

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE Science – Technologie – Santé

Equipe de recherche 3842

Thèse N° [-----]

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline : Sciences

Présentée et soutenue par

Angélique Guillaudeau

Le 3 avril 2012

Etude de marqueurs moléculaires et des variants de l'EGFR
dans les gliomes infiltrants de l'adulte

Thèse dirigée par

Mr le Professeur François LABROUSSE (Co-Directeur)

et

Mme le Docteur Hélène CHABLE-RABINOVITCH (Co-Directeur)

JURY

Président : Mr le Professeur Jean Jacques MOREAU
Rapporteurs : Mr le Professeur Hugues LOISEAU
Mme le Docteur Anne JOUVET
Examineur : Mme le Professeur Catherine DAUMAS-DUPORT
Membre invité : Mme le Professeur Marie-Odile JAUBERTEAU
Directeurs : Mr le Professeur François LABROUSSE
Mme le Docteur Hélène CHABLE-RABINOVITCH

A Verde YN,
Chawqï et Oryx

Au Professeur Hugues LOISEAU et au Docteur Anne JOUVET

Je vous remercie d'avoir accepté de siéger dans ce jury, de bien avoir voulu relire et critiquer ce travail de façon très constructive.

Au Professeur François LABROUSSE

Je vous remercie de m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire, de m'avoir introduit dans le monde de l'anatomopathologie mais également de m'avoir ouvert les portes d'une équipe de recherche et de m'avoir laissé travailler sur ce sujet. J'ai pu profiter au cours de mon internat, de mon clinicat et de ce travail de thèse de votre enseignement, de vos conseils mais également de votre soutien aussi bien sur un plan professionnel que personnel.

Je suis reconnaissante que vous ayez accepté de diriger ce second travail. Veuillez trouver ici, l'expression de ma profonde admiration et de mon respect.

A Madame le Docteur Hélène CHABLE-RABINOVITCH

Je vous remercie sincèrement pour toute l'aide que vous m'avez apportée. Votre soutien, vos conseils et votre gentillesse en toutes circonstances m'ont permis de mener à bien ce projet et de surmonter toutes les difficultés qui se sont présentées.

C'est pour moi un honneur et une joie que vous ayez accepté de co-diriger cette thèse.

Au Professeur Catherine DAUMAS-DUPORT

Je suis très reconnaissante que vous acceptiez de juger ce travail. Votre avis éclairé sur celui-ci sera source de critiques constructives pour la poursuite de mon activité de recherche.

Au Professeur Jean Jacques MOREAU

Je vous remercie d'accepter de présider une deuxième fois mon jury de thèse et de m'avoir aidé pour toute la partie clinique.

Au Professeur Marie Odile JAUBERTEAU

Je tiens à vous exprimer ma reconnaissance pour m'avoir accueillie au sein de votre équipe de recherche afin de réaliser ce travail. Je vous remercie de vos conseils et de vos suggestions qui m'ont permis d'avancer dans ma démarche scientifique.

Je suis reconnaissante de l'honneur que vous me faites en acceptant de faire partie de mon jury.

Au Professeur Catherine YARDIN

Je tiens particulièrement à t'exprimer ma gratitude pour l'aide technique que tu m'as apportée ainsi que pour l'accueil chaleureux qui m'a été réservé à chacune de mes visites tardives dans ton service.

Au Docteur Sylvie BOURTHOUMIEU

Je te remercie sincèrement pour l'aide que tu m'as apportée pour la mise au point des techniques de FISH, pour la formation sur la lecture de ces dernières et pour les conseils que tu continues encore à me prodiguer sur cette technique qui n'a aucun secret pour toi.

Je suis certaine que ton dévouement et tes compétences scientifiques te promettent un brillant avenir personnel et professionnel.

Au Docteur Jeanne COOK-MOREAU

Notre amitié et ton soutien ont été pour moi des éléments précieux aussi bien sur un plan personnel que professionnel. Je te remercie pour ta gentillesse et pour nos discussions scientifiques enrichissantes. Ton soutien chabannais m'a empêché de m'effondrer.

Au Docteur Karine DURAND-FAUCHER

Je voudrais te remercier pour l'amitié et la disponibilité dont tu as fait preuve tout au long de ce travail de thèse, pour l'aide scientifique, technique et personnelle, pour avoir relu mon manuscrit d'une manière pertinente, efficace et rapide et pour m'avoir prêté ton bureau.

Je suis sûre que ton avenir sera à la hauteur de tes nombreuses qualités.

Au Docteur Catherine DUSSARTRE

Je te remercie d'avoir un jour accepté de partager mon bureau et d'y être restée. Ton dynamisme, tes conseils et tes attentions m'ont donné la force d'avancer. Tu es Grande!

Au Docteur Barbara BESSETTE et à Delphine

Merci d'avoir accepté de me conseiller à toutes heures et sur tous les sujets, de m'avoir aidé à m'occuper de ma fille et de mes fils autour d'un café ou d'un aquarium.

Au Docteur Béma COULIBALY

Merci pour ta bonne humeur quotidienne, pour tes tentatives d'améliorer ma culture musicale et pour toutes tes préparations vanillées.

Au Professeur François PARAF, aux Docteurs Manuela DELAGE-CORRE, Isabelle POMMEPUY, Jocelyne GOBURDHUN-GRANDE, Yannick ROUGIER, Julien PALASSE, Barbara PETIT, Naïma THALI et Véronique FERMEAUX

Je vous remercie de la formation que vous m'avez dispensée au cours de ces dernières années. Merci pour votre bonne humeur, votre disponibilité et votre soutien quotidien.

A Monsieur Alain CHAUNAVEL

Je te remercie pour ton aide pour récupérer les données cliniques, pour ta disponibilité et pour la gentillesse dont tu as fait preuve à mon égard.

A Mademoiselle Sandrine ROBERT

Je tiens à te remercier pour la patience dont tu as fait preuve pour m'enseigner la rigueur et la précision de la biologie moléculaire, pour ton aide technique mais également pour ton soutien au cours de ces dernières années. Je suis certaine que tes nombreuses qualités te permettront de réaliser tes projets personnels et professionnels.

Au personnel du Service d'Anatomie Pathologique

Je tiens à remercier tout le personnel du service d'Anatomie Pathologique pour leur soutien au quotidien, leur disponibilité et leur aide concernant les techniques ou la rédaction. Travailler avec une telle équipe est tellement stimulant. Merci à tous.

A ma mère

Merci d'avoir accepté de vivre à mon rythme pendant cette dernière année.

Aux habitants de Chabanne

Sans vous je n'aurais jamais pu achever ce travail. Vive le Boum !

Aux amis

Pour toutes les goupilles perdues et les moments de détente qui m'ont permis de faire face.... Et pour tous ceux à venir !

SOMMAIRE

RESUME	8
ABSTRACT.....	9
ABREVIATIONS.....	10
FIGURES ET TABLEAUX	12
INTRODUCTION.....	13
1. GENERALITES	15
1.1. LES GLIOMES	15
1.1.1 <i>Définition, incidence, aspects cliniques.....</i>	<i>15</i>
1.1.1.1. Définition.....	15
1.1.1.2. Incidence.....	15
1.1.1.3. Aspects cliniques	16
1.1.2 <i>Hypothèses oncogénétiques, historique, structure spatiale et aspects histopathologiques.</i>	<i>17</i>
1.1.2.1. Hypothèses oncogénétiques et historique	17
1.1.2.2. Croissance tumorale et structure spatiale des gliomes infiltrants.....	19
1.1.2.3. Classification OMS 2007 des gliomes	20
1.1.2.4. Classification HSA des gliomes.....	24
1.1.2.5. Pronostic en fonction des diagnostics histopathologiques	26
1.1.3. <i>Données radiologiques et topographiques</i>	<i>28</i>
1.1.3.1. Imagerie des astrocytomes de grade II et des oligodendrogliomes de grade II	29
1.1.3.2. Imagerie des astrocytomes de grade III, des oligodendrogliomes de grade III et des glioblastomes	29
1.1.4. <i>Caractéristiques moléculaires.....</i>	<i>33</i>
1.1.4.1. Altération de la voie de p53.....	34
1.1.4.2. Altération de la voie Rb (rétinoblastome).....	35
1.1.4.3. Codélétion 1p et 19q.....	36
1.1.4.4. PTEN, MTOR et délétions 10p et 10q.....	36
1.1.4.5. Inactivation du gène MGMT	37
1.1.4.6. Mutations de IDH1 et IDH2	38
1.1.4.7. Rôle de l'EGFR	39
1.1.5. <i>Prise en charge et traitement.....</i>	<i>45</i>
1.1.5.1. Prise en charge actuelle recommandée et évolution.....	45
1.1.5.2. Les traitements expérimentaux	51
1.2. CARACTERISATION, CLASSIFICATION ET MARQUEURS DES GLIOMES	55
2. OBJECTIFS ET DEROULEMENT DU TRAVAIL.....	57
3. RÉSULTATS.....	59
3.1. PUBLICATION N°1: 1P19Q LOH PATTERNS AND EXPRESSION OF P53 AND OLIG2 IN GLIOMAS: RELATION WITH HISTOLOGICAL TYPES AND PROGNOSIS.....	59
3.1.1. <i>Synthèse</i>	<i>59</i>

3.1.2. Article	61
3.2. PUBLICATION N°2: ALPHA-INTERNEXIN EXPRESSION IN GLIOMAS: RELATIONSHIP WITH HISTOLOGICAL TYPE AND 1P, 19Q, 10P AND 10Q STATUS	72
3.2.1. Synthèse	72
3.2.2. Article	74
3.3. PUBLICATION N°3: DETERMINATION OF EGFR STATUS IN GLIOMAS: USEFULNESS OF IMMUNOHISTOCHEMISTRY AND FLUORESCENT IN SITU HYBRIDIZATION.....	84
3.3.1. Synthèse	84
3.3.2. Article	86
3.4. PUBLICATION N°4 : ADULT DIFFUSE GLIOMAS PRODUCE mRNA TRANSCRIPTS ENCODING EGFR ISOFORMS LACKING TYROSINE KINASE DOMAIN.....	94
3.4.1. Synthèse	94
3.4.2. Article	97
4. DISCUSSION ET PERSPECTIVES	109
4.1. MARQUEURS MOLECULAIRES DES GLIOMES	109
4.1.1. Marqueurs immunohistochimiques usuels : Ki67, Olig2, p53, Nestine	109
4.1.2. L'alpha-internexine.....	110
4.1.2. Les marqueurs génomiques et génétiques.....	111
4.1.2.1. Les délétions 1p et 19q, 10p, 10q	111
4.1.2.2 Amplification de l'EGFR	114
4.1.3. Type histologique et profil moléculaire	115
4.2. LES VARIANTS DE L'EGFR.....	117
4.3. PERSPECTIVES	117
4.3.1. Analyser nos résultats en fonction de la classification de l'Hôpital Sainte-Anne.....	117
4.3.2. IDH1 et 2	118
4.3. 3. Les variants de l'EGFR et ses isoformes : rôle et expression dans les autres tumeurs	118
5. CONCLUSION.....	121
6. ANNEXES	123
6.1. PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES DANS DES REVUES A COMITE DE LECTURE REFERENCEES	123
6.2. COMMUNICATIONS ORALES (CO) ET AFFICHÉE (CA)	125
7. BIBLIOGRAPHIE.....	127
TITRE: ETUDE DE MARQUEURS MOLECULAIRES ET DES VARIANTS DE L'EGFR DANS LES GLIOMES INFILTRANTS DE L'ADULTE	137

Résumé

Les difficultés de classification et les traitements décevants des gliomes infiltrants conduisent à rechercher des marqueurs diagnostiques, pronostiques et théranostiques. Dans notre travail, nous avons i) recherché les délétions 1p, 19q, 10p, 10q et une amplification de l'*EGFR*, et étudié l'expression de l'INA, ii) analysé l'expression génique et protéique de l'*EGFR*.

