► Les tumeurs cérébrales primitives malignes font partie des 10 premières causes de décès par cancer et leur incidence, en augmentation, est estimée à 6-7/100 000. Les tumeurs du système nerveux central (SNC) posent un problème de santé publique du fait de la morbidité associée, de la gravité des formes les plus malignes qui demeurent incurables et enfin des populations affectées. En effet, les tumeurs cérébrales touchent particulièrement les jeunes et elles constituent le deuxième cancer chez les 15-34 ans. Le pronostic des gliomes malins est influencé par l'âge, l'indice de performance Karnofsky (IK), le *Mini-Mental Status* (MMS), le type de chirurgie, l'histologie, la dose de radiothérapie délivrée, facteurs dont la combinaison définit 6 groupes pronostiques distincts, où la survie médiane varie de 4,6 à 58,6 mois. ◀

Tumorotheque de l'AP-HM : cartographie moléculaire des gliomes

Dominique Figarella-Branger^{1,2}, Carole Colin¹, Olivier Chinot^{3,4,9}, Isabelle Nanni⁴, Nathalie Baeza¹, Frédéric Fina⁴, Soutsakhone Tong², Nathalie Eudes¹, Benoit Quilichini⁵, Sylvie Romain⁴, Philippe Metellus⁶, Stéphane Fuentes⁶, Maryline Barrié³, Céline Boucard³, Caroline Fraslou⁷, Marie-José Bonavita⁸, Pierre-Marie Martin^{4,9}, L'Houcine Ouafik^{4,9}

¹Laboratoire de Biopathologie de l'Adhésion et de la Signalisation, EA3281, Faculté de Médecine Timone, Marseille, France.

²Service d'Anatomie Pathologique et de Neuropathologie, AP-HM, Hôpital de la Timone, 264, rue Saint-Pierre, 13285 Marseille Cedex 5, France.

³Unité de Neuro-oncologie, Hôpital de la Timone, Marseille, France.

⁴Laboratoire de Transfert d'Oncologie Biologique et Moléculaire, AP-HM, Hôpital Nord, Marseille, France.

⁵Unité de Cytogénétique Oncologique, Hôpital de la Timone, Marseille, France.

⁶Service de Neurochirurgie, Hôpital de la Timone, Marseille, France.

⁷Laboratoire Sanofi-Aventis.

⁸Direction à la Recherche Clinique, AP-HM, Marseille, France.

⁹Laboratoire de Cancérologie Expérimentale, Inserm EMI0359, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille (AP-HM), Université de la Méditerranée, Marseille, France.

dominique.figarella-branger@medecine.univ-mrs.fr

L'objectif de cet article est de montrer l'utilisation de la tumorotheque de l'AP-HM pour l'étude des tumeurs du SNC. Les travaux rapportés ici concernent la caractérisation moléculaire de certains gliomes. Il s'agit d'une étude collaborative impliquant des cliniciens (neurochirurgiens, neuro-oncologues, neuropathologistes), des biologistes (oncobiologistes, biologistes moléculaires, cytogénéticiens) et des chercheurs fondamentaux. Cette étude a débuté en mai 2004. Des réunions régulières à une fréquence d'environ une fois tous les deux mois, et réunissant l'ensemble des participants, ont permis un avancement régulier du projet. Les résultats obtenus, dont certains sont encore en cours d'analyse, serviront de base à un plus vaste programme de recherche impliquant d'autres structures principalement rattachées au Cancéropôle PACA.

La tumorotheque de l'AP-HM

La tumorotheque de l'AP-HM a été labellisée par la DHOS sous le n° 49 (appel d'offre DHOS tumorotheque 2002).

AP-HM : Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille.

