figure 5. Trois techniques de séquençage de l'ADN.....	31
Figure 6. La Polymerase Chain Reaction .....	32
Figure 7. cDNA microarray pour l'expression du gène .....	34
Figure 8. Diagram for selection criteria of the 51 patients of the development cohort. ....	37
Figure 9. Overall survival of the 51 patients in the development cohort .....	42
Figure 10. PROM2 mRNA expression, "PROM2 IHC score" in metastatic lymph nodes, and survival data in the development cohort.....	44
Figure 11. Survival curves in two cohorts of melanoma lymph node metastases from public databanks, according to PROM2 mRNA expression level (high or low). ....	45
Figure 12. PROM2 expression and survival data according to subgroups in the development cohort.....	47
Figure 13. Survival curves in the validation cohort, according to the presence or not of brain metastases (upper panel), or to the "PROM2 IHC score" (lower panel) .....	53
Figure 14. PRISMA flowchart for the screening and selection of the studies. ....	57
Figure 15. Gene mutation prevalence, loss of heterozygosity and copy number alterations in primary tumor, extracerebral metastases and brain metastases .....	82
Figure 16. Forest plots of mutation prevalence for 6 genes: ESR1, ERBB2, EGFR, PTEN, BRCA2 and NOTCH1.....	94
Figure 17. Cartography of the mutations reported in the meta-analysis for the 6 genes with an increased mutation prevalence in brain metastases.....	124
Figure 18. Gene alterations and signaling pathways involved in breast cancer carcinogenesis and brain metastatic processes .....	127
Figure 19. Laser-microdissection of cancer cells and mean RNA integrity of cancer samples .	139
Figure 20. An unsupervised hierarchic clustering of transcriptomic data from 155 metastatic samples .....	140
Figure 21. Analytical approach of transcriptomic data from metastases .....	141
Figure 22. An unsupervised hierarchic clustering of transcriptomic data from 21 genes up-regulated in brain metastases .....	144

Figure 23. KLK6 mRNA expression according to subgroups in the 3 cancer types .....	150
Figure 24. AQP4 mRNA expression according to subgroups in the 3 cancer types. ....	151
Figure 25. KLK6 protein expression using an immunohistochemistry score .....	152
Figure 26. Modeling KLK6 overexpression in syngeneic models of brain metastases .....	154



## Tableaux

Tableau 1. Pharmacocinétique du liquide céphalo-rachidien pour les médicaments anticancéreux .....	16
Tableau 2. Les données cérébrales pharmacocinétiques cliniques et précliniques pour les différents Tyrosine kinase inhibiteurs .....	17
Tableau 3. Résumé des principaux avantages et inconvénients des technologies les plus couramment utilisées pour l'analyse fonctionnelle du génome .....	25
Tableau 4. Characteristics of the 51 patients in the development cohort with transcriptomic analyses of metastatic lymph nodes .....	41
Tableau 5. Genes differentially expressed in metastatic lymph nodes of patients with versus without brain metastasis .....	43
Tableau 6. Univariate and multivariate analyses of factors associated with brain metastasis ...	48
Tableau 7. Baseline characteristics and comparison between the development and the validation cohort.....	49
Tableau 8. Univariate and multivariate analyses of factors associated with mortality in the development and validation cohorts.....	50
Tableau 9. Univariate analyses of an association between a high “PROM2 IHC score” $\geq 5$ and other metastatic sites than brain metastases.....	52
Tableau 10. Main characteristics of the 57 studies included in the meta-analysis .....	61
Tableau 11. Details on individual scores for the included studies based on Q-genie tool.....	71
Tableau 12. Comparison of prevalence among gene mutation according to the quality of studies (Q genie tool) .....	76
Tableau 13. Comparison of prevalence among gene mutation in primary tumor, extracerebral metastases and brain metastases in breast cancers.....	83
Tableau 14. Pairwise comparison of prevalence of gene mutations according to the tumor site	91
Tableau 15. Paired data comparison of prevalence among gene mutation in primary tumor, extracerebral metastases and brain metastases .....	96
Tableau 16. Comparison of prevalence among gene mutation according to the genomic analysis method (whole sample) .....	100
Tableau 17. Comparison of prevalence among gene mutation according to the conservation method (whole sample) .....	107
Tableau 18. Comparison of prevalence among gene amplification in primary tumor, extracerebral metastases and brain metastases in breast cancers.....	114

Tableau 19. Prevalence of gain-loss of heterozygosity in primary tumor, extracerebral metastases and brain metastases in breast cancers .....	119
Tableau 20. Univariate and multivariate meta-regression.....	122
Tableau 21. Repartition of the 155 patients with transcriptomic analyses of metastatic samples .....	138
Tableau 22. Common genes up-regulated in brain metastases of breast cancer, melanoma, and non-Hodgkin lymphoma.....	142
Tableau 23. Characteristics of 6 clusters with unsupervised hierarchical classification.....	143
Tableau 24. Role of 21 overexpressed genes in brain metastases of breast cancer, melanoma and lymphoma .....	145
Tableau 25. Main characteristics of the 10 studies with transcriptomic analysis of brain metastases .....	157

## Liste des abréviations (dans l'ordre alphabétique)

ABC	ATP Binding Cassette
ACP	Analyse en composantes principales
ADNc	ADN complémentaire
AF-2	Activation transcriptionnelle-2
aHR	HR ajusté
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BHT	Barrière hémato-tumeur
dd-PCR	Digital doplet polymerase chain reaction
ET	Ecart-type
Fab	Antigen Binding Fragment
FcRn	Récepteur Fc néonatal
FDR	False Discovery Rate
HR	Hazard ratios
IC	Intervalle de confiance
IgG	Immunoglobulines G.
IHC	Immunohistochimie
IQR	Intervalle interquartile
IRM	Imagerie par résonance magnétique
ITK	Inhibiteurs de tyrosine Kinase
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LOH	Loss of heterozygosity
NGS	Next generation sequencing
PCR	Polymerase chain reaction
P-gp	P-glycoprotein
RC	Rapports de cotes
RCA	RC ajusté
RT-PCR	Real-time polymerase chain reaction
WES	Whole exome sequencing
WGS	Whole genome sequencing

# I. INTRODUCTION

## 1. Épidémiologie et biologie des métastases cérébrales

### 1.1. Épidémiologie des métastases cérébrales

Les métastases cérébrales surviennent chez environ 20% des patients atteints de cancer métastatique, principalement dans les cancers du poumon (20- 50%), les cancers du sein (15- 32%), et les mélanomes (7- 35%)<sup>1-5</sup>. Depuis 20 ans, il y a une augmentation de l'incidence de métastases cérébrales<sup>6</sup>, en raison d'un meilleur contrôle des métastases extra-cérébrales et d'une amélioration de la détection des métastases cérébrales asymptomatiques par imagerie par résonance magnétique. Malgré les avancées thérapeutiques dans la prise en charge des cancers métastatiques, le traitement des métastases cérébrales reste un enjeu majeur, avec des indications réduites et un bénéfice limité de la chirurgie curative et de la radiothérapie<sup>7,8</sup>. Les traitements systémiques sont encore peu efficaces, parce que la plupart des xénobiotiques ne peuvent pas traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) à des concentrations pharmacologiques pertinentes<sup>9</sup>. Le pronostic des métastases cérébrales reste donc globalement sombre, et la plupart des patients meurent du fait de ces localisations, avec une médiane de survie inférieure à 16 mois<sup>10</sup>.

### 1.2. Biologie des métastases cérébrales

#### *Les étapes de la formation de métastases cérébrales*

Pour devenir une métastase cérébrale, les cellules cancéreuses qui sont génétiquement aptes à métastaser doivent subir une série d'étapes complexes, y compris l'invasion cellulaire à travers la membrane basale dans les tissus environnants, l'intravasation dans les vaisseaux sanguins, la survie dans la circulation, l'extravasation par migration transendothéliale, la colonisation et la formation éventuelle de lésions métastatiques au sein du parenchyme cérébrale (Figure 1)<sup>11</sup>.

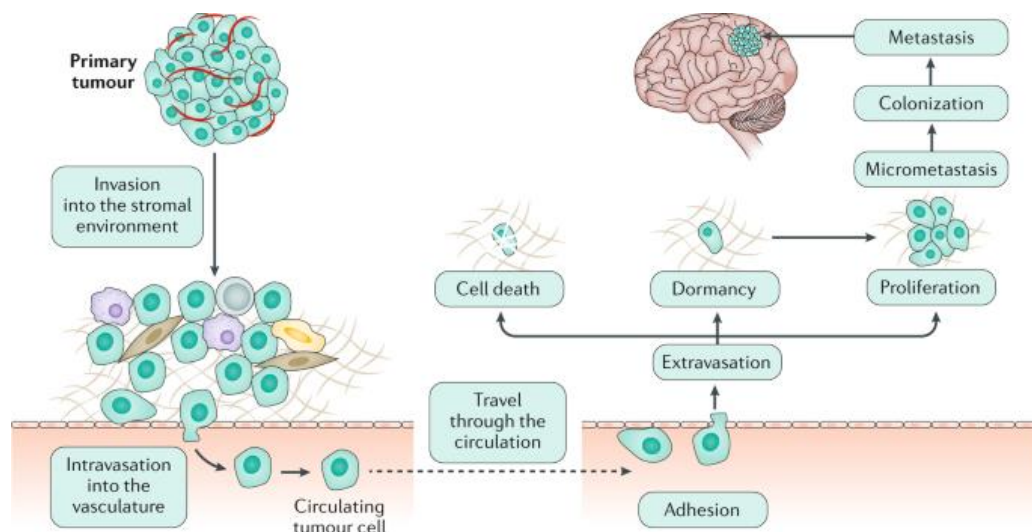


Figure 1. Étapes de la formation de métastases cérébrales (Achrol, Nat rev dis pri 2019)

*L'invasion et l'intravasation* sont des étapes initiales dans le processus métastatique. Après l'invasion et l'intravasation, les cellules cancéreuses deviennent des cellules tumorales circulantes.

Pour envahir le stroma, les cellules tumorales doivent franchir la membrane basale. La dégradation de la barrière de la membrane basale est obtenue grâce à une protéolyse active par des métalloprotéinases matricielles (MMP)<sup>12,13</sup>, qui sont sécrétées par les cellules tumorales. Lors de ce processus essentiel de la carcinogénèse<sup>14</sup>, les cellules cancéreuses à potentiel métastatique acquièrent souvent un phénotype de transition épithélio-mésenchymateuse<sup>15</sup>.

*La survie dans la circulation* : Lorsque les cellules tumorales pénètrent dans les vaisseaux sanguins, elles rencontrent un microenvironnement particulièrement sévère et différent. On estime qu'il y a seulement 0,01% des cellules tumorales entrant dans la circulation sanguine qui peuvent survivre pour créer des lésions secondaires<sup>16</sup>.

*L'extravasation par migration transendothéliale* : Grâce à la circulation sanguine, les cellules cancéreuses arrivent dans le système vasculaire cérébral, s'arrêtent dans le lit capillaire principalement en raison d'une restriction de taille, puis extravasent à travers la BHE et pénètrent dans le parenchyme cérébral.

Pour les cellules cancéreuses métastatiques mammaires, plusieurs cibles ont été identifiées comme médiateurs qui favorisent la migration des cellules tumorales à travers la BHE, notamment la cyclooxygénase-2 (COX2), le ligand HBEGF du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) et la  $\alpha$ -2,6-sialyltransférase 5 (ST6GALNAC5)<sup>17,18</sup>. Alors que les ligands de l'EGFR et la COX2 étaient auparavant liés à l'infiltration du poumon par le cancer du sein, ST6GALNAC5 a été reconnu comme un médiateur spécifique du passage des cellules tumorales à travers la BHE et peut donc constituer une cible thérapeutique particulièrement précieuse<sup>17,19</sup>.

En plus, comme les MMP perturbent les jonctions serrées de la BHE<sup>20,21</sup>, l'expression des MMP pourrait être importante dans le processus de migration des cellules tumorales à travers la barrière hémato-encéphalique. En effet, la MMP-9 s'est avérée surexprimée dans les cellules d'adénocarcinome du poumon métastatique au cerveau, alors qu'il a été démontré que la MMP-2 joue un rôle crucial dans la formation de métastases cérébrales des cellules du cancer du sein et du mélanome<sup>22-24</sup>.

*La colonisation et la formation éventuelle de lésions métastatiques au cerveau* : Dans le parenchyme cérébral, la plupart des cellules meurent ou entrent dans un état de dormance, peu prolifèrent dans ce nouveau microenvironnement. Après reprogrammation métabolique, les cellules tumorales établissent une colonisation plus stable puis forment des métastases

cérébrales. De plus, les cellules dormantes ont tendance à se réveiller dans certaines conditions et participent à la colonisation et provoquent une prolifération tumorale.

La capacité à survivre et à initier la croissance tumorale dans le cerveau est déterminée par les caractéristiques spécifiques des cellules tumorales métastasées, ainsi que par les interactions moléculaires avec le microenvironnement cérébral. Par exemple, il a été démontré que l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  du récepteur d'adhésion des cellules tumorales induit une régulation positive continue du VEGF et favorise la croissance métastatique et le recrutement des vaisseaux sanguins de soutien dans le microenvironnement cérébral<sup>25</sup>. Plusieurs voies moléculaires sont impliquées dans le développement de vaisseaux angiogéniques soutenant la croissance tumorale secondaire, le VEGF représente un facteur crucial qui module la prolifération et l'assemblage des cellules endothéliales, la formation de lumières et la structuration des réseaux vasculaires. Les données ont montré que les cellules tumorales présentant une activité métastatique cérébrale élevée se caractérisent par une sécrétion accrue de VEGF<sup>26</sup>, et une diminution de l'expression significativement diminuée l'incidence des métastases cérébrales<sup>27</sup>.

### ***La BHE est-elle perturbée en cas de métastases cérébrales ?***

La BHE normale (Figure 2a) est composée de cellules endothéliales à jonctions serrées, entourées d'une couche de péricytes. Les extrémités des astrocytes s'enroulent autour des capillaires et jouent un rôle dans la formation et le maintien de la BHE<sup>28</sup>. Les jonctions serrées sont constituées de protéines transmembranaires : les claudines et les occludines ancrées dans le cytoplasme des cellules endothéliales et reliées au cytosquelette par des protéines de la zone occluse. Les jonctions serrées limitent le transport paracellulaire de la plupart des molécules et des composés pharmacologiques à travers la BHE<sup>29-31</sup>. Une membrane basale, composée de fibronectine, de laminine et de collagène, entoure les cellules endothéliales et les péricytes<sup>32</sup>. Les cellules endothéliales et les péricytes contribuent à la production de la membrane basale<sup>30</sup>. Dans les modèles murins de métastases cérébrales, il existe des preuves de perturbation et de changements physiques dans la BHE, généralement appelée barrière hémato-tumorale (BHT) (Figure 2b). En règle générale, le colorant bleu d'Evans lié à l'albumine injecté par voie intraveineuse s'accumule dans les métastases cérébrales, alors qu'il ne traverse pas la BHE en l'absence de métastases. Morphologiquement, la barrière hémato-tumorale est anarchique, désorganisée, sinueuse, de forme irrégulière, avec des vaisseaux sanguins volumineux et perméables<sup>33</sup>. La microscopie électronique à ultra-mince a montré une redistribution des jonctions serrées des deux côtés (du côté protoplasmique au côté exoplasmique) de la bicouche lipidique<sup>34</sup>. Le nombre d'astrocytes normaux est réduit<sup>35</sup>, et ils perdent probablement leur capacité à produire des facteurs inducteurs de BHE<sup>36</sup>.

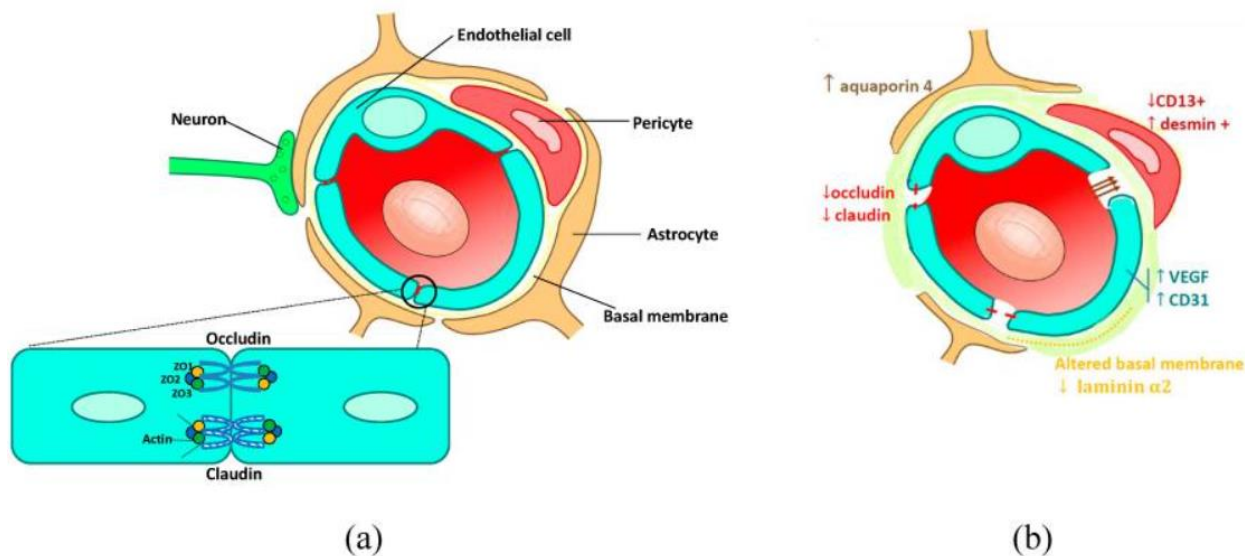


Figure 2. Unité neurovasculaire de (a) barrière hémato-encéphalique normale (BHE) et (b) barrière hémato-tumorale (BHT) (source : Angeli, Nguyen et al, Int J Mol Sci 2020)

## 2. Traitements des métastases cérébrales

Du fait de son franchissement par les cellules tumorales et l'implantation de métastases, il existe une rupture théorique de la BHE. Malgré cela, au niveau de la barrière hémato-tumorale (BHT) reconstituée, persistent les jonctions serrées physiologiques présentes entre les cellules endothéliales d'une BHE normale<sup>37</sup>. Dans une revue de la littérature co-écrite avec le Dr Angeli en 2019, et intitulée "How to make anticancer drugs cross the blood-brain barrier to treat brain metastases", nous avons fait une synthèse pour 26 anti-cancéreux et leur exposition cérébrale après administration orale ou intraveineuse de la drogue. Le ratio de la concentration dans le liquide céphalo-rachidien par rapport à la concentration sanguine était dans la majorité des cas faible, inférieur à 10% (Tableau 1)<sup>9</sup>. Plus particulièrement, pour les inhibiteurs de tyrosine kinase, le constat est le même si on utilise ce même critère d'exposition cérébrale (Tableau 2)<sup>38</sup>.

En effet, la livraison de médicaments anticancéreux dans le cerveau est encore limitée. Plusieurs paramètres physicochimiques interviennent dans la capacité des médicaments à traverser la BHE puis à rester dans le cerveau : petites molécules, liposolubilité, charge, interactions avec les protéines plasmatiques, interactions avec les pompes d'efflux et les transporteurs<sup>33</sup>. Les mécanismes physiologiques d'efflux sont détaillés dans une revue de littérature écrite par l'unité de recherche en 2021<sup>39</sup>. Parmi ces systèmes d'efflux, on retiendra les transporteurs ABC dont la protéine P-gp, et le récepteur FcRn des immunoglobulines G.

Tableau 1. Pharmacocinétique du liquide céphalo-rachidien pour les médicaments anticancéreux

Drug Family	CSF/Plasma Ratio (%)	Species Studied	Time
<b>Chemotherapy</b>			
Thiotepa	100 (for thiotepa and metabolite)	Human (children)	AUC <sub>0-24 h</sub>
Temozolomide	20	Human	AUC <sub>0-5 h</sub>
Methotrexate	2.8	Human (children)	24 h
Topotecan	32	RHM	AUC <sub>0-60 min</sub>
Irinotecan	9.6–16 Metabolite SN 38: <3	RHM	AUC <sub>0-48 h</sub>
Cisplatin	3	RHM	AUC <sub>0-4 h</sub>
Carboplatin	2.6	RHM	AUC <sub>0-4 h</sub>
Oxaliplatin	1.2	RHM	AUC <sub>0-4 h</sub>
Etoposide	0–3	Human (children)	Mean <sub>0-5 h</sub>
Doxorubicin	<5	RHM	Mean <sub>0-48 h</sub>
Idarubicin	0–15 Metabolite idarubicinol: 1.9	RHM	1 h
Daunorubicin	2.4 (Metabolite Daunorubicinol)	RHM	AUC <sub>0-96 h</sub>
Tomudex	0.6–2.0	RHM	Mean <sub>0-48 h</sub>
Docetaxel	0.1–9	Human	72 h
Pemetrexed	1–3	Human	AUC <sub>1-4 h</sub>
	0.76	RHM	AUC <sub>0-∞</sub>
Ciclofosphamid	17	RHM	AUC <sub>0-240 min</sub>
	38	RHM	AUC <sub>0-240 min</sub>
Ifosphamid	Metabolite 4-OH-Ifo: 30		
	13	RHM	AUC <sub>0-240 min</sub>
Vincristin	0	Human (children)	Mean <sub>8-46 min</sub>
	0	Human	Mean <sub>0-24 h</sub>
Gemcitabin	6.7	RHM	NA
<b>Tyrosin kinase inhibitors</b>			
Gefitinib	1	Mice	1 h
Erlotinib	1	Mice	1 h
Icotinib	0.7	Mice	1 h
Imatinib	5	RHM	AUC <sub>0-48 h</sub>
Osimertinib	>100 (brain/plasma ratio)	Mouse and monkey	AUC <sub>0-90 min</sub>
<b>Antibodies</b>			
Trastuzumab	0.5	Rat	AUC <sub>0-722 h</sub>
Rituximab	0.2	Human	Mean <sub>0-15 days</sub>

CSF: cerebrospinal fluid; AUC: area under the curve; RHM: Rhesus Monkey



Tableau 2. Les données cérébrales pharmacocinétiques cliniques et précliniques pour les différents Tyrosine kinase inhibiteurs

Cancer	Drug	Molar Mass (g/mol)	Species	CSF/Plasma or Brain/Plasma Ratio	Time
Breast	Lapatinib	581	Mice	0.03	steady state
			Mice	0.02	2 h
			Mice	0.03	12 h
			Mice	0.05	AUC <sub>0-16 h</sub>
			Mice	0.04	AUC <sub>0-16 h</sub>
Lung	Neratinib	557	Humans	<LOD	steady state
			Mice	0.01	1 h
	Erlotinib	393	Rats	0.14	AUC <sub>0-16 h</sub>
			Mice	0.01	1 h
	Gefitinib	447	Mice	0.4	AUC <sub>0-48 h</sub>
			Mice	0.7	AUC <sub>0-48 h</sub>
			Humans	0.01	Day 30
			Rats	0.12	AUC <sub>0-16 h</sub>
	Afatinib	486	Rats	0.2	AUC <sub>0-16 h</sub>
			Rats	6.09	AUC <sub>0-16 h</sub>
Humans			3.8 (mean)	AUC <sub>0-90 min</sub>	
Crizotinib	450	Humans	0.001	5 h	
		Humans	0.0006	5 h	
Lorlatinib	406	Rats	0.6	AUC <sub>0-24h</sub>	
		Humans	0.28–1.39	NA	
Melanoma	Vemurafenib	490	Mice	<0.1	4 h
			Mice	0.02	AUC <sub>0-2h</sub>
	Trametinib	615	Mice	0.1	AUC <sub>0-48h</sub>
	Cobimetinib	531	Mice	0.02	6 h
	Encorafenib	540	Mice	4.10–3	2 h

CSF cerebrospinal fluid; AUC Area Under the Curve; LOD Limit of Detection (tiré de “Brain Metastasis Treatment: The Place of Tyrosine Kinase Inhibitors and How to Facilitate Their Diffusion across the Blood–Brain Barrier”, E Angeli et G Bousquet, *Pharmaceutics* 2021, 13(9): 1446.

Comment faciliter la diffusion cérébrale des médicaments ?

Plusieurs approches ont été développées pour augmenter la pénétration médicamenteuse de la BHE, notamment la méthode osmotique et l’utilisation d’ultrasons, qui perturbent mécaniquement la barrière hémato-encéphalique pour administrer des médicaments au cerveau, l’administration

intra-nasale, l'utilisation de nanoparticules, et les anticorps bispécifiques utilisant transporteurs actifs de la BHE. Ces approches ont été décrites en détail dans la même revue de 2019<sup>9</sup> :

### ***La méthode osmotique***

Une solution hyperosmotique produit une perturbation transitoire et réversible de la BHE en provoquant un rétrécissement des cellules endothéliales et en ouvrant ainsi les jonctions serrées (Figure 3A). En pratique clinique, la procédure comprend une perfusion intra-artérielle de solution hypertonique de mannitol (25%) dans une artère carotide ou vertébrale, suivie d'une administration intra-artérielle de chimiothérapie, pour le traitement des tumeurs cérébrales. Knuutinen et al.<sup>40</sup> ont récemment rapporté le cas d'un homme de 25 ans présentant des métastases cérébrales d'une tumeur germinale, progressant après des traitements standard. Après deux mois de perturbation osmotique de la BHE avec une association intra-artérielle de carboplatine, de cyclophosphamide et d'étoposide, le patient a obtenu une réponse complète et durable. Des résultats prometteurs comparables ont été rapportés avec des métastases cérébrales ou des tumeurs primaires d'autres types de cancer<sup>41,42</sup>. Outre le bénéfice clinique, cette méthode est également sûre, avec des profils de toxicité similaires à ceux de la chimiothérapie intraveineuse. Cependant, il est difficile de mettre en œuvre cette procédure dans la pratique quotidienne puisqu'elle nécessite plusieurs jours d'hospitalisation avec mise en place d'un cathéter crânien intra-artériel sous anesthésie générale<sup>43</sup>.

### ***L'utilisation d'ultrasons***

Cette technique est associée à l'administration intraveineuse de microbulles d'air et présente l'avantage d'être non invasive. Lorsqu'elles sont excitées par des ultrasons, les microbulles se dilatent et exercent une force mécanique sur les cellules endothéliales de la BHE, ce qui entraîne une perturbation des jonctions serrées<sup>44</sup> et une augmentation de l'activité des transports actifs<sup>45</sup> (Figure 3B). Une étude clinique précoce a démontré l'innocuité de l'utilisation d'ultrasons combinés à des microbulles pour perturber la BHE, en association avec le carboplatine, chez 17 patients atteints de glioblastome. Cette étude pilote ouvre de nouvelles perspectives pour l'optimisation de l'administration de la chimiothérapie aux tumeurs cérébrales<sup>46</sup>.

### ***L'administration intra-nasale***

En 2004, une étude a démontré qu'après administration intranasale, les xénobiotiques étaient capables de pénétrer dans le système nerveux central par la voie olfactive et trigéminal<sup>47</sup>. Depuis lors, l'administration intranasale de médicaments a été proposée pour le traitement des tumeurs cérébrales.

Le médicament anticancéreux alcool périllylique a été développé de manière sélective pour traiter les tumeurs du système nerveux central en utilisant l'administration intranasale. Dans une étude

clinique de phase II portant sur 37 patients atteints d'un gliome malin récidivant<sup>48</sup>, l'administration intranasale d'alcool périllylique a été bien tolérée. De plus, par rapport aux témoins historiquement non traités, les patients atteints de glioblastome récidivant primaire traités par de l'alcool périllylique intranasal ont montré un avantage de survie de 5,9 mois<sup>49</sup>. Après 4 ans de traitement exclusif par inhalation d'alcool périllylique chez 198 patients atteints de gliome malin récidivant, 19% des patients étaient toujours en rémission clinique<sup>50</sup>. De plus, le profil de toxicité de l'administration intranasale semble être bon par rapport à l'administration systémique.

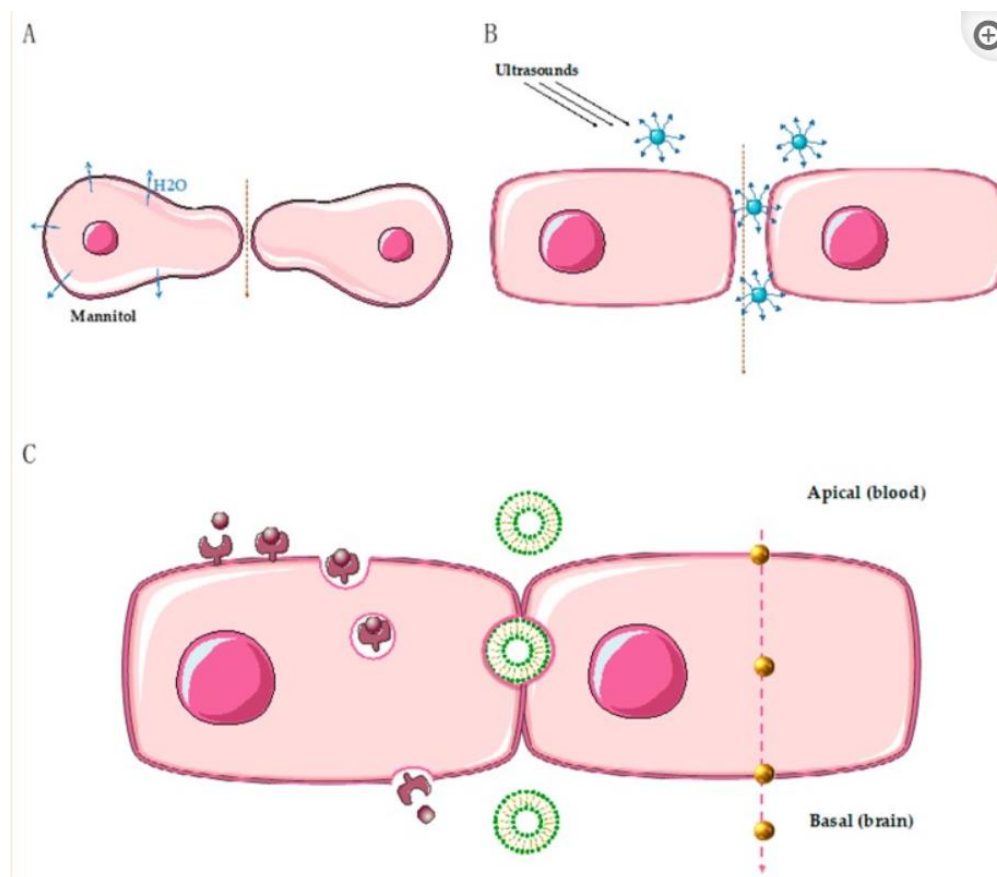


Figure 3 . Résumé des différentes façons de surmonter la BHE (Angeli, Nguyen et al, Int J Mol Sci 2020). (A) Perturbation osmotique, mannitol hypertonique provoque une fuite d'eau dans la zone extracellulaire et un rétrécissement des cellules endothéliales (la flèche bleue signifie une extravasation de H<sub>2</sub>O de l'espace intracellulaire vers l'espace extracellulaire / la flèche rose signifie le passage des médicaments à travers la BHE du sang au cerveau). (B) Ultrasons combinés à des microbulles: lorsqu'elles sont excitées par des ultrasons, les microbulles se dilatent et exercent une force mécanique sur les cellules endothéliales de la BHE, entraînant une rupture de jonction serrée. (C) Transcytose à travers les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique. Côté gauche: transport médié par le récepteur : liaison du ligand à un récepteur spécifique du côté apical, invagination de la membrane contenant le complexe, transcytose, fusion et libération de la cargaison vers la face basale. Milieu: passage inter-endothélial de nanoparticules liposomales. Côté droit: diffusion passive de nanoparticules d'or.

### ***L'utilisation de nanoparticules***

Les nanoparticules sont des particules naturelles ou artificielles dont la taille varie entre 10 et 1000 nm<sup>51</sup>. Le terme nanoparticule s'applique à une grande variété de véhicules d'administration de médicaments, y compris les dendrimères, les micelles, les liposomes, les céramiques à l'échelle nanométrique, les nanoparticules métalliques et polymères<sup>52</sup>. Les nanoparticules présentent deux avantages : d'une part, elles sont absorbées par les cellules endothéliales de la BHE (par les voies de transcytose médiées par les récepteurs ou par adsorption), et d'autre part, lorsqu'elles sont administrées par voie systémique, l'encapsulation des nanoparticules protège les médicaments transportés contre les dommages.

Les nanoparticules d'or sont récemment apparues comme des outils innovants, en particulier pour la thérapie photothermique puisqu'elles peuvent être excitées par laser pour induire une hyperthermie et une cytotoxicité dans les cellules tumorales. Dans un modèle in vitro de barrière hémato-encéphalique, les nanoparticules d'or enrobées de glucose sont absorbées par l'endothélium cérébral et ciblent les cellules gliales par diffusion passive. De plus, les nanoparticules d'or sont capables de pénétrer sélectivement dans les cellules endothéliales du cerveau, plutôt que dans d'autres cellules endothéliales<sup>53</sup> (Figure 3C). Un essai clinique utilisant cette nanoparticule (appelée NU-0129) est en cours pour le traitement du glioblastome récidivant.

Les liposomes sont des vésicules constituées d'une bicouche phospholipidique et d'un noyau aqueux. Ils peuvent passer à travers les lacunes inter-endothéliales dans le système vasculaire perméable de la BHT, ou par des transports actifs médiés par les récepteurs lorsqu'ils sont liés à des ligands spécifiques<sup>54</sup> (Figure 3C). Dans les études précliniques, ils ont tendance à s'accumuler dans les tissus tumoraux cérébraux plutôt que dans les tissus cérébraux normaux<sup>55</sup>, favorisant ainsi la pénétration cérébrale par les médicaments.

Chez 15 patients atteints de glioblastome ou de métastases cérébrales, la doxorubicine liposomale radiomarquée s'est fortement accumulée dans les tumeurs cérébrales avec des réponses significatives chez 14 patients<sup>55</sup>. La même formulation liposomale de doxorubicine fonctionnalisée avec des anticorps anti-HER2 s'est également accumulée dans les métastases cérébrales du cancer du sein surexprimant HER2<sup>56</sup>.

### ***Les anticorps bispécifiques utilisant transporteurs actifs de la BHE***

Le transport médié par les récepteurs permet aux transporteurs actifs de traverser la BHE pour maintenir l'homéostasie du système nerveux central. En règle générale, le récepteur de l'insuline est responsable de l'importation de l'insuline du sang au cerveau. Le récepteur des lipoprotéines de basse densité intervient dans le transport des lipoprotéines et de nombreux autres ligands à travers la BHE<sup>57</sup>. Lorsqu'un ligand se lie à son récepteur spécifique sur les cellules endothéliales

de la BHE, il conduit à l'endocytose du complexe ligand-récepteur dans une vésicule de transport. Lorsque la vésicule atteint la membrane opposée, elle fusionne avec la membrane et permet au ligand d'être libéré dans le compartiment cérébral (Figure 3C). À l'aide de ces navettes physiologiques, des anticorps bispécifiques ou des conjugués de récepteurs médicamenteux ont été développés.

Angiopeps est une famille de peptides, dérivés du domaine de Kunitz, qui est le ligand des récepteurs des lipoprotéines, avec une bonne capacité de transcytose du sang au cerveau. En 2008, Regina et al. ont mis au point un nouveau médicament combinant le paclitaxel et l'angiopep2, appelé ANG1005 ou GRN1005, avec des résultats précliniques prometteurs dans le gliome ou les métastases cérébrales<sup>58</sup>. Dans une étude de phase II sur des femmes atteintes d'un cancer du sein, de métastases cérébrales ou d'une carcinose leptoméningée, le bénéfice clinique était de 71%, avec une survie médiane de 8 mois<sup>59</sup>. Un essai de phase 3 est en cours et les résultats sont attendus en 2020.

Ces données prometteuses ont conduit à l'ingénierie de conjugués d'Angiopep2 avec des thérapies ciblées : une combinaison d'une réception anti-facteur de croissance épidermique (EGFR) et d'Angiopep2, avec des résultats prometteurs dans des modèles murins de glioblastome<sup>60</sup>, et une combinaison d'Angiopep2 avec un nouvel anticorps anti-HER2, avec une forte absorption cérébrale dans des modèles de xénogreffe de métastases cérébrales du cancer du sein surexprimant les récepteurs épidermiques humains (HER)<sup>61</sup>.

De toutes ces approches, l'utilisation d'anticorps bispécifiques, appelés aussi "chevaux de Troie", est la plus avancée dans le développement clinique. Un tel médicament a été approuvé au Japon pour le traitement de la mucopolysaccharidose, et utilise un anticorps du récepteur de la transferrine couplé avec l'enzyme lysosomale iduronate sulfatase<sup>62</sup>.

Pour contourner la limitation du passage direct de la BHE du sang vers le cerveau, une tout autre approche consiste à administrer directement les médicaments dans le liquide céphalo-rachidien (LCR). C'est un des axes de recherche de laboratoire, avec l'administration intrathécale d'IgG et de fragments d'anticorps.

La preuve de concept a été faite en clinique en 2016 avec une jeune patiente atteinte d'un cancer du sein sur-exprimant HER-2 et des métastases cérébrales évolutives, résistantes aux traitements standards. Nous lui avons proposé de faire des administrations intra-ventriculaires de trastuzumab, en guidant le schéma d'administration par une analyse pharmacocinétique détaillée dans le LCR et dans le sérum. L'obtention d'une concentration cible suffisante dans le LCR

nous a permis d'obtenir un contrôle des métastases cérébrales<sup>63</sup>. Nous avons aussi pu mettre en évidence l'existence d'un efflux important de l'anticorps thérapeutique du LCR vers le sang, ayant nécessité des injections répétées pluri-hebdomadaires. Nous avons fait l'hypothèse que cet efflux passait majoritairement le récepteur FcRn des immunoglobulines. De telles injections intra-ventriculaires pluri hebdomadaires n'étant pas compatibles avec la pratique clinique usuelle, notre unité a mis en place un vaste programme de recherche pour faire l'ingénierie et le développement préclinique d'un Fab du trastuzumab, afin de limiter cet efflux.

Depuis la preuve de concept, nous avons néanmoins répété cette approche thérapeutique avec quelques autres patientes, et obtenu des résultats comparables pour la pharmacocinétique du trastuzumab en administration intra-ventriculaire. Nous avons aussi testé la co-administration intra-ventriculaire du trastuzumab avec un cytotoxique afin d'augmenter l'effet antitumoral. C'est le cas de l'une de ces patientes que j'ai prise en charge juste avant ma Thèse de Sciences alors que j'étais en France comme stagiaire associée des Relations Internationales de l'APHP, dans le service d'oncologie médicale de l'hôpital Avicenne. A cette jeune patiente en situation de recours, nous avons proposé l'administration intrathécale d'une association de trastuzumab et de méthotrexate (Figure 4A), en raison de leur cytotoxicité synergique démontrée *in vitro* et de l'utilisation possible du méthotrexate par cette voie d'administration. Guidés par le même type d'étude pharmacocinétique détaillée (Figure 4B), nous avons pu optimiser le schéma d'administration et obtenir une excellente réponse sur les métastases cérébrales après seulement 2 mois de traitement (Figure 4C).

Cette nouvelle étude de cas nous a conforté dans la nécessité de travailler sur cette approche compartimentale, par une administration directe de médicaments dans le liquide céphalo-rachidien pour le traitement des métastases cérébrales<sup>64</sup>.

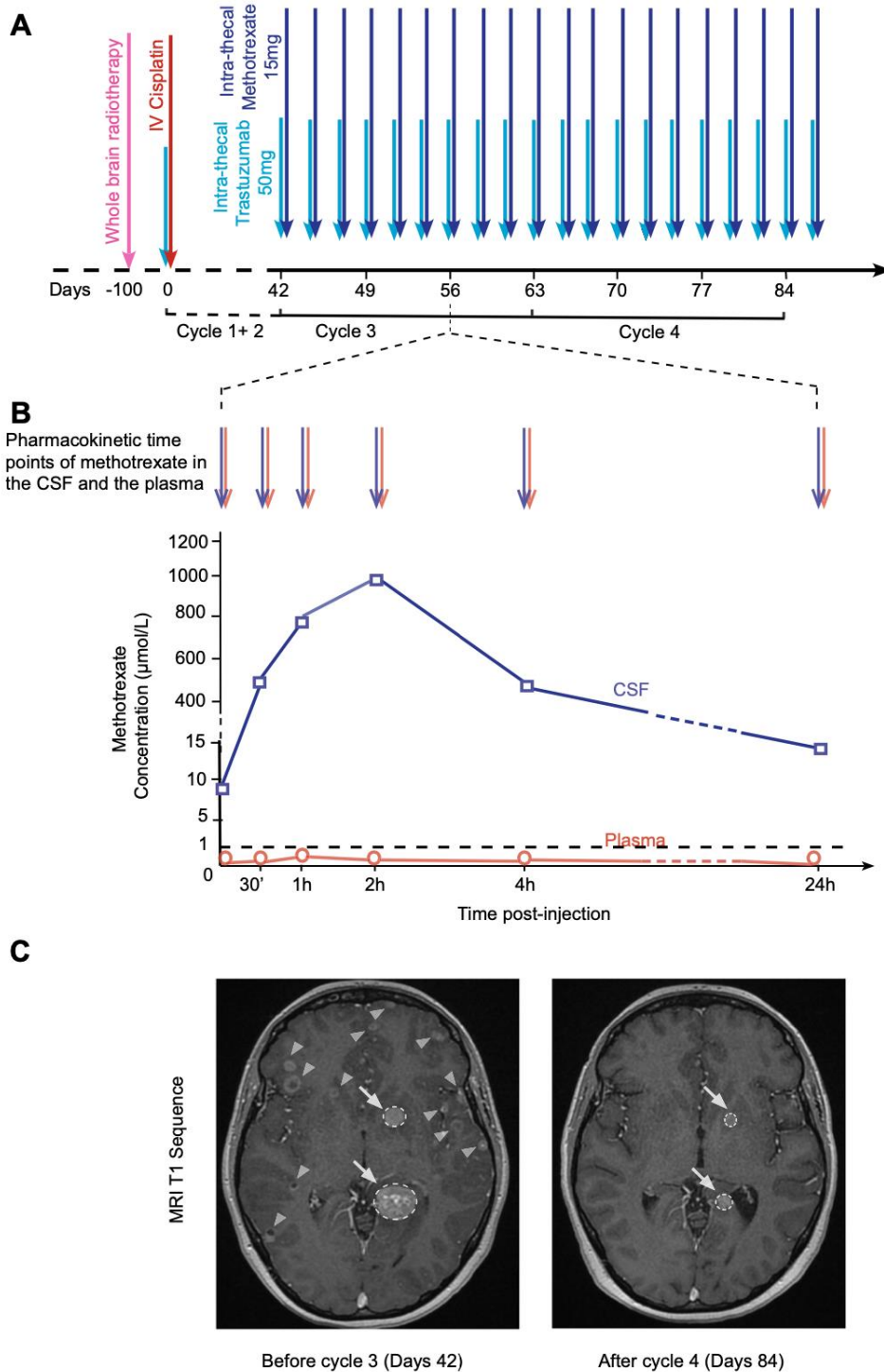


Figure 4. Injections intrathécales de trastuzumab associé au méthotrexate

A. Schéma d'administrations intrathécales pluri hebdomadaires de trastuzumab et de méthotrexate. Les traitements faisaient suite à une progression cérébrale après irradiation encéphalique.

B. Analyse pharmacocinétique intrathécale et intra-veineuse du méthotrexate.

C. IRM cérébrale (séquence T1) de la patiente montrant une réponse cérébrale de 74% au bout de 4 cycles, selon les critères RECIST

D'après Nguyen et al, Cancer Chemother Pharmacol<sup>64</sup> Abréviations : CSF cerebrospinal fluid

### **3. Génomique des métastases cérébrales et méthodes d'analyses fonctionnelles du génome**

Au-delà de ces limitations thérapeutiques et des approches innovantes que je viens d'exposer, la connaissance des données génomiques des métastases cérébrales est encore limitée et constitue un enjeu majeur de la recherche en cancérologie.

Ce constat s'explique avant tout par un accès biopsique difficile de ces localisations<sup>65</sup>. Bien que les tumeurs primitives et les métastases puissent avoir une signature génomique commune, des différences parfois importantes ont été identifiées entre des échantillons appariés d'un patient donné. En effet, les cellules métastatiques peuvent dériver d'un clone minoritaire au sein des tumeurs primitives<sup>66</sup>, mais les métastases cérébrales peuvent sans doute elles-mêmes dériver d'un clone minoritaire dans une métastase extra-cérébrale.

Le profilage moléculaire des cancers est au cœur de la médecine de précision, à la fois pour le soin mais aussi dans le domaine de la recherche. Actuellement, il existe de nombreuses technologies différentes étudiant épigénomique, génomique, et transcriptomique. L'épigénomique s'intéresse à l'identification des modifications impliquées dans les mécanismes de régulation contrôlant l'expression des gènes telles que la méthylation de l'ADN, la modification des histones, la liaison aux facteurs de transcription, l'accessibilité de la chromatine ou la conformation tridimensionnelle de la chromatine. Les analyses génomiques permettent l'étude des modifications de l'ADN telles que les mutations génétiques, les modifications de nombres de copies, les pertes d'hétérozygotie et les réarrangements chromosomiques. Quant à la transcriptomique, elle permet de mesurer le niveau d'expression des ARNm transcrits dans la cellule, ce qui reflète directement les gènes exprimés à un moment donné. Les technologies couramment utilisées pour les analyses épigénétiques, génomiques, et transcriptomiques sont décrites en détail dans le Tableau 3<sup>67-70</sup>



Tableau 3. Résumé des principaux avantages et inconvénients des technologies les plus couramment utilisées pour l'analyse fonctionnelle du génome

Étude	Méthode	But	Description	Avantages	Inconvénients
<b>Épigénomique</b>					
Technique à haut débit	WGBS	Méthylation de l'ADN	Séquençage de l'ADN bisulfite	Haute résolution CpG	Lourdeur des analyses bio-informatiques Coûteux
	MRE-seq	Méthylation de l'ADN	Digestion de l'ADN par une enzyme de restriction à la méthylation suivie d'un séquençage	Facile à utiliser	Limiter par l'utilisation d'une enzyme spécifique et par son activité
	ChIP-seq	Modifications des histones/ présence de facteurs de transcription	Immunoprécipitation avec un anticorps contre une modification d'histones/ facteur de transcription, suivie d'un séquençage	Technique bien rodée	Besoin d'un nombre élevé de cellules Reproductibilité incertaine
	ATAC-seq	Accessibilité de la chromatine/ Positionnement des nucléosomes	Utilisation de la transposase Tn5 pour créer des bibliothèques de séquençage. Méthode basée sur l'intégration préférentielle de la Tn5 dans la chromatine ouverte	Simple Ne nécessite qu'un faible nombre de cellules	Peut avoir des biais de séquence
Technique à haut débit Conformation tridimensionnelle de	4C	Détection des interactions tridimensionnelles entre un loci et le reste du génome	Les complexes ADN-protéine sont réticulés en utilisant du formaldéhyde. Il est fragmenté et l'ADN est ligaturé	Haute résolution	Echec de détection des interactions focales (<50kb) entre la région intérêt et le reste du

la chromatine	Hi-C	Détection de toutes les interactions tridimensionnelles du génome	et digéré. Les fragments d'ADN se circularisent, suivis d'une PCR inverse et d'un séquençage.	Couverture large du génome	génomique	Faible résolution, Lourdeur des analyses bio-informatiques
<b>Génomique</b>						
	ISH (FISH, CISH)	Détection d'anomalies cytogénétiques structurelles mineures	Utiliser une sonde spécifique pour cibler des emplacements chromosomiques spécifiques dans le noyau, ce qui donne des signaux colorés qui peuvent être détectés à l'aide d'un microscope à fluorescence (FISH) ou en lumière blanche (CISH)	Sensibilité, et spécificité élevées		Basé sur des sondes reconnaissant à une cible spécifique Coût
Haute résolution à l'échelle du génome	aCGH	Détecter simultanément les aneuploïdies, les délétions, les duplications et/ou les amplifications de tout locus représenté	Marquer un échantillon d'ADN test et un échantillon d'ADN de référence avec la cyanine 3 et la cyanine 5, des colorants fluorescents verts et rouges, respectivement. Après cette étape, le test et la référence sont mélangés et déposés sur un microréseau composé de dizaines de milliers de courtes séquences d'ADN représentant des régions du génome. Les échantillons regroupés s'hybrideront de manière compétitive aux sondes d'ADN.	Sensibilité et spécificité élevées		Inapproprié pour la détection des réarrangements chromosomiques équilibrés

Séquençage ciblé, à bas débit, qu'un seul fragment d'ADN à la fois (800-1000 bp)	Sanger	Peut être utilisé comme méthode complémentaire pour confirmer des variants identifiés par le NGS	- L'ADN polymérase ajoute des nucléotides fluorescents un par un sur un brin de matrice d'ADN en croissance - Chaque nucléotide incorporé est identifié par son étiquette fluorescente.	Simple et rapide Spécifié forte L'utilisation de quantités minimales (aussi faibles que 0,1ng) d'ADN provenant d'échantillons FFPE	Faible sensibilité Prend beaucoup de temps et peu rentable pour des fragments d'ADN de grande taille
Séquençage ciblé, à haut débit	Targeted NGS	Séquençage des régions d'intérêt		Diminution du coût Analyse simplifiée Sensibilité élevée Nécessite une faible quantité d'ADN (10ng)	Pouvoir manquer des variantes pertinentes si elles ne sont pas dans le panel de gène
Technique à haut débit	WES	Séquençage uniquement des exons (régions codant pour les protéines)		Flux de travail plus rapide que WGS Nécessite une faible quantité d'ADN (50ng-1µg) Sensibilité, mais plus faible que targeted NGS	Analyse des données compliquée dans le cas de variants non spécifiés
	WGS	Séquençage du génome entier		Permet d'identifier les variantes de nucléotide unique, de structure ou de	Matériel coûteux Lourdeur des analyses bio-informatiques

nombre de copies

*Transcriptomique*

Un ou quelques gènes	PCR classique	Le séquençage Le génotypage Le clonage	Chaque cycle de PCR est constitué de trois étapes : une dénaturation de l'ADN par chauffage pour séparer les deux brins qui le composent, une hybridation des amorces aux extrémités de la séquence recherchée, puis une élongation grâce à l'action d'une ADN polymérase.	Simple, rapide	Faible précision Faible sensibilité Faible résolution Les résultats ne sont pas exprimés en chiffres
	RT-PCR	Évaluation quantitative absolue de l'expression génétique		- Simple, rapide, précise, sensible	Ne pouvoir détecter que des séquences connues.
	dd-PCR	dd-PCR : pouvoir détecter des allèles rares	Ce cycle est répété un grand nombre de fois pour obtenir une multiplication exponentielle de la séquence d'ADN cible	Sensibilité, beaucoup élevée, précise	Plus coûteux que la RT-PCR
			dd-PCR : amplification du signal par la partition de l'échantillon en millier de gouttelettes		
	SAGE	Analyser tous les transcrits (y compris de nouveaux gènes) sans connaissance préalable des gènes	Représentation des ARNm par de courtes étiquettes de séquence et concaténation de ces étiquettes pour le clonage afin de permettre une analyse de séquençage efficace	Directe, quantitative Analyse de données simple Sensibilité pour détecter des transcrits peu exprimé	Faible débit Coût et prend du temps par rapport microarrays
Transcriptome entier					

cDNA Microarrays	Mesurer le niveau d'expression des gènes	Basée sur l'hybridation entre des cibles marquées issues d'un échantillon et un réseau de nombreuses sondes d'ADN immobilisées sur une matrice Le signal d'hybridation produit pour chaque sonde est le niveau d'expression de l'ARNm du gène correspondant dans l'échantillon au moment de l'étude	Méthode à fort débit et quantitative Rapide, sensible, spécifique	Lourdeur des analyses informatiques
RNA-seq	L'identification de gènes, de transcrits ou d'expression spécifique d'allèle Faciliter la découverte de mutations rares, d'isoformes de gènes auparavant non reconnus	L'ARNm est extrait de l'organisme, fragmenté et copié dans un ADNc double brin stable (ds-cDNA). L'ADNc ds est séquencé à l'aide de méthodes de séquençage à haut débit et à lecture courte. Ces séquences peuvent ensuite être alignées sur une séquence génomique de référence pour reconstruire quelles régions du génome ont été transcrites	Rapide, précise, sensible et à haut débit Peut être réalisée sur des tissus fixé en formol Ne nécessite pas de connaissance a priori sur les caractéristiques génomiques.	Coûteux Lourdeur des analyses informatiques

WGBS: Whole-genome bisulfite sequencing

MRE-seq: Methylation Restriction Enzyme sequencing

ChIP-seq: Chromatin immunoprecipitation sequencing

ATAC-seq: Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing

FISH: Fluorescence in situ hybridization

CISH: Chromogenic in situ hybridization

aCGH: Array comparative genomic hybridization

Targeted NGS: Targeted next generation sequencing

WES: Whole exome sequencing

WGS: Whole genome sequencing

RT-PCR: Real-time polymerase chain reaction

dd-PCR: digital droplet polymerase chain reaction

SAGE: Serial analysis of gene expression

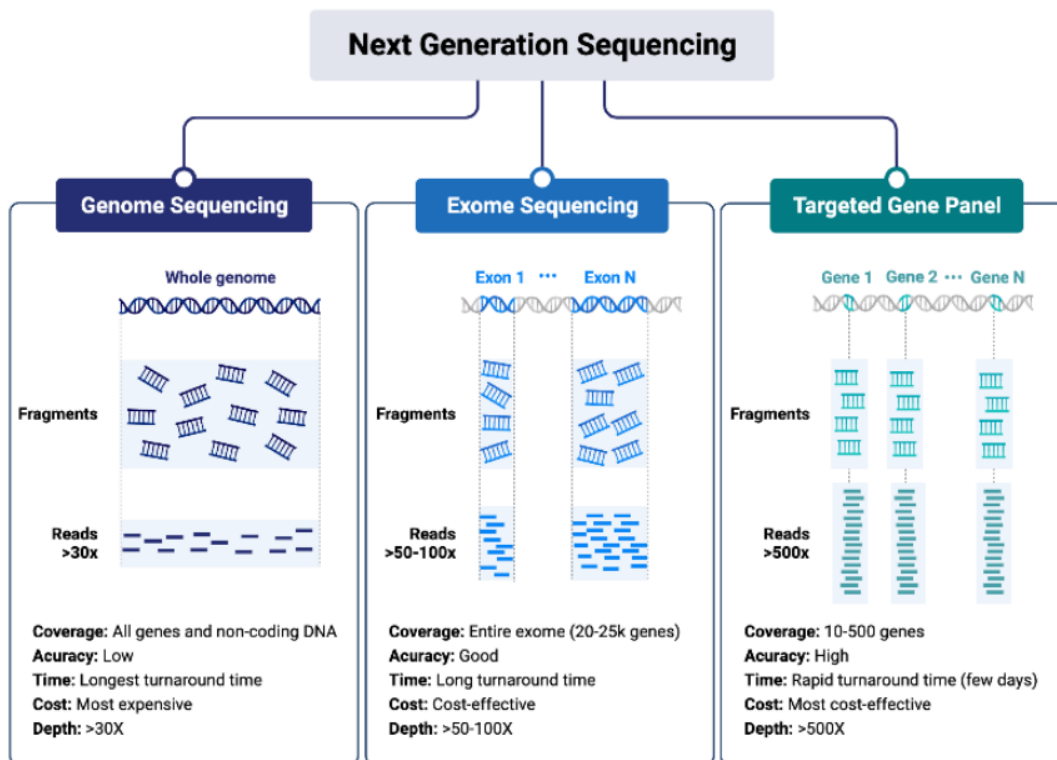
Dans ce paragraphe, je propose de détailler les techniques que j'ai utilisées pendant ma Thèse de Sciences.

### 3.1. NGS

Le séquençage nouvelle génération (NGS), également connu sous le nom de séquençage à haut débit, est une technologie récente qui permet de séquencer l'ADN et l'ARN beaucoup plus rapidement que les méthodes antérieures. Les technologies NGS présentent 3 étapes communes :

- **La préparation de banques** : les banques sont créées en utilisant une fragmentation aléatoire de l'ADN suivie de la liaison avec des petites séquences spécifiques
- **L'amplification** : la banque est amplifiée grâce à des méthodes d'amplification clonale et de PCR
- **Le séquençage** : l'ADN est séquencé en utilisant différentes approches en fonction de la technologie utilisée

Le séquençage de l'ADN comprend le séquençage du génome entier (WGS), de l'exome entier (WES) ou de gènes cibles (Targeted NGS) qui sont alors une sélection de gènes d'intérêt pour une maladie donnée (Figure 5).



Template adapted from: Dr. Roshini Abraham  
Clinical Immunologist at Nationwide Children's Hospital

Figure 5. Trois techniques de séquençage de l'ADN (tiré de biorender.com)

### 3.2. La PCR (Polymerase Chain Reaction)

La réaction de polymérase en chaîne (PCR) a été découverte en 1990 par le Dr Mullis. C'est une technique d'amplification d'un fragment d'ADN spécifique à partir d'un pool complexe d'ADN. Elle permet d'obtenir un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN choisie.

Une analyse PCR de base peut être divisée en trois phases (Figure 6A) :

**Exponentielle** : Au cours de cette phase, l'ADN cible double à chaque cycle (en supposant que la réaction est efficace à 100 %). La réaction est très spécifique et précise. L'amplification exponentielle a lieu dès lors que tous les réactifs sont disponibles et que la cinétique de la réaction favorise le doublement de l'amplicon.

**Linéaire** (forte variabilité) : à ce stade, certains réactifs sont consommés par suite de l'amplification. Les réactions commencent à ralentir et le produit de la PCR n'est plus doublé à chaque cycle.

**Plateau** : La réaction s'est arrêtée, aucun produit supplémentaire n'est généré et, les produits de la PCR commencent à se dégrader. Chaque réaction s'arrêtera à un point différent, en raison de la cinétique de réaction différente pour chaque échantillon.

La figure 6B montre clairement les variations de la phase de plateau de plusieurs réactions de PCR avec la même concentration d'ADN de départ. Dans cet exemple, 96 réactions répliquées ont été faites sur la même plaque. Les valeurs de fluorescence au point final montrent beaucoup de variabilité d'un échantillon à l'autre. Ceci est dû aux variations de la cinétique de réaction.

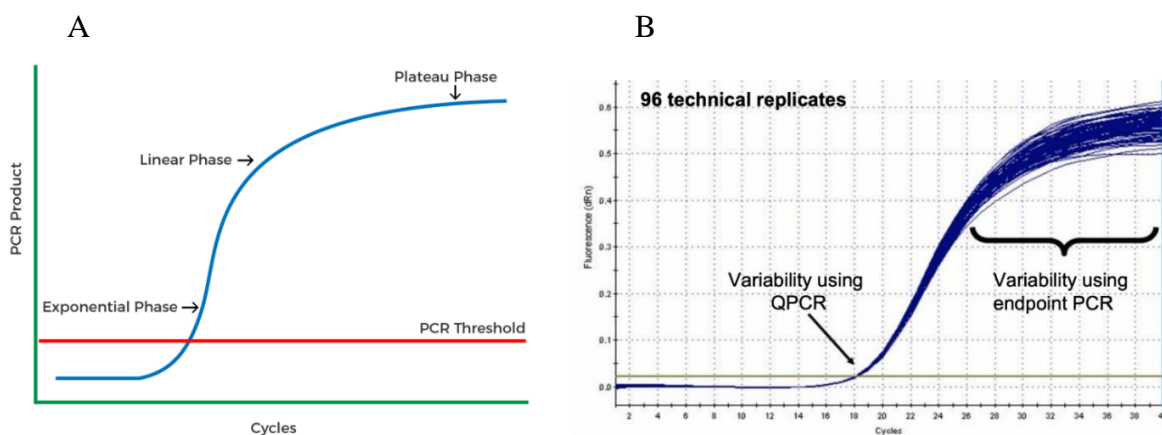


Figure 6. La Polymerase Chain Reaction

A, Phases de la PCR

B, Des échantillons identiques produisent différentes quantités de produits de réaction par la phase plateau de la PCR tandis que les valeurs Cq restent cohérentes (Cq: Quantification du Cycle) (tiré de Medicinal Genomics, <https://help.medicinalgenomics.com/qpcr-vs-end-point-pcr>)



Les différents types de PCR sont :

**La PCR classique** : les mesures sont prises au niveau de la phase de plateau, par conséquent, elle donne des résultats variables. C'est la limitation de PCR classique.

**La PCR en temps réel** (RT-PCR : real-time PCR) se concentre sur la phase exponentielle, car cette phase fournit des données plus précises et reproductible pour l'évaluation quantitative. Pendant la phase exponentielle, l'instrument de PCR en temps réel détermine à quel cycle une réaction dépasse l'intensité de fluorescence du « bruit de fond ». Ce niveau s'appelle la Quantification du Cycle, Cq. En comparant les valeurs Cq des échantillons dont la concentration est inconnue avec une série d'échantillons étalonnés, la quantité de matrices d'ADN dans une réaction inconnue peut être déterminée avec précision.

**La PCR digitale en gouttelettes** (ddPCR : Digital Droplet PCR) est une méthode de PCR numérique utilisée pour la quantification ultrasensible et absolue des acides nucléiques. Elle fonctionne en fractionnant un échantillon en environ 20 000 gouttelettes et une amplification PCR s'effectue dans chaque gouttelette. Après la PCR, chaque gouttelette est analysée afin de déterminer la fraction de gouttelettes positives dans l'échantillon d'origine.

En discrimination allélique pour une mutation "hotspot" d'un gène connu, la ddPCR permet d'identifier et de quantifier cette mutation connue (généralement un hotspot) avec une très grande sensibilité en utilisant une sonde spécifique de la mutation et de la séquence sauvage. En effet, le seuil de détection de la méthode est d'environ 0.1%. Par contre, elle ne permet pas de détecter des mutations autres que celles recherchées.

### 3.3. cDNA Microarray

Le «DNA microarray» ou technique des puces à ADNc (ADN complémentaire), est une technologie moléculaire puissante qui permet l'étude simultanée de l'expression de milliers de gènes dans la cellule au moment de l'étude.

L'analyse des puces à ADNc peut être divisée en deux étapes principales : la production de sondes (target) et la production de cibles (probe). Les sondes correspondent aux fragments synthétiques d'ADN espacés de quelques micromètres, fixés sur la puce et représentatifs de chacun des gènes étudiés.

Comme l'ARNm se dégrade facilement, L'ARN des cellules est rétrotranscrit en ADNc qui est plus stable. L'ADNc est ensuite couplé à un marqueur fluorescent (appelé cible). Les ADNc réagissent ensuite avec les sondes de la puce à ADN au cours de l'étape d'hybridation. Chaque séquence est identifiée par son schéma d'émission de fluorescence (Figure 7).

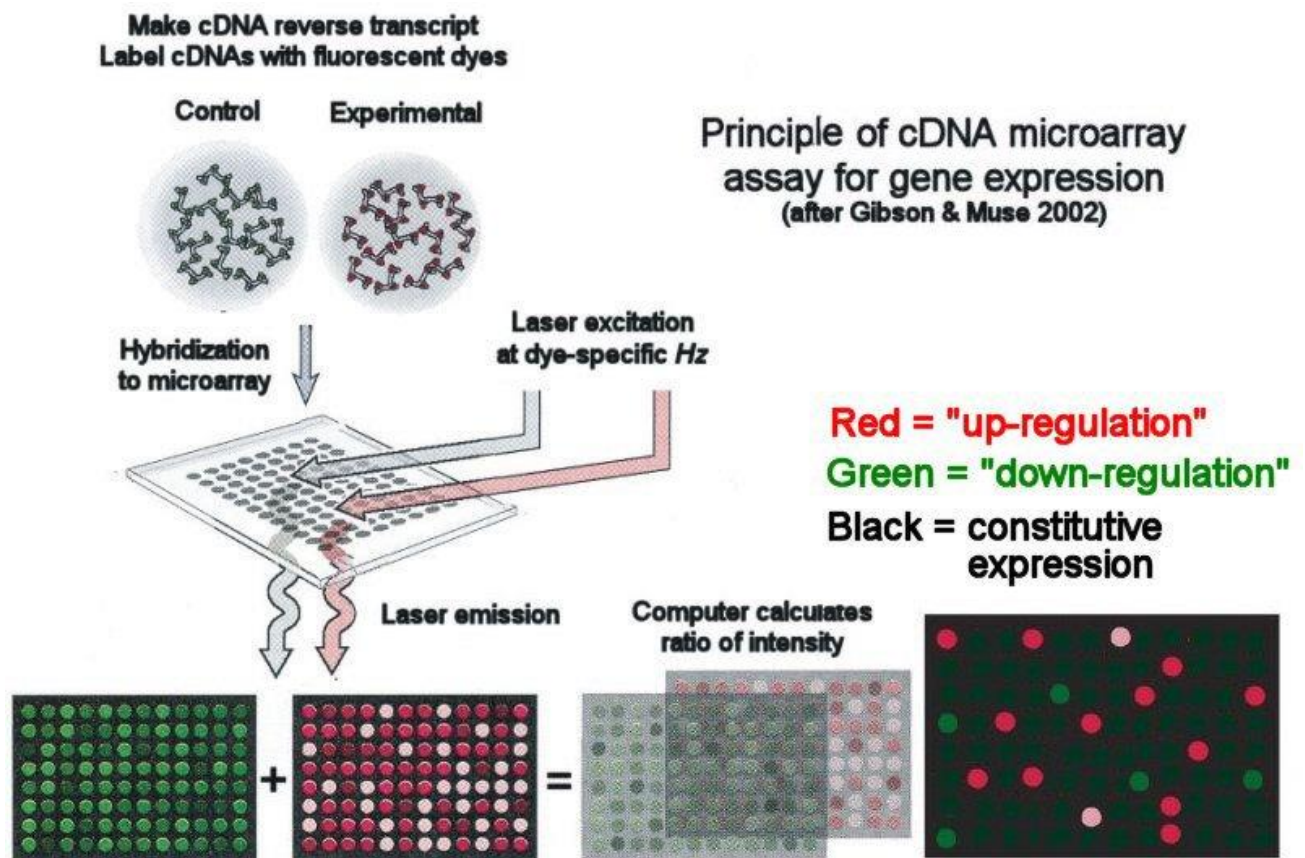


Figure 7. cDNA microarray pour l'expression du gène (tire de [https://www.mun.ca/biology/scarr/cDNA\\_microarray Assay of Gene Expression.html](https://www.mun.ca/biology/scarr/cDNA_microarray_Assay_of_Gene_Expression.html))

Plusieurs questions sont en suspens, auxquelles j'ai tenté de répondre durant ma Thèse de Sciences :

- 1) À partir de données moléculaires obtenues de métastases extra-cérébrales, peut-on identifier des biomarqueurs prédictifs de la survenue de métastases cérébrales ?
- 2) Peut-on identifier des signatures mutationnelles propres aux métastases cérébrales ?
- 3) Peut-on identifier une signature moléculaire transcriptomique commune à des métastases cérébrales dérivées de différents types de cancers ?