La délétion complète 1p19q est associée au phénotype oligodendrogial et à une survie plus longue alors que les pertes 10p et 10q sont liées au phénotype astrocytaire et à un pronostic défavorable. Une forte expression d'INA est un marqueur de bon pronostic, prédictif de la délétion 1p19q mais l'étude immunohistochimique ne permet de remplacer l'analyse génomique. La présence d'une amplification du gène de l'*EGFR* est un marqueur de malignité lié au type histologique et au grade (glioblastomes et astrocytomes de grade III) ainsi qu'à la présence du mutant vIII.

Par épissage alternatif, le gène de l'*EGFR* donne les transcrits variants v1, v2, v3, v4 qui codent pour les isoformes protéiques a, b, c et d. Nos résultats montrent que les profils d'expression des variants et des isoformes diffèrent selon le type histologique. Les glioblastomes ont des niveaux d'expression plus élevés des variants *EGFR*v3, -v4 et du mutant *EGFR*vIII que les autres types tumoraux.

Nous avons comme projets de corrélérer nos résultats à la présence ou l'absence des mutations *IDH1/2*, d'analyser l'expression génique et protéique de l'*EGFR* dans d'autres types tumoraux et de préciser le rôle des isoformes en utilisant des modèles expérimentaux de cultures cellulaires.

Abstract

Molecular markers and Variants of EGFR in Infiltrating Gliomas in Adults

Due to difficulties in classifying infiltrating gliomas and disappointing treatment results we looked for diagnostic, prognostic and theranostic markers. In our study we i) assessed 1p, 19q, 10p, and 10q deletions as well as EGFR amplification and studied INA expression and ii) analyzed EGFR gene and protein expression.

Complete 1p19q deletion was associated with an oligodendrocyte phenotype and longer survival while loss of 10p and 10q was linked to an astrocyte phenotype and poor prognosis. Strong INA expression was a marker of good prognosis and predictive of a 1P19q deletion but immunohistochemistry could not replace genetic analysis. Amplification of the EGFR gene was an indicator of malignancy correlated with histological type and grade (grade III glioblastomas and astrocytomas) as well as the vIII mutant.

Alternative splicing of the EGFR gene gave the transcript variants v1, v2, v3, v4 which coded for the protein isoforms a, b, c and d. Our data showed that expression profiles of transcript variants and isoforms differed according to histological type. Glioblastomas expressed higher levels of EGFRv3 and -v4 variants and the EGFRvIII mutant compared to other tumor types.

Our perspectives include correlating our results with the presence or absence of IDH1/2 mutations, analysis of EGFR gene and protein expression in other tumor types and to clarify the role of isoforms using experimental cell culture.

ABREVIATIONS

1p	: bras court du chromosome 1
10p	: bras court du chromosome 10
10q	: bras long du chromosome 10
19q	: bras long du chromosome 19
aa	: acides aminés
ADN	: Acide Désoxyribonucléique
AFIP	: <i>Armed Forces Institute of Pathology</i>
ARN	: Acide Ribonucléique
bFGF	: <i>basic fibroblast growth factor</i>
cdk	: <i>cycline dependant kinase</i>
CDK4	: complexe cycline D/CD4 kinase
CDKN2	: <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
CGH	: <i>hybridation génomique comparative</i>
Cip1	: cdk2 inhibiting protein
CTI	: cellules tumorales isolées
del	: délétion
DMTB1	: <i>deleted in malignant brain tumours 1</i>
dNTP	: désoxynucléotide triphosphate
EGF	: <i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	: <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
Ext-Ab	: anticorps dirigé contre le domaine extracellulaire de l'EGFR
FAK	: <i>Focal Adhesion Kinase</i>
FDA	: <i>Food and Drug Administration</i>
FISH	: Fluorescent <i>In Situ</i> Hybridization
GEC INCC	: Groupe d'Etudes Cliniques de l'Institut National du Cancer du Canada
GFAP	: <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
HB-EGF	: <i>heparin-binding EGF</i>
HER	: <i>Human Epithelial Receptor</i>
HPRT	: <i>hypoxanthine phosphoribosyl transferase</i>
HSA	: Hôpital Sainte-Anne
HSV	: virus Herpes simplex
IDH1	: <i>isocitrate deshydrogenase 1</i>
IDH2	: <i>isocitrate deshydrogenase 2</i>
INA	: Alpha-internexine
Int-Ab	: anticorps dirigé contre le domaine intracellulaire de l'EGFR
IRM	: Imagerie par Résonance Magnétique
kDa	: kiloDalton
LOH	: <i>lost of heterozygoty</i>
MAPK	: <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MDM2	: <i>Mouse Double Minute 2</i>
MGMT	: <i>MethylGuanine MethylTransferase</i>
MMAC1	: <i>Mutated in Multiple Advanced Cancers 1</i>
MTIC	: <i>5-(3-méthyl)-1-triazen-1-yl-imidazole-4-carboxamide</i>

mTOR	: <i>mammalian Target of Rapamycin</i>
nb	: nombre
NFP	: protéine neurofilamentaire
ng	: nanogramme
OERTC	: Organisation Européenne pour la Recherche et le Traitement du Cancer
OMS	: Organisation Mondial de la Santé
pb	: paires de bases
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCV	: procarbazine, CCNU [®] (lomustine), vincristine
PI3K	: <i>phosphatidyl inositol kinase</i>
PIP3	: <i>phosphoinositol triphosphate</i>
PTEN	: <i>Phosphatase and TENsin homolog on chromosome 10</i>
Rb	: rétinoblastome
SNC	: système nerveux central
SRCR	: <i>scavenger receptor cysteine-rich</i>
TGF α	: transforming growth factor α
TT	: tissu tumoral
VEGF	: <i>Vascular Epithelial Growth Factor</i>
VEGFR	: <i>Vascular Epithelial Growth Factor Receptor</i>
WAF1	: <i>Wild Type p53-activated fragment</i>

FIGURES et TABLEAUX

Figure 1 : Signes cliniques des tumeurs cérébrales selon la topographie tumorale d'après d'Andon <i>et al</i> , 2005 (7)	17
Figure 2 : Astrocytomes diffus de grade II de l'OMS.....	21
Figure 3 : Glioblastome de l'OMS	22
Figure 4 : Oligodendrogliomes de l'OMS.....	23
Tableau 1 : Ages de diagnostic, survie et complications en fonctions des diagnostics histopathologiques selon la classification OMS (5, 13).....	27
Figure 5 : Oligodendrogliome de grade II frontal gauche(24).	30
Figure 6 : Glioblastome temporal postérieur droit découvert à l'occasion d'une première crise d'épilepsie(24).....	31
Figure 7 : Oligodendrogliome de grade B temporo-occipital gauche(24).	32
Figure 8 : Principales altérations génétiques associées aux glioblastomes primaire et secondaire. D'après Kleihues <i>et al</i> (1999)(35); Ohgaki <i>et al</i> (2005) (31).	34
Figure 9 : Schéma récapitulatif des variants et des isoformes de l'EGFR.....	40
Figure 10 : Cartographie des différents variants et isoformes de l'EGFR	41
Figure 11 : Voie de signalisation de l'EGFR , Fortunato Ciardiello <i>et al</i> , 2008 (80).....	42
Figure 12 : Domaines protéiques détectés par les anticorps	95

Introduction

Les tumeurs intracrâniennes primitives les plus fréquentes de l'adulte sont les gliomes et les méningiomes qui représentent plus de 80% de l'ensemble. La prise en charge des patients atteints de gliomes reste difficile malgré les traitements utilisables (chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie), le pronostic reste extrêmement péjoratif. De plus, il existe des divergences de prise en charge, selon les centres, en partie à cause des difficultés rencontrées pour la classification histopathologique de ces tumeurs.

Le type d'une tumeur cérébrale est actuellement défini sur la reconnaissance de caractères morphologiques qu'ont les cellules tumorales comparativement aux cellules normales, par exemple des astrocytes, des oligodendrocytes, des neurones ou des épendymocytes. Pour chaque type histopathologique est ensuite déterminé un degré de malignité ou grade. Parmi les tumeurs primitives gliales (ou gliomes), on distingue les tumeurs avec ou sans composante infiltrante sous forme de cellules tumorales isolées. Les tumeurs avec composante infiltrante sont les astrocytomes, les oligodendrogliomes et les tumeurs mixtes oligoastrocytaires. Les tumeurs ne présentant pas de composante infiltrante sont les astrocytomes pilocytiques et les épendymomes. En France, deux classifications sont utilisées : la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et la classification de l'Hôpital Sainte-Anne (HSA).

A côté de ces données morphologiques, on peut disposer de données moléculaires, dont certaines ont un intérêt pronostique. Ainsi, les données de la littérature indiquent que les tumeurs à composante oligodendrogliale qui présentent une délétion du bras court du chromosome 1 (1p) et/ou du bras long du chromosome 19 (19q) sans amplification du gène de l'« Epidermal Growth Factor Receptor » (*EGFR*) bénéficieraient d'une survie prolongée. L'amplification du gène de l'*EGFR* s'observe dans 40 à 60% des glioblastomes selon les séries et dans 15 à 20 % des oligodendrogliomes et des astrocytomes de grade III de l'OMS. De nombreuses mutations peuvent être observées au niveau du gène *EGFR*. Dans les gliomes, la plupart des anomalies aboutissent à la formation d'un transcrite mutant appelé EGFRvIII. Il diffère du variant 1 de l'*EGFR* par une délétion intéressant les bases 273 à 1076 soit les exons 2 à 7. La forme mutante EGFRvIII s'observe dans des gliomes de haut grade et surtout dans 20 à 50% des glioblastomes. Elle pourrait être associée à l'amplification du gène *EGFR*. Le récepteur tronqué obtenu conserve son activité tyrosine kinase intracellulaire avec une activation constitutionnelle. Les tumeurs ne présentant pas ces délétions ou surexprimant

l'EGFR ont un mauvais pronostic et présentent une chimiorésistance au traitement utilisé PCV [procarbazine, CCNU (lomustine), vincristine] et/ou Témzolomide. De plus, il a été montré que des anticorps anti-EGFR ou des inhibiteurs de tyrosine kinase seraient susceptibles d'améliorer la survie dans les tumeurs surexprimant ce récepteur.

Par ailleurs, l'expression de l'Alpha-internexine (INA) s'observe dans les oligodendrogliomes ou dans les tumeurs avec pertes 1p et 19q alors qu'elle est absente ou faible dans les tumeurs astrocytaires ou mixtes et plus particulièrement dans les tumeurs avec perte 10q. Différents types de délétions 10p et 10q peuvent être observés.

Afin de rationaliser la prise en charge des malades atteints de gliomes, il est essentiel de déterminer des groupes homogènes de patients en tenant compte des données qui ont une influence sur le pronostic et le choix du traitement. Elles sont d'ordre clinique, radiologique, histopathologique et moléculaire.

Dans différentes séries de gliomes infiltrants, nous avons analysé les marqueurs moléculaires 1p, 19q, 10p, 10q, recherché la présence ou l'absence d'une amplification de l'*EGFR* et étudié l'expression de l'INA et d'Olig2. Les résultats obtenus ont été analysés comparativement avec les données cliniques, radiologiques, histologiques et immunohistochimiques.

Dans un deuxième temps, nous avons analysé l'expression de différents variants de l'*EGFR* dans ces tumeurs. En effet, le gène de l'*EGFR* est à l'origine par épissage alternatif de plusieurs transcrits (variants 1, 2, 3 et 4) qui codent pour plusieurs isoformes protéiques (a, b, c et d). Nous avons ainsi étudié l'expression génique des différents variants de l'EGFR et recherché la mutation EGFRvIII.

1. Généralités

L'approche neuro-oncologique des tumeurs du système nerveux central (SNC) chez les adultes et les enfants, est probablement l'un des exemples les plus clairs de collaboration multidisciplinaire dans le domaine médical (1, 2) .

Les tumeurs primitives du SNC représentent environ 2% de l'ensemble des cancers. Moins fréquentes que les tumeurs secondaires, elles ont une incidence globale de 18 cas pour 100000 habitants par an (3). Elles constituent la troisième cause de décès pour le groupe de 15 à 34 ans et représentent 20% de tous les cancers chez l'enfant.

Pour les adultes, les tumeurs primitives du SNC sont dans leur grande majorité (80%) des gliomes et méningiomes. Plus de la moitié sont des gliomes et 66% d'entre eux sont malins (4).