Elle est l'une des unités constitutives du Centre de Ressources Biologiques (CRB) de Marseille reconnu et soutenu par l'Inserm en décembre 2003. Le responsable médical de la tumorothèque de l'AP-HM est le Professeur P.M. Martin. La tumorothèque de l'AP-HM possède deux sites de stockage, un sur le secteur Nord (responsable Dr S. Romain), l'autre sur le site Timone (responsable Pr D. Figarella-Branger). La tumorothèque est gérée par un comité de pilotage unique et des comités de gestion par filière de soins. Cette tumorothèque abrite différentes collections de tumeurs cryopré-servées clairement identifiées. L'évaluation de la tumorothèque AP-HM fait partie du rapport de l'Institut National du Cancer (INCa) en date de mai 2005 « Évaluation des bio-banques françaises utilisables pour des projets de recherche clinique sur le cancer. Comparaison avec les autres pays industrialisés ». Dans le tableau établi lors de l'enquête INCa sur les tumorothèques, il apparaît quelques informations utiles pour le positionnement de la tumorothèque de l'AP-HM. En effet, sur ce tableau d'enquête auprès de 59 CHU (Centre Hospitalo-Universitaire)-CRLCC (Centre Régional de Lutte Contre le Cancer), 37 ont une tumorothèque ou ont répondu à l'enquête. La tumorothèque AP-HM porte le code 48 ; elle est la 3^e/37 déclarées en quantité d'échantillons préservés (5 600 échantillons) après le centre n° 4 (6 660 échantillons) et le centre n° 27 (11 000 échantillons). Elle est la première en ce qui concerne les collections des tumeurs cérébrales, prostate/urologie, ORL et mélanomes. La collection des tumeurs du SNC abrite plus de 2 500 identités de patients et reflète la diversité de la pathologie tumorale du SNC. Quatre sur 6 centres de neurochirurgie dans la région PACA sont associés au groupe de neuro-oncologie de l'hôpital de la Timone. La cryopréservation est réalisée pour la majorité des patients opérés sur le site Timone. Elle devrait s'étendre aux autres structures dans le cadre de la mise en place de réseaux permettant à des structures de soins d'avoir accès à la tumorothèque de l'AP-HM pour stocker les échantillons à des fins sanitaires.

Les cohortes les plus abondantes sont représentées par les méningiomes (29,11 %) et les gliomes (28,71 %) (Figure 1). Cette importante collection est rendue pertinente du fait de la fiabilité du diagnostic anatomopathologique et des annotations cliniques et la démarche qualité faite dans le cadre de la tumorothèque et du laboratoire de transfert.

Les gliomes

Les grands types de gliomes

Il existe deux grands types de gliomes. Les gliomes dits circonscrits essentiellement représentés par l'astrocytome pilocytique (AP), de grade I, strictement bénins qui pourront être traités par une exérèse chirurgicale totale et les gliomes infiltrants. Ces derniers sont de type astrocytaire, oligodendrogial ou mixte, de grade II, III ou IV dans la classification de l'OMS [1, 2]. Du fait de leur caractère infiltrant, l'exérèse chirurgicale ne permet pas leur éradication. Ces tumeurs progressent toujours : d'une part, elles continuent à infiltrer les structures nerveuses préexistantes, d'autre part, quel que soit leur *grading* initial, elles évoluent inexorablement vers la malignité, le glioblastome (GBM) de grade IV représentant la forme la plus maligne. Histologiquement, les GBM sont typiquement des tumeurs polymorphes, denses, comportant des mitoses, de la nécrose et une angiogenèse (prolifération endothélio-capillaire). Cependant, dans certains cas, des difficultés diagnostiques peuvent être observées

avec des confusions possibles avec des tumeurs bénignes comme l'astrocytome pilocytique (AP) rendant nécessaire la détermination de marqueurs moléculaires fiables du diagnostic. Les publications rapportant la non reproductibilité de la classification de l'OMS sont à cet égard éloquentes [3]. Par ailleurs, les GBM se caractérisent par un certain nombre d'altérations moléculaires comme une perte d'hétérozygotie en 19q et en 10q, des délétions de p16, des mutations de TP53, de PTEN ou encore une amplification

Figure 1. La collection de tumeurs du système nerveux central (SNC) de l'AP-HM.

du récepteur de l'EGF [2]. Bien que les GBM soient classés selon l'OMS comme des tumeurs astrocytaires, certains oligodendrogliomes pourraient évoluer vers d'authentiques GBM et sont appelés glioblastomes à composante oligodendrogliale ou GBMO [4]. Ces tumeurs combinent les altérations moléculaires des oligodendrogliomes (perte de l'hétérozygotie-LOH-1p/19q) et des GBM.