## **II. DOMAINE DE RECHERCHE**

### **1. À partir de données moléculaires obtenues de métastases extra-cérébrales, peut-on identifier des biomarqueurs prédictifs de la survenue de métastases cérébrales ?**

Notre unité a conduit un premier projet à partir d'échantillons de métastases ganglionnaires de 28 patientes atteintes de cancers du sein ayant développé ou non des métastases cérébrales. L'analyse transcriptomique sur tissu microdisséqué des métastases ganglionnaires a permis d'identifier une surexpression du gène *CDKN2A/p16* dans les ganglions de patientes ayant développé des métastases cérébrales au cours de l'évolution de leur maladie. Le score immunohistochimique de p16 était significativement plus élevé chez les patientes avec métastases cérébrales par rapport aux patientes ne développant pas de métastases cérébrales<sup>71</sup>.

Durant ma Thèse, en utilisant la même approche, j'ai réalisé une étude sur 101 patients avec mélanome métastatique ganglionnaire (stade III), et pour lesquelles nous avons les données cliniques évolutives avec un suivi de plus de 4 ans. Nous étions en mesure de catégoriser les patients selon qu'ils avaient ou non développé des métastases cérébrales. Ce travail de recherche translationnelle a fait l'objet d'une publication dont je suis première auteur, dans la revue *Clinical and Translational Medicine*, Impact factor 11.49<sup>72</sup>.

#### **1.1. Matérielles et méthodes**

Nous avons suivi les recommandations de rapport pour les études pronostiques de marqueurs tumoraux (recommandations REMARK)<sup>73</sup>.

##### **Données patientes**

Cent un patient de l'hôpital Saint-Louis avec des échantillons tumoraux disponibles et des données de suivi ont été inclus dans cette étude, pour les cohortes de développement et de validation. Le consentement éclairé a été obtenu de chaque patient. Le Comité d'éthique du Conseil de la recherche clinique a approuvé cette étude (CPP-Ile-de-France#13218).

Tous les patients ont été diagnostiqués entre 2009 et 2014 et présentaient un mélanome métastatique macroscopique régional sans métastases à distance au moment de l'inclusion dans cette étude. Aucun d'entre eux n'a reçu de traitement adjuvant systémique. Cinquante et un patients ont été inclus dans la cohorte de développement, avec des échantillons prélevés entre 2009 et 2013. Cinquante patients supplémentaires ont été inclus dans la cohorte de validation, avec des échantillons prélevés entre 2013 et 2014.

Sur la base des données cliniques et d'imagerie, et d'un suivi médian de 48 mois à partir du moment de la maladie ganglionnaire régionale, les patients avec et sans métastases à distance ont été séparés, y compris ceux présentant des métastases cérébrales. Comme recommandé par le National Comprehensive Cancer Network, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) du

cerveau a été systématiquement réalisée au moment de la maladie métastatique, puis au moins une fois par an, ou en cas de symptômes neurologiques.

### **Microdissection laser de cellules tumorales de ganglions lymphatiques métastatiques et traitement des données transcriptomiques**

Pour la cohorte de développement, après consultation du registre du service de pathologie (hôpital Saint-Louis), nous avons identifié 336 patients atteints de mélanome et d'échantillons métastatiques ganglionnaires régionaux prélevés entre 2009 et 2013. Parmi eux, 100 patients disposaient d'au moins un échantillon métastatique congelé et 58 patients avaient un suivi d'au moins 36 mois à compter du diagnostic de maladie métastatique (Figure 8). Des sections cryo-découpées de chaque échantillon ont été microdisséquées au laser pour sélectionner les cellules tumorales. À l'aide d'un système PALMMicrobeam/Zeiss, un minimum de 1500 cellules tumorales ont été microdisséquées au laser sur des coupes tissulaires de 7  $\mu\text{m}$  d'épaisseur pour une surface minimale de 471 000  $\mu\text{m}^2$ . L'ARN total a été extrait des cellules tumorales microdisséquées par laser à l'aide de RNeasy-Mini-Kit (Qiagen, France), il a été quantifié sur NanoDrop et qualifié sur Bio-RadExperion™ Automated- Electrophoresis-Station (BioRad, France). Sept des 58 cas avaient un ARN de qualité insuffisante. Les 51 cas restants avaient un indice moyen d'intégrité de l'ARN de 8,7 (intervalle 7-10) (Figure 8).

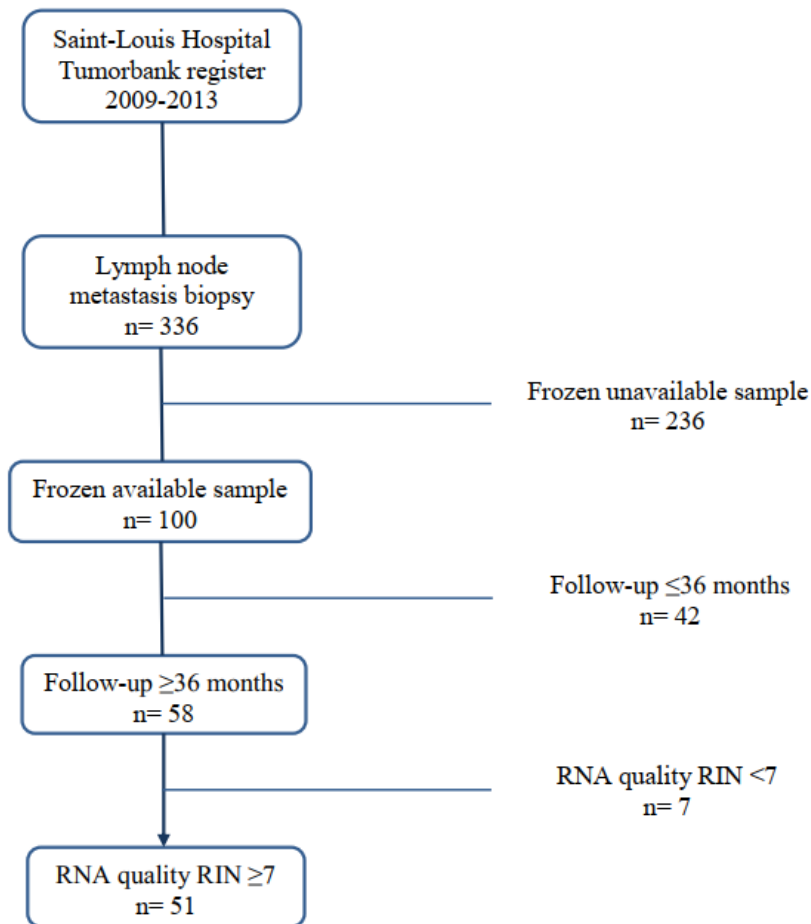


Figure 8. Diagram for selection criteria of the 51 patients of the development cohort.

Les analyses transcriptomiques ont été effectuées à l'aide de MiltenyiBiotec-Microarray. Une étape d'amplification linéaire basée sur T7 a été réalisée sur 0,5 µg de tous les échantillons d'ARN. Pour produire de l'ARNc marqué Cy3, les échantillons d'ARN ont été amplifiés et étiquetés à l'aide du kit de marquage Agilent-Quick. Les rendements de l'ARNc et les taux d'incorporation de colorants ont été mesurés avec un spectrophotomètre ND-1000 (NanoDrop, LabTech, France). L'hybridation a été réalisée selon le protocole Agilent 60-mer-oligomicroarray: 1,65 µg d'ARNc marqué Cy3 ont été hybridés (pendant la nuit/65 °C) sur des microréseaux Agilent-Whole-Human-Genome-Oligo-Arrays 8 × 60K V2, et des signaux de fluorescence ont été détectés à l'aide d'un scanner AgilentMicroarray. Agilent-FE-Software a déterminé l'intensité des fonctionnalités. La normalisation quantile a été réalisée à l'aide du paquet Limma sur R-software version 3.2.1 (Foundation for Statistical Computing, Vienne, Autriche), basé sur des données d'expression d'intensité unique log2.

## **RT-qPCR et validation de l'expression de l'ARNm *PROM2* dans les ganglions lymphatiques métastatiques**

Pour la cohorte de développement, sur les sections suivantes des mêmes ganglions lymphatiques métastatiques microdisséqués au laser, la RT-qPCR a été réalisée pour valider les résultats transcriptomiques de l'expression de *PROM2* [Hs00376331\_m1].

Pour la cohorte de validation, les cellules cancéreuses du mélanome de 50 ganglions lymphatiques métastatiques ont été microdisséquées au laser et traitées pour la RT-qPCR.

L'ARN total a été transcrit à l'envers (ADNc) avant amplification qPCR à l'aide d'amorces aléatoires avec SuperScript<sup>TM</sup>-II-Reverse Transcriptase (Invitrogen, France). Les réactions qPCR ont été réalisées à l'aide de sondes fluorescentes sur un système CFX96 Real-Time (Bio-Rad) conformément aux directives MIQE<sup>74</sup>. Un échantillon blanc sans ADNc a été inclus, et les expériences ont été réalisées en triple exemplaire pour chaque gène, chaque échantillon étant dupliqué sur la plaque PCR. Le gène de référence TBP [Hs99999910\_m1] a été utilisé pour normaliser les résultats de l'expression génique. Les résultats ont été exprimés en  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  (quantification relative).

### **Expression in situ de *PROM2* dans les ganglions lymphatiques métastatiques**

En immunohistochimie, l'expression de *PROM2* a été évaluée dans les ganglions lymphatiques métastatiques des 51 échantillons déjà traités pour les analyses transcriptomiques et des 50 échantillons de la cohorte de validation. Une méthode indirecte d'immuno-péroxydase (Discovery/RocheDiagnostics) sur des coupes de tissus congelés de 5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur a été utilisée en utilisant l'anti-*PROM2* (ab74997, polyclonal de lapin, Abcam, 1/100) comme anticorps primaire, et le kit de détection anti-lapin OmniMap (Roche-Diagnostics). Les contrôles systématiques étaient l'absence d'anticorps primaire et l'utilisation d'un anticorps primaire non pertinent du même isotype. La peau normale et le foie normal ont été utilisés comme témoins positifs et négatifs respectivement. Pour chaque section de tissu, les cellules exprimant *PROM2* ont été comptées par deux pathologistes différents (MB, AJ) sur cinq champs différents à un grossissement de  $\times 400$ , à l'aide d'un microscope ProvisAX70 (Olympus, Tokyo) avec un oculaire à grand champ numéro 26,5, fournissant une taille de champ de 0,344 mm<sup>2</sup> à ce grossissement. Les pathologistes ont été aveuglés par les données cliniques.

Une distribution membraneuse et cytoplasmique de *PROM2* a été considérée comme positive. Pour chaque champ, un minimum de 100 cellules tumorales ont été analysées. Le pourcentage de cellules exprimant *PROM2* était le nombre de cellules positives parmi ces 100 cellules tumorales. Chaque échantillon a reçu un score en multipliant le grade d'intensité des taches (0

= aucune coloration, 1 = faible intensité, 2 = intensité moyenne, 3 = intensité forte) par le code numérique pour le pourcentage de cellules positives (0 = 0%, 1 = inférieur à 10%, 2 = 10-50%, 3 = 51-80%, 4 = plus de 81%). Le score maximum était de 12 lorsque plus de 81% des cellules exprimaient PROM2 avec un signal d'intensité forte. Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  d'erreur-type de la Moyenne.

### **Analyses statistiques**

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel statistique R (version 3.4.3, R Foundation for Statistical Computing, Vienne, Autriche; <http://www.r-project.org>). Aux fins de l'analyse descriptive, les variables catégorielles ont été résumées sous forme de nombre (pourcentage) et les variables continues ont été résumées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type (ET) ou de médiane [intervalle interquartile 25e à 75e], selon le cas. Le « score PROM2 IHC » a été classé par la médiane de 5 comme faible ( $< 5$ ) ou élevé ( $\geq 5$ ). L'imputation multivariée par équations enchaînées a été utilisée pour traiter les données manquantes pour l'expression PROM2 ( $n = 2$ ) et le « score PROM2 IHC » ( $n = 10$ ), via le package MICE dans R.

*Données transcriptomiques* : Le package Bioconductor Limma a été utilisé pour lire les fichiers de données du test d'expression génique, pour appliquer une correction de fond, pour filtrer les sondes et pour normaliser l'expression génique entre les échantillons. Le package SAMR a été utilisé pour identifier les gènes exprimés différemment dans les échantillons avec la méthode non appariée à deux classes, basée sur l'ExpressionSet généré par le package Limma. Une valeur P estimée a été rapportée pour chaque gène, à partir d'un ensemble de permutations dans l'analyse SAM ( $n = 1500$  permutations). Les valeurs de p ont été corrigées pour les comparaisons multiples à l'aide de la méthode des taux de fausses découvertes (FDR). L'analyse FDR permet de multiples comparaisons de la distribution des valeurs P et calcule un seuil correspondant à une valeur Q définie (0,001), où le paramètre q représente la limite supérieure de la proportion de gènes exprimés différemment qui sont des faux positifs. Une valeur Q minimale  $< 0,001$  a été fixée, ce qui signifie que la liste des gènes exprimés différemment ne contenait que 0,1% de faux positifs. Le score (d) ou d-score représente la valeur statistique T qui mesure l'ampleur de la différence par rapport à la variation de nos données d'échantillon.

Nous avons effectué les mêmes analyses sur les données transcriptomiques téléchargées à partir de banques de données publiques. Les données transcriptomiques des mélanomes métastatiques ont été importées des bases de données TCGA et GEO (Gene Expression Omnibus). Les fichiers « HT-seq counts » de la cohorte TCGA SKCM<sup>75</sup> ont été téléchargés avec le package TCGAbiolinks R et la normalisation a été effectuée avec le package DESqe2,

en appliquant une transformation stabilisatrice de la variance aux données de comptage. Les données traitées des séries GEO suivantes ont été téléchargées et analysées: GSE22155<sup>76</sup>, GSE65904<sup>77</sup>, GSE60464<sup>78(p5)</sup>.

*Facteurs associés aux métastases cérébrales* : Les patients avec et sans métastases cérébrales au départ ont été comparés en ce qui concerne leurs caractéristiques cliniques (âge, sexe, siège primaire du mélanome, site métastatique et présence d'ulcération), le statut *BRAF*, l'expression de *PROM2* et l'intensité du « score IHC *PROM2* » en utilisant le test du khi carré ( $\chi^2$ ) ou le test exact de Fisher selon le cas pour les variables catégorielles et le test t de Student ou le test de Wilcoxon pour les variables quantitatives, selon le cas. Une régression logistique univariée et multivariée a été réalisée avec l'échantillon de patients métastatiques cérébraux. Les rapports de cotes (RC) pour les variables continues ont été exprimés par écart type ou intervalle interquartile (IQR), selon le cas. Les variables donnant des valeurs de P inférieures à 0,2 dans l'analyse univariée ont été prises en compte pour inclusion dans l'analyse multivariée. Un processus d'élimination rétrospective des valeurs p les plus élevées a été utilisé pour l'analyse multivariée. Les variables associées aux patients métastatiques cérébraux dans l'analyse multivariée ont été exprimées sous forme de RC ajusté (RCA) [intervalle de confiance (IC) à 95%].

*Facteurs associés à la mortalité* : Les courbes de survie univariées ont été tracées selon la méthode Kaplan-Meier pour le statut métastatique cérébral et le « score *PROM2* IHC ». Une régression à risque proportionnel de Cox univariée et multivariée a été réalisée avec l'échantillon de patients décédés. Les hypothèses du modèle ont été vérifiées. Les hazard ratios (HR) pour les variables continues ont été exprimés par écart type ou intervalle interquartile (IQR), selon le cas. Les variables donnant des valeurs de P inférieures à 0,2 dans l'analyse univariée ont été prises en compte pour inclusion dans l'analyse multivariée. Un processus d'élimination rétrospective des valeurs P les plus élevées a été utilisé pour l'analyse multivariée. Les variables associées à la mortalité dans l'analyse multivariée ont été exprimées sous forme de HR ajusté (aHR) [IC à 95 %]. Nous avons vérifié les termes d'interaction potentiels entre tous les prédicteurs de survie pour ajuster le modèle multivarié final.

## **1.2. Résultats**

### **Caractéristiques de la cohorte de développement des patients**

Parmi les 51 patients sélectionnés pour cette étude, 19 avaient des métastases cérébrales et 32 n'en avaient pas. Les patients ont été divisés en 3 groupes en fonction de la présence ou non de métastases cérébrales, et des autres localisations métastatiques : le groupe 1 comprenait des



patients présentant uniquement des métastases ganglionnaires régionales ; Le groupe 2 comprenait des patients sans métastases cérébrales mais présentant d'autres localisations métastatiques ; Le groupe 3 comprenait des patients présentant des métastases cérébrales (Figure 9A). Les caractéristiques de ces 51 patients sont résumées dans le tableau 4, comparant les patients présentant des métastases cérébrales (groupe 3) et les patients sans métastases cérébrales (groupes 1 et 2).

*Tableau 4. Characteristics of the 51 patients in the development cohort with transcriptomic analyses of metastatic lymph nodes*

<b>Variables</b>	<b>N (%)</b>	<b>Brain metastases (Group 3) N=19 (37%)</b>	<b>No brain metastasis (Group 1 and 2) N=32 (63%)</b>	<b>P*</b>
Age (y), mean ± SD	57.8 ± 15.8	55.0 ± 15.6	59.5 ± 15.9	0.3
Gender (women)	28 (55)	11 (58)	17 (53)	0.7
Initial TNM classification <sup>#</sup> :				
IIIB	20 (39)	7 (37)	13 (41)	0.5
IIIC	28 (55)	10 (53)	18 (56)	
IIID	3 (6)	2 (10)	1 (3)	
Primary site of melanoma:				0.6
Head and neck	5 (10)	3 (16)	2 (6)	
Trunk	10 (20)	3 (16)	7 (22)	
Upper limb	11 (21)	5 (26)	6 (19)	
Lower limb	23 (45)	8 (42)	15 (47)	
Non-available	2 (4)	0	2 (6)	
Metastatic site:				
Lung	24 (47)	12 (63)	12 (37.5)	0.07
<b>Bone</b>	<b>11 (21)</b>	<b>8 (42)</b>	<b>3 (9)</b>	<b>0.01</b>
Liver	16 (31)	8 (42)	8 (25)	0.2
Breslow index (mm), median (25 <sup>th</sup> -75 <sup>th</sup> )	3.5 (2.0-5.0)	3.25 (2.01-7.0)	3.58 (1.42-4.87)	0.4
Ulceration (yes)	18 (41)	8 (42)	10 (31)	0.7
<i>BRAF</i> status:				0.7
<i>BRAF V600E</i>	26 (51)	9 (47)	17 (53)	
Wild type	25 (49)	10 (53)	15 (47)	

<sup>#</sup> TNM classification according to 2017 AJCC 8<sup>th</sup> edition

\* Chi square test or Fisher's exact test as appropriate for categorical variables and Student's t-test or Wilcoxon's test for quantitative variables as appropriate

Chaque ganglion lymphatique métastatique a été microdisséqué au laser pour sélectionner spécifiquement un nombre minimum de 1500 cellules tumorales, avec une surface moyenne de 610 000  $\mu\text{m}^2$  (480 000 à 820 000  $\mu\text{m}^2$ ). Après l'extraction de l'ARN, tous les échantillons étaient de bonne qualité, ce qui a permis des analyses transcriptomiques, puisque le chiffre moyen d'intégrité de l'ARN (RIN) était de 8,7 (intervalle de 7 à 10).

La survie globale médiane calculée à partir du premier diagnostic de métastases ganglionnaires régionales était significativement plus courte chez les patients présentant des métastases cérébrales que chez les patients sans métastases cérébrales (39 mois vs 76 mois,  $p < 0,01$ ) (Figure 9B). La survie médiane à partir du moment des métastases cérébrales était de 13,3 mois (intervalle de 2 à 72 mois). Chez les patients présentant une mutation *BRAF*, la survie médiane n'était pas significativement différente pour les patients avec et sans métastases cérébrales (14 vs 17 mois).

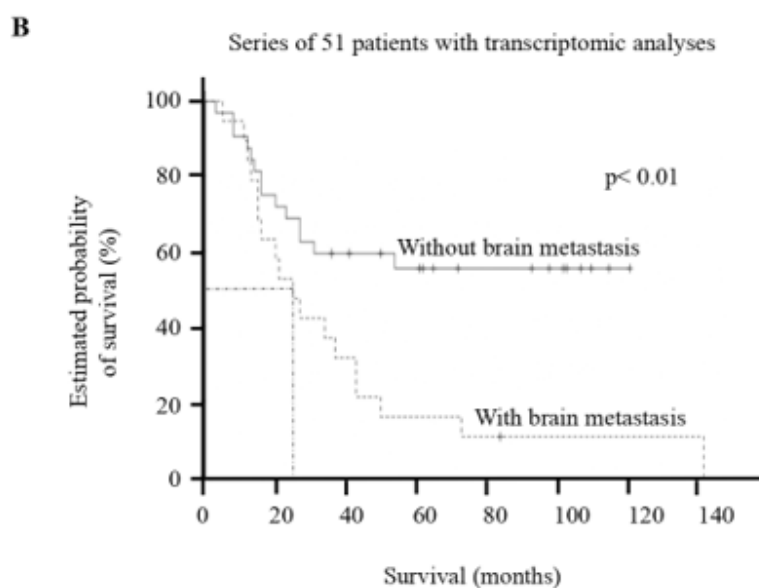
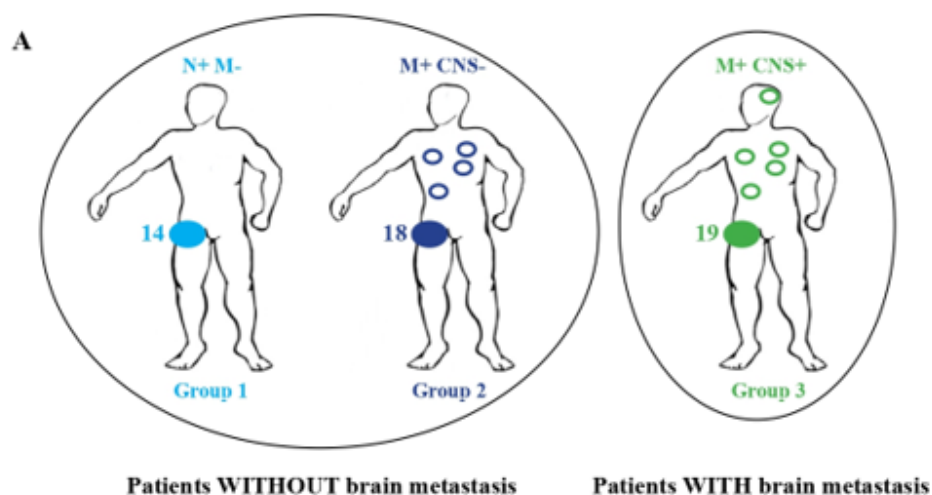


Figure 9. Overall survival of the 51 patients in the development cohort

### Expression du gène *PROM2* dans les ganglions lymphatiques métastatiques de patients atteints de métastases cérébrales

Des analyses transcriptomiques ont été effectuées sur des cellules tumorales microdisséquées au laser obtenues à partir de ganglions lymphatiques métastatiques des 51 patients. Une analyse multivariée a été réalisée pour comparer les données des patients atteints de métastases cérébrales et de ceux qui n'en ont pas. Le tableau 5 montre les gènes avec les plus grands scores d et les plus grands changements de pli, tous ayant une valeur  $q < 0,05$ . Nous avons décidé de nous concentrer sur le gène *PROM2* avec certains des scores d les plus élevés à 4,6 et un changement de pli de 3,3, et parce que la protéine PROM2 induit des protubérances membranaires<sup>79</sup> et peut donc être impliquée dans des processus invasifs.

Tableau 5. Genes differentially expressed in metastatic lymph nodes of patients with versus without brain metastasis

Gene	Without brain metastasis (mean)	With brain metastasis (mean)	Fold Change	d-score	P value
<b><i>PROM2</i></b>	<b>5,7</b>	<b>7,5</b>	<b>3,3</b>	<b>4.6</b>	<b>2.1e-05</b>
<i>LRRC2</i>	7,4	9,3	3,6	4.2	2.2e-05
<i>CASC15</i>	9,8	11,7	3,6	4.2	2.2e-05
<i>HMBOX1</i>	7,2	9,0	3,5	4.1	2.2e-05
<i>GPR179</i>	5,9	7,7	3,4	4.3	2.2e-05
<i>CD86</i>	9,6	11,4	3,4	4.0	2.3e-05
<i>RPA4</i>	7,1	8,8	3,2	4.3	2.1e-05
<i>GPR182</i>	5,8	7,5	3,1	4.4	2.1e-05
<i>KRT79</i>	5,1	6,7	2,9	3.9	2.3e-05
<i>PPP6R1</i>	8,0	9,4	2,7	3.7	2.5e-05
<i>BICC1</i>	5,1	6,5	2,6	4.1	2.2e-05

En utilisant la RT-qPCR, nous avons confirmé que l'expression de l'ARNm *PROM2* était significativement plus élevée dans les ganglions lymphatiques métastatiques des patients ayant développé des métastases cérébrales ( $\Delta Ct = 9,38$ ) que chez les patients qui n'en avaient pas ( $\Delta Ct = 3,36$ ) ( $p < 0,05$ , Figure 10A).

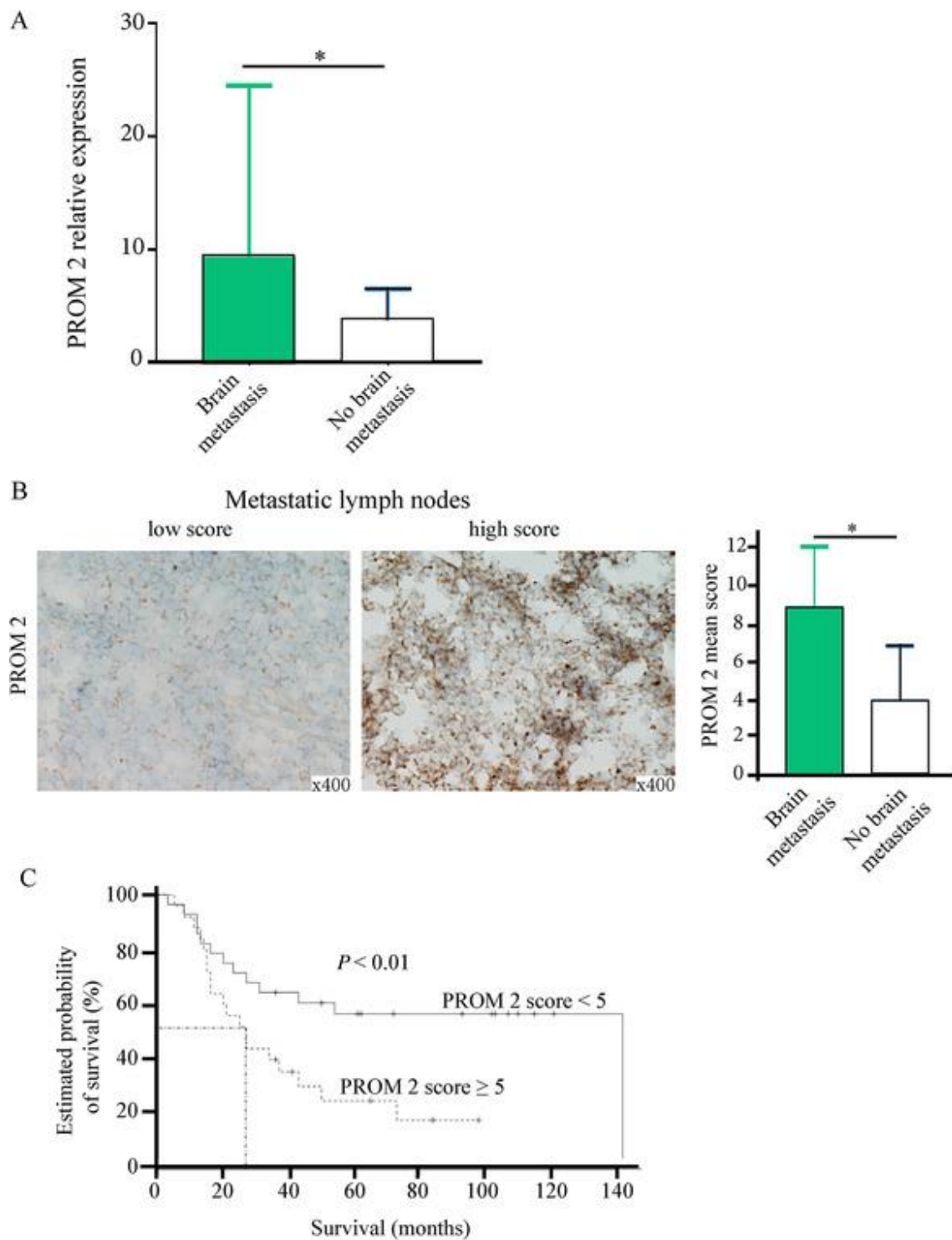


Figure 10. PROM2 mRNA expression, "PROM2 IHC score" in metastatic lymph nodes, and survival data in the development cohort.

(A), PROM2 mRNA expression is significantly higher in the metastatic lymph nodes from patients with brain metastases than in those without brain metastases ( $P < 0.05$ ).

(B), Using immunostaining on metastatic lymph nodes, the mean "PROM2 IHC score" is significantly higher among patients with brain metastases than among those without ( $P < 0.05$ ).

(C), Survival according to the "PROM2 IHC score" in the development cohort of 51 patients. A "PROM2 IHC score"  $\geq 5$  is significantly associated with a shorter survival

Nous avons ensuite analysé les données transcriptomiques téléchargées à partir de trois banques de données publiques (l'Atlas du génome du cancer SKCM<sup>75</sup> et les cohortes GSE22155<sup>76</sup> et GSE65904<sup>77</sup>) et avons constaté qu'une expression élevée de *PROM2* dans les ganglions lymphatiques métastatiques du mélanome était associée à une faible survie (Figure 11).

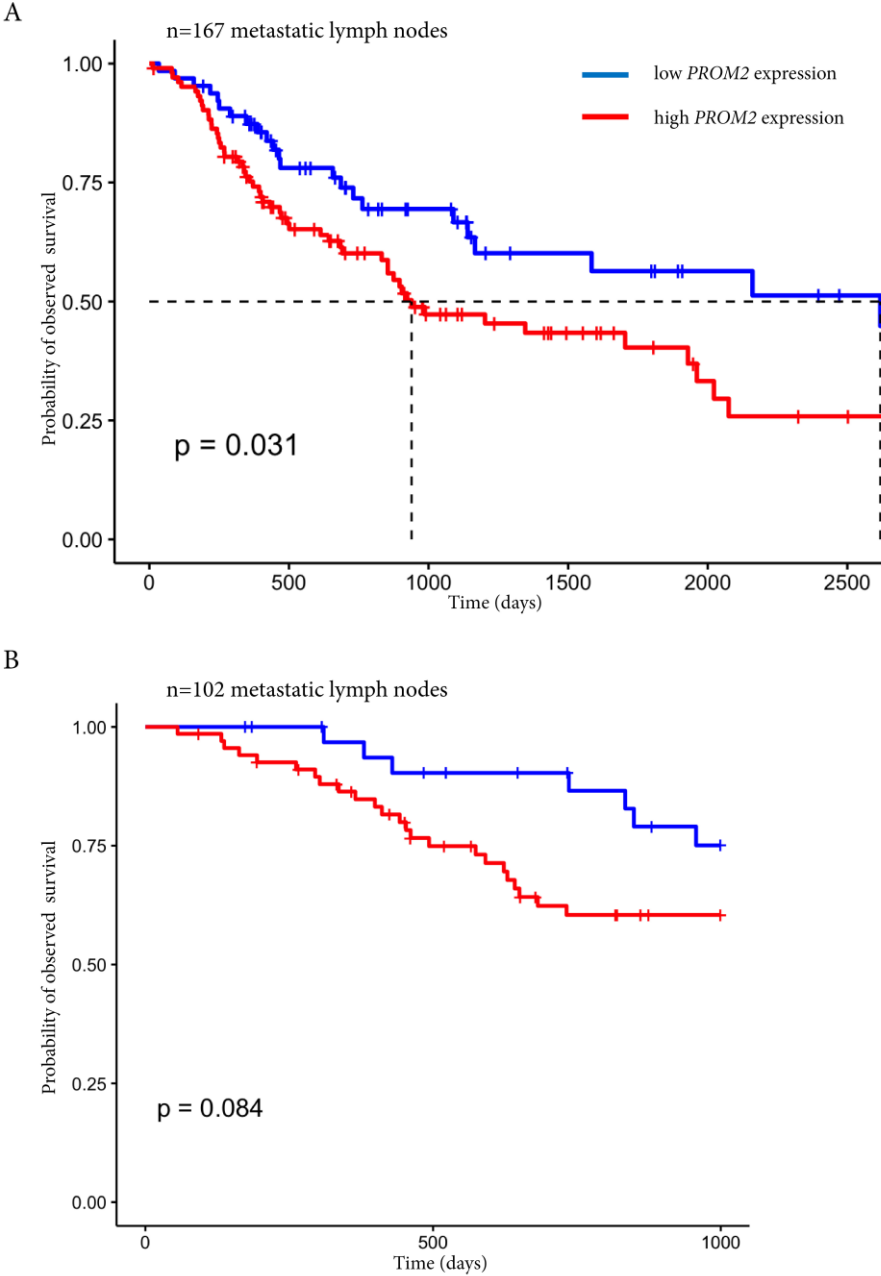


Figure 11. Survival curves in two cohorts of melanoma lymph node metastases from public databanks, according to *PROM2* mRNA expression level (high or low).

A. TCGA SKCM cohort

B. GSE22155 and GSE65904 cohorts

### **L'expression de la protéine PROM2 dans les ganglions lymphatiques métastatiques est associée au risque de métastases cérébrales**

En utilisant l'immunohistochimie, nous avons évalué l'expression de PROM2 sur les 51 ganglions lymphatiques métastatiques. Nous avons montré que le « score IHC » moyen PROM2 était significativement plus élevé chez les patients présentant des métastases cérébrales que chez les patients sans métastases cérébrales (8,8 vs 4,  $p < 0,01$ ) (Figure 10B). Lorsque nous avons choisi un seuil  $\geq 5$  pour le « score IHC » PROM2, la survie globale était significativement plus élevée chez les patients qui avaient un seuil  $< 5$  que chez les patients qui avaient un seuil  $\geq 5$  ( $p < 0,01$ , Figure 10C). Dans l'ensemble, l'expression de PROM2 dans les ganglions lymphatiques métastatiques des mélanomes est associée au risque de métastases cérébrales et à une diminution de la survie.

### **L'expression de *PROM2* est faible dans les ganglions lymphatiques régionaux sans métastases à distance associées**

Lorsque nous avons comparé l'expression de l'ARNm *PROM2* dans les trois groupes différents, nous avons montré une augmentation progressive et significative de l'expression de l'ARNm *PROM2* du groupe 1 au groupe 3 (Figure 12A, B).

Nous avons également comparé le score moyen PROM2 et la survie globale dans les trois groupes différents, et avons constaté que le « score IHC » moyen PROM2 était progressivement et significativement différent dans les 3 groupes (Figure 12B). La survie globale était également beaucoup plus longue pour le groupe 1 avec seulement des ganglions lymphatiques régionaux métastatiques sans métastases à distance après un suivi médian de 80 mois (Figure 12C).

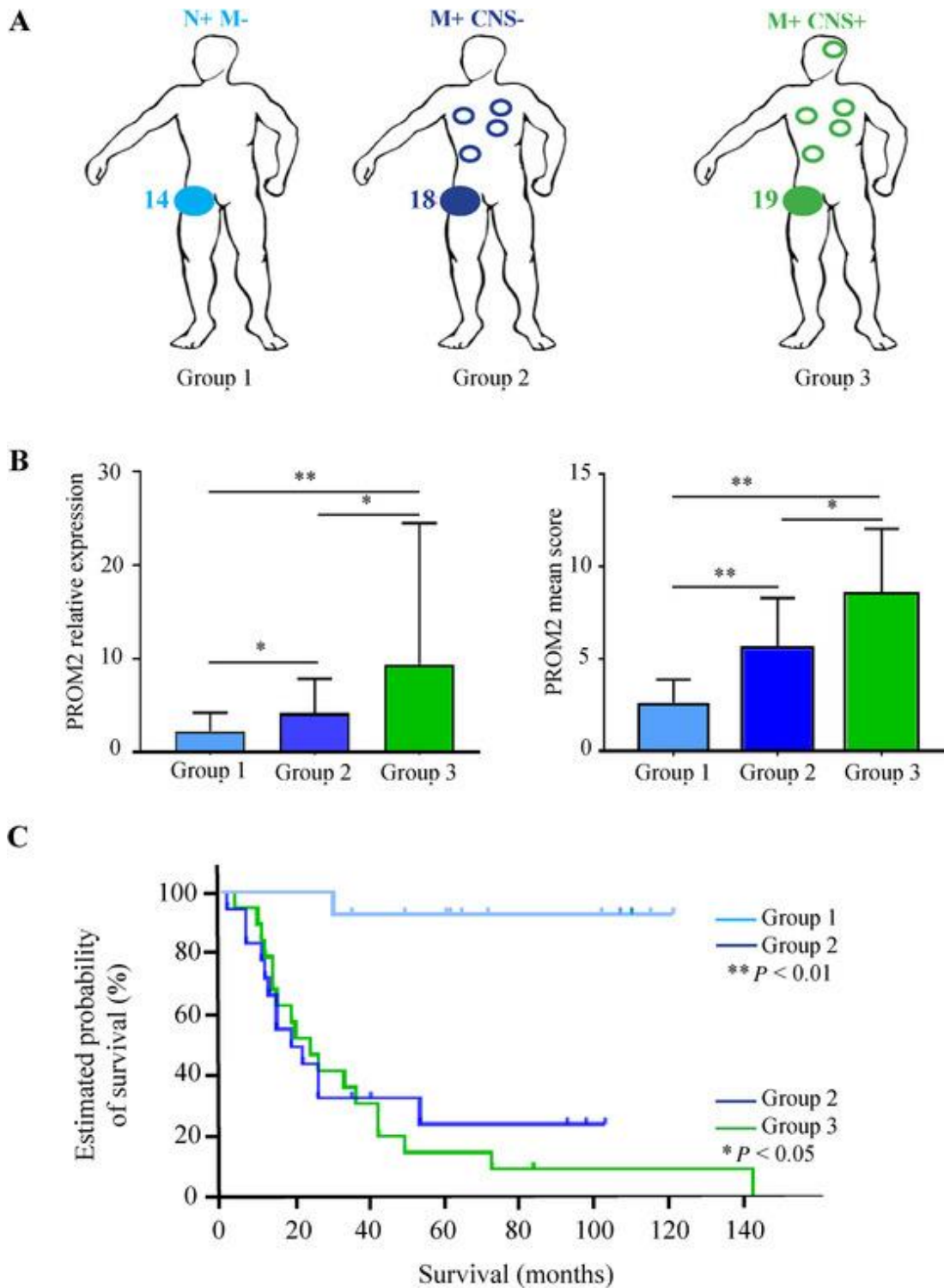


Figure 12. PROM2 expression and survival data according to subgroups in the development cohort. (A), group 1 includes patients with only regional lymph node metastases; Group 2 includes patients without brain metastases but with other distant metastatic localizations; Group 3 includes patients with brain metastases. (B), PROM2 mRNA expression and PROM2 mean score in the three different groups. PROM2 mRNA expression and PROM2 mean score are gradually and significantly different in the three groups. (C), Survival curves according to the three different groups. \* $P < .05$ ; \*\* $P < 0.01$

Les facteurs de risque de métastases cérébrales ont d’abord été identifiés par analyse univariée, puis par analyse multivariée. À l’aide d’une analyse multivariée, le score PROM2 et la présence de métastases osseuses étaient les deux seules variables significativement associées au risque de métastases cérébrales. Pour le score PROM2, le rapport des cotes était de 28,2 ( $p = 0,003$ , tableau 6), ce qui a montré une forte association entre un score élevé de PROM2 et le risque de développer des métastases cérébrales. Ainsi, nous avons confirmé que dans les mélanomes métastatiques des ganglions lymphatiques régionaux, le score de PROM2 pourrait discriminer un groupe à faible risque de métastases à distance, y compris les métastases cérébrales.

Tableau 6. Univariate and multivariate analyses of factors associated with brain metastasis

Variables	Univariate analysis OR [95%CI]	P	Multivariate analysis Adjusted OR [95%CI]	P
Metastatic site:				
Lung	2.86 [0.88-9.25]	0.08	1.41 [0.27-7.27]	0.66
<b>Bone</b>	7.03 [1.57-31.4]	<b>0.01</b>	16.2 [1.83-395.9]	<b>0.02</b>
PROM2 expression, per 1 IQR	1.21 [1.03-1.48]	<b>0.03</b>	1.05 [0.91-1.36]	0.62
<b>PROM2 IHC score:</b>				
Low (< 5)	1 (reference)		1 (reference)	
High ( $\geq 5$ )	16.0 [4.10-83.1]	<b>0.0002</b>	28.2 [4.33-570.7]	<b>0.003</b>

### Une cohorte de validation confirme PROM2 comme biomarqueur des métastases à distance

Entre 2009 et 2014, 50 patients présentant des ganglions lymphatiques métastatiques à partir d’un mélanome et des échantillons de biopsie congelés ont été sélectionnés pour la série de validations. 19 patients avaient des métastases et 31 n’en avaient pas. Il n’y avait pas de caractéristiques cliniques et biocliniques significatives entre 2 séries (Tableau 7).



Tableau 7. Baseline characteristics and comparison between the development and the validation cohort

Variables	Development cohort n = 51	Validation cohort n = 50	P*
Age (y), mean $\pm$ SD	58 $\pm$ 16	63 $\pm$ 16	0.11
Gender (women)	28 (55)	20 (40)	0.14
Initial TNM classification:			
IIIB	20 (39)	23 (46)	0.73
IIIC	28 (55)	25 (50)	
IIID	3 (6)	2 (4)	
Primary site of melanoma:			0.59
Head and neck	5 (10)	4 (8)	
Trunc	10 (20)	17 (34)	
Upper extremity	11 (21)	9 (18)	
Lower extremity	23 (45)	19 (38)	
Non-available	2 (4)	1 (2)	
Metastatic site at relapse:			
Brain	19 (37)	19 (38)	0.94
Lung	24 (47)	19 (38)	0.36
Bone	11 (21)	12 (24)	0.77
Liver	16 (31)	17 (34)	0.78
Breslow index (mm), median (IQR)	3.5 (3.0)	2.5 (2.7)	0.27
Ulceration (yes)	18 (41)	21 (42)	0.34
BRAF status:			0.25
BRAF V600E	26 (51)	27 (54)	

\* Chi square test or Fisher's exact test as appropriate for categorical variables and Student's t-test or Wilcoxon's test for quantitative variables as appropriate.

IQR: interquartile range.

Dans cette cohorte de validation, lorsque l'expression de l'ARNm *PROM2* a été évaluée sur des cellules cancéreuses de mélanome microdisséquées au laser à partir de ganglions lymphatiques métastatiques, elle était significativement plus élevée chez les patients ayant développé des métastases cérébrales ( $\Delta$ Ct médian = 5,1, IQR = 2,3 vs  $\Delta$ Ct = 2, IQR = 4,6) ( $P < 0,01$ ). Le « score *PROM2* IHC » était également significativement plus élevé en cas de métastases cérébrales (7,4 vs 2,1 ;  $P < .01$ ). En utilisant un seuil de  $\geq 5$  pour le « score *PROM2* IHC » dans la régression multivariée, le « score *PROM2* IHC » était le seul facteur associé au risque de métastases cérébrales (Tableau 8).

Tableau 8. Univariate and multivariate analyses of factors associated with mortality in the development and validation cohorts

Variables	Development cohort (n=51)				Validation cohort (n=50)			
	Univariate analysis HR [95% CI]	p- value	Multivariate analysis aHR [95% CI]	p- value	Univariate analysis HR [95% CI]	p- value	Multivariate analysis aHR [95% CI]	p- value
Age (y), mean ± SD	1.01 [0.98-1.03]	.37			0.98 [0.96-1.01]	.26		
Gender (women)	0.94 [0.46-1.93]	.88			0.82 [0.39-1.75]	.62		
Initial TNM classification:		.01				.94		
IIB	1 (reference)				1 (reference)			
IIC	1.22 [0.57-2.60]				1.12 [0.53-2.34]			
IID	7.26 [1.85-28.4]				0.86 [0.11-6.58]			
Primary site of melanoma:		.49				.20		
Head and neck	1 (reference)				1 (reference)			
Trunk	0.91 [0.26-3.15]				0.42 [0.10-1.64]			
Upper limb	0.48 [0.13-1.75]				0.80 [0.19-3.26]			
Lower limb	0.46 [0.15-1.44]				1.08 [0.30-3.86]			
Unknown	0.49 [0.05-4.45]				-			
Metastatic site:								
Brain	2.61 [1.28-5.34]	.008	-	-	5.20 [2.39-11.3]	<.0001	8.08 [2.49-26.2]	.0005
Lung	3.82 [1.78-8.18]	.0005	10.7 [2.86-39.9]	.0004	2.36 [1.13-4.96]	.02	-	-
Bone	2.00 [0.91-4.36]	.08	-	-	2.50 [1.17-5.37]	.01	-	-
Liver	1.85 [0.90-3.79]	.09	-	-	2.07 [0.99-4.31]	.05	-	-
Breslow index (mm), per 1 IQR of more	1.19 [1.04-1.36]	.01	-	-	0.93 [0.82-1.06]	.28		
Ulceration (yes)	2.75 [1.26-6.00]	.01	-	-	1.19 [0.53-2.65]	.67		
BRAF status:								
BRAF V600E (yes)	1.49 [0.73-3.04]	.26			1.49 [0.65-3.42]	.34		
PROM2 mRNA expression, per 1 IQR of more	1.02 [0.99-1.05]	.11	-	-	1.16 [1.03-1.31]	.01	-	-
PROM2 IHC score								

High ( $\geq 5$ )	2.41 [1.16-5.03]	.01	6.48 [1.65-25.5]	.007	3.60 [1.69-7.70]	.0001	3.95 [1.14-13.7]	.02
Interaction terms								
Lung metastases $\times$ PROM2 IHC score $\geq 5$			0.12 [0.02-0.64]	.01				
Brain metastases $\times$ PROM2 IHC score $\geq 5$							0.21 [0.04-1.10]	.06

Note. Univariate and multivariate Cox proportional hazards regression models were run with the sample of deceased patients. The assumptions of the model were verified. Hazard ratios (HRs) for continuous variables were expressed per 1 SD or 1 interquartile interval (IQR) as appropriate. Variables yielding *P values* under .2 in the univariate analysis were considered for inclusion in the multivariate analysis. A stepwise selection process of the lowest *P values* was used for the multivariate analysis, also using interaction terms. aHR: adjusted hazard ratio

Dans les deux cohortes, dans l'analyse univariée, un « score PROM2 IHC » élevé  $\geq 5$  dans les ganglions lymphatiques métastatiques n'était pas associé au risque d'autres sites métastatiques (poumon, foie et os), à l'exception des métastases pulmonaires dans la cohorte de validation (Tableau 9).

*Tableau 9. Univariate analyses of an association between a high "PROM2 IHC score"  $\geq 5$  and other metastatic sites than brain metastases*

<b>Types of metastases</b>	<b>Development cohort OR [95%CI]</b>	<b>P</b>	<b>Validation cohort Adjusted OR [95%CI]</b>	<b>P</b>
Lung	2.38 [0.77-7.34]	0.13	4.19 [1.25-14.1]	<b>0.02</b>
Bone	1.47 [0.38-5.60]	0.57	0.61 [0.16-2.41]	0.48
Liver	1.71 [0.52-5.65]	0.37	0.65 [0.19-2.19]	0.49

Dans les cohortes de développement et de validation, la présence de métastases cérébrales et un « score IHC PROM2 » de  $\geq 5$  étaient les deux seuls facteurs significativement associés à la mortalité (Tableau 8 ; Figure 13).

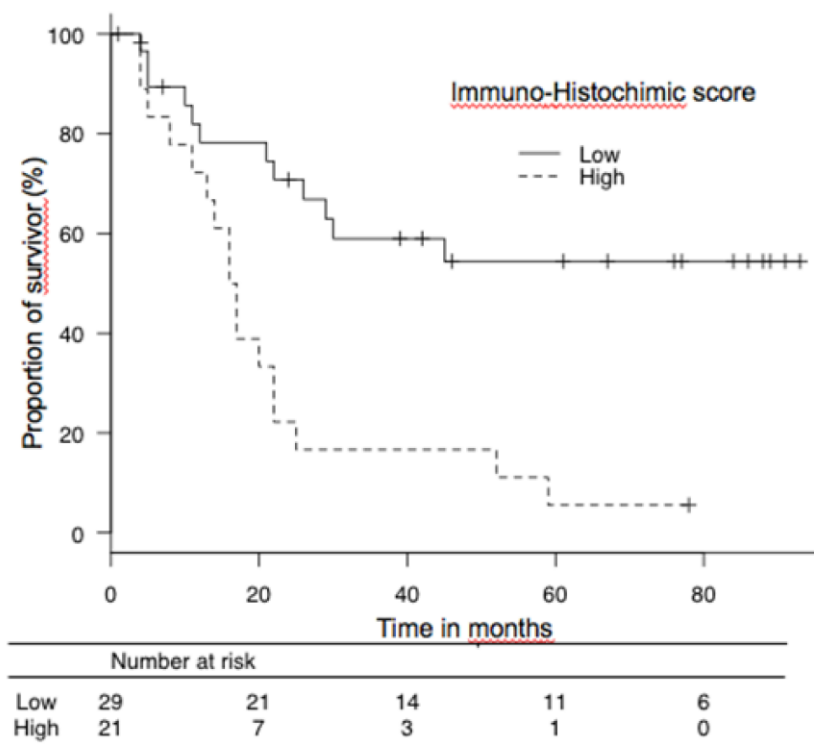
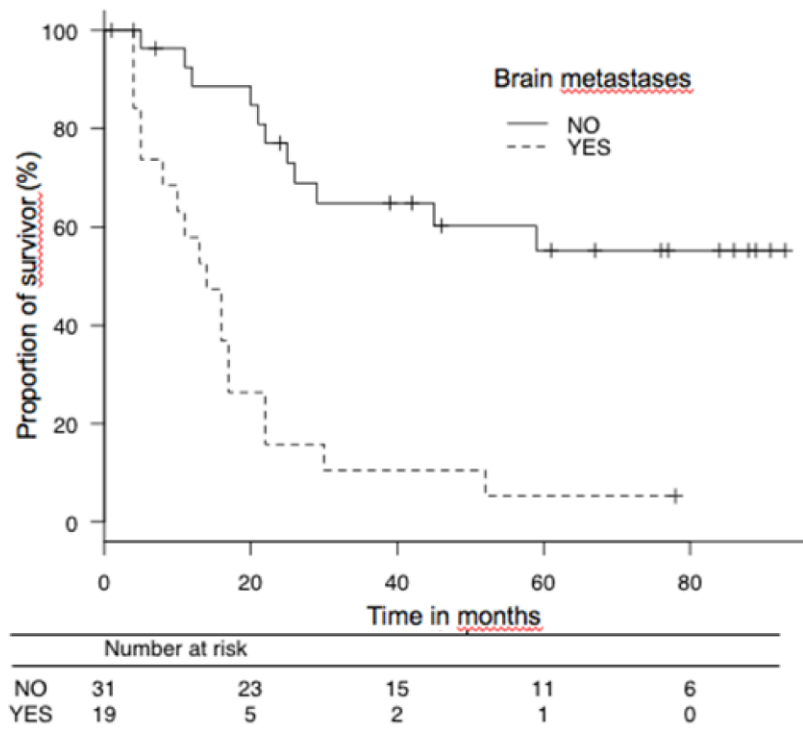


Figure 13. Survival curves in the validation cohort, according to the presence or not of brain metastases (upper panel), or to the “PROM2 IHC score” (lower panel). The presence of brain metastases and/or a “PROM2 IHC score”  $\geq 5$  are significantly associated with a shorter survival.

### 1.3. Discussions

Dans cette étude, chez les patients atteints de métastases ganglionnaires régionales de mélanome, nous avons identifié PROM2 comme un marqueur significativement associé au risque de métastases à distance, en particulier les métastases cérébrales.

L'analyse multivariée a montré que le score PROM2 et la présence de métastases osseuses étaient les deux seuls facteurs significativement associés au risque de métastases cérébrales. Dans une vaste étude observationnelle portant sur 26430 patients atteints de métastases cérébrales cancéreuses, les métastases osseuses et pulmonaires sont plus fréquemment associées au risque de métastases cérébrales que les métastases hépatiques<sup>1</sup>. En cas de métastases pulmonaires, les cellules cancéreuses peuvent pénétrer dans la veine pulmonaire par les capillaires pulmonaires, amenant les cellules cancéreuses à la circulation artérielle via le ventricule gauche, favorisant ainsi le développement de métastases cérébrales<sup>80</sup>. Cette distribution préférentielle des métastases pulmonaires ou osseuses avec métastases cérébrales est particulièrement vraie pour les mélanomes. Cela pourrait s'expliquer par la courte survie de 4 mois en cas de métastases hépatiques lorsque le délai médian pour développer des métastases cérébrales est de 9 mois<sup>81</sup>. Il peut également y avoir des raisons biologiques.

Les chimiokines sont de petites molécules sécrétées par chimio-attractant qui régulent le recrutement cellulaire dans les tissus, et jouent ainsi un rôle clé dans l'initiation et la régulation du processus métastatique des cellules tumorales<sup>82,83</sup>. L'expression d'un récepteur de chimiokine dans les cellules cancéreuses est généralement associée à l'expression de son ligand respectif dans un site cible pour les métastases<sup>83</sup>. Dans divers types de cancers, y compris les mélanomes, l'expression du récepteur de chimiokine CCR7 est préférentiellement associée à la distribution métastatique des ganglions lymphatiques<sup>84,85(p7),86(p21)</sup>. Chez les souris injectées par voie intraveineuse avec des lignées cellulaires de mélanome, la surexpression du récepteur de chimiokine CXCR4 augmente le risque de métastases pulmonaires<sup>87</sup>. À ce jour, on ne sait toujours pas si l'expression des récepteurs chimiokines/chimiokines contribue à une distribution préférentielle des métastases du mélanome dans le cerveau.

Dans notre étude, le score PROM2 est le marqueur le plus fort qui prédit le risque de développement de métastases à distance chez les patients atteints de mélanome, y compris les métastases cérébrales. C'est la force de notre étude avec des applications translationnelles potentielles chez les patients atteints de mélanome de stade III. En effet, un traitement adjuvant par immunothérapie ou anti-BRAF est recommandé chez les patients atteints d'une maladie de stade III<sup>88</sup>. Aucun autre marqueur que l'atteinte des ganglions lymphatiques régionaux n'est

actuellement incluse dans la décision thérapeutique. Dans notre étude, nous avons pu identifier un groupe de patients de stade III qui n'ont pas développé de métastases à distance après un suivi minimum de 5 ans, et ces patients avaient un score PROM2 significativement inférieur à celui des patients des deux autres groupes. Après validation dans une cohorte plus importante, ce score pourrait être utilisé pour mieux identifier les patients à haut risque atteints d'un mélanome de stade III, et pourrait donc être inclus dans les essais cliniques adjuvants.

Malgré des améliorations récentes dans la prise en charge des mélanomes métastatiques, 20 à 40% des patients restent insensibles à l'immunothérapie ou aux traitements anti-BRAF<sup>89,90</sup>, ce qui est difficile dans la pratique clinique. Notre étude ouvre la perspective de l'utilisation de PROM2 comme cible thérapeutique potentielle pour le traitement du mélanome métastatique. PROM2, également appelée prominine-2, est une glycoprotéine membranaire et un deuxième membre de la famille des prominines. PROM2 est un paralogue de PROM1 qui colocalisé avec PROM1 dans les cellules épithéliales. PROM1, également appelé CD133, est un marqueur bien connu des cellules souches cancéreuses<sup>91</sup>. De plus, il a été démontré que les cellules souches cancéreuses sont liées à la résistance aux médicaments<sup>92-95</sup>, à l'invasion tumorale et au processus métastatique<sup>96-98</sup>. Comme PROM1, PROM2 est enrichi au niveau des protubérances de la membrane plasmique dans le rein adulte ainsi que dans divers autres tissus épithéliaux, et peut donc être impliqué dans l'adhésion cellulaire, la cicatrisation des plaies et la migration<sup>79(p)</sup>. Cependant, le rôle de PROM2 dans le processus métastatique, en particulier les métastases cérébrales, n'est pas étudié. D'autres études sont nécessaires pour élucider ce rôle de PROM2 et pour voir si PROM2 a des propriétés de souche ou non.

#### **1.4. Conclusion et perspective**

Dans cette étude, nous avons identifié l'expression de PROM2 comme biomarqueur prédictif du risque de métastases à distance, y compris les métastases cérébrales chez les patients atteints de mélanome de stade III. Notre découverte ouvre des perspectives d'études translationnelles visant à valider PROM2 en tant que biomarqueur utile dans les essais cliniques et en tant que cible thérapeutique potentielle pour le traitement du mélanome métastatique. C'est l'objet d'un autre sujet de thèse d'un doctorant dans notre unité.

## **2. Y-a-t-il des signatures mutationnelles propres aux métastases cérébrales ?**

Au cours des dernières décennies, la recherche sur la génomique du cancer a considérablement bénéficié des nouvelles technologies, dont le séquençage du génome entier, pour acquérir une meilleure connaissance de la cancérogenèse, mais aussi à des fins diagnostiques et thérapeutiques. Cependant, avec le séquençage complet de l'exome/génome, il y a des données très nombreuses, parfois d'interprétation difficile. L'une des difficultés est la valeur des prévalences des anomalies observées, qui dépend de nombreux paramètres comme le mode de conservation de l'échantillon tumoral, le type de technique utilisée ou encore si l'analyse se fait sur échantillon unique ou sur plusieurs fragments d'un même échantillon tumoral.

Notre unité a conduit une première méta-analyse sur les données génomiques dans le cancer du rein à cellules claires. Les résultats de cette méta-analyse nous donnent des prévalences d'anomalies génomiques plus fiables que les données obtenues à partir de sources individuelles. Elle a également confirmé l'intérêt de séquencer de multiples échantillons d'un même patient afin d'éviter la sous-estimation de la prévalence de mutations en raison de l'hétérogénéité tumorale. Par ailleurs, le mode de conservation de tissu modifie la prévalence des mutations génétiques. En effet, la fixation au formol pourrait conduire à une sous-détection de certaines anomalies, en raison de modifications conformationnelles de l'ADN et de cassures d'ADN. Les échantillons congelés devraient rester la référence à des fins de recherche.

Une forte valeur ajoutée de cette méta-analyse est que nous avons comparé les données génomiques obtenues à partir des échantillons de cancers du rein primitifs et de métastases, mettant ainsi en lumière des anomalies qui semblent clairement associées au processus métastatique<sup>99</sup>.

En utilisant la même approche, dans le cadre de ma Thèse de sciences, j'ai effectué une méta-analyse sur les données génomiques de métastases cérébrales du cancer du sein.

Ce travail de recherche a fait l'objet d'une publication dont je suis première auteur, dans la revue *Cancers*<sup>100</sup>. Notre méta-analyse a porté sur 37218 patients avec un total de 18932 échantillons, dont 11906 échantillons des tumeurs primitives, 5541 échantillons des métastases extra-cérébrales et 1485 échantillons des métastases cérébrales.

### **2.1. Matérielles et méthodes**

#### **Stratégie de recherche et critères de sélection**

Nous avons effectué cette revue systématique en suivant les méthodes décrites par le Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analyses (PRISMA)<sup>101</sup>.



## Critères d'admissibilité

### *Critères d'inclusion*

Notre objectif était d'effectuer une méta-analyse sur les données génomiques obtenues à partir de métastases cérébrales liées au cancer du sein. Les critères d'inclusion étaient : (1) toute étude évaluant la génomique des métastases du cancer du sein dans n'importe quelle localisation, et (2) tout article en anglais de 1999 à aujourd'hui.

### *Critères d'exclusion*

Les critères d'exclusion suivants ont été appliqués : (1) études avec des données génomiques inutilisables ou non disponibles sur les métastases; (2) études limitées aux données génomiques des tumeurs primaires sans données génomiques disponibles sur les métastases ; 3) les données génomiques obtenues à partir d'échantillons autres que des échantillons de tissus (par exemple, l'ADN circulant); (4) revues, méta-analyses, lettres à l'éditeur; (5) données expérimentales et études non humaines, (6) articles sans texte intégral disponible. Le modèle de diagramme de flux PRISMA utilisé dans cette étude est détaillé à la Figure 14.

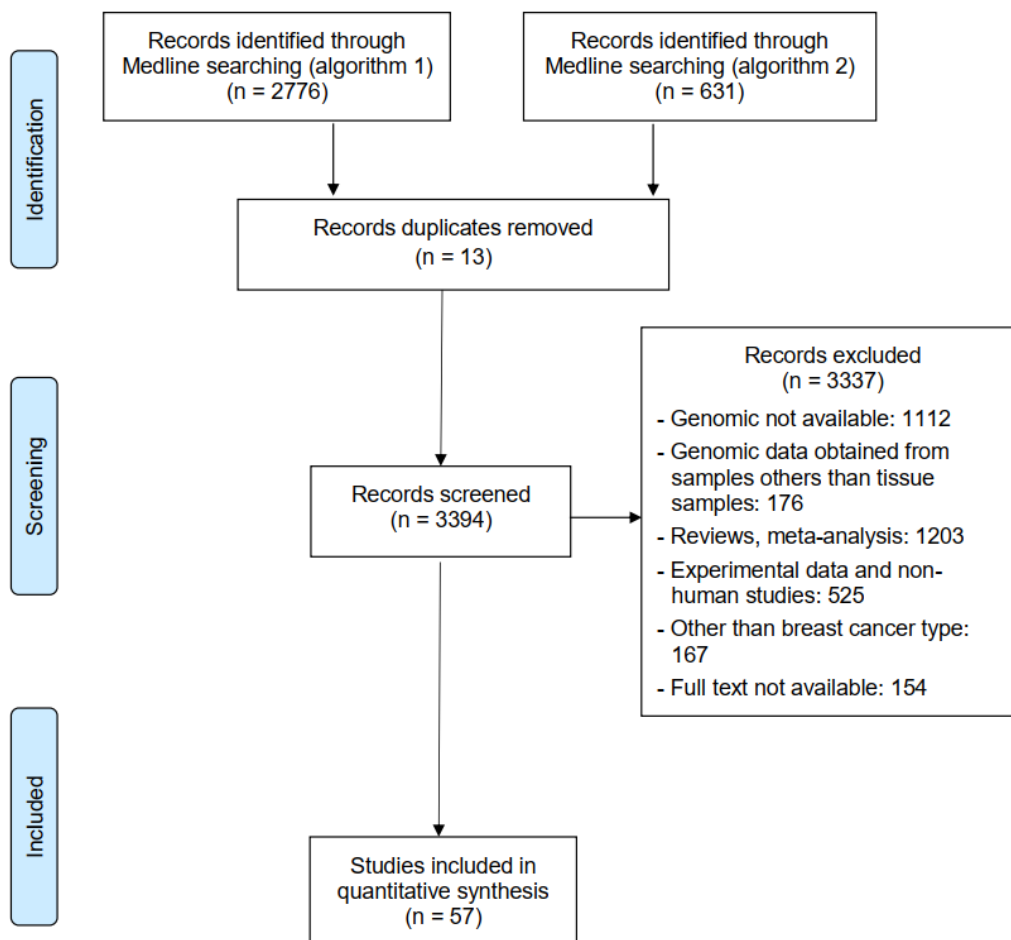


Figure 14. PRISMA flowchart for the screening and selection of the studies.

## **Stratégie de recherche**

Pour une méta-analyse systématique, nous avons effectué une recherche dans MEDLINE via PubMed et utilisé l'algorithme de recherche suivant : (« Tumeurs mammaires » [Mesh] ET « métast\* » ET (« Génomique » [Mesh] OU « mutation »)). Au total, 2776 articles ont été initialement identifiés. Nous avons ensuite testé un deuxième algorithme pour nous concentrer sur les métastases cérébrales : « Sein » ET « cerveau » ET « métast\* » ET (« Genom\* » OU « mutation\* » OU « séquenç\* »). Nous avons obtenu 631 publications. Nous avons effectué une recherche manuelle dans les références bibliographiques de tous les articles inclus afin d'identifier les articles potentiellement liés. La version 5.0.95.1 du logiciel Zotero a été utilisée pour gérer les références et supprimer les doublons. En outre, les références contenues dans la littérature recherchée et les revues pertinentes ont également été prises en compte pour éviter que les articles admissibles ne soient manqués.

## **Sélection des études**

Deux auteurs (TTN et GB) ont indépendamment passé au crible les articles récupérés, d'abord par titre, puis par résumé et enfin par texte intégral.

## **Protocole et enregistrement**

Nous avons enregistré la revue dans PROSPERO, un registre prospectif international de revues systématiques. Le protocole peut être consulté à l'adresse suivante :

<https://www.crd.york.ac.uk/PROSPERO/> Numéro d'enregistrement : CRD42021272358

## **Évaluation de la qualité**

Pour évaluer la qualité des études, nous avons utilisé l'outil Q-genie<sup>102</sup>. Il comprend 11 questions portant sur les aspects suivants de la méthodologie de l'étude : justification de l'étude, sélection et résultats, comparabilité des groupes témoins, exposition technique et non technique, biais, taille et puissance de l'échantillon, analyses, méthodes statistiques, contrôle des facteurs de confusion, inférences pour les analyses génétiques et inférences à partir des résultats. Chaque question a été notée de 1 à 7 comme suit : « 1 (mauvais) », « 2 », « 3 (bon) », « 4 », « 5 (très bon) », « 6 » ou « 7 (excellent) ». Pour les études avec un groupe témoin, un score total de  $\leq 35$  indique une mauvaise qualité, un score de 36 à 45 indique une qualité modérée et un score de  $> 45$  indique une bonne qualité. Dans notre méta-analyse sur les données génomiques, comme le critère « exposition non technique » n'était pas applicable, nous avons considéré qu'un score total de  $\leq 28$  indiquait une mauvaise qualité, un score entre 29 et 38 indiquait une qualité modérée et un score de  $> 38$  indiquait une bonne qualité.

## Analyse statistique

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel statistique R (version 4.1.0; R Foundation for Statistical Computing, Vienne (Autriche); <http://www.r-project.org>). Sur la base des articles sélectionnés, nous avons réalisé une méta-analyse (avec le package « meta ») pour évaluer la prévalence des mutations génétiques dans les cancers du sein en fonction du site tumoral : tumeur primaire, métastases extra-cérébrales et métastases cérébrales. Nous n'avons pris en compte que les gènes associés à une prévalence  $\geq 1\%$  dans la tumeur primaire. Pour toutes les études, nous avons évalué la prévalence des mutations génétiques en fonction : i) de la qualité des études : bonne ou modérée/mauvaise ; ii) le site tumoral : métastases extra-cérébrales, tumeurs primaires et métastases cérébrales pour tous les échantillons tumoraux. Nous avons également évalué la prévalence des mutations génétiques dans des échantillons tumoraux appariés du même patient entre les tumeurs primaires, métastases extra-cérébrales et métastases cérébrales ; iii) la méthode génomique (NGS, NGS ciblée ou autre) ; iv) et les conditions de conservation des tissus (frais congelés ou fixés au formol). Pour chaque critère de jugement, pour tester les différences entre les sous-groupes, nous avons utilisé le test Q basé sur l'analyse de la variance.