1.1. Les gliomes

1.1.1 Définition, incidence, aspects cliniques

1.1.1.1. Définition

Tumeurs primitives du système nerveux central, les gliomes constituent un ensemble hétérogène dans lequel chaque type tumoral correspond à l'une des cellules du tissu de soutien nerveux appelé glie. La glie se compose essentiellement d'astrocytes, d'oligodendrocytes et d'épendymocytes. Les gliomes regroupent principalement les astrocytomes et les oligodendrogliomes.

1.1.1.2. Incidence

Au cours de l'année 2000, 5299 cas de cancers cérébraux primitifs et 3168 décès dus à des tumeurs primitives du système nerveux central ont été recensés en France. Les gliomes sont les tumeurs primitives les plus fréquentes du système nerveux central (5) de l'adulte et les secondes après les leucémies chez l'enfant. En fait, ils correspondent à plus de la moitié des tumeurs primitives du système nerveux central quel que soit l'âge.

L'incidence des glioblastomes se situe entre 2,8 à 4,7 cas/an pour 100 000 habitants, et celle de l'ensemble des gliomes est de 5,1/100 000/an. L'incidence des gliomes est en augmentation régulière depuis plusieurs décennies. En fait, cette augmentation

s'observe surtout chez les sujets les plus âgés et pourrait être liée au vieillissement de la population.

1.1.1.3. Aspects cliniques

Les gliomes se distribuent selon l'âge. Ainsi, les astrocytomes de grade II et les oligodendrogliomes de grade A (6) s'observent chez l'adulte jeune. Les astrocytomes anaplasiques (grade III) et les oligodendrogliomes de grade B, c'est-à-dire les gliomes dits de haut grade, s'observent chez l'adulte d'âge moyen avec un pic de fréquence dans la cinquième décennie, alors que les glioblastomes surviennent chez l'adulte après l'âge de 50 ans avec un pic de fréquence dans la sixième décennie.

La symptomatologie clinique neurologique peut être très variable, en fonction de la localisation et de la dynamique de la croissance tumorale. Les trois grands syndromes révélateurs d'un gliome sont par ordre décroissant : une épilepsie symptomatique, un déficit neurologique, au sens large du terme et une hypertension intracrânienne. Il existe des corrélations entre la localisation, le grade histologique et les manifestations révélatrices de la maladie. La figure 1 résume les différents tableaux pouvant être rencontrés

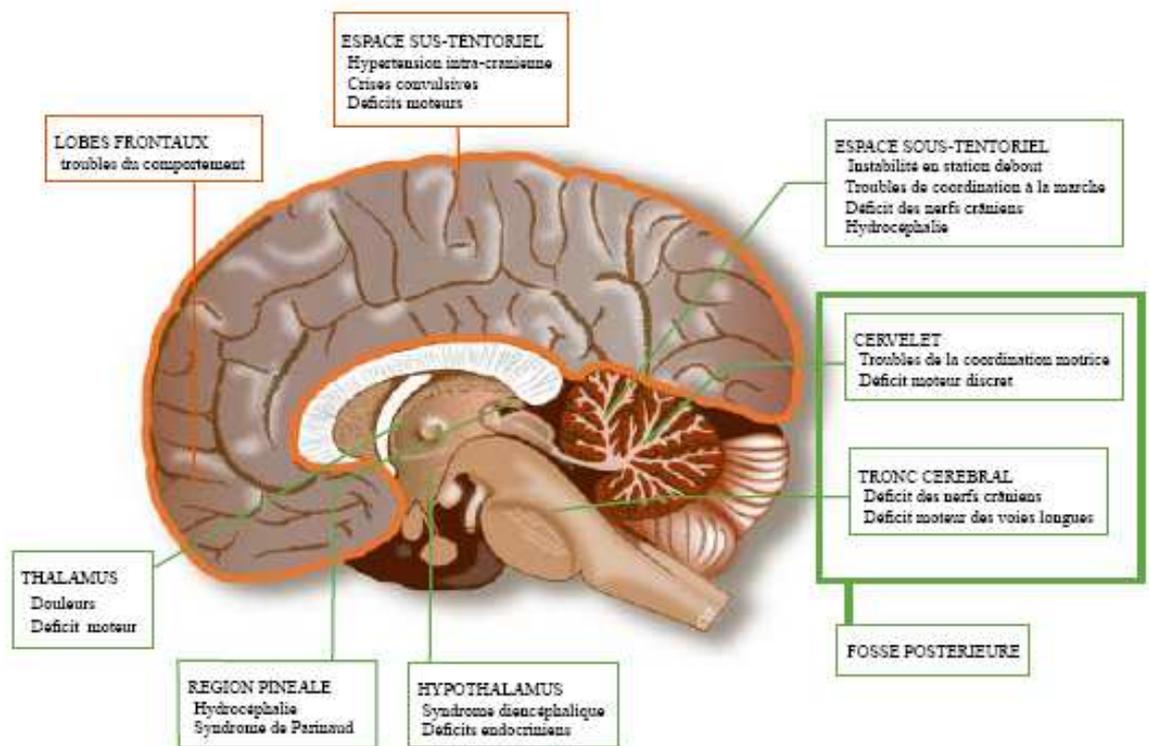


Figure 1 : Signes cliniques des tumeurs cérébrales selon la topographie tumorale d'après d'Andon *et al*, 2005 (7)

1.1.2 Hypothèses oncogénétiques, historique, structure spatiale et aspects histopathologiques.

1.1.2.1. Hypothèses oncogénétiques et historique

Deux hypothèses oncogénétiques sont proposées :

- La transformation de cellules différenciées : dans ce cas, seules les cellules matures transformées auraient la capacité de se diviser et de donner naissance à une tumeur. Néanmoins, cette théorie n'explique pas l'existence de tumeurs mixtes.
- La transformation de cellules souches ou progénitrices : ces cellules pluri ou multipotentes transformées pourraient être à l'origine de tumeurs formées de

différents types cytologiques ; cette hypothèse des cellules souches cancéreuses est celle qui est actuellement privilégiée.

Au cours des dernières années, plusieurs théories se sont succédées et ont servi de point de départ pour les classifications histologiques (8).

La première classification histologique des tumeurs cérébrales fut établie par Bailey et Cushing en 1926. Elle était fondée sur le principe de l'histogenèse et la théorie des restes embryonnaires. Selon ce principe, le développement des tumeurs s'effectuerait à partir de cellules embryonnaires arrêtées à différents stades de développement et susceptibles de se différencier. Bailey et Cushing classèrent les gliomes en fonction de leur similarité avec les différents stades de différenciation au cours de l'embryogenèse et décrivent ainsi quatre types de gliomes astrocytaires (glioblastome, spongioblastome polaire, astroblastome et astrocytome fibrillaire ou protoplasmique), ainsi qu'un type d'oligodendrogliome.

En 1949, Kernohan *et al* (9) supposèrent que les gliomes se développaient à partir de cellules adultes susceptibles de se dédifférencier et introduisirent la notion de « grading » histologique de malignité fondé sur la présence ou l'absence de critères d'anaplasie. L'absence de différence de survie dans le groupe constitué par les grades 1 et 2 aboutira au concept tenace de bas grade. Les mêmes constatations sont observées entre les grades 3 et les grades 4. Malgré le caractère obsolète de cette classification, le concept de bas grade et de haut grade sera conservé dans le langage médical. Il faut noter que les astrocytomes pilocytiques ne sont pas individualisés dans la classification de Kernohan.

En 1950, Ringertz (10, 11) définit trois grade de malignité en s'appuyant sur l'idée que la transformation des astrocytomes des oligodendrogliomes et des épendymomes en glioblastomes passaient par des formes intermédiaires.

En 1979, la première classification OMS établit un premier consensus en associant des éléments de la classification de Bailey et Cushing à celle de Kernohan. La classification OMS a depuis subi plusieurs révisions (1993, 2000, 2007), mais n'a pas sensiblement évolué : le type tumoral est défini en fonction du type cytologique prédominant et le grade en fonction des critères d'anaplasie. Les principales modifications ont concerné le cadre nosologique des glioblastomes. Classé en 1976 dans le cadre nosologique des tumeurs mal différenciées et embryonnaires, les glioblastomes ont intégré en 1993 le groupe des tumeurs astrocytaires et en 2007, la notion de glioblastome à composante oligodendrogliale a été retenue. La théorie actuelle selon laquelle les glioblastomes dériveraient de cellules souches neurales cancéreuses (12) représente en quelque sorte un retour à la théorie des restes embryonnaires et rend

compte des difficultés nosologiques rencontrées. Des données récentes de la biologie et de la génétique moléculaire sont venues compléter cette classification histologique dans la version 2000 (13), puis 2007 de l'OMS (5, 14). Bien que cette classification soit internationalement reconnue, elle présente un défaut majeur de reproductibilité qui entrave considérablement l'évaluation de l'efficacité des thérapeutiques.

Pour pallier ces problèmes, une autre classification a été proposée par Catherine Daumas-Duport, qui intègre les données de la clinique et de l'imagerie (15-17).

1.1.2.2 Croissance tumorale et structure spatiale des gliomes infiltrants

La croissance tumorale des gliomes se distingue de celle des autres tumeurs malignes. D'une part, une évolution métastatique est exceptionnelle, excepté dans le liquide céphalorachidien. D'autre part, l'extension tumorale se fait par infiltration du tissu cérébral par des cellules tumorales isolées. Cette infiltration induit une réaction du parenchyme cérébral qui présente une hyperplasie astrocytaire, appelée gliose cérébrale (18). Les travaux de Catherine Daumas-Duport (15) ont montré qu'il y a deux types de tissu tumoral : le tissu tumoral solide (TT) composé uniquement de cellules tumorales et le tissu formé de cellules tumorales infiltrantes (CTI). Les gliomes infiltrants peuvent être composés uniquement de CTI, et la densité de cellules tumorales est alors variable dans la tumeur, ou bien être constitué de TT avec une composante associée de CTI. Lorsqu'une tumeur présente une composante de TT, il s'y associe une néo-angiogenèse qui n'existe pas dans le contingent de CTI (15). Le micro-environnement des cellules tumorales, qui représente le stroma, est donc de nature différente dans les contingents de TT et de CTI.

Les glioblastomes sont toujours formés de TT et d'une composante de CTI. Les oligodendrogliomes, les astrocytomes ou les oligoastrocytomes peuvent aussi présenter une structure mixte, mais au moment du diagnostic clinique les deux tiers de ces tumeurs ne sont formées que de CTI. Les astrocytomes pilocytiques sont des tumeurs particulières qui ne sont constituées que de TT, sans composante de CTI associée.

Ces données ont deux conséquences. D'une part, elles permettent de comprendre et d'intégrer les données de l'imagerie :

- après injection de produit de contraste, la prise de contraste étant étroitement liée au degré d'édification vasculaire, la composante de TT se traduit sur le scanner ou l'imagerie par résonance magnétique (IRM) par une prise de contraste,

- la composante de CTI ne prend pas le contraste mais, par l'intermédiaire de l'œdème qui lui est généralement associé, elle se traduit par une hypodensité au scanner et en IRM par un hypersignal en T2 (ou par un hyposignal en T1).

D'autre part, la densité des cellules tumorales étant variable d'un type tumoral à l'autre, mais également au sein d'une même tumeur, l'interprétation des résultats de l'analyse moléculaire doit s'effectuer en fonction des données de l'examen histopathologique. C'est la confrontation histo-moléculaire.

1.1.2.3. Classification OMS 2007 des gliomes

Schématiquement trois groupes de gliomes peuvent être distingués en fonction de la différenciation des cellules tumorales :

- Les astrocytomes présentant des caractéristiques morphologiques et immunohistochimiques d'astrocytes,
- Les oligodendrogliomes, présentant celles des oligodendrocytes,
- Les tumeurs mixtes ou oligo-astrocytomes, ayant des caractéristiques des deux types cellulaires.

La classification OMS 2007 des gliomes (5, 14, 19) reconnaît sept types histologiques de gliomes astrocytaires subdivisés en différentes variantes histologiques. Elle définit également les oligodendrogliomes et les gliomes mixtes oligoastrocytaires qui peuvent être de grade II ou III.