Prise en charge thérapeutique et anomalies moléculaires

Alors que la résistance des gliomes aux différentes thérapies accessibles a été longtemps la règle, des résultats observés ces dernières années ont significativement modifié nos stratégies thérapeutiques. Pendant plus de 20 ans, le standard de traitement adjuvant des gliomes malins a reposé sur la radiothérapie, alors que le bénéfice de la chimiothérapie par nitroso-urées était plus discuté, puisqu'il portait principalement sur l'augmentation du nombre de longs survivants, et ce sans impact perceptible sur la médiane de survie qui restait de l'ordre de 10 à 12 mois. Cependant, en 2002, la méta-analyse du Groupe GMT, portant sur 3 004 patients inclus dans 12 essais randomisés concluait à un bénéfice de la chimiothérapie adjuvante, apportant un gain de 2 mois en médiane de survie [5]. En 2004, confirmant ces données, un essai prospectif de l'EORTC et du NCI Canada, a défini un nouveau standard incluant une chimiothérapie pour les glioblastomes améliorant significativement la médiane de survie (de 12 à 14,5 mois) et le taux de survivants à 2 ans (de 10 à 26 %) [6]. Cette chimiosensibilité potentielle des glioblastomes apparaît aussi en terme de réponse objective à la chimiothérapie, qui peut être observée dans 30 à 40 % des cas y compris dans des groupes caractérisés par un pronostic médiocre [7, 8]. Il apparaît actuellement que les facteurs pronostiques cliniques précédemment décrits ne peuvent pas prédire, de façon satisfaisante, le bénéfice potentiel des thérapeutiques actuelles, et notamment celui de la chimiothérapie dans les glioblastomes [5, 6]. Dans les oligodendrogliomes, en revanche, des délétions isolées ou combinées des chromosomes 1p et 19q ont une valeur diagnostique et surtout pronostique démontrée en rétrospectif et en prospectif [9, 10]. Certains auteurs lui ont attribué aussi une valeur prédictive de la réponse à la chimiothérapie [9, 11] qui n'a cependant pas été confirmée dans le cadre d'essais prospectifs comparatifs récents [9]. Les essais thérapeutiques actuels incluent l'analyse de ces marqueurs voire la stratification des groupes thérapeutiques selon l'existence ou non de ces délétions. Dans les glioblastomes, aucune valeur

pronostique n'a cependant pu être clairement attribuée aux anomalies moléculaires décrites. Plus récemment cependant, la méthylation du promoteur de l'O6-méthylguanine-ADN-méthyltransférase (MGMT), impliquée dans le métabolisme des alkylants, est apparue comme un marqueur potentiel fort à la fois pronostique et prédictif du bénéfice de la chimiothérapie adjuvante en terme de survie pour les glioblastomes [12]. Cependant, aucune étude n'a pu corréler le statut de méthylation du MGMT à la réponse thérapeutique objective. Enfin, en ce qui concerne les essais de biothérapies ciblées, il est trop tôt pour savoir si leur efficacité est corrélée au statut biologique de la tumeur, mais ce champ d'application est en plein essor.

But du projet

Le but de notre étude a été :

- d'identifier des marqueurs d'intérêt diagnostique permettant de distinguer les astrocytomes pilocytiques des glioblastomes ;
- d'identifier les gènes impliqués dans l'invasion tumorale et l'angiogenèse ;
- d'identifier des marqueurs prédictifs du pronostic des GBM ;
- de valider les résultats sur une grande cohorte de patients en utilisant les ressources biologiques de la tumorothèque de l'AP-HM.