Voici un exemple typique de script R d'une seule proportion utilisant la transformation logit et ne prenant en compte que l'effet aléatoire :

```
metaprop(event=name.database$variable.number.of.event,  
n=name.database$variable.total.number.of.observations,  
studlab=name.database$name.of.studies, subgroup=name.database$variable.subgroup,  
sm="PLOGIT", common = FALSE, random = TRUE).
```

Nous avons effectué une comparaison par paires de la prévalence des mutations génétiques entre les sites tumoraux en utilisant le test z comme suit : tumeurs primaires vs métastases extra-cérébrales, tumeurs primaires vs métastases cérébrales, et métastases extra-cérébrales vs métastases cérébrales. Nous avons ensuite sélectionné tous les gènes associés à des différences significatives de prévalence entre les sous-groupes et nous n'avons retenu que ceux présentant une prévalence dans chaque site tumoral (primaires, extra-cérébrales et cérébrales) et une prévalence plus élevée dans les métastases cérébrales que dans la tumeur primaire. Sur ces gènes sélectionnés, nous avons effectué une méta-régression univariée et multivariée pour prendre en compte l'ampleur de l'effet du site tumoral, la qualité des études (bonne vs modérée ou mauvaise), la méthode génomique (NGS, NGS ciblé ou autre) et l'état de conservation des tissus (congelé ou fixé au formol). Les variables univariées donnant des valeurs  $P$  inférieures à 0,20 dans l'analyse univariée ont été prises en compte pour inclusion dans l'analyse

multivariée. Les résultats de la méta-régression ont été présentés sous forme d'estimations (coefficient  $\beta$ )  $\pm$  erreur-type.

Nous avons évalué l'hétérogénéité des résultats de l'étude à l'aide de l'indicateur I<sup>2</sup> et du test Q de Cochran<sup>103</sup>. Des valeurs I<sup>2</sup> de 0%, 25%, 50% et 75% ont été considérées comme indiquant respectivement une absence faible, modérée et une hétérogénéité marquée. Une valeur  $P \leq 0,05$  des tests Q indiquait une hétérogénéité significative. En raison d'une hétérogénéité significative de la prévalence des mutations génétiques, les résultats regroupés ont été résumés à l'aide du modèle à effets aléatoires et ordonnés en valeurs de prévalence décroissantes (%) avec leur intervalle de confiance à 95% (IC à 95%), y compris une comparaison de la prévalence des sous-groupes.

Graphiquement, la prévalence de la mutation génétique en fonction du site de la tumeur a été présentée sous forme de diagramme de carte thermique. Les mutations génétiques associées à une prévalence accrue des métastases cérébrales ont été présentées sous la forme d'un diagramme à barres de fréquences ordonnées en valeurs décroissantes dans les tumeurs primaires. Les modifications du nombre de copies (LOH, gain matériel) ont également été présentées sous la forme d'un diagramme à barres des fréquences. Tous les tests étaient bilatéraux, et le seuil de signification statistique a été fixé à une valeur  $P$  inférieure à 0,05. Il s'agit d'une méta-analyse sur des données publiées, de sorte que l'approbation éthique n'a pas été demandée.

## **2.2. Résultats**

### **Sélection des études, caractéristiques et évaluation de la qualité**

Après la recherche documentaire et la suppression des articles en double, nous avons identifié 3394 études. Après une sélection minutieuse des titres et des résumés, 3337 études ont été exclues, principalement parce que les données génomiques n'étaient pas disponibles. Au total, 57 études ont finalement été incluses dans cette méta-analyse (Figure 14). Les caractéristiques des 57 études sélectionnées sont résumées dans le Tableau 10.

Tableau 10. Main characteristics of the 57 studies included in the meta-analysis

ID	First author, year	Patient (N)	Breast cancer subtype	Primary tumor		Brain metastases		Extracerebral metastases			Genomic analysis method	Variant selection criteria
				Samples analyzed		Samples analyzed		Samples analyzed				
				Yes/No	N	Yes/No	N	Yes/No	N	Sites		
1	Nguyen et al <sup>1</sup> , 2022	2609	All	Yes	1561	No	-	Yes	163	Lung, pleura, liver, bone, LN	NGS	Oncogenic alterations, using OncoKB
2	Cosgrove et al <sup>2</sup> , 2022	39	All	No	-	Yes	39	No	-	-	NGS (WES)	Driver mutations, using the dndscv R package
3	Wardell et al <sup>3</sup> , 2021	10	All	No	-	Yes	10	No	-	-	Targeted NGS	Significantly mutated genes, using dNdSCV
4	Huang et al <sup>4</sup> , 2021	1	TN	Yes	2	Yes	4	Yes	24	Lung, liver, bone, skin, LN, kidney, peripancreas	NGS (WGS)	Somatic mutation (based on COSMIC data)
5	Thulin et al <sup>5</sup> , 2021	57	All	Yes	42	Yes	52	No	-	-	Targeted NGS	Pathogenic mutation/ The Cancer Hotspot Panel
6	Chen et al <sup>6</sup> , 2021	157	All	Yes	157	No	-	Yes	157	LN	NGS	Somatic mutation, using GENCODE
7	Aftimos et al <sup>7</sup> , 2021	242	All	Yes	242	No	-	No	-	Lung, pleura, liver, bone, LN, skin, soft tissue, ovary	NGS	Driver mutations, using Target Gene Sequencing (TGS) data
8	Hagio et al <sup>8</sup> , 2021	24	HR+	Yes	13	Yes	1	Yes	10	Lung, chest wall, liver bone, LN, ovary	Target NGS	List of 160 cancer-related genes included in

												the CLHURC comprehensive cancer panel	
9	Giannoudis et al <sup>9</sup> , 2021	32	All	Yes	32	Yes	32	No	-	-		Multiplex PCR	39 driver mutations across 5 oncogenes ( <i>TP53</i> , <i>PIK3CA</i> , <i>ESR1</i> , <i>ERBB2</i> , <i>AKT</i> ) in 8 multiplex assays
10	Akcakanat et al <sup>10</sup> , 2021	41	All	Yes	17	No	-	No	-	Distant metastases, local recurrent		Targeted NGS	Actionable genes (oncogene/tumor suppressor gene)
11	Huang et al <sup>11</sup> , 2021	10722	All	No	-	Yes	733	No	-	-		NGS	APOBEC mutational signatures
12	Dono et al <sup>12</sup> , 2021	21	All	No	-	Yes	21	No	-	-		NGS	Somatic mutation, using COSMIC
13	Callens et al <sup>13</sup> , 2021	82	All	Yes	82	No	-	Yes	9	Lung, pleura, liver, bone, LN, skin, ovary		Targeted NGS	Most frequently mutated genes in breast cancer from TCGA
14	Rinaldi et al <sup>14</sup> , 2020	11616	All	Yes	4515	Yes	238	No	-	Lung, chest wall, liver, bone, skin		NGS	somatic alterations, using COSMIC v62
15	Fumagalli et al <sup>15</sup> , 2020	128	All	Yes	106	No	-	Yes	82	Lung, chest wall, pleural, liver, bone, LN, skin		NGS	Driver mutation, using COSMIC
16	Geelen et al <sup>16</sup> , 2020	234	All	Yes	76	No	-	No	-	Lung, liver, bone, LN, ovary		Targeted NGS	Targeted sequencing panel and actionable genes as per ESMO guidelines

17	Akahane et al <sup>17</sup> , 2020	11	All	Yes	11	No	-	Yes	7	Lung, pleural	Targeted NGS	Somatic driver mutation, using The QIAseq Human Breast Cancer Panel and the GeneRead Human Comprehensive Cancer Panel
18	Kaur et al <sup>18</sup> , 2020	4	HR+/TN	No	-	Yes	2	Yes	2	Pleural, liver	NGS (WES)	Actionable genes, using OncoKB
19	Hutchinson et al <sup>19</sup> , 2020	34	TN	Yes	34	No	-	No	-	Bone, LN, skin, other	Targeted NGS	Oncogenic variant, using the FoundationOne® targeted next-generation sequencing panel
20	Paul et al <sup>20</sup> , 2020	66	All	Yes	17	Yes	3	Yes	63	Lung, sternum, contralateral breast, liver, bone, LN, skin, soft tissue, ovary	NGS (WES)	MutSigCV2 (19) was used to determine SMGs based on coding mutations and per-sample background mutation rates.
21	Hu et al <sup>21</sup> , 2020	67	All	Yes	67	No	-	No	-	Lung, liver, peritoneum, bone, skin, ovary	NGS (WES)	Driver mutations, using COSMIC (v87)
22	Freitag et al <sup>22</sup> , 2020	223	All	No	-	No	-	Yes	223	Lung, liver, bone, LN, local recurrent	NGS	Genetic alterations for all cases had been previously

												detected via the FoundationOne CDX NGS assay.
23	Hempel et al <sup>23</sup> , 2020	41	All	No	-	No	-	Yes	41	Visceral, bone	NGS	Point mutation, using FoundationOne CDx
24	Mosele et al <sup>24</sup> , 2020	617	HR+/TN	No	-	No	-	Yes	617	Lung, Pleural, contralateral breast, liver, LN, skin	NGS (WES)	Hotspot mutation, using COSMIC
25	Arruda et al <sup>25</sup> , 2019	10	All	No	-	Yes	8	No	-	Lung, liver, LN, ovary	NGS (WES)	Driver mutations
26	Varešlija et al <sup>26</sup> , 2019	21	All	No	-	Yes	21	No	-	-	NGS	Utilizing ExAC, dbSNP and ClinVar databases.
27	Tyran et al <sup>27</sup> , 2019	14	All	Yes	14	Yes	14	No	-	-	Targeted NGS	panel of 494 “cancer-associated” and “actionable” genes
28	Angus et al <sup>28</sup> , 2019	442	All	No	-	No	-	Yes	442	Lung, liver, bone, LN, soft tissue	NGS (WGS)	Driver mutations, using COSMIC
29	Ferguson et al <sup>29</sup> , 2018	7069	All	Yes	3496	Yes	99	Yes	3469	LN, other	NGS	Using the customized Illumina TruSeq Amplicon Cancer Hotspot panel
30	Schrijver et al <sup>30</sup> , 2018	17	TN/HER2+	Yes	17	No	-	No	-	Skin	Targeted NGS	Somatic mutation, using MSK-Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets



												(MSK-IMPACT) assay
31	Razavi et al <sup>31</sup> , 2018	1756	All	Yes	918	No	-	No		Lung, chest wall, pleural, liver, LN, ovary	Targeted NGS	Hotspot mutation, using Variant Effect Predictor (VEP) ver. 81 and vcf2maf ver. 1.6.3
32	Arruda et al <sup>32</sup> , 2018	6	HR+/HER2+	Yes	6	Yes	9	No	-	-	Targeted NGS	Actionable mutation, using OncoKB
33	Diossy et al <sup>33</sup> , 2018	17	All	Yes	19	Yes	19	No	-	-	NGS (WES)	Driver mutation, using Genome Analysis Toolkit (GATK 3.7)
34	Siegel et al <sup>34</sup> , 2018	16	All	No	0	Yes	10	No	-	-	NGS (WES)	Somatic mutations, using DawnRank
35	Kjällquist et al <sup>35</sup> , 2018	10	All	Yes	10	No	-	Yes	10	Lung, liver, bone, LN, skin	NGS (WGS)	Somatic mutations, using set of 505 recurrent cancer genes from COSMIC census database and The Cancer Genome Atlas
36	Krøigård et al <sup>36</sup> , 2018	6	HR+	Yes	6	No	-	Yes	6	Liver, bone	NGS	Somatic mutations, using nine publicly available somatic variant callers
37	Ng et al <sup>37</sup> ,	9	All	Yes	9	No	-	Yes	9	Lung, liver, bone	NGS	Pathogenic

	2017										(WES)	mutations, using a combination of MutationTaster, CHASM and FATHMM
38	Richichi et al <sup>38</sup> , 2017	12	All	No	-	Yes	12	No	-	-	NGS (WES)	Somatic mutations, using cBioPortal database
39	Priedigkeit et al <sup>39</sup> , 2017	20	All	No	-	Yes	20	No	-	-	NGS (WES)	Activating mutation, using CLC Genomics Workbench and IGV
40	Yates et al <sup>40</sup> , 2017	51	All	Yes	51	No	-	Yes	51	Distant metastases, local recurrent	NGS (WGS)	Driver mutations, using mutation calling algorithms (CaVEMan, Pindel and BRASS) and post-processing filters
41	Basho et al <sup>41</sup> , 2016	89	All	Yes	89	No	-	No	-	Visceral, LN, soft tissue	Multiplex PCR	Hotspot mutations, using panel of 190 regions that encompass 740 mutational hotspots
42	Bertucci et al <sup>42</sup> , 2016	23	All	Yes	23	No	-	No	-	Liver, peritoneum, LN, skin, muscles, ovary, bladder, uterus	Targeted NGS	SNVs (non-synonymous, stop/gain) and indels, using panel

												of 365 “cancer-associated” genes selected for their involvement in cancers
43	Muller et al <sup>43</sup> , 2016	22	All	No	-	Yes	4	No	-	Lung, chest wall, neck mass, liver, LN, skin	Targeted NGS	Somatic mutations, using COSMIC
44	Manso et al <sup>44</sup> , 2016	11	HR+	Yes	11	No	-	Yes	11	Lung, peritoneum, bone	NGS	Panel covering the coding DNA sequence of the 106 genes
45	Saunus et al <sup>45</sup> , 2015	11	All	No	-	Yes	11	No	-	-	NGS (WES)	Somatic mutations, using qSNP and the Genome Analysis Tool Kit
46	Lee et al <sup>46</sup> , 2015	45	All	Yes	18	Yes	42	No	-	-	NGS	Hotspot mutations, using The Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2
47	Brastianos et al <sup>47</sup> , 2015	21	All	No	-	Yes	21	No	-	-	NGS (WES)	Actionable mutations, using COSMIC (v67)
48	Roy-Chowdhuri et al <sup>48</sup> , 2015	61	All	Yes	61	No	-	Yes	61	Distant metastases, local recurrent	NGS	Hotspot mutations, using The IT AmpliSeq cancer panel
49	Salhia et al <sup>49</sup> , 2014	35	All	No	-	Yes	11	No	-	-	aCGH	Genomic identification using Significant

											Targets in Cancer	
50	Staren et al <sup>50</sup> , 2014	101	All	Yes	31	No	-	Yes	70	Distant metastases, local recurrent	NGS	Genomic alterations, using panel of 236 cancer-related genes
51	Meric-Bernstam et al <sup>51</sup> , 2014	43	All	Yes	36	No	-	No		Lung, liver, skin, LN, ovary, local recurrent	Targeted NGS	Somatic mutations using the COSMIC database (version 62),
52	Craig et al <sup>52</sup> , 2013	14	TN	No	-	No	-	Yes	14	Lung, chest wall, liver, bone, LN	NGS	Coding mutations, using MutationWalker and Genome Analysis Toolkit (GATK)
53	Wikman et al <sup>53</sup> , 2012	30	All	No	-	Yes	10	No	-	-	Sanger	The entire PTEN coding region was screened for mutations by sequencing PTEN cDNA.
54	Qian et al <sup>54</sup> , 2011	41	NA	No	-	Yes	20	No	-	-	Sanger	Using GeneBank reference sequence NM_000546
55	Dupont Jensen et al <sup>55</sup> , 2011	104	All	Yes	101	No	-	No	-	Lung, pleura, liver, bone, LN, local recurrent	Multiplex PCR	Hotspot mutations, analyzed by SNaPshot

													genotyping assay
56	Da Silvia et al <sup>56</sup> , 2010	12	All	Yes	12	Yes	12	No	-	-		NGS	Somatic mutations, using the OncoCarta® Panel Assay v1.0
57	Ding et al <sup>57</sup> , 2010	1	TN	Yes	4	Yes	7	No	-	-		NGS	Somatic mutations, using glfSomatic

*Note. Liste des 57 études en méta-analyse se trouve dans l'annexe dans l'ordre de 1 à 57*

Notre méta-analyse comprenait un total de 37218 patients avec un âge médian au moment du diagnostic de 53,5 ans, et un total de 18932 échantillons, dont 11906 échantillons de tumeurs primaires, 5541 échantillons de métastases extra-cérébrales et 1485 échantillons de métastases cérébrales.

Pour l'évaluation de la qualité, 29 études (50,9%) étaient de bonne qualité, 25 études (43,8%) étaient de qualité modérée et 3 études (5,3%) étaient de mauvaise qualité (Tableau 11).

Cependant, étant donné que les études de bonne qualité comprenaient un nombre beaucoup plus important d'échantillons tumoraux que les autres études, elles représentaient respectivement 97,3%, 97,5% et 85,3% du nombre total d'échantillons pour les tumeurs primaires, les métastases extra-cérébrales et cérébrales.

### **Profils de mutation génétique dans les métastases cérébrales du cancer du sein**

En utilisant un seuil de 1% pour la prévalence des mutations dans la tumeur primaire, nous avons identifié 53 gènes. En considérant tous les échantillons tumoraux regroupés, nous avons d'abord comparé la prévalence des mutations génétiques pour ces 53 gènes entre des études de bonne qualité et des études de qualité modérée/mauvaise. Pour 16 gènes, la prévalence de la mutation était significativement plus élevée pour les études de qualité modérée et mauvais, mais avec de petits nombres d'échantillons analysés (Tableau 12).

Tableau 11. Details on individual scores for the included studies based on Q-genie tool

Study	Questions											Score
	Rationale for study	Selection and outcome	Comparability of comparison group	Technical exposure	Non-technical exposure	Other sources of bias	Samples size and power	A priori planning of analysis	Statistical methods and control for confounding	Testing of assumptions and inferences for genetic analysis	Appropriateness of inferences drawn from results	
Nguyen et al <sup>1</sup> , 2022	6	4	5	4	NA	5	6	5	4	5	6	50
Cosgrove et al <sup>2</sup> , 2022	6	5	4	4	NA	4	3	5	4	5	6	46
Wardell et al <sup>3</sup> , 2021	6	4	4	4	NA	3	2	5	4	5	6	43
Huang et al <sup>4</sup> , 2021	5	3	6	3	NA	2	1	3	4	3	4	34
Thulin et al <sup>5</sup> , 2021	5	5	5	4	NA	4	3	4	5	4	5	44
Chen et al <sup>6</sup> , 2021	5	4	5	4	NA	5	6	4	4	3	3	43
Aftimos et al <sup>7</sup> , 2021	4	4	2	4	NA	5	6	4	5	4	4	42
Hagio et al <sup>8</sup> , 2021	6	5	6	4	NA	3	2	5	6	4	4	45
Giannoudis et al <sup>9</sup> , 2021	5	5	5	2	NA	4	3	4	3	4	4	39
Akcakanat et al <sup>10</sup> , 2021	5	3	2	4	NA	4	3	4	5	5	4	39
Huang et al <sup>11</sup> , 2021	5	5	4	3	NA	5	7	5	3	3	4	44

Dono et al <sup>12</sup> , 2021	5	4	4	4	NA	3	3	5	4	4	3	39
Callens et al <sup>13</sup> , 2021	5	5	6	4	NA	4	4	4	5	4	6	47
Rinaldi et al <sup>14</sup> , 2020	6	5	5	4	NA	4	6	4	5	5	4	48
Fumagalli et al <sup>15</sup> , 2020	5	4	5	3	NA	4	6	4	5	4	5	45
Geelen et al <sup>16</sup> , 2020	6	4	2	4	NA	4	6	4	6	4	4	44
Akahane et al <sup>17</sup> , 2020	4	4	5	4	NA	3	2	4	4	4	4	38
Kaur et al <sup>18</sup> , 2020	3	3	4	3	NA	2	1	3	3	3	3	28
Hutchinson et al <sup>19</sup> , 2020	5	3	2	4	NA	4	3	5	5	5	5	41
Paul et al <sup>20</sup> , 2020	5	5	5	3	NA	3	4	3	4	3	3	38
Hu et al <sup>21</sup> , 2020	4	2	2	3	NA	3	4	4	4	3	3	32
Freitag et al <sup>22</sup> , 2020	5	4	3	4	NA	3	3	3	5	4	5	39
Hempel et al <sup>23</sup> , 2020	5	3	3	4	NA	3	4	4	4	4	5	39
Mosele et al <sup>24</sup> , 2020	5	3	3	3	NA	4	6	3	4	4	4	39
Arruda et al <sup>25</sup> , 2019	5	4	4	3	NA	2	2	4	4	4	4	36
Varešlija et al <sup>26</sup> , 2019	6	3	4	4	NA	4	2	3	4	3	3	36



Tyran et al <sup>27</sup> , 2019	6	4	6	3	NA	3	2	3	4	3	4	38
Angus et al <sup>28</sup> , 2019	5	4	3	3	NA	4	6	4	5	5	4	43
Ferguson et al <sup>29</sup> , 2018	6	5	6	3	NA	4	6	4	6	5	5	50
Schrijver et al <sup>30</sup> , 2018	4	3	2	4	NA	4	2	4	6	4	4	37
Razavi et al <sup>31</sup> , 2018	4	3	2	4	NA	4	6	5	5	4	4	41
Arruda et al <sup>32</sup> , 2018	5	4	6	4	NA	2	1	5	4	3	4	38
Diossy et al <sup>33</sup> , 2018	4	4	6	3	NA	3	2	3	4	3	4	36
Siegel et al <sup>34</sup> , 2018	5	4	4	3	NA	3	2	4	3	3	4	35
Kjällquist et al <sup>35</sup> , 2018	4	3	6	4	NA	2	2	3	4	3	4	35
Krøigård et al <sup>36</sup> , 2018	4	3	6	3	NA	2	1	4	3	4	3	33
Ng et al <sup>37</sup> , 2017	4	3	6	3	NA	2	1	3	3	3	4	32
Richichi et al <sup>38</sup> , 2017	4	3	4	3	NA	3	2	4	4	3	4	34
Priedigkeit et al <sup>39</sup> , 2017	4	4	4	3	NA	3	2	4	3	5	4	36
Yates et al <sup>40</sup> , 2017	6	3	6	3	NA	4	3	5	4	4	4	42

Basho et al <sup>41</sup> , 2016	4	4	4	4	NA	4	4	3	4	4	4	39
Bertucci et al <sup>42</sup> , 2016	4	3	2	4	NA	4	2	4	5	5	4	37
Muller et al <sup>43</sup> , 2016	4	3	4	4	NA	3	2	4	4	4	4	36
Manso et al <sup>44</sup> , 2016	5	3	6	3	NA	3	2	4	5	4	5	40
Saunus et al <sup>45</sup> , 2015	5	4	4	3	NA	4	2	3	4	3	4	36
Lee et al <sup>46</sup> , 2015	5	4	6	3	NA	4	3	4	5	4	4	42
Brastianos et al <sup>47</sup> , 2015	5	3	4	3	NA	3	2	4	4	4	5	37
Roy-Chowdhuri et al <sup>48</sup> , 2015	6	3	6	4	NA	4	4	4	5	4	6	46
Salhia et al <sup>49</sup> , 2014	5	4	4	2	NA	5	4	3	3	2	4	36
Staren et al <sup>50</sup> , 2014	5	4	5	4	NA	4	4	4	4	4	5	43
Meric-Bernstam et al <sup>51</sup> , 2014	4	3	2	4	NA	4	3	4	5	5	5	39
Craig et al <sup>52</sup> , 2013	4	3	3	3	NA	3	2	4	4	3	4	33
Wikman et al <sup>53</sup> , 2012	4	4	4	2	NA	2	2	3	2	3	3	29

Qian et al <sup>54</sup> , 2011	3	3	4	2	NA	2	2	2	2	3	3	26
Dupont Jensen et al <sup>55</sup> , 2011	3	2	2	2	NA	3	5	3	4	2	2	28
Da Silvia et al <sup>56</sup> , 2010	5	3	6	3	NA	2	2	3	4	2	3	33
Ding et al <sup>57</sup> , 2010	5	2	6	4	NA	1	1	2	3	2	3	29

Tableau 12. Comparison of prevalence among gene mutation according to the quality of studies (*Q* genie tool)

Gene	ID studies	Sample (n)	Mutation prevalence % [95%CI] (random effects model)	P value for subgroup differences (random effects model)	Heterogeneity	
					I <sup>2</sup>	P
<b>TP53</b>				0.78		
Good studies	1,3,5,6,7,8,9,11,12,13,14,15,16,19,23,28,29,31,40,41,44,47,48,51	16380	47.0 [40.0-54.0]		96%	<0.01
Moderate or low studies	17,20,21,27,30,32,33,34,35,36,37,42,43,45,47,52,54,57	1321	48.0 [39.0-57.0]		76%	<0.01
<b>PIK3CA</b>				0.81		
Good studies	1,3,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,19,23,2,28,29,40,41,46,48,51	16974	28.0 [26.0-31.0]		82%	<0.01
Moderate or low studies	17,20,21,27,30,32,33,35,36,37,38,42,43,45,47,56	485	29.0 [23.0-37.0]		49%	<0.01
<b>CCND1</b>				0.61		
Good studies	11,15,16,19,22,23,28,51	1559	12.0 [5.00-25.0]		86%	<0.01
Moderate or low studies	27,30,45	25	16.0 [6.00-36.0]		0%	0.79
<b>MYC</b>				0.05		
Good studies	8,11,12,15,19,23,28,34,44	1540	13.0 [6.00-25.0]		87%	<0.01
Moderate or low studies	27,39,45	55	29.0 [19.0-42.0]		0%	0.88
<b>FGF19</b>				NA		
Good studies	15,19,22	222	18.0 [13.0-23.0]		43%	0.17
Moderate or low studies		0	NA		NA	NA
<b>FGF3</b>				NA		
Good studies	15,19,22,23	263	11.0 [5.00-21.0]		55%	0.08
Moderate or low studies		0	NA		NA	NA
<b>KMT2C</b>				0.27		
Good studies	1,6,13,28,44	2511	11.0 [4.00-27.0]		95%	<0.01
Moderate or low studies	17,20,21,27,32,35	221	20.0 [12.0-33.0]		65%	<0.01
<b>BRCA2</b>				0.1		

Good studies	8,12,13,14,15,16,19,23,29,40,50,51	12420	10.0 [7.00-14.0]		89%	<0.01
Moderate or low studies	30,32,36,42,45,47	76	30.0 [8.00-68.0]		55%	0.05
<b><i>ATRX</i></b>				NA		
Good studies		0	NA		NA	NA
Moderate or low studies	27,30,32,35	43	14.0 [6.00-28.0]		0%	0.92
<b><i>GATA3</i></b>				0.71		
Good studies	1,6,7,10,11,12,13,14,16, 28, 40,44	8374	11.0 [9.00-13.0]		80%	<0.01
Moderate or low studies	17,20,21,27,37,38,42	239	12.0 [8.00-16.0]		0%	0.95
<b><i>FGFR1</i></b>				NA		
Good studies	14,15,16,19,23,29	8597	5.00 [2.00-16.0]		97%	<0.01
Moderate or low studies		0	NA		NA	NA
<b><i>GRIN2A</i></b>				<0.01		
Good studies	14	4762	4.00 [2.00-8.00]		85%	<0.01
Moderate or low studies	57	4	50.0 [7.00-93.0]		NA	NA
<b><i>NCOR1</i></b>				NA		
Good studies	1,13,14,40,44	6683	14.0 [2.00-58.0]		83%	<0.01
Moderate or low studies		0	NA		NA	NA
<b><i>CDKN2A</i></b>				0.41		
Good studies	10,11,19,28,51	1262	10.0 [8.00-12.0]		21%	0.28
Moderate or low studies	26,45	43	14.0 [6.00-28.0]		0%	0.65
<b><i>TSC2</i></b>				0.54		
Good studies	19,40	93	4.00 [2.00-11.0]		0%	0.4
Moderate or low studies	30,42,47	44	7.00 [2.00-19.0]		0%	0.61
<b><i>PTEN</i></b>				<0.01		
Good studies	1,5,6,7,8,10,11,13,15,16,19,23,28,29,40,41,46,48,51	11352	7.00 [6.00-9.00]		88%	<0.01
Moderate or low studies	4,21,27,33,42,45,53	188	24.0 [10.0-47.0]		60%	<0.01
<b><i>RBI</i></b>				0.02		
Good studies	1,5,7,8,11,16,19,29,40,46,50	10399	5.00 [3.00-8.00]		94%	<0.01
Moderate or low studies	4,21,27,30,34,37,52	155	21.0 [7.00-50.0]		60%	0.01
<b><i>ARID1A</i></b>				0.57		
Good studies	1,3,6,7,8,10,11,13,15,16,23,28,31,40,51	3766	6.00 [5.00-8.00]		65%	<0.01

Moderate or low studies	21,32,35,47	1035	8.00 [4.00-16.0]		81%	<0.01
<b>MDM2</b>				0.08		
Good studies	15,23,51	192	6.00 [3.00-10.0]		0%	0.77
Moderate or low studies	30,34,45,52	35	14.0 [6.00-30.0]		1%	0.36
<b>MAP3K1</b>				0.63		
Good studies	1,6,13,14,40	6924	6.00 [6.00-7.00]		0%	0.67
Moderate or low studies	42	23	9.00 [1.00-28.0]		NA	NA
<b>CDH1</b>				0.25		
Good studies	1,5,6,7,13,14,16,19,23,28,29,40,44,51	14541	6.00 [3.00-11.0]		98%	<0.01
Moderate or low studies	17,20,21,25,32,33,35,37,38,42,43	294	9.00 [6.00-13.0]		0%	0.98
<b>AKT1</b>				0.9		
Good studies	1,6,7,8,9,13,15,23,28,29,40,41,48,50,51	10474	8.00 [5.00-11.0]		90%	<0.01
Moderate or low studies	20,27,42,45,	136	8.00 [5.00-14.0]		0%	0.89
<b>CDKN2B</b>				0.07		
Good studies	11,19,51	11525	5.00 [5.00-6.00]		0%	0.41
Moderate or low studies	26	32	12.0 [5.00-29.0]		0%	0.49
<b>RUNX1</b>				<0.01		
Good studies	1,7,28,51	2452	2.00 [1.00-4.00]		76%	<0.01
Moderate or low studies	20,27,30,36,37	129	11.0 [7.00-17.0]		22%	0.26
<b>BRCA1</b>				<0.01		
Good studies	7,8,11,13,14,15,19,29,40	13122	6.00 [5.00-8.00]		79%	<0.01
Moderate or low studies	27,32,33,45,52	100	15.0 [9.00-23.0]		0%	0.76
<b>ARID1B</b>				0.56		
Good studies	40,44	132	4.00 [1.00-15.0]		15%	0.32
Moderate or low studies	21,27,30,34,35	111	7.00 [3.00-15.0]		0%	0.41
<b>MSH6</b>				<0.01		
Good studies	40,51	138	2.00 [1.00-7.00]		0%	0.96
Moderate or low studies	34,42,	44	16.0 [8.00-30.0]		0%	0.56
<b>ESR1</b>				0.89		
Good studies	1,7,8,9,14,15,16,22,23,31,50	7965	9.00 [5.00-16.0]		95%	<0.01
Moderate or low studies	17,20,21,27,39,57	1100	10.0 [3.00-28.0]		93%	<0.01
<b>KDM6A</b>				0.01		

Good studies	14	4798	4.00 [3.00-5.00]		20%	0.29
Moderate or low studies	18,30,34,35	32	16.0 [7.00-32.0]		0%	0.84
<b>APC</b>				0.14		
Good studies	29,31,46,48	7280	4.00 [4.00-5.00]		44%	0.08
Moderate or low studies	4,21,35,43	1039	20.0 [2.00-73.0]		88%	<0.01
<b>KMT2D</b>				0.23		
Good studies	14,31,44	4764	10.0 [9.00-11.0]		0%	0.59
Moderate or low studies	21,27,32,27	1032	5.00 [1.00-15.0]		85%	<0.01
<b>MAP2K4</b>				0.84		
Good studies	6,7,8,16,28,40	1186	5.00 [3.00-9.00]		68%	<0.01
Moderate or low studies	20,32,	89	6.00 [2.00-13.0]		0%	0.75
<b>ERBB2</b>				0.11		
Good studies	1,6,7,8,9,11,12,13,15,16,19,23,26,28,29,30,31,41	11069	5.00 [3.00-9.00]		95%	<0.01
Moderate or low studies	21,32,33,34,39,45,47	1121	11.0 [5.00-23.0]		89%	<0.01
<b>FAT1</b>				0.94		
Good studies	6,28,31	599	6.00 [5.00-9.00]		55%	0.14
Moderate or low studies	18,21,27,42	1038	7.00 [2.00-17.0]		83%	<0.01
<b>ATM</b>				<0.01		
Good studies	8,15,29,46,48,51	7515	3.00 [3.00-4.00]		2%	0.42
Moderate or low studies	4,30,32,37	78	19.0 [12.0-29.0]		0%	0.62
<b>NRAS</b>				<0.01		
Good studies	29,41	3657	1.00 [0.00-4.00]		92%	<0.01
Moderate or low studies	45,56	35	17.0 [8.00-33.0]		0%	0.99
<b>NF1</b>				0.41		
Good studies	1,6,7,11,13,15,23,28,31,40,51	3904	5.00 [3.00-8.00]		87%	<0.01
Moderate or low studies	21,35,42,47,52	1063	7.00 [3.00-12.0]		63%	0.01
<b>ERBB3</b>				<0.01		
Good studies	7	242	2.00 [1.00-5.00]		NA	NA
Moderate or low studies	21,26,37,45	117	11.0 [5.00-22.0]		36%	0.18
<b>JAK1</b>				0.41		
Good studies	6,14	5076	3.00 [2.00-6.00]		86%	<0.01

Moderate or low studies	30,34	77	5.00 [2.00-13.0]		0%	0.48
<b>NOTCH1</b>				0.19		
Good studies	13,14,19,29	11842	2.00 [0.00-7.00]		96%	<0.01
Moderate or low studies	21,27,30	95	6.00 [2.00-20.0]		55%	0.11
<b>IGF1R</b>				NA		
Good studies	14,15,51	4977	4.00 [2.00-7.00]		83%	<0.01
Moderate or low studies		0	NA		NA	NA
<b>MTOR</b>				0.07		
Good studies	14	4753	4.00 [2.00-7.00]		89%	<0.01
Moderate or low studies	27,42,47	72	10.0 [5.00-19.0]		0%	0.75
<b>FOXA1</b>				<0.01		
Good studies	1,29,40,44	2279	4.00 [2.00-10.0]		94%	<0.01
Moderate or low studies	39,57	27	43.0 [15.0-76.0]		76%	0.04
<b>PIK3R1</b>				<0.01		
Good studies	1,6,7,13,14,15,40	7003	3.00 [2.00-5.00]		81%	<0.01
Moderate or low studies	26,45	32	22.0 [11.0-39.0]		49%	0.16
<b>GNAS</b>				<0.01		
Good studies	10,11,14,29,40	12570	1.00 [0.00-3.00]		95%	<0.01
Moderate or low studies	18,21,27,35	107	10.0 [4.00-24.0]		43%	0.14
<b>ARID2</b>				0.97		
Good studies	14,31,40	4864	3.00 [2.00-5.00]		60%	0.04
Moderate or low studies	21,30,35	1005	3.00 [0.00-16.0]		87%	<0.01
<b>ASXL1</b>				0.48		
Good studies	8,12,14	4775	9.00 [2.00-32.0]		89%	<0.01
Moderate or low studies	34,35,37	39	15.0 [7.00-30.0]		0%	0.57
<b>KRAS</b>				NA		
Good studies	7,14,15,19,23,29,46,48,51	7802	2.00 [1.00-3.00]		62%	<0.01
Moderate or low studies		0	NA		NA	NA
<b>EGFR</b>				<0.01		
Good studies	5,10,13,16,29,46,51	7353	1.00 [1.00-3.00]		78%	<0.01
Moderate or low studies	21,39,47	108	8.00 [3.00-22.0]		72%	0.03



<b>MLHI</b>				0.14		
Good studies	29,40,46	7121	2.00 [1.00-6.00]		93%	<0.01
Moderate or low studies	32,	9	11.0 [2.00-50.0]		NA	NA
<b>BRAF</b>				<0.01		
Good studies	16,19,29,40,48	7248	1.00 [0.00-3.00]		85%	<0.01
Moderate or low studies	32,38,45	31	19.0 [9.00-37.0]		0%	0.57
<b>FGFR2</b>				<0.01		
Good studies	29	7001	1.00 [0.00-2.00]		88%	<0.01
Moderate or low studies	32,52	44	16.0 [8.00-30.0]		0%	0.41
<b>FGFR4</b>				NA		
Good studies		0	-		NA	NA
Moderate or low studies	26,27,39	987	9.00 [1.00-41.0]		93%	<0.01

Bold: Gene's name and significant *P* value at the threshold of 5% for subgroup differences

Ensuite, nous avons comparé la prévalence des mutations génétiques en fonction du site d'échantillonnage de la tumeur : tumeur primaire, métastases extra-cérébrales et métastases cérébrales (Figure 15A). Cinq d'entre eux avaient une prévalence de mutation supérieure à 10% dans les 3 types d'échantillons : *TP53*, *PIK3CA*, *MYC*, *KMT2C* et *ATRX*. Dans les métastases cérébrales, la prévalence des mutations était particulièrement élevée pour *TP53* (58%), *FOXA1* (43%), *FGFR4* (33%), *BRCA2* (22%), *FGFR2* (20%), *BRAF* (19%) et *PTEN* (15%).

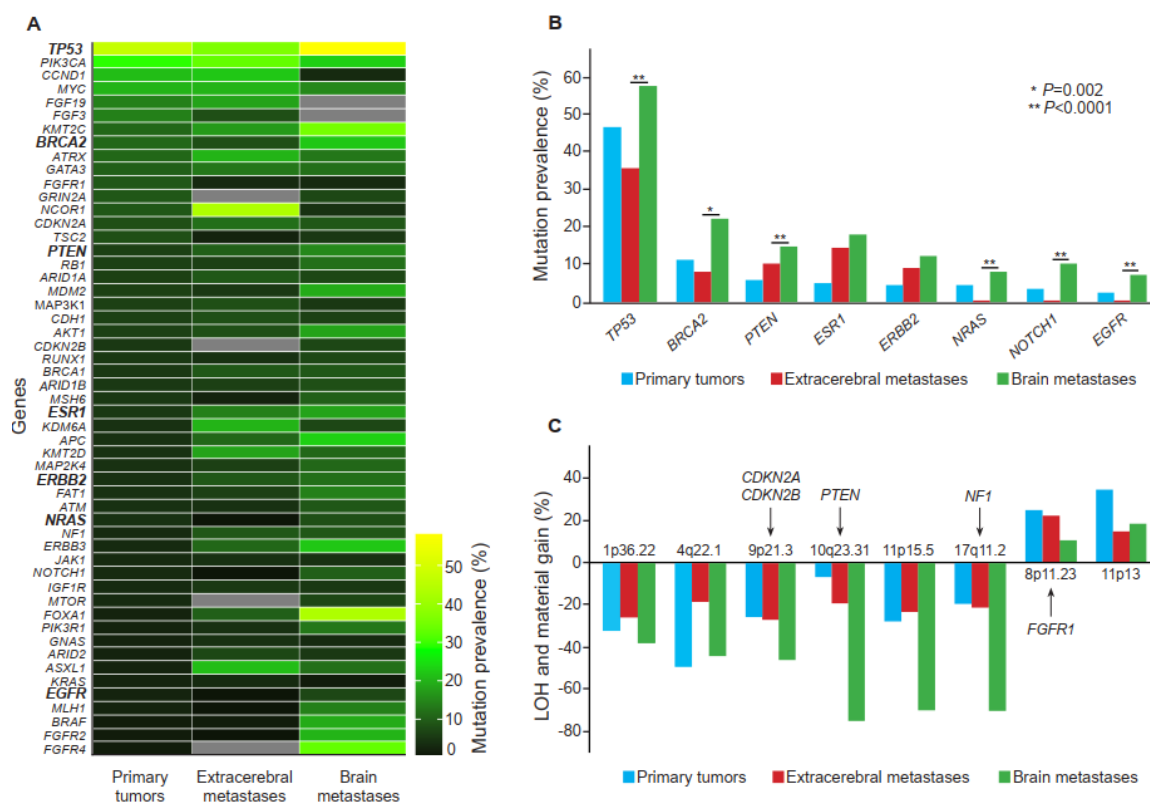


Figure 15. Gene mutation prevalence, loss of heterozygosity and copy number alterations in primary tumor, extracerebral metastases and brain metastases

Panel A shows a heatmap plot for the prevalence of gene mutations according to the tumor site (primary tumor, extracerebral metastases and brain metastases).

Panel B shows the increased prevalence of gene mutations in brain metastases for 8 genes: *TP53*, *BRCA2*, *PTEN*, *ESR1*, *ERBB2*, *NRAS*, *NOTCH1*, *EGFR*. *P* values reported here corresponded to those of Table 14 and of pairwise comparison of gene mutation prevalence between brain metastases and extracerebral metastases.

Panel C shows the loss of heterozygosity and material gain identified in breast cancer brain metastases.

Parmi les 53 gènes initialement retenus, 21 étaient associés à des différences significatives de prévalence entre les sous-groupes (Tableau 13).

Tableau 13. Comparison of prevalence among gene mutation in primary tumor, extracerebral metastases and brain metastases in breast cancers.

Gene	ID studies	Sample (n)	Mutation prevalence % [95%CI] (random effects model)	P value for subgroup differences (random effects model)	Heterogeneity	
					I <sup>2</sup>	P
<b>TP53</b>				<b>0.04</b>		
Primary	1,5,6,7,8,9,13,14,15,16,17,19,20,21,27,29,30,31,32,33,36,37,40,41,42,44,46,48,51,57	11750	47.0 [40.0-54.0]		95%	<0.01
Extracerebral metastases	1,6,8,13,15,17,20,23,28,29,35,36,37,40,44,48,52	4605	36.0 [25.0-49.0]		81%	<0.01
Brain metastases	3,5,8,9,11,12,14,20,27,29,32,33,34,43,45,46,47,54,57	1346	58.0 [47.0-69.0]		79%	<0.01
<b>PIK3CA</b>				<b>0.03</b>		
Primary	1,5,6,7,8,9,10,13,14,15,16,17,19,20,21,27,29,30,32,33,35,36,37,40,41,42,46,48,51,55,56	10940	29.0 [26.0-33.0]		76%	<0.01
Extracerebral metastases	1,6,8,13,15,17,20,23,24,28,29,36,37,40,48	5187	33.0 [28.0-38.0]		85%	<0.01
Brain metastases	3,5,9,11,12,14,20,27,29,32,33,35,38,43,45,46,47,56	1332	23.0 [18.0-28.0]		45%	0.02
<b>CCND1</b>				<b>0.25</b>		
Primary	15,16,19,22,30,51	261	21.0 [16.0-26.0]		1%	0.4
Extracerebral metastases	15,23,28	565	22.0 [15.0-31.0]		67%	0.05
Brain metastases	11,27,45	758	3.00 [0.00-28.0]		91%	<0.01
<b>MYC</b>				<b>0.92</b>		
Primary	8,15,19,44	200	20.0 [13.0-29.0]		9%	0.36
Extracerebral metastases	8,15,23,28,44	586	20.0 [11.0-34.0]		76%	<0.01
Brain metastases	11,12,27,34,39,45	809	15.0 [4.00-47.0]		90%	<0.01
<b>FGF19</b>				<b>0.59</b>		
Primary	15,19,22	140	14.0 [6.00-31.0]		71%	0.06
Extracerebral metastases	15	15	18.0 [11.0-28.0]		NA	NA
Brain metastases		0	NA		NA	NA
<b>FGF3</b>				<b>0.7</b>		
Primary	15,19,22	140	14.0 [6.00-30.0]		62%	0.1

Extracerebral metastases	15,23	123	8.00 [2.00-29.0]		75%	0.05
Brain metastases		0	NA		NA	NA
<b>KMT2C</b>				0.08		
Primary	1,6,17,20,21,27,32,35,44	1854	11.0 [4.00-25.0]		92%	<0.01
Extracerebral metastases	1,6,13,20,28,35,44	855	17.0 [7.00-34.0]		86%	<0.01
Brain metastases	27,32	23	35.0 [18.0-56.0]		0%	0.32
<b>BRCA2</b>				0.02		
Primary	13,14,16,19,29,30,36,40,42,50,51	8359	11.0 [5.00-22.0]		92%	<0.01
Extracerebral metastases	8,13,15,23,29,36,40,50	3738	8.00 [5.00-13.0]		50%	0.05
Brain metastases	12,14,29,32,45,47	399	22.0 [13.0-35.0]		72%	<0.01
<b>ATRX</b>				0.78		
Primary	30,35	19	11.0 [3.00-34.0]		0%	0.94
Extracerebral metastases	35	10	20.0 [3.00-56.0]		NA	NA
Brain metastases	27,32	23	13.0 [4.00-34.0]		0%	0.83
<b>GATA3</b>				0.63		
Primary	1,6,7,10,13,14,16,17,20,21,27,37,40,42,44	6853	10.0 [8.00-13.0]		67%	<0.01
Extracerebral metastases	6,13,20,28,37,40,44	742	13.0 [9.00-18.0]		31%	0.19
Brain metastases	11,12,14,27,38	1018	12.0 [7.00-20.0]		72%	<0.01
<b>FGFR1</b>				0.15		
Primary	14,15,16,19	4767	9.00 [3.00-21.0]		98%	<0.01
Extracerebral metastases	15,23,29	3592	3.00 [0.00-38.0]		97%	<0.01
Brain metastases	14	238	3.00 [1.00-5.00]		NA	NA
<b>GRIN2A</b>				0.73		
Primary	14,30,57	4528	9.00 [2.00-38.0]		86%	<0.01
Extracerebral metastases		0	NA		NA	NA
Brain metastases	14	238	7.00 [4.00-11.0]		NA	NA
<b>NCOR1</b>				0.4		
Primary	1,13,14,40,44	6220	9.00 [1.00-63.0]		90%	<0.01
Extracerebral metastases	1,40,44	225	43.0 [1.00-98.0]		0%	0.83
Brain metastases	14	238	4.00 [2.00-8.00]		NA	NA
<b>CDKN2A</b>				0.13		

Primary	10,19,51	87	8.00 [4.00-16.0]		0%	0.73
Extracerebral metastases	28	442	12.0 [10.0-16.0]		NA	NA
Brain metastases	11,26,45	776	9.00 [7.00-11.0]		0%	0.48
<b>TSC2</b>				0.43		
Primary	19,30,42	65	8.00 [3.00-17.0]		0%	0.8
Extracerebral metastases	40	51	2.00 [0.00-10.0]		NA	NA
Brain metastases	47	21	5.00 [0.00-25.0]		NA	NA
<b>PTEN</b>				0.04		
Primary	1,4,6,7,8,10,13,15,16,19,21,27,29,40,41,42,51	6066	6.00 [5.00-8.00]		53%	<0.01
Extracerebral metastases	1,4,6,15,23,28,29,40,48	4490	10.0 [6.00-16.0]		91%	<0.01
Brain metastases	4,5,11,27,33,45,46,53	984	15.0 [7.00-30.0]		57%	0.02
<b>RBI</b>				0.63		
Primary	1,4,5,7,8,16,19,21,29,30,37,46,50	5608	6.00 [3.00-13.0]		89%	<0.01
Extracerebral metastases	4,8,28,29,40,50,52	4080	6.00 [2.00-16.0]		95%	<0.01
Brain metastases	4,5,7,11,27,34,46	866	12.0 [4.00-31.0]		0%	0.72
<b>ARID1A</b>				0.15		
Primary	1,6,7,8,10,13,16,21,31,35,40,51	3230	6.00 [4.00-8.00]		72%	<0.01
Extracerebral metastases	1,13,15,23,28,35,40	798	9.00 [7.00-11.0]		11%	0.34
Brain metastases	3,11,32,47	773	7.00 [6.00-9.00]		0%	0.92
<b>MDM2</b>				0.11		
Primary	15,30,51	151	6.00 [3.00-11.0]		0%	0.6
Extracerebral metastases	23,52	55	5.00 [2.00-16.0]		0%	0.75
Brain metastases	34,45	21	19.0 [7.00-41.0]		0%	0.33
<b>MAP3K1</b>				0.51		
Primary	1,6,13,14,42	6338	6.00 [6.00-7.00]		0%	0.65
Extracerebral metastases	1,6,40	371	8.00 [5.00-11.0]		0%	0.58
Brain metastases	14	238	5.00 [3.00-9.00]		NA	NA
<b>CDH1</b>				0.71		
Primary	1,5,7,13,14,16,17,19,20,21,29,32,33,35,40,42,44,51	10299	6.00 [4.00-9.00]		93%	<0.01
Extracerebral metastases	1,6,13,17,20,23,28,29,33,37,40,44	4432	8.00 [4.00-19.0]		98%	<0.01

Brain metastases	5,25,32,33,38,43	104	6.00 [3.00-12.0]		0%	0.54
<b>AKT1</b>				0.11		
Primary	1,6,7,8,9,13,15,27,29,40,41,42,48,50,51	5994	6.00 [4.00-10.0]		87%	<0.01
Extracerebral metastases	1,6,8,15,20,23,28,29,40,50	4548	8.00 [6.00-11.0]		84%	<0.01
Brain metastases	9,27,45	68	18.0 [7.00-39.0]		50%	0.11
<b>CDKN2B</b>				0.04		
Primary	19,51	10792	5.00 [5.00-5.00]		0%	0.96
Extracerebral metastases	-	-	-	-	-	-
Brain metastases	11,26	765	7.00 [5.00-9.00]		18%	0.29
<b>RUNX1</b>				0.9		
Primary	1,7,20,27,30,36,51	1884	5.00 [1.00-15.0]		87%	<0.01
Extracerebral metastases	1,20,28,36,37	683	4.00 [2.00-9.00]		67%	0.02
Brain metastases	27	14	7.00 [0.00-34.0]		NA	NA
<b>BRCA1</b>				0.02		
Primary	7,8,13,14,15,19,27,29,33,40	8572	5.00 [4.00-8.00]		72%	<0.01
Extracerebral metastases	8,15,29,40,52	3626	9.00 [8.00-10.0]		0%	0.62
Brain metastases	11,14,27,32,33,45	1024	9.00 [7.00-10.0]		35%	0.17
<b>ARID1B</b>				0.8		
Primary	21,30,35,44	147	5.00 [1.00-14.0]		18%	0.3
Extracerebral metastases	35,40,44	72	6.00 [2.00-20.0]		48%	0.14
Brain metastases	27,34	24	8.00 [2.00-28.0]		0%	0.8
<b>MSH6</b>				0.42		
Primary	40,42,51	110	5.00 [1.00-21.0]		75%	0.02
Extracerebral metastases	40	51	2.00 [0.00-13.0]		NA	NA
Brain metastases	34	10	10.0 [2.00-31.0]		0%	0.94
<b>ESR1</b>				0.07		
Primary	1,7,8,9,14,15,16,17,21,22,32	7541	5.00 [2.00-12.0]		95%	<0.01
Extracerebral metastases	1,8,15,20,23,50	480	14.0 [11.0-17.0]		42%	0.11
Brain metastases	9,37,14,27,39,57	1044	18.0 [8.00-37.0]		92%	<0.01
<b>KDM6A</b>				<0.01		
Primary	14,30	4570	4.00 [3.00-4.00]		0%	0.74

Extracerebral metastases	35	10	20.0 [3.00-56.0]		NA	NA
Brain metastases	14,18,34	250	7.00 [4.00-11.0]		67%	0.05
<b>APC</b>				0.3		
Primary	4,21,29,31,35,46,48	4606	4.00 [1.00-13.0]		64%	<0.01
Extracerebral metastases	4,29,35,48	3564	11.0 [3.00-32.0]		94%	<0.01
Brain metastases	4,29,43,46	149	23.0 [2.00-80.0]		8%	0.35
<b>KMT2D</b>				0.28		
Primary	14,21,27,31	5514	4.00 [1.00-16.0]		93%	<0.01
Extracerebral metastases	37,44	11	18.0 [5.00-51.0]		NA	NA
Brain metastases	14,27,32	271	11.0 [8.00-15.0]		0%	0.98
<b>MAP2K4</b>				0.56		
Primary	6,7,16,20,40	543	4.00 [2.00-9.00]		69%	0.01
Extracerebral metastases	6,8,20,28,40	723	6.00 [4.00-11.0]		45%	0.12
Brain metastases	32	9	11.0 [0.00-48.0]		NA	NA
<b>ERBB2</b>				0.06		
Primary	1,6,7,9,13,15,16,19,21,29,30,31,32,33,41	6929	4.00 [2.00-7.00]		88%	<0.01
Extracerebral metastases	1,6,8,15,23,28,29	4364	9.00 [4.00-17.0]		98%	<0.01
Brain metastases	9,11,12,26,32,33,34,39,45,47	897	12.0 [5.00-26.0]		90%	<0.01
<b>FAT1</b>				0.41		
Primary	21,27,31,42	1022	4.00 [1.00-13.0]		84%	<0.01
Extracerebral metastases	6,18,28	601	6.00 [5.00-9.00]		65%	0.06
Brain metastases	27	14	14.0 [2.00-43.0]		NA	NA
<b>ATM</b>				0.19		
Primary	8,15,29,30,32,48,51	3782	4.00 [2.00-8.00]		62%	<0.01
Extracerebral metastases	4,15,29,37,48	3645	4.00 [3.00-4.00]		67%	0.02
Brain metastases	29,46	166	9.00 [3.00-24.0]		73%	0.01
<b>NRAS</b>				<0.01		
Primary	41,56	101	4.00 [1.00-24.0]		80%	0.02
Extracerebral metastases	29	3469	0.00 [0.00-0.00]		NA	NA
Brain metastases	29,45,56	122	8.00 [3.00-21.0]		57%	0.1
<b>NFI</b>				<0.01		

Primary	1,6,7,13,15,21,31,35,40,42,31	3253	3.00 [2.00-6.00]		82%	<0.01
Extracerebral metastases	1,6,15,23,28,35,40,52	960	9.00 [6.00-12.0]		43%	0.09
Brain metastases	11,47	754	9.00 [7.00-11.0]		0%	0.93
<b>ERBB3</b>				<b>&lt;0.01</b>		
Primary	7,21,37	318	3.00 [1.00-5.00]		31%	0.23
Extracerebral metastases	37	9	11.0 [0.00-48.0]		NA	NA
Brain metastases	26,45	32	22.0 [11.0-39.0]		0%	0.72
<b>JAK1</b>				0.86		
Primary	6,14,30	4748	3.00 [1.00-8.00]		86%	<0.01
Extracerebral metastases	6	157	4.00 [1.00-8.00]		NA	NA
Brain metastases	14,34	248	4.00 [2.00-8.00]		0%	0.4
<b>NOTCH1</b>				<b>&lt;0.01</b>		
Primary	13,14,19,21,27,29,30	8216	3.00 [1.00-7.00]		93%	<0.01
Extracerebral metastases	29	3469	0.00 [0.00-0.00]		NA	NA
Brain metastases	14,27	252	10.0 [6.00-14.0]		0%	0.54
<b>IGF1R</b>				0.79		
Primary	14,15,51	4657	3.00 [1.00-8.00]		86%	<0.01
Extracerebral metastases	15	82	5.00 [2.00-12.0]		NA	NA
Brain metastases	14	249	5.00 [3.00-8.00]		0%	0.51
<b>MTOR</b>				<b>&lt;0.01</b>		
Primary	14,27,42	4552	3.00 [3.00-4.00]		70%	0.03
Extracerebral metastases		0	-	-	-	-
Brain metastases	14,27,47	273	7.00 [4.00-11.0]		0%	0.53
<b>FOXA1</b>				<b>&lt;0.01</b>		
Primary	1,40,44	1623	2.00 [0.00-7.00]		78%	0.01
Extracerebral metastases	1,28,40	656	10.0 [8.00-13.0]		33%	0.23
Brain metastases	39,57	27	43.0 [15.0-76.0]		76%	0.04
<b>PIK3R1</b>				<b>&lt;0.01</b>		
Primary	1,7,13,14,15,40	6557	2.00 [1.00-4.00]		86%	<0.01
Extracerebral metastases	6,40	208	4.00 [2.00-8.00]		0%	0.97
Brain metastases	14,26,45	270	13.0 [5.00-30.0]		80%	<0.01



<b><i>GNAS</i></b>				0.9		
Primary	10,14,21,27,29,40	8160	2.00 [1.00-7.00]		92%	<0.01
Extracerebral metastases	18,29,35,40	3532	4.00 [0.00-27.0]		93%	<0.01
Brain metastases	11,14,27	985	3.00 [0.00-16.0]		90%	<0.01
<b><i>ARID2</i></b>				<0.01		
Primary	14,21,30,31,35,40	5570	2.00 [1.00-6.00]		71%	<0.01
Extracerebral metastases	35,40	61	7.00 [2.00-16.0]		65%	0.09
Brain metastases	14	238	5.00 [3.00-8.00]		NA	NA
<b><i>ASXL1</i></b>				<0.01		
Primary	14,35	4525	2.00 [2.00-3.00]		55%	0.14
Extracerebral metastases	35,37	19	21.0 [8.00-45.0]		0%	0.33
Brain metastases	8,12,14,34	270	12.0 [4.00-34.0]		72%	0.01
<b><i>KRAS</i></b>				0.52		
Primary	7,19,29,48,51	3869	2.00 [1.00-4.00]		69%	0.01
Extracerebral metastases	15,23,29,48	3653	3.00 [1.00-6.00]		69%	0.02
Brain metastases	14,46	280	1.00 [1.00-4.00]		0%	0.58
<b><i>EGFR</i></b>				<0.01		
Primary	5,10,13,16,21,29,51	3816	2.00 [1.00-4.00]		66%	<0.01
Extracerebral metastases	23,29	3510	0.00 [0.00-0.00]		82%	0.02
Brain metastases	5,39,46,47	135	7.00 [3.00-18.0]		64%	0.04
<b><i>MLH1</i></b>				<0.01		
Primary	29,40,46	3565	2.00 [0.00-7.00]		83%	<0.01
Extracerebral metastases	29,40	3520	0.00 [0.00-1.00]		70%	0.07
Brain metastases	32,46	51	14.0 [7.00-26.0]		0%	0.8
<b><i>BRAF</i></b>				<0.01		
Primary	16,19,29	3667	1.00 [0.00-6.00]		91%	<0.01
Extracerebral metastases	29,40,48	3581	1.00 [1.00-1.00]		46%	0.16
Brain metastases	32,38,45	31	19.0 [9.00-37.0]		0%	0.57
<b><i>FGFR2</i></b>				<0.01		
Primary	29	3532	1.00 [0.00-7.00]		94%	<0.01
Extracerebral metastases	29,52	3483	0.00 [0.00-1.00]		87%	<0.01

Brain metastases	32	30	20.0 [9.00-38.0]	<b>&lt;0.01</b>	0%	0.44
<b><i>FGFR4</i></b>						
Primary	27,31	932	1.00 [0.00-8.00]		88%	<0.01
Extracerebral metastases		-	-	-	-	-
Brain metastases	26,27,39	55	33.0 [22.0-46.0]		12%	0.32

Bold: Gene's name and significant *P* value at the threshold of 5% for subgroup difference

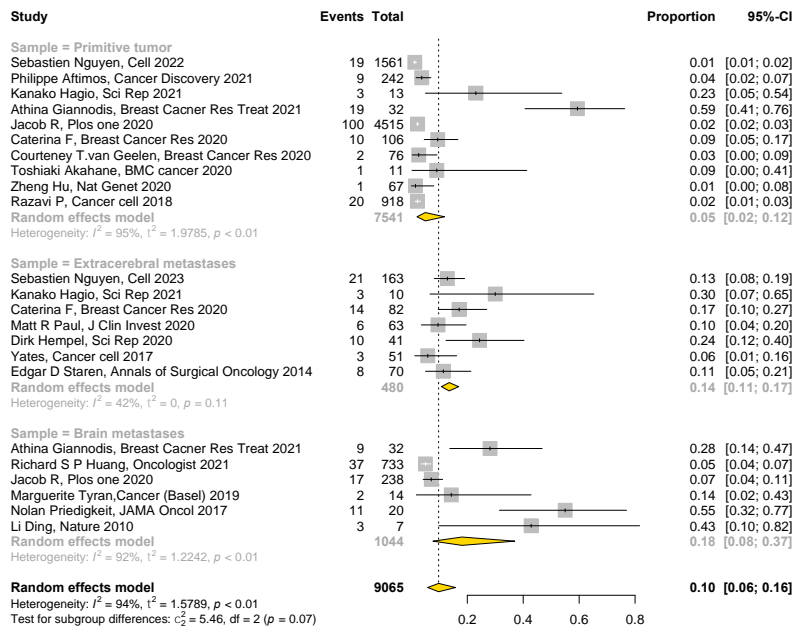
Lorsque nous avons comparé les métastases cérébrales aux métastases extra-cérébrales, la prévalence de la mutation était significativement plus élevée pour 10 gènes. Nous avons considéré que la prévalence de la mutation était fiable si un nombre minimum d'échantillons de 100 métastases cérébrales était analysé. Nous avons finalement retenu 6 gènes : *TP53*, *BRCA2*, *PTEN*, *NRAS*, *NOTCH1* et *EGFR* (Tableau 14, Figure 15B et Figure 16) pour *BRCA2*, *PTEN*, *NOTCH1* et *EGFR*).

Tableau 14. Pairwise comparison of prevalence of gene mutations according to the tumor site

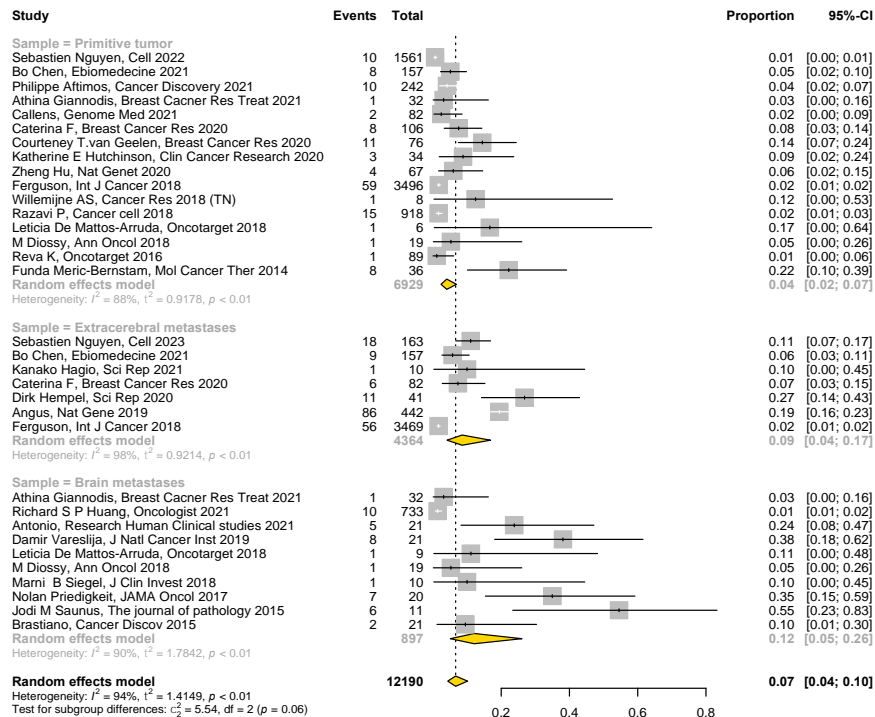
Gene	<i>P</i> value for pairwise comparisons of mutation prevalence		
	Primary tumors vs extracerebral metastases	Primary tumors vs brain metastases	Extracerebral metastases vs brain metastases
<b><i>TP53</i></b>	<0.0001	<0.0001	<b>&lt;0.0001</b>
<i>PIK3CA</i>	0.06	0.04	0.33
<b><i>BRCA2</i></b>	0.002	<0.0001	<b>0.002</b>
<b><i>PTEN</i></b>	0.008	<0.0001	<b>&lt;0.0001</b>
<i>CDKN2B</i>	NA	0.95	NA
<i>BRCA1</i>	<0.0001	0.002	0.72
<i>KDM6A</i>	0.06	0.02	0.34
<b><i>NRAS</i></b>	<0.0001	0.35	<b>&lt;0.0001</b>
<i>NF1</i>	<0.0001	<0.0001	0.8
<i>ERBB3</i>	0.65	<0.0001	0.8
<b><i>NOTCH1</i></b>	<0.0001	<0.0001	<b>&lt;0.0001</b>
<i>MTOR</i>	NA	0.001	NA
<b><i>FOXAI</i></b>	<0.0001	<0.0001	<b>&lt;0.0001</b>
<i>PIK3R1</i>	0.68	<0.0001	0.06
<i>ARID2</i>	0.02	0.004	0.77
<i>ASXL1</i>	<0.0001	<0.0001	0.05
<b><i>EGFR</i></b>	<0.0001	<0.0001	<b>&lt;0.0001</b>
<b><i>MLH1</i></b>	0.001	<0.0001	<b>&lt;0.0001</b>
<b><i>BRAF</i></b>	0.0001	<0.0001	<b>&lt;0.0001</b>
<b><i>FGFR2</i></b>	0.29	<0.0001	<b>&lt;0.0001</b>
<i>FGFR4</i>	NA	<0.0001	NA

Bold = significant *P* value at the threshold of 0.05, NA: not available

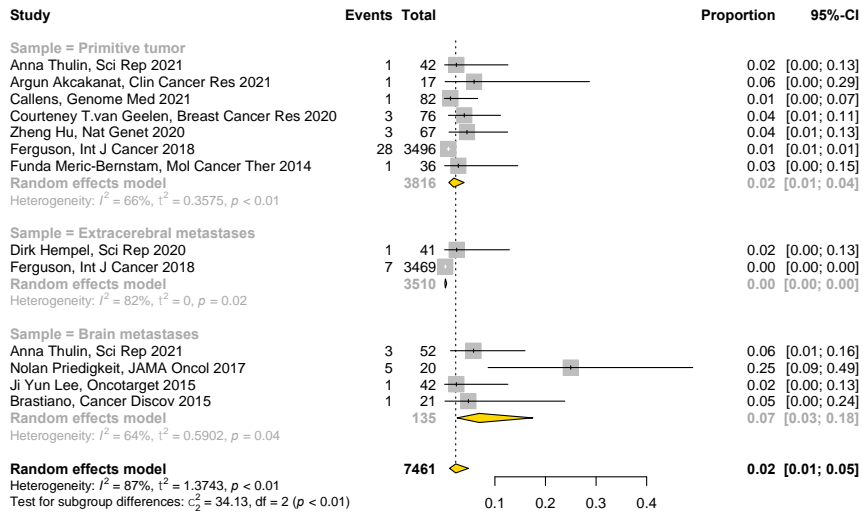
# ESR1



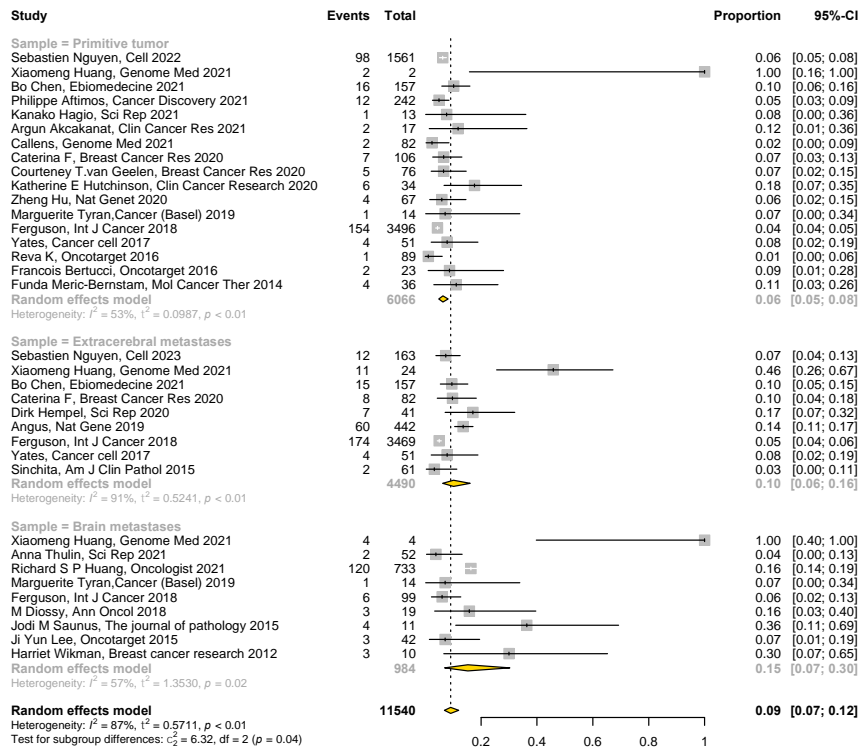
# ERBB2



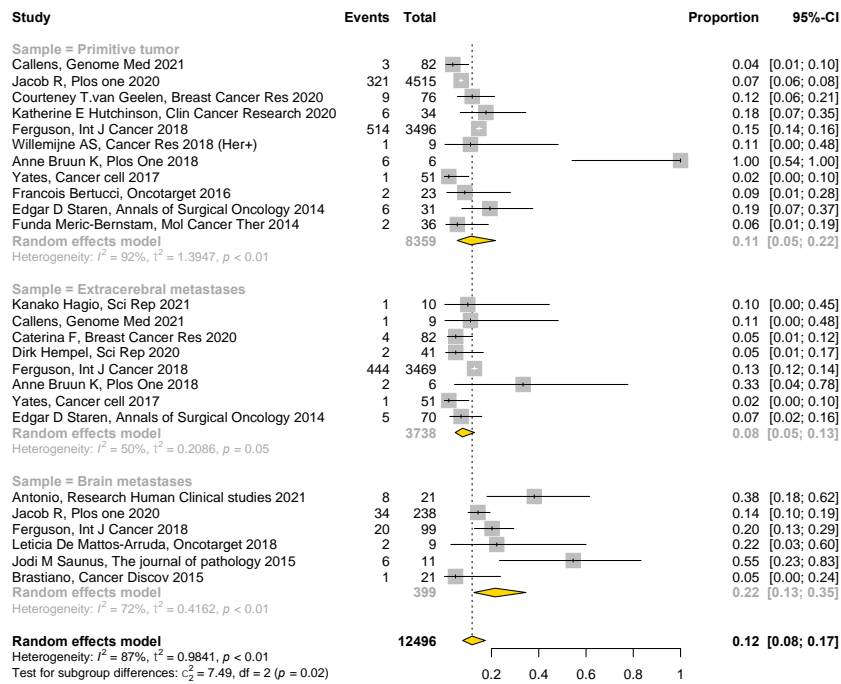
# EGFR



# PTEN



## BRCA2



## NOTCH1

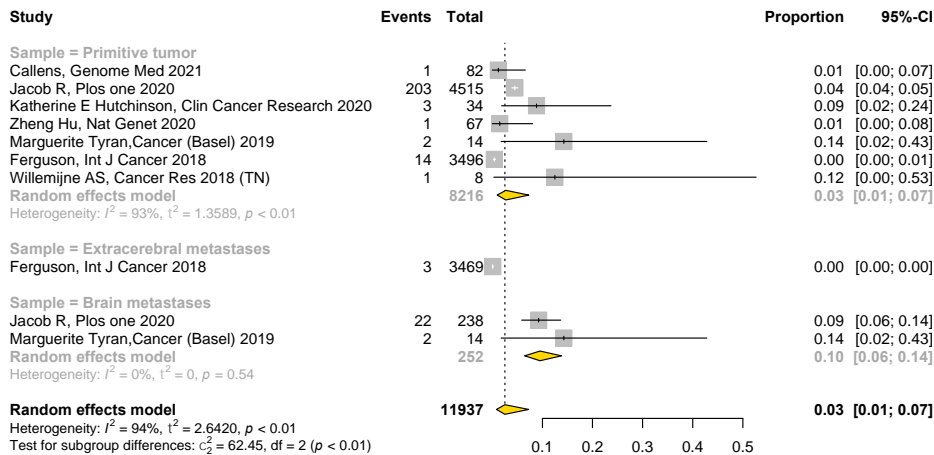


Figure 16. Forest plots of mutation prevalence for 6 genes: *ESR1*, *ERBB2*, *EGFR*, *PTEN*, *BRCA2* and *NOTCH1*

Nous avons ensuite analysé des échantillons tumoraux appariés entre la tumeur primaire, les métastases extra-cérébrales et les métastases cérébrales : la plupart des différences observées n'ont pas atteint la signification statistique en raison du petit nombre d'échantillons (Tableau 15). Lorsque nous avons considéré les gènes les plus fréquemment mutés tels que *TP53*, *PIK3CA* ou *BRCA2*, la prévalence de la mutation génétique était comparable aux données obtenues à partir de tous les échantillons tumoraux regroupés (Tableaux 13 et 15).