Le grade des gliomes repose sur la présence de critères d'anaplasie : hyper-cellularité, polymorphisme cellulaire, atypies nucléaires, activité mitotique, mitoses atypiques, prolifération vasculaire et endothéliale, et nécrose. L'OMS définit le grade en fonction de la présence ou de l'absence de ces critères d'anaplasie pour chaque type histologique. Entre types histologiques différents, pour un même grade, les critères d'anaplasie sont variables.

1.1.2.3.1. Les gliomes astrocytaires

L'astrocytome pilocytique, tumeur de grade I par définition, s'observe typiquement chez l'enfant et l'adulte jeune au niveau de la fosse postérieure et de la ligne médiane. L'astrocytome pilocytique se caractérise par une architecture biphasique, avec des cellules bipolaires et des fibres de Rosenthal alternant avec des cellules rondes pseudo-oligodendrogliales formant des microkystes. La vascularisation est souvent anormale avec des

vaisseaux remaniés, télangectasiques et parfois une prolifération microvasculaire. Les mitoses sont rares mais peuvent être présentes. Si de la nécrose est présente, elle est de type ischémique. Les cellules bipolaires et les fibres de Rosenthal expriment typiquement la protéine gliofibrillaire acide des astrocytes (GFAP) alors que les cellules rondes expriment le facteur de transcription Olig2 (20).

La variante pilomyxoïde se caractérise par des cellules bipolaires se disposant le plus souvent en pseudorosettes périvasculaires dans une substance myxoïde dépourvue de fibre de Rosenthal ou de corps granuleux. Quelques mitoses peuvent être présentes. La prolifération analysée avec le marqueur Ki67 est plus élevée dans la variante pilomyxoïde que dans l'astrocytome pilocytique classique, atteignant dans certains cas 7 à 10 %.

L'astrocytome diffus (Figure 2) de grade II est défini par une cellularité augmentée par rapport à la substance blanche normale, par des atypies cytonucléaires et par la présence d'une mitose au maximum pour 10 champs au grossissement X400. Il n'y a pas de nécrose ni de prolifération endothéliale. L'aspect des cellules, permet de distinguer les sous types fibrillaire (Figure 2b), protoplasmique ou gémistocytique (Figure 2c).

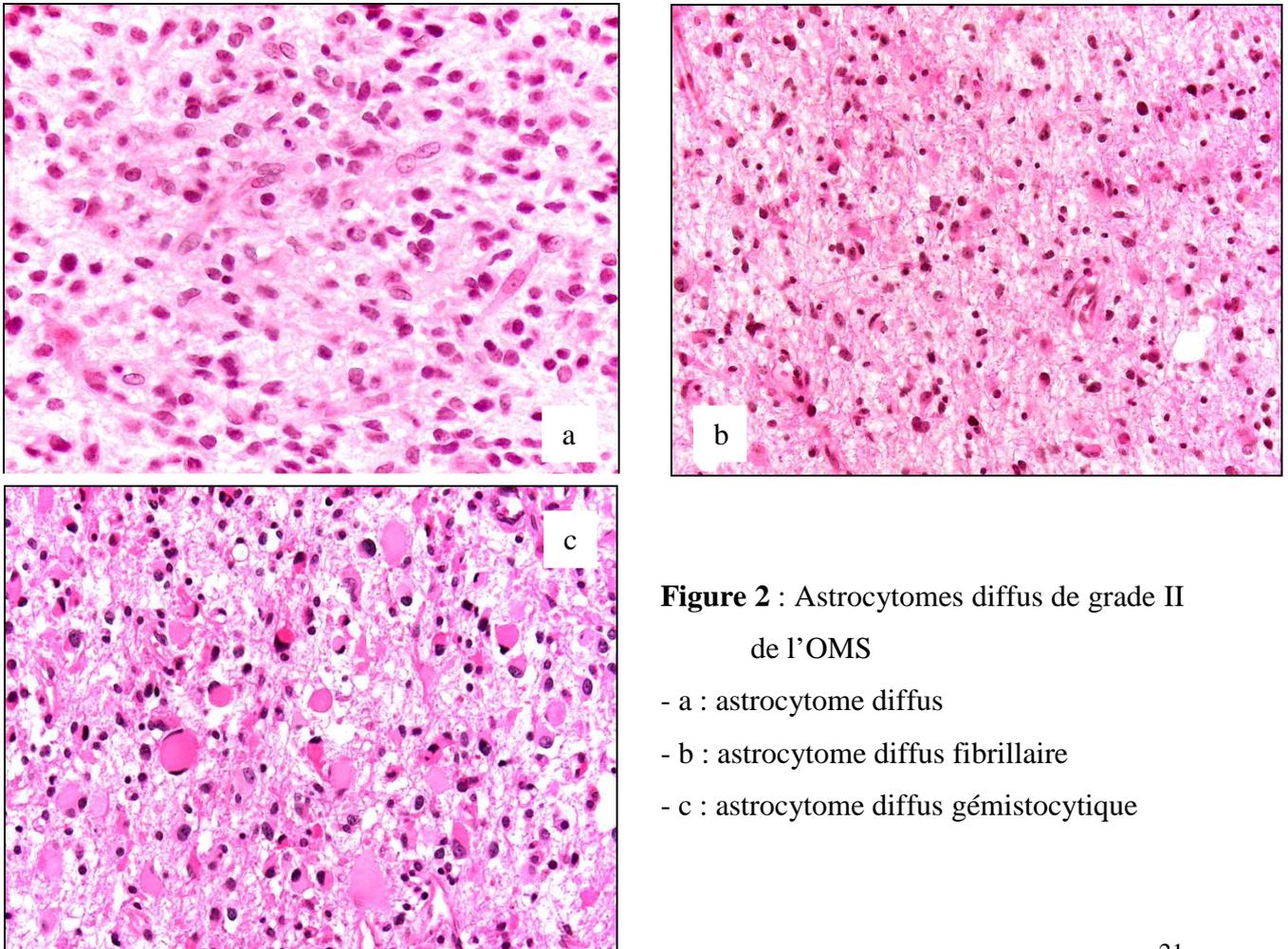


Figure 2 : Astrocytomes diffus de grade II de l'OMS

- a : astrocytome diffus
- b : astrocytome diffus fibrillaire
- c : astrocytome diffus gémistocytique

L'astrocytome anaplasique de grade III se caractérise par une densité cellulaire nettement plus importante, des atypies nucléaires marquées et des mitoses.

La présence de nécrose et d'une prolifération microvasculaire caractérise les glioblastomes (grade IV) (Figure 3). La nécrose tumorale est de type ischémique avec des palissades cellulaires périnécrotiques (Figure 3a). Elle peut être très étendue. Dans sa version 2007, l'OMS distingue les glioblastomes à petites cellules qui se caractérisent par un monomorphisme, une activité mitotique intense et une faible expression de la GFAP et les glioblastomes à composante oligodendrogliale (Figure 3c) qui comportent des territoires typiquement oligodendrogliaux.

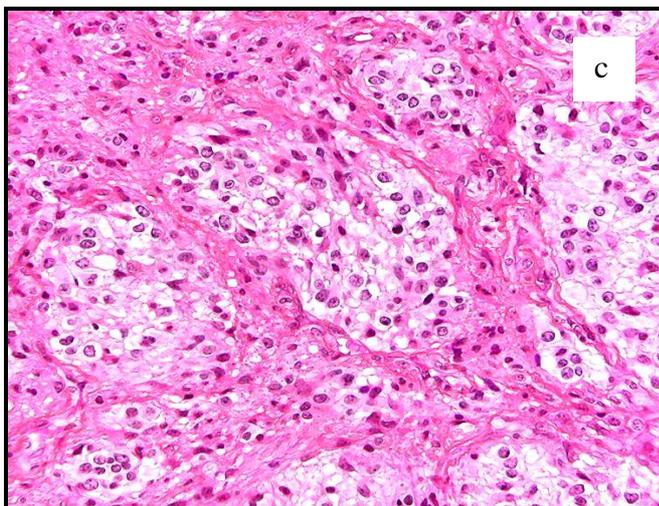
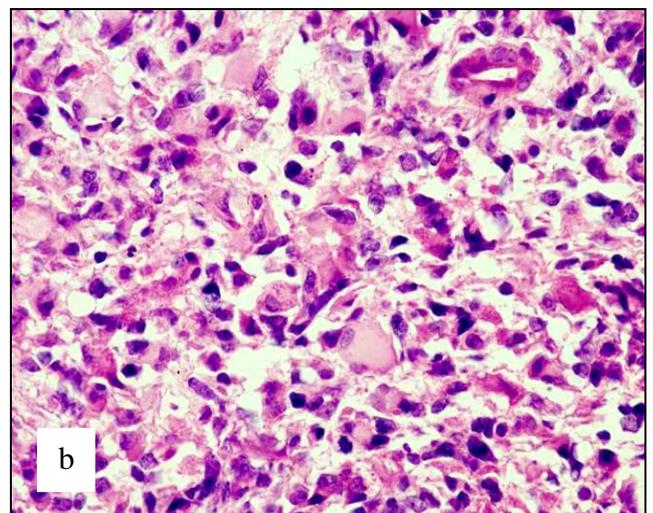
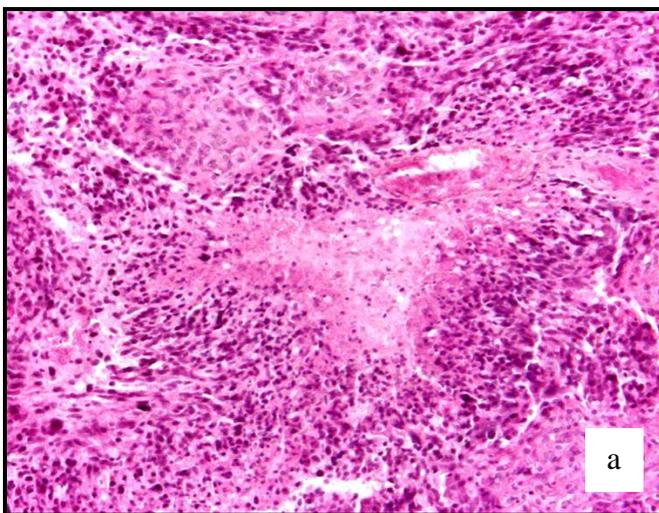


Figure 3 : Glioblastome de l'OMS

- a : glioblastome avec nécrose en carte de géographie et palissades cellulaires périnécrotiques
- b : atypies cytonucléaires marquées
- c : glioblastome à composante oligodendrogliale

1.1.2.3.2. Les oligodendrogliomes

Les oligodendrogliomes (Figure 4) sont classés en grade II ou III. Ils sont composés de cellules arrondies à noyaux réguliers, avec des cytoplasmes clarifiés formant un aspect caractéristique dit en « nid d'abeille » (figure 4a). Ils comportent généralement des zones microkystiques, des calcifications (figure 4b) et leur vascularisation est représentée par un réseau dense de capillaires fins et ramifiés.

Les oligodendrogliomes de grade II ne sont composés que de CTI monomorphes dont la densité est faible (Figure 4c). Des atypies nucléaires et des mitoses occasionnelles peuvent être observées.

Les oligodendrogliomes anaplasiques de grade III se composent généralement de CTI et de TT. Les cellules tumorales conservent des caractères oligodendrogliaux mais peuvent montrer des variations morphologiques. Les oligodendrocytes gliofibrillaires ou minigémistocytiques sont fréquents. La vascularisation est caractéristique : elle se compose de petits capillaires ramifiés avec un aspect endocrinoïde. Les oligodendrogliomes de grade III peuvent présenter des zones de nécrose.