Mise en évidence de marqueurs d'intérêt diagnostique

Deux techniques ont été choisies. La première est une technique d'hybridation soustractive (SSH) permettant d'isoler des ARN sélectivement exprimés (même de façon peu abondante) dans une population par rapport à une autre [13]. Ainsi, un *pool* d'ARN issu de 4 astrocytomes pilocytiques (AP) a été soustrait à un autre *pool* d'ARN de 4 GBM permettant l'obtention de 106 clones sélectivement exprimés dans les AP. La manœuvre inverse a permis d'obtenir 80 clones spécifiques des GBM. Les gènes identifiés ont été classés selon leur fonction (Figure 2). De façon intéressante les gènes les plus fréquemment observés dans les GBM étaient impliqués dans l'invasion et l'angiogenèse alors que ceux majoritairement retrouvés dans les AP jouaient un rôle prépondérant dans le métabolisme ou encore codaient pour des protéines impliquées dans le développement. Cette approche a permis de mettre en évidence des marqueurs sensibles et spécifiques capables de distinguer les astrocytomes pilocytiques des glioblastomes dont l'expression a été confirmée par RT-PCR quantitative en temps réel et/ou immunohistochimie.

Une deuxième approche, encore en cours d'analyse, a utilisé le *profiling* haute densité (puces Affymetrix, contrat Sanofi-Aventis).

Identification de gènes impliqués dans l'invasion tumorale et l'angiogenèse

La SSH a permis de mettre en évidence des candidats majeurs (comme la fibronectine ou encore l'ostéopontine) déjà rapportés par d'autres équipes en utilisant des approches différentes, mais également des candidats nouveaux comme la kératopithéline ou encore la fibromoduline. Par ailleurs, les travaux antérieurs de la littérature et de l'EMI 0539 nous ont incité à étudier l'expression des protéases comme l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA), ses inhibiteurs

PAI1, et la cathepsine B ainsi que des marqueurs de l'angiogenèse (VEGF, *vascular endothelial growth factor*, adrénomédulline et ses récepteurs) dans les gliomes [14-16]. La mesure de l'expression de l'adrénomédulline par hybridation *in situ* et la quantification par PCR quantitative en temps réel montrent une forte expression de l'adrénomédulline restreinte aux formes les plus agressives de gliomes [15, 17]. Nous avons pu démontrer que l'adrénomédulline joue un rôle fondamental dans la mise en place d'une néoangiogenèse tumorale stable et fonctionnelle [15] faisant de l'adrénomédulline et/ou ses récepteurs des cibles thérapeutiques potentielles.

Nous avons ainsi pu montrer que l'adrénomédulline qui était fortement exprimée dans les GBM [15] n'était pas observée dans les AP.

Identification de marqueurs prédictifs du pronostic des GBM

Plusieurs candidats pronostiques potentiels ont été étudiés dans une large cohorte de patients (voir paragraphe suivant). Les marqueurs ciblés étaient :

- certains marqueurs obtenus à l'issue de la technique de SSH ;
- les marqueurs uPA, PAI1, cathepsine B, adrénomédulline (et ses récepteurs CRLR, RAMP2,3), VEGF, et la fibronectine impliqués dans l'invasion et l'angiogenèse ;

- l'amplification du REGF ;
- le statut 1p19q analysé soit par la technique de LOH, soit par celle de FISH ;
- par ailleurs, si l'étude du *profiling* haute densité (DNA array Affymetrix puce n°HG-U133) permet l'identification de signature moléculaire caractéristique des sous-populations de GBM (sous-populations établies en fonction de la survie globale des patients), l'expression de ces gènes sera confirmée par RT-PCR quantitative en temps réel.

Validation des résultats sur une grande cohorte de patients

Cette étape, nécessaire dans la conduite d'un projet de génomique descriptive, illustre l'importance cruciale des biobanques, des plateaux techniques associés et la nécessité d'une complémentarité entre les structures, d'une part, et les compétences, d'autre part.

En effet, les prélèvements congelés retenus pour l'étude ont dû obéir à un certain nombre de critères quantitatifs et qualitatifs.

Critères quantitatifs

Le nombre de prélèvements stockés dans la banque devait être suffisant (une trentaine pour chaque cohorte de patients du fait du risque de perte encourue, sur des critères qualitatifs, à chaque étape), et d'un poids minimum de 50 mg.