### **L'hétérogénéité de la prévalence des mutations génétiques entre les études était moins marquée pour les échantillons de métastases cérébrales**

Parmi les 53 gènes, il y avait une hétérogénéité significative entre les études, à l'exception de 26 gènes dans les échantillons de métastases cérébrales (Tableau 13).

Pour remédier à cette limite, nous avons effectué plusieurs analyses de sous-groupes. Nous avons d'abord évalué la prévalence des mutations génétiques dans tous les échantillons selon la méthode d'analyse génomique (NGS, NGS ciblé et autres) et les conditions de préservation de la tumeur (congelé vs fixé au formol). Le NGS était la principale méthode utilisée, pour 61,4% des études et 91% de tous les échantillons tumoraux, avec une hétérogénéité significative persistante entre les études. En ce qui concerne la prévalence des mutations, une différence significative entre les méthodes d'analyse génomique n'a été observée que pour 9 gènes, dont 7 gènes présentant une prévalence de mutation plus élevée avec NGS ciblé qu'avec NGS à l'exome entier / génome entier (Tableau 16).

Pour les conditions de préservation de la tumeur, la congélation est généralement considérée comme la condition standard pour les analyses du génome entier<sup>104</sup>. Il représentait 28% des études et seulement 7,1% des échantillons tumoraux, avec moins d'hétérogénéité entre les études. De plus, la prévalence des mutations était significativement plus élevée pour 16 gènes lorsque l'état congelé était comparé à l'état fixé au formol (Tableau 17). Étant donné que l'hétérogénéité dans les études génomiques pourrait être liée à l'hétérogénéité tumorale elle-même, nous avons l'intention d'évaluer la prévalence des mutations génétiques en comparant l'échantillonnage multiple à l'échantillonnage unique. Cependant, les données n'étaient disponibles que pour 7% des études, ce qui représente 0,5% du nombre total d'échantillons analysés.

Tableau 15. Paired data comparison of prevalence among gene mutation in primary tumor, extracerebral metastases and brain metastases

Gene	ID studies	Sample (n)	Mutation prevalence % [95%CI] (random effects model)	P value for subgroup differences (random effects model)	Heterogeneity	
					I <sup>2</sup>	P
<b>TP53</b>				0.52		
Primary	5,6,9,13,20,27,32,33,36,37,40,44,46,38	196	45.0 [32.0-59.0]		66%	<0.01
Extracerebral metastases	6,13,20,35,36,37,40,44,48	139	37.0 [19.0-59.0]		80%	<0.01
Brain metastases	5,9,20,27,32,33,46,57	74	55.0 [33.0-76.0]		12%	0.34
<b>PIK3CA</b>				0.17		
Primary	5,6,9,13,20,27,32,33,35,36,37,40,46,48,56	455	23.0 [17.0-30.0]		40%	0.05
Extracerebral metastases	6,13,20,36,37,40,48	310	32.0 [25.0-41.0]		46%	0.08
Brain metastases	5,9,27,32,33,46,56	138	25.0 [18.0-33.0]		0%	0.6
<b>MYC</b>				0.34		
Primary	44	11	9.00 [1.00-44.0]		NA	NA
Extracerebral metastases	44	11	9.00 [1.00-44.0]		NA	NA
Brain metastases	27	14	29.0 [11.0-56.0]		NA	NA
<b>KMT2C</b>				0.2		
Primary	6,13,20,27,32,35,44	41	32.0 [16.0-54.0]		40%	0.17
Extracerebral metastases	6,13,20,35,44	21	57.0 [36.0-76.0]		0%	0.8
Brain metastases	27,32	23	35.0 [18.0-56.0]		0%	0.32
<b>BRCA2</b>				0.06		
Primary	13,36,40	66	6.00 [1.00-33.0]		82%	0.02
Extracerebral metastases	13,36,40	57	8.00 [1.00-46.0]		83%	0.02
Brain metastases	32	9	22.0 [6.00-58.0]		NA	NA
<b>ATRX</b>				0.8		
Primary	35	10	10.0 [1.00-47.0]		NA	NA
Extracerebral metastases	35	10	20.0 [5.00-54.0]		NA	NA
Brain metastases	27,32	23	13.0 [4.00-34.0]		0%	0.83
<b>GATA3</b>				0.89		
Primary	6,13,20,27,37,40,44	268	10.0 [7.00-15.0]		0%	0.91
Extracerebral metastases	6,13,20,37,40,44	254	10.0 [7.00-15.0]		0%	0.8



Brain metastases	27	14	14.0 [2.00-43.0]		NA	NA
<b>NCOR1</b>				0.99		
Primary	40,44	62	83.0 [0.00-100]		0%	1
Extracerebral metastases	40,44	62	84.0 [0.00-100]		0%	1
Brain metastases		0	-		-	-
<b>PTEN</b>				0.87		
Primary	4,6,20,27,40	241	10.0 [7.00-14.0]		0%	0.96
Extracerebral metastases	4,6,20,40,48	310	10.0 [4.00-24.0]		84%	<0.01
Brain metastases	4,5,20,27,33	74	19.0 [2.00-77.0]		0%	0.45
<b>RBI</b>				0.95		
Primary	4,5,6,37,40,46	63	19.0 [3.00-64.0]		40%	0.17
Extracerebral metastases	4	75	12.0 [1.00-69.0]		92%	<0.01
Brain metastases	4,5,27,46	70	18.0 [1.00-77.0]		0%	0.57
<b>ARID1A</b>				0.02		
Primary	6,13,35,40	227	5.00 [3.00-9.00]		0%	0.52
Extracerebral metastases	13,35,40	70	16.0 [9.00-26.0]		0%	0.87
Brain metastases	32	9	11.0 [0.00-48.0]		NA	NA
<b>CDHI</b>				0.68		
Primary	5,20,32,33,35,40,44	151	8.00 [5.00-13.0]		0%	0.47
Extracerebral metastases	6,13,20,35,37,40,44	264	7.00 [4.00-12.0]		0%	0.65
Brain metastases	5,32,33	65	5.00 [1.00-13.0]		0%	0.59
<b>AKT1</b>				0.28		
Primary		126	5.00 [2.00-11.0]		5%	0.35
Extracerebral metastases		51	12.0 [5.00-24.0]		NA	NA
Brain metastases		14	7.00 [1.00-37.0]		NA	NA
<b>RUNX1</b>				0.64		
Primary	20,27,36	20	21.0 [4.00-63.0]		73%	0.05
Extracerebral metastases	20,36,37	6	17.0 [2.00-63.0]		NA	NA
Brain metastases	27	24	8.00 [2.00-28.0]		0%	0.8
<b>BRCA1</b>				0.14		
Primary	20,27,33,40	84	8.00 [2.00-22.0]		58%	0.09
Extracerebral metastases	20,40	51	2.00 [0.00-13.0]		NA	NA
Brain metastases	20,27,32,33	42	14.0 [7.00-28.0]		0%	0.65

<b>ARID1B</b>					0.75		
Primary	35,40,44	72	3.00 [0.00-16.0]			0%	1
Extracerebral metastases	35,40,44	72	6.00 [2.00-20.0]			48%	0.14
Brain metastases	27	14	7.00 [1.00-37.0]			NA	NA
<b>ESR1</b>					<b>0.04</b>		
Primary	9	0	-			-	-
Extracerebral metastases	20,40	51	6.00 [2.00-17.0]			NA	NA
Brain metastases	9,27,57	21	24.0 [10.0-46.0]			48%	0.16
<b>KMT2D</b>					0.7		
Primary	27	14	21.0 [7.00-49.0]			NA	NA
Extracerebral metastases	37,44	11	18.0 [5.00-51.0]			NA	NA
Brain metastases	27,32	33	12.0 [5.00-28.0]			0%	0.95
<b>MAP2K4</b>					0.36		
Primary	6,20,40	51	2.00 [0.00-13.0]			NA	NA
Extracerebral metastases	6,40	51	2.00 [0.00-13.0]			NA	NA
Brain metastases	32	9	11.0 [2.00-50.0]			NA	NA
<b>ERBB2</b>					0.91		
Primary	6,9,32,33	25	8.00 [2.00-27.0]			0%	0.39
Extracerebral metastases	6	0	-			-	-
Brain metastases	9,32,33	28	7.00 [2.00-24.0]			0%	0.58
<b>FAT1</b>					0.62		
Primary	20,27	14	21.0 [7.00-49.0]			NA	NA
Extracerebral metastases	6,20	0	-			-	-
Brain metastases	20,27	14	14.0 [4.00-43.0]			NA	NA
<b>ATM</b>					0.23		
Primary	27,32,46,48	96	6.00 [1.00-24.0]			55%	0.08
Extracerebral metastases	4,37,48	61	2.00 [0.00-11.0]			NA	NA
Brain metastases	27,46	39	10.0 [4.00-24.0]			0%	0.8
<b>NF1</b>					0.26		
Primary	6,35,40	61	3.00 [1.00-12.0]			28%	0.24
Extracerebral metastases	6,35,40	61	8.00 [3.00-18.0]			49%	0.16
Brain metastases		0	-			-	-
<b>ERBB3</b>					0.41		

Primary	37	9	11.0 [2.00-50.0]		NA	NA
Extracerebral metastases	37	9	22.0 [4.00-70.0]		-	-
Brain metastases		0	-		NA	NA
<b>FOXA1</b>				<b>&lt;0.01</b>		
Primary	40,44	62	5.00 [2.00-14.0]		0%	0.48
Extracerebral metastases	40	51	6.00 [2.00-17.0]		NA	NA
Brain metastases	57	7	71.0 [33.0-93.0]		NA	NA
<b>GNAS</b>				<b>0.55</b>		
Primary	13,27,40	74	6.00 [2.00-17.0]		32%	0.23
Extracerebral metastases	35,40	61	6.00 [1.00-27.0]		74%	0.05
Brain metastases	27	14	14.0 [4.00-43.0]		NA	NA
<b>ARID2</b>				<b>0.41</b>		
Primary	35,40	61	3.00 [1.00-12.0]		28%	0.24
Extracerebral metastases	35,40	61	7.00 [2.00-16.0]		65%	0.09
Brain metastases		0	-		-	-
<b>ASXL1</b>				<b>0.41</b>		
Primary	35	10	10.0 [1.00-47.0]		NA	NA
Extracerebral metastases	33,37	10	30.0 [10.0-62.0]		NA	NA
Brain metastases		10	10.0 [1.00-47.0]		NA	NA
<b>KRAS</b>				<b>0.33</b>		
Primary	48	61	2.00 [0.00-11.0]		NA	NA
Extracerebral metastases	48	61	5.00 [2.00-14.0]		NA	NA
Brain metastases		0	-		-	-
<b>MLH1</b>				<b>0.04</b>		
Primary	40,46	66	3.00 [1.00-11.0]		NA	NA
Extracerebral metastases	40	51	2.00 [0.00-13.0]		NA	NA
Brain metastases	32,46	24	17.0 [6.00-37.0]		NA	NA
<b>FGFR4</b>				<b>0.3</b>		
Primary	27	14	7.00 [1.00-37.0]		NA	NA
Extracerebral metastases		0	-		-	-
Brain metastases	27	14	21.0 [7.00-49.0]		NA	NA

Bold: Gene's name and significant *P* value at the threshold of 5% for subgroup differences

Tableau 16. Comparison of prevalence among gene mutation according to the genomic analysis method (whole sample)

Gene	ID studies	Sample (n)	Mutation prevalence % [95%CI] (random effects model)	P value for subgroup differences (random effects model)	Heterogeneity	
					I <sup>2</sup>	P
<b>TP53</b>				0.27		
NGS	1,6,7,11,12,14,15,20,21,23,28,29,33,34,35,36,37,40,44,45,47,47,48,52,57	16123	46.0 [40.0-53.0]		94%	<0.01
Targeted NGS	3,5,8,13,16,17,19,27,30,31,32,42,43,51	1405	53.0 [42.0-64.0]		83%	<0.01
Other	9,41,54	173	34.0 [18.0-55.0]		86%	<0.01
<b>PIK3CA</b>				0.31		
NGS	1,6,7,11,12,14,15,20,21,23,24,28,29,33,35,36,37,38,40,45,46,47,48,56	16719	27.0 [24.0-31.0]		84%	<0.01
Targeted NGS	3,5,8,10,13,16,17,19,27,30,32,42,43,51	486	30.0 [26.0-34.0]		0%	0.52
Other	9,41	254	33.0 [25.0-42.0]		58%	0.07
<b>CCND1</b>				0.34		
NGS	11,15,22,23,28,45	1415	10.0 [3.00-31.0]		90%	<0.01
Targeted NGS	16,19,27,30,51	169	18.0 [13.0-25.0]		0%	0.44
Other		0	NA		NA	NA
<b>MYC</b>				0.6		
NGS	11,12,15,23,28,34,39,44,45	1468	16.0 [7.00-31.0]		86%	<0.01
Targeted NGS	8,19,27,	71	20.0 [12.0-31.0]		0%	0.7
Other		0	NA		NA	NA
<b>FGF19</b>				0.07		
NGS	15,22	188	20.0 [15.0-26.0]		0%	0.67
Targeted NGS	19	34	6.00 [1.00-20.0]		NA	NA
Other		0	NA		NA	NA
<b>FGF3</b>				0.32		
NGS	15,22,23	229	13.0 [6.00-25.0]		54%	0.11
Targeted NGS	19	34	6.00 [1.00-20.0]		NA	NA
Other		0	NA		NA	NA
<b>KMT2C</b>				0.05		

NGS	1,6,20,21,28,35,44	2669	12.0 [5.00-24.0]		93%	<0.01
Targeted NGS	13,17,27,32	63	28.0 [18.0-42.0]		1%	0.41
Other		0	NA		NA	NA
<b>BRCA2</b>				0.47		
NGS	8,12,13,14,15,19,23,29,36,40,45,47,50	12208	12.0 [8.00-18.0]		92%	<0.01
Targeted NGS	16,19,30,32,42,51	288	9.00 [6.00-14.0]		0%	0.45
Other		0	NA		NA	NA
<b>ATRX</b>				0.8		
NGS	35	20	15.0 [5.00-38.0]		0%	0.54
Targeted NGS	27,30,32	32	13.0 [5.00-29.0]		0%	0.96
Other		0	NA			
<b>GATA3</b>				0.5		
NGS	1,6,7,11,12,14, 20,21,27,28,37,38,40,44	8367	11.0 [9.00-13.0]		76%%	<0.01
Targeted NGS	10,13,16,17,27,42	246	12.0 [9.00-17.0]		0%	0.58
Other		0	NA			
<b>FGFR1</b>				0.04		
NGS	14,15,23,29	8451	3.00 [1.00-14.0]		97%	<0.01
Targeted NGS	16,19,	110	17.0 [9.00-29.0]		57%	0.13
Other		0	NA		NA	NA
<b>GRIN2A</b>				0.72		
NGS	14,57	4757	7.00 [2.00-27.0]		92%	<0.01
Targeted NGS	30	9	11.0 [0.00-48.0]		NA	NA
Other		0	NA		NA	NA
<b>NCOR1</b>				0.13		
NGS	1,14,40,44	6601	18.0 [2.00-72.0]		85%	<0.01
Targeted NGS	13	82	2.00 [0.00-9.00]		NA	NA
Other		0	NA		NA	NA
<b>CDKN2A</b>				0.47		
NGS	11,26,28,45	1207	11.0 [8.00-14.0]		48%	0.12
Targeted NGS	10,19,51	87	8.00 [4.00-16.0]		0%	0.73
Other		0	NA		NA	NA
<b>TSC2</b>				0.21		

NGS	40,47	72	3.00 [1.00-10.0]		0%	0.52
Targeted NGS	19,30,42	65	8.00 [3.00-17.0]		0%	0.8
Other		0	NA		NA	NA
<b><i>PTEN</i></b>				0.44		
NGS	1,4,6,7,11,15,21,23,28,29,33,40,45,46,48	11080	10.0 [7.00-14.0]		91%	<0.01
Targeted NGS	5,8,10,13,16,19,27,42,51	361	6.00 [0.00-47.0]		89%	<0.01
Other	41,53	99	7.00 [5.00-11.0]		2%	0.42
<b><i>RB1</i></b>				0.78		
NGS	1,4,5,7,11,21,29,34,37,40,46,50,52	10285	8.00 [4.00-16.0]		95%	<0.01
Targeted NGS	8,16,19,27,30,	258	7.00 [4.00-12.0]		26%	0.21
Other		0	NA		NA	NA
<b><i>ARID1A</i></b>				0.78		
NGS	1,3,6,7,11,13,15,21,23,28,35,40,47	3631	7.00 [5.00-9.00]		75%	<0.01
Targeted NGS	8,10,16,31,32,51	1170	6.00 [4.00-10.0]		53%	0.03
Other		0	NA		NA	NA
<b><i>MDM2</i></b>				0.59		
NGS	15,23,34,45,52	227	7.00 [4.00-11.0]		41%	0.15
Targeted NGS	30,51	45	9.00 [3.00-21.0]		0%	0.79
Other		0	NA		NA	NA
<b><i>MAP3K1</i></b>				0.55		
NGS	1,6,14,40	6942	6.00 [6.00-7.00]		0%	0.58
Targeted NGS	13,42	105	8.00 [4.00-15.0]		0%	0.83
Other		0	NA		NA	NA
<b><i>CDH1</i></b>				0.31		
NGS	1,5,6,7,14,20,21,23,25,28,29,33,35,37,38,40,43,44	14444	6.00 [3.00-10.0]		97%	<0.01
Targeted NGS	13,16,17,19,32,42,51	391	8.00 [6.00-12.0]		0%	0.57
Other		0	NA		NA	NA
<b><i>AKT1</i></b>				0.48		
NGS	1,6,7,15,20,23,28,29,40,45,48,50	10254	7.00 [5.00-8.00]		83%	<0.01
Targeted NGS	8,13,27,42,51	192	7.00 [3.00-17.0]		60%	<0.01
Other	9,41	153	17.0 [4.00-54.0]		89%	<0.01
<b><i>CDKN2B</i></b>				0.8		
NGS	11,26	754	6.00 [5.00-8.00]		0%	0.57

Targeted NGS	19,51	70	6.00 [2.00-14.0]		0%	0.95
Other		0	NA		NA	NA
<b>RUNX1</b>				0.49		
NGS	1,7,20,28,36,37	2509	4.00 [2.00-11.0]		86%	<0.01
Targeted NGS	27,30,51	72	7.00 [3.00-16.0]		0%	0.93
Other		0	NA		NA	NA
<b>BRCA1</b>				0.61		
NGS	7,11,14,15,29,33,40,45,52	13046	7.00 [5.00-9.00]		80%	<0.01
Targeted NGS	8,13,19,27,32	176	8.00 [4.00-16.0]		32%	0.18
Other		0	NA		NA	NA
<b>ARID1B</b>				0.1		
NGS	21,34,35,40,44	221	4.00 [2.00-9.00]		0%	0.54
Targeted NGS	27,30,	22	14.0 [4.00-35.0]		19%	0.27
Other		0	NA		NA	NA
<b>MSH6</b>				0.2		
NGS	42,51	112	3.00 [1.00-8.00]		0%	0.4
Targeted NGS	34,40	59	9.00 [2.00-33.0]		75%%	0.04
Other		0	NA		NA	NA
<b>ESR1</b>				<0.01		
NGS	1,7,9,14,15,20,21,22,23,39,50,57	7959	8.00 [5.00-14.0]		94%	<0.01
Targeted NGS	8,16,17,27,31,	1042	8.00 [3.00-19.0]		85%	<0.01
Other		64	43.0 [23.0-66.0]		84%	0.01
<b>KDM6A</b>				0.81		
NGS	14,18,34,35	4785	6.00 [2.00-16.0]		72%	<0.01
Targeted NGS	30	45	4.00 [1.00-16.0]		1%	0.31
Other		0	NA		NA	NA
<b>APC</b>				0.43		
NGS	4,21,29,35,43,46,48	7363	10.0 [4.00-24.0]		83%	<0.01
Targeted NGS	31	956	2.00 [0.00-20.0]		89%	<0.01
Other		0	NA		NA	NA
<b>KMT2D</b>				0.44		
NGS	14,21,37,44	4840	10.0 [9.00-10.0]		2%	0.39
Targeted NGS	27,31,32	955	5.00 [1.00-24.0]		91%	<0.01

Other		0	NA		NA	NA
<b>MAP2K4</b>				<b>0.01</b>		
NGS	6,7,20,28,40	1180	4.00 [3.00-7.00]		66%	<0.01
Targeted NGS	8,16,32	95	12.0 [7.00-20.0]		0%	0.98
Other		0	NA		NA	NA
<b>ERBB2</b>				<b>0.15</b>		
NGS	1,6,7,11,12,15,21,23,26,28,29,33,34,39,45,47	10858	7.00 [4.00-11.0]		96%	<0.01
Targeted NGS	8,13,16,19,30,31,32,	1143	6.00 [3.00-12.0]		82%	<0.01
Other	9,41	153	2.00 [1.00-6.00]		0%	0.7
<b>FAT1</b>				<b>0.88</b>		
NGS	6,18,21,28	668	6.00 [4.00-10.0]		57%	0.07
Targeted NGS	27,31,42	969	7.00 [2.00-19.0]		88%	<0.01
Other		0	NA		NA	NA
<b>ATM</b>				<b>0.02</b>		
NGS	4,15,29,37,46,48	7449	3.00 [3.00-4.00]		56%	0.01
Targeted NGS	8,30,32,51	133	8.00 [4.00-16.0]		22%	0.26
Other		0	NA		NA	NA
<b>NRAS</b>				<b>0.37</b>		
NGS	29,45,56	3603	4.00 [1.00-21.0]		93%	<0.01
Targeted NGS		0	NA		NA	NA
Other	41	89	1.00 [0.00-6.00]		NA	NA
<b>NFI</b>				<b>0.09</b>		
NGS	1,6,7,11,15,21,23,28,35,40,47,52	3908	5.00 [3.00-9.00]		84%	<0.01
Targeted NGS	13,31,42,51	1059	3.00 [2.00-5.00]		61%	0.05
Other		0	NA		NA	NA
<b>ERBB3</b>				<b>NA</b>		
NGS	7,21,26,37,45	359	7.00 [3.00-17.0]		73%	<0.01
Targeted NGS		0	NA		NA	NA
Other		0	NA		NA	NA
<b>JAK1</b>				<b>NA</b>		
NGS	6,14,34	5144	3.00 [2.00-5.00]		78%	<0.01
Targeted NGS	30	0	NA		NA	NA
Other		0	NA		NA	NA



<b>NOTCH1</b>				0.05		
NGS	14,21,29	11785	1.00 [0.00-5.00]		97%	<0.01
Targeted NGS	13,19,27,30	152	7.00 [3.00-16.0]		25%	0.26
Other		0	NA		NA	NA
<b>IGFR1</b>				0.15		
NGS	14,15	4941	3.00 [2.00-6.00]		84%	<0.01
Targeted NGS	51	36	8.00 [2.00-22.0]		NA	NA
Other		0	NA		NA	NA
<b>MTOR</b>				<b>0.03</b>		
NGS	14,47	4774	4.00 [2.00-7.00]		78%	0.01
Targeted NGS	27,42	51	12.0 [5.00-24.0]		0%	0.83
Other		0	NA		NA	NA
<b>FOXA1</b>				NA		
NGS	1,29,39,40,44,57	2306	9.00 [3.00-22.0]		93%	<0.01
Targeted NGS		0	NA		NA	NA
Other		0	NA		NA	NA
<b>PIK3R1</b>				0.23		
NGS		6953	4.00 [2.00-8.00]		86%	<0.01
Targeted NGS	1,6,7,13,14,15,26,40,45	82	1.00 [0.00-7.00]		NA	NA
Other		0	NA		NA	NA
<b>GNAS</b>				<b>&lt;0.01</b>		
NGS	11,14,18,21,29,35,40	12632	2.00 [1.00-5.00]		94%	<0.01
Targeted NGS	10,27	45	11.0 [5.00-24.0]		0%	0.7
Other		0	NA		NA	NA
<b>ARID2</b>				0.36		
NGS	14,21,35,40	4942	3.00 [2.00-6.00]		70%	<0.01
Targeted NGS	30,31	927	1.00 [0.00-14.0]		90%	<0.01
Other		0	NA		NA	NA
<b>ASXL1</b>				1		
NGS	12,14,34,35,37	4813	8.00 [3.00-17.0]		88%	<0.01
Targeted NGS	8	1	100.0 [3.00-100.0]		NA	NA
Other		0	NA		NA	NA
<b>KRAS</b>				<b>0.02</b>		

NGS	7,14,15,23,29,46,48	7732	2.00 [1.00-3.00]		54%	0.03
Targeted NGS	19,51	70	6.00 [2.00-14.0]		6%	0.3
Other		0	NA		NA	NA
<b>EGFR</b>				0.47		
NGS	5,21,29,39,46,47	7156	2.00 [1.00-7.00]		92%	<0.01
Targeted NGS	10,13,16,51	305	3.00 [2.00-6.00]		0%	0.79
Other		0	NA		NA	NA
<b>MLH1</b>				0.14		
NGS	29,40,46	7127	2.00 [1.00-6.00]		93%	<0.01
Targeted NGS	32	9	11.0 [0.00-48.0]		NA	NA
Other		0			NA	NA
<b>BRAF</b>				<0.01		
NGS	29,38,40,45,48	7161	1.00 [0.00-3.00]		80%	<0.01
Targeted NGS	16,19,32	119	7.00 [3.00-13.0]		36%	0.21
Other		0	NA		NA	NA
<b>FGFR2</b>				0.18		
NGS	29,52	7000	2.00 [0.00-12.0]		96%	<0.01
Targeted NGS	32	9	11.0 [0.00-48.0]		NA	NA
Other		0	NA		NA	NA
<b>FGFR4</b>				0.02		
NGS	26,39	41	37.0 [23.0-52.0]		15%	0.28
Targeted NGS	27,31	946	3.00 [0.00-24.0]		92%	<0.01
Other		0	NA		NA	NA

Bold: Gene's name and significant *P* value at the threshold of 5% for subgroup differences

Tableau 17. Comparison of prevalence among gene mutation according to the conservation method (whole sample)

Gene	ID studies	Sample (n)	Mutation prevalence % [95%CI] (random effects model)	P value for subgroup differences (random effects model)	Heterogeneity	
					I <sup>2</sup>	P
<b>TP53</b>				0.19		
FFPE	3,5,6,7,9,12,14,15,16,17,19,20,21,23,29,30,31,32,33,41,43,44,47,48,51,54	14550	49.0 [44.0-55.0]		93%	<0.01
Fresh frozen	13,27,28,34,35,42,52	618	42.0 [33.0-52.0]		53%	0.03
<b>PIK3CA</b>				0.27		
FFPE	3,5,6,7,9,10,12,14,15,16,17,19,20,21,23,29,30,32,33,38,41,43,46,47,48,51,56	13727	27.0 [24.0-30.0]		57%	<0.01
Fresh frozen	13,24,27,28,35,42,	1211	32.0 [24.0-42.0]		91%	<0.01
<b>CCND1</b>				<b>0.02</b>		
FFPE	15,16,19,22,30,51	354	20.0 [16.0-25.0]		0%	0.65
Fresh frozen	27,28	456	27.0 [23.0-31.0]		13%	0.28
<b>MYC</b>				<b>&lt;0.01</b>		
FFPE	12,15,19,39,44,45	332	23.0 [19.0-28.0]		27%	0.21
Fresh frozen	27,28,34	466	35.0 [31.0-40.0]		0%	0.51
<b>FGF19</b>				NA		
FFPE	15,19,22	222	18.0 [13.0-23.0]		43%	0.17
Fresh frozen		0	NA		NA	NA
<b>FGF3</b>				NA		
FFPE	15,19,22	222	16.0 [12.0-21.0]		25%	0.26
Fresh frozen		0	NA		NA	NA
<b>KMT2C</b>				0.13		
FFPE	1,6,13,17,20,21,32,44	509	15.0 [8.00-26.0]		76%	<0.01
Fresh frozen	27,28,35	499	28.0 [16.0-45.0]		80%	<0.01
<b>BRCA2</b>				<b>0.04</b>		
FFPE	12,14,15,16,19,29,30,32,36,47,51	12230	14.0 [8.00-22.0]		90%	<0.01

Fresh frozen	13,42,		114	5.00 [2.00-11.0]			0%	0.48
<b>ATRX</b>					-			
FFPE	30,32	-	-				-	-
Fresh frozen	27,35	-	-				-	-
<b>GATA3</b>					<b>0.03</b>			
FFPE	6,7,10,12,14,16,17,20,21,38,44		5735	9.00 [9.00-10.0]			31%	0.1
Fresh frozen	13,27,28,42		584	15.0 [10.0-21.0]			14%	0.32
<b>FGFR1</b>					NA			
FFPE	14,15,16,19,23,29		8556	5.00 [1.00-15.0]			97%	<0.01
Fresh frozen			0	NA			NA	NA
<b>GRIN2A</b>					NA			
FFPE	14,30		4762	4.00 [2.00-8.00]			85%	<0.01
Fresh frozen			0	NA			NA	NA
<b>NCOR1</b>					0.09			
FFPE	14,44		4877	37.0 [2.00-94.0]			0%	1
Fresh frozen	13		82	2.00 [1.00-9.00]			NA	NA
<b>CDKN2A</b>					0.5			
FFPE	10,19,26,51		119	10.0 [6.00-17.0]			0%	0.63
Fresh frozen	28		453	12.0 [10.0-16.0]			0%	0.74
<b>TSC2</b>					0.4			
FFPE	19,30,40,42,47		114	4.00 [2.00-10.0]			0%	0.61
Fresh frozen			23	9.00 [1.00-28.0]			NA	NA
<b>PTEN</b>					0.11			
FFPE	4,5,6,7,10,15,16,19,21,29,33,41,42,46,48,51,53		8416	7.00 [5.00-9.00]			63%	<0.01
Fresh frozen	4,13,27,28,		613	17.0 [6.00-39.0]			73%	<0.01
<b>RBI</b>					<b>0.04</b>			
FFPE	4,5,7,16,19,21,29,30,46		7617	5.00 [2.00-10.0]			87%	<0.01
Fresh frozen	4,27,34,52		519	19.0 [6.00-43.0]			79%	<0.01
<b>ARID1A</b>					0.45			
FFPE	3,6,7,10,15,16,21,28,31,32,47,51		1737	7.00 [5.00-10.0]			71%	<0.01
Fresh frozen	13,35,		553	8.00 [6.00-11.0]			22%	0.28
<b>MDM2</b>					1			
FFPE	15,30,51		162	8.00 [4.00-18.0]			52%	0.1

Fresh frozen	34,52	24	8.00 [2.00-28.0]		0%	0.8
<b>MAP3K1</b>				0.48		
FFPE	6,14	5118	6.00 [5.00-7.00]		0%	0.68
Fresh frozen	13,42	105	8.00 [4.00-15.0]		0%	0.83
<b>CDHI</b>				<0.01		
FFPE	5,6,7,14,16,17,19,20,21,23,29,32,33,38,43,44,51	12486	6.00 [4.00-8.00]		93%	<0.01
Fresh frozen	13,25,28,35,42	584	11.0 [9.00-14.0]		0%	0.93
<b>AKT1</b>				0.75		
FFPE	6,7,9,15,20,23,28,29,41,48,51	8135	7.00 [5.00-12.0]		91%	<0.01
Fresh frozen	13,27,28,42	586	7.00 [5.00-9.00]		4%	0.39
<b>CDKN2B</b>				NA		
FFPE	19,26,51	91	7.00 [3.00-14.0]		0%	0.83
Fresh frozen		0	NA		NA	NA
<b>RUNX1</b>				0.03		
FFPE	7,20,30,36,37,51	387	7.00 [3.00-19.0]		64%	<0.01
Fresh frozen	27,28	470	2.00 [1.00-4.00]		44%	0.17
<b>BRCA1</b>				0.6		
FFPE	7,14,15,19,29,32,33	12342	7.00 [5.00-9.00]		70%	<0.01
Fresh frozen	13,27,52	124	9.00 [3.00-23.0]		63%	0.04
<b>ARID1B</b>				0.1		
FFPE	21,30,44	199	4.00 [1.00-10.0]		26%	0.24
Fresh frozen	27,34,35	44	11.0 [5.00-25.0]		0%	0.81
<b>MSH6</b>				<0.01		
FFPE	51	138	2.00 [1.00-7.00]		0%	0.96
Fresh frozen	34,42	44	16.0 [8.00-30.0]		0%	0.56
<b>ESR1</b>				0.5		
FFPE	7,9,14,15,16,17,20,21,22,31,39	6453	9.00 [4.00-16.0]		95%	<0.01
Fresh frozen	27	14	14.0 [2.00-43.0]		NA	NA
<b>KDM6A</b>				0.01		
FFPE	14,18,30	4800	4.00 [3.00-5.00]		55%	0.06
Fresh frozen	34,35	30	13.0 [5.00-31.0]		0%	1
<b>APC</b>				<0.01		
FFPE	4,21,29,31,43,46,48	8271	4.00 [2.00-9.00]		68%	<0.01

Fresh frozen	4,35	48	39.0 [11.0-77.0]		32%	0.22
<b>KMT2D</b>				0.05		
FFPE	14,21,31,32,37,44	5768	5.00 [2.00-13.0]		87%	<0.01
Fresh frozen	27	28	18.0 [8.00-36.0]		0%	0.62
<b>MAP2K4</b>				<0.01		
FFPE	6,7,16,20,32	823	4.00 [3.00-7.00]		45%	0.07
Fresh frozen	28	442	10.0 [8.00-13.0]		NA	NA
<b>ERBB2</b>				0.81		
FFPE	6,7,9,12,15,16,19,21,26,29,30,31,32,33,39,41,47	9148	7.00 [4.00-11.0]		91%	<0.01
Fresh frozen	13,28,34	534	8.00 [2.00-25.0]		80%	<0.01
<b>FAT1</b>				<0.01		
FFPE	6,18,21,31	1144	2.00 [1.00-5.00]		72%	0.01
Fresh frozen	27,28,42	493	8.00 [6.00-11.0]		28%	0.25
<b>ATM</b>				<0.01		
FFPE	4,15,29,30,32,46,48,51	7517	3.00 [3.00-4.00]		45%	0.04
Fresh frozen	4	63	19.0 [11.0-31.0]		0%	0.48
<b>NRAS</b>				NA		
FFPE	29,41,45,56	3692	3.00 [1.00-14.0]		91%	<0.01
Fresh frozen		0	NA		NA	NA
<b>NF1</b>				<0.01		
FFPE	6,7,15,21,23,31,47,51,52	1888	5.00 [3.00-7.00]		63%	<0.01
Fresh frozen	13,28,35,42	581	11.0 [9.00-14.0]		0%	0.63
<b>ERBB3</b>				NA		
FFPE	7,21,26	359	7.00 [3.00-17.0]		73%	<0.01
Fresh frozen		0	NA		NA	NA
<b>JAK1</b>				0.28		
FFPE	6,14,30	5143	3.00 [2.00-6.00]		84%	<0.01
Fresh frozen	34	10	10.0 [0.00-45.0]		NA	NA
<b>NOTCH1</b>				0.25		
FFPE	14,19,21,29,30	11827	2.00 [0.00-7.00]		96%	<0.01
Fresh frozen	13,27	110	6.00 [1.00-20.0]		61%	0.07
<b>IGFRI</b>				NA		
FFPE	14,15,51	4977	4.00 [2.00-7.00]		83%	<0.01

Fresh frozen		0	NA		NA	NA
<b>MTOR</b>				<b>0.03</b>		
FFPE	14,47	4774	4.00 [2.00-7.00]		78%	0.01
Fresh frozen	27,42	51	12.0 [5.00-24.0]		0%	0.83
<b>FOXAI</b>				0.44		
FFPE	29,39,44	133	8.00 [4.00-18.0]		59%	0.06
Fresh frozen	28	442	12.0 [9.00-15.0]		NA	NA
<b>PIK3R1</b>				0.16		
FFPE	6,7,14,15,26	5392	5.00 [3.00-8.00]		73%	<0.01
Fresh frozen	13	82	1.00 [0.00-7.00]		NA	NA
<b>GNAS</b>				<0.01		
FFPE	10,14,18,21,29	11906	2.00 [1.00-5.00]		94%	<0.01
Fresh frozen	27,35	38	16.0 [7.00-31.0]		0%	0.91
<b>ARID2</b>				<0.01		
FFPE	14,21,30,31	5849	2.00 [1.00-5.00]		73%	<0.01
Fresh frozen	35	20	15.0 [5.00-38.0]		0%	0.54
<b>ASXL1</b>				0.11		
FFPE	12,14,34,37	4783	6.00 [2.00-15.0]		90%	<0.01
Fresh frozen	35	30	17.0 [7.00-34.0]		0%	0.41
<b>KRAS</b>				NA		
FFPE	7,14,15,19,23,29,46,48,51	7761	2.00 [1.00-3.00]		62%	<0.01
Fresh frozen		0	NA		NA	NA
<b>EGFR</b>				0.52		
FFPE	5,10,16,21,29,39,46,47,51	7338	2.00 [1.00-6.00]		89%	<0.01
Fresh frozen	13	82	1.00 [0.00-7.00]		NA	NA
<b>MLH1</b>				NA		
FFPE	29,32,46	7136	2.00 [1.00-7.00]		92%	<0.01
Fresh frozen		0	NA		NA	NA
<b>BRAF</b>				<0.01		
FFPE	16,19,29,32,38,48	7268	2.00 [1.00-5.00]		87%	<0.01
Fresh frozen	52	11	27.0 [9.00-59.0]		NA	NA
<b>FGFR2</b>				0.36		
FFPE	29,32	7031	2.00 [0.00-11.0]		95%	<0.01

Fresh frozen	52	14	7.00 [1.00-37.0]		NA	NA
<b><i>FGFR4</i></b>				-		
FFPE		-	-		-	-
Fresh frozen		-	-		-	-

---

Bold: Gene's name and significant *P* value at the threshold of 5% for subgroup differences



### **Altérations du nombre de copies et perte d'hétérozygotie dans les métastases cérébrales du cancer du sein.**

Pour l'amplification génique, des données ont été obtenues pour 11950 patients et 9286 échantillons. Lorsque nous avons analysé et comparé la prévalence entre la tumeur primaire, les métastases extra-cérébrales et les métastases cérébrales, la plupart des différences observées n'ont pas atteint la signification statistique en raison du petit nombre d'échantillons, en particulier pour les métastases extra-cérébrales et cérébrales. Fait intéressant, pour *PTEN*, la prévalence de la mutation est passée de 11 % à 0 % (Tableau 18).

Pour la perte d'hétérozygotie et d'autres altérations du nombre de copies, seules 7 études portant sur 628 patients et 614 échantillons ont fourni des données. En raison du petit nombre d'échantillons analysés pour chaque gène et chaque site tumoral, nous n'avons pas été en mesure d'effectuer des comparaisons statistiques fiables (Tableau 19). Fait intéressant, dans les 3 loci 9p21.3, 10q23.31 et 17q11.2, la prévalence de LOH a augmenté entre les métastases extra-cérébrales et les métastases cérébrales. Par exemple, pour le locus 10q23.31, comprenant *PTEN*, la prévalence des métastases cérébrales était de 75%, mais dans seulement 10 échantillons de cerveau (Figure 15C).

Tableau 18. Comparison of prevalence among gene amplification in primary tumor, extracerebral metastases and brain metastases in breast cancers.

Gene	ID studies	Sample (n)	Amplification frequency % [95%CI] (random effects as appropriate)	P value for subgroup differences	Heterogeneity	
					I <sup>2</sup>	P
<b>TP53</b>				NA		
Primary	51	36	36.0 [21.0-54.0]		NA	NA
Extracerebral metastases		0	NA		NA	NA
Brain metastases		0	NA		NA	NA
<b>PIK3CA</b>				0.26		
Primary	7,19,51	312	7.00 [1.00-31.0]		94%	<0.01
Extracerebral metastases	52	14	7.00 [0.00-34.0]		NA	NA
Brain metastases	2,11	872	2.00 [2.00-4.00]		0%	0.69
<b>CCND1</b>				0.7		
Primary	1,7,10,11,14,16,19,23,27,40,51	3992	18.0 [17.0-19.0]		36%	0.12
Extracerebral metastases	40	51	16.0 [7.00-29.0]		NA	NA
Brain metastases	2,11,27	886	11.0 [3.00-34.0]		88%	<0.01
<b>CCNE1</b>				0.12		
Primary	1,4,7,10,11,14,16,19,27,29,30,40,47,51	3547	10.0 [1.00-54.0]		92%	<0.01
Extracerebral metastases	40	75	73.0 [28.0-95.0]		91%	<0.01
Brain metastases	2,11,27	18	28.0 [12.0-52.0]		0%	1
<b>MYC</b>				0.68		
Primary	1,4,7,11,14,19,30,40,47,51	3925	21.0 [14.0-32.0]		96%	<0.01
Extracerebral metastases	4,40,52	89	39.0 [5.00-89.0]		91%	<0.01
Brain metastases	2,4,11,27	890	32.0 [9.00-68.0]		79%	<0.01
<b>BRCA2</b>				NA		
Primary	51	36	6.00 [0.00-19.0]		NA	NA
Extracerebral metastases		0	NA		NA	NA
Brain metastases		0	NA		NA	NA

<b><i>GATA3</i></b>				0.99		
Primary	1,10	1578	2.00 [0.00-29.0]		97%	<0.01
Extracerebral metastases		0	NA		NA	NA
Brain metastases	2,47	190	2.00 [1.00-5.00]		0%	0.93
<b><i>CDKN2A</i></b>				NA		
Primary		0	NA		NA	NA
Extracerebral metastases		0	NA		NA	NA
Brain metastases	2,49	150	2.00 [1.00-6.00]		57%	0.13
<b><i>PTEN</i></b>				<0.01		
Primary	51	36	11.0 [3.00-26.0]		NA	NA
Extracerebral metastases		0	NA		NA	NA
Brain metastases	2,11	872	0.00 [0.00-1.00]		0%	0.62
<b><i>RBI</i></b>				NA		
Primary		0	NA		NA	NA
Extracerebral metastases		0	NA		NA	NA
Brain metastases	49	11	9.00 [0.00-41.0]		NA	NA
<b><i>MAP2K2</i></b>				1		
Primary	4	2	100.0 [16.0-100.0]		NA	NA
Extracerebral metastases	4	24	92.0 [73.0-99.0]		NA	NA
Brain metastases	4	4	100.0 [40.0-100.0]		NA	NA
<b><i>MCL1</i></b>				<0.01		
Primary	1,4,14,51	3549	15.0 [1.00-69.0]		96%	<0.01
Extracerebral metastases	4	24	96.0 [79.0-100.0]		NA	NA
Brain metastases	2,4,11	876	5.00 [4.00-7.00]		0%	0.38
<b><i>MDM2</i></b>				0.57		
Primary	1,10,11,14	3539	2.00 [1.00-7.00]		89%	<0.01
Extracerebral metastases	23	41	5.00 [1.00-17.0]		NA	NA
Brain metastases	2	139	2.00 [0.00-6.00]		NA	NA
<b><i>MDM4</i></b>				0.66		

Primary	1,7,14	3753	2.00 [0.00-12.0]		94%	<0.01
Extracerebral metastases		0	NA		NA	NA
Brain metastases	2	139	3.00 [1.00-7.00]		NA	NA
<b>AKT1</b>				0.46		
Primary	51	53	4.00 [1.00-14.0]		0%	0.59
Extracerebral metastases		0	NA		NA	NA
Brain metastases	49	11	9.00 [0.00-41.0]		NA	NA
<b>AKT2</b>				1		
Extracerebral metastases	4	24	92.0 [73.0-99.0]		NA	NA
Brain metastases	4	4	100.0 [40.0-100.0]		NA	NA
Primary	4	2	100.0 [16.0-100.0]		NA	NA
<b>AURKA</b>				<0.01		
Primary	1,14	1961	9.00 [7.00-10.0]		0%	0.95
Extracerebral metastases	4	24	79.0 [58.0-93.0]		NA	NA
Brain metastases		0	NA		NA	NA
<b>CDKN2B</b>				NA		
Primary		0	NA		NA	NA
Extracerebral metastases		0	NA		NA	NA
Brain metastases	49	11	18.0 [2.00-52.0]		NA	NA
<b>RUNX1</b>				NA		
Primary	51	36	6.00 [0.00-19.0]		NA	NA
Extracerebral metastases		0	NA		NA	NA
Brain metastases		0	NA		NA	NA
<b>MSH6</b>				0.95		
Primary	51	36	3.00 [0.00-14.5]		NA	NA
Extracerebral metastases		0	NA		NA	NA
Brain metastases	49	11	9.00 [0.00-41.0]		NA	NA
<b>ESR1</b>				<0.01		
Primary	4,10	19	11.0 [3.00-4.00]		60%	0.11

Extracerebral metastases	4	24	75.0 [53.0-90.0]		NA	NA
Brain metastases	4,11	737	2.00 [1.00-3.00]		0%	1
<b><i>ERBB2</i></b>				0.42		
Primary	1,7,10,11,14,16,27,29,30,40,47,51	6804	20.0 [13.0-29.0]		99%	<0.01
Extracerebral metastases	4,23,40	116	32.0 [17.0-52.0]		81%	<0.01
Brain metastases	2,4,11,27,29,47	1021	21.0 [8.00-44.0]		69%	<0.01
<b><i>ATM</i></b>				NA		
Primary	4,51	38	8.00 [3.00-22.0]		0%	1
Extracerebral metastases		0	NA		NA	NA
Brain metastases		0	NA		NA	NA
<b><i>NFI</i></b>				0.92		
Primary	10	17	6.00 [0.00-29.0]		NA	NA
Extracerebral metastases		0	NA		NA	NA
Brain metastases	2	139	2.00 [0.00-6.00]		NA	NA
<b><i>NOTCH1</i></b>				NA		
Primary	10	17	23.5 [7.00-50.0]		NA	NA
Extracerebral metastases		0	NA		NA	NA
Brain metastases		0	NA		NA	NA
<b><i>FOXA1</i></b>				0.74		
Primary	10	17	18.0 [4.00-43.0]		NA	NA
Extracerebral metastases		0	NA		NA	NA
Brain metastases	27	14	7.00 [0.00-34.0]		NA	NA
<b><i>GNAS</i></b>				<0.01		
Primary	10,14	1967	10.0 [9.00-12.0]		0%	0.32
Extracerebral metastases		0	NA		NA	NA
Brain metastases	11	733	5.00 [3.00-7.00]		NA	NA
<b><i>ASXL1</i></b>				NA		
Primary		0	NA		NA	NA
Extracerebral metastases		0	NA		NA	NA

Brain metastases	2	139	2.00 [0.00-6.00]		NA	NA
<b>KRAS</b>				0.76		
Primary	10,19	51	10.0 [4.00-21.0]		0%	0.51
Extracerebral metastases	52	14	7.00 [0.00-34.0]		NA	NA
Brain metastases		0	NA		NA	NA
<b>EGFR</b>				0.91		
Primary	1,7,11,27,29,51	2703	3.00 [1.00-11.0]		94%	<0.01
Extracerebral metastases		0	NA		NA	NA
Brain metastases	2,27,29,47,49	660	3.00 [2.00-5.00]		0%	0.73
<b>BRAF</b>				0.41		
Primary		0	NA		NA	NA
Extracerebral metastases	52	14	7.00 [0.00-34.0]		NA	NA
Brain metastases	49	11	27.0 [6.00-61.0]		NA	NA
<b>FGFR1</b>				0.66		
Primary	4,7,10,14,16,19,27,40,51	2422	14.0 [12.0-15.0]		25%	0.22
Extracerebral metastases	2,4,23,40,52	130	27.0 [6.00-68.0]		90%	<0.01
Brain metastases	4,11,27,47	941	5.00 [4.00-7.00]		0%	0.5
<b>FGFR2</b>				0.66		
Primary	7,10,11,40,51	357	3.00 [2.00-5.00]		48%	0.1
Extracerebral metastases	40	51	2.00 [0.00-10.0]		NA	NA
Brain metastases		0	NA		NA	NA
<b>FGFR4</b>				NA		
Primary	7,10	1820	5.00 [2.00-15.0]			
Extracerebral metastases		0	NA		NA	NA
Brain metastases		0	NA		NA	NA

Bold: Gene's name and significant *P* value at the threshold of 5% for subgroup differences

Tableau 19. Prevalence of gain-loss of heterozygosity in primary tumor, extracerebral metastases and brain metastases in breast cancers

Locus	Gain of heterozygosity						Loss of heterozygosity					
	Primary tumor		Extracerebral metastases		Brain metastases		Primary tumor		Extracerebral metastases		Brain metastases	
	Sample (n)	%	Sample (n)	%	Sample (n)	%	Sample (n)	%	Sample (n)	%	Sample (n)	%
1p21.3	47	8.25	-	-	10	20.0	30	25.8	442	22.06	-	-
1p36.11	17	6.67	-	-	-	-	17	33.3	442	26.47	-	-
1p36.22	17	6.67	-	-	-	-	56	32.15	442	26.13	39	38.0
1q21.3	56	40.34	-	-	39	79.0	17	40.0	-	-	-	-
1q32.1	34	42.64	442	41.06	-	-	34	46.67	-	-	-	-
2q37.1	39	31.0	-	-	39	31.0	39	21.0	-	-	39	26.0
3q13.33	17	13.3	-	-	-	-	39	15.0	-	-	39	21.0
4p11	39	5.0	-	-	39	15.0	39	54.0	-	-	39	46.0
4q22.1	17	7.1	-	-	-	-	56	48.7	442	18.44	39	44.0
6q25.1	17	14.3	-	-	-	-	27	36.3	10	50.0	-	-
6q25.3	39	36.0	-	-	39	46.0	39	28.0	-	-	39	26.0
6q27	17	7.1	-	-	-	-	17	39.3	442	23.53	-	-
7p11.2	17	46.67	-	-	-	-	56	9.84	-	-	39	15.0
7p21.1	47	27.9	-	-	10	70.0	47	7.55	-	-	-	-
7p21.3	47	24.3	-	-	10	80.0	47	7.55	-	-	-	-
7q36.2	17	25.0	-	-	-	-	17	32.1	442	13.58	-	-
8p11.23	56	24.35	442	21.72	39	10.0	17	25.0	-	-	-	-
8p21.2	17	6.67	-	-	-	-	-	-	442	35.41	39	82.0
8q24.21	17	64.3	442	36.31	-	-	17	3.6	-	-	-	-
<b>9p21.3</b>	34	27.15	-	-	-	-	73	25,73	442	26.81	39	46.0
9p23	17	20.0	-	-	-	-	17	13.3	442	24.89	-	-
10p14	18	35.7	-	-	10	40.0	17	10.7	-	-	10	20.0
<b>10q23.31</b>	30	4.85	-	-	10	5.0	30	6.45	442	18.44	<b>10</b>	<b>75.0</b>

10q26.2	47	7.78	-	-	10	5.0	47	26.43	-	-	10	75.0
10q26.3	30	4.85	-	-	10	5.0	69	25.23	442	19.12	49	71.0
11p13	64	34.1	442	14.25	39	18.0	17	21.4	-	-	-	-
11p15.5	64	10.57	-	-	-	-	64	27.52	442	23.19	10	70.0
11q13.3	34	38.1	-	-	442	25.0	34	8.69	-	-	-	-
11q25	17	3.6	-	-	-	-	17	57.1	442	31.22	-	-
12p13.1	17	40.0	-	-	-	-	17	20.0	442	14.82	-	-
13q14.2	17	40.0	-	-	-	-	17	20.0	442	31.0	-	-
13q34	34	27.15	-	-	-	-	73	39.26	-	-	39	46.0
16q24.2	17	7.1	-	-	-	-	47	81.05	-	-	10	30.0
17p12	17	3.6	-	-	-	-	17	67.9	442	37.22	-	-
<b>17q11.2</b>	30	27.4	-	-	-	-	30	19.35	442	20.82	10	70.0
17q12	34	17.35	442	17.53	-	-	34	31.45	-	-	-	-
17q22	17	26.67	10	16.7	-	-	17	13.33	-	-	-	-
17q23.1	17	57.1	442	24.66	-	-	17	14.3	-	-	-	-
18q23	17	10.7	442	23.42	-	-	17	50.0	-	-	-	-
19p13.2	17	6.67	-	-	-	-	56	32.0	-	-	39	62.0
19p13.3	17	42.9	-	-	-	-	34	32.29	442	31.9	-	-
19q13.2	56	20.67	-	-	-	28	17	20.0	-	-	-	-



**Les mutations *ESR1*, *ERBB2*, *EGFR*, *PTEN*, *BRCA2* et *NOTCH1* pourraient être liées à des processus métastatiques dans le cerveau.**

Pour les 6 gènes avec un nombre d'échantillons minimum de 100 métastases cérébrales analysées et une prévalence de mutation plus élevée dans les échantillons de métastases cérébrales que dans les métastases extra-cérébrales, nous avons effectué des méta-régressions univariées et multivariées pour déterminer si la prévalence de la mutation génétique était associée à des sous-groupes d'échantillons. En nous concentrant sur les localisations des métastases cérébrales, nous avons montré qu'elles influençaient significativement la prévalence des mutations pour 4 gènes : *EGFR*, *PTEN*, *BRCA2* et *NOTCH1* (Tableau 20).

Nous avons également décidé de conserver *ESR1* et *ERBB2*, car leur prévalence de mutation a augmenté progressivement de la tumeur primaire, aux métastases extra-cérébrales et aux métastases cérébrales (Tableau 13, Figure 15B et Figure 16), une observation qui peut avoir des implications thérapeutiques. Pour ces 6 gènes, nous avons réalisé une cartographie des mutations rapportées dans notre méta-analyse (Figure 17).

Tableau 20. Univariate and multivariate meta-regression

Gene	Samples	Univariate meta-regression			Multivariate meta-regression		
		Estimate	Standard error	P	Estimate	Standard error	P
TP53	<b>Tumor site:</b> Primary tumors	1 (ref)	-				
	Extracerebral metastases	-0.42	0.27	0.11			
	Brain metastases	0.44	0.27	0.1			
	<b>Quality of studies</b> (good)	-0.29	0.24	0.22			
	<b>Method analysis:</b> NGS	1 (ref)	-	-			
	Targeted NGS	0.24	0.25	0.33			
	Other	-0.5	0.47	0.28			
	<b>Preservation</b> (Frozen)	-0.25	0.29	0.39			
BRCA2	<b>Tumor site:</b> Primary tumors	1 (ref)	-	-	1 (ref)	-	-
	Extracerebral metastases	-0.24	0.35	0.49	-0.12	0.41	0.77
	Brain metastases	0.94	0.35	<b>0.008</b>	0.92	0.37	<b>0.01</b>
	<b>Quality of studies</b> (good)	-0.79	0.44	0.07			
	<b>Method analysis:</b> NGS	1 (ref)	-	-			
	Targeted NGS	-0.29	0.4	0.48			
	Other	-	-	-			
	<b>Preservation</b> (Frozen)	-0.87	0.66	0.19	-0.59	0.58	0.31
PTEN	<b>Tumor site:</b> Primary tumors	1 (ref)	-	-	1 (ref)	-	-
	Extracerebral metastases	0.46	0.32	0.15	0.47	0.29	0.1
	Brain metastases	0.84	0.35	<b>0.01</b>	0.32	0.35	0.36
	<b>Quality of studies</b> (good)	-1.26	0.32	<b>&lt;0.0001</b>	-1.21	0.37	<b>0.01</b>
	<b>Method analysis:</b> NGS	1 (ref)	-	-			
	Targeted NGS	-0.41	0.38	0.27			
	Other	-0.58	0.78	0.45			
	<b>Preservation</b> (Frozen)	0.88	0.37	<b>0.01</b>	0.23	0.36	0.52

<i>NRAS</i>	<b><i>Tumor site:</i></b> Primary tumors	1 (ref)	-	-	1 (ref)	-	-
	Extracerebral metastases	-3.81	1.12	<b>0.0007</b>	-3.05	0.88	<b>0.0005</b>
	Brain metastases	0.88	0.89	0.32	0.65	0.71	0.35
	<b><i>Quality of studies</i></b> (good)	-3.42	1.11	<b>0.002</b>	-1.95	0.64	<b>0.002</b>
	<b><i>Method analysis:</i></b> NGS	1 (ref)	-	-			
	Targeted NGS	-	-	-			
	Other	-1.62	2.38	0.49			
<b><i>Preservation</i></b> (Frozen)	-	-	-				
<i>NOTCH1</i>	<b><i>Tumor site:</i></b> Primary tumors	1 (ref)	-	-	1 (ref)	-	-
	Extracerebral metastases	-3.55	1.18	<b>0.002</b>	-2.97	1.1	<b>0.006</b>
	Brain metastases	1.46	0.87	0.09	1.5	0.76	<b>0.04</b>
	<b><i>Quality of studies</i></b> (good)	-1.52	1.09	0.16	-0.39	0.81	0.62
	<b><i>Method analysis:</i></b> NGS	1 (ref)	-	-	1 (ref)	-	-
	Targeted NGS	1.8	0.99	0.07	1.04	0.75	0.16
	Other	-	-	-	-	-	-
<b><i>Preservation</i></b> (Frozen)	1.12	1.21	0.35				
<i>EGFR</i>	<b><i>Tumor site:</i></b> Primary tumors	1 (ref)	-	-	1 (ref)	-	-
	Extracerebral metastases	-1.89	0.78	<b>0.01</b>	-1.42	0.39	<b>0.0003</b>
	Brain metastases	1.38	0.61	<b>0.02</b>	1.46	0.44	<b>0.001</b>
	<b><i>Quality of studies</i></b> (good)	-1.83	0.77	<b>0.01</b>	-1.49	0.46	<b>0.001</b>
	<b><i>Method analysis:</i></b> NGS	1 (ref)	-	-			
	Targeted NGS	0.33	0.79	0.67			
	Other	-	-	-			
<b><i>Preservation</i></b> (Frozen)	-0.99	1.67	0.55				

Uni- and multivariate meta-regressions were run to assess sample groups significantly associated with prevalence of gene mutations. Sample groups yielding *P*-values under 0.20 in the univariate analysis were considered for inclusion in the multivariate analysis.

Bold = significant *P* value at the threshold of 0.05.

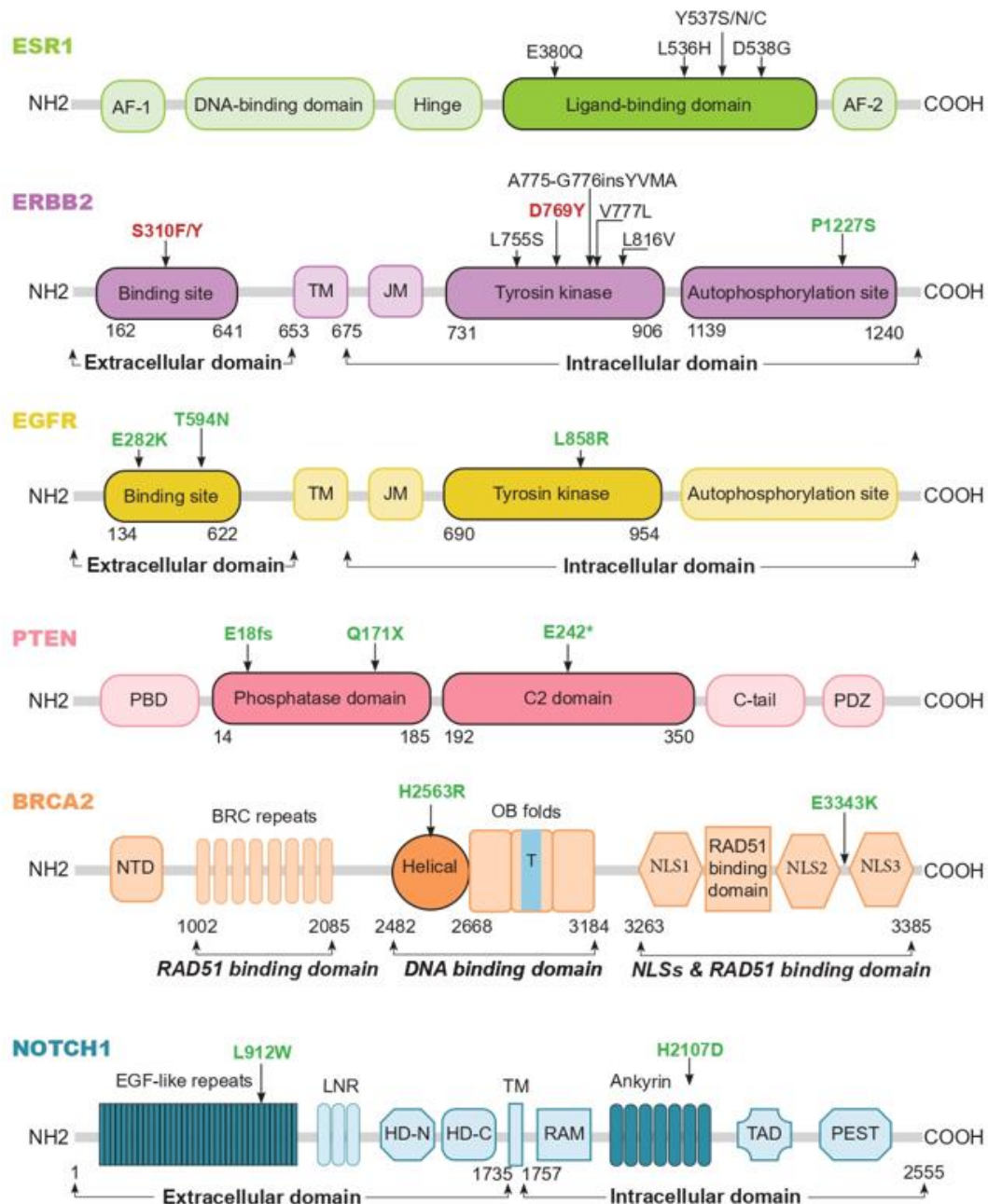


Figure 17. Cartography of the mutations reported in the meta-analysis for the 6 genes with an increased mutation prevalence in brain metastases. Mutations exclusive to brain metastases are identified in green. Those exclusive to extracerebral metastases are in red, and the mutation common to both sites are in black.

AF-1: activation function-1, AF-2: activation function-2, TM: transmembrane, JM: juxtamembrane, PBD: PIP2-binding domain, NTD: N-terminal domain, OB folds: oligonucleotide binding folds, T: tower domain, NLS: nuclear localization sequence, EGF-like repeats: epidermal growth factor-like repeats, LNR: Lin12/Notch repeat, HD-N: heterodimerization domain- N terminal, HD-C: heterodimerization domain- C terminal, RAM: Rbp-associated molecule, TAD: transactivation domain, PEST: a region rich in prolone (P), glutamate (E), serine (S) and threonine (T)

Pour *ESR1*, toutes les mutations rapportées étaient communes aux métastases extra-cérébrales et cérébrales, situées dans le domaine de liaison au ligand, qui comprend la fonction d'activation transcriptionnelle-2 (AF2). Ces mutations activent des mutations, elles peuvent favoriser la croissance cellulaire en l'absence d'œstradiol<sup>105-107</sup>, et elles pourraient être liées à un risque accru de métastases cérébrales, par exemple la mutation pD538G<sup>108</sup>.