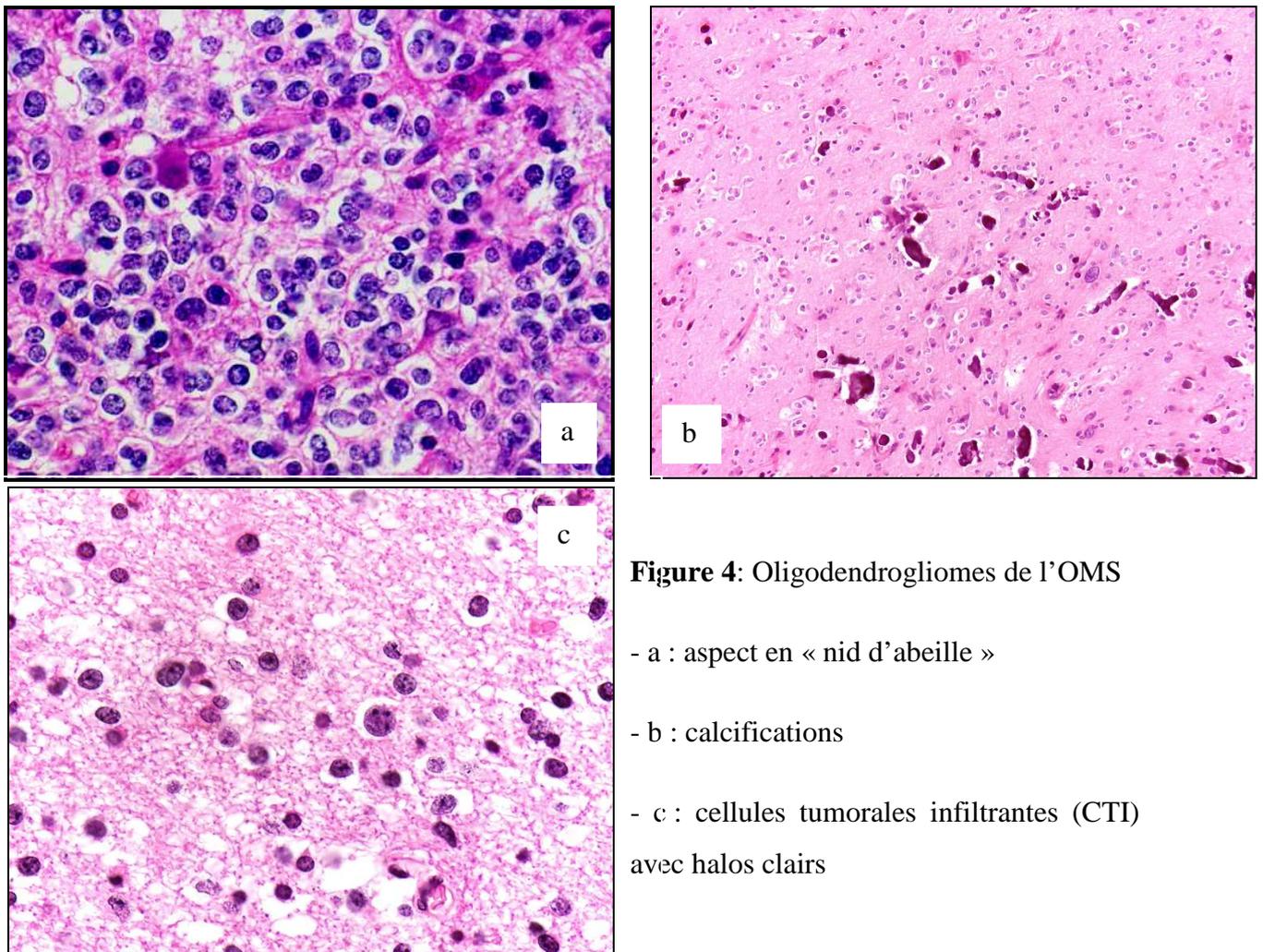


Figure 4: Oligodendrogliomes de l'OMS

- a : aspect en « nid d'abeille »
- b : calcifications
- c : cellules tumorales infiltrantes (CTI) avec halos clairs

1.1.2.3.3. Les gliomes mixtes oligo-astrocytaires

Les auteurs de l'AFIP (Armed Forces Institute of Pathology) (21) soulignent que la plupart des astrocytomes et des oligodendrogliomes sont phénotypiquement mixtes ou hybrides par rapport à leur composition cytologique. Les termes de gliomes mixtes et d'oligoastrocytomes sont utilisés pour définir des tumeurs avec tous les degrés de différenciation astrocytaire, oligodendrogliale ou bien lorsque les cellules ont une morphologie hybride oligoastrocytaire. Plus rarement des tumeurs peuvent être constituées de deux populations distinctes histologiquement et géographiquement présentant des caractères oligodendrogliaux ou astrocytaires.

1.1.2.4. Classification HSA des gliomes

Cette classification résulte pour l'essentiel, de l'étude de biopsies étagées stéréotaxiques corrélées à l'imagerie (22). Ces travaux ont permis de définir la structure spatiale des gliomes et de préciser leur mode de croissance. Elle intègre de plus les données cliniques et l'imagerie à l'histologie traditionnelle. Cette classification distingue ainsi quatre classes de gliomes : les oligodendrogliomes et oligoastrocytomes de grade A, les oligodendrogliomes et oligoastrocytomes de grade B, les glioblastomes et les tumeurs glioneurales malignes (15, 23). Dans cette classification, l'aspect astrocytaire, fibrillaire ou protoplasmique est rattaché à la présence d'une gliose astrocytaire réactionnelle et/ou au stroma.

1.1.2.4.1. Critères histologiques, radiologiques et grades des oligodendrogliomes et des oligoastrocytomes

Dans les oligodendrogliomes purement infiltrants (15-17), le cytoplasme des cellules tumorales n'est habituellement pas visualisé par les colorations usuelles. Ces tumeurs ne peuvent donc être identifiées que par leurs caractéristiques nucléaires. Des étalements réalisés à partir de ce type de tumeurs permettent d'observer aisément que les cellules présentent un aspect de « noyau nu », typiquement rond, à limite nucléaire bien contrastée. La présence d'amas chromatiniens donne à cette population un aspect typique en « bouton de chemise » (Figure 4c). Ces cellules à petits noyaux sombres, sont associées en proportion variable à des éléments d'aspect moins caractéristiques, à noyaux clairs nucléolés plus volumineux. De ce fait, la population tumorale présente une nette anisonucléose. De plus, au niveau du cortex, un

halo clair périnucléaire est parfois visible et les oligodendrocytes tumoraux tendent à former une satellitose périneuronale. L'intégration des données de l'imagerie facilite le diagnostic d'oligodendrogliome : seules les formes purement infiltrantes d'oligodendrogliomes ne prennent pas le contraste.

Les oligodendrogliomes de structure mixte solide et infiltrante (15-17) sont facilement identifiés grâce à la composante de TT qui prend un aspect typique de nid d'abeille et s'associe à une néovascularisation. En imagerie, ces tumeurs présentent un aspect hétérogène. La composante de TT se traduit par une prise de contraste d'intensité variable.

L'évaluation du degré de malignité des oligodendrogliomes repose sur la présence ou l'absence de deux critères :

- hyperplasie des cellules endothéliales (ou microangiogenèse) sur l'analyse histopathologique
- prise de contraste à l'imagerie.

Deux grades de malignité sont ainsi définis :

- le grade A caractérisé par l'absence d'hyperplasie endothéliale et de prise de contraste
- le grade B qui comporte une hyperplasie endothéliale et/ou une prise de contraste.

L'identification d'une néoangiogenèse est l'élément clé de ce grading. Elle repose sur l'analyse des données radiologiques et histologiques.

Pour les oligoastrocytomes (15-17), la composante oligodendrogliale est associée à une composante astrocytaire ne pouvant être interprétée avec certitude comme une gliose réactive. La composante astrocytaire est le plus souvent polymorphe. L'évaluation du degré de malignité de ces tumeurs s'effectue selon les mêmes critères que les oligodendrogliomes (15).

1.1.2.4.2. Le glioblastome

La définition du glioblastome dans la classification HSA est plus restrictive que dans celle de l'OMS. Elle s'applique aux gliomes de haut grade dépourvus de différenciation oligodendrogliale évidente, présentant une structure mixte solide et infiltrante et une angiogenèse se traduisant par une prise de contraste en anneau sur l'imagerie cérébrale

(scanner et/ou IRM). Les tumeurs présentant une différenciation oligodendrogliale sont classées en oligodendrogliomes de grade B.

Pour les glioblastomes, la présence d'une différenciation astrocytaire (GFAP positive le plus souvent), même partielle est nécessaire au diagnostic, ainsi que la présence d'atypies cytonucléaires, de mitoses et de nécrose. Ces tumeurs fortement angiogéniques comportent toujours une riche vascularisation faite de gros vaisseaux souvent thrombosés ainsi que d'une prolifération microvasculaire. La composante de CTI est toujours formée d'éléments indifférenciés GFAP négatifs.

1.1.2.4.3. Les tumeurs glioneurales malignes

Ce sont des tumeurs à composante charnue, essentiellement corticale et qui peuvent être confondues avec des glioblastomes (23). Le diagnostic différentiel est possible devant la présence de cellules tumorales d'aspect non neuronal exprimant la protéine neurofilamentaire (NFP).

1.1.2.5. Pronostic en fonction des diagnostics histopathologiques

Le type histologique et le grade (et de fait le caractère infiltrant ou non) constituent des facteurs essentiels du pronostic.

Dans la classification OMS, pour les gliomes infiltrants, la médiane de survie avant l'âge de 40 ans est de 31,7 mois alors qu'elle n'est que de 8,4 mois après l'âge de 60 ans. La survie varie également en fonction des diagnostics histopathologiques et des grades (Tableau 1) (5). L'évolution fatale de ces tumeurs est le plus souvent due à des récives. Les astrocytomes diffus et anaplasiques se transforment fréquemment en glioblastomes.

Dans la classification HSA, pour les glioblastomes et les astrocytomes pilocytiques, la survie est comparable à celle observée dans la classification de l'OMS. Pour les autres types tumoraux, le grade A est associé à une survie globale de 11 ans et le grade B est associé à une survie globale de 3,5 ans.

		âges lors du diagnostic	survie avec traitement	complications évolutives
Tumeurs astrocytaires	astrocytome pilocytique (grade I)	enfants, inférieur à 20 ans	supérieur à 15 ans	récidives
	astrocytome diffus (grade II)	adulte jeune, avec un pic de fréquence entre 30 et 40 ans	6 à 8 ans	progression en glioblastome après 4 à 5 ans d'évolution
	astrocytome anaplasique (grade III)	45 ans	2 à 3 ans	progression en glioblastome après 2 ans d'évolution
	glioblastomes (grade IV)	tout âge, avec un pic de fréquence entre 45 et 75 ans	inférieur à 1 an (20% à un an)	récidives
Tumeurs oligodendrogiales	oligodendrogliome diffus (grade II)	adulte, avec un pic de fréquence entre 40 et 45 ans	supérieur à 10 ans (51% à 10 ans)	récidives
	oligodendrogliome anaplasique (grade III)	adulte, avec un pic de fréquence entre 45 et 50 ans	2 à 3 ans	récidives
	oligoastrocytome diffus (grade II)	adulte, avec un pic de fréquence entre 35 et 45 ans	6,3 ans (58% à 5 ans et 32% à 10 ans)	récidives
	oligoastrocytomes anaplasiques (grade III)	adulte, avec un pic de fréquence entre 50 et 60 ans	2,8 ans (36% à 5 ans et 9% à 10 ans)	récidives

Tableau 1 : Ages de diagnostic, survie et complications en fonctions des diagnostics histopathologiques selon la classification OMS (5, 13)

1.1.3. Données radiologiques et topographiques

Selon Jean-Louis Dietemann (24), l'imagerie a comme premier objectif la détection la plus précoce du processus tumoral devant les premiers symptômes cliniques. Le deuxième objectif est de préciser la topographie de la lésion et d'établir la corrélation entre le tableau clinique et les données de l'imagerie. Le troisième objectif est de définir la nature tumorale de la lésion. Le quatrième objectif est d'apporter des informations topographiques, morphologiques, métaboliques et fonctionnelles utiles à la décision thérapeutique et à la surveillance du processus tumoral.