Critères qualitatifs

Outre la qualité et la fiabilité des annotations cliniques et du diagnostic anatomopathologique initial, la traçabilité de la conservation, différents contrôles qualitatifs se sont avérés cruciaux :

- vérification anatomopathologique des prélèvements tissulaires congelés au moment du déstockage (coupe à congélation colorée par l'hématéine-éosine appréciant la nature du tissu destiné aux analyses moléculaires et permettant d'exclure ainsi les prélèvements comportant plus de 80 % de tissu normal et/ou de nécrose) ;
 - contrôle de la qualité des ARN sur puce Agilent (ARN retenus pour le *profiling* à haute densité : ratio 28S/18S > 1,8 pour le *profiling* haute densité et > 1,5 pour la QRT-PCR [18]).
- Quatre cohortes de patients ont ainsi été analysées, représentées par :

Figure 2. Gènes identifiés par SSH (technique d'hybridation soustractive) classés selon leur fonction biologique. Les gènes les plus fréquemment observés dans les GBM (A) sont impliqués dans l'invasion et l'angiogenèse alors que ceux majoritairement retrouvés dans les AP (B) jouent un rôle prépondérant dans le métabolisme ou codent pour des protéines impliquées dans le développement.

- des astrocytomes pilocytiques de l'enfant ;
- des glioblastomes stratifiés en fonction de la survie globale (SG) :
 - GBM avec SG < 6 mois ;
 - GBM avec 10 < SG < 16 mois ;
 - GBM avec SG > 18 mois.

Les Figures 3 et 4 résument les différentes étapes et les techniques utilisées à partir des prélèvements congelés. Par ailleurs, les fragments fixés et inclus en paraffine correspondant aux mêmes patients ainsi que d'autres, stratifiés en fonction du type histologique et de la survie globale, ont été placés en *tissue-arrays*. Cette technique permet de recueillir, sur un seul bloc de paraffine, plusieurs dizaines d'échantillons appartenant à un grand nombre de patients après sélection des zones d'intérêt par un pathologiste. Ce système permet de valider les résultats du transcriptome au niveau protéique par des techniques d'immunohistochimie dans les mêmes conditions expérimentales, sur de larges cohortes de patients.

À titre d'exemple, les différentes approches méthodologiques (SSH, *profiling* haute densité, QRT-PCR, immunohistochimie sur *tissue-array*) ont montré l'expression majeure de la fibronectine dans les GBM par rapport aux AP sans différence significative cependant dans les différentes sous-populations de GBM. Six marqueurs moléculaires semblent potentiellement intéressants pour définir des sous-groupes pronostiques parmi les glioblastomes, il s'agit de la

cathepsine B, PAI1, uPA, VEGF, adrénomédulline (et ses récepteurs), fibronectine, surexpression/amplification REGF. Il est intéressant de noter qu'une partie de ces marqueurs moléculaires (PAI1 et REGF) retrouvent la valeur pronostique qui leur était associée par leur détermination protéique [16].

Conclusion

Ce projet illustre l'intérêt d'une tumorothèque au service de la communauté scientifique, la complémentarité indispensable entre les cliniciens, les anatomopathologistes, les biologistes et les chercheurs fondamentaux. La mise en place de pôle de compétence, la structuration actuelle des équipes de recherche au sein du Cancéropôle PACA autour d'axes transversaux (projet structurant) dont fait partie le glioblastome offre un terrain privilégié pour une recherche compétitive dans l'espace européen. ♦

SUMMARY

AP-HM tumour tissue bank : molecular signature of gliomas

The AP-HM tissue bank is the largest one in France regarding some collections, including brain tumors. This collection was used to better characterize some gliomas. In particular because some benign gliomas such as pilocytic astrocytomas (WHO grade I) can be misclassified as malignant ones such as glioblastomas (grade IV) the first aim of our study was to find accurate diagnostic markers. This was done mainly by suppressive subtractive hybridization (SSH). This study also provides a restrictive list of genes selectively involved in angiogenesis and invasion, which were highly expressed in GBM. Results were confirmed

by real time quantitative RT-PCR in a large cohort of patients. In addition in order to find accurate markers which can predict GBM overall survival (OS) we selected three cohorts of GBM patients with distinctive OS (short survival < 6 months, long survival > 18 months and intermediate). Quantification of a series of markers involved in angiogenesis and invasion was done as well as cDNA array analysis. ♦