Pour *ERBB2*, la plupart des mutations étaient courantes aux métastases extra-cérébrales et cérébrales. La plupart d'entre eux sont des mutations activatrices, situées dans le domaine de la tyrosine kinase. pP1227S était la seule mutation limitée à un échantillon de métastases cérébrales. Il est situé dans le domaine de l'autophosphorylation et pourrait être responsable de l'activation des récepteurs constitutifs, comme décrit pour les mutations *EGFR* pY1068F et pY992F<sup>109,110</sup>.

Pour l'*EGFR*, une mutation pL858R a été trouvée dans un échantillon métastatique cérébral. Ce point chaud de mutation, bien décrite dans l'adénocarcinome pulmonaire non à petites cellules, est prédictive de la réponse aux inhibiteurs de la tyrosine kinase du R-EGF<sup>111,112</sup>. Les mutations pE282K et pT594N sont situées dans le domaine de liaison au ligand extracellulaire. Les mutants ectodomaines *EGFR* sont oncogènes dans les modèles précliniques de glioblastome<sup>113</sup>.

Pour *PTEN*, trois mutations ont été identifiées dans des échantillons de métastases cérébrales, pE18fs, pQ171X et pE242\*. Le pE18fs et le pQ171X sont tous les deux situés dans le domaine de la phosphatase, ce qui est important pour la liaison membranaire du PTEN et facilite l'hydrolyse des phospholipides<sup>114,115</sup>. Des mutations survenant dans le domaine phosphatase telles que pY65S, pQ171R, pC124S et pG129E, ont été associées à une perte de la fonction *PTEN*<sup>116,117</sup>. La mutation pE242\* est située dans le domaine C2, qui interagit avec le domaine phosphatase, régulant l'activité de la phosphatase PTEN. Il peut également se lier aux membranes phospholipidiques, permettant au *PTEN* d'inhiber la migration cellulaire<sup>115,118</sup>.

Pour *BRCA2*, deux mutations ont été identifiées dans des échantillons de métastases cérébrales, pH2563R et pE3343K. La mutation pE3343K est située entre les régions NLS2 et NLS3, et sa valeur fonctionnelle n'est pas encore déchiffrée<sup>119</sup>. La mutation pH2563R est située dans le domaine hélicoïdal du domaine de liaison à l'ADN, qui est à son tour impliqué dans la liaison *BRCA2* à l'ADN simple brin et double brin. Cette mutation pourrait être responsable d'une réparation anormale de l'ADN, comme décrit pour la mutation G2609D<sup>120</sup>.

Les deux mutations de *NOTCH1* identifiées dans les échantillons métastatiques cérébraux étaient pL912W et pH2107D. pL912W est situé dans le domaine de type EGF, impliqué dans la liaison du ligand, et il pourrait être oncogène<sup>121</sup>. pH2107D est situé dans le domaine de l'ankyrine qui est responsable de la médiation des interactions protéine-protéine<sup>122</sup>.

Dans l'ensemble, certaines mutations génétiques pourraient être liées au processus métastatique cérébral du cancer du sein, avec de fortes implications thérapeutiques.

### 2.3. Discussions

Ici, nous rapportons la première méta-analyse de données génomiques concernant 37218 patientes atteintes de cancers du sein métastatiques, dont 1485 échantillons de métastases cérébrales. Nous avons récemment montré que cette approche méthodologique fournit des valeurs de prévalence de mutation génétique plus fiables que les données obtenues à partir de sources individuelles<sup>99</sup>. En outre, la méthodologie rigoureuse que nous avons utilisée est une force de notre étude, avec deux algorithmes de recherche complémentaires, une sélection minutieuse des études, un contrôle de la qualité des études et une approche pour expliquer l'hétérogénéité entre les sous-groupes. Dans une revue récente des données génomiques de 164 métastases cérébrales liées au cancer du sein, la prévalence des mutations génétiques pour les deux gènes les plus fréquemment mutés, *TP53* et *PIK3CA*, était similaire à celle de notre méta-analyse<sup>123</sup>. En revanche, il y avait de nombreuses divergences pour les autres gènes. Dans cette revue, la prévalence de la mutation était de 4% pour *PTEN* et *BRCA2*, comparativement à 15% et 22% respectivement dans notre méta-analyse, dans laquelle un nombre beaucoup plus important d'échantillons de métastases cérébrales ont été analysés.

Notre méta-analyse met en évidence la nécessité de séquencer les métastases cérébrales, et donc d'obtenir des échantillons de tissus, ce qui pourrait être facilité par l'utilisation de biopsies guidées par imagerie<sup>65</sup>. Notre méta-analyse a également montré la valeur ajoutée de l'utilisation de NGS ciblés pour fournir des données fiables sur la prévalence des mutations génétiques. Par rapport au séquençage de l'exome entier/génome, le NGS ciblé est plus rapide et moins coûteux avec une plus grande sensibilité pour détecter les mutations à faible fréquence allélique<sup>124</sup>. Ce type d'approche pourrait être proposé pour séquencer un panel de gènes ayant des implications thérapeutiques sur des échantillons de métastases cérébrales.

L'une des valeurs de notre méta-analyse est que nous avons comparé les données génomiques obtenues à partir de métastases cérébrales, de métastases extra-cérébrales et de tumeurs primaires. Les cellules métastatiques peuvent provenir de clones minoritaires au sein d'une tumeur primaire<sup>66</sup>, mais aussi de clones minoritaires au sein de métastases extra-cérébrales, avec des mutations liées à la propagation métastatique spécifique au site<sup>83,125,126</sup>. En effet, une métastase cérébrale est le résultat de propriétés biologiques favorisant le franchissement de la barrière hémato-encéphalique par les cellules cancéreuses, et leur implantation dans le cerveau.

Les facteurs biologiques associés à un risque accru de métastases cérébrales ne sont pas entièrement compris. Il existe des signatures transcriptomiques de tumeurs primaires ou de métastases extra-cérébrales qui sont associées à un risque accru de métastases cérébrales<sup>71,72(p2),127,128</sup>. Cependant, il n'existe aucune donnée démontrant que certaines mutations génétiques pourraient être responsables du franchissement de la barrière hémato-encéphalique par les cellules cancéreuses.

Dans notre méta-analyse, nous avons identifié 6 gènes à forte prévalence de mutation dans les métastases cérébrales, particulièrement intéressants pour leur rôle potentiel dans le processus métastatique cérébral et la résistance aux médicaments anticancéreux de première intention : *ESR1*, *ERBB2*, *EGFR*, *PTEN*, *BRCA2* et *NOTCH1* (Figure 18).

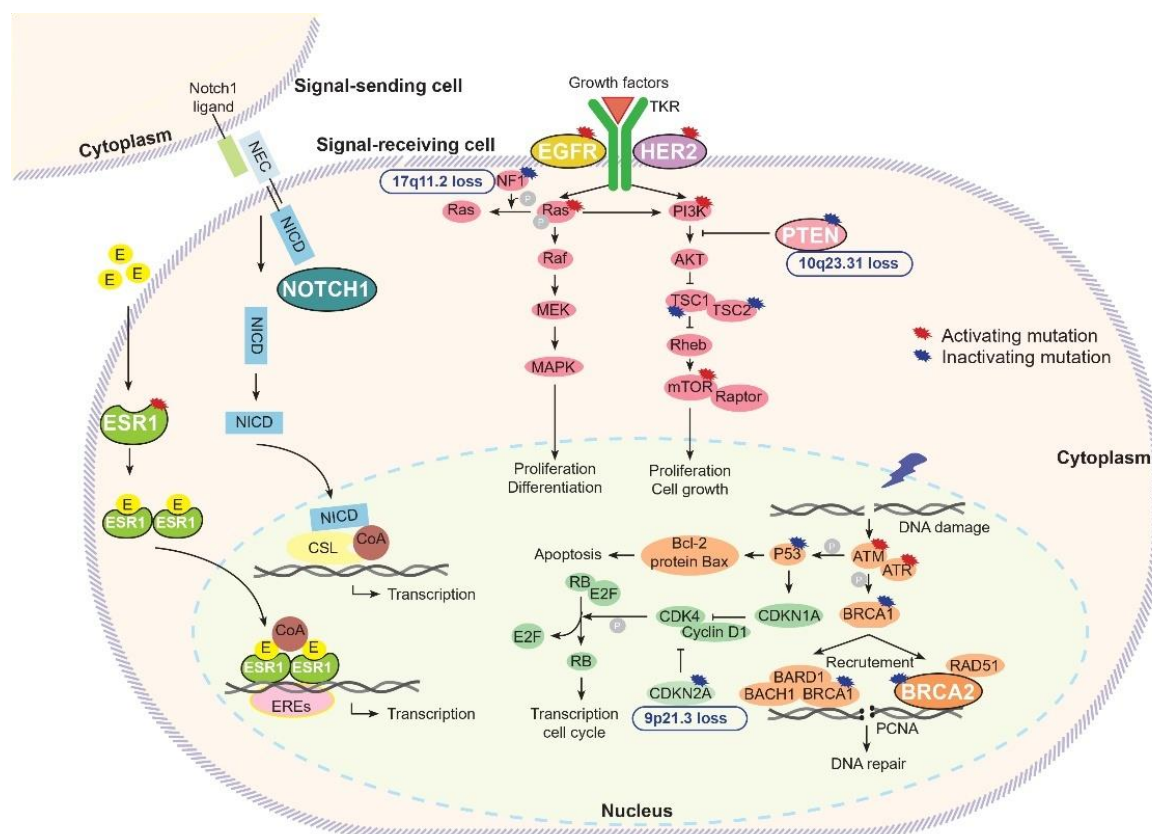


Figure 18. Gene alterations and signaling pathways involved in breast cancer carcinogenesis and brain metastatic processes

*E:* estrogen, *CoA:* coactivators, *EREs:* estrogen receptor elements, *NEC:* Notch1 extracellular cell, *NICD:* Notch1 intracellular cell domain, *CSL (CSL proteins):* CBF-1/RBPJ- $\kappa$  in *Homo sapiens/Mus musculus* respectively, *Suppressor of Hairless* in *Drosophila melanogaster*, *Lag-1* in *Caenorhabditis elegans*, *PCNA:* proliferating cell nuclear antigen.

*ESR1* code pour la protéine du récepteur 1 des œstrogènes. Après la liaison aux œstrogènes, ESR1 se transloque vers le noyau et se lie aux éléments récepteurs des œstrogènes dans les régions amplificatrices du génome, médiant la transcription des gènes au cours des processus physiologiques normaux, mais aussi au cours de la tumorigenèse du cancer du sein<sup>129</sup>. Des mutations activatrices dans le domaine de liaison au ligand d'*ESR1* ont été observées dans 10% à 40% des cancers du sein ER+ métastatiques, conférant une résistance endocrinienne<sup>129,130(p1)</sup>.

*ERBB2* est un proto-oncogène codant pour un membre de la famille des récepteurs du facteur de croissance épidermique. L'amplification *ERBB2* est fréquente dans différents types de cancer<sup>131,132</sup>. C'est un facteur de risque bien établi des métastases cérébrales dans le cancer du sein. Cependant, les mécanismes biologiques de cette association ne sont pas entièrement déchiffrés. In vitro, les cellules cancéreuses surexprimées de HER2 sont plus susceptibles d'interagir avec l'intégrine  $\beta 4$ , favorisant leur adhésion aux cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique<sup>133</sup>. De plus, dans un modèle murin de métastases cérébrales, la surexpression de HER2 augmente la croissance des cellules tumorales métastatiques dans le cerveau<sup>134</sup>. Les mutations *ERBB2* sont moins fréquentes, avec une prévalence allant de 0,2% à 12,6%<sup>135,136</sup>. Dans le cancer du sein, des mutations *ERBB2* ont été décrites dans tous les sous-types histologiques, généralement en l'absence d'amplification *ERBB2*<sup>137,138</sup>. Dans les études précliniques, les mutations *ERBB2* situées dans les domaines extracellulaire et C-terminal, sont généralement prédictives de la sensibilité au trastuzumab, alors que la plupart des mutations dans le domaine tyrosine kinase sont des mutations résistantes. Par exemple, les mutations pL755P/S, fréquentes dans le cancer du sein, sont associées à une résistance au lapatinib, un ITK (Inhibiteur de tyrosine kinase) anti-HER2. En revanche, la mutation A775\_776insYVMA, fréquemment identifiée dans les métastases cérébrales du cancer du poumon, est associée à une réponse à l'afatinib et au nératinib<sup>135,139(p20)</sup>.

L'*EGFR* est un oncogène fréquemment modifié. L'activation de l'*EGFR*, par amplification ou mutation, active à son tour de nombreuses voies de transduction du signal en aval, y compris les voies Ras-Raf-MAPK et PI3K/Akt<sup>140</sup>. Dans les modèles précliniques, l'association entre l'activation de la voie EGFR et les métastases cérébrales du cancer du sein, y compris par la surexpression de l'EGF liant l'EGF (HBEGF) du ligand EGFR (EGF) a également été rapportée<sup>17,141</sup>. Les mutations *EGFR*, généralement des mutations activatrices indépendantes du ligand, sont des événements oncogéniques bien connus dans les cancers du poumon non à petites cellules<sup>126,142</sup>. De plus, chez 384 patients atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules, l'incidence des métastases cérébrales était de 49,5 % chez les patients atteints d'un



cancer avec mutation *EGFR* L858R, contre 27,3 % chez ceux atteints d'un cancer de type sauvage<sup>3</sup>.

*PTEN* est un gène suppresseur de tumeur. La protéine PTEN est principalement impliquée dans le blocage de la signalisation PI3K/Akt provenant de l'activation de l'EGFR. Des mutations PTEN inactivantes ont été identifiées dans de nombreux types de cancer, en particulier les carcinomes de l'endomètre et les glioblastomes<sup>143,144</sup>. Dans 56 métastases cérébrales de différents types de cancer, la prévalence de la perte de *PTEN* était très élevée en cas de cancers du poumon et du sein, combinant parfois LOH et une mutation inactivante, suggérant que la perte de fonction *PTEN* pourrait contribuer aux processus métastatiques cérébraux<sup>145</sup>. La perte de *PTEN* s'est également avérée prédire la résistance au trastuzumab chez les patientes atteintes d'un cancer du sein<sup>146</sup>.

*BRCA2* est un gène suppresseur de tumeur. La protéine BRCA2 joue un rôle important dans la réparation de l'ADN et la régulation de la transcription. Les mutations germinales *BRCA2* sont associées à un risque accru de cancers du sein, de l'ovaire et du pancréas<sup>147,148</sup>. Dans le cancer du sein, les mutations germinales *BRCA2* se sont avérées significativement associées aux métastases cérébrales, quel que soit le sous-type de tumeur<sup>149</sup>.

*NOTCH1* code pour un récepteur transmembranaire qui appartient à une voie de signalisation bien conservée. Lorsque NOTCH1 est activé, il se divise pour former un domaine extracellulaire et un domaine intracellulaire, lui-même transloqué vers le noyau pour réguler la transcription des gènes cibles. Des mutations activatrices de *NOTCH1* ont été identifiées dans différents types de cancer<sup>150</sup>. Dans les modèles précliniques de cancer du sein, l'activation de la voie de signalisation NOTCH1 a été associée à un risque accru de métastases cérébrales<sup>151,152</sup>.

Ces gènes ont également des implications thérapeutiques potentielles considérables.

Pour les mutations *ESR1*, les antagonistes des récepteurs des œstrogènes tels que le fulvestrant apparaissent globalement efficaces *in vitro*, en particulier le mutant D538G<sup>106</sup>. Chez la souris, la combinaison de fulvestrant et de palbociclib ou d'évérolimus inhibe la croissance tumorale dans les cancers du sein porteurs de mutations D538G ou Y537S *ESR1*<sup>153</sup>. Chez les patientes atteintes d'un cancer du sein résistant au système endocrinien, les mêmes combinaisons étaient efficaces<sup>154</sup>. D'autres cibles ESR1 telles que le lasofoxifène et H3B-5942 se sont révélées supérieures au fulvestrant dans l'inhibition des processus métastatiques dans les xénogreffes de cancer du sein hébergeant des mutants Y537S et D538G *ESR1*<sup>155,156</sup>. Leurs avantages pour le

traitement des femmes atteintes d'un cancer du sein ER-positif avec mutations *ESR1* acquises sont actuellement évalués dans le cadre d'essais cliniques<sup>157,158</sup>.

Dans les cancers avec mutation *ERBB2*, le bénéfice des TKI anti-HER2 a été évalué. Dans un essai de phase II impliquant 125 patientes présentant des mutations *ERBB2* dans 21 types de cancer, le traitement par nératinib, un pan HER2-TKI, a fourni un taux de réponse de 24% chez les patientes atteintes de cancer du sein présentant des mutations *ERBB2* S310, L755, V777, G778\_P780dup et Y772\_A775dup<sup>159</sup>. Parmi 16 patientes atteintes de cancers du col de l'utérus avec mutation *ERBB2*, la réponse au nératinib était liée à la mutation pS310F<sup>160</sup>.

En règle générale, les mutations du *EGFR* sont associées à des taux de réponse élevés aux TKI anti-EGFR dans le cancer du poumon non à petites cellules métastatique. Cela est également vrai pour les localisations cérébrales, avec des taux de réponse allant de 36,5% à 91%<sup>161,162</sup>. En particulier, l'osimertinib, un anti-EGFR de troisième génération, a une meilleure pénétration cérébrale, avec des taux de réponse de plus de 70%<sup>162</sup>. Dans une étude préclinique, l'osimertinib a également montré une efficacité marquée dans le glioblastome muté *EGFR*<sup>163</sup>. Pour une patiente atteinte d'un cancer du sein métastatique porteuse de la mutation L861Q du *EGFR*, le traitement anti-EGFR a permis de contrôler la maladie pendant 6 mois<sup>164</sup>.

La voie PI3K/AKT /mTOR est fréquemment activée dans les métastases cérébrales du cancer du sein en raison de la perte de fonction PTEN et des mutations fréquentes d'activation *PIK3CA*, *AKT* et *mTOR*, comme en témoigne notre méta-analyse. Dans un modèle murin de xénogreffes cérébrales dérivées d'un cancer du sein surexprimé en HER2 avec perte de PTEN, une combinaison d'inhibiteurs de PI3K et de mTOR a considérablement inhibé la croissance tumorale<sup>165</sup>. Étant donné que la perte de PTEN diminue la recombinaison homologue et sensibilise les cellules tumorales aux inhibiteurs de la polyadénosine diphosphate ribose polymérase (PARP), une combinaison d'inhibiteur de PARP avec un inhibiteur de PIK3 pourrait être prometteuse pour les cancers présentant des mutations de perte de fonction *PTEN*<sup>166</sup>.

Les inhibiteurs de PARP sont actuellement approuvés pour le traitement de plusieurs cancers métastatiques présentant des mutations *BRCA*<sup>167-169</sup>. Étant donné que les métastases cérébrales surviennent chez environ la moitié des patientes atteintes d'un cancer du sein avancé présentant des mutations *BRCA*<sup>149</sup> et que la prévalence de la mutation *BRCA2* a atteint 22% dans notre méta-analyse, les inhibiteurs de PARP pourraient être des outils prometteurs pour le traitement des métastases cérébrales. En effet, pour une femme présentant des métastases cérébrales d'origine cancéreuse de l'endomètre et porteuse d'une mutation *BRCA1* circulante, le traitement par un inhibiteur de PARP a fourni une excellente réponse dans les localisations

cérébrales<sup>170</sup>. Dans les modèles précliniques de métastases cérébrales du cancer du sein triple négatif, le carboplatine en association avec le véliparib, un inhibiteur de PARP, a diminué le volume tumoral chez le mutant *BRCA*<sup>171</sup>. Un essai clinique en cours teste la combinaison de cisplatine et de véliparib pour les métastases cérébrales du cancer du sein abritant des mutations *BRCA*<sup>172</sup>.

Enfin, la voie NOTCH est fréquemment activée dans les cancers métastatiques, ce qui conduit au développement de thérapies ciblées par NOTCH<sup>173,174</sup>. Dans les modèles précliniques de cancer du sein, les inhibiteurs de la  $\gamma$ -sécrétase ont montré une activité prometteuse dans les métastases cérébrales<sup>151,152</sup>.

À ce jour, plusieurs médicaments commercialisés comme l'osimertinib ou le nélatinib ne sont pas actuellement approuvés pour le traitement du cancer du sein métastatique. Leur utilisation est discutée lors de réunions multidisciplinaires spécifiques. Des essais cliniques supplémentaires sont nécessaires, idéalement des essais paniers dédiés aux métastases cérébrales de différents types de cancer.

Notre méta-analyse présente certaines limites. Premièrement, elle a été effectuée sur des données agrégées et non sur des données individuelles. Pour cette raison, certaines analyses de sous-groupes n'ont pas pu être évaluées en raison de données manquantes (données sur l'origine ethnique, sous-types histologiques). Deuxièmement, il y avait une hétérogénéité significative entre les études pour la prévalence des mutations, persistant généralement malgré diverses analyses de sous-groupes pour remédier à cette limitation. En particulier, étant donné que l'hétérogénéité dans les études génomiques pourrait être liée à l'hétérogénéité tumorale elle-même, nous avons l'intention d'évaluer la prévalence des mutations génétiques en comparant l'échantillonnage multiple à l'échantillonnage unique. Cependant, les données n'étaient disponibles que pour 7% des études, ce qui représente 0,5% du nombre total d'échantillons analysés. D'autre part, cette hétérogénéité a disparu pour la plupart des gènes lorsque nous avons considéré uniquement les échantillons de métastases cérébrales. Selon l'hypothèse des semences et du sol, les métastases cérébrales peuvent provenir d'un clone minoritaire au sein d'une tumeur primaire ou d'une autre localisation métastatique<sup>66,175</sup> avec des signatures spécifiques possibles liées à des sites métastatiques spécifiques à un organe<sup>176</sup>. Cela souligne la nécessité de biopsies et d'analyses de métastases cérébrales.

#### **2.4. Conclusion et perspective**

Il s'agit de la première méta-analyse des altérations génomiques des métastases cérébrales du cancer du sein. Nos résultats soulignent la valeur ajoutée de l'obtention de biopsies à partir de

métastases cérébrales pour explorer pleinement leur biologie, pour le développement de traitements personnalisés.

Au Viet Nam, en collaboration avec les acteurs du site et le soutien du directeur de l'hôpital national du cancer du Viet Nam, nous allons mettre en place un panel NGS reposant sur les données de ma méta-analyse pour l'analyse moléculaire des métastases cérébrales de cancer du sein. Une première étude pilote que je conduirai permettra d'évaluer la mise en place de cet outil biologique, à la fois son efficacité diagnostique et son impact thérapeutique en médecine personnalisée.

### **3. Peut-on identifier une signature moléculaire transcriptomique commune à des métastases cérébrales dérivées de différents types de cancers ?**

Pour répondre à cette question, nous avons proposé une approche originale. À partir d'échantillons métastatiques de trois types de cancer différents – cancer du sein, mélanome et lymphome – nous avons cherché à identifier une signature moléculaire commune liée aux métastases cérébrales.

#### **3.1. Matériels et méthodes**

##### **Les échantillons métastatiques de patients**

Cent cinquante-cinq patients ont été inclus dans l'étude, avec les échantillons de biopsie métastatique disponibles provenant de métastases cérébrales ou de métastases extra-cérébrales. Tous les patients avaient soit un cancer du sein métastatique, soit un mélanome métastatique, soit un lymphome non hodgkinien de stade IV selon la stadification d'Ann Arbor<sup>177</sup>.

Au moment de la biopsie, tous les patients avaient une tomodensitométrie du corps entier au cours du dernier mois, y compris l'imagerie cérébrale. Des échantillons métastatiques cérébraux ont été fournis par l'Hôpital Sainte Anne Tumorbank. Des échantillons métastatiques extra-cérébraux ont été fournis par l'Hôpital Saint-Louis Tumorbank pour les cancers du sein et les mélanomes, et par la banque de tumeurs de l'hôpital Rui-jin (Shanghai, Chine) pour le lymphome.

Conformément à la loi française sur la bioéthique (2004-800; 8 juin 2004), tous les patients avaient été informés de l'utilisation à des fins de recherche de la partie de leurs échantillons restante après l'établissement du diagnostic, et aucun ne s'y est opposé. Le consentement éclairé a été obtenu de chaque patient. Le Comité d'éthique du Conseil de recherches cliniques a approuvé cette étude (CPP-Ile-de-France#13218). Sur la base de données cliniques et d'imagerie, nous avons séparé les patients ayant ou pas de métastases cérébrales. Dans la littérature, le délai médian entre la maladie métastatique et l'apparition de métastases cérébrales varie de 8 à 14 mois pour les femmes atteintes d'un cancer du sein métastatique<sup>4,178</sup>, de 8 à 9 mois pour le mélanome<sup>81,179</sup> et de 6 mois pour le lymphome non hodgkinien<sup>180</sup>. Dans notre série, pour le cancer du sein et le lymphome non hodgkinien, le suivi médian était de 24 mois pour les patientes présentant des métastases extra-cérébrales. Pour le mélanome, le suivi médian était de 48 mois. Pour le cancer du sein et le mélanome, certaines données de patientes ont déjà été décrites<sup>71,72</sup>.

### **Microdissection laser de cellules cancéreuses et analyses transcriptomiques**

Les 155 patients avaient au moins une biopsie métastatique congelée disponible. Pour chaque échantillon, des coupes cryodécoupées de 7 µm ont été microdisséquées au laser pour sélectionner un minimum de 1500 cellules tumorales pour une surface minimale de 471000 µm<sup>2</sup>, à l'aide d'un système PALM Microbeam/Zeiss. L'ARN total a été extrait de cellules tumorales microdisséquées par laser à l'aide de RNeasy-Mini-Kit (Qiagen, France), quantifié sur NanoDrop et qualifié sur Bio-RadExperion™ Automated-Electrophoresis-Station (BioRad, France).

Les analyses transcriptomiques ont été effectuées à l'aide du service MiltenyiBiotec Microarray. Une étape d'amplification linéaire basée sur T7 a été réalisée sur 0,5 µg de tous les échantillons d'ARN. Pour produire de l'ARNc marqué Cy3, les échantillons d'ARN ont été amplifiés et marqués à l'aide du kit de marquage Agilent-Quick. Les rendements de l'ARNc et les taux d'incorporation de colorants ont été mesurés avec le spectrophotomètre ND-1000 (NanoDrop, LabTech, France). L'hybridation a été réalisée selon le protocole Agilent 60-mer-oligomicroarray : 1,65 µg d'ARNc marqués au Cy3 ont été hybridés (pendant la nuit/65°C) sur des puces Agilent-Whole-Human-Genome-Oligo-Microarrays 8 × 60K V2, et des signaux de fluorescence détectés à l'aide d'AgilentMicroarray-Scanner. Agilent-FE-Software a déterminé l'intensité des fonctionnalités. La normalisation quantile a été réalisée à l'aide du paquet Limma sur R-software version 4.1.0 (Foundation for Statistical Computing, Vienne, Autriche), basé sur des données d'expression log<sub>2</sub> d'intensité unique.

### **Analyse bio-informatique des données transcriptomiques**

Pour identifier les gènes impliqués dans les métastases cérébrales, des analyses ont été effectuées à l'aide de l'environnement informatique R-statistique. Le package Bioconductor Limma a été utilisé pour lire les fichiers de données de l'essai d'expression génique, pour appliquer une correction de fond, pour filtrer les sondes et pour normaliser l'expression génique entre les échantillons. Les métastases cérébrales des cancers du sein (n = 13), des lymphomes (n = 4) et des mélanomes (n = 11) ont été comparées à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis. Les valeurs de p ont été ajustées par la méthode de Bonferroni. GeneSet a été généré comme la liste des gènes avec une valeur de > 0,5, identifiant les gènes dont l'expression n'était pas statistiquement différente entre les trois types de cancers. Sur la base du GeneSet généré par le test de Kruskal-Wallis (FDR<0.05, fold change >1.5), l'ensemble SAMR a été utilisé pour identifier les gènes exprimés différemment entre les métastases cérébrales et les métastases extra-cérébrales pour chaque type de cancer séparément, en utilisant la méthode non appariée à deux classes.

Nous avons ensuite comparé les trois listes de gènes pour finalement retenir les gènes communs surexprimés dans les métastases cérébrales des trois types de cancers. Le regroupement hiérarchique a été réalisé avec la fonction `heatmap.2` de R, évaluant la distance entre les échantillons et les gènes en utilisant la méthode de Manhattan et les réorganisant avec l'algorithme de Ward. L'ensemble de données du microréseau a été déposé dans la base de données publique ArrayExpress de l'Institut européen de bio-informatique.

### **RT-qPCR et la validation de l'expression de l'ARNm Kallikrein 6 dans des échantillons métastatiques**

Sur les sections suivantes des mêmes échantillons métastatiques microdisséqués au laser, nous avons utilisé RT-qPCR (reverse transcription quantitative real-time PCR) pour valider les résultats transcriptomiques. L'ARN total a été transcrit à l'envers (ADNc) avant amplification qPCR à l'aide d'amorces aléatoires avec SuperScript<sup>TM</sup>-II-Reverse Transcriptase (Invitrogen, France). Les réactions qPCR ont été réalisées à l'aide de sondes fluorescentes sur un système temps réel CFX96 (Bio-Rad) conformément aux directives MIQE<sup>181</sup>. Un échantillon blanc sans ADNc a été inclus, et les expériences ont été réalisées en triple exemplaire pour les gènes KLK6 [Hs00160519\_m1], AQP4 [Hs00242342\_m1], chaque échantillon étant dupliqué sur la plaque PCR. Les deux gènes de référence TBP [Hs00427620\_m1] et GAPDH [Hs02786624\_g1] ont été utilisés pour normaliser les résultats de l'expression génique. Les résultats ont été exprimés en dCt (quantification relative).

### **Expression de KLK6 dans des échantillons métastatiques**

En utilisant l'immunochimie, l'expression de KLK6 a été évaluée sur les échantillons métastatiques cérébraux et les échantillons métastatiques extra-cérébraux des 155 patients. Une méthode indirecte d'immunoperoxydase (Discovery/RocheDiagnostics) sur des coupes de tissus congelés de 5 µm d'épaisseur a été réalisée en utilisant l'anti-KLK6 (clone E24, anticorps monoclonal, Merck Millipore) comme anticorps primaire. L'anticorps secondaire anti-souris se trouvait dans le kit de détection DABMAP (Roche-Diagnostics). Les contrôles systématiques étaient l'absence d'anticorps primaire et l'utilisation d'un anticorps primaire non pertinent du même isotype. Pour chaque section de tissu, les cellules exprimant KLK6 ont été comptées par deux pathologistes différents (GB, AJ) sur cinq champs différents à un grossissement de  $\times 400$ , à l'aide d'un microscope ProvisAX70 (Olympus, Tokyo) avec un oculaire à grand champ numéro 26,5, fournissant une taille de champ de 0,344 mm<sup>2</sup> à ce grossissement. Une distribution membraneuse et cytoplasmique de KLK6 a été considérée comme positive. Pour chaque champ, un minimum de 100 cellules tumorales ont été analysées. Le pourcentage de cellules exprimant KLK6 était le nombre de cellules positives dans ces 100

cellules tumorales. Chaque échantillon a reçu un score en multipliant le grade d'intensité des taches (0 = aucune coloration, 1 = faible intensité, 2 = intensité moyenne, 3 = intensité forte) par le code numérique pour le pourcentage de cellules positives (0 = 0%, 1 = inférieur à 10%, 2 = 10-50%, 3 = 51-80%, 4 = plus de 81%). Le score maximum était de 12 lorsque plus de 81% des cellules exprimaient KLK6 avec un signal d'intensité forte. Les résultats ont été exprimés sous forme d'erreur type (ET) moyenne.

### **Lignées cellulaires de cancer du sein et de lymphome**

Nous avons choisi deux lignées cellulaires murines et une lignée cellulaire humaine pour leur potentiel métastatique cérébral après injection intracardiaque<sup>182-184</sup>. Les deux lignées cellulaires murines obtenues de l'ATCC (Rockville, MD, États-Unis) étaient la lignée cellulaire triple négative du cancer du sein 4T1 et la lignée cellulaire T du lymphome S49.1. La lignée cellulaire humaine était MDA-MB-231, une lignée cellulaire triple négative de cancer du sein achetée auprès de l'ATCC (Rockville, MD, États-Unis).

Les lignées cellulaires ont été cultivées dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO<sub>2</sub> à 37 °C. Les cellules 4T1 ont été cultivées dans RPMI à haute teneur en glucose (Gibco), 10% de sérum bovin fœtal (PAA), 1% de pénicilline / streptomycine (Sigma Aldrich). Les cellules S49.1 étaient la croissance dans le DMEM à haute glycémie (Gibco), 10% de sérum de cheval (PAA), 1% de pénicilline / streptomycine (Sigma Aldrich). La cellule MDA-MB-231 était une croissance dans DMEM à haute glycémie (Gibco), 20% de sérum de cheval (PAA), 1% de pénicilline/ streptomycine (Sigma Aldrich).

### **Modèles murins de métastases cérébrales**

Pour des expériences in vivo, des souris nudes NMRI âgées de six semaines, maintenues dans des conditions spécifiques exemptes d'agents pathogènes, ont reçu une injection intracardiaque avec 50 000 cellules pour obtenir des localisations métastatiques cérébrales (N = 5 animaux pour chaque lignée cellulaire).

Le comité d'éthique du conseil d'administration de l'Institut universitaire pour les études expérimentales sur les animaux a approuvé cette étude (APAFIS #31871-2021060213196041), et la maison animalière du centre de recherche est certifiée (accord D93-008-01). Les souris ont été suivies, avec une observation quotidienne de la perte de poids, des comportements de toilettage, de la posture, de la fréquence respiratoire et de l'activité. Lorsque des signes de souffrance ont été observés, des souris ont été euthanasiées par une prolongation cervicale.

Au moment de l'euthanasie, pour chaque souris, tous les organes ont été prélevés pour évaluer la propagation métastatique. En particulier, le cerveau entier a été enlevé et coupé longitudinalement en deux parties, l'une immédiatement congelée et l'autre fixée au formol.



L'évaluation de la propagation métastatique cérébrale a été réalisée sur des lames de 2  $\mu\text{m}$  colorées à l'hématoxyline-éosine. Chaque diapositive a été numérisée à l'aide d'un scanner Nanozoomer 2.0 HT (Hamamatsu, Japon). Pour chaque souris, les zones métastatiques cérébrales ont été délimitées sur quatre lames virtuelles consécutives et quantifiées à l'aide du logiciel DotSlide.

Au moment de l'euthanasie, pour chaque souris, la surface moyenne de l'extension métastatique cérébrale a été calculée en pourcentage (%) de la surface des métastases cérébrales et de la surface du cerveau entier.

### **Évaluation de l'expression de *KLK6* sur les métastases cérébrales de souris et les métastases extra-cérébrales**

Pour chaque échantillon (métastases cérébrales et métastases extra-cérébrales), des coupes tissulaires de 7  $\mu\text{m}$  d'épaisseur ont été microdisséquées au laser pour sélectionner un minimum de 1500 cellules tumorales pour une surface minimale de 430000  $\mu\text{m}^2$ , à l'aide d'un système PALM-Microbeam/Zeiss (Carl Zeiss, Allemagne). L'expression de l'ARNm *KLK6* a ensuite été évaluée à l'aide de la RT-qPCR comme décrit précédemment.

### **Analyses statistiques**

Les variables quantitatives ont été exprimées sous forme de moyenne  $\pm$  d'écart-type (ET) et les variables catégorielles sous forme de nombres et de pourcentages.

Pour résumer les données de l'ensemble de données sur l'expression génique, nous effectuons d'abord une analyse en composantes principales (ACP). L'ACP est capable d'identifier les composantes principales qui sont une combinaison linéaire de l'ensemble de données d'origine<sup>185</sup>. Chaque expression génique est considérée comme sa propre dimension unique. L'objectif de l'ACP est de réduire le nombre de dimensions aux axes principaux permettant d'expliquer la variance maximale de l'ensemble de données d'expression génique et d'éviter la perte d'information tout en limitant la redondance de l'information. Pour la présente analyse, nous avons retenu les neuf premières dimensions qui expliquaient 80% de la variance totale de l'ensemble de données sur l'expression génique. Ensuite, à partir de l'ACP, nous effectuons une classification hiérarchique ascendante non supervisée pour regrouper des échantillons homogènes. La classification hiérarchique ascendante a permis de conserver six groupes homogènes distincts (à savoir le cluster).

Les grappes ont ensuite été comparées à l'aide du test  $\chi^2$  (variables qualitatives : types de cancer et localisations métastatiques) ou du test ANOVA (variable quantitative : expression génique).

Le Mann Whitney a été utilisé pour comparer les niveaux d'expression de l'ARNm *KLK6* ou *AQP4* dans des échantillons métastatiques de cancer du sein, de mélanome et de lymphome non hodgkinien. Tous les tests étaient bilatéraux, et le seuil de signification retenu était pour une valeur  $P < 0,05$ .

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel R (version 4.1.0, R Foundation for Statistical Computing, Vienne, Autriche; <http://www.r-project.org>).

### 3.2. Résultats

#### Caractéristique de 155 patients avec analyses transcriptomiques d'échantillons métastatiques

Parmi les 155 patientes atteintes d'un cancer métastatique, 58 avaient un cancer du sein, 62 avaient un mélanome et 35 avaient un lymphome non hodgkinien. Les patients ont été divisés en 3 groupes en fonction du type d'échantillon métastatique analysé et de la présence ou non de métastases cérébrales: le groupe 1 comprenait des patients présentant des métastases cérébrales et un échantillon métastatique cérébral; Le groupe 2 comprenait des patients présentant des métastases cérébrales et un échantillon métastatique extra-cérébral ; Le groupe 3 comprenait des patients qui ayant pas de métastases cérébrales et un échantillon métastatique extra-cérébral. La plupart des échantillons extra-cérébraux métastatiques étaient des métastases ganglionnaires (N = 89) ou des métastases hépatiques (N = 12) (Tableau 21).

Tableau 21. Repartition of the 155 patients with transcriptomic analyses of metastatic samples

	Breast cancer	Melanoma	Non-Hodgkin lymphoma
<b>Group 1</b> <i>Patients with brain metastasis</i> <i>Biopsy samples of brain metastasis</i>	N= 13	N= 11	N= 4
<b>Group 2</b> <i>Patients with brain metastasis</i> <i>Biopsy samples of extracerebral metastasis</i>	N= 23 Lymph nodes= 15 Lung= 4 Liver= 4	N= 18 Lymph nodes= 18	N=14 Testis= 6 Adrenal gland= 8
<b>Group 3</b> <i>Patients without brain metastasis</i> <i>Biopsy samples of extracerebral metastasis</i>	N= 22 Lymph nodes= 14 Liver= 8	N= 33 Lymph nodes= 33	N= 17 Lymph nodes= 9 Skin= 8

Chacun des 155 échantillons métastatiques a été microdisséqué au laser pour sélectionner au moins 1500 cellules cancéreuses pour d'autres analyses transcriptomiques (Figure 19A). Après l'extraction de l'ARN, tous les échantillons étaient de bonne qualité, avec un indice moyen d'intégrité de l'ARN de 8,4 (plage de 5,5 à 10) (Figure 19B).

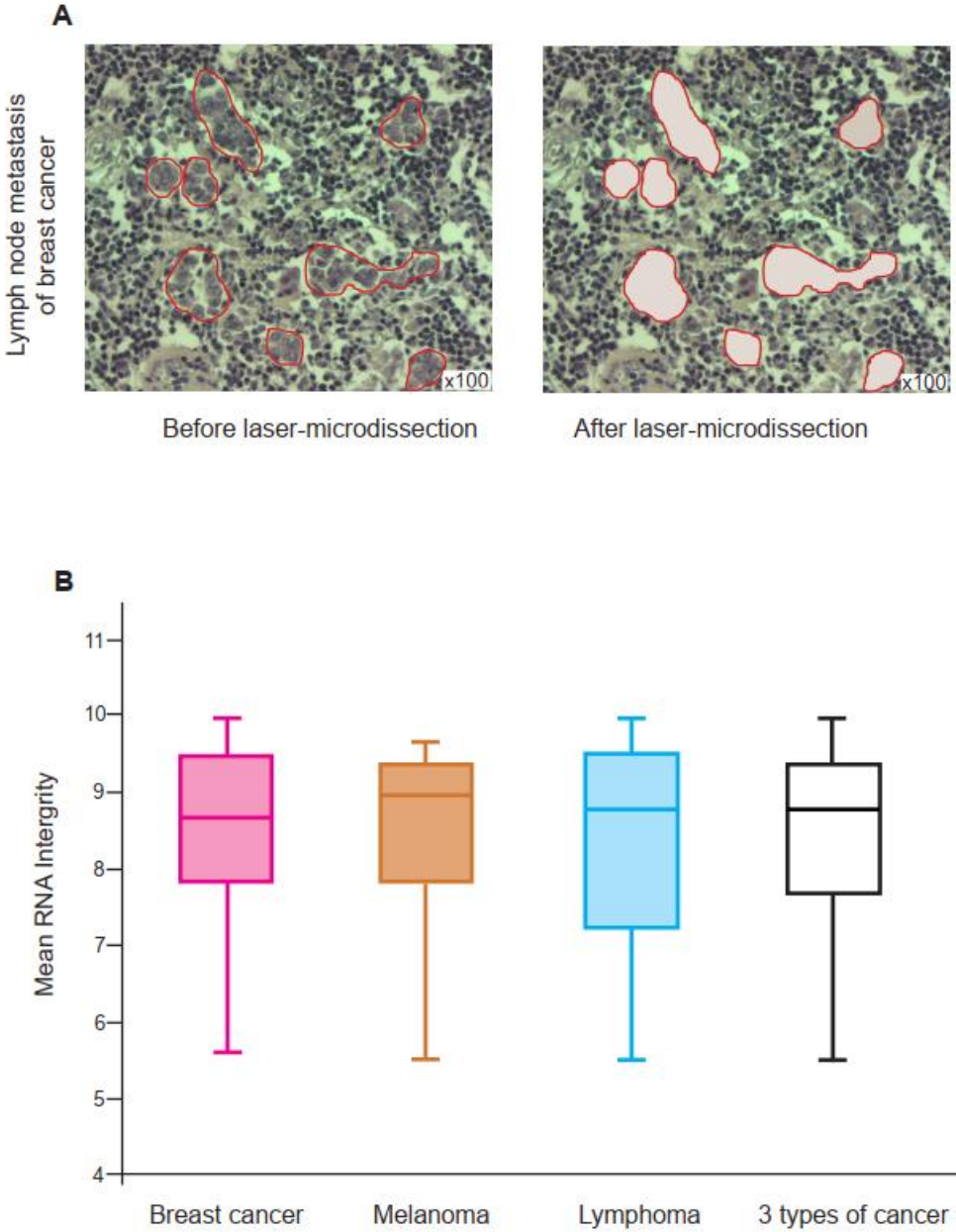


Figure 19. Laser-microdissection of cancer cells and mean RNA integrity of cancer samples

- A. Laser-microdissection of breast cancer cell from a lymph node metastasis.
- B. Mean RNA integrity number of the 155 metastatic samples.

## Une signature commune aux métastases cérébrales des patientes atteintes d'un cancer du sein, d'un mélanome ou d'un lymphome

Sur les données transcriptomiques obtenues à partir des 155 échantillons métastatiques, nous avons d'abord effectué une analyse factorielle de données mixtes en tenant compte des données transcriptomiques qualitatives (type de tumeur, groupe de patients) et quantitatives, et effectué une classification hiérarchique non supervisée. En considérant 6 grappes, les échantillons étaient regroupés selon le type de tumeur pour 5 grappes, mais un grappe « Cluster 1 », compris 6 métastases cérébrales de mélanome (Figure 20).

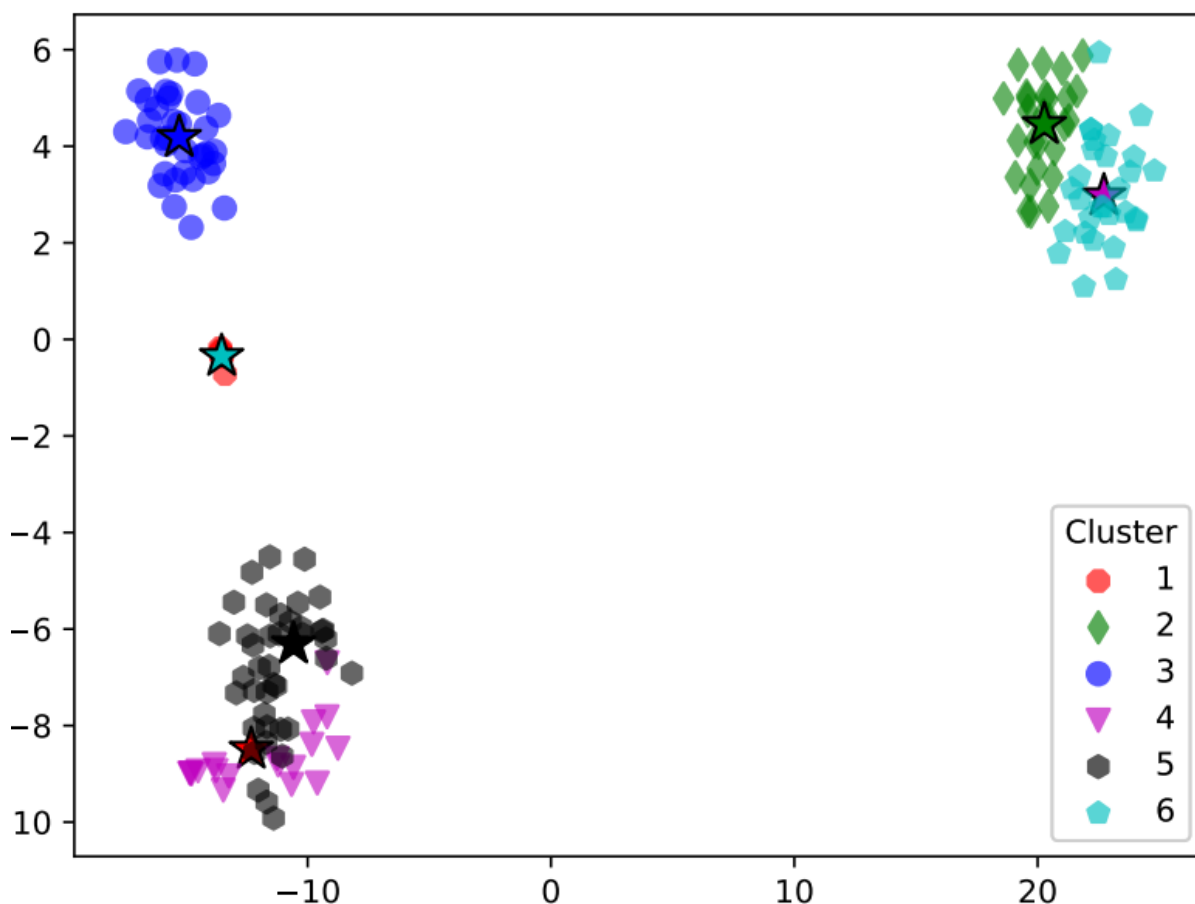


Figure 20. An unsupervised hierarchic clustering of transcriptomic data from 155 metastatic samples

Six clusters are identified, mainly corresponding to the different cancer types: Clusters 1, 2 and 6 are melanoma metastases; cluster 3 is only including lymphoma metastases; clusters 4 and 5 are breast cancer metastases.

Nous avons ensuite analysé séparément des échantillons métastatiques cérébraux provenant de cancers du sein (N = 13), de mélanomes (N = 11) et de lymphomes non hodgkiniens (N = 4), afin d'identifier les gènes qui ne s'exprimaient pas significativement différemment entre ces trois types de cancer. En utilisant un test de Kruskal-Wallis et un seuil de signification pour une valeur P de 5%, nous avons retenu 13623 gènes communs (Figure 21A).

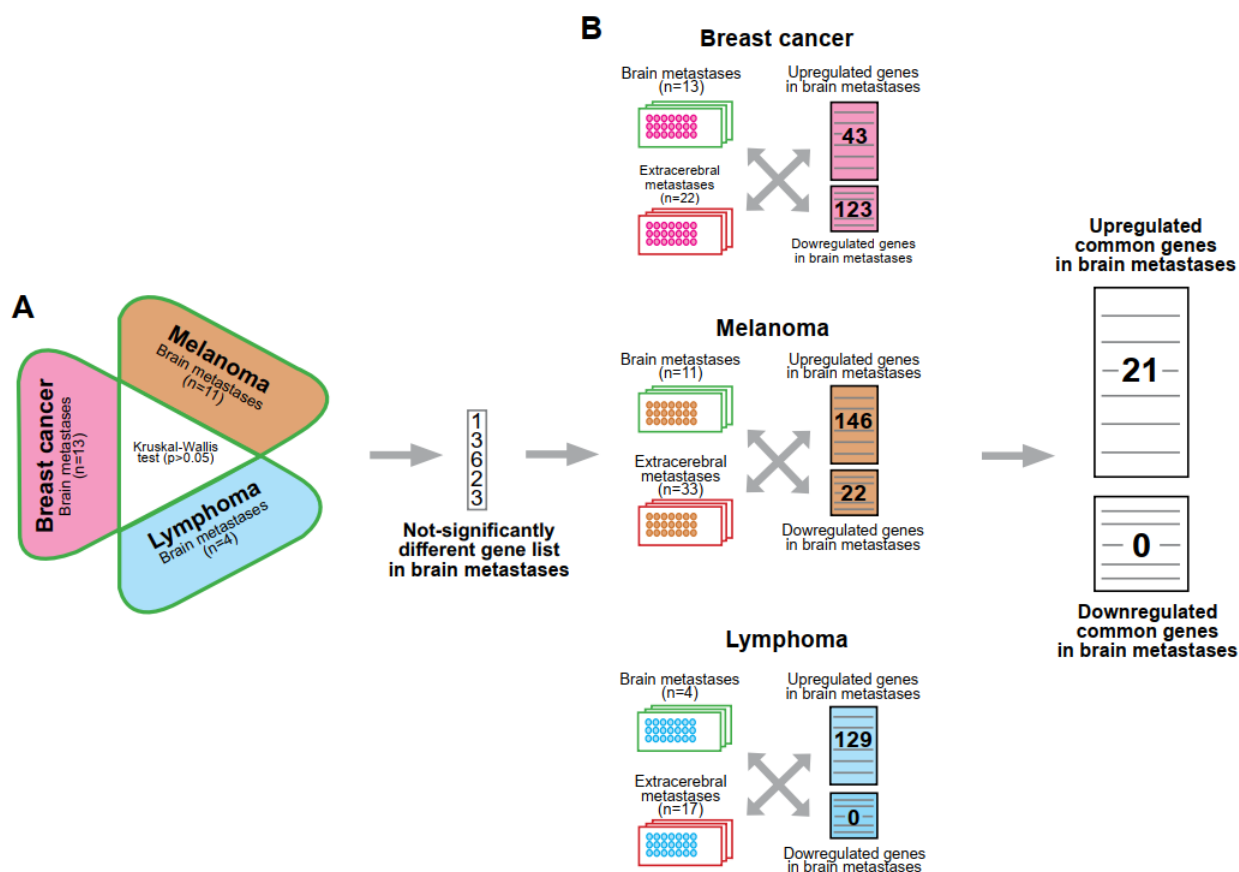


Figure 21. Analytical approach of transcriptomic data from metastases

A. From brain metastases of breast cancers, melanomas and lymphomas, using a Kruskal–Wallis test to identify common genes not significantly expressed differently between the 3 cancer types.

B. Comparisons between brain metastatic samples and extracerebral metastatic samples for each cancer type to identify common genes up-regulated in brain metastases of breast cancers, melanomas, and lymphomas

Pour chaque type de cancer, à l'aide de ce panel de 13623 gènes, nous avons comparé des échantillons métastatiques cérébraux avec des échantillons métastatiques extra-cérébraux afin d'identifier les gènes significativement sur-exprimés ou sous-exprimés dans les métastases cérébrales. Nous nous sommes ensuite demandé s'il existait des gènes couramment sur-exprimés ou sous-exprimés dans les métastases cérébrales des trois types de cancer. Nous avons récupéré 21 gènes communs sur-exprimés dans les métastases cérébrales du cancer du sein, du mélanome et du lymphome (Figure 21B, Tableau 22).

Tableau 22. *Common genes up-regulated in brain metastases of breast cancer, melanoma, and non-Hodgkin lymphoma*

Gene	Breast cancer		Melanoma		Non-Hodgkin lymphoma	
	Fold Change	Rank	Fold Change	Rank	Fold Change	Rank
<i>NKX6-2</i>	20.01	1	26.63	1	83.1	1
<i>KLK6</i>	19.02	2	4.86	15	38.08	3
<i>GFAP</i>	13.81	3	13.07	3	50.01	2
<i>DPYSL5</i>	10.01	4	11.42	4	34.44	5
<i>AQP4</i>	9.11	5	14.78	2	25.35	9
<i>APC2</i>	6.89	6	7.19	8	36.91	4
<i>NCAM1</i>	5.95	7	7.32	7	33.02	6
<i>GAP43</i>	5.71	8	5.21	14	16.36	14
<i>STMN4</i>	5.55	9	8.08	6	30.31	7
<i>MOBP</i>	4.43	10	6.35	12	9.52	18
<i>FAM123A</i>	3.8	11	6.95	9	18.01	13
<i>GPR37L1</i>	3.58	12	8.96	5	26.19	8
<i>C1orf61</i>	3.57	13	3.27	19	12.26	15
<i>GRM3</i>	3.47	14	2.58	21	12	16
<i>CACNG7</i>	3.47	15	5.35	13	23.71	10
<i>SOX2-OT</i>	3.33	16	6.4	11	19.59	11
<i>SPOCK3</i>	3.17	17	6.88	10	18.52	12
<i>MAG</i>	3.12	18	2.93	20	6.84	20
<i>TMEM229A</i>	3.01	19	4.02	16	7.32	19
<i>OMG</i>	2.73	20	3.45	18	5.94	21
<i>LOC284570</i>	2.27	21	3.8	17	9.6	17

Encore une fois, lorsque nous avons fait une classification hiérarchique non supervisée avec 6 grappes ne considérant que les 21 gènes surexprimés dans les métastases cérébrales, deux grappes « grappes 5 et 6 » étaient indépendantes sur le type de tumeur et correspondaient exclusivement à des échantillons métastatiques cérébraux (Tableau 23 et Figure 22).

Tableau 23. Characteristics of 6 clusters with unsupervised hierarchical classification

<b>Variables</b>	<b>Cluster 1</b>	<b>Cluster 2</b>	<b>Cluster 3</b>	<b>Cluster 4</b>	<b>Cluster 5</b>	<b>Cluster 6</b>	<b>P*</b>
	N =23	N = 26	N = 31	N = 54	N = 11	N = 10	
<b>Cancer</b>							<0.0001
Melanoma	0 (0)	0 (0)	0 (0)	54 (100)	4 (36)	4 (40)	
Lymphoma	0 (0)	0 (0)	31 (100)	0 (0)	1 (9)	3 (30)	
Breast-HER2	23 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (18)	2 (20)	
Breast-TN	0 (0)	26 (100)	0 (0)	0 (0)	4 (36)	1 (10)	
<b>Groups</b>							<0.0001
Group 1	1 (4.5)	3 (11.5)	0 (0)	3 (5.5)	11 (100)	10 (100)	
Group 2	10 (43.5)	13 (50)	14 (45)	18 (33.5)	0 (0)	0 (0)	
Group 3	12 (52)	10 (38.5)	17 (55)	33 (61)	0 (0)	0 (0)	
<b>Transcriptome (mean ± SD)</b>							
NKX6.2	3.8 ± 0.5	4.1 ± 0.7	4.3 ± 0.5	4.5 ± 0.6	8.6 ± 1.9	11.8 ± 1.1	<0.0001
KLK6	4.5 ± 2.1	4.7 ± 2.0	4.7 ± 1.5	3.9 ± 0.8	5.9 ± 1.9	8.7 ± 2.2	<0.0001
GFAP	3.4 ± 0.6	3.8 ± 0.9	3.3 ± 0.4	3.4 ± 0.5	7.6 ± 1.0	9.6 ± 1.6	<0.0001
DPYSL5	5.3 ± 2.2	4.4 ± 2.4	3.9 ± 0.9	4.0 ± 1.6	7.2 ± 1.1	10.3 ± 1.4	<0.0001
AQP4	4.9 ± 1.3	5.5 ± 1.6	4.9 ± 1.6	5.2 ± 0.9	8.3 ± 0.8	10.6 ± 1.6	<0.0001
APC2	5.7 ± 1.4	6.0 ± 1.6	5.5 ± 1.1	6.5 ± 1.6	8.8 ± 0.9	10.8 ± 0.7	<0.0001
NCAM1	3.9 ± 0.7	3.6 ± 0.7	4.0 ± 1.0	5.2 ± 1.9	7.0 ± 1.2	9.3 ± 0.8	<0.0001
GAP43	3.7 ± 0.5	3.9 ± 1.2	4.0 ± 0.8	4.4 ± 1.7	6.4 ± 0.9	7.8 ± 1.5	<0.0001
STMN4	3.8 ± 0.8	3.9 ± 0.8	4.5 ± 0.7	4.0 ± 0.7	6.8 ± 1.4	9.0 ± 0.9	<0.0001
MOBP	3.3 ± 0.6	3.1 ± 0.7	3.7 ± 0.5	3.2 ± 0.6	4.9 ± 0.9	7.8 ± 0.8	<0.0001
FAM123A	3.9 ± 0.7	3.8 ± 0.7	4.2 ± 0.8	4.1 ± 0.9	5.8 ± 1.0	8.8 ± 0.5	<0.0001
GPR37L1	5.2 ± 0.8	5.2 ± 1.3	3.9 ± 0.6	4.0 ± 1.3	6.9 ± 0.6	8.9 ± 0.8	<0.0001
C1orf61	4.0 ± 0.9	4.4 ± 1.1	5.4 ± 1.1	4.1 ± 0.6	6.2 ± 1.4	7.9 ± 1.3	<0.0001
GRM3	3.3 ± 0.6	3.3 ± 0.7	3.4 ± 1.0	3.6 ± 0.6	5.1 ± 0.7	6.7 ± 0.4	<0.0001
CACNG7	3.4 ± 0.8	3.8 ± 0.8	3.3 ± 0.6	3.0 ± 0.7	5.6 ± 0.8	7.7 ± 1.0	<0.0001
SOX2.OT	3.8 ± 0.8	3.7 ± 0.4	3.7 ± 0.7	4.2 ± 0.9	5.5 ± 1.0	8.5 ± 0.8	<0.0001
SPOCK3	3.9 ± 0.7	3.6 ± 0.6	3.8 ± 1.3	3.4 ± 0.6	5.5 ± 0.9	8.2 ± 0.7	<0.0001
MAG	5.2 ± 0.4	5.4 ± 1.1	6.8 ± 0.7	6.4 ± 1.0	6.9 ± 1.0	9.5 ± 1.0	<0.0001
TMEM229A	3.5 ± 0.7	3.7 ± 0.6	4.3 ± 1.1	4.2 ± 1.2	5.5 ± 1.1	7.4 ± 0.7	<0.0001
OMG	3.5 ± 0.9	3.4 ± 0.6	3.8 ± 0.5	4.3 ± 1.3	5.0 ± 1.0	7.2 ± 0.4	<0.0001
LOC284570	4.1 ± 0.5	4.2 ± 0.6	3.6 ± 0.6	3.9 ± 0.7	5.2 ± 0.6	7.2 ± 1.1	<0.0001

\* P value for Chi2 test (qualitative variables) or ANOVA test (quantitative variables)

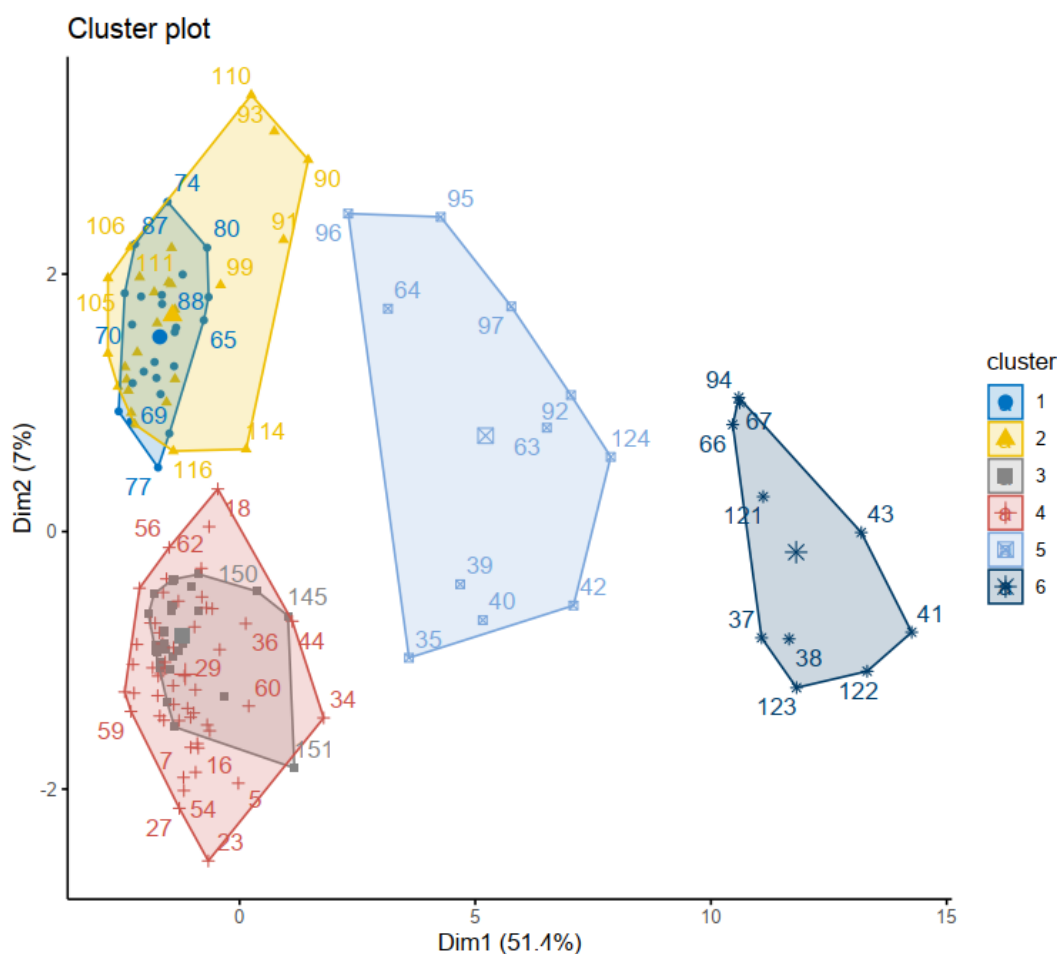


Figure 22. An unsupervised hierarchic clustering of transcriptomic data from 21 genes up-regulated in brain metastases

Six clusters are identified. Clusters 1, 2,3 and 4 correspond to the three cancer types (respectively HER-2 positive breast cancer, tripple negative breast cancer, lymphoma and melanoma); clusters 5 and 6 exclusively include brain metastatic samples from the three different cancer types

La plupart de ces 21 gènes sont impliqués dans le développement du système nerveux central. Nous avons effectué une recherche documentaire systématique pour ces 21 gènes, afin de comprendre leur lien potentiel avec les métastases cérébrales, les tumeurs cérébrales primaires et les caractéristiques de la cancérogénèse (Tableau 24). Un seul gène, *GAP43*, a été signalé comme étant surexprimé dans les métastases cérébrales du cancer du poumon par rapport aux tumeurs primaires<sup>186</sup>. En considérant les 10 premiers gènes, y compris Kallikrein-6 (*KLK6*), 8 d'entre eux ont été décrits dans la pathogenèse des tumeurs cérébrales primaires, principalement le glioblastome. Leur surexpression était associée à une survie plus courte<sup>187-190</sup>. Nous avons décidé de nous concentrer sur *KLK6* car il y avait 14 références liées aux caractéristiques de la cancérogénèse dans plusieurs types de cancer différents (Tableau 24), y compris la prolifération, la migration et l'invasion<sup>191-193</sup>.



Tableau 24. Role of 21 overexpressed genes in brain metastases of breast cancer, melanoma and lymphoma

Genes	Function	Brain metastasis				Primary brain tumor			Carcinogenesis hallmarks				
		Yes /No	N*	Cancer type	Ref	Yes /No	Type of tumor	N*	Ref	Yes /No	N*	Cancer type	Ref
<i>NKX6-2</i>	Homeobox protein Nkx-6.2; Transcription factor. Regulation of axon-glia interactions at myelin paranodes in oligodendrocytes	No	-	-	-	Yes	Oligo-dendroglioma	1	194	Yes	1	Gastric	195
<i>GFAP</i>	Glial fibrillary acidic protein, distinct astrocytes from other glial cells during the development of the CNS	Yes	2	Lung, breast*	149, 150	Yes	Glioblastoma	4	190,198-200	No	-	-	-
<i>DPYSL5 (CRMP5)</i>	Dihydropyrimidinase-related protein 5; neuronal differentiation	No	-	-	-	Yes	Glioblastoma	1	201(p5)	Yes	5	Prostate, colorectal, osteosarcoma-glioblastoma	201,202,203(p5), 204,205
<i>AQP4</i>	Aquaporin-4; regulates body water balance and mediates water flow within the CNS	No	-	-	-	Yes	Glioblastoma	5	206-210	Yes	3	Lung, glioma	211-213
<i>APC2</i>	Adenomatous polyposis coli protein 2; Stabilizes microtubules and may regulate actin fiber dynamics through the activation of Rho family GTPases.	No	-	-	-	No	-	-	-	No	-	-	-
<i>NCAMI</i>	Neural cell adhesion molecule 1; neuron-neuron adhesion, outgrowth of neurites	No*	-	-	-	Yes	Glioblastoma, primary CNS lymphoma	2	214,215	Yes	3	Melanoma, ameloblastoma, pancreatic cancer cell	216-218

<b>KLK6</b>	Kallikrein-6; regulation of axon outgrowth following spinal cord injury	No	-	-	-	<b>Yes</b>	High grade astrocytoma, glioblastoma	3	187,189, 219	<b>Yes</b>	14	<b>Colorectal, gastric, squamous skin tumors, colon, lung, melanoma, breast, head and neck cancer</b>	191–193,220–229
<i>STMN4</i>	Stathmin-4; involved in neuron projection development	No	-	-	-	<b>Yes</b>	Neuroblastoma	1	230	No	-	-	-
<i>GPR37L1</i>	Prosaposin receptor GPR37L1; Receptor for the neuroprotective	No	-	-	-	No	-	-	-	No	-	-	-
<i>FAM123A</i>	APC membrane recruitment protein 2; Negative regulator of the canonical Wnt signaling pathway involved in neuroectodermal patterning	No	-	-	-	No	-	-	-	No	-	-	-
<b>GAP43</b>	Growth associated protein 43; Neuromodulin; associated with nerve growth. Plays a role in axonal and dendritic filopodia induction	<b>Yes</b>	1	<b>NSCLC</b>	<sup>186</sup>	No	-	-	-	<b>Yes</b>	1	NSCLC	186,231
<i>SOX2-OT</i>	SOX2 Overlapping Transcript/ non protein coding; This gene produces alternatively spliced long non-coding RNAs, Overexpression of these	No	-	-	-	No	-	-	-	<b>Yes</b>	9	Breast, ovarian, prostate, head and neck, glioblastoma, cholangio-carcinoma,	232(pp2-),233–237,238(p4),239, 240

	transcripts may promote cell proliferation												osteosarcoma
<i>CACNG7</i>	Voltage-dependent calcium channel gamma-7 subunit; Promotes their targeting to the cell membrane and synapses	No	-	-	-	No	-	-	-	No	-	-	-
<i>SPOCK3</i> ( <i>Testican 3</i> )	Sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan; May participate in diverse steps of neurogenesis.	No	-	-	-	No	-	-	-	Yes	1	-	241
<i>MOBP</i>	Myelin-associated oligodendrocyte basic protein; involved in nervous system development	No	-	-	-	No	-	-	-	No	-	-	-
<i>C1orf61</i>	- Chromosome 1 open reading frame 61; development and remodeling of neurons	No	-	-	-	No	-	-	-	Yes	1	HCC	242
<i>GRM3</i>	Metabotropic glutamate receptor 3; Ligand binding causes a conformation change that triggers signaling via guanine nucleotide-binding proteins (G proteins) and modulates the activity of down-stream effectors.	No	-	-	-	No	-	-	-	Yes	4	Breast, colon cancer, melanoma	243-246
<i>TMEM229A</i>	Transmembrane protein 229A, Predicted to be integral component of	No	-	-	-	No	-	-	-	Yes	1	NSCLC	247

	membrane, role in tooth differentiation and development												
<i>LOC284570</i>	Uncharacterized												
<i>MAG</i>	Myelin-associated glycoprotein; Adhesion molecule that mediates interactions between myelinating cells and neurons, maintenance of normal axon myelination. Protects motoneurons against apoptosis	No	-	-	-	Yes	Astrocytic, meningeal tumor	1	<sup>248(p)</sup>	No	-	-	-
<i>OMG</i>	Oligodendrocyte-myelin glycoprotein; Cell adhesion, required for myelination in the CNS	No	-	-	-	No	-	-	-	No	-	-	-

### **La surexpression de *KLK6* est liée à la localisation métastatique cérébrale**

À l'aide de la RT-qPCR, nous avons ensuite évalué l'expression de *KLK6* dans des cellules cancéreuses microdisséquées au laser à partir des 155 échantillons métastatiques de notre série initiale. Nous avons comparé l'expression de *KLK6* dans les trois groupes en fonction des localisations métastatiques et du type d'échantillons métastatiques analysés (Figure 23A). Lorsque les 155 échantillons ont été regroupés, nous avons montré une surexpression significative de *KLK6* dans le groupe 1 par rapport au groupe 2 ou au groupe 3 ( $p < 0,001$  et  $p < 0,05$ , respectivement) (Figure 23B).