La scannographie reste souvent la première étape du diagnostic. Devant une première crise d'épilepsie, la sensibilité de la scannographie est de plus de 90% pour le dépistage d'une étiologie tumorale. La sensibilité diminue nettement en cas de processus expansif développé au niveau de la fosse postérieure. L'IRM offre une sensibilité proche de 100% pour le dépistage des tumeurs cérébrales symptomatiques.

La localisation hémisphérique correspond à la moitié des tumeurs cérébrales primitives. Les gliomes du tronc cérébral représentent 10 à 20% des tumeurs intracrâniennes primitives de l'enfant. Ils sont rares chez l'adulte.

Radiologiquement, il est classique de distinguer les tumeurs gliales de grade II de l'OMS ou de grade A de l'HSA et celles de grade III ou IV de l'OMS ou de grade B de l'HSA en fonction de la présence ou non d'une prise de contraste. Par définition, les oligodendrogliomes de grade A selon la classification HSA ne prennent pas le contraste à l'inverse des tumeurs de grade B.

La localisation hémisphérique correspond à la moitié des tumeurs cérébrales primitives. Les gliomes infiltrants se localisent au niveau des lobes frontaux, temporaux et insulaires, avec parfois des tumeurs s'étendant dans ces trois lobes, et plus rarement au niveau des lobes pariétaux et occipitaux. Les gliomes multifocaux sont peu fréquents : 2 à 10% des gliomes (25, 26) avec une augmentation au cours des récurrences (26). Il s'agit alors le plus souvent de tumeurs de haut grade.

Les gliomes du tronc cérébral représentent 10 à 20% des tumeurs intracrâniennes primitives de l'enfant. Ils sont rares chez l'adulte. Ils correspondent à des astrocytomes pilocytiques chez l'enfant et des astrocytomes fibrillaires, des oligodendrogliomes le plus souvent de haut grade et des glioblastomes chez l'adulte.

1.1.3.1. Imagerie des astrocytomes de grade II et des oligodendrogliomes de grade II

La scannographie montre une lésion corticale et sous corticale hypodense faiblement hétérogène, exceptionnellement isodense aux contours souvent nets, non rehaussée après injection de produit de contraste. Des calcifications sont souvent notées dans les oligodendrogliomes. Les formations kystiques sont rares.

L'IRM montre une lésion qui élargit une ou plusieurs circonvolutions cérébrales, qui apparaît hypointense en T1, hyperintense en T2 et en FLAIR et qui ne se rehausse pas après injection de produit de contraste. L'œdème péri lésionnel est absent ou modéré. L'identification de calcifications tumorales est délicate en T1 et en T2 ; seul le T2 peut démontrer de manière inconstante des foyers hypointenses au sein de la tumeur (Figure 5).

L'IRM est l'outil de choix pour assurer la surveillance de ces gliomes. L'apparition d'une prise de contraste traduit un changement de grade, ce qui incite à modifier la prise en charge thérapeutique.

1.1.3.2. Imagerie des astrocytomes de grade III, des oligodendrogliomes de grade III et des glioblastomes

La scannographie montre une lésion hypodense et hétérogène aux contours irréguliers avec une prise de contraste hétérogène. La présence d'une prise de contraste annulaire et de nécrose matérialisée par une plage hypodense, oriente vers un glioblastome (Figure 6). Des calcifications peuvent être identifiées (Figures 7) et sont classiquement évocatrices d'un oligodendrogliome. Un effet de masse marqué et une extension controlatérale sont souvent notés.

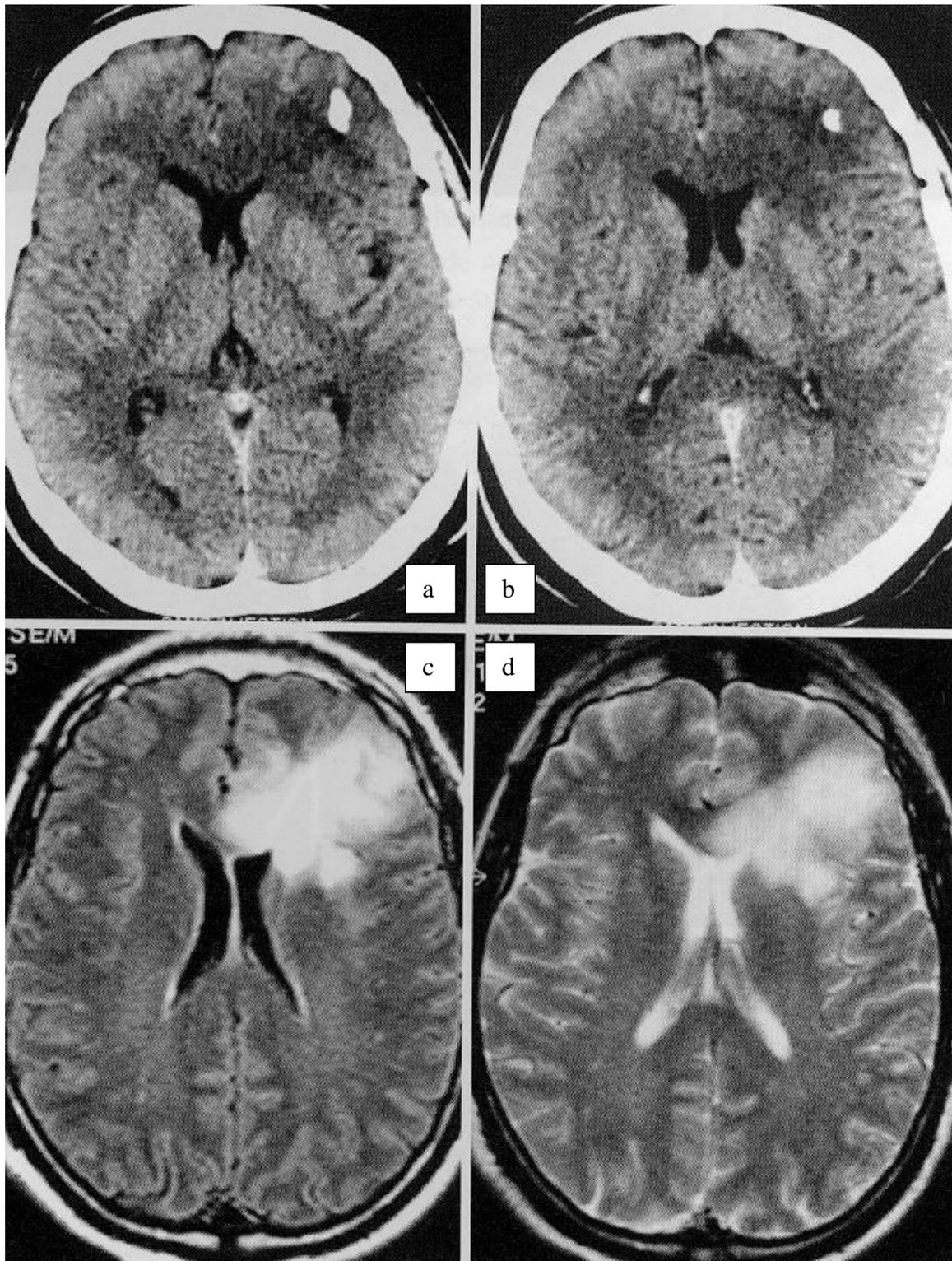


Figure 5 : Oligodendrogliome de grade II frontal gauche(24).

Les coupes scannographiques après injection (a, b) montrent un discret effet de masse sur la corne frontale gauche qui est comprimée et refoulée vers l'arrière. Il existe une hypodensité frontale gauche corticale et surtout sous corticale associée à une hypodensité de type calcique. L'IRM en coupe axiale en FLAIR (c) et en T2 (d) confirme l'effet de masse et l'existence d'un signal anormal hyperintense cortical et sous cortical au niveau frontal gauche. L'IRM n'identifie pas de manière formelle les calcifications tumorales (24).

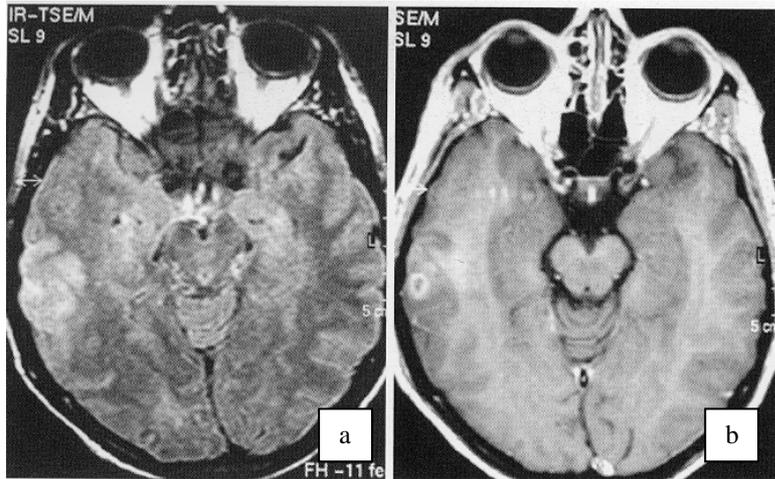


Figure 6 : Glioblastome temporal postérieur droit découvert à l’occasion d’une première crise d’épilepsie(24).

L’IRM en FLAIR (a) note un signal hyperintense au niveau cortical et sous cortical en temporal postérieur droit. En T1 après injection de gadolinium (b), une petite prise de contraste annulaire infracentrique est visualisée au niveau du cortex temporal postérieur droit (24).

L’IRM met en évidence une lésion de signal hétérogène lié à la présence de foyers nécrotiques et de formations pseudo-kystiques, aux contours irréguliers. Elle est de signal hypointense en T1, hyperintense en T2 et en FLAIR, avec un œdème et un effet de masse marqué, parfois une extension controlatérale et un rehaussement hétérogène nodulaire et/ou annulaire après injection de produit de contraste (Figure 7). L’intensité de la prise de contraste est liée à la densité de la microvascularisation tumorale. Un signal hyperintense intermédiaire évoque radiologiquement un œdème périlésionnel. Il correspond en réalité à des zones de tumeur infiltrante sous forme de CTI.

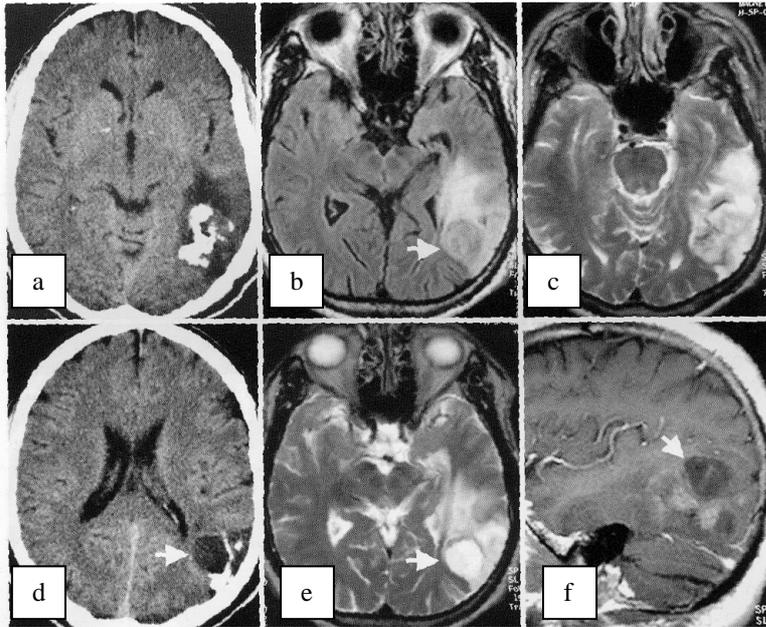


Figure 7 : Oligodendrogliome de grade B temporo-occipital gauche(24).

L'examen scannographique réalisé après injection de produit de contraste (a, b) montre une lésion temporale postérieure gauche (flèches) qui présente des composantes calcifiées spontanément hyperdenses et des composantes hypodenses. L'IRM en coupes axiales en FLAIR (c) et en T (d,e) et sagittale en T1 après injection de gadolinium (f) confirme le processus tumoral avec effet de massesur le carrefour ventriculaire. Cette lésion présente un signal essentiellement hyperintense en FLAIR et T2 ; ce signal apparaît très hétérogène. Quelques rares foyers hypointenses sont identifiés en T2 et correspondent probablement aux calcifications (24).