REMERCIEMENTS

Ce travail a été financé en partie par le Cancéropôle PACA, l'Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, l'Inserm et le Ministère de la Recherche (crédits institutionnels Inserm 0359, EA3281), l'Association pour la recherche contre le Cancer (ARC), et la Fondation Nélia et Amadéo Barletta (FNAB). Les études du *profiling* haute densité qui sont évoquées ont été financées par un contrat entre l'équipe 0359 et Sanofi-Aventis. Cette étude a impliqué l'en-

Figure 3. Obtention de produits dérivés à partir de fragments congelés.

semble des neurochirurgiens travaillant au sein de l'AP-HM et les anatomopathologistes ayant en charge les tumeurs du SNC ainsi que les neuro-oncologues.

RÉFÉRENCES

- Curran WJ, Scott CB, Horton J, et al. Recursive partitioning analysis of prognostic factors in three Radiation Therapy Oncology Group malignant glioma trials. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 704-10.
- Kleihues P, Cavenee WK. *World Health Organization: classification of tumors of the nervous system*. Lyon: IARC/WHO, 2000.
- Coons SW, Johnson PC, Scheithauer BW, Yates AJ, Pearl DK. Improving diagnostic accuracy and interobserver concordance in the classification and grading of primary gliomas. *Cancer* 1997; 79: 1381-93.
- He J, Mokhtari K, Sanson M, et al. Glioblastomas with an oligodendroglial component: a pathological and molecular study. *Neuropathol Exp Neurol* 2001; 60: 863-71.
- Group GM-aTG. Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *Lancet* 2002; 359: 1011-8.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352: 987-96.
- Chinot OL, Barrie M, Frauger E, et al. Phase II study of temozolomide without radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma multiforme in an elderly populations. *Cancer* 2004; 100: 2208-14.
- Barrié M, Couprie C, Dufour H, et al. Temozolomide in combination with BCNU before and after radiotherapy in patients with inoperable newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Ann Oncol* 2006 (sous presse).
- Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, et al. Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1473-9.
- Smith JS, Perry A, Borell TJ, et al. Alterations of chromosome arms 1p and 19q as predictors of survival in oligodendrogliomas, astrocytomas, and mixed oligoastrocytomas. *J Clin Oncol* 2000; 18: 636-45.
- Hoang-Xuan K, Capelle L, Kujas M, et al. Temozolomide as initial treatment for adults with low-grade oligodendrogliomas or oligoastrocytomas and correlation with chromosome 1p deletions. *J Clin Oncol* 2004; 22: 3133-8.
- Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352: 997-1003.
- Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 6025-30.
- Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas *in vivo*. *Nature* 1992; 359: 845-8.
- Ouafik L, Sauze S, Boudouresque F, et al. Neutralization of adrenomedullin inhibits the growth of human glioblastoma cell lines *in vitro* and suppresses tumor xenograft growth *in vivo*. *Am J Pathol* 2002; 160: 1279-92.
- Muracciole X, Romain S, Dufour H, Palmari J, Chinot O, Ouafik L, Grisoli F, Figarella-Branger D, Martin PM. PAI-1 and EGFR expression in adult glioma tumors: toward a molecular prognostic classification. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002; 52: 592-8.
- Boudouresque F, Berthois Y, Martin PM, Figarella-Branger D, Chinot O, Ouafik LH. Angiogenèse et tumeurs cérébrales: rôle de l'adrénomédulline. *Bull Cancer* 2005; 94: 317-26.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-9.

Figure 4. Méthodes employées pour la validation des résultats sur une large cohorte de patients.

TIRÉS À PART

D. Figarella-Branger