Lorsque nous avons analysé chaque type de cancer séparément, nous avons confirmé que l'expression de *KLK6* était significativement plus élevée dans les métastases cérébrales (groupe 1) que dans les métastases extra-cérébrales (groupes 2 et 3) (Figure 23C, D et E). En particulier, il convient de noter que *KLK6* n'était pas surexprimé dans les métastases extra-cérébrales du patient ayant développé des métastases cérébrales.

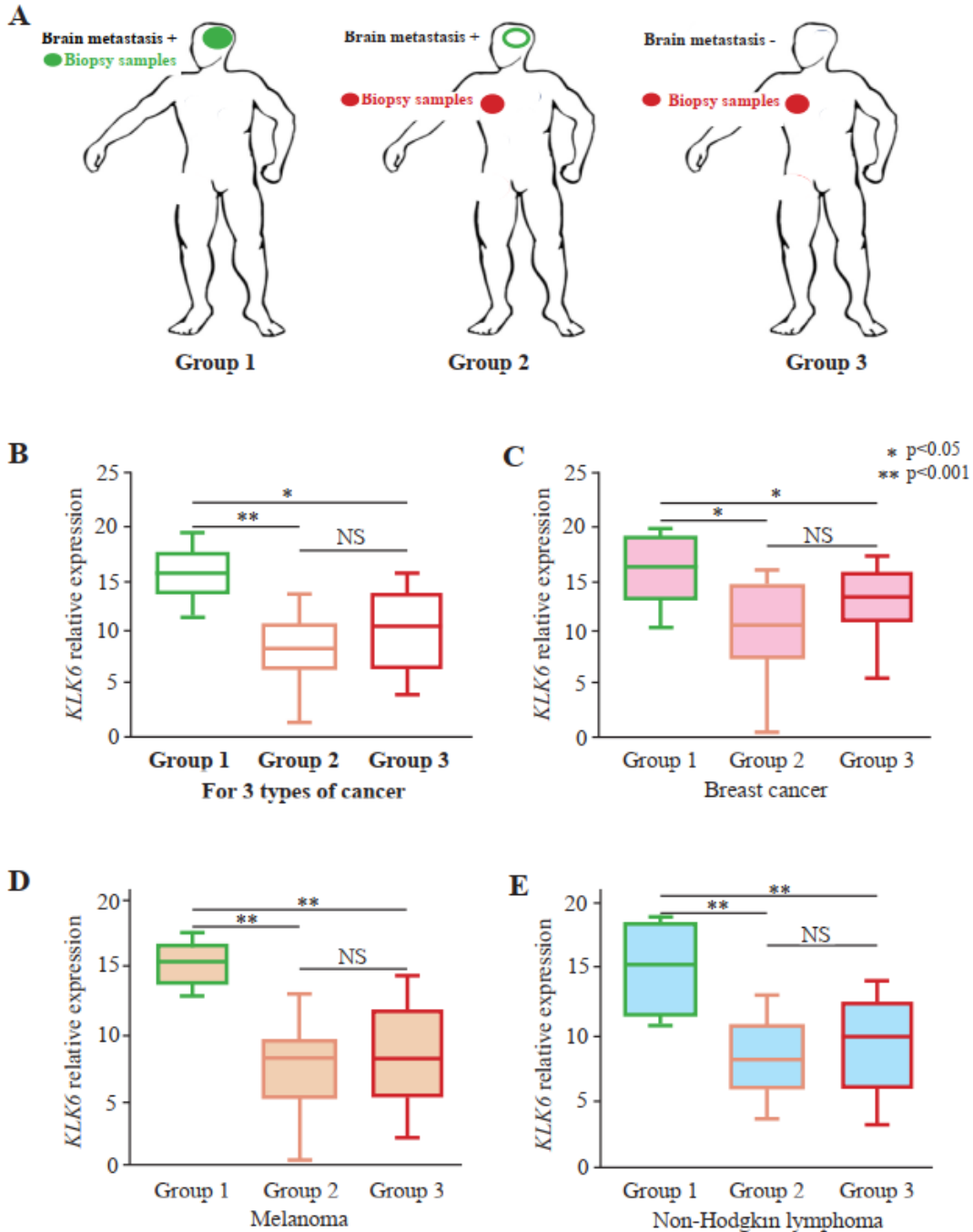


Figure 23. *KLK6* mRNA expression according to subgroups in the 3 cancer types

A. Group 1 includes patients with brain metastases and a brain metastatic sample; group 2 includes patients with brain metastases and an extracerebral metastatic sample; group 3 includes patients without brain metastases, and an extracerebral metastatic sample.

B. *KLK6* mRNA expression among the three groups, and then separately in each cancer type (C, D, E)

Pour confirmer les résultats de nos données transcriptomiques sur des échantillons individuels, nous avons évalué l'expression de l'ARNm d'un autre gène significativement surexprimé dans les métastases cérébrales des trois types de cancer, *AQP4* (Tableau 22). Encore une fois, nous avons constaté une surexpression significative de l'*AQP4* dans le groupe 1 par rapport au groupe 2 ou au groupe 3 (Figure 24).

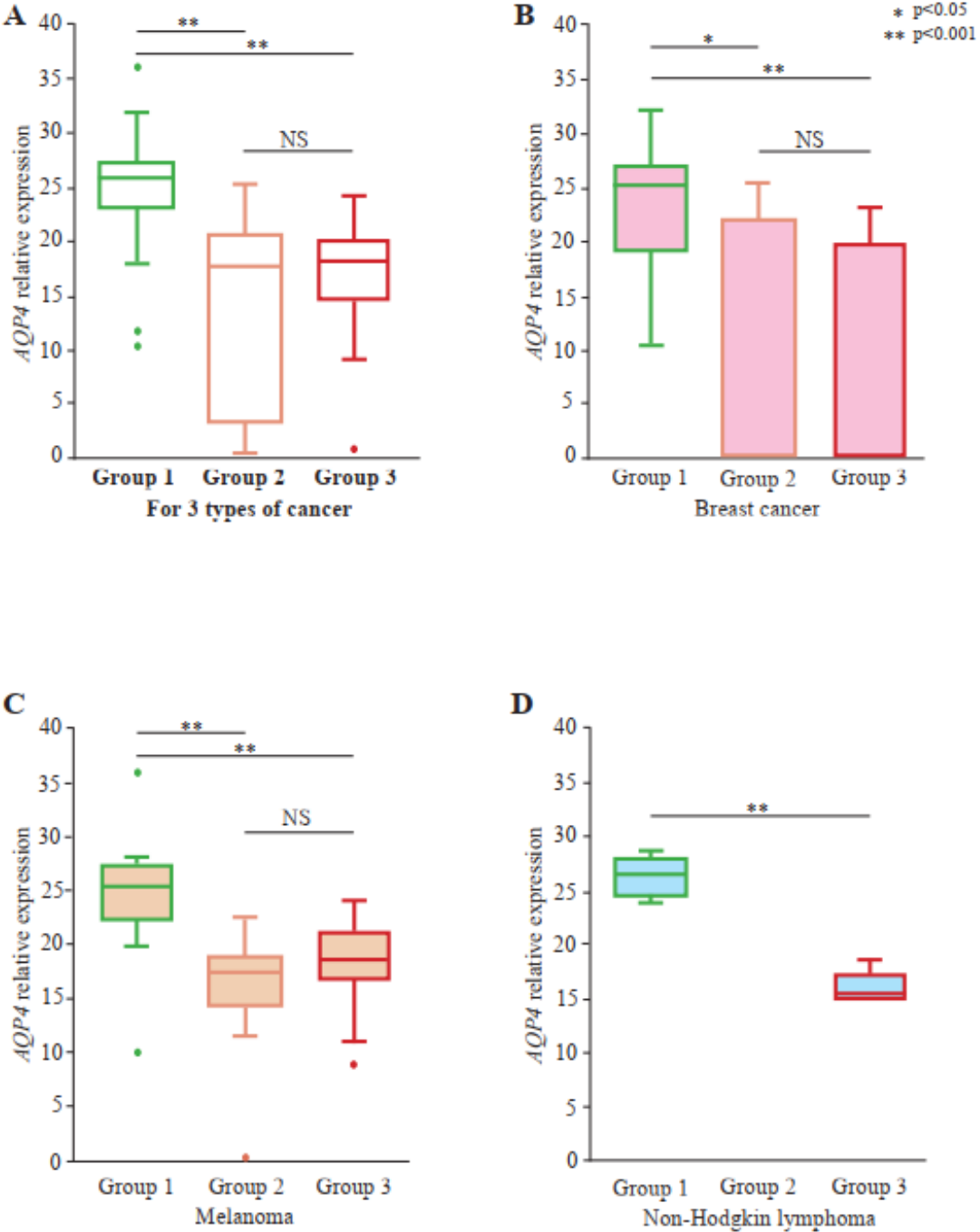


Figure 24. *AQP4* mRNA expression according to subgroups in the 3 cancer types. *AQP4* mRNA expression among the three groups (A), and then separately in each cancer type (B, C, D)

Au niveau des protéines, nous avons également évalué l'expression de KLK6 sur les 155 échantillons de métastases cérébrales et extra-cérébrales par immunohistochimie (Figure 25A). Lorsque nous avons comparé le score moyen KLK6 dans les trois groupes différents, nous avons montré que le « score IHC » moyen de KLK6 était significativement plus élevé dans le groupe 1 par rapport au groupe 2 (6,0 vs 2,1,  $p < 0,001$ ) et au groupe 1 par rapport au groupe 3 (6,0 vs, 1,9,  $p < 0,001$ ) (Figure 25B). En particulier, l'expression de la protéine KLK6 n'était pas significativement plus élevée dans les échantillons métastatiques extra-cérébraux de patients ayant développé des métastases cérébrales par rapport à ceux qui n'en avaient pas.

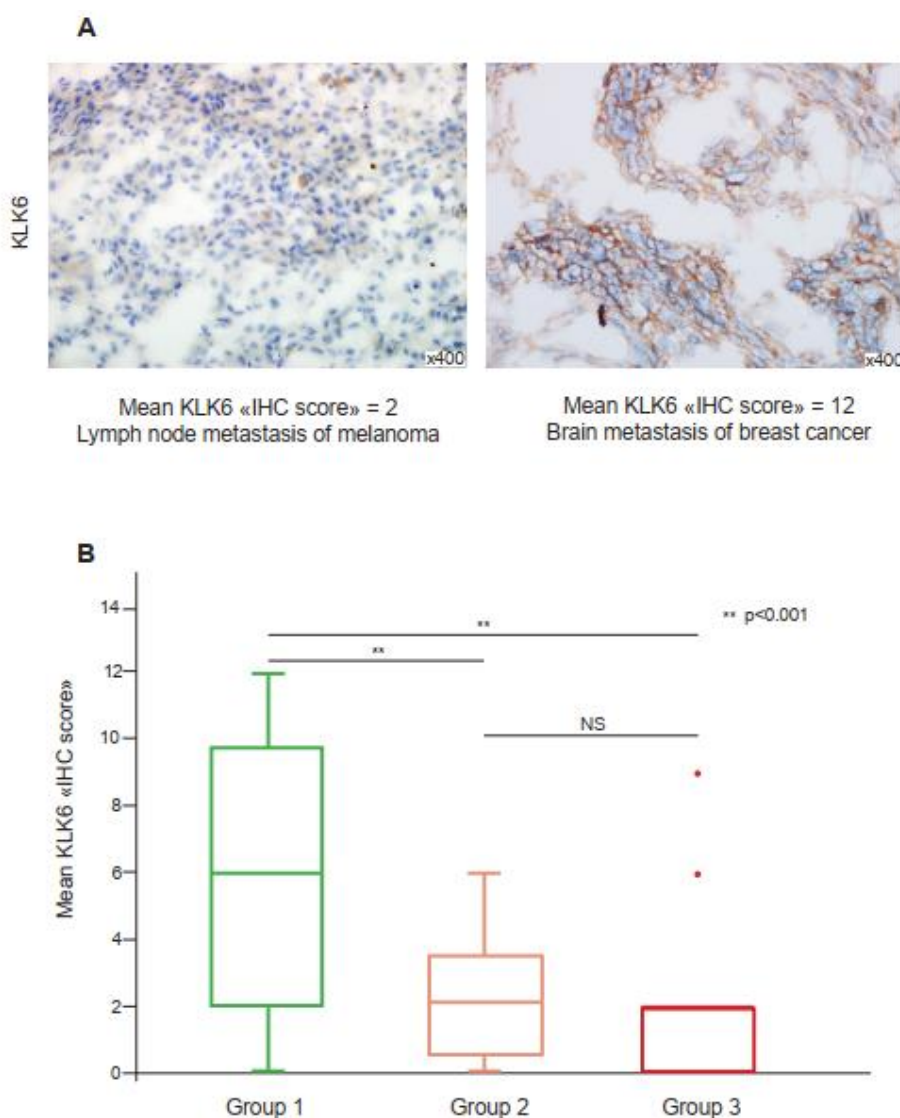


Figure 25. KLK6 protein expression using an immunohistochemistry score

A. This panel shows KLK6 expression in a melanoma lymph node metastasis with a low “IHC score” of 2 (left panel), and in a breast cancer brain metastasis with a high “IHC score” of 12 (right panel).

B. KLK6 mean “IHC score” is significantly higher in Group 1 compared to Group 2 (6.0 vs. 2.1,  $P < 0.001$ ), and Group 1 compared to Group 3 (6.0 vs. 1.9,  $P < 0.001$ )



Dans l'ensemble, les résultats suggèrent que la surexpression de *KLK6* est liée à des localisations métastatiques cérébrales et à l'implantation de cellules cancéreuses dans le parenchyme cérébral, quel que soit le type de cancer.

### **En modélisant la propagation métastatique cérébrale chez la souris, *KLK6* est-il un facteur adaptatif?**

Après l'injection intracardiaque de lignées cellulaires cancéreuses, les souris ont été euthanasiées après un temps médian de 12 jours pour les cellules 4T1, de 42 jours pour les cellules MDA-MB-231 et de 45 jours pour les cellules S49.1. Toutes les souris sauf deux ont développé des métastases cérébrales. Au moment de l'euthanasie, pour chaque souris, le pourcentage d'extension métastatique cérébrale a été calculé et l'expression de l'ARNm *KLK6* a été évaluée dans des cellules cancéreuses microdisséquées au laser. En considérant toutes les souris, il y avait une corrélation significative entre l'expression de l'ARNm *KLK6* et la surface moyenne des métastases cérébrales ( $R^2 = 0,87$ ,  $P < 0,001$ ) (Figure 26A).

Pour les trois lignées cellulaires, les métastases extracérébrales ont été distribuées dans divers organes, y compris les poumons, le foie, la rate, les ovaires et les reins (données non présentées). Pour les lignées cellulaires 4T1 et MDA-MB-21, les localisations métastatiques pulmonaires étaient les plus fréquentes, tandis qu'elles étaient principalement distribuées dans la rate pour la lignée cellulaire S49.1. Pour chaque souris, nous avons également évalué l'expression de l'ARNm *KLK6* dans des cellules cancéreuses microdisséquées au laser d'un échantillon métastatique extracérébral. Pour les deux lignées cellulaires murines (4T1 et S49.1) et en considérant chaque lignée cellulaire comme référence, l'expression de l'ARNm *KLK6* était significativement plus élevée dans les métastases cérébrales que dans les métastases extracérébrales ( $-ddCq = 6,9$  vs  $-3,1$ ,  $P < 0,001$  pour 4T1 et  $12,3$  vs  $8,6$ ,  $P < 0,01$  pour S49.1), imitant ainsi ce que nous avons observé chez les patients. En revanche, des résultats similaires n'ont pas été obtenus pour la lignée cellulaire cancéreuse humaine MDA-MB-231 greffée chez des souris receveuses, ce qui suggère un mécanisme intra-espèce (Figure 26B).

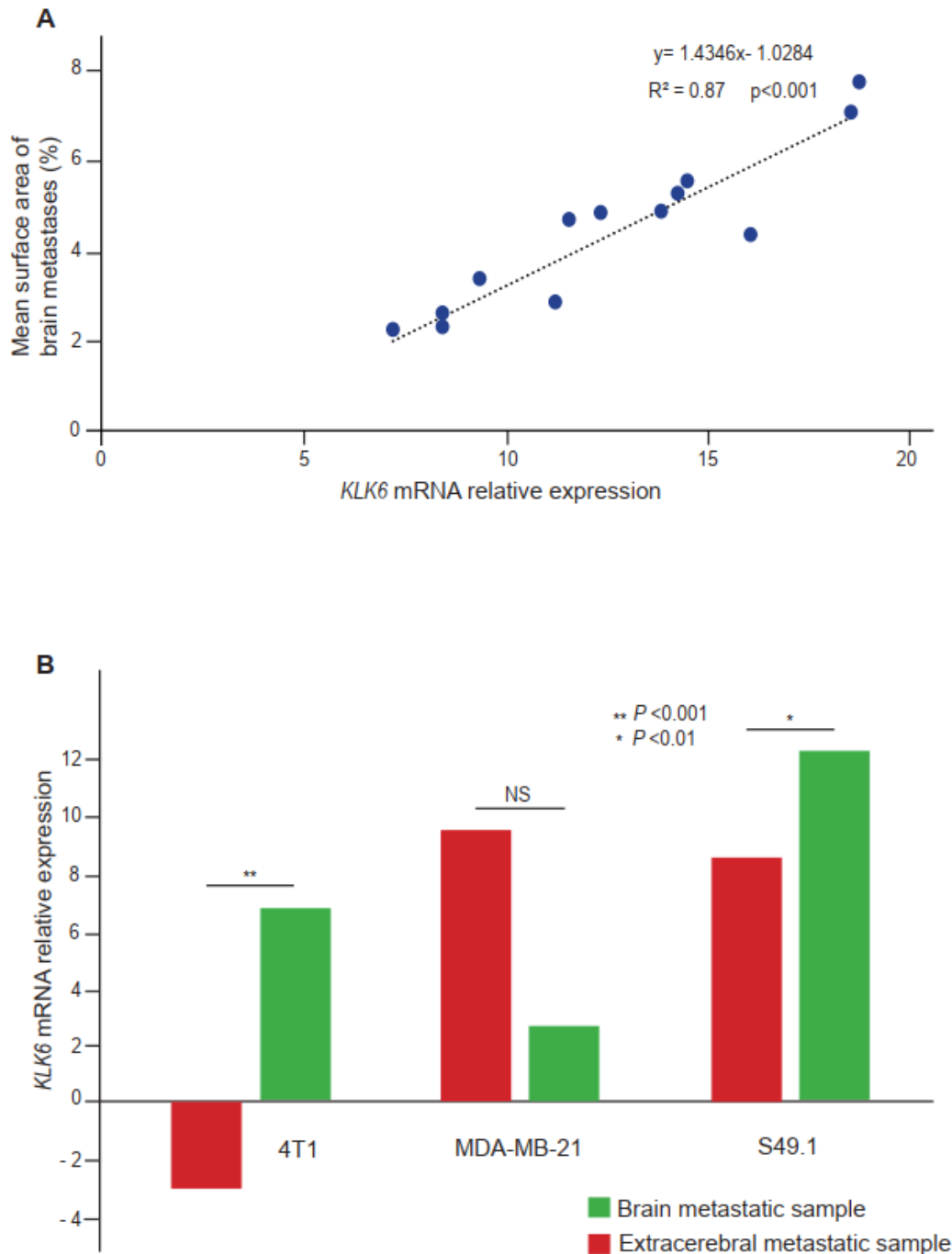


Figure 26. Modeling *KLK6* overexpression in syngeneic models of brain metastases

A. Correlation between *KLK6* mRNA expression and the mean surface area of brain metastases. The Kendall rank correlation coefficient is calculated between *KLK6* mRNA expression and the mean surface area of brain metastases for corresponding mouse models.

B. For 4T1 and S49.1 cell lines, *KLK6* mRNA expression is significantly higher in brain metastases compared to extracerebral metastases ( $-ddCq = 6.9$  vs.  $-3.1$ ,  $P < 0.001$  for 4T1, and  $12.3$  vs.  $8.6$ ,  $P < 0.01$  for S49.1). For MDA-MB-231 cell line, the difference is not significant.

### 3.3. Discussions

Dans cette étude, chez des patientes et dans des modèles murins, nous avons démontré que la surexpression de *KLK6* est liée à l'implantation métastatique cérébrale dans les cancers du sein métastatiques, les mélanomes et les lymphomes.

*KLK6*, également connu sous le nom de hK6, neurosine, protéase M ou zyme, est codé par le gène *KLK6* et est une protéase sérine avec des propriétés semblables à celles de la trypsine. Il est physiologiquement exprimé dans un large éventail de tissus, avec la plus haute expression dans le système nerveux central. En particulier, *KLK6* est fortement exprimé dans les cellules luminales qui tapissent le plexus choroïde, dans les oligodendrocytes et les cellules endothéliales cérébrales de la matière grise, et dans les nerfs périphériques<sup>249,250</sup>. Dans les 155 métastases cérébrales humaines de notre étude clinique, la surexpression de l'ARNm *KLK6* ainsi que les signatures cérébrales que nous avons trouvées n'étaient pas liées à cette expression physiologique de *KLK6* et à une contamination avec le tissu cérébral normal. En effet, tous les échantillons ont été microdisséqués au laser pour sélectionner et analyser uniquement les cellules cancéreuses, ce qui est la force de notre étude. Nous avons précédemment démontré la faisabilité d'effectuer des études transcriptomiques complètes pertinentes sur des échantillons métastatiques congelés microdisséqués au laser<sup>71,72</sup>.

Nous avons confirmé que la surexpression de l'ARNm *KLK6* dans les métastases cérébrales était associée à une surexpression accrue des protéines *KLK6* par les cellules cancéreuses. Cette surexpression partagée de *KLK6* dans les métastases cérébrales du cancer du sein, du mélanome et du lymphome non hodgkinien n'a jamais été rapportée. Notre approche est originale puisque la plupart des études se concentrent généralement sur un seul type de cancer, et les signatures partagées entre les types de cancer sont donc limitées. Une étude précédente a proposé une signature métastatique commune à différents types de cancer en comparant 12 échantillons métastatiques à des tumeurs primaires non appariées<sup>251</sup>. Selon l'hypothèse des semences et du sol, la croissance réussie d'une métastase dépend des interactions entre les cellules cancéreuses (graines) et l'organe métastasé (sol). Pour s'implanter, les cellules cancéreuses circulantes ont besoin d'un « sol adapté », et moins de 0,01% d'entre elles réussissent à former des métastases<sup>252</sup>. Différents types et sous-types de cancer ont des sites métastatiques préférés distincts. Le profil d'expression génique des cellules métastatiques est un déterminant clé de la formation de métastases spécifiques au site<sup>253,254</sup>. Mais il n'est pas clair s'il existe des signatures spécifiques liées à des sites métastatiques spécifiques aux organes<sup>176</sup>. À l'aide de bases de données transcriptomiques publiques, Zhang et al. ont identifié une signature de métastases cérébrales commune aux cancers du poumon et du sein, tout en

normalisant leurs données à l'aide d'une « signature cérébrale normale »<sup>255</sup>. Dans notre étude, nous avons mis en évidence que la signature de 21 gènes, y compris la surexpression de KLK6 dans les métastases cérébrales, semble liée à un processus adaptatif des cellules cancéreuses métastatiques, imitant la « biologie normale » de l'organe métastasé, afin de faciliter leur implantation.

Dans notre modèle préclinique, nous avons également confirmé que la surexpression de KLK6 est liée à l'implantation métastatique cérébrale, mais uniquement dans des modèles syngéniques et non xénogéniques. Étant donné que l'homologie de la protéine KLK6 est de 68% entre l'homme et la souris<sup>256</sup>, nos résultats sont en faveur d'un processus adaptatif intra-espèce de surexpression de KLK6 après implantation cérébrale de cellules cancéreuses métastatiques.

Une autre force de notre étude est que nous avons effectué une analyse transcriptomique sur des échantillons métastatiques cérébraux et les avons comparés aux données transcriptomiques des métastases extra-cérébrales. Nous avons identifié 21 gènes associés à une signature de métastases cérébrales. Dans une méta-analyse des altérations génomiques dans les métastases cérébrales du cancer du sein, nous avons souligné la valeur ajoutée de l'obtention de biopsies à partir de métastases cérébrales pour explorer pleinement leur biologie<sup>100</sup>. Dans cette méta-analyse, nous avons identifié un panel de 6 gènes présentant une prévalence de mutation plus élevée dans les métastases cérébrales que dans les métastases extra-cérébrales, d'un intérêt particulier pour leur rôle potentiel dans le processus métastatique cérébral. Les métastases cérébrales peuvent provenir d'un clone minoritaire au sein d'une tumeur primaire ou d'une autre localisation métastatique<sup>66,175</sup>, et il existe peu d'études transcriptomiques obtenues à partir d'échantillons métastatiques cérébraux, la plupart d'entre elles comparant les données transcriptomiques des tumeurs primaires et des métastases cérébrales (Tableau 25).

Tableau 25. Main characteristics of the 10 studies with transcriptomic analysis of brain metastases

<b>ID</b>	<b>First author, year</b>	<b>Cancer type</b>	<b>Samples compared</b>	<b>Method</b>	<b>Results</b>
1	Tsakonas et al <sup>257</sup> , 2020	NSCLC	25 BM vs. 13 primary tumor (13 paired)	mRNA array analysis using the nanoString Pan-Cancer Immune Oncology panel	12-gene immune signature separated brain metastases from primary tumours: (CCL19, CCL21, CXCL9, CCL14, CCL18) or cytokine-receptor families (IL2RB, IL21R), and the five most differentially expressed transcripts: CD48, GZMA, ITGA4, RUNX3 and TPSAB1
2	Liu et al <sup>258</sup> , 2020	Lung cancer	10 BM vs. 18 primary tumors	single-cell transcriptome	801 upregulated and 249 downregulated genes in the primary tumor compared to brain metastasis
3	Iwamoto et al <sup>259</sup> , 2019	Breast cancer	16 BM vs. 16 primary tumors	Genome-wide expression using Affymetrix U133A gene chips	VEGFA and DNMT3A demonstrated significantly higher gene expression in brain metastases.
4	Ferguson et al <sup>260</sup> , 2018	Breast, melanoma, NSCLC	16,999 unmatched primary tumor and/or systemic metastases; brain metastases	gene amplification (assayed by in situ hybridization)	TOP2A expression was increased in brain metastases from all 3 cancers
5	Priedigkeit et al <sup>261</sup> , 2017	Breast cancer	17 BM vs. 17 primary tumors (paired)	Nanostring gene expression	ERBB2/HER2 was the most recurrent alteration showing at least a 2-fold expression increase in 35% of brain metastases. FGFR4 showed increased expression in 30% of brain metastases
6	Lee et al <sup>262</sup> , 2016	Breast cancer	20 primary tumors vs. 41 BM	NanoString nCounter Analysis covering 252 target genes	Expression levels of SOX2 and OLIG2 were downregulated in primary BC compared to BCBM.
7	Jeevan et al <sup>263</sup> , 2016	NSCLC	26 BM vs. normal brain	cDNA microarray	Metastatic brain tumor samples displayed expression of epithelial markers (zinc finger protein SNAI1 and Twist-related protein-1), and the mesenchymal marker vimentin. The stem cell marker CD44 was also highly expressed.
8	Wikman et al <sup>264</sup> , 2014	Breast cancer	39 primary tumor 20 BCBM tissue samples.	q-RT PCR	SPARC, RECK, TNFAIP3 and CXCL14 were down-regulated (p < 0.05) in BCBM as compared to primary BC samples irrespectively of the cancer subtype.
9	Palmieri et al <sup>265</sup> , 2009	Breast cancer	9 primary tumors vs. 8 BM	Microarray	Q-PCR analysis confirmed statistically significant differences or strong trends in the expression of six genes: BMP1, PEDF, LAMγ3,

---

SIAH, STHMN3 and TSPD2. Hexokinase 2 (HK2) was increased expression in brain metastases

---

10	Bos et al <sup>17</sup> , 2009	breast cancer	13 brains, 8 bone, 3 liver, 12 lung and 2 ovary human metastases from breast cancer patients	Microarray	17 genes whose expression was correlated with the presence of brain metastases, the 17 genes are: COL13A1, HBEGF, B4GALT6, MMP1, PLOD2, PELI1, CSF3, ANGPTL4, PTGS2, PSCN1, LTBP1, LAMA4, RGC32, RARRES3, TNFSF10, SCNN1A and SEPP1
----	-----------------------------------	---------------	--	------------	---

---

BM: brain metastases

BCBM: breast cancer brain metastases

Fait intéressant, dans notre modèle préclinique, nous avons constaté qu'une expression plus élevée de l'ARNm *KLK6* dans les métastases cérébrales était également associée à une plus grande surface métastatique cérébrale, ce qui suggère que la surexpression de *KLK6* contribue non seulement à l'implantation cérébrale adaptative des cellules cancéreuses, mais aussi à la progression de la maladie elle-même. Des études *in vitro* ont montré que *KLK6* dégrade le fibrinogène et divers collagènes, qui sont des composants de la membrane basale<sup>192,266</sup>, contribuant à l'invasion et à la migration des cellules cancéreuses<sup>191,193,222,223,225,228</sup>. La surexpression de *KLK6* a également été signalée pour augmenter la prolifération des cellules cancéreuses<sup>191,193</sup>, mais aussi la résistance cellulaire. Chez les patients atteints de glioblastome, la surexpression de *KLK6* est associée à un grade plus élevé et à un pronostic défavorable, lié à une résistance à l'apoptose<sup>187</sup>.

### **3.4. Conclusion et perspective**

Il s'agit de la première analyse transcriptomique sur des échantillons métastatiques microdisséqués au laser provenant de trois types de cancer différents, le cancer du sein, le mélanome et le lymphome. Dans cette étude, nous avons identifié que la surexpression de *KLK6* est liée aux localisations cérébrales, ce qui pourrait être une stratégie prometteuse pour utiliser l'anti-*KLK6* pour ces localisations difficiles, quel que soit leur organe d'origine, en attendant le ciblage spécifique des cellules cancéreuses pour éviter la cytotoxicité sur les cellules cérébrales normales.

Dans ce projet, nous visons à décrypter une signature commune aux métastases cérébrales dans trois types de cancer, liée à cette localisation spécifique de mauvais pronostic. Nous souhaitons également voir s'il existe des différences entre deux populations de patients français et vietnamiens. En effet, dans les cancers somatiques, les études génétiques comparatives des populations asiatiques et occidentales sont rares. Et les données des populations occidentales ne doivent pas être automatiquement généralisées à d'autres populations. Ce projet translationnel est d'une grande importance car il répond à un défi de soins quotidien. Il offre l'opportunité d'appliquer des approches biologiques innovantes au domaine des soins aux patients et de la valorisation des potentiels et du développement industriel.

## Bibliographies

1. Cagney DN, Martin AM, Catalano PJ, et al. Incidence and prognosis of patients with brain metastases at diagnosis of systemic malignancy: a population-based study. *Neuro Oncol.* 2017;19(11):1511-1521. doi:10.1093/neuonc/nox077
2. Barnholtz-Sloan JS, Sloan AE, Davis FG, Vigneau FD, Lai P, Sawaya RE. Incidence proportions of brain metastases in patients diagnosed (1973 to 2001) in the Metropolitan Detroit Cancer Surveillance System. *J Clin Oncol.* 2004;22(14):2865-2872. doi:10.1200/JCO.2004.12.149
3. Hsiao SH, Chou YT, Lin SE, et al. Brain metastases in patients with non-small cell lung cancer: the role of mutated-EGFRs with an exon 19 deletion or L858R point mutation in cancer cell dissemination. *Oncotarget.* 2017;8(32):53405-53418. doi:10.18632/oncotarget.18509
4. Kuksis M, Gao Y, Tran W, et al. The incidence of brain metastases among patients with metastatic breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Neuro-Oncology.* 2021;23(6):894-904. doi:10.1093/neuonc/noaa285
5. Zhang D, Wang Z, Shang D, Yu J, Yuan S. Incidence and prognosis of brain metastases in cutaneous melanoma patients: a population-based study. *Melanoma Res.* 2019;29(1):77-84. doi:10.1097/CMR.0000000000000538
6. Nieder C, Spanne O, Mehta MP, Grosu AL, Geinitz H. Presentation, patterns of care, and survival in patients with brain metastases. *Cancer.* 2011;117(11):2505-2512. doi:10.1002/cncr.25707
7. Ramakrishna N, Temin S, Chandarlapaty S, et al. Recommendations on disease management for patients with advanced human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer and brain metastases: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline. *J Clin Oncol.* 2014;32(19):2100-2108. doi:10.1200/JCO.2013.54.0955
8. Vogelbaum MA, Brown PD, Messersmith H, et al. Treatment for Brain Metastases: ASCO-SNO-ASTRO Guideline. *JCO.* 2022;40(5):492-516. doi:10.1200/JCO.21.02314
9. Angeli E, Nguyen TT, Janin A, Bousquet G. How to Make Anticancer Drugs Cross the Blood–Brain Barrier to Treat Brain Metastases. *Int J Mol Sci.* 2019;21(1):22. doi:10.3390/ijms21010022



10. Sperduto PW, Mesko S, Li J, et al. Survival in Patients With Brain Metastases: Summary Report on the Updated Diagnosis-Specific Graded Prognostic Assessment and Definition of the Eligibility Quotient. *JCO*. 2020;38(32):3773-3784. doi:10.1200/JCO.20.01255
11. Achrol AS, Rennert RC, Anders C, et al. Brain metastases. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1):1-26. doi:10.1038/s41572-018-0055-y
12. Valastyan S, Weinberg RA. Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cell*. 2011;147(2):275-292. doi:10.1016/j.cell.2011.09.024
13. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. *Cell*. 2010;141(1):52-67. doi:10.1016/j.cell.2010.03.015
14. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
15. Liao T, Yang M. Revisiting epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: the connection between epithelial plasticity and stemness. *Mol Oncol*. 2017;11(7):792-804. doi:10.1002/1878-0261.12096
16. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(7):3983-3988. doi:10.1073/pnas.0530291100
17. Bos PD, Zhang XHF, Nadal C, et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature*. 2009;459(7249):1005-1009. doi:10.1038/nature08021
18. Gabos Z, Sinha R, Hanson J, et al. Prognostic significance of human epidermal growth factor receptor positivity for the development of brain metastasis after newly diagnosed breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006;24(36):5658-5663. doi:10.1200/JCO.2006.07.0250
19. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung - PMC. Accessed November 9, 2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1283098/>
20. Feng S, Cen J, Huang Y, et al. Matrix Metalloproteinase-2 and -9 Secreted by Leukemic Cells Increase the Permeability of Blood-Brain Barrier by Disrupting Tight Junction Proteins. *PLoS One*. 2011;6(8):e20599. doi:10.1371/journal.pone.0020599
21. Yang Y, Rosenberg GA. MMP-Mediated Disruption of Claudin-5 in the Blood-Brain Barrier of Rat Brain After Cerebral Ischemia. *Methods Mol Biol*. 2011;762:333-345. doi:10.1007/978-1-61779-185-7\_24
22. Hu L, Zhang J, Zhu H, Min J, Feng Y, Zhang H. Biological characteristics of a specific brain metastatic cell line derived from human lung adenocarcinoma. *Med Oncol*. 2010;27(3):708-714. doi:10.1007/s12032-009-9273-1

23. Mendes O, Kim HT, Stoica G. Expression of MMP2, MMP9 and MMP3 in breast cancer brain metastasis in a rat model. *Clin Exp Metastasis*. 2005;22(3):237-246. doi:10.1007/s10585-005-8115-6
24. Xie T xin, Huang FJ, Aldape KD, et al. Activation of Stat3 in Human Melanoma Promotes Brain Metastasis. *Cancer Research*. 2006;66(6):3188-3196. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2674
25. Lorger M, Krueger JS, O'Neal M, Staflin K, Felding-Habermann B. Activation of tumor cell integrin  $\alpha\beta 3$  controls angiogenesis and metastatic growth in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(26):10666-10671. doi:10.1073/pnas.0903035106
26. Oku T, Tjuvajev JG, Miyagawa T, et al. Tumor growth modulation by sense and antisense vascular endothelial growth factor gene expression: effects on angiogenesis, vascular permeability, blood volume, blood flow, fluorodeoxyglucose uptake, and proliferation of human melanoma intracerebral xenografts. *Cancer Res*. 1998;58(18):4185-4192.
27. Cho JH, Robinson JP, Arave RA, et al. AKT1 Activation Promotes Development of Melanoma Metastases. *Cell Rep*. 2015;13(5):898-905. doi:10.1016/j.celrep.2015.09.057
28. Janzer RC, Raff MC. Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature*. 1987;325(6101):253-257. doi:10.1038/325253a0
29. Pardridge WM. CNS drug design based on principles of blood-brain barrier transport. *J Neurochem*. 1998;70(5):1781-1792. doi:10.1046/j.1471-4159.1998.70051781.x
30. Liu S, Agalliu D, Yu C, Fisher M. The role of pericytes in blood-brain barrier function and stroke. *Curr Pharm Des*. 2012;18(25):3653-3662. doi:10.2174/138161212802002706
31. Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7(1):41-53. doi:10.1038/nrn1824
32. The blood-brain barrier: an engineering perspective - PMC. Accessed October 30, 2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3757302/>
33. Dréan A, Goldwirt L, Verreault M, et al. Blood-brain barrier, cytotoxic chemotherapies and glioblastoma. *Expert Rev Neurother*. 2016;16(11):1285-1300. doi:10.1080/14737175.2016.1202761
34. Liebner S, Fischmann A, Rascher G, et al. Claudin-1 and claudin-5 expression and tight junction morphology are altered in blood vessels of human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol*. 2000;100(3):323-331. doi:10.1007/s004010000180

35. Papadopoulos MC, Saadoun S, Binder DK, Manley GT, Krishna S, Verkman AS. Molecular mechanisms of brain tumor edema. *Neuroscience*. 2004;129(4):1011-1020. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.05.044
36. Papadopoulos MC, Saadoun S, Woodrow CJ, et al. Occludin expression in microvessels of neoplastic and non-neoplastic human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2001;27(5):384-395. doi:10.1046/j.0305-1846.2001.00341.x
37. Arvanitis CD, Ferraro GB, Jain RK. The blood–brain barrier and blood–tumour barrier in brain tumours and metastases. *Nat Rev Cancer*. 2020;20(1):26-41. doi:10.1038/s41568-019-0205-x
38. Angeli E, Bousquet G. Brain Metastasis Treatment: The Place of Tyrosine Kinase Inhibitors and How to Facilitate Their Diffusion across the Blood–Brain Barrier. *Pharmaceutics*. 2021;13(9):1446. doi:10.3390/pharmaceutics13091446
39. Paris J, Angeli E, Bousquet G. The Pharmacology of Xenobiotics after Intracerebro Spinal Fluid Administration: Implications for the Treatment of Brain Tumors. *Int J Mol Sci*. 2021;22(3):1281. doi:10.3390/ijms22031281
40. Knuutinen O, Kuitunen H, Alahuhta S, et al. Case Report: Chemotherapy in Conjunction With Blood-Brain Barrier Disruption for a Patient With Germ Cell Tumor With Multiple Brain Metastases. *Clin Genitourin Cancer*. 2018;16(5):e993-e996. doi:10.1016/j.clgc.2018.05.005
41. Morikawa N, Mori T, Abe T, Kawashima H, Takeyama M, Hori S. Pharmacokinetics of etoposide and carboplatin in cerebrospinal fluid and plasma during hyperosmotic disruption of the blood brain barrier and intraarterial combination chemotherapy. *Biol Pharm Bull*. 1999;22(4):428-431. doi:10.1248/bpb.22.428
42. Fortin D, Gendron C, Boudrias M, Garant MP. Enhanced chemotherapy delivery by intraarterial infusion and blood-brain barrier disruption in the treatment of cerebral metastasis. *Cancer*. 2007;109(4):751-760. doi:10.1002/cncr.22450
43. Haluska M, Anthony ML. Osmotic blood-brain barrier modification for the treatment of malignant brain tumors. *Clin J Oncol Nurs*. 2004;8(3):263-267. doi:10.1188/04.CJON.263-267
44. Shang X, Wang P, Liu Y, Zhang Z, Xue Y. Mechanism of low-frequency ultrasound in opening blood-tumor barrier by tight junction. *J Mol Neurosci*. 2011;43(3):364-369. doi:10.1007/s12031-010-9451-9
45. Sheikov N, McDannold N, Jolesz F, Zhang YZ, Tam K, Hynynen K. Brain arterioles show more active vesicular transport of blood-borne tracer molecules than capillaries and

- venules after focused ultrasound-evoked opening of the blood-brain barrier. *Ultrasound Med Biol.* 2006;32(9):1399-1409. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2006.05.015
46. Carpentier A, Canney M, Vignot A, et al. Clinical trial of blood-brain barrier disruption by pulsed ultrasound. *Sci Transl Med.* 2016;8(343):343re2. doi:10.1126/scitranslmed.aaf6086
  47. Thorne RG, Pronk GJ, Padmanabhan V, Frey WH. Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration. *Neuroscience.* 2004;127(2):481-496. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.05.029
  48. da Fonseca CO, Schwartsmann G, Fischer J, et al. Preliminary results from a phase I/II study of perillyl alcohol intranasal administration in adults with recurrent malignant gliomas. *Surg Neurol.* 2008;70(3):259-266; discussion 266-267. doi:10.1016/j.surneu.2007.07.040
  49. da Fonseca CO, Simão M, Lins IR, Caetano RO, Futuro D, Quirico-Santos T. Efficacy of monoterpene perillyl alcohol upon survival rate of patients with recurrent glioblastoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2011;137(2):287-293. doi:10.1007/s00432-010-0873-0
  50. DA Fonseca CO, Teixeira RM, Silva JCT, et al. Long-term outcome in patients with recurrent malignant glioma treated with Perillyl alcohol inhalation. *Anticancer Res.* 2013;33(12):5625-5631.
  51. Kreuter J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;47(1):65-81. doi:10.1016/s0169-409x(00)00122-8
  52. Patel T, Zhou J, Piepmeier JM, Saltzman WM. Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery to the Central Nervous System. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64(7):701-705. doi:10.1016/j.addr.2011.12.006
  53. Gromnicova R, Davies HA, Sreekanthreddy P, et al. Glucose-Coated Gold Nanoparticles Transfer across Human Brain Endothelium and Enter Astrocytes In Vitro. *PLoS One.* 2013;8(12):e81043. doi:10.1371/journal.pone.0081043
  54. Karim R, Palazzo C, Evrard B, Piel G. Nanocarriers for the treatment of glioblastoma multiforme: Current state-of-the-art. *J Control Release.* 2016;227:23-37. doi:10.1016/j.jconrel.2016.02.026
  55. Koukourakis MI, Koukouraki S, Fezoulidis I, et al. High intratumoural accumulation of stealth® liposomal doxorubicin (Caelyx®) in glioblastomas and in metastatic brain tumours. *Br J Cancer.* 2000;83(10):1281-1286. doi:10.1054/bjoc.2000.1459

56. Lee H, Shields AF, Siegel BA, et al.  $^{64}\text{Cu}$ -MM-302 Positron Emission Tomography Quantifies Variability of Enhanced Permeability and Retention of Nanoparticles in Relation to Treatment Response in Patients with Metastatic Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 2017;23(15):4190-4202. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-3193
57. Lajoie JM, Shusta EV. Targeting receptor-mediated transport for delivery of biologics across the blood-brain barrier. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2015;55:613-631. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010814-124852
58. Thomas FC, Taskar K, Rudraraju V, et al. Uptake of ANG1005, a Novel Paclitaxel Derivative, Through the Blood-Brain Barrier into Brain and Experimental Brain Metastases of Breast Cancer. *Pharm Res.* 2009;26(11):2486-2494. doi:10.1007/s11095-009-9964-5
59. Kumthekar P, Tang S, Brenner AJ, et al. OS7.2 A Phase II Study of ANG1005, a novel BBB/BCB Penetrant Taxane in Patients with Recurrent Brain Metastases and Leptomeningeal Carcinomatosis from Breast Cancer. *Neuro Oncol.* 2016;18(Suppl 4):iv16. doi:10.1093/neuonc/nov188.052
60. Wang X, Xiong Z, Liu Z, Huang X, Jiang X. Angiopep-2/IP10-EGFRvIIIscFv modified nanoparticles and CTL synergistically inhibit malignant glioblastoma. *Sci Rep.* 2018;8(1):12827. doi:10.1038/s41598-018-30072-x
61. Regina A, Demeule M, Tripathy S, et al. ANG4043, a novel brain-penetrant peptide-mAb conjugate, is efficacious against HER2-positive intracranial tumors in mice. *Mol Cancer Ther.* 2015;14(1):129-140. doi:10.1158/1535-7163.MCT-14-0399
62. JCR Pharmaceuticals Announces Approval of IZCARGO® (Pabinafusp Alfa) for Treatment of MPS II (Hunter Syndrome) in Japan. Published March 23, 2021. Accessed July 17, 2022. <https://www.businesswire.com/news/home/20210323005577/en/JCR-Pharmaceuticals-Announces-Approval-of-IZCARGO%C2%AE-Pabinafusp-Alfa-for-Treatment-of-MPS-II-Hunter-Syndrome-in-Japan>
63. Bousquet G, Darrouzain F, de Bazelaire C, et al. Intrathecal Trastuzumab Halts Progression of CNS Metastases in Breast Cancer. *JCO.* 2016;34(16):e151-e155. doi:10.1200/JCO.2012.44.8894
64. Nguyen TT, Angeli E, Darrouzain F, et al. A successful compartmental approach for the treatment of breast cancer brain metastases. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2019;83(3):573-580. doi:10.1007/s00280-018-3752-z
65. Yu KKH, Patel AR, Moss NS. The Role of Stereotactic Biopsy in Brain Metastases. *Neurosurg Clin N Am.* 2020;31(4):515-526. doi:10.1016/j.nec.2020.06.002

66. Bousquet G, Bouchtaoui ME, Leboeuf C, et al. Tracking sub-clonal TP53 mutated tumor cells in human metastatic renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 2015;6(22):19279-19289.
67. Gasperskaja E, Kučinskas V. The most common technologies and tools for functional genome analysis. *Acta Med Litu*. 2017;24(1):1-11. doi:10.6001/actamedica.v24i1.3457
68. Pettini F, Visibelli A, Cicaloni V, Iovinelli D, Spiga O. Multi-Omics Model Applied to Cancer Genetics. *Int J Mol Sci*. 2021;22(11):5751. doi:10.3390/ijms22115751
69. Weichenhan D, Lipka DB, Lutsik P, Goyal A, Plass C. Epigenomic technologies for precision oncology. *Seminars in Cancer Biology*. 2022;84:60-68. doi:10.1016/j.semcancer.2020.08.004
70. Lowe R, Shirley N, Bleackley M, Dolan S, Shafee T. Transcriptomics technologies. *PLoS Comput Biol*. 2017;13(5):e1005457. doi:10.1371/journal.pcbi.1005457
71. Furet E, Bouchtaoui ME, Feugeas JP, et al. Increased risk of brain metastases in women with breast cancer and p16 expression in metastatic lymph-nodes. *Oncotarget*. 2017;8(23):37332-37341. doi:10.18632/oncotarget.16953
72. Nguyen TT, Gapihan G, Tetu P, et al. Increased risk of brain metastases among patients with melanoma and PROM2 expression in metastatic lymph nodes. *Clin Transl Med*. 2020;10(8):e198. doi:10.1002/ctm2.198
73. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM. REporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies (REMARK). *Br J Cancer*. 2005;93(4):387-391. doi:10.1038/sj.bjc.6602678
74. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments - PubMed. Accessed September 3, 2023. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19246619/>
75. Cancer systems biology of TCGA SKCM: efficient detection of genomic drivers in melanoma - PubMed. Accessed September 3, 2023. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25600636/>
76. Jönsson G, Busch C, Knappskog S, et al. Gene expression profiling-based identification of molecular subtypes in stage IV melanomas with different clinical outcome. *Clin Cancer Res*. 2010;16(13):3356-3367. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2509
77. Cirenajwis H, Ekedahl H, Lauss M, et al. Molecular stratification of metastatic melanoma using gene expression profiling: Prediction of survival outcome and benefit from molecular targeted therapy. *Oncotarget*. 2015;6(14):12297-12309. doi:10.18632/oncotarget.3655

78. Jilaveanu LB, Parisi F, Barr ML, et al. PLEKHA5 as a Biomarker and Potential Mediator of Melanoma Brain Metastasis. *Clin Cancer Res.* 2015;21(9):2138-2147. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0861
79. Prominin-2 expression increases protrusions, decreases caveolae and inhibits Cdc42 dependent fluid phase endocytosis - PubMed. Accessed September 3, 2023. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23583380/>
80. Yoshida K, Fujikawa T, Tanabe A, Sakurai K. Quantitative analysis of distribution and fate of human lung cancer emboli labeled with 125I-5-iodo-2'-deoxyuridine in nude mice. *Surg Today.* 1993;23(11):979-983. doi:10.1007/BF00308973
81. Tas F. Metastatic behavior in melanoma: timing, pattern, survival, and influencing factors. *J Oncol.* 2012;2012:647684. doi:10.1155/2012/647684
82. Chemokine signaling in development and disease - PMC. Accessed September 4, 2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4302920/>
83. Sarvaiya PJ, Guo D, Ulasov I, Gabikian P, Lesniak MS. Chemokines in tumor progression and metastasis. *Oncotarget.* 2013;4(12):2171-2185.
84. Ding Y, Shimada Y, Maeda M, et al. Association of CC chemokine receptor 7 with lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2003;9(9):3406-3412.
85. Mashino K, Sadanaga N, Yamaguchi H, et al. Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with lymph node metastasis of gastric carcinoma. *Cancer Res.* 2002;62(10):2937-2941.
86. Takeuchi H, Fujimoto A, Tanaka M, Yamano T, Hsueh E, Hoon DSB. CCL21 chemokine regulates chemokine receptor CCR7 bearing malignant melanoma cells. *Clin Cancer Res.* 2004;10(7):2351-2358. doi:10.1158/1078-0432.ccr-03-0195
87. Murakami T, Maki W, Cardones AR, et al. Expression of CXC chemokine receptor-4 enhances the pulmonary metastatic potential of murine B16 melanoma cells. *Cancer Res.* 2002;62(24):7328-7334.
88. Guidelines Detail. NCCN. Accessed January 7, 2023. <https://www.nccn.org/guidelines/guidelines-detail>
89. Manzano JL, Layos L, Bugés C, et al. Resistant mechanisms to BRAF inhibitors in melanoma. *Ann Transl Med.* 2016;4(12):237. doi:10.21037/atm.2016.06.07
90. Gide TN, Wilmott JS, Scolyer RA, Long GV. Primary and Acquired Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors in Metastatic Melanoma. *Clin Cancer Res.* 2018;24(6):1260-1270. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-2267

91. Glumac PM, LeBeau AM. The role of CD133 in cancer: a concise review. *Clin Transl Med.* 2018;7(1):18. doi:10.1186/s40169-018-0198-1
92. Bousquet G, Bouchtaoui ME, Sophie T, et al. Targeting autophagic cancer stem-cells to reverse chemoresistance in human triple negative breast cancer. *Oncotarget.* 2017;8(21):35205-35221. doi:10.18632/oncotarget.16925
93. Varna M, Gapihan G, Feugeas JP, et al. Stem cells increase in numbers in perinecrotic areas in human renal cancer. *Clin Cancer Res.* 2015;21(4):916-924. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0666
94. Viale A, Pettazzoni P, Lyssiotis CA, et al. Oncogene ablation-resistant pancreatic cancer cells depend on mitochondrial function. *Nature.* 2014;514(7524):628-632. doi:10.1038/nature13611
95. Tanei T, Morimoto K, Shimazu K, et al. Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential Paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers. *Clin Cancer Res.* 2009;15(12):4234-4241. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1479
96. Abraham BK, Fritz P, McClellan M, Hauptvogel P, Athellogou M, Brauch H. Prevalence of CD44+/CD24-/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. *Clin Cancer Res.* 2005;11(3):1154-1159.
97. Balic M, Lin H, Young L, et al. Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype. *Clin Cancer Res.* 2006;12(19):5615-5621. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0169
98. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis | Nature. Accessed September 4, 2023. <https://www.nature.com/articles/nature06188>
99. Bui TO, Dao VT, Nguyen VT, Feugeas JP, Pamoukdjian F, Bousquet G. Genomics of Clear-cell Renal Cell Carcinoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *European Urology.* 2022;81(4):349-361. doi:10.1016/j.eururo.2021.12.010
100. Nguyen TT, Hamdan D, Angeli E, et al. Genomics of Breast Cancer Brain Metastases: A Meta-Analysis and Therapeutic Implications. *Cancers.* 2023;15(6):1728. doi:10.3390/cancers15061728
101. Stewart LA, Clarke M, Rovers M, et al. Preferred Reporting Items for a Systematic Review and Meta-analysis of Individual Participant Data: The PRISMA-IPD Statement. *JAMA.* 2015;313(16):1657-1665. doi:10.1001/jama.2015.3656



102. Sohani ZN, Meyre D, de Souza RJ, et al. Assessing the quality of published genetic association studies in meta-analyses: the quality of genetic studies (Q-Genie) tool. *BMC Genetics*. 2015;16(1):50. doi:10.1186/s12863-015-0211-2
103. Huedo-Medina TB, Sánchez-Meca J, Marín-Martínez F, Botella J. Assessing heterogeneity in meta-analysis: Q statistic or I<sup>2</sup> index? *Psychol Methods*. 2006;11(2):193-206. doi:10.1037/1082-989X.11.2.193
104. Gaffney EF, Riegman PH, Grizzle WE, Watson PH. Factors that drive the increasing use of FFPE tissue in basic and translational cancer research. *Biotech Histochem*. 2018;93(5):373-386. doi:10.1080/10520295.2018.1446101
105. Zinger L, Merenbakh-Lamin K, Klein A, et al. Ligand-binding Domain-activating Mutations of ESR1 Rewire Cellular Metabolism of Breast Cancer Cells. *Clinical Cancer Research*. 2019;25(9):2900-2914. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-1505
106. Toy W, Weir H, Razavi P, et al. Activating ESR1 mutations differentially impact the efficacy of ER antagonists. *Cancer Discov*. 2017;7(3):277-287. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-1523
107. Jeselsohn R, Yelensky R, Buchwalter G, et al. Emergence of constitutively active estrogen receptor- $\alpha$  mutations in pretreated advanced estrogen receptor positive breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2014;20(7):1757-1767. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-2332
108. Wang P, Bahreini A, Gyanchandani R, et al. FSensitive detection of mono- and polyclonal ESR1 mutations in primary tumors, metastatic lesions and cell free DNA of breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2016;22(5):1130-1137. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-1534
109. Hartman Z, Zhao H, Agazie YM. HER2 stabilizes EGFR and itself by altering autophosphorylation patterns in a manner that overcomes regulatory mechanisms and promotes proliferative and transformation signaling. *Oncogene*. 2013;32(35):4169-4180. doi:10.1038/onc.2012.418
110. Gotoh N, Tojo A, Muroya K, et al. Epidermal growth factor-receptor mutant lacking the autophosphorylation sites induces phosphorylation of Shc protein and Shc-Grb2/ASH association and retains mitogenic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(1):167-171.
111. Gazdar AF. Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene*. 2009;28 Suppl 1:S24-31. doi:10.1038/onc.2009.198

112. Park S, Lee SY, Kim D, et al. Comparison of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors for patients with lung adenocarcinoma harboring different epidermal growth factor receptor mutation types. *BMC Cancer*. 2021;21(1):52. doi:10.1186/s12885-020-07765-6
113. Lee JC, Vivanco I, Beroukhi R, et al. Epidermal Growth Factor Receptor Activation in Glioblastoma through Novel Missense Mutations in the Extracellular Domain. *PLoS Med*. 2006;3(12):e485. doi:10.1371/journal.pmed.0030485
114. Membrane-binding and activation mechanism of PTEN | PNAS. Accessed April 23, 2022. <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.0932835100>
115. Crystal Structure of the PTEN Tumor Suppressor: Cell. Accessed April 23, 2022. [https://www.cell.com/fulltext/S0092-8674\(00\)81663-3](https://www.cell.com/fulltext/S0092-8674(00)81663-3)
116. Garrido JAMaG, Alcantara KMM, Danac JMC, Serrano FEC, Cutiongco-de la Paz EM, Garcia RL. The Novel Phosphatase Domain Mutations Q171R and Y65S Switch PTEN from Tumor Suppressor to Oncogene. *Cells*. 2021;10(12):3423. doi:10.3390/cells10123423
117. Liaw D, Marsh DJ, Li J, et al. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat Genet*. 1997;16(1):64-67. doi:10.1038/ng0597-64
118. Raftopoulou M, Etienne-Manneville S, Self A, Nicholls S, Hall A. Regulation of cell migration by the C2 domain of the tumor suppressor PTEN. *Science*. 2004;303(5661):1179-1181. doi:10.1126/science.1092089
119. Andreassen PR, Seo J, Wiek C, Hanenberg H. Understanding BRCA2 Function as a Tumor Suppressor Based on Domain-Specific Activities in DNA Damage Responses. *Genes (Basel)*. 2021;12(7):1034. doi:10.3390/genes12071034
120. Guidugli L, Pankratz VS, Singh N, et al. A classification model for BRCA2 DNA binding domain missense variants based on homology directed repair activity. *Cancer Res*. 2013;73(1):265-275. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2081
121. Hahn CN, Babic M, Schreiber AW, et al. Rare and Common Germline Variants Contribute to Occurrence of Myelodysplastic Syndrome. *Blood*. 2015;126(23):1644. doi:10.1182/blood.V126.23.1644.1644
122. Mosavi LK, Cammett TJ, Desrosiers DC, Peng ZY. The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Sci*. 2004;13(6):1435-1448. doi:10.1110/ps.03554604

123. Morgan AJ, Giannoudis A, Palmieri C. The genomic landscape of breast cancer brain metastases: a systematic review. *The Lancet Oncology*. 2021;22(1):e7-e17. doi:10.1016/S1470-2045(20)30556-8
124. Mamanova L, Coffey AJ, Scott CE, et al. Target-enrichment strategies for next-generation sequencing. *Nat Methods*. 2010;7(2):111-118. doi:10.1038/nmeth.1419
125. Urosevic J, Garcia-Albéniz X, Planet E, et al. Colon cancer cells colonize the lung from established liver metastases through p38 MAPK signalling and PTHLH. *Nat Cell Biol*. 2014;16(7):685-694. doi:10.1038/ncb2977
126. Tsai MF, Chang TH, Wu SG, et al. EGFR-L858R mutant enhances lung adenocarcinoma cell invasive ability and promotes malignant pleural effusion formation through activation of the CXCL12-CXCR4 pathway. *Sci Rep*. 2015;5:13574. doi:10.1038/srep13574
127. Duchnowska R, Jassem J, Goswami CP, et al. Predicting early brain metastases based on clinicopathological factors and gene expression analysis in advanced HER2-positive breast cancer patients. *J Neurooncol*. 2015;122(1):205-216. doi:10.1007/s11060-014-1704-y
128. Xiao W, Zheng S, Xie X, et al. SOX2 Promotes Brain Metastasis of Breast Cancer by Upregulating the Expression of FSCN1 and HBEGF. *Mol Ther Oncolytics*. 2020;17:118-129. doi:10.1016/j.omto.2020.03.001
129. Heldring N, Pike A, Andersson S, et al. Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets. *Physiological Reviews*. 2007;87(3):905-931. doi:10.1152/physrev.00026.2006
130. Toy W, Shen Y, Won H, et al. ESR1 ligand-binding domain mutations in hormone-resistant breast cancer. *Nat Genet*. 2013;45(12):1439-1445. doi:10.1038/ng.2822
131. Burstein HJ. The Distinctive Nature of HER2-Positive Breast Cancers. *N Engl J Med*. 2005;353(16):1652-1654. doi:10.1056/NEJMp058197
132. Iqbal N, Iqbal N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. *Mol Biol Int*. 2014;2014:852748. doi:10.1155/2014/852748
133. Fan J, Cai B, Zeng M, Hao Y, Giancotti FG, Fu BM. Integrin  $\beta$ 4 Signaling Promotes Mammary Tumor Cell Adhesion to Brain Microvascular Endothelium by Inducing ErbB2-mediated Secretion of VEGF. *Ann Biomed Eng*. 2011;39(8):2223-2241. doi:10.1007/s10439-011-0321-6

134. Palmieri D, Bronder JL, Herring JM, et al. Her-2 overexpression increases the metastatic outgrowth of breast cancer cells in the brain. *Cancer Res.* 2007;67(9):4190-4198. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3316
135. Nagano M, Kohsaka S, Ueno T, et al. High-Throughput Functional Evaluation of Variants of Unknown Significance in ERBB2. *Clinical Cancer Research.* 2018;24(20):5112-5122. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-0991
136. Subramanian J, Katta A, Masood A, Vudem DR, Kancha RK. Emergence of ERBB2 Mutation as a Biomarker and an Actionable Target in Solid Cancers. *Oncologist.* 2019;24(12):e1303-e1314. doi:10.1634/theoncologist.2018-0845
137. Comprehensive molecular portraits of human breast tumors. *Nature.* 2012;490(7418):61-70. doi:10.1038/nature11412
138. Bose R, Kavuri SM, Searleman AC, et al. Activating HER2 mutations in HER2 gene amplification negative breast cancer. *Cancer Discov.* 2013;3(2):224-237. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0349
139. Yang S, Wang Y, Zhao C, et al. Exon 20 YVMA insertion is associated with high incidence of brain metastasis and inferior outcome of chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer patients with HER2 kinase domain mutations. *Transl Lung Cancer Res.* 2021;10(2):753-765. doi:10.21037/tlcr-20-559
140. Yarden Y, Pines G. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(8):553-563. doi:10.1038/nrc3309
141. Nie F, Yang J, Wen S, et al. Involvement of epidermal growth factor receptor overexpression in the promotion of breast cancer brain metastasis. *Cancer.* 2012;118(21):5198-5209. doi:10.1002/cncr.27553
142. Greulich H, Chen TH, Feng W, et al. Oncogenic Transformation by Inhibitor-Sensitive and -Resistant EGFR Mutants. *PLOS Medicine.* 2005;2(11):e313. doi:10.1371/journal.pmed.0020313
143. Li J, Yen C, Liaw D, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science.* 1997;275(5308):1943-1947. doi:10.1126/science.275.5308.1943
144. Bonneau D, Longy M. Mutations of the human PTEN gene. *Hum Mutat.* 2000;16(2):109-122. doi:10.1002/1098-1004(200008)16:2<109::AID-HUMU3>3.0.CO;2-0
145. Hahn M, Wieland I, Koufaki ON, et al. Genetic alterations of the tumor suppressor gene PTEN/MMAC1 in human brain metastases. *Clin Cancer Res.* 1999;5(9):2431-2437.