L'imagerie prend ainsi une place importante dans la prise en charge des gliomes. Elle précise la localisation, la taille, la présence ou l'absence de nécrose et apporte des informations essentielles sur la vascularisation tumorale. La confrontation des données histopathologiques et radiologiques est une étape fondamentale du diagnostic des tumeurs cérébrales. Cette confrontation permet, entre autre, d'analyser la représentativité de prélèvements biopsiques soumis à l'examen microscopique ou bien de rechercher la présence d'une néovascularisation ou de nécrose qui n'aurait pas été intéressé par les prélèvements. En quelque sorte, elle remplace l'étude macroscopique.

1.1.4. Caractéristiques moléculaires

De nombreux travaux ont été menés au cours des deux dernières décades afin de caractériser les altérations génétiques présentes dans les gliomes et une première classification moléculaire de ces tumeurs a été proposée (27-30). L'ensemble de ces travaux vise à associer des anomalies moléculaires avec le diagnostic histopathologique de l'OMS.

Les altérations géniques majeures rencontrées dans les gliomes activent certaines voies de transduction du signal ou entraînent une dérégulation du cycle cellulaire. Elles consistent essentiellement en la surexpression de facteurs de croissance, des mutations « gain de fonction » des récepteurs à activité tyrosine kinase et des mutations « perte de fonction » de gènes suppresseurs de tumeurs. Parmi ces altérations, celles qui concernent l'*EGFR* sont notables.

Dans les gliomes, les premières altérations génétiques clairement impliquées dans la tumorigenèse de ces tumeurs étaient l'amplification de l'oncogène *EGFR* et les pertes du chromosome 10. Des gènes suppresseurs de tumeurs (*p53*, *Rb*, *p16/CDKN2*, *PTEN/MMAC1*) et des oncogènes (*MDM2* et *CDK4*) ont été identifiés comme étant fréquemment altérés dans les gliomes (31-34). La présence des différentes altérations et leurs conséquences, en particulier sur le cycle cellulaire et la transduction du signal, mais aussi sur les processus d'apoptose, d'angiogenèse et d'invasion tumorale, est aujourd'hui mieux comprise.

La confrontation des données moléculaires a révélé qu'au sein d'une même tumeur, ces altérations n'intervenaient pas de manière aléatoire mais s'associaient selon une certaine cohérence. Des travaux visant à combiner les paramètres histo-moléculaires ont permis d'émettre des hypothèses sur l'existence de « voies moléculaires de progression tumorale » spécifiques à certains sous-groupes de gliomes et sur la chronologie de survenue de certaines altérations dans la progression tumorale (31, 35) (Figure 8). Ainsi, les mutations du gène *p53* codant pour la protéine p53 qui surviennent à un stade précoce semblent préférentiellement être associées aux tumeurs astrocytaires caractérisées par une évolution progressive vers la malignité (astrocytomes grade II, astrocytomes anaplasiques, glioblastomes dits secondaires) alors que l'amplification de l'*EGFR* paraît être associée aux glioblastomes *de novo*. D'autres altérations comme les délétions des chromosomes 1p et 19q sont en revanche fréquemment associées aux tumeurs d'origine oligodendrocytaire.

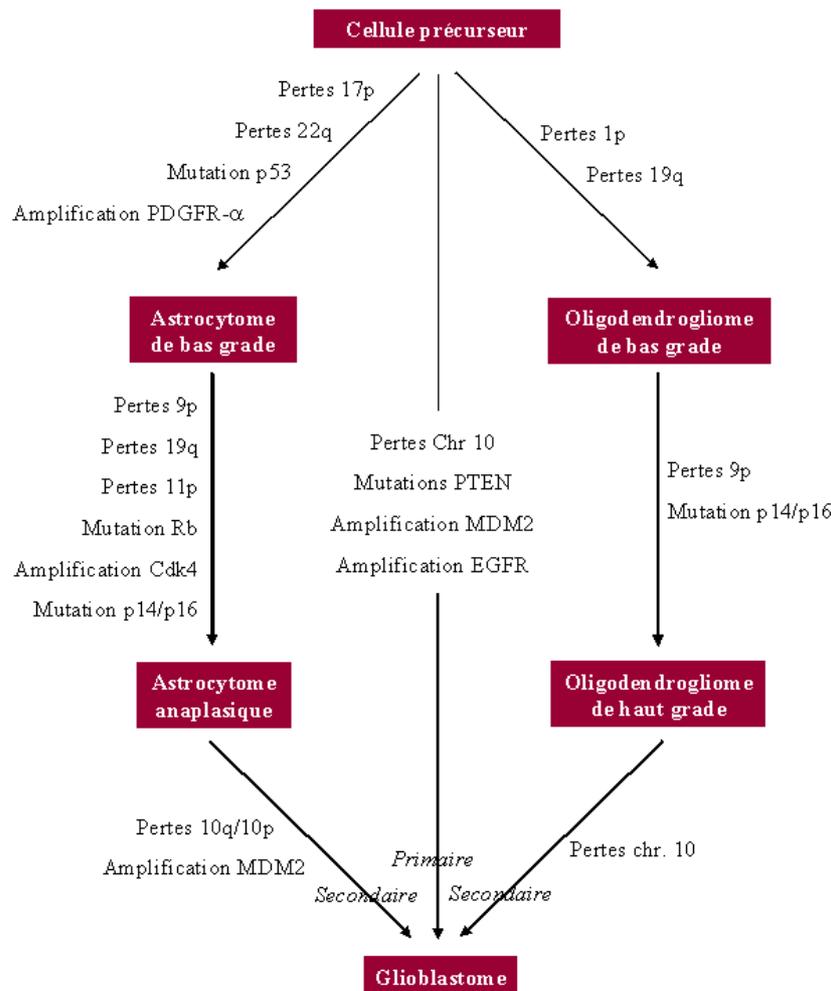


Figure 8 : Principales altérations génétiques associées aux glioblastomes primaire et secondaire. D’après Kleihues *et al* (1999)(35); Ohgaki *et al* (2005) (31).

1.1.4.1. Altération de la voie de p53

Le gène *p53* est situé en position 17p13.1. Il code pour une phosphoprotéine de 393 aa qui est présente en très petite quantité dans les cellules normales, mais en abondance dans les cellules transformées en culture ou dans les tumeurs humaines. Lors d'une agression cellulaire, la concentration et la demi-vie de *p53* s'accroissent par une diminution de sa dégradation. Deux rôles particuliers sont dévolus à cette protéine : soit l'arrêt du cycle cellulaire entre la phase G1 et la phase S, soit la mort cellulaire par un phénomène d'apoptose. La protéine *p53* se lie avec une séquence spécifique de l'ADN (c'est donc un

facteur de transcription) aboutissant à une interaction avec le cycle cellulaire par l'intermédiaire d'un gène appelé WAF1 / Cip1 (*Wild Type p53-activated fragment /cdk2 inhibiting protein*). La cellule s'arrête avant la phase S et peut réparer d'éventuels dommages. Dans d'autres cellules, l'augmentation de la protéine p53 induite par l'irradiation provoque l'induction de l'apoptose.

Dans les glioblastomes, la voie de transduction du signal dépendante de p53 est altérée par des mutations du gène *p53* (31, 35, 36). 90% des mutations du gène *p53* sont des mutations de type faux sens. Plus de 12 000 mutations dans 50 types de cancers différents ont été décrites. 90% se regroupent dans la région centrale du gène *p53* et correspondent souvent à la transition G:C-> A:T dans un dinucléotide CpG. Les mutations inactiveraient la fonction de régulateur négatif de la prolifération cellulaire (37). Lorsque le gène *p53* est muté, la dégradation de la protéine est diminuée, ce qui conduit à son accumulation pouvant être détectée en immunohistochimie.

La voie de p53 peut également être altérée à la suite d'une atteinte d'autres gènes qui codent pour des protéines impliquées dans le contrôle des niveaux cellulaires de p53, notamment p14^{ARF} et MDM2 (*mouse double minute 2*). La protéine p14^{ARF} contrôle l'activité de MDM2 qui elle, régule l'expression de p53. La perte des deux copies du gène de p14^{ARF} ou l'amplification/surexpression de *MDM2* conduit à une rapidement à une déplétion en protéine p53 (38). La majorité des glioblastomes présente une perte de p53, une absence de p14^{ARF} ou une surexpression de MDM2 (39). Les mutations de *p53* sont moins fréquentes dans les glioblastomes primaires (environ 30%) alors que dans les glioblastomes secondaires, elles présentent une incidence supérieure à 65% (31, 40).

1.1.4.2. Altération de la voie Rb (rétinoblastome)

Dans plus de 90% des glioblastomes, se retrouve une anomalie de l'un des acteurs impliqués dans la voie du rétinoblastome (Rb) (41). Il peut s'agir de la perte d'expression de p16, un inhibiteur des cdk (cycline dépendant kinase), de la surexpression de CDK4 (complexe cycline D/CD4 kinase) (42), ou de mutations du gène de la protéine Rb.

La protéine p16 est codée par le gène *CDKN2A*, un gène suppresseur de tumeur. Il est situé sur le chromosome 9p21. La protéine p16 qui inhibe CDK4 empêchant ainsi la phosphorylation de Rb et bloque donc le cycle cellulaire en G1. L'inactivation de p16 est liée le plus souvent dans les gliomes astrocytaires à une délétion homozygote du gène *CDKN2A*.

Une telle inactivation s'observe dans un tiers à deux tiers des glioblastomes (42-44). Plus rarement, l'inactivation de p16 est liée à des mutations ponctuelles (44, 45) ou à la méthylation des îlots CpG du promoteur du gène (46, 47). La délétion du gène suppresseur de tumeur p16/CDKN2a peut être associée à la perte d'hétérozygotie du chromosome 10q ou à l'amplification de l'EGFR mais serait exclusive avec les délétions 1p et 19q (48).

1.1.4.3. Codélétion 1p et 19q

Certains travaux indiquent que les tumeurs à composante oligodendrogliale qui présentent une délétion 1p, plus précisément en 1p36.23 sur 150kb (49) et du bras long du chromosome 19 (19q13) sans amplification du gène de l'EGFR situé sur le chromosome 7 (7p12) bénéficieraient d'une survie prolongée (32-34, 50-52).

D'après certaines études, la perte combinée 1p et 19q est en fait due à une translocation déséquilibrée t(1;19)(q10;p10), qui conduit à la perte du matériel génétique concerné (53, 54). Elle est retrouvée dans plus de 80% des oligodendrogliomes selon les séries (5). La codélétion, perte combinée de 1p et 19q et la mutation de p53, rare dans les oligodendrogliomes, seraient des altérations qui s'excluent mutuellement (5).

Si d'autres anomalies comme la délétion du gène suppresseur de tumeur p16/CDKN2A, la perte d'hétérozygotie du chromosome 10q et l'amplification de l'EGFR, isolées ou en association, ont été rapportées comme particulièrement fréquentes dans les oligodendrogliomes anaplasiques, elles s'excluent mutuellement avec les délétions 1p/19q. Ces deux profils moléculaires ont un pronostic différent avec une évolution plus péjorative pour les tumeurs avec amplification de l'EGFR, une LOH de 10q et, probablement, une délétion sur le gène p16/CDKN2A que pour celles avec délétions 1p et 19q.

1.1.4.4. PTEN, MTOR et délétions 10p et 10q

PTEN (Phosphatase and TENsin homolog on chromosome 10) est un gène suppresseur de tumeurs, identifié dans une région chromosomique souvent altérée dans les tumeurs humaines (10q23). Il code pour une protéine qui est dotée d'une activité phosphatase qui lui permet de déphosphoryler à la fois des protéines en tyrosine, sérine ou thréonine, mais également des phospholipides de la voie des phosphatidylinositols. Son activité de protéine

phosphatase lui permet d'inhiber la voie Ras/Mek/Erk, ainsi que FAK (*Focal Adhésion Kinase*), la kinase d'adhésion focale. Elle agit ainsi sur les interactions de la cellule avec la matrice extracellulaire d'où son rôle dans les mécanismes invasifs des tumeurs. Son activité lipidique phosphatase intervient pour bloquer la voie PI3K/Akt (PI3K= *phosphatidyl inositol kinase*) et permet ainsi un arrêt en phase G1 du cycle cellulaire et sensibilité accrue à l'apoptose. Elle agit ainsi à la fois sur la morphologie, le caractère invasif et la prolifération des cellules tumorales. Le gène *PTEN* est plus souvent délété dans les glioblastomes. La mutation de *TP53* et la perte de *PTEN* semblent mutuellement exclusifs (35). La perte de *PTEN* est fortement corrélée à l'activation de la protéine mTOR via Akt.