146. Nagata Y, Lan KH, Zhou X, et al. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell*. 2004;6(2):117-127. doi:10.1016/j.ccr.2004.06.022
147. Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, et al. Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA*. 2017;317(23):2402-2416. doi:10.1001/jama.2017.7112
148. Moran A, O'Hara C, Khan S, et al. Risk of cancer other than breast or ovarian in individuals with BRCA1 and BRCA2 mutations. *Fam Cancer*. 2012;11(2):235-242. doi:10.1007/s10689-011-9506-2
149. Song Y, Barry WT, Seah DS, Tung NM, Garber JE, Lin NU. Patterns of recurrence and metastasis in BRCA1/BRCA2-associated breast cancers. *Cancer*. 2020;126(2):271-280. doi:10.1002/cncr.32540
150. Zhou B, Lin W, Long Y, et al. Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics. *Sig Transduct Target Ther*. 2022;7(1):1-33. doi:10.1038/s41392-022-00934-y
151. Nam DH, Jeon HM, Kim S, et al. Activation of notch signaling in a xenograft model of brain metastasis. *Clin Cancer Res*. 2008;14(13):4059-4066. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-4039
152. McGowan PM, Simeone C, Ribot EJ, et al. Notch1 inhibition alters the CD44<sup>hi</sup>/CD24<sup>lo</sup> population and reduces the formation of brain metastases from breast cancer. *Mol Cancer Res*. 2011;9(7):834-844. doi:10.1158/1541-7786.MCR-10-0457
153. Ladd B, Mazzola AM, Bihani T, et al. Effective combination therapies in preclinical endocrine resistant breast cancer models harboring ER mutations. *Oncotarget*. 2016;7(34):54120-54136. doi:10.18632/oncotarget.10852
154. Turner NC, Slamon DJ, Ro J, et al. Overall Survival with Palbociclib and Fulvestrant in Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2018;379(20):1926-1936. doi:10.1056/NEJMoa1810527
155. Lainé M, Fanning SW, Chang YF, et al. Lasofoxifene as a potential treatment for therapy-resistant ER-positive metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2021;23:54. doi:10.1186/s13058-021-01431-w
156. Puyang X, Furman C, Zheng GZ, et al. Discovery of Selective Estrogen Receptor Covalent Antagonists for the Treatment of ER $\alpha$ WT and ER $\alpha$ MUT Breast Cancer. *Cancer Discovery*. 2018;8(9):1176-1193. doi:10.1158/2159-8290.CD-17-1229

157. Team E. Lasofoxifene Alone or Combined with a CDK Inhibitor may Limits Progression in AI Resistant Tumors - Onco'Zine. Published January 12, 2022. Accessed May 1, 2022. <https://www.oncozine.com/lasofoxifene-alone-or-combined-with-a-cdk-inhibitor-may-limits-progression-in-ai-resistant-tumors/>, <https://www.oncozine.com/lasofoxifene-alone-or-combined-with-a-cdk-inhibitor-may-limits-progression-in-ai-resistant-tumors/>
158. H3 Biomedicine Inc. *A Phase 1-2 Multicenter, Open Label Trial of H3B-6545, a Covalent Antagonist of Estrogen Receptor Alpha, in Women With Locally Advanced or Metastatic Estrogen Receptor-Positive, HER2 Negative Breast Cancer.* clinicaltrials.gov; 2022. Accessed April 28, 2022. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03250676>
159. Hyman DM, Piha-Paul SA, Won H, et al. HER kinase inhibition in patients with HER2- and HER3-mutant cancers. *Nature*. 2018;554(7691):189-194. doi:10.1038/nature25475
160. Oaknin A, Friedman CF, Roman LD, et al. Neratinib in patients with HER2-mutant, metastatic cervical cancer: Findings from the phase 2 SUMMIT basket trial. *Gynecol Oncol*. 2020;159(1):150-156. doi:10.1016/j.ygyno.2020.07.025
161. Bai H, Xiong L, Han B. The effectiveness of EGFR-TKIs against brain metastases in EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer. *Onco Targets Ther*. 2017;10:2335-2340. doi:10.2147/OTT.S129809
162. Reungwetwattana T, Nakagawa K, Cho BC, et al. CNS Response to Osimertinib Versus Standard Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors in Patients With Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *JCO*. 2018;36(33):3290-3297. doi:10.1200/JCO.2018.78.3118
163. Chagoya G, Kwatra SG, Nanni CW, et al. Efficacy of osimertinib against EGFRvIII+ glioblastoma. *Oncotarget*. 2020;11(22):2074-2082. doi:10.18632/oncotarget.27599
164. Singh GK, Bajpai J, Joshi S, et al. Excellent response to erlotinib in breast carcinoma with rare EGFR mutation—a case report. *Ecancermedicalscience*. 2020;14:1092. doi:10.3332/ecancer.2020.1092
165. Ni J, Ramkissoon SH, Xie S, et al. Combination inhibition of PI3K and mTORC1 yields durable remissions in orthotopic patient-derived xenografts of HER2-positive breast cancer brain metastases. *Nat Med*. 2016;22(7):723-726. doi:10.1038/nm.4120
166. Philip CA, Laskov I, Beauchamp MC, et al. Inhibition of PI3K-AKT-mTOR pathway sensitizes endometrial cancer cell lines to PARP inhibitors. *BMC Cancer*. 2017;17:638. doi:10.1186/s12885-017-3639-0
167. Gelmon KA, Tischkowitz M, Mackay H, et al. Olaparib in patients with recurrent high-grade serous or poorly differentiated ovarian carcinoma or triple-negative breast cancer: a

- phase 2, multicentre, open-label, non-randomised study. *The Lancet Oncology*. 2011;12(9):852-861. doi:10.1016/S1470-2045(11)70214-5
168. Golan T, Hammel P, Reni M, et al. Maintenance Olaparib for Germline BRCA-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2019;381(4):317-327. doi:10.1056/NEJMoa1903387
169. de Bono J, Mateo J, Fizazi K, et al. Olaparib for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2020;382(22):2091-2102. doi:10.1056/NEJMoa1911440
170. Wang Q, Zhang F, Gao H, Xu Y. Successful treatment of a patient with brain metastases from endometrial cancer using Niraparib: a case report. *Ann Palliat Med*. 2021;10(1):818-827. doi:10.21037/apm-21-113
171. Karginova O, Siegel MB, Van Swearingen AED, et al. Efficacy of carboplatin alone and in combination with ABT888 in intracranial murine models of BRCA-mutated and BRCA-wild-type triple negative breast cancer. *Mol Cancer Ther*. 2015;14(4):920-930. doi:10.1158/1535-7163.MCT-14-0474
172. National Cancer Institute (NCI). *Phase II Randomized Placebo-Controlled Trial of Cisplatin With or Without ABT-888 (Veliparib) in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer and/or BRCA Mutation-Associated Breast Cancer, With or Without Brain Metastases*. clinicaltrials.gov; 2022. Accessed April 28, 2022. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02595905>
173. Morgensztern D, Besse B, Greillier L, et al. Efficacy and Safety of Rovalpituzumab Tesirine in Third-Line and Beyond Patients with DLL3-Expressing, Relapsed/Refractory Small-Cell Lung Cancer: Results From the Phase II TRINITY Study. *Clin Cancer Res*. 2019;25(23):6958-6966. doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-1133
174. Coleman RL, Handley KF, Burger R, et al. Demcizumab combined with paclitaxel for platinum-resistant ovarian, primary peritoneal, and fallopian tube cancer: The SIERRA open-label phase Ib trial. *Gynecol Oncol*. 2020;157(2):386-391. doi:10.1016/j.ygyno.2020.01.042
175. Haffner MC, Mosbrugger T, Esopi DM, et al. Tracking the clonal origin of lethal prostate cancer. *J Clin Invest*. 2013;123(11):4918-4922. doi:10.1172/JCI70354
176. Brasó-Maristany F, Paré L, Chic N, et al. Gene expression profiles of breast cancer metastasis according to organ site. *Mol Oncol*. 2022;16(1):69-87. doi:10.1002/1878-0261.13021

177. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, et al. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. *J Clin Oncol*. 2014;32(27):3059-3068. doi:10.1200/JCO.2013.54.8800
178. Bai X, Lin X, Song J, Chang J han, Han L li, Fan C. Incidence of central nervous system metastases in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer treated with trastuzumab: A meta-analysis. *Clinics (Sao Paulo)*. 2021;76. doi:10.6061/clinics/2021/e2653
179. Derks SHAE, Jongen JLM, van der Meer EL, et al. Impact of Novel Treatments in Patients with Melanoma Brain Metastasis: Real-World Data. *Cancers*. 2023;15(5):1461. doi:10.3390/cancers15051461
180. Bernstein SH, Unger JM, Leblanc M, Friedberg J, Miller TP, Fisher RI. Natural history of CNS relapse in patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma: a 20-year follow-up analysis of SWOG 8516 -- the Southwest Oncology Group. *J Clin Oncol*. 2009;27(1):114-119. doi:10.1200/JCO.2008.16.8021
181. Huggett JF, Foy CA, Benes V, et al. The digital MIQE guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments. *Clin Chem*. 2013;59(6):892-902. doi:10.1373/clinchem.2013.206375
182. Yoneda T, Williams PJ, Hiraga T, Niewolna M, Nishimura R. A Bone-Seeking Clone Exhibits Different Biological Properties from the MDA-MB-231 Parental Human Breast Cancer Cells and a Brain-Seeking Clone In Vivo and In Vitro. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2001;16(8):1486-1495. doi:10.1359/jbmr.2001.16.8.1486
183. Kijewska M, Viski C, Turrell F, et al. Using an in-vivo syngeneic spontaneous metastasis model identifies ID2 as a promoter of breast cancer colonisation in the brain. *Breast Cancer Res*. 2019;21(1):4. doi:10.1186/s13058-018-1093-9
184. Knier NN, Pellizzari S, Zhou J, Foster PJ, Parsyan A. Preclinical Models of Brain Metastases in Breast Cancer. *Biomedicines*. 2022;10(3):667. doi:10.3390/biomedicines10030667
185. Ringnér M. What is principal component analysis? *Nat Biotechnol*. 2008;26(3):303-304. doi:10.1038/nbt0308-303
186. Zhang F, Ying L, Jin J, et al. GAP43, a novel metastasis promoter in non-small cell lung cancer. *J Transl Med*. 2018;16:310. doi:10.1186/s12967-018-1682-5
187. Drucker KL, Paulsen AR, Giannini C, et al. Clinical significance and novel mechanism of action of kallikrein 6 in glioblastoma. *Neuro Oncol*. 2013;15(3):305-318. doi:10.1093/neuonc/nos313



188. Haritos C, Michaelidou K, Mavridis K, et al. Kallikrein-related peptidase 6 (KLK6) expression differentiates tumor subtypes and predicts clinical outcome in breast cancer patients. *Clin Exp Med*. 2018;18(2):203-213. doi:10.1007/s10238-018-0487-4
189. Drucker KL, Gianinni C, Decker PA, Diamandis EP, Scarisbrick IA. Prognostic significance of multiple kallikreins in high-grade astrocytoma. *BMC Cancer*. 2015;15:565. doi:10.1186/s12885-015-1566-5
190. Ahmadipour Y, Gembruch O, Pierscianek D, Sure U, Jabbarli R. Does the expression of glial fibrillary acid protein (GFAP) stain in glioblastoma tissue have a prognostic impact on survival? *Neurochirurgie*. 2020;66(3):150-154. doi:10.1016/j.neuchi.2019.12.012
191. Klucky B, Mueller R, Vogt I, et al. Kallikrein 6 induces E-cadherin shedding and promotes cell proliferation, migration, and invasion. *Cancer Res*. 2007;67(17):8198-8206. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0607
192. Ghosh MC, Grass L, Soosaipillai A, Sotiropoulou G, Diamandis EP. Human kallikrein 6 degrades extracellular matrix proteins and may enhance the metastatic potential of tumour cells. *Tumour Biol*. 2004;25(4):193-199. doi:10.1159/000081102
193. Nagahara H, Mimori K, Utsunomiya T, et al. Clinicopathologic and biological significance of kallikrein 6 overexpression in human gastric cancer. *Clin Cancer Res*. 2005;11(19 Pt 1):6800-6806. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0943
194. Lee SH, Davison JA, Vidal SM, Belouchi A. Cloning, expression and chromosomal location of NKX6B TO 10Q26, a region frequently deleted in brain tumors. *Mamm Genome*. 2001;12(2):157-162. doi:10.1007/s003350010247
195. Dai J, Peng T, Yu X. NK6 Homeobox 2 Regulated Gastrokin-2 Suppresses Gastric Cancer Cell Proliferation and Invasion via Akt Signaling Pathway. *Cell Biochem Biophys*. 2021;79(1):123-131. doi:10.1007/s12013-020-00948-9
196. Lin X, Lu T, Deng H, et al. Serum neurofilament light chain or glial fibrillary acidic protein in the diagnosis and prognosis of brain metastases. *J Neurol*. 2022;269(2):815-823. doi:10.1007/s00415-021-10660-0
197. Darlix A, Hirtz C, Mollevi C, et al. Serum glial fibrillary acidic protein is a predictor of brain metastases in patients with metastatic breast cancer. *Int J Cancer*. 2021;149(8):1605-1618. doi:10.1002/ijc.33724
198. Lyubimova NV, Timofeiev YS, Sushlinskii NE. [The glio-fibrillar acid protein in blood serum of patients with brain tumors and neurological diseases of non-tumorous etiology]. *Klin Lab Diagn*. 2016;61(8):466-469.

199. Lyubimova NV, Timofeev YS, Mitrofanov AA, Bekyashev AK, Goncharova ZA, Kushlinskii NE. Glial Fibrillary Acidic Protein in the Diagnosis and Prognosis of Malignant Glial Tumors. *Bull Exp Biol Med.* 2020;168(4):503-506. doi:10.1007/s10517-020-04741-9
200. Grube S, Freitag D, Kalff R, Ewald C, Walter J. Characterization of adherent primary cell lines from fresh human glioblastoma tissue, defining glial fibrillary acidic protein as a reliable marker in establishment of glioblastoma cell culture. *Cancer Rep (Hoboken).* 2020;4(2):e1324. doi:10.1002/cnr2.1324
201. Brot S, Malleval C, Benetollo C, et al. Identification of a new CRMP5 isoform present in the nucleus of cancer cells and enhancing their proliferation. *Experimental Cell Research.* 2013;319(5):588-599. doi:10.1016/j.yexcr.2012.12.011
202. Zheng C, Guo K, Chen B, Wen Y, Xu Y. miR-214-5p inhibits human prostate cancer proliferation and migration through regulating CRMP5. *Cancer Biomark.* 2019;26(2):193-202. doi:10.3233/CBM-190128
203. Shimizu D, Masuda T, Sato K, et al. CRMP5-associated GTPase (CRAG) Is a Candidate Driver Gene for Colorectal Cancer Carcinogenesis. *Anticancer Research.* 2019;39(1):99-106. doi:10.21873/anticanres.13084
204. Wang L, Liu W, Tang H, et al. DRP5 is involved in cancer cell growth and predicts poor prognosis in human osteosarcoma. *Cancer Med.* 2017;6(5):982-993. doi:10.1002/cam4.1009
205. Moutal A, Honnorat J, Massoma P, et al. CRMP5 Controls Glioblastoma Cell Proliferation and Survival through Notch-Dependent Signaling. *Cancer Res.* 2015;75(17):3519-3528. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-0631
206. Isoardo G, Morra I, Chiarle G, et al. Different aquaporin-4 expression in glioblastoma multiforme patients with and without seizures. *Mol Med.* 2012;18:1147-1151. doi:10.2119/molmed.2012.00015
207. Nico B, Ribatti D. Role of aquaporins in cell migration and edema formation in human brain tumors. *Experimental Cell Research.* 2011;317(17):2391-2396. doi:10.1016/j.yexcr.2011.07.006
208. Ding T, Gu F, Fu L, Ma YJ. Aquaporin-4 in glioma invasion and an analysis of molecular mechanisms. *Journal of Clinical Neuroscience.* 2010;17(11):1359-1361. doi:10.1016/j.jocn.2010.02.014

209. Warth A, Kröger S, Wolburg H. Redistribution of aquaporin-4 in human glioblastoma correlates with loss of agrin immunoreactivity from brain capillary basal laminae. *Acta Neuropathol.* 2004;107(4):311-318. doi:10.1007/s00401-003-0812-0
210. Valente O, Messina R, Ingravallo G, et al. Alteration of the translational readthrough isoform AQP4ex induces redistribution and downregulation of AQP4 in human glioblastoma. *Cell Mol Life Sci.* 2022;79(3):140. doi:10.1007/s00018-021-04123-y
211. Xie Y, Wen X, Jiang Z, Fu HQ, Han H, Dai L. Aquaporin 1 and aquaporin 4 are involved in invasion of lung cancer cells. *Clin Lab.* 2012;58(1-2):75-80.
212. Wu X, Wu G, Zhang H, et al. MiR-196b Promotes the Invasion and Migration of Lung Adenocarcinoma Cells by Targeting AQP4. *Technol Cancer Res Treat.* 2021;20:1533033820985868. doi:10.1177/1533033820985868
213. Chen Y, Gao F, Jiang R, et al. Down-Regulation of AQP4 Expression via p38 MAPK Signaling in Temozolomide-Induced Glioma Cells Growth Inhibition and Invasion Impairment. *J Cell Biochem.* 2017;118(12):4905-4913. doi:10.1002/jcb.26176
214. Jayaram S, Balakrishnan L, Singh M, et al. Identification of a Novel Splice Variant of Neural Cell Adhesion Molecule in Glioblastoma Through Proteogenomics Analysis. *OMICS.* 2018;22(6):437-448. doi:10.1089/omi.2017.0220
215. Liu Q, Chen X, Li G, et al. Primary central nervous system ALK-positive anaplastic large cell lymphoma with CD56 abnormally expression in a Chinese child: Challenge in diagnostic practice. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2020;34:2058738420941756. doi:10.1177/2058738420941756
216. Li J, Yang R, Yang H, et al. NCAM regulates the proliferation, apoptosis, autophagy, EMT, and migration of human melanoma cells via the Src/Akt/mTOR/cofilin signaling pathway. *J Cell Biochem.* 2020;121(2):1192-1204. doi:10.1002/jcb.29353
217. Guan G, Niu X, Qiao X, Wang X, Liu J, Zhong M. Upregulation of Neural Cell Adhesion Molecule 1 (NCAM1) by hsa-miR-141-3p Suppresses Ameloblastoma Cell Migration. *Med Sci Monit.* 2020;26:e923491. doi:10.12659/MSM.923491
218. Deborde S, Omelchenko T, Lyubchik A, et al. Schwann cells induce cancer cell dispersion and invasion. *J Clin Invest.* 126(4):1538-1554. doi:10.1172/JCI82658
219. Talieri M, Zoma M, Devetzi M, Scorilas A, Ardavanis A. Kallikrein-related peptidase 6 (KLK6) gene expression in intracranial tumors. *Tumour Biol.* 2012;33(5):1375-1383. doi:10.1007/s13277-012-0385-4

220. Ogawa K, Utsunomiya T, Mimori K, et al. Clinical significance of human kallikrein gene 6 messenger RNA expression in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2005;11(8):2889-2893. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-2281
221. Liu X, Xiong H, Li J, He Y, Yuan X. Correlation of hK6 expression with tumor recurrence and prognosis in advanced gastric cancer. *Diagn Pathol.* 2013;8:62. doi:10.1186/1746-1596-8-62
222. Henkhaus RS, Gerner EW, Ignatenko NA. Kallikrein 6 is a mediator of K-RAS-dependent migration of colon carcinoma cells. *Biol Chem.* 2008;389(6):757-764. doi:10.1515/BC.2008.087
223. Kim JT, Song EY, Chung KS, et al. Up-regulation and clinical significance of serine protease kallikrein 6 in colon cancer. *Cancer.* 2011;117(12):2608-2619. doi:10.1002/cncr.25841
224. Nathalie HV, Chris P, Serge G, et al. High kallikrein-related peptidase 6 in non-small cell lung cancer cells: an indicator of tumour proliferation and poor prognosis. *J Cell Mol Med.* 2009;13(9B):4014-4022. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00763.x
225. Krenzer S, Peterziel H, Mauch C, et al. Expression and function of the kallikrein-related peptidase 6 in the human melanoma microenvironment. *J Invest Dermatol.* 2011;131(11):2281-2288. doi:10.1038/jid.2011.190
226. Pampalakis G, Prosnikli E, Agalioti T, Vlahou A, Zoumpourlis V, Sotiropoulou G. A tumor-protective role for human kallikrein-related peptidase 6 in breast cancer mediated by inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Res.* 2009;69(9):3779-3787. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1976
227. Sidiropoulos KG, Ding Q, Pampalakis G, et al. KLK6-regulated miRNA networks activate oncogenic pathways in breast cancer subtypes. *Mol Oncol.* 2016;10(7):993-1007. doi:10.1016/j.molonc.2016.03.008
228. Schrader CH, Kolb M, Zaoui K, et al. Kallikrein-related peptidase 6 regulates epithelial-to-mesenchymal transition and serves as prognostic biomarker for head and neck squamous cell carcinoma patients. *Mol Cancer.* 2015;14:107. doi:10.1186/s12943-015-0381-6
229. Kaneko N, Kawano S, Yasuda K, et al. Differential roles of kallikrein-related peptidase 6 in malignant transformation and  $\Delta$ Np63 $\beta$ -mediated epithelial-mesenchymal transition of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2017;75:148-157. doi:10.1016/j.oraloncology.2017.11.004

230. Sung PJ, Boulos N, Tilby MJ, et al. Identification and characterisation of STMN4 and ROBO2 gene involvement in neuroblastoma cell differentiation. *Cancer Lett.* 2013;328(1):168-175. doi:10.1016/j.canlet.2012.08.015
231. Zheng C, Quan RD, Wu CY, et al. Growth-associated protein 43 promotes thyroid cancer cell lines progression via epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Mol Med.* 2019;23(12):7974-7984. doi:10.1111/jcmm.14460
232. Zhang W, Yang S, Chen D, et al. SOX2-OT induced by PAI-1 promotes triple-negative breast cancer cells metastasis by sponging miR-942-5p and activating PI3K/Akt signaling. *Cell Mol Life Sci.* 2022;79(1):59. doi:10.1007/s00018-021-04120-1
233. Lai Y, Dong L, Jin H, Li H, Sun M, Li J. Exosome long non-coding RNA SOX2-OT contributes to ovarian cancer malignant progression by miR-181b-5p/SCD1 signaling. *Aging (Albany NY).* 2021;13(20):23726-23738. doi:10.18632/aging.203645
234. Song X, Wang H, Wu J, Sun Y. Long Noncoding RNA SOX2-OT Knockdown Inhibits Proliferation and Metastasis of Prostate Cancer Cells Through Modulating the miR-452-5p/HMGB3 Axis and Inactivating Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway. *Cancer Biother Radiopharm.* 2020;35(9):682-695. doi:10.1089/cbr.2019.3479
235. Tai Y, Ji Y, Liu F, et al. Long noncoding RNA SOX2-OT facilitates laryngeal squamous cell carcinoma development by epigenetically inhibiting PTEN via methyltransferase EZH2. *IUBMB Life.* 2019;71(9):1230-1239. doi:10.1002/iub.2026
236. Zhang E, Li X. LncRNA SOX2-OT regulates proliferation and metastasis of nasopharyngeal carcinoma cells through miR-146b-5p/HNRNPA2B1 pathway. *J Cell Biochem.* 2019;120(10):16575-16588. doi:10.1002/jcb.28917
237. Wang H, Hu Q, Tong Y, et al. LncRNA SOX2-OT regulates miR-192-5p/RAB2A axis and ERK pathway to promote glioblastoma cell growth. *Cell Cycle.* 2021;20(19):2010-2020. doi:10.1080/15384101.2021.1965722
238. Wei CX, Wong H, Xu F, Liu Z, Ran L, Jiang RD. IRF4-induced upregulation of lncRNA SOX2-OT promotes cell proliferation and metastasis in cholangiocarcinoma by regulating SOX2 and PI3K/AKT signaling. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2018;22(23):8169-8178. doi:10.26355/eurrev\_201812\_16509
239. Wang Z, Tan M, Chen G, Li Z, Lu X. LncRNA SOX2-OT is a novel prognostic biomarker for osteosarcoma patients and regulates osteosarcoma cells proliferation and motility through modulating SOX2. *IUBMB Life.* 2017;69(11):867-876. doi:10.1002/iub.1681

240. Wo Q, Zhang D, Hu L, et al. Long noncoding RNA SOX2-OT facilitates prostate cancer cell proliferation and migration via miR-369-3p/CFL2 axis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019;520(3):586-593. doi:10.1016/j.bbrc.2019.09.108
241. Nakada M, Yamada A, Takino T, et al. Suppression of Membrane-type 1 Matrix Metalloproteinase (MMP)-mediated MMP-2 Activation and Tumor Invasion by Testican 3 and Its Splicing Variant Gene Product, N-Tes1. *Cancer Research.* 2001;61(24):8896-8902.
242. Yu Y, Wang Z, Huang Z, Tang X, Huang X, Li W. C1orf61 promotes hepatocellular carcinoma metastasis and increases the therapeutic response to sorafenib. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2021;1868(8):119048. doi:10.1016/j.bbamcr.2021.119048
243. Yue Y, Deng P, Xiao H, et al. N6-methyladenosine-mediated downregulation of miR-374c-5p promotes cadmium-induced cell proliferation and metastasis by targeting GRM3 in breast cancer cells. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2022;229:113085. doi:10.1016/j.ecoenv.2021.113085
244. Yi H, Geng L, Black A, Talmon G, Berim L, Wang J. The miR-487b-3p/GRM3/TGF $\beta$  signaling axis is an important regulator of colon cancer tumorigenesis. *Oncogene.* 2017;36(24):3477-3489. doi:10.1038/onc.2016.499
245. Prickett TD, Wei X, Cardenas-Navia I, et al. Exon capture analysis of G protein-coupled receptors identifies activating mutations in GRM3 in melanoma. *Nat Genet.* 2011;43(11):1119-1126. doi:10.1038/ng.950
246. Lu J, Li Y. Circ\_0079593 facilitates proliferation, metastasis, glucose metabolism and inhibits apoptosis in melanoma by regulating the miR-516b/GRM3 axis. *Mol Cell Biochem.* 2020;475(1-2):227-237. doi:10.1007/s11010-020-03875-8
247. Zhang X, He Y, Jiang Y, et al. TMEM229A suppresses non-small cell lung cancer progression via inactivating the ERK pathway. *Oncol Rep.* 2021;46(2):176. doi:10.3892/or.2021.8127
248. Koper-Lenkiewicz OM, Milewska AJ, Kamińska J, et al. Myelin-associated proteins are potential diagnostic markers in patients with primary brain tumour. *Ann Med.* 53(1):1710-1721. doi:10.1080/07853890.2021.1983205
249. Cd P, Vn K, Pt S, et al. The spectrum of human kallikrein 6 (zyme/protease M/neurosin) expression in human tissues as assessed by immunohistochemistry. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society.* 2001;49(11). doi:10.1177/002215540104901111

250. Shaw JLV, Diamandis EP. Distribution of 15 human kallikreins in tissues and biological fluids. *Clin Chem*. 2007;53(8):1423-1432. doi:10.1373/clinchem.2007.088104
251. Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet*. 2003;33(1):49-54. doi:10.1038/ng1060
252. Fidler IJ. Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Res*. 1975;35(1):218-224.
253. Chen W, Hoffmann AD, Liu H, Liu X. Organotropism: new insights into molecular mechanisms of breast cancer metastasis. *NPJ Precis Oncol*. 2018;2:4. doi:10.1038/s41698-018-0047-0
254. Minn AJ, Kang Y, Serganova I, et al. Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumors. *J Clin Invest*. 2005;115(1):44-55. doi:10.1172/JCI200522320
255. Zhang L, Fan M, Napolitano F, Gao X, Xu Y, Li L. Transcriptomic analysis identifies organ-specific metastasis genes and pathways across different primary sites. *J Transl Med*. 2021;19:31. doi:10.1186/s12967-020-02696-z
256. HomoloGene - NCBI. Accessed September 13, 2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene/?term=68279>
257. Tsakonas G, Lewensohn R, Botling J, et al. An immune gene expression signature distinguishes central nervous system metastases from primary tumours in non-small-cell lung cancer. *Eur J Cancer*. 2020;132:24-34. doi:10.1016/j.ejca.2020.03.014
258. Liu Y, Ye G, Huang L, et al. Single-cell transcriptome analysis demonstrates inter-patient and intra-tumor heterogeneity in primary and metastatic lung adenocarcinoma. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(21):21559-21581. doi:10.18632/aging.103945
259. Iwamoto T, Niikura N, Ogiya R, et al. Distinct gene expression profiles between primary breast cancers and brain metastases from pair-matched samples. *Sci Rep*. 2019;9(1):13343. doi:10.1038/s41598-019-50099-y
260. Ferguson SD, Zheng S, Xiu J, et al. Profiles of brain metastases: Prioritization of therapeutic targets. *Int J Cancer*. 2018;143(11):3019-3026. doi:10.1002/ijc.31624
261. Priedigkeit N, Hartmaier RJ, Chen Y, et al. Intrinsic Subtype Switching and Acquired ERBB2/HER2 Amplifications and Mutations in Breast Cancer Brain Metastases. *JAMA Oncol*. 2017;3(5):666-671. doi:10.1001/jamaoncol.2016.5630
262. Lee JY, Park K, Lee E, et al. Gene Expression Profiling of Breast Cancer Brain Metastasis. *Sci Rep*. 2016;6:28623. doi:10.1038/srep28623

263. Jeevan DS, Cooper JB, Braun A, Murali R, Jhanwar-Uniyal M. Molecular Pathways Mediating Metastases to the Brain via Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Genes, Proteins, and Functional Analysis. *Anticancer Res.* 2016;36(2):523-532.
264. Wikman H, Westphal L, Schmid F, et al. Loss of CADM1 expression is associated with poor prognosis and brain metastasis in breast cancer patients. *Oncotarget.* 2014;5(10):3076-3087. doi:10.18632/oncotarget.1832
265. Palmieri D, Fitzgerald D, Shreeve SM, et al. Analyses of resected human brain metastases of breast cancer reveal the association between up-regulation of hexokinase 2 and poor prognosis. *Mol Cancer Res.* 2009;7(9):1438-1445. doi:10.1158/1541-7786.MCR-09-0234
266. Magklara A, Mellati AA, Wasney GA, et al. Characterization of the enzymatic activity of human kallikrein 6: Autoactivation, substrate specificity, and regulation by inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;307(4):948-955. doi:10.1016/s0006-291x(03)01271-3



## LETTER TO EDITOR

# Increased risk of brain metastases among patients with melanoma and *PROM2* expression in metastatic lymph nodes

Dear Editor,

Brain metastases occur in the progression of metastatic melanoma in up to 44% of cases.<sup>1</sup> Despite evidence of clinical benefit of combined immunotherapies on melanoma brain metastases,<sup>2</sup> more than 50% of patients will have brain progression, challenging daily practice in oncology. Molecular markers predictive of the risk of melanoma brain metastases remain largely to be identified.<sup>3</sup>

In our study, we performed transcriptomic analyses on laser-microdissected tumor cells from metastatic lymph nodes of patients with melanoma, to identify biomarkers associated with the occurrence of brain metastases over a median follow-up of 48 months. We followed REMARK recommendations for tumor marker prognostic studies.<sup>4</sup> All methods are fully detailed in Material and Method in the Supporting Information.

Among the 51 patients selected for the development cohort (Figure S1), after a median follow-up of 48 months from the time of regional lymph node disease, 19 (37%) developed brain metastases (Group 3), whereas 32 (63%) did not (Group 1 including patients with only regional lymph node metastases and who did not relapse, and Group 2 including patients without brain metastases but with other metastatic localizations) (Table S1 for patients' characteristics and Figure 1A). The median overall survival calculated from first diagnosis of regional lymph node metastasis was significantly shorter among patients with brain metastases than among patients without (39 vs 76 months,  $P < .01$ ) (Figure S2). The median survival from the time of brain metastases was 13.3 months (range: 2-72 months).

Each metastatic lymph node was laser microdissected to select a minimum number of 1500 tumor cells. After RNA extraction, all samples had a RNA integrity number over 7, enabling transcriptomic analyses. On transcriptomic data, multivariate analysis was carried out to compare patients with and without brain metastases. We focused on the

*PROM2* gene, also called prominin-2, with some of the highest *d*-scores at 4.6 and fold change of 3.3 (Table S2), and because *PROM2*, a membrane glycoprotein and a second member of the prominin family, induces membrane protrusions<sup>5</sup> and could thus be implicated in invasive processes. Using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR), the median expression of *PROM2* mRNA was significantly higher in metastatic lymph nodes from patients who subsequently developed brain metastases ( $\Delta$  cycle threshold [Ct] = 4.9, interquartile range [IQR] = 6.3 vs  $\Delta$ Ct = 2.1, IQR = 3.9;  $P = .005$ ; Figure 1A).

We then analyzed transcriptomic data downloaded from three public databanks (the Cancer Genome Atlas SKCM and GSE22155 and GSE65904 cohorts<sup>6-8</sup>), and found that a high *PROM2* expression in melanoma metastatic lymph nodes was associated with poor survival (Figure S3).

Using immunohistochemistry (IHC) on the 51 metastatic lymph nodes of the development cohort, *PROM2* was only expressed by cancer cells and the mean "PROM2 IHC score" was significantly higher among patients with brain metastases compared to patients without (8.8 vs 4;  $P < .01$ ) (Figure 1B). Overall survival was significantly longer among patients who had a "PROM2 IHC score"  $< 5$  than among patients who reached the cutoff of 5 ( $P < .01$ ; Figure 1C).

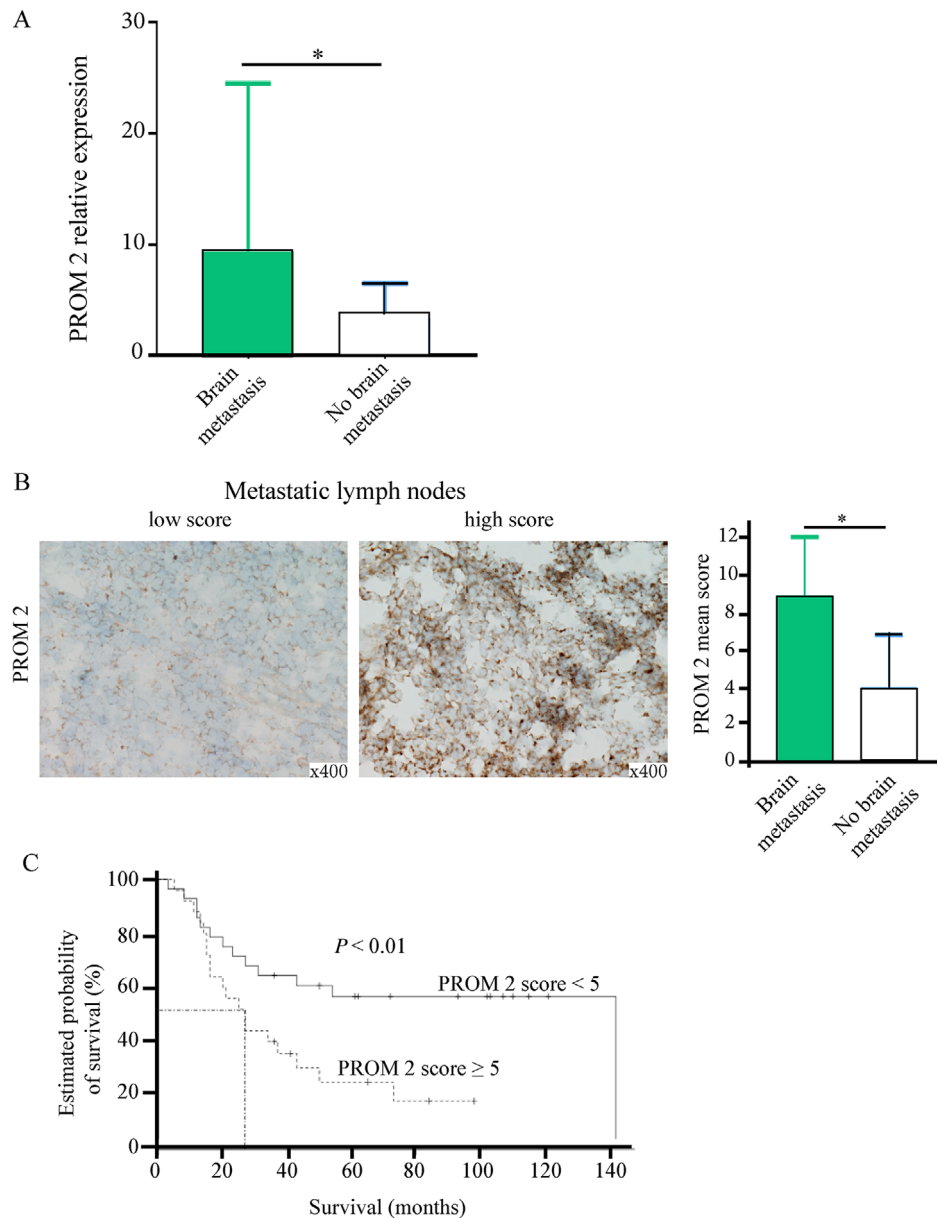
Across the three groups of patients, we observed a gradual, significant increase in *PROM2* mRNA and protein expression from Group 1 to Group 3 (Figure 2B). After a median follow-up of 80 months, overall survival was also much longer for Group 1 with only metastatic regional lymph nodes (Figure 2C).

Using multivariate regression, a "PROM2 IHC score"  $\geq 5$  (odds ratio at 28.2) and the presence of bone metastases were the two variables significantly associated with the risk of brain metastases (Table S3).

Between 2013 and 2014, 50 additional patients with stage III melanoma at diagnosis and a frozen biopsy sample from lymph node metastases were included in

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2020 The Authors. *Clinical and Translational Medicine* published by John Wiley & Sons Australia, Ltd on behalf of Shanghai Institute of Clinical Bioinformatics



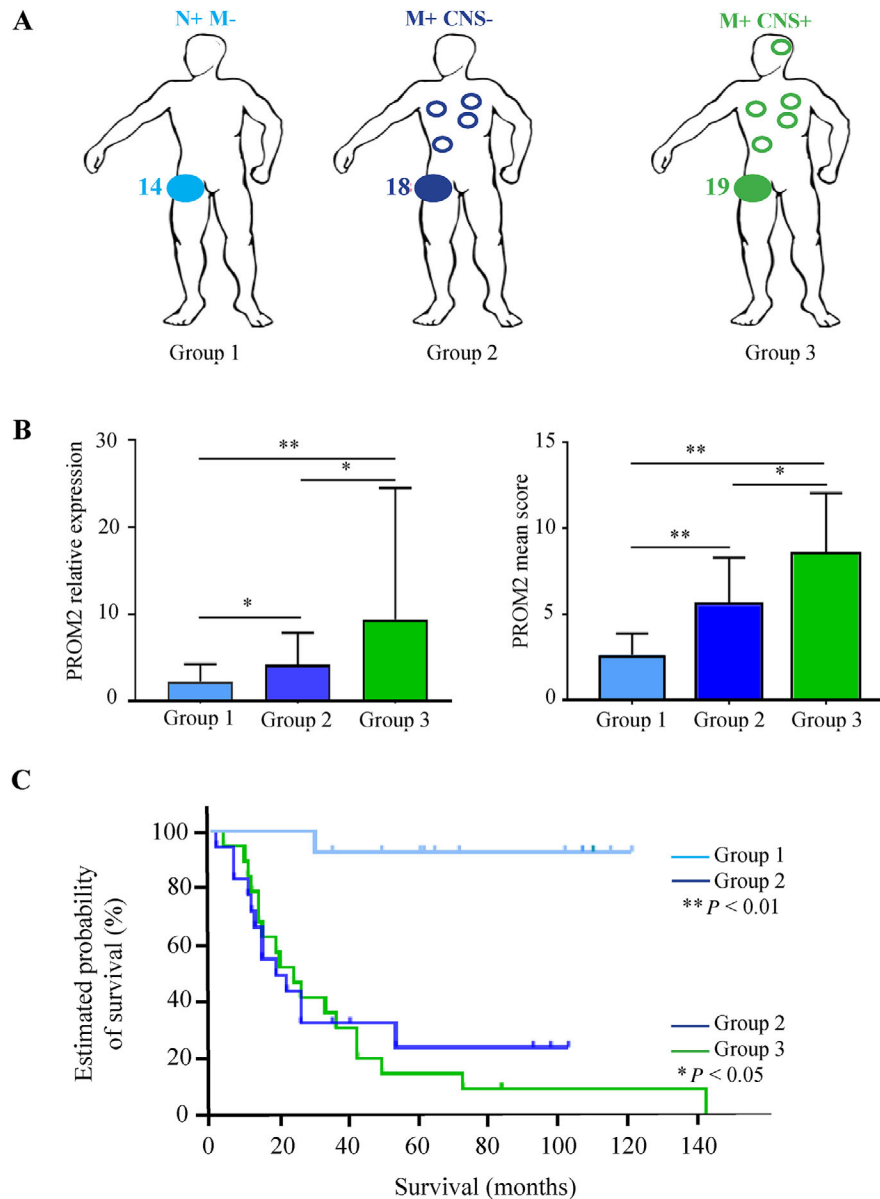
**FIGURE 1** *PROM2* mRNA expression, “*PROM2* IHC score” in metastatic lymph nodes, and survival data in the development cohort. (A), *PROM2* mRNA expression is significantly higher in metastatic lymph nodes from patients with brain metastases than in those from patients without brain metastases ( $P < .05$ ). (B), Using immunostaining on metastatic lymph nodes, the mean “*PROM2* IHC score” is significantly higher among patients with brain metastases than among those without ( $P < .05$ ). (C), Survival according to the “*PROM2* IHC score” level in the development cohort of 51 patients. A “*PROM2* IHC score”  $\geq 5$  is significantly associated with a shorter survival

the validation cohort. After a median follow-up of 48 months from the time of the regional lymph node disease, 19 patients (38%) developed brain metastases, whereas 31 (62%) did not. There was no significant difference between the development and the validation cohorts (Table S4).

In this validation cohort, when *PROM2* mRNA expression was assessed on melanoma cancer cells laser microdissected from metastatic lymph nodes, it was significantly higher among patients who developed brain metastases (median  $\Delta Ct = 5.1$ , IQR = 2.3 vs  $\Delta Ct = 2$ , IQR = 4.6)

( $P < .01$ ). The “*PROM2* IHC score” was also significantly higher in case of brain metastases (7.4 vs 2.1;  $P < .01$ ). Using a cutoff of  $\geq 5$  for the “*PROM2* IHC score” in multivariate regression, the “*PROM2* IHC score” was the only factor associated with the risk of brain metastases.

In the two cohorts, in univariate analysis, a high “*PROM2* IHC score”  $\geq 5$  in metastatic lymph nodes was not associated with the risk of other metastatic sites (lung, liver, and bone), except for lung metastases in the validation cohort (Table S2). In both the development



**FIGURE 2** PROM2 expression and survival data according to subgroups in the development cohort. (A), Group 1 includes patients with only regional lymph node metastases; Group 2 includes patients without brain metastases but with other distant metastatic localizations; Group 3 includes patients with brain metastases. (B), PROM2 mRNA expression and PROM2 mean score in the three different groups. PROM2 mRNA expression and PROM2 mean score are gradually and significantly different in the three groups. (C), Survival curves according to the three different groups. \* $P < .05$ ; \*\* $P < 0.01$

and validation cohorts, the presence of brain metastases and a “PROM2 IHC score” of  $\geq 5$  were the only two factors significantly associated with mortality (Table 1; Figure S4).

In this study, among patients with resectable regional lymph node metastases from cutaneous melanoma, we identified PROM2 as a biomarker significantly associated with the risk of distant metastases, particularly brain metastases, and a decreased survival. This association is strength of our study, with potential translational applications among patients with stage III melanoma. Indeed,

adjuvant treatment using immunotherapy or targeted anti-BRAF and anti-MEK (anti-Mitogen-activated protein kinase) therapies is recommended for patients with stage III disease. No other marker than regional lymph node involvement is currently included in the therapeutic decision. After validation in a larger cohort, the “PROM2 IHC score” could be used to identify high- and low-risk patients with stage III melanoma more efficiently, and could thus be included in adjuvant clinical trials.

In the management of metastatic melanomas, 20% to 40% of patients remain insensitive to targeted

**TABLE 1** Univariate and multivariate analyses of factors associated with mortality in the development and validation cohorts

Variables	Development cohort (n = 51)				Validation cohort (n = 50)			
	Univariate analysis HR [95% CI]	P-value	Multivariate analysis aHR [95% CI]	P-value	Univariate analysis HR [95% CI]	P-value	Multivariate analysis aHR [95% CI]	P-value
Age (years), mean ± SD	1.01 [0.98-1.03]	.37			0.98 [0.96-1.01]	.26		
Gender (women)	0.94 [0.46-1.93]	.88			0.82 [0.39-1.75]	.62		
Initial TNM classification		.01		–		.94		
IIIB	1 (reference)		–		1 (reference)			
IIIC	1.22 [0.57-2.60]		–		1.12 [0.53-2.34]			
IIID	7.26 [1.85-28.4]		–		0.86 [0.11-6.58]			
Primary site of melanoma		.49				.20		
Head and neck	1 (reference)				1 (reference)			
Trunk	0.91 [0.26-3.15]				0.42 [0.10-1.64]			
Upper limb	0.48 [0.13-1.75]				0.80 [0.19-3.26]			
Lower limb	0.46 [0.15-1.44]				1.08 [0.30-3.86]			
Unknown	0.49 [0.05-4.45]				–			
Metastatic site								
Brain	2.61 [1.28-5.34]	.008	–	–	5.20 [2.39-11.3]	<.0001	8.08 [2.49-26.2]	.0005
Lung	3.82 [1.78-8.18]	.0005	10.7 [2.86-39.9]	.0004	2.36 [1.13-4.96]	.02	–	–
Bone	2.00 [0.91-4.36]	.08	–	–	2.50 [1.17-5.37]	.01	–	–
Liver	1.85 [0.90-3.79]	.09	–	–	2.07 [0.99-4.31]	.05	–	–
Breslow index (mm), per 1 IQR of more	1.19 [1.04-1.36]	.01	–	–	0.93 [0.82-1.06]	.28		
Ulceration (yes)	2.75 [1.26-6.00]	.01	–	–	1.19 [0.53-2.65]	.67		
BRAF status:								
BRAF V600E (yes)	1.49 [0.73-3.04]	.26			1.49 [0.65-3.42]	.34		
PROM2 mRNA expression, per 1 IQR of more	1.02 [0.99-1.05]	.11	–	–	1.16 [1.03-1.31]	.01	–	–
PROM2 IHC score								
High (≥ 5)	2.41 [1.16-5.03]	.01	6.48 [1.65-25.5]	.007	3.60 [1.69-7.70]	.0001	3.95 [1.14-13.7]	.02
Interaction terms								
Lung metastases × PROM2 IHC score ≥5			0.12 [0.02-0.64]	.01				
Brain metastases × PROM2 IHC score ≥5							0.21 [0.04-1.10]	.06

Note. Univariate and multivariate Cox proportional hazard regression models were run with the sample of deceased patients. The assumptions of the model were verified. Hazard ratios (HRs) for continuous variables were expressed per 1 SD or 1 interquartile range (IQR) as appropriate. Variables yielding *P*-values under .2 in the univariate analysis were considered for inclusion in the multivariate analysis. A stepwise selection process of the lowest *P*-values was used for the multivariate analysis, also using interaction terms. aHR: adjusted hazard ratio.

treatments.<sup>9,10</sup> Our study opens new perspectives for the use of PROM2 as a potential therapeutic target for the treatment of metastatic melanoma.

The role of PROM2 in the metastatic process has not been investigated, and further studies are required to elu-

cidate this role and to see whether PROM2, like PROM1, provides stemness properties.

Our findings open new perspectives for further studies to validate PROM2 as a useful biomarker in adjuvant clinical trials, and as a potential biotarget

for the treatment of metastatic melanoma in resort situations.

## ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Ms S. Leyshon and Ms A. Swaine for revising the English language. The study was supported by INSERM, University of Paris, and University Paris 13.

## ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

All patients had been informed that a part of their remaining samples could be used for research after diagnosis had been established, and none opposed it. Written informed consent was obtained from each patient. The Clinical Research Board Ethics Committee approved this study (CPP-Ile-de-France#13218).

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

All data generated or analyzed during this study are included in this published article and its Supporting Information.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

GB, AJ, and MB conceived and designed the study. PT, BB, JD, CL, and SM provided patient clinical data. MB provided patient tumor samples. TTN and MEB carried out the laser microdissections. GG and JPF analyzed the transcriptomic data. TTN and ChL performed the immunostaining. FP did statistical analyses. AJ, GB, and MB provided financial support. AJ and GB provided administrative support. TTN, GB, and MB drafted the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Thuy Thi Nguyen<sup>1,2,3</sup>

Guillaume Gapihan<sup>1,4</sup>

Pauline Tetu<sup>5</sup>

Frédéric Pamoukdjian<sup>1,6,7</sup>

Morad El Bouchtaoui<sup>1</sup>

Christophe Lebœuf<sup>1</sup>

Jean-Paul Feugeas<sup>8,9</sup>

Justine Paris<sup>1</sup>

Barouyr Baroudjian<sup>5</sup>

Julie Delyon<sup>5,10</sup>

Samia Mourah<sup>4,10,11</sup>

Céleste Lebbé<sup>4,5,10</sup>

Anne Janin<sup>1,4</sup>

Guilhem Bousquet<sup>1,2,7</sup> 

Maxime Battistella<sup>4,10,12</sup>

<sup>1</sup> INSERM U942, Universités de Paris et Sorbonne Paris Nord, Bobigny, France

<sup>2</sup> AP-HP Hôpital Avicenne, Oncologie Médicale, Bobigny, France

<sup>3</sup> Medical Oncology Department A, National Cancer Hospital, Hanoi, Vietnam

<sup>4</sup> Hôpital Saint-Louis, Université de Paris, Paris, France

<sup>5</sup> Dermatologie, AP-HP Hôpital Saint Louis, Paris, France

<sup>6</sup> Médecine Gériatrique, AP-HP Hôpital Avicenne, Bobigny, France

<sup>7</sup> Université Sorbonne Paris Nord, Cardiovascular Markers in Stressed Conditions, MASCOT, Bobigny, France

<sup>8</sup> INSERM U722, Paris, France

<sup>9</sup> Université de Franche-Comté, Besançon, France

<sup>10</sup> INSERM U976, Paris, France

<sup>11</sup> Solid Tumor Genomic Department, AP-HP, Hôpital Saint Louis, Paris, France

<sup>12</sup> Laboratoire de Pathologie, AP-HP Hôpital Saint-Louis, Paris, France

## Correspondence

Maxime Battistella, Hôpital Saint-Louis, Université de Paris, 1 avenue Claude Vellefaux, Paris, F-75010, France.

Email: [maxime.battistella@aphp.fr](mailto:maxime.battistella@aphp.fr)


Guilhem Bousquet, INSERM U942, Universités de Paris et Sorbonne Paris Nord, SMBH, Rue de Chablis, Bobigny, F-93000, France.

Email: [guilhem.bousquet@aphp.fr](mailto:guilhem.bousquet@aphp.fr)

Guillaume Gapihan, Pauline Tetu, and Frédéric Pamoukdjian contributed equally to this work.

Guilhem Bousquet and Maxime Battistella are co-senior authors.

## ORCID

Guilhem Bousquet  <https://orcid.org/0000-0001-5594-6694>

## REFERENCES

1. Cagney DN, Martin AM, Catalano PJ, et al. Incidence and prognosis of patients with brain metastases at diagnosis of systemic malignancy: a population-based study. *Neuro Oncol.* 2017;19(11):1511-1521.
2. Tawbi HA, Forsyth PA, Algazi A, et al. Combined nivolumab and ipilimumab in melanoma metastatic to the brain. *N Engl J Med.* 2018;379(8):722-730.
3. Jilaveanu LB, Parisi F, Barr ML, et al. PLEKHA5 as a biomarker and potential mediator of melanoma brain metastasis. *Clin Cancer Res.* 2015;21(9):2138-2147.
4. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, et al. REporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies (REMARK). *British journal of cancer.* 2005;93(4):387-391.




5. Singh RD, Schroeder AS, Scheffer L, et al. Prominin-2 expression increases protrusions, decreases caveolae and inhibits Cdc42 dependent fluid phase endocytosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;434(3):466-472.
6. Cirenajwis H, Ekedahl H, Lauss M, et al. Molecular stratification of metastatic melanoma using gene expression profiling: prediction of survival outcome and benefit from molecular targeted therapy. *Oncotarget*. 2015;6(14):12297-12309.
7. Guan J, Gupta R, Filipp FV. Cancer systems biology of TCGA SKCM: efficient detection of genomic drivers in melanoma. *Sci Rep*. 2015;5:7857.
8. Jonsson G, Busch C, Knappskog S, et al. Gene expression profiling-based identification of molecular subtypes in stage IV melanomas with different clinical outcome. *Clin Cancer Res*. 2010;16(13):3356-3367.
9. Manzano JL, Layos L, Buges C, et al. Resistant mechanisms to BRAF inhibitors in melanoma. *Ann Transl Med*. 2016;4(12):237.
10. Gide TN, Wilmott JS, Scolyer RA, Long GV. Primary and acquired resistance to immune checkpoint inhibitors in metastatic melanoma. *Clin Cancer Res*. 2018;24(6):1260-1270.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

## Article

# Genomics of Breast Cancer Brain Metastases: A Meta-Analysis and Therapeutic Implications

Thuy Thi Nguyen<sup>1,2,3,4</sup>, Diaddin Hamdan<sup>2,5</sup> , Eurydice Angeli<sup>2,4,6</sup>, Jean-Paul Feugeas<sup>7,8,\*</sup>, Quang Van Le<sup>1,2</sup>, Frédéric Pamoukdjian<sup>2,4,9</sup>  and Guilhem Bousquet<sup>2,4,6,\*</sup> 

<sup>1</sup> National Cancer Hospital, Ha Noi 100000, Vietnam

<sup>2</sup> Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM), Université Paris Cité, UMR\_S942 MASCOT, 75006 Paris, France; frederic.pamoukdjian@aphp.fr (F.P.)

<sup>3</sup> Department of Pediatrics, Hanoi Medical University, Ha Noi 100000, Vietnam

<sup>4</sup> Institut Galilée, Université Sorbonne Paris Nord, 93439 Villetaneuse, France

<sup>5</sup> Hôpital La Porte Verte, 78000 Versailles, France

<sup>6</sup> Service d'Oncologie Médicale, Hôpital Avicenne, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, 93000 Bobigny, France

<sup>7</sup> INSERM U1098, 25030 Besançon, France

<sup>8</sup> Laboratoire de Biochimie Hôpital Jean Minjot, Université de Franche-Comté, 25000 Besançon, France

<sup>9</sup> Service de Médecine Gériatrique, Hôpital Avicenne, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, 93000 Bobigny, France

\* Correspondence: jean-paul.feugeas@univ-fcomte.fr (J.-P.F.); guilhem.bousquet@aphp.fr (G.B.)

**Simple Summary:** Breast cancer brain metastases are a challenging daily practice, and the biological link between gene mutations and metastatic spread to the brain remains to be determined. We performed a meta-analysis on genomic data obtained from primary tumors, extracerebral metastases and brain metastases, to identify gene alterations associated with brain metastatic processes. Fifty-seven publications were selected for this meta-analysis, including 37,218 patients in all, 11,906 primary tumor samples, 5541 extracerebral metastasis samples, and 1485 brain metastasis samples. Using a threshold of 1% for mutation prevalence in the primary tumor, we identified 53 genes, among which 21 were associated with significant differences in prevalence between subgroups (primary tumor, extracerebral metastases, and brain metastases). In particular, we identified six genes with a higher mutation prevalence in brain metastases than in extracerebral metastases: *ESR1*, *ERBB2*, *EGFR*, *PTEN*, *BRCA2* and *NOTCH1*. These mutated genes could be responsible for the crossing of the blood–brain barrier by cancer cells, and thus have considerable potential therapeutic implications, underlining the added value of obtaining biopsies from brain metastases to develop personalized treatments.

**Abstract:** Breast cancer brain metastases are a challenging daily practice, and the biological link between gene mutations and metastatic spread to the brain remains to be determined. Here, we performed a meta-analysis on genomic data obtained from primary tumors, extracerebral metastases and brain metastases, to identify gene alterations associated with metastatic processes in the brain. Articles with relevant findings were selected using Medline via PubMed, from January 1999 up to February 2022. A critical review was conducted according to the Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-analysis statement (PRISMA). Fifty-seven publications were selected for this meta-analysis, including 37,218 patients in all, 11,906 primary tumor samples, 5541 extracerebral metastasis samples, and 1485 brain metastasis samples. We report the overall and sub-group prevalence of gene mutations, including comparisons between primary tumors, extracerebral metastases and brain metastases. In particular, we identified six genes with a higher mutation prevalence in brain metastases than in extracerebral metastases, with a potential role in metastatic processes in the brain: *ESR1*, *ERBB2*, *EGFR*, *PTEN*, *BRCA2* and *NOTCH1*. We discuss here the therapeutic implications. Our results underline the added value of obtaining biopsies from brain metastases to fully explore their biology, in order to develop personalized treatments.

**Keywords:** breast cancer; brain metastases; genomics; specific gene panel



**Citation:** Nguyen, T.T.; Hamdan, D.; Angeli, E.; Feugeas, J.-P.; Le, Q.V.; Pamoukdjian, F.; Bousquet, G. Genomics of Breast Cancer Brain Metastases: A Meta-Analysis and Therapeutic Implications. *Cancers* **2023**, *15*, 1728. <https://doi.org/10.3390/cancers15061728>

Academic Editor: David Wong

Received: 15 January 2023

Revised: 5 March 2023

Accepted: 5 March 2023

Published: 12 March 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Brain metastases are becoming a leading cause of mortality among patients with metastatic cancers, including breast cancer. In the last twenty years, the incidence of brain metastases has increased [1,2] as a result of the improved control of metastases outside the central nervous system, and of better imaging techniques that led to improved detection of brain metastases. Despite therapeutic advances, breast cancer brain metastases develop in 15% to 25% of patients [3], mainly due to HER2 overexpressing and triple negative subtypes where they occur in up to 50% of cases [4]. They have a poor life quality impact (neurological deficit, major asthenia, headaches, epileptic manifestations), and a poor prognosis, with a median survival of 16 months [5].

Brain metastatic colonization is a multistep complex process. To migrate into the brain, tumor cells have first to adhere to the brain endothelium, then disrupt the blood–brain barrier, and finally invade through the endothelial layer. Then, only a few tumor cells, which adapt to brain environment, probably have the ability to survive and form brain metastases [6]. Overall, the biological and genomic characteristics of breast cancer cells leading to this process are not fully deciphered [7].

The treatment of brain metastases remains a major therapeutic challenge, with limited indications for and benefits of curative surgery and radiation therapy [8]. Systemic drugs have limited effects on brain metastases, because most anti-cancer drugs fail to cross the blood–brain barrier [9]. Innovative approaches using physical methods or physiological transporters are being explored to facilitate drug penetration across this barrier to deliver them to brain metastases at relevant pharmacological concentrations [9]. New generation tyrosine kinase inhibitors such as osimertinib and tucatinib have been engineered to cross the blood–brain barrier more efficiently, with greater, but time-limited, control of brain metastases [10,11].

Following recent improvements in the genomic sequencing of malignant tumors, targetable genetic alterations are being increasingly identified. However, most alterations have been identified in primary tumors and not metastases [12]. Additionally, this is particularly true for brain metastases, because of the difficulty accessing these localizations [13]. Although primary tumors and metastases can harbor a common genomic signature, significant discrepancies have also been identified between matched samples from a given patient, since metastases can derive from a minority clone in the primary tumor [14]. In addition, there are few studies comparing genomic data from primary tumors and metastases.

Here, we performed the first meta-analysis on genomic data from breast cancer brain metastases. The integrative study we performed enabled us to identify gene alterations associated with brain metastasis, a requisite for the development of new targeted therapies for these localizations.

## 2. Methods

### 2.1. Search Strategy and Selection Criteria

We conducted this systematic review following the methods outlined by Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analyses (PRISMA) [15].

### 2.2. Eligibility Criteria

#### 2.2.1. Inclusion Criteria

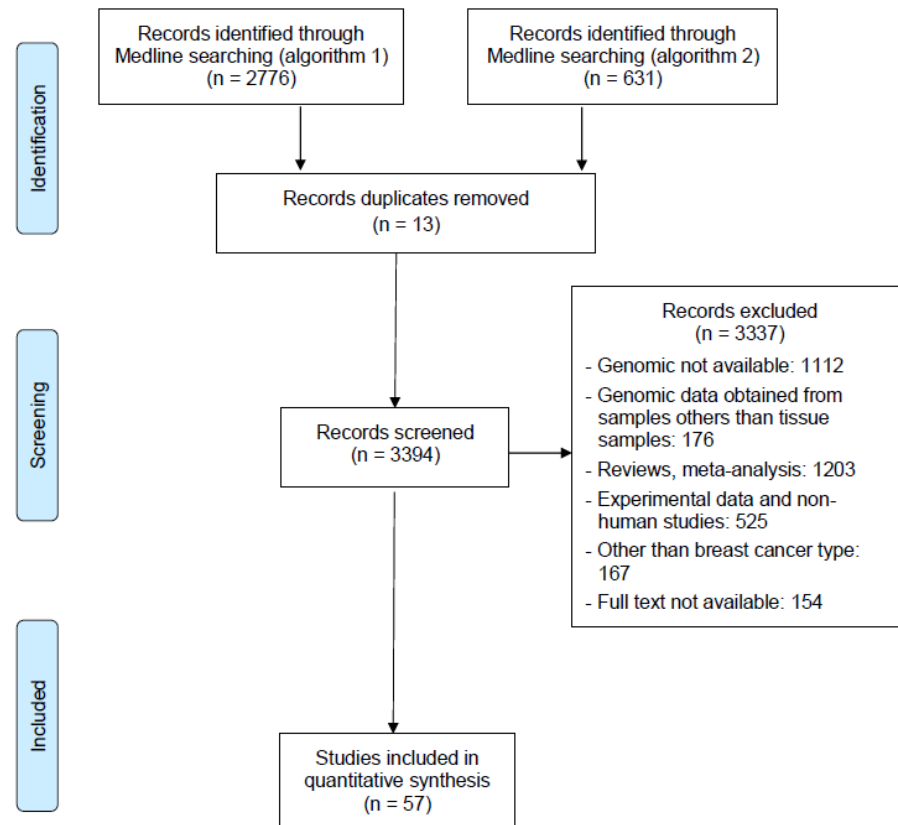
Our objective was to perform meta-analysis on genomic data obtained from breast cancer brain metastases. The inclusion criteria were: (1) any study assessing the genomics of breast cancer metastases in any localization, and (2) any article in English from 1999 to the present.

#### 2.2.2. Exclusion Criteria

The following exclusion criteria were applied: (1) studies with unusable or unavailable genomic data on metastases; (2) studies limited to genomic data from primary tumors without available genomic data on metastases; (3) genomic data obtained from samples



other than tissue samples (e.g., circulating DNA); (4) reviews, meta-analyses, letters to the editor; (5) experimental data and non-human studies, (6) articles without full text available. The PRISMA flow diagram template used in this study is detailed in Figure 1.



**Figure 1.** PRISMA flowchart for the screening and selection of the studies.

### 2.2.3. Search Strategy

For a systematic meta-analysis, we searched MEDLINE via PubMed and used the following research algorithm: (“Breast Neoplasms”[Mesh] AND “metast\*” AND (“Genomics”[Mesh] OR “mutation\*”). In total, 2776 articles were initially identified. We then tested a second algorithm to focus on brain metastases: “Breast” AND “brain” AND “metast\*” AND (“Genom\*” OR “mutation\*” OR “sequenc\*”). We obtained 631 publications. We manually searched the reference lists of all included articles to identify any potentially related articles. Zotero software version 5.0.95.1 was used to manage the references and remove any duplicates. In addition, the references contained in the literature searched and relevant reviews were also considered to avoid eligible articles being missed.

### 2.2.4. Study Selection

Two authors (TTN and GB) independently screened the papers retrieved, initially by title, then by abstract, and finally by full text.

### 2.2.5. Protocol and Registration

We registered the review in PROSPERO, an international prospective register of systematic reviews. The protocol can be accessed at: <https://www.crd.york.ac.uk/PROSPERO> (accessed on 10 September 2021)/Registration number: CRD42021272358.

### 2.2.6. Quality Assessment

To assess the quality of studies, we used the Q-genie tool [16]. It consists of 11 questions addressing the following aspects of the study methodology: rationale for the

study, selection and outcomes, comparability of comparison groups, technical and non-technical exposure, bias, sample size and power, analyses, statistical methods, control for confounders, inferences for genetic analyses and inferences from results. Each question was scored from 1 to 7, as follows: “1 (poor)”, “2”, “3 (good)”, “4”, “5 (very good)”, “6” or “7 (excellent)”. For studies with a control group, a total score of  $\leq 35$  indicates poor quality, a score of 36–45 indicates moderate quality and a score of  $> 45$  indicates good quality [16]. In our meta-analysis on genomic data, as the criterion “non-technical exposure” was not applicable, we considered that a total score of  $\leq 28$  indicated poor quality, a score between 29 and 38 indicated moderate quality and a score of  $> 38$  indicated good quality.

### 2.2.7. Statistical Analysis

The data were analyzed using R statistical software (version 4.1.0; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; <http://www.r-project.org> (accessed on 1 May 2022)). On the basis of the articles selected, we performed a meta-analysis (with the package “meta”) to assess the gene mutation prevalence in breast cancers according to the tumor site: primary tumor, extracerebral metastases and brain metastases. We only considered genes associated with a prevalence  $\geq 1\%$  in the primary tumor.

For all studies, we assessed the gene mutation prevalence according to the quality of studies, good or moderate/poor, and the tumoral site: primary tumor, extracerebral metastases and brain metastases for all tumor samples. We also assessed the gene mutation prevalence in matched tumor samples from the same patient between primary tumor, extracerebral and brain metastases; the genomic method (NGS, targeted NGS or other); and the conditions of tissue preservation (fresh frozen or formalin-fixed). For each outcome, to test the sub-group differences, we used the Q-test based on analysis of variance.

Here is a typical R script example of a single proportion using logit transformation and taking only random effect into account: `metaprop(event = name.database$variable.number.of.event, n = name.database$variable.total.number.of.observations, studlab = name.database$name.of.studies, subgroup = name.database$variable.subgroup, sm = “PLOGIT”, common = FALSE, random = TRUE)`.

We performed a pairwise comparison of gene mutation prevalence across tumor sites using z test, as follows: primary tumors vs. extracerebral metastases, primary tumors vs. brain metastases, and extracerebral metastases vs. brain metastases. We then selected all genes associated with significant differences in prevalence between subgroups and retained only those with prevalence in each tumor site (primary, extracerebral and brain metastases), and with greater prevalence in brain metastases than in the primary tumor. Of these selected genes, we performed univariate and multivariate meta-regression to take into account the effect size of tumor site, quality of studies (good vs. moderate or poor), genomic method (NGS, targeted NGS or other) and tissue preservation condition (frozen or formalin-fixed). Univariate variables yielding *p*-values under 0.20 in the univariate analysis were considered for inclusion in the multivariate analysis. Results of the meta-regression were presented as estimates ( $\beta$ -coefficient)  $\pm$  standard error.

We assessed the heterogeneity of the study results using the I<sup>2</sup> indicator and Cochran’s Q-test [17]. I<sup>2</sup> values of 0%, 25%, 50% and 75% were considered to indicate absence, low, moderate and marked heterogeneity, respectively. A *p*-value  $\leq 0.05$  of the Q tests indicated significant heterogeneity. Due to a significant heterogeneity in gene mutation prevalence, pooled results were summarized using the random-effect model and ordered in decreasing prevalence values (%) with their 95% Confidence Interval (95%CI), including a comparison of subgroup prevalence.

Graphically, the gene mutation prevalence according to the tumor site was presented as a heatmap plot. Gene mutations associated with an increased prevalence in brain metastases were presented as a bar plot of frequencies ordered in decreasing values in primary tumors. Copy-number alterations (LOH, material gain) were also presented as a bar plot of frequencies. All tests were two-tailed, and the threshold for statistical significance was set at a *p*-value  $\leq 0.05$ .

This is a meta-analysis on published data, so ethical approval was not sought.

### 3. Results

#### 3.1. Study Selection, Characteristics and Quality Assessment

After the literature search and removal of duplicate articles, we identified 3394 studies. By careful selection based on titles and abstracts, 3337 studies were excluded, mainly because genomic data were not available. A total of 57 studies were finally included in this meta-analysis (Figure 1).

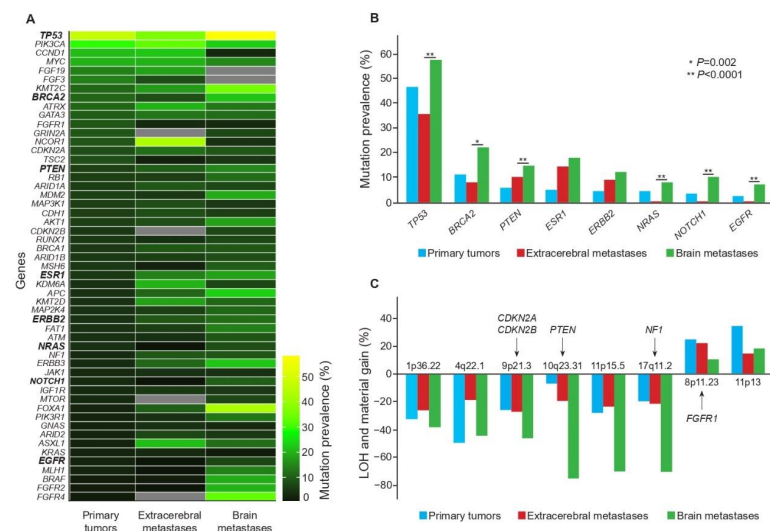
The characteristics of the 57 studies selected are summarized in Table S1. Our meta-analysis included a total of 37,218 patients with a median age at diagnosis of 53.5 years, and a total of 18,932 samples, including 11,906 primary tumor samples, 5541 extracerebral metastasis samples, and 1485 brain metastasis samples.

For the quality assessment, 29 studies (50.9%) were good quality, 25 studies (43.8%) were of moderate quality, and three studies (5.3%) were poor quality (Table S2). However, since good quality studies included much larger numbers of tumor samples than other studies, they accounted for 97.3%, 97.5% and 85.3% of the total number of samples for primary tumors, extracerebral and brain metastases, respectively.

#### 3.2. Gene Mutation Profiles in Breast Cancer Brain Metastases

Using a threshold of 1% for mutation prevalence in the primary tumor, we identified 53 genes. Considering all pooled tumor samples, we first compared gene mutation prevalence for these 53 genes between studies of good quality and studies of moderate/poor quality. For 16 genes, the mutation prevalence was significantly higher for moderate and poor-quality studies, but with small sample numbers analyzed (Table S3).

Then, we compared gene mutation prevalence according to tumor sample site: primary tumor, extracerebral metastases, and brain metastases (Figure 2A). Five of them had a mutation prevalence over 10% in all three types of samples: *TP53*, *PIK3CA*, *MYC*, *KMT2C* and *ATRX*. In brain metastases, mutation prevalence was particularly high for *TP53* (58%), *FOXA1* (43%), *FGFR4* (33%), *BRCA2* (22%), *FGFR2* (20%), *BRAF* (19%) and *PTEN* (15%).



**Figure 2.** Gene mutation prevalence, loss of heterozygosity and copy number alterations in primary tumor, extracerebral metastases and brain metastases. Panel (A) shows a heatmap plot for the prevalence of gene mutations according to the tumor site (primary tumor, extracerebral metastases and brain metastases). Panel (B) shows the increased prevalence of gene mutations in brain metastases for 8 genes: *TP53*, *BRCA2*, *PTEN*, *ESR1*, *ERBB2*, *NRAS*, *NOTCH1*, *EGFR*. *p*-values reported here corresponded to those of Table 1 and of the pairwise comparison of gene mutation prevalence between brain metastases and extracerebral metastases. Panel (C) shows the loss of heterozygosity and material gain identified in breast cancer brain metastases.

**Table 1.** Pairwise comparison of prevalence of gene mutations according to the tumor site.

Gene	<i>p</i> -Value for Pairwise Comparisons of Mutation Prevalence		
	Primary Tumors vs. Extracerebral Metastases	Primary Tumors vs. Brain Metastases	Extracerebral Metastases vs. Brain Metastases
<i>TP53</i>	<0.0001	<0.0001	<b>&lt;0.0001</b>
<i>PIK3CA</i>	0.06	0.04	0.33
<i>BRCA2</i>	0.002	<0.0001	<b>0.002</b>
<i>PTEN</i>	0.008	<0.0001	<b>&lt;0.0001</b>
<i>CDKN2B</i>	NA	0.95	NA
<i>BRCA1</i>	<0.0001	0.002	0.72
<i>KDM6A</i>	0.06	0.02	0.34
<i>NRAS</i>	<0.0001	0.35	<b>&lt;0.0001</b>
<i>NF1</i>	<0.0001	<0.0001	0.8
<i>ERBB3</i>	0.65	<0.0001	0.8
<i>NOTCH1</i>	<0.0001	<0.0001	<b>&lt;0.0001</b>
<i>MTOR</i>	NA	0.001	NA
<i>FOXA1</i>	<0.0001	<0.0001	<b>&lt;0.0001</b>
<i>PIK3R1</i>	0.68	<0.0001	0.06
<i>ARID2</i>	0.02	0.004	0.77
<i>ASXL1</i>	<0.0001	<0.0001	0.05
<i>EGFR</i>	<0.0001	<0.0001	<b>&lt;0.0001</b>
<i>MLH1</i>	0.001	<0.0001	<b>&lt;0.0001</b>
<i>BRAF</i>	0.0001	<0.0001	<b>&lt;0.0001</b>
<i>FGFR2</i>	0.29	<0.0001	<b>&lt;0.0001</b>
<i>FGFR4</i>	NA	<0.0001	NA

Bold = significant *p*-value at the threshold of 0.05, NA: not available.

Among the 53 genes initially retained, 21 were associated with significant differences in prevalence between subgroups (Table S4). When we compared brain metastases with extracerebral metastases, the mutation prevalence was significantly higher for 10 genes. We considered that the mutation prevalence was reliable if a minimum sample number of 100 brain metastases was analyzed. We finally retained six genes: *TP53*, *BRCA2*, *PTEN*, *NRAS*, *NOTCH1* and *EGFR* (Table 1, Figure 2B and Figure S1 for *BRCA2*, *PTEN*, *NOTCH1* and *EGFR*).

We then analyzed matched tumor samples between primary tumor, extracerebral metastases and brain metastases. Most differences observed did not reach statistical significance due to small sample numbers (Table S5). When we considered the most frequently mutated genes, such as *TP53*, *PIK3CA* or *BRCA2*, the gene mutation prevalence was comparable with data obtained from all pooled tumor samples (Tables S4 and S5).

### 3.3. Heterogeneity of Gene Mutation Prevalence between Studies Was Less Marked for Brain Metastasis Samples

Among the 53 genes, there was significant heterogeneity across studies except for 26 genes in the brain metastasis samples (Table S4). To address this limitation, we performed several subgroup analyses. We first assessed the prevalence of gene mutations in all samples according to the genomic analysis method (NGS, targeted NGS and others) and tumor preservation conditions (frozen vs. formalin-fixed). NGS was the main method used, for 61.4% of the studies and 91% of all tumor samples, with persistent significant

heterogeneity across studies. For mutation prevalence, a significant difference across genomic analysis methods was only observed for nine genes, of which seven had a higher mutation prevalence with targeted NGS than with whole exome/genome NGS (Table S6).

For the conditions of tumor preservation, freezing is usually considered to be the standard condition for whole genome analyses [18]. It accounted for 28% of studies and only 7.1% of tumor samples, with less heterogeneity across studies. In addition, mutation prevalence was significantly higher for 16 genes when the frozen condition was compared to the formalin-fixed condition (Table S7).

### 3.4. Copy-Number Alterations and Loss of Heterozygosity in Breast Cancer Brain Metastases

For gene amplification, data were obtained for 11,950 patients and 9286 samples. When we analyzed and compared the prevalence between primary tumor, extracerebral metastases and brain metastases, most differences observed did not reach statistical significance due to small sample numbers, especially for extracerebral and brain metastases. Interestingly, for *PTEN*, the mutation prevalence decreased from 11% to 0% (Table S8).

For the loss of heterozygosity and other copy-number alterations, only seven studies with 628 patients and 614 samples provided data. Due to the small number of samples analyzed for each gene and each tumor site, we were not able to perform reliable statistical comparisons (Table S9). Interestingly, in the three loci 9p21.3, 10q23.31 and 17q11.2, the prevalence of LOH increased between the extracerebral metastases and brain metastases. For example, for the 10q23.31 locus, comprising *PTEN*, the prevalence in brain metastases was 75%, but in only 10 brain samples (Figure 2C).

*ESR1*, *ERBB2*, *EGFR*, *PTEN*, *BRCA2*, and *NOTCH1* mutations could be linked to metastatic processes in the brain.

For the six genes with a minimum sample number of 100 brain metastases analyzed and a mutation prevalence that was higher in brain metastasis samples than in extracerebral metastases, we ran univariate and multivariate meta-regressions to determine whether gene mutation prevalence was associated with sample subgroups. Focusing on brain metastasis localizations, we showed that they significantly influenced mutation prevalence for four genes: *EGFR*, *PTEN*, *BRCA2* and *NOTCH1* (Table 2). We also decided to retain *ESR1* and *ERBB2*, since their mutation prevalence increased gradually from primary tumor to extracerebral metastases and brain metastases (Table S4, Figures 2B and 3), an observation that may have therapeutic implications. For these six genes, we produced a cartography of the mutations reported in our meta-analysis (Figure 3).

For *ESR1*, all reported mutations were common to extracerebral and brain metastases, located in the ligand binding domain, which includes the transcriptional activating function-2 (AF2). These mutations are activating mutations; they can promote cell growth in the absence of estradiol [19–21], and they could be linked to an increased risk of brain metastases, for instance the pD538G mutation [22].

**Table 2.** Univariate and multivariate meta-regression.

Gene	Samples	Univariate Meta-Regression			Multivariate Meta-Regression		
		Estimate	Standard Error	<i>p</i>	Estimate	Standard Error	<i>p</i>
<i>TP53</i>	<b>Tumor site:</b> Primary tumors	1 (ref)	-				
	Extracerebral metastases	-0.42	0.27	0.11			
	Brain metastases	0.44	0.27	0.1			
	<b>Quality of studies</b> (good)	-0.29	0.24	0.22			
	<b>Method analysis:</b> NGS	1 (ref)	-				
	Targeted NGS	0.24	0.25	0.33			
	Other	-0.5	0.47	0.28			
<b>Preservation</b> (Frozen)	-0.25	0.29	0.39				

Table 2. Cont.

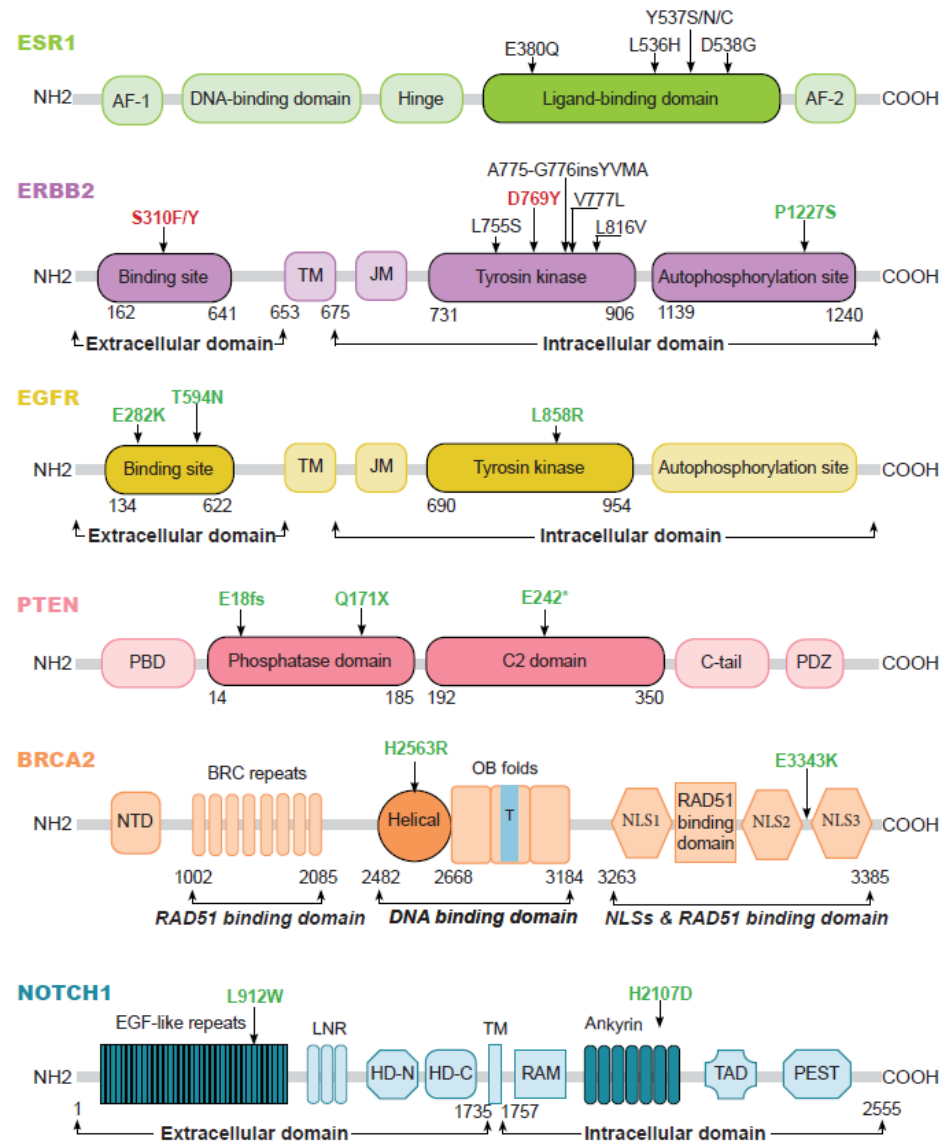
Gene	Samples	Univariate Meta-Regression			Multivariate Meta-Regression		
		Estimate	Standard Error	<i>p</i>	Estimate	Standard Error	<i>p</i>
BRCA2	Tumor site: Primary tumors	1 (ref)	-	-	1 (ref)	-	-
	Extracerebral metastases	-0.24	0.35	0.49	-0.12	0.41	0.77
	Brain metastases	0.94	0.35	<b>0.008</b>	0.92	0.37	<b>0.01</b>
	Quality of studies (good)	-0.79	0.44	0.07			
	Method analysis: NGS	1 (ref)	-	-			
	Targeted NGS	-0.29	0.4	0.48			
	Other	-	-	-			
	Preservation (Frozen)	-0.87	0.66	0.19	-0.59	0.58	0.31
PTEN	Tumor site: Primary tumors	1 (ref)	-	-	1 (ref)	-	-
	Extracerebral metastases	0.46	0.32	0.15	0.47	0.29	0.1
	Brain metastases	0.84	0.35	<b>0.01</b>	0.32	0.35	0.36
	Quality of studies (good)	-1.26	0.32	<b>&lt;0.0001</b>	-1.21	0.37	<b>0.01</b>
	Method analysis: NGS	1 (ref)	-	-			
	Targeted NGS	-0.41	0.38	0.27			
	Other	-0.58	0.78	0.45			
	Preservation (Frozen)	0.88	0.37	<b>0.01</b>	0.23	0.36	0.52
NRAS	Tumor site: Primary tumors	1 (ref)	-	-	1 (ref)	-	-
	Extracerebral metastases	-3.81	1.12	<b>0.0007</b>	-3.05	0.88	<b>0.0005</b>
	Brain metastases	0.88	0.89	0.32	0.65	0.71	0.35
	Quality of studies (good)	-3.42	1.11	<b>0.002</b>	-1.95	0.64	<b>0.002</b>
	Method analysis: NGS	1 (ref)	-	-			
	Targeted NGS	-	-	-			
	Other	-1.62	2.38	0.49			
	Preservation (Frozen)	-	-	-			
NOTCH1	Tumor site: Primary tumors	1 (ref)	-	-	1 (ref)	-	-
	Extracerebral metastases	-3.55	1.18	<b>0.002</b>	-2.97	1.1	<b>0.006</b>
	Brain metastases	1.46	0.87	0.09	1.5	0.76	<b>0.04</b>
	Quality of studies (good)	-1.52	1.09	0.16	-0.39	0.81	0.62
	Method analysis: NGS	1 (ref)	-	-	1 (ref)	-	-
	Targeted NGS	1.8	0.99	0.07	1.04	0.75	0.16
	Other	-	-	-	-	-	-
	Preservation (Frozen)	1.12	1.21	0.35			
EGFR	Tumor site: Primary tumors	1 (ref)	-	-	1 (ref)	-	-
	Extracerebral metastases	-1.89	0.78	<b>0.01</b>	-1.42	0.39	<b>0.0003</b>
	Brain metastases	1.38	0.61	<b>0.02</b>	1.46	0.44	<b>0.001</b>
	Quality of studies (good)	-1.83	0.77	<b>0.01</b>	-1.49	0.46	<b>0.001</b>
	Method analysis: NGS	1 (ref)	-	-			
	Targeted NGS	0.33	0.79	0.67			
	Other	-	-	-			
	Preservation (Frozen)	-0.99	1.67	0.55			

Uni- and multivariate meta-regressions were run to assess sample groups significantly associated with prevalence of gene mutations. Sample groups yielding *p*-values under 0.20 in the univariate analysis were considered for inclusion in the multivariate analysis. Bold = significant *p*-value at the threshold of 0.05.

For *ERBB2*, most mutations were common to extracerebral and brain metastases. Most of them are activating mutations, located in the tyrosine kinase domain. pP1227S was the only mutation restricted to a brain metastasis sample. It is located in the autophosphorylation domain, and could be responsible for constitutive receptor activation as described for pY1068F and pY992F *EGFR* mutations [23,24].

For *EGFR*, a pL858R mutation was found in one brain metastatic sample. This hotspot mutation, well-described in non-small-cell lung adenocarcinoma, is predictive of the response to *EGFR* tyrosine kinase inhibitors [25,26]. pE282K and pT594N mutations are

located in the extracellular ligand-binding domain. *EGFR* ectodomain mutants are oncogenic in preclinical models of glioblastoma [27].



**Figure 3.** Cartography of the mutations reported in the meta-analysis for the 6 genes with an increased mutation prevalence in brain metastases. Mutations exclusive to brain metastases are identified in green. Those exclusive to extracerebral metastases are in red, and the mutations common to both sites are in black. AF-1: activation function-1, AF-2: activation function-2, TM: transmembrane, JM: juxtamembrane, PBD: PIP2-binding domain; NTD: N-terminal domain, OB folds: oligonucleotide binding folds, T: tower domain, NLS: nuclear localization sequence, EGF-like repeats: epidermal growth factor-like repeats, LNR: Lin12/Notch repeat, HD-N: heterodimerization domain- N terminal, HD-C: heterodimerization domain- C terminal, RAM: Rbp-associated molecule, TAD: transactivation domain, PEST: a region rich in proline (P), glutamate (E), serine (S) and threonine (T), \*: means there is a codon stop.

For *PTEN*, three mutations were identified in brain metastasis samples: pE18fs, pQ171X and pE242\*. Both pE18fs and pQ171X are located in the phosphatase domain, which is important for the membrane-binding of *PTEN* and facilitates phospholipid hydrolysis [28,29]. Mutations occurring in the phosphatase domain, such as pY65S, pQ171R, pC124S, and pG129E, have been associated with the loss of *PTEN* function [30,31]. The pE242\* mutation is located in the C2 domain, which interacts with the phosphatase do-

main, regulating PTEN phosphatase activity. It can also bind to phospholipid membranes, enabling PTEN to inhibit cell migration [29,32].

For *BRCA2*, two mutations were identified in brain metastasis samples: pH2563R and pE3343K. The pE3343K mutation is located between the NLS2 and NLS3 regions, and its functional value is as yet undeciphered [33]. The pH2563R mutation is located in the helical domain within the DNA binding domain, which is in turn implicated in *BRCA2* binding to both single-strand and double-strand DNA. This mutation could be responsible for abnormal DNA repair, as described for the G2609D mutation [34].

The two mutations of *NOTCH1* identified in brain metastatic samples were pL912W and pH2107D. pL912W is located in the EGF-like domain, involved in ligand binding, and it could be oncogenic [35]. pH2107D is located in the ankyrin domain, which is responsible for mediating protein–protein interactions [36].

Overall, some gene mutations could be linked to the breast cancer brain metastatic process, with strong therapeutic implications.

#### 4. Discussion

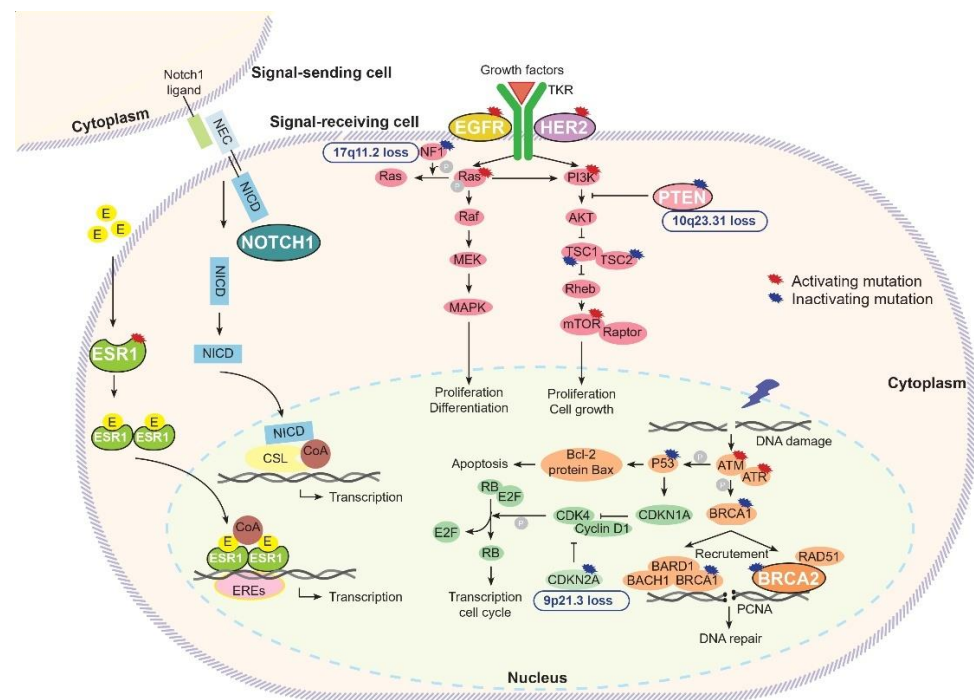
Here, we report the first meta-analysis of genomic data concerning 37,218 patients with metastatic breast cancers, including 1485 brain metastasis samples. We have recently shown that this methodological approach provides more reliable gene mutation prevalence values than data obtained from individual sources [12]. In addition, the stringent methodology we have used is a strength of our study, with two complementary search algorithms, careful selection of the studies, quality control of the studies, and an approach to explaining heterogeneity across subgroups. In a recent review on genomic data for 164 breast cancer brain metastases, the gene mutation prevalence for the two most frequently mutated genes, *TP53* and *PIK3CA*, was similar to those in our meta-analysis [37]. In contrast, there were many discrepancies for the other genes. In that review, the mutation prevalence was 4% for *PTEN* and *BRCA2*, compared to 15% and 22%, respectively, in our meta-analysis, in which a much larger number of brain metastasis samples were analyzed.

Our meta-analysis highlights the need to sequence brain metastases, and thus to obtain tissue samples, which could be facilitated by the use of imagery-guided biopsies [13]. Our meta-analysis has also shown the added value of using targeted NGS to provide reliable data on gene mutation prevalence. Compared with whole exome/genome sequencing, targeted NGS is faster and less costly, with a greater sensitivity to detect mutations with low allelic frequency [38]. This type of approach could be proposed to sequence a panel of genes with therapeutic implications on brain metastasis samples.

One value of our meta-analysis is that we compared genomic data obtained from brain metastases, extracerebral metastases and primary tumors. Metastatic cells can derive from minority clones within a primary tumor [14], but also from minority clones within extracerebral metastases, with mutations linked to site-specific metastatic spread [39–41]. Indeed, a brain metastasis is the result of biological properties favoring the crossing of the blood–brain barrier by cancer cells, and their implantation in the brain. Biological factors associated with increased risk of brain metastases are not fully understood. There are transcriptomic signatures of primary tumors or extracerebral metastases that are associated with an increased risk of brain metastases [42–45]. However, there are no data demonstrating that some gene mutations could be responsible for the crossing of the blood–brain barrier by cancer cells.

In our meta-analysis, we identified six genes with high mutation prevalence in brain metastases, of particular interest for their potential role in brain metastatic process and resistance to first-line anti-cancer drugs: *ESR1*, *ERBB2*, *EGFR*, *PTEN*, *BRCA2* and *NOTCH1* (Figure 4).





**Figure 4.** Gene alterations and signaling pathways involved in breast cancer carcinogenesis and brain metastatic processes: estrogen, CoA: coactivators, EREs: estrogen receptor elements, NEC: Notch1 extracellular cell, NICD: Notch1 intracellular cell domain, CSL (CSL proteins): CBF-1/RBPJ- $\kappa$  in Homo sapiens/Mus musculus, respectively, Suppressor of Hairless in Drosophila melanogaster, Lag-1 in Caenorhabditis elegans, PCNA: proliferating cell nuclear antigen.

*ESR1* encodes for the estrogen receptor 1 protein. After estrogen binding, *ESR1* translocates to the nucleus and binds to estrogen receptor elements in enhancer regions of the genome, mediating gene transcription during normal physiological processes, but also in the course of breast cancer tumorigenesis [46]. Activating mutations in the ligand-binding domain of *ESR1* have been observed in 10% to 40% of metastatic ER+ breast cancers, conferring endocrine resistance [46,47].

*ERBB2* is a proto-oncogene encoding a member of the epidermal growth factor receptor family. *ERBB2* amplification is common in different cancer types [48,49]. It is a well-established risk factor for brain metastases in breast cancer. However, the biological mechanisms for this association are not fully deciphered. In vitro, *HER2* overexpressed cancer cells are more likely to interact with integrin  $\beta 4$ , promoting their adhesion to endothelial cells of the blood–brain barrier [50]. Additionally, in a murine model of brain metastases, *HER2* overexpression increases the outgrowth of metastatic tumor cells in the brain [51]. *ERBB2* mutations are less common, with prevalence ranging from 0.2% to 12.6% [52,53]. In breast cancer, *ERBB2* mutations have been described in all histological subtypes, usually in the absence of *ERBB2* amplification [54,55]. In preclinical studies, *ERBB2* mutations located in the extracellular and the C-terminal domains are usually predictive of sensitivity to trastuzumab, whereas most mutations in the tyrosine kinase domain are resistant mutations. For example, pL755P/S mutations, common in breast cancer, are associated with resistance to lapatinib, an anti-*HER2* TKI. In contrast, the A775\_776insYVMA mutation, frequently identified in lung cancer brain metastases, is associated with response to afatinib and neratinib [52,56].

*EGFR* is a frequently altered oncogene. *EGFR* activation, through either amplification or mutation, in turn activates numerous downstream signal transduction pathways including the Ras-Raf-MAPK and PI3K/Akt pathways [57]. In preclinical models, the association between *EGFR* pathway activation and breast cancer brain metastases, including through *EGFR* ligand heparin binding EGF (HBEGF) overexpression, was also reported [7,58]. *EGFR*

mutations, usually ligand-independent activating mutations, are well-known oncogenic events in non-small-cell lung cancers [40,59]. In addition, in 384 patients with non-small-cell lung cancer, the incidence of brain metastases was 49.5% among patients with L858R *EGFR*-mutated cancer versus 27.3% among those with wild-type cancer [60].

*PTEN* is a tumor suppressor gene. The *PTEN* protein is mainly involved in the blockade of PI3K/Akt signaling originating from *EGFR* activation. Inactivating *PTEN* mutations have been identified in many cancer types, particularly endometrial carcinomas and glioblastomas [61,62]. In 56 brain metastases from different cancer types, the prevalence of *PTEN* loss was very high in cases of lung and breast cancers, sometimes combining LOH and an inactivating mutation, suggesting that *PTEN* loss of function could contribute to brain metastatic processes [63]. The loss of *PTEN* was also found to predict trastuzumab resistance among breast cancer patients [64].

*BRCA2* is a tumor suppressor gene. The *BRCA2* protein plays an important role in DNA repair and transcription regulation. *BRCA2* germline mutations are associated with an increased risk of breast, ovarian, and pancreas cancers [65,66]. In breast cancer, *BRCA2* germline mutations have been found to be significantly associated with brain metastasis, regardless of tumor subtype [67].

*NOTCH1* encodes a trans-membrane receptor that belongs to a well-conserved signaling pathway. When *NOTCH1* is activated, it splits to form an extracellular domain and an intracellular domain, itself translocated to the nucleus to regulate the transcription of target genes. Activating *NOTCH1* mutations have been identified in different cancer types [68]. In preclinical models of breast cancer, *NOTCH1* signaling pathway activation has been associated with an increased risk of brain metastases [69,70].

These genes also have considerable potential therapeutic implications.

For *ESR1* mutations, estrogen receptor antagonists such as fulvestrant appear broadly effective in vitro, in particular the D538G mutant [20]. In mice, the combination of fulvestrant and palbociclib or everolimus inhibits tumor growth in breast cancers harboring D538G or Y537S *ESR1* mutations [71]. In patients with endocrine-resistant breast cancer, the same combinations were efficacious [72]. Other *ESR1* targets, such as lasofoxifene and H3B-5942, have proved superior to fulvestrant in inhibiting metastatic processes in breast cancer xenografts harboring Y537S and D538G *ESR1* mutants [73,74]. Their benefits for the treatment of women with ER-positive breast cancer with acquired *ESR1* mutations are currently being assessed in clinical trials [75,76].

In *ERBB2*-mutated cancers, the benefit of anti-HER2 TKIs has been evaluated. In a phase II trial involving 125 patients with *ERBB2* mutations across 21 cancer types, treatment with neratinib, a pan HER2-TKI, provided a 24% response rate among breast cancer patients with *ERBB2* S310, L755, V777, G778\_P780dup and Y772\_A775dup mutations [77]. Among 16 patients with *ERBB2*-mutated cervical cancers, the response to neratinib was linked to the pS310F mutation [78].

Typically, *EGFR* mutations are associated with high response rates to anti-*EGFR* TKIs in metastatic non-small-cell lung cancer. This is also true for brain localizations, with response rates ranging from 36.5% to 91% [79,80]. In particular, osimertinib, a third-generation anti-*EGFR*, has better brain penetration, with response rates of over 70% [80]. In a preclinical study, osimertinib also showed marked efficacy in *EGFR*-mutated glioblastoma [81]. For a metastatic breast cancer patient with *EGFR* L861Q mutation in a resort situation, treatment with anti-*EGFR* provided 6 months of disease control [82].

The PI3K/AKT/mTOR pathway is frequently activated in breast cancer brain metastases due to *PTEN* loss of function and frequent *PIK3CA*, *AKT* and *mTOR* activating mutation, as evidenced in our meta-analysis. In a murine model of brain xenografts derived from HER2-overexpressed breast cancer with *PTEN* loss, a combination of PI3K and mTOR inhibitors considerably inhibited tumor growth [83]. Since a loss of *PTEN* decreases homologous recombination and sensitizes tumor cells to polyadenosine diphosphate ribose polymerase (PARP) inhibitors, a combination of PARP-inhibitor with PIK3-inhibitor could be promising for cancers with *PTEN* loss of function mutations [84].

PARP inhibitors are currently approved for the treatment of several metastatic cancers with *BRCA* mutations [85–87]. Since brain metastases occur in approximately half the patients with advanced breast cancer with *BRCA* mutations [67], and *BRCA2* mutation prevalence reached 22% in our meta-analysis, PARP inhibitors could be promising tools for the treatment of brain metastases. Indeed, for a woman with brain metastases of endometrial cancer origin and with a circulating *BRCA1* mutation, treatment with a PARP inhibitor provided an excellent response in brain localizations [88]. In preclinical models of triple-negative breast cancer brain metastases, carboplatin in combination with veliparib, a PARP inhibitor, decreased tumor volume in the *BRCA*-mutant [89]. An clinical trial is testing the combination of cisplatin and veliparib for breast cancer brain metastases harboring *BRCA* mutations [90].

Finally, the NOTCH pathway is frequently activated in metastatic cancers, leading to the development of NOTCH-targeted therapies [91,92]. In preclinical models of breast cancer,  $\gamma$ -secretase inhibitors showed promising activity in brain metastases [69,70].

To date, several commercialized drugs, such as osimertinib or neratinib, are not currently approved for the treatment of metastatic breast cancer. Their use shall be discussed during dedicated multidisciplinary meetings. Additional clinical trials are required, ideally basket trials dedicated to brain metastases of different cancer types.

Our meta-analysis has some limitations. First, it was performed on aggregated data and not individual data. For this reason, some subgroup analyses could not be assessed because of missing data (data on ethnicity, histological subtypes). Second, there was significant heterogeneity across studies for mutation prevalence, usually persisting despite various subgroup analyses to address this limitation. Particularly, since heterogeneity in genomic studies could be linked to tumor heterogeneity itself, we intended to assess gene mutation prevalence, comparing multiple sampling with single sampling. However, data were only available for 7% of the studies, accounting for 0.5% of the total number of samples analyzed. On the other hand, this heterogeneity disappeared for most genes when we considered solely brain metastasis samples. According to the seed and soil hypothesis, brain metastases can derive from a minority clone within a primary tumor or from another metastatic localization [14,93] with possible specific signatures linked to organ-specific metastatic sites [94]. This highlights the need for biopsy and brain metastasis analyses.

## 5. Conclusions

This is the first meta-analysis of genomic alterations in breast cancer brain metastases. Our results underline the added value of obtaining biopsies from brain metastases to fully explore their biology, for the development of personalized treatments.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers15061728/s1>, Figure S1: Forest plots of mutation prevalence for 6 genes: *ESR1*, *ERBB2*, *EGFR*, *PTEN*, *BRCA2* and *NOTCH1*; Table S1: Main characteristics of the 57 studies included in the meta-analysis; Table S2: Details on individual scores for the included studies based on Q-genie tool; Table S3: Comparison of prevalence among gene mutation according to the quality of studies (Q genie tool); Table S4: Comparison of prevalence among gene mutation in primary tumor, extracerebral metastases and brain metastases in breast cancers; Table S5: Paired data comparison of prevalence among gene mutation in primary tumor, extracerebral metastases and brain metastases; Table S6: Comparison of prevalence among gene mutation according to the genomic analysis method (whole sample); Table S7: Comparison of prevalence among gene mutation according to the conservation method (whole sample); Table S8: Comparison of prevalence among gene amplification in primary tumor, extracerebral metastases and brain metastases in breast cancers; Table S9: Prevalence of gain-loss of heterozygosity in primary tumor, extracerebral metastases and brain metastases in breast cancers (ID studies).

**Author Contributions:** Conceptualization, T.T.N. and G.B.; methodology, T.T.N. and G.B.; software, F.P.; validation, T.T.N., D.H. and G.B.; formal analysis, F.P.; investigation, T.T.N.; resources, T.T.N. and E.A.; data curation, T.T.N. and G.B.; writing—original draft preparation, T.T.N. and G.B.; writing—review and editing, T.T.N. and G.B.; visualization, J.-P.F. and G.B.; supervision, G.B.; project

administration, Q.V.L. and G.B.; funding acquisition, G.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This meta-analysis was funded by the University Sorbonne Paris Nord International Scholarship, Erasmus+ kit mobility, number KA107. The funder of the study had no role in the study design, data collection, data analysis, data interpretation, or writing of the report.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Data collected for this study are readily available, as all included articles in this meta-analysis are publicly accessible through the PubMed Library.

**Acknowledgments:** We thank Angela Swaine for the revision of the English language.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Barnholtz-Sloan, J.S.; Sloan, A.E.; Davis, F.G.; Vignea, F.D.; Lai, P.; Sawaya, R.E. Incidence Proportions of Brain Metastases in Patients Diagnosed (1973 to 2001) in the Metropolitan Detroit Cancer Surveillance System. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2004**, *22*, 2865–2872. [[CrossRef](#)]
- Kuksis, M.; Gao, Y.; Tran, W.; Hoey, C.; Kiss, A.; Komorowski, A.S.; Dhaliwal, A.J.; Sahgal, A.; Das, S.; Chan, K.K.; et al. The Incidence of Brain Metastases among Patients with Metastatic Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neuro-Oncol.* **2021**, *23*, 894–904. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cagney, D.N.; Martin, A.M.; Catalano, P.J.; Redig, A.J.; Lin, N.U.; Lee, E.Q.; Wen, P.Y.; Dunn, I.F.; Bi, W.L.; Weiss, S.E.; et al. Incidence and Prognosis of Patients with Brain Metastases at Diagnosis of Systemic Malignancy: A Population-Based Study. *Neuro-Oncol.* **2017**, *19*, 1511–1521. [[CrossRef](#)]
- Aversa, C.; Rossi, V.; Geuna, E.; Martinello, R.; Milani, A.; Redana, S.; Valabrega, G.; Aglietta, M.; Montemurro, F. Metastatic Breast Cancer Subtypes and Central Nervous System Metastases. *Breast Edinb. Scotl.* **2014**, *23*, 623–628. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Sperduto, P.W.; Mesko, S.; Li, J.; Cagney, D.; Aizer, A.; Lin, N.U.; Nesbit, E.; Kruser, T.J.; Chan, J.; Braunstein, S.; et al. Survival in Patients With Brain Metastases: Summary Report on the Updated Diagnosis-Specific Graded Prognostic Assessment and Definition of the Eligibility Quotient. *J. Clin. Oncol.* **2020**, *38*, 3773–3784. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Morris, V.L.; Koop, S.; MacDonald, I.C.; Schmidt, E.E.; Grattan, M.; Percy, D.; Chambers, A.F.; Groom, A.C. Mammary Carcinoma Cell Lines of High and Low Metastatic Potential Differ Not in Extravasation but in Subsequent Migration and Growth. *Clin. Exp. Metastasis* **1994**, *12*, 357–367. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bos, P.D.; Zhang, X.H.-F.; Nadal, C.; Shu, W.; Gomis, R.R.; Nguyen, D.X.; Minn, A.J.; van de Vijver, M.J.; Gerald, W.L.; Foekens, J.A.; et al. Genes That Mediate Breast Cancer Metastasis to the Brain. *Nature* **2009**, *459*, 1005–1009. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ramakrishna, N.; Temin, S.; Chandralapaty, S.; Crews, J.R.; Davidson, N.E.; Esteva, F.J.; Giordano, S.H.; Gonzalez-Angulo, A.M.; Kirshner, J.J.; Krop, I.; et al. Recommendations on Disease Management for Patients with Advanced Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer and Brain Metastases: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2014**, *32*, 2100–2108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Angeli, E.; Nguyen, T.T.; Janin, A.; Bousquet, G. How to Make Anticancer Drugs Cross the Blood–Brain Barrier to Treat Brain Metastases. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *21*, 22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ramalingam, S.S.; Vansteenkiste, J.; Planchard, D.; Cho, B.C.; Gray, J.E.; Ohe, Y.; Zhou, C.; Reungwetwattana, T.; Cheng, Y.; Chewaskulyong, B.; et al. Overall Survival with Osimertinib in Untreated, EGFR-Mutated Advanced NSCLC. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 41–50. [[CrossRef](#)]
- Lin, N.U.; Borges, V.; Anders, C.; Murthy, R.K.; Paplomata, E.; Hamilton, E.; Hurvitz, S.; Loi, S.; Okines, A.; Abramson, V.; et al. Intracranial Efficacy and Survival With Tucatinib Plus Trastuzumab and Capecitabine for Previously Treated HER2-Positive Breast Cancer With Brain Metastases in the HER2CLIMB Trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2020**, *38*, 2610–2619. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bui, T.O.; Dao, V.T.; Nguyen, V.T.; Feugeas, J.-P.; Pamoukdjian, F.; Bousquet, G. Genomics of Clear-Cell Renal Cell Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Eur. Urol.* **2022**, *81*, 349–361. [[CrossRef](#)]
- Yu, K.K.H.; Patel, A.R.; Moss, N.S. The Role of Stereotactic Biopsy in Brain Metastases. *Neurosurg. Clin. N. Am.* **2020**, *31*, 515–526. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bousquet, G.; Bouchtaoui, M.E.; Leboeuf, C.; Battistella, M.; Varna, M.; Ferreira, I.; Plassa, L.-F.; Hamdan, D.; Bertheau, P.; Feugeas, J.-P.; et al. Tracking Sub-Clonal TP53 Mutated Tumor Cells in Human Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Oncotarget* **2015**, *6*, 19279–19289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Stewart, L.A.; Clarke, M.; Rovers, M.; Riley, R.D.; Simmonds, M.; Stewart, G.; Tierney, J.F.; for the PRISMA-IPD Development Group. Preferred Reporting Items for a Systematic Review and Meta-Analysis of Individual Participant Data: The PRISMA-IPD Statement. *JAMA* **2015**, *313*, 1657–1665. [[CrossRef](#)]

16. Sohani, Z.N.; Meyre, D.; de Souza, R.J.; Joseph, P.G.; Gandhi, M.; Dennis, B.B.; Norman, G.; Anand, S.S. Assessing the Quality of Published Genetic Association Studies in Meta-Analyses: The Quality of Genetic Studies (Q-Genie) Tool. *BMC Genet.* **2015**, *16*, 50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Huedo-Medina, T.B.; Sánchez-Meca, J.; Marín-Martínez, F.; Botella, J. Assessing Heterogeneity in Meta-Analysis: Q Statistic or I2 Index? *Psychol. Methods* **2006**, *11*, 193–206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Gaffney, E.F.; Riegman, P.H.; Grizzle, W.E.; Watson, P.H. Factors That Drive the Increasing Use of FFPE Tissue in Basic and Translational Cancer Research. *Biotech. Histochem. Off. Publ. Biol. Stain Comm.* **2018**, *93*, 373–386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Zinger, L.; Merenbakh-Lamin, K.; Klein, A.; Elazar, A.; Journo, S.; Boldes, T.; Pasmanik-Chor, M.; Spitzer, A.; Rubinek, T.; Wolf, I. Ligand-Binding Domain–Activating Mutations of ESR1 Rewire Cellular Metabolism of Breast Cancer Cells. *Clin. Cancer Res.* **2019**, *25*, 2900–2914. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Toy, W.; Weir, H.; Razavi, P.; Lawson, M.; Goepfert, A.U.; Mazzola, A.M.; Smith, A.; Wilson, J.; Morrow, C.; Wong, W.L.; et al. Activating ESR1 Mutations Differentially Affect the Efficacy of ER Antagonists. *Cancer Discov.* **2017**, *7*, 277–287. [[CrossRef](#)]
21. Jeselsohn, R.; Yelensky, R.; Buchwalter, G.; Frampton, G.; Meric-Bernstam, F.; Gonzalez-Angulo, A.M.; Ferrer-Lozano, J.; Perez-Fidalgo, J.A.; Cristofanilli, M.; Gómez, H.; et al. Emergence of Constitutively Active Estrogen Receptor- $\alpha$  Mutations in Pretreated Advanced Estrogen Receptor Positive Breast Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2014**, *20*, 1757–1767. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Wang, P.; Bahreini, A.; Gyanchandani, R.; Lucas, P.C.; Hartmaier, R.J.; Watters, R.J.; Jonnalagadda, A.R.; Trejo Bittar, H.E.; Berg, A.; Hamilton, R.L.; et al. FSensitive Detection of Mono- and Polyclonal ESR1 Mutations in Primary Tumors, Metastatic Lesions and Cell Free DNA of Breast Cancer Patients. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2016**, *22*, 1130–1137. [[CrossRef](#)]
23. Hartman, Z.; Zhao, H.; Agazie, Y.M. HER2 Stabilizes EGFR and Itself by Altering Autophosphorylation Patterns in a Manner That Overcomes Regulatory Mechanisms and Promotes Proliferative and Transformation Signaling. *Oncogene* **2013**, *32*, 4169–4180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Gotoh, N.; Tojo, A.; Muroya, K.; Hashimoto, Y.; Hattori, S.; Nakamura, S.; Takenawa, T.; Yazaki, Y.; Shibuya, M. Epidermal Growth Factor-Receptor Mutant Lacking the Autophosphorylation Sites Induces Phosphorylation of Shc Protein and Shc-Grb2/ASH Association and Retains Mitogenic Activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 167–171. [[CrossRef](#)]
25. Gazdar, A.F. Activating and Resistance Mutations of EGFR in Non-Small-Cell Lung Cancer: Role in Clinical Response to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors. *Oncogene* **2009**, *28* (Suppl. 1), S24–S31. [[CrossRef](#)]
26. Park, S.; Lee, S.Y.; Kim, D.; Sim, Y.S.; Ryu, J.-S.; Choi, J.; Lee, S.H.; Ryu, Y.J.; Lee, J.H.; Chang, J.H. Comparison of Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors for Patients with Lung Adenocarcinoma Harboring Different Epidermal Growth Factor Receptor Mutation Types. *BMC Cancer* **2021**, *21*, 52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Lee, J.C.; Vivanco, I.; Beroukhi, R.; Huang, J.H.Y.; Feng, W.L.; DeBiasi, R.M.; Yoshimoto, K.; King, J.C.; Nghiemphu, P.; Yuza, Y.; et al. Epidermal Growth Factor Receptor Activation in Glioblastoma through Novel Missense Mutations in the Extracellular Domain. *PLoS Med.* **2006**, *3*, e485. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Membrane-Binding and Activation Mechanism of PTEN | PNAS. Available online: <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.0932835100> (accessed on 23 April 2022).
29. Crystal Structure of the PTEN Tumor Suppressor: Cell. Available online: [https://www.cell.com/fulltext/S0092-8674\(00\)81663-3](https://www.cell.com/fulltext/S0092-8674(00)81663-3) (accessed on 23 April 2022).
30. Garrido, J.A.M.G.; Alcantara, K.M.M.; Danac, J.M.C.; Serrano, F.E.C.; Cutiongco-de la Paz, E.M.; Garcia, R.L. The Novel Phosphatase Domain Mutations Q171R and Y65S Switch PTEN from Tumor Suppressor to Oncogene. *Cells* **2021**, *10*, 3423. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Liaw, D.; Marsh, D.J.; Li, J.; Dahia, P.L.M.; Wang, S.I.; Zheng, Z.; Bose, S.; Call, K.M.; Tsou, H.C.; Peacocke, M.; et al. Germline Mutations of the PTEN Gene in Cowden Disease, an Inherited Breast and Thyroid Cancer Syndrome. *Nat. Genet.* **1997**, *16*, 64–67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Raftopoulou, M.; Etienne-Manneville, S.; Self, A.; Nicholls, S.; Hall, A. Regulation of Cell Migration by the C2 Domain of the Tumor Suppressor PTEN. *Science* **2004**, *303*, 1179–1181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Andreassen, P.R.; Seo, J.; Wiek, C.; Hanenberg, H. Understanding BRCA2 Function as a Tumor Suppressor Based on Domain-Specific Activities in DNA Damage Responses. *Genes* **2021**, *12*, 1034. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Guidugli, L.; Pankratz, V.S.; Singh, N.; Thompson, J.; Erding, C.A.; Engel, C.; Schmutzler, R.; Domchek, S.; Nathanson, K.; Radice, P.; et al. A Classification Model for BRCA2 DNA Binding Domain Missense Variants Based on Homology Directed Repair Activity. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 265–275. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Hahn, C.N.; Babic, M.; Schreiber, A.W.; Kutyna, M.M.; Wee, L.A.; Brown, A.L.; Perugini, M.; Singhal, D.; Hiwase, S.; Feng, J.; et al. Rare and Common Germline Variants Contribute to Occurrence of Myelodysplastic Syndrome. *Blood* **2015**, *126*, 1644. [[CrossRef](#)]
36. Mosavi, L.K.; Cammett, T.J.; Desrosiers, D.C.; Peng, Z.-Y. The Ankyrin Repeat as Molecular Architecture for Protein Recognition. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **2004**, *13*, 1435–1448. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Morgan, A.J.; Giannoudis, A.; Palmieri, C. The Genomic Landscape of Breast Cancer Brain Metastases: A Systematic Review. *Lancet Oncol.* **2021**, *22*, e7–e17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Mamanova, L.; Coffey, A.J.; Scott, C.E.; Kozarewa, I.; Turner, E.H.; Kumar, A.; Howard, E.; Shendure, J.; Turner, D.J. Target-Enrichment Strategies for next-Generation Sequencing. *Nat. Methods* **2010**, *7*, 111–118. [[CrossRef](#)]

39. Urosevic, J.; Garcia-Albéniz, X.; Planet, E.; Real, S.; Céspedes, M.V.; Guiu, M.; Fernandez, E.; Bellmunt, A.; Gawrzak, S.; Pavlovic, M.; et al. Colon Cancer Cells Colonize the Lung from Established Liver Metastases through P38 MAPK Signalling and PTHLH. *Nat. Cell Biol.* **2014**, *16*, 685–694. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Tsai, M.-F.; Chang, T.-H.; Wu, S.-G.; Yang, H.-Y.; Hsu, Y.-C.; Yang, P.-C.; Shih, J.-Y. EGFR-L858R Mutant Enhances Lung Adenocarcinoma Cell Invasive Ability and Promotes Malignant Pleural Effusion Formation through Activation of the CXCL12-CXCR4 Pathway. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 13574. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Sarvaiya, P.J.; Guo, D.; Ulasov, I.; Gabikian, P.; Lesniak, M.S. Chemokines in Tumor Progression and Metastasis. *Oncotarget* **2013**, *4*, 2171–2185. [[CrossRef](#)]
42. Duchnowska, R.; Jassem, J.; Goswami, C.P.; Dundar, M.; Gökmen-Polar, Y.; Li, L.; Woditschka, S.; Biernat, W.; Sosińska-Mielcarek, K.; Czartoryska-Arlukowicz, B.; et al. Predicting Early Brain Metastases Based on Clinicopathological Factors and Gene Expression Analysis in Advanced HER2-Positive Breast Cancer Patients. *J. Neurooncol.* **2015**, *122*, 205–216. [[CrossRef](#)]
43. Xiao, W.; Zheng, S.; Xie, X.; Li, X.; Zhang, L.; Yang, A.; Wang, J.; Tang, H.; Xie, X. SOX2 Promotes Brain Metastasis of Breast Cancer by Upregulating the Expression of FSCN1 and HBEGF. *Mol. Ther. Oncolytics* **2020**, *17*, 118–129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Furet, E.; Bouchtaoui, M.E.; Feugeas, J.-P.; Miquel, C.; Leboeuf, C.; Beytout, C.; Bertheau, P.; Le Rhun, E.; Bonnetterre, J.; Janin, A.; et al. Increased Risk of Brain Metastases in Women with Breast Cancer and P16 Expression in Metastatic Lymph-Nodes. *Oncotarget* **2017**, *8*, 37332–37341. [[CrossRef](#)]
45. Nguyen, T.T.; Gapihan, G.; Tetu, P.; Pamoukdjian, F.; El Bouchtaoui, M.; Lebœuf, C.; Feugeas, J.; Paris, J.; Baroudjian, B.; Delyon, J.; et al. Increased Risk of Brain Metastases among Patients with Melanoma and PROM2 Expression in Metastatic Lymph Nodes. *Clin. Transl. Med.* **2020**, *10*, e198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Heldring, N.; Pike, A.; Andersson, S.; Matthews, J.; Cheng, G.; Hartman, J.; Tujague, M.; Ström, A.; Treuter, E.; Warner, M.; et al. Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets. *Physiol. Rev.* **2007**, *87*, 905–931. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Toy, W.; Shen, Y.; Won, H.; Green, B.; Sakr, R.A.; Will, M.; Li, Z.; Gala, K.; Fanning, S.; King, T.A.; et al. ESR1 Ligand-Binding Domain Mutations in Hormone-Resistant Breast Cancer. *Nat. Genet.* **2013**, *45*, 1439–1445. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Burstein, H.J. The Distinctive Nature of HER2-Positive Breast Cancers. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *353*, 1652–1654. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Iqbal, N.; Iqbal, N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. *Mol. Biol. Int.* **2014**, *2014*, 852748. [[CrossRef](#)]
50. Fan, J.; Cai, B.; Zeng, M.; Hao, Y.; Giancotti, F.G.; Fu, B.M. Integrin B4 Signaling Promotes Mammary Tumor Cell Adhesion to Brain Microvascular Endothelium by Inducing ErbB2-Mediated Secretion of VEGF. *Ann. Biomed. Eng.* **2011**, *39*, 2223–2241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Palmieri, D.; Bronder, J.L.; Herring, J.M.; Yoneda, T.; Weil, R.J.; Stark, A.M.; Kurek, R.; Vega-Valle, E.; Feigenbaum, L.; Halverson, D.; et al. Her-2 Overexpression Increases the Metastatic Outgrowth of Breast Cancer Cells in the Brain. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 4190–4198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Nagano, M.; Kohsaka, S.; Ueno, T.; Kojima, S.; Saka, K.; Iwase, H.; Kawazu, M.; Mano, H. High-Throughput Functional Evaluation of Variants of Unknown Significance in ERBB2. *Clin. Cancer Res.* **2018**, *24*, 5112–5122. [[CrossRef](#)]
53. Subramanian, J.; Katta, A.; Masood, A.; Vudem, D.R.; Kancha, R.K. Emergence of ERBB2 Mutation as a Biomarker and an Actionable Target in Solid Cancers. *Oncologist* **2019**, *24*, e1303–e1314. [[CrossRef](#)]
54. Comprehensive Molecular Portraits of Human Breast Tumors. *Nature* **2012**, *490*, 61–70. [[CrossRef](#)]
55. Bose, R.; Kavuri, S.M.; Searleman, A.C.; Shen, W.; Shen, D.; Koboldt, D.C.; Monsey, J.; Goel, N.; Aronson, A.B.; Li, S.; et al. Activating HER2 Mutations in HER2 Gene Amplification Negative Breast Cancer. *Cancer Discov.* **2013**, *3*, 224–237. [[CrossRef](#)]
56. Yang, S.; Wang, Y.; Zhao, C.; Li, X.; Liu, Q.; Mao, S.; Liu, Y.; Yu, X.; Wang, W.; Tian, Q.; et al. Exon 20 YVMA Insertion Is Associated with High Incidence of Brain Metastasis and Inferior Outcome of Chemotherapy in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Patients with HER2 Kinase Domain Mutations. *Transl. Lung Cancer Res.* **2021**, *10*, 753–765. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Yarden, Y.; Pines, G. The ERBB Network: At Last, Cancer Therapy Meets Systems Biology. *Nat. Rev. Cancer* **2012**, *12*, 553–563. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Nie, F.; Yang, J.; Wen, S.; An, Y.-L.; Ding, J.; Ju, S.-H.; Zhao, Z.; Chen, H.-J.; Peng, X.-G.; Wong, S.T.C.; et al. Involvement of Epidermal Growth Factor Receptor Overexpression in the Promotion of Breast Cancer Brain Metastasis. *Cancer* **2012**, *118*, 5198–5209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Greulich, H.; Chen, T.-H.; Feng, W.; Jänne, P.A.; Alvarez, J.V.; Zappaterra, M.; Bulmer, S.E.; Frank, D.A.; Hahn, W.C.; Sellers, W.R.; et al. Oncogenic Transformation by Inhibitor-Sensitive and -Resistant EGFR Mutants. *PLOS Med.* **2005**, *2*, e313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Hsiao, S.-H.; Chou, Y.-T.; Lin, S.-E.; Hsu, R.-C.; Chung, C.-L.; Kao, Y.-R.; Liu, H.E.; Wu, C.-W. Brain Metastases in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer: The Role of Mutated-EGFRs with an Exon 19 Deletion or L858R Point Mutation in Cancer Cell Dissemination. *Oncotarget* **2017**, *8*, 53405–53418. [[CrossRef](#)]
61. Li, J.; Yen, C.; Liaw, D.; Podsypanina, K.; Bose, S.; Wang, S.I.; Puc, J.; Miliarsis, C.; Rodgers, L.; McCombie, R.; et al. PTEN, a Putative Protein Tyrosine Phosphatase Gene Mutated in Human Brain, Breast, and Prostate Cancer. *Science* **1997**, *275*, 1943–1947. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Bonneau, D.; Longy, M. Mutations of the Human PTEN Gene. *Hum. Mutat.* **2000**, *16*, 109–122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Hahn, M.; Wieland, I.; Koufaki, O.N.; Görgens, H.; Sobottka, S.B.; Schackert, G.; Schackert, H.K. Genetic Alterations of the Tumor Suppressor Gene PTEN/MMAC1 in Human Brain Metastases. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **1999**, *5*, 2431–2437.

64. Nagata, Y.; Lan, K.-H.; Zhou, X.; Tan, M.; Esteva, F.J.; Sahin, A.A.; Klos, K.S.; Li, P.; Monia, B.P.; Nguyen, N.T.; et al. PTEN Activation Contributes to Tumor Inhibition by Trastuzumab, and Loss of PTEN Predicts Trastuzumab Resistance in Patients. *Cancer Cell* **2004**, *6*, 117–127. [[CrossRef](#)]
65. Kuchenbaecker, K.B.; Hopper, J.L.; Barnes, D.R.; Phillips, K.-A.; Mooij, T.M.; Roos-Blom, M.-J.; Jervis, S.; van Leeuwen, F.E.; Milne, R.L.; Andrieu, N.; et al. Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA* **2017**, *317*, 2402–2416. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Moran, A.; O'Hara, C.; Khan, S.; Shack, L.; Woodward, E.; Maher, E.R.; Lalloo, F.; Evans, D.G.R. Risk of Cancer Other than Breast or Ovarian in Individuals with BRCA1 and BRCA2 Mutations. *Fam. Cancer* **2012**, *11*, 235–242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Song, Y.; Barry, W.T.; Seah, D.S.; Tung, N.M.; Garber, J.E.; Lin, N.U. Patterns of Recurrence and Metastasis in BRCA1/BRCA2-associated Breast Cancers. *Cancer* **2020**, *126*, 271–280. [[CrossRef](#)]
68. Zhou, B.; Lin, W.; Long, Y.; Yang, Y.; Zhang, H.; Wu, K.; Chu, Q. Notch Signaling Pathway: Architecture, Disease, and Therapeutics. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2022**, *7*, 95. [[CrossRef](#)]
69. Nam, D.-H.; Jeon, H.-M.; Kim, S.; Kim, M.H.; Lee, Y.-J.; Lee, M.S.; Kim, H.; Joo, K.M.; Lee, D.-S.; Price, J.E.; et al. Activation of Notch Signaling in a Xenograft Model of Brain Metastasis. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2008**, *14*, 4059–4066. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. McGowan, P.M.; Simeone, C.; Ribot, E.J.; Foster, P.J.; Palmieri, D.; Steeg, P.S.; Allan, A.L.; Chambers, A.F. Notch1 Inhibition Alters the CD44hi/CD24lo Population and Reduces the Formation of Brain Metastases from Breast Cancer. *Mol. Cancer Res. MCR* **2011**, *9*, 834–844. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Ladd, B.; Mazzola, A.M.; Bihani, T.; Lai, Z.; Bradford, J.; Collins, M.; Barry, E.; Goepfert, A.U.; Weir, H.M.; Hearne, K.; et al. Effective Combination Therapies in Preclinical Endocrine Resistant Breast Cancer Models Harboring ER Mutations. *OncoTarget* **2016**, *7*, 54120–54136. [[CrossRef](#)]
72. Turner, N.C.; Slamon, D.J.; Ro, J.; Bondarenko, I.; Im, S.-A.; Masuda, N.; Colleoni, M.; DeMichele, A.; Loi, S.; Verma, S.; et al. Overall Survival with Palbociclib and Fulvestrant in Advanced Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *379*, 1926–1936. [[CrossRef](#)]
73. Lainé, M.; Fanning, S.W.; Chang, Y.-F.; Green, B.; Greene, M.E.; Komm, B.; Kurleto, J.D.; Phung, L.; Greene, G.L. Lasofoxifene as a Potential Treatment for Therapy-Resistant ER-Positive Metastatic Breast Cancer. *Breast Cancer Res. BCR* **2021**, *23*, 54. [[CrossRef](#)]
74. Puyang, X.; Furman, C.; Zheng, G.Z.; Wu, Z.J.; Banka, D.; Aithal, K.; Agoulnik, S.; Bolduc, D.M.; Buonamici, S.; Caleb, B.; et al. Discovery of Selective Estrogen Receptor Covalent Antagonists for the Treatment of ER $\alpha$ WT and ER $\alpha$ MUT Breast Cancer. *Cancer Discov.* **2018**, *8*, 1176–1193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Sermonix Pharmaceuticals Inc. An Open-Label, Randomized, Multicenter Study Evaluating the Activity of Lasofoxifene Relative to Fulvestrant for the Treatment of Pre- and Postmenopausal Women With Locally Advanced or Metastatic ER+/HER2- Breast Cancer With an ESR1 Mutation. [clinicaltrials.gov](https://www.clinicaltrials.gov); 2022. Available online: <https://www.medfind.com/conditions/HER2%20Negative%20Breast%20Cancer/6547/clinical-trial/4684954> (accessed on 23 April 2022).
76. H3 Biomedicine Inc. A Phase 1-2 Multicenter, Open Label Trial of H3B-6545, a Covalent Antagonist of Estrogen Receptor Alpha. In Women With Locally Advanced or Metastatic Estrogen Receptor-Positive, HER2 Negative Breast Cancer. [clinicaltrials.gov](https://www.clinicaltrials.gov); 2022. Available online: <https://ichgcp.net/clinical-trials-registry/NCT03250676> (accessed on 23 April 2022).
77. Hyman, D.M.; Piha-Paul, S.A.; Won, H.; Rodon, J.; Saura, C.; Shapiro, G.I.; Juric, D.; Quinn, D.I.; Moreno, V.; Doger, B.; et al. HER Kinase Inhibition in Patients with HER2- and HER3-Mutant Cancers. *Nature* **2018**, *554*, 189–194. [[CrossRef](#)]
78. Oaknin, A.; Friedman, C.F.; Roman, L.D.; D'Souza, A.; Brana, I.; Bidard, F.-C.; Goldman, J.; Alvarez, E.A.; Boni, V.; ElNaggar, A.C.; et al. Neratinib in Patients with HER2-Mutant, Metastatic Cervical Cancer: Findings from the Phase 2 SUMMIT Basket Trial. *Gynecol. Oncol.* **2020**, *159*, 150–156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Bai, H.; Xiong, L.; Han, B. The Effectiveness of EGFR-TKIs against Brain Metastases in EGFR Mutation-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *OncoTargets Ther.* **2017**, *10*, 2335–2340. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Reungwetwattana, T.; Nakagawa, K.; Cho, B.C.; Cobo, M.; Cho, E.K.; Bertolini, A.; Bohnet, S.; Zhou, C.; Lee, K.H.; Nogami, N.; et al. CNS Response to Osimertinib Versus Standard Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors in Patients With Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2018**, *36*, 3290–3297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Chagoya, G.; Kwatra, S.G.; Nanni, C.W.; Roberts, C.M.; Phillips, S.M.; Nullmeyergh, S.; Gilmore, S.P.; Spasojevic, I.; Corcoran, D.L.; Young, C.C.; et al. Efficacy of Osimertinib against EGFRvIII+ Glioblastoma. *Oncotarget* **2020**, *11*, 2074–2082. [[CrossRef](#)]
82. Singh, G.K.; Bajpai, J.; Joshi, S.; Prabhash, K.; Choughule, A.; Patil, A.; Gupta, S.; Badwe, R.A. Excellent Response to Erlotinib in Breast Carcinoma with Rare EGFR Mutation—A Case Report. *Ecancermedicalscience* **2020**, *14*, 1092. [[CrossRef](#)]
83. Ni, J.; Ramkissoon, S.H.; Xie, S.; Goel, S.; Stover, D.G.; Guo, H.; Luu, V.; Marco, E.; Ramkissoon, L.A.; Kang, Y.J.; et al. Combination Inhibition of PI3K and MTORC1 Yields Durable Remissions in Orthotopic Patient-Derived Xenografts of HER2-Positive Breast Cancer Brain Metastases. *Nat. Med.* **2016**, *22*, 723–726. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Philip, C.-A.; Laskov, I.; Beauchamp, M.-C.; Marques, M.; Amin, O.; Bitharas, J.; Kessous, R.; Kogan, L.; Baloch, T.; Gotlieb, W.H.; et al. Inhibition of PI3K-AKT-MTOR Pathway Sensitizes Endometrial Cancer Cell Lines to PARP Inhibitors. *BMC Cancer* **2017**, *17*, 638. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Gelmon, K.A.; Tischkowitz, M.; Mackay, H.; Swenerton, K.; Robidoux, A.; Tonkin, K.; Hirte, H.; Huntsman, D.; Clemons, M.; Gilks, B.; et al. Olaparib in Patients with Recurrent High-Grade Serous or Poorly Differentiated Ovarian Carcinoma or Triple-Negative Breast Cancer: A Phase 2, Multicentre, Open-Label, Non-Randomised Study. *Lancet Oncol.* **2011**, *12*, 852–861. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

86. Golan, T.; Hammel, P.; Reni, M.; Van Cutsem, E.; Macarulla, T.; Hall, M.J.; Park, J.-O.; Hochhauser, D.; Arnold, D.; Oh, D.-Y.; et al. Maintenance Olaparib for Germline BRCA-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *381*, 317–327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. de Bono, J.; Mateo, J.; Fizazi, K.; Saad, F.; Shore, N.; Sandhu, S.; Chi, K.N.; Sartor, O.; Agarwal, N.; Olmos, D.; et al. Olaparib for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 2091–2102. [[CrossRef](#)]
88. Wang, Q.; Zhang, F.; Gao, H.; Xu, Y. Successful Treatment of a Patient with Brain Metastases from Endometrial Cancer Using Niraparib: A Case Report. *Ann. Palliat. Med.* **2021**, *10*, 818–827. [[CrossRef](#)]
89. Karginova, O.; Siegel, M.B.; Van Swearingen, A.E.D.; Deal, A.M.; Adamo, B.; Sambade, M.J.; Bazyar, S.; Nikolaishvili-Feinberg, N.; Bash, R.; O’Neal, S.; et al. Efficacy of Carboplatin Alone and in Combination with ABT888 in Intracranial Murine Models of BRCA-Mutated and BRCA-Wild-Type Triple Negative Breast Cancer. *Mol. Cancer Ther.* **2015**, *14*, 920–930. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Rodler, E.; Sharma, P.; Barlow, W.E.; Gralow, J.R.; Puhalla, S.L.; Anders, C.K.; Goldstein, L.; Tripathy, D.; Brown-Glaberman, U.A.; Huynh, T.-T.; et al. Cisplatin with Veliparib or Placebo in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer and BRCA Mutation-Associated Breast Cancer (S1416): A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 2 Trial. *Lancet Oncol.* **2023**, *24*, 162–174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Morgensztern, D.; Besse, B.; Greillier, L.; Santana-Davila, R.; Ready, N.; Hann, C.L.; Glisson, B.S.; Farago, A.F.; Dowlati, A.; Rudin, C.M.; et al. Efficacy and Safety of Rovalpituzumab Tesirine in Third-Line and Beyond Patients with DLL3-Expressing, Relapsed/Refractory Small-Cell Lung Cancer: Results From the Phase II TRINITY Study. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2019**, *25*, 6958–6966. [[CrossRef](#)]
92. Coleman, R.L.; Handley, K.F.; Burger, R.; Molin, G.Z.D.; Stagg, R.; Sood, A.K.; Moore, K.N. Demcizumab Combined with Paclitaxel for Platinum-Resistant Ovarian, Primary Peritoneal, and Fallopian Tube Cancer: The SIERRA Open-Label Phase Ib Trial. *Gynecol. Oncol.* **2020**, *157*, 386–391. [[CrossRef](#)]
93. Haffner, M.C.; Mosbrugger, T.; Esopi, D.M.; Fedor, H.; Heaphy, C.M.; Walker, D.A.; Adejola, N.; Gürel, M.; Hicks, J.; Meeker, A.K.; et al. Tracking the Clonal Origin of Lethal Prostate Cancer. *J. Clin. Investig.* **2013**, *123*, 4918–4922. [[CrossRef](#)]
94. Brasó-Maristany, F.; Paré, L.; Chic, N.; Martínez-Sáez, O.; Pascual, T.; Mallafré-Larrosa, M.; Schettini, F.; González-Farré, B.; Sanfeliu, E.; Martínez, D.; et al. Gene Expression Profiles of Breast Cancer Metastasis According to Organ Site. *Mol. Oncol.* **2022**, *16*, 69–87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.