La protéine mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*) est une enzyme de la famille des sérine/thréonine kinases. Elle régule la prolifération, la croissance, la mobilité, la survie cellulaire, la synthèse protéique et la transcription. Elle intervient dans la voie cellulaire de PI3K vers Akt. L'amplification de l'oncogène MTOR est fréquemment observée dans le cas des glioblastomes secondaires. Quant à la protéine mTOR, elle est un important effecteur dans la signalisation d'Akt. La protéine Akt contrôle la traduction d'ARN messagers spécifiques nécessaires à la prolifération et à l'oncogenèse (55).

1.1.4.5. Inactivation du gène MGMT

Le gène *MGMT* (MethylGuanine MethylTransferase) est un gène de 299kb situé sur le chromosome 10 (10q26). Il code pour une protéine de 238 aa, O⁶-méthylguanine-DNA-méthyltransférase. Cette enzyme est une clé dans la réparation des dégâts, léthaux, causés à l'ADN par les agents alkylants. En l'absence de cette enzyme, les cellules sont plus sensibles à ces traitements et notamment au témozolomide. La méthylation des îlots CpG situés dans le promoteur du gène *MGMT* induit une inhibition de la transcription et donc de la traduction du gène. Cette modification épigénétique s'observe dans 40 à 57% des glioblastomes (56-58). Jusqu'à présent, la méthylation de *MGMT* était reconnue pour être un marqueur prédictif de la réponse au traitement par le témozolomide (56-58). De récentes études (59-61) montrent que les patients porteurs d'une tumeur avec méthylation de ce gène et traités par témozolomide en association à une radiothérapie ou à un traitement par carmustine, ont une augmentation de la médiane de survie de 5 à 9 mois. Ceci indique qu'elle serait un marqueur de bon pronostic. De plus, Lechapt-Zalcman et al (61) montrent qu'une faible expression protéique de *MGMT*

détectée par immunohistochimie serait également un marqueur de meilleur pronostic avec une augmentation de la médiane de survie de 15 à 27 mois chez des patients porteurs d'un glioblastome et traités carmustine et témozolomide.

1.1.4.6. Mutations de IDH1 et IDH2

Le gène *IDH1* sur le bras long du chromosome 2, 2q32-qter code pour l'isocitrate déshydrogénase 1. Il s'agit d'une enzyme impliquée dans le cycle de Krebs. Cette enzyme est localisée dans le cytoplasme et dans les peroxysomes où elle représente la seule source de NADPH qui est un cofacteur impliqué dans la protection cellulaire contre les dommages liés au stress oxydatif (62). Par conséquent, IDH1 agit en protégeant les cellules contre le stress oxydatif et en diminuant leur sensibilité à l'apoptose (62). Le gène *IDH2* sur le bras long du chromosome 15, 15q26.1 code pour l'isocitrate déshydrogénase 2. Elle présente la même activité qu'IDH1.

Les mutations du gène *IDH1* et de *IDH2* (63-65) entraînent dans 90% des cas la substitution de l'arginine132 d'IDH1 et 172 d'IDH2 par une histidine. Ces mutations notées R132H pour IDH1 et R172H pour IDH2 ont pour conséquence une diminution de l'affinité d'IDH1 pour son substrat et l'inhibition de l'activité enzymatique d'IDH1. Les mutations du gène *IDH1* ont d'abord été décrites comme étant spécifiques des gliomes avant d'avoir été mise en évidence dans des leucémies myéloïdes chroniques (66) et semblent être liées au grade de la tumeur. Elles s'observent dans 59% à 88% des astrocytomes diffus de grade II, 50% à 78% des astrocytomes anaplasiques et 50% à 88% des glioblastomes secondaires. Elles sont, en revanche rarement observées dans les astrocytomes pilocytiques de grade I (0% à 10%)(67) et dans les glioblastomes primaires (3% à 12%) (63, 65, 68-74). Deux études récentes montrent que la présence de ces mutations est associée à une augmentation de la survie des patients atteints de gliomes de grade II, III et IV (70, 75). La mutation d'*IDH1* ou *IDH2* est étroitement associée au profil moléculaire : elle est constante dans les gliomes avec codélétion 1p19q et pratiquement absente dans les gliomes avec amplification de l'EGFR (74). La mutation d'*IDH1* ou *IDH2* est un facteur majeur de bon pronostic, quel que soit le grade et ce indépendamment du profil moléculaire (56, 76).

Le mécanisme de tumorigénèse via ces mutations est encore peu connu (67). Tout traitement de radiothérapie ou chimiothérapie constitue pour la cellule un stress oxydatif. La protéine IDH1 protège la cellule contre le stress des traitements agressifs. IDH1 muté favorise

la survie cellulaire et peut intervenir dans la réponse aux traitements. Il reste à étudier l'effet de cette mutation sur le fonctionnement de l'enzyme IDH1 et sur la réponse aux traitements.

1.1.4.7. Rôle de l'EGFR

1.1.4.5.1. Description et fonctions générales de l'EGFR : du gène aux protéines

Le gène, les transcrits, les récepteurs

Le récepteur du facteur de croissance épidermique ou EGFR (epidermal growth factor receptor) est un récepteur codé par le proto-oncogène *c-erbB1*. Le gène de l'EGFR comporte 188 307 paires de bases (pb) et se situe en 7p12 (Genbank N° d'accèsion NG_007726). Il code pour 4 transcrits : les variants 1 à 4. La traduction de chacun de ces transcrits génère des protéines appelées isoformes a, b, c et d (Figure 9).

Le variant 1 (Genbank N° d'accèsion NM_005228) de 5616 pb contient 28 exons et code pour une protéine (isoforme a, Genbank N° d'accèsion NP_5219) de 1210 acides aminés (aa), (Figure 10). Cette protéine correspond au récepteur à l'EGF ou HER1, chef de file de la famille des récepteurs transmembranaires HER (« Human Epithelial Receptor »). HER1 se compose d'une région extracellulaire, d'une région transmembranaire et d'une région intracellulaire.

La partie extracellulaire se divise en quatre domaines (77) :

- I : domaine de liaison à l'EGF
- II : domaine riche en Cystéines
- III : domaine de liaison à l'EGF
- IV : domaine riche en Cystéines

La partie intracellulaire comporte deux domaines (Figure 10) :

- un domaine tyrosine kinase,
- un domaine de régulation.

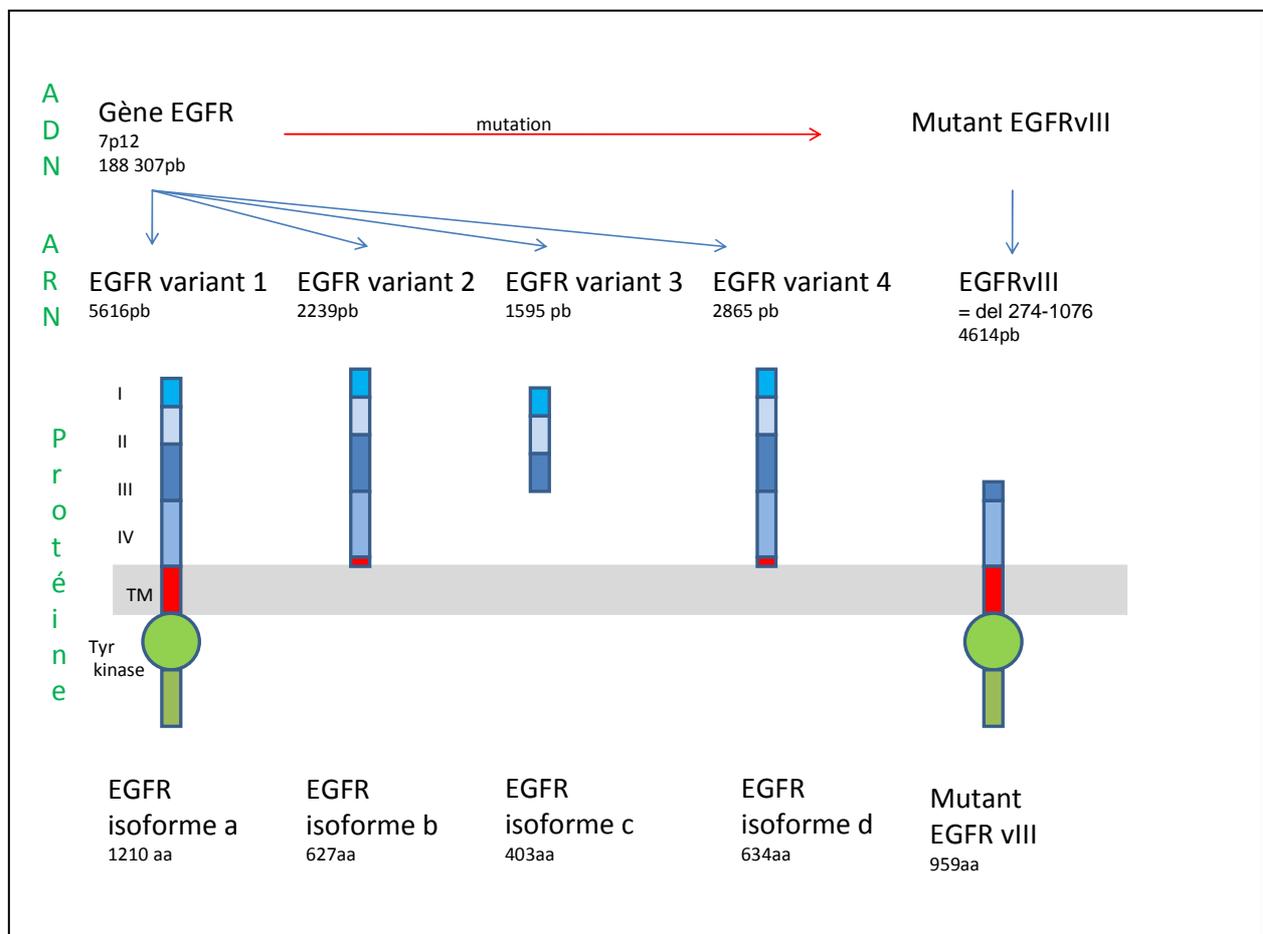


Figure 9 : Schéma récapitulatif des variants et des isoformes de l'EGFR

Les variants 2, 3 et 4 (Genbank N° d'accèsion NM_201282, NM_201283 et NM_201284) comportent respectivement 2239 pb, 1595 pb et 2865 pb (Figure 11). Ils présentent une homologie de séquence avec le variant 1 de 1454 à 2126pb. Les variants 2, 3 et 4 codent respectivement pour les isoformes b, c et d du récepteur de l'EGFR qui sont des protéines de 627 aa, 403 aa et 634 aa (Genbank N° d'accèsion NP_958439, NP_958440 et NP_958441). Ces trois isoformes correspondent à des récepteurs EGFR tronqués et/ou solubles, composés de la partie extracellulaire du récepteur entier (isoforme a), (Figure 9). En effet, l'isoforme c est une forme tronquée et soluble car dépourvu de partie transmembranaire : il ne peut rester fixé à la membrane, ce qui explique que l'on puisse le mettre en évidence dans le sang circulant. Pour les isoformes b et d, elles présentent une petite partie de la région transmembranaire qui pourrait être responsable d'un ancrage dans la membrane : elles correspondent à des formes tronquées et à priori non solubles. Les différentes isoformes sont identiques sur les 403 premiers aa. Les transcrits correspondants aux quatre isoformes sont tous codés par le même gène et sont obtenus par épissage alternatif (78, 79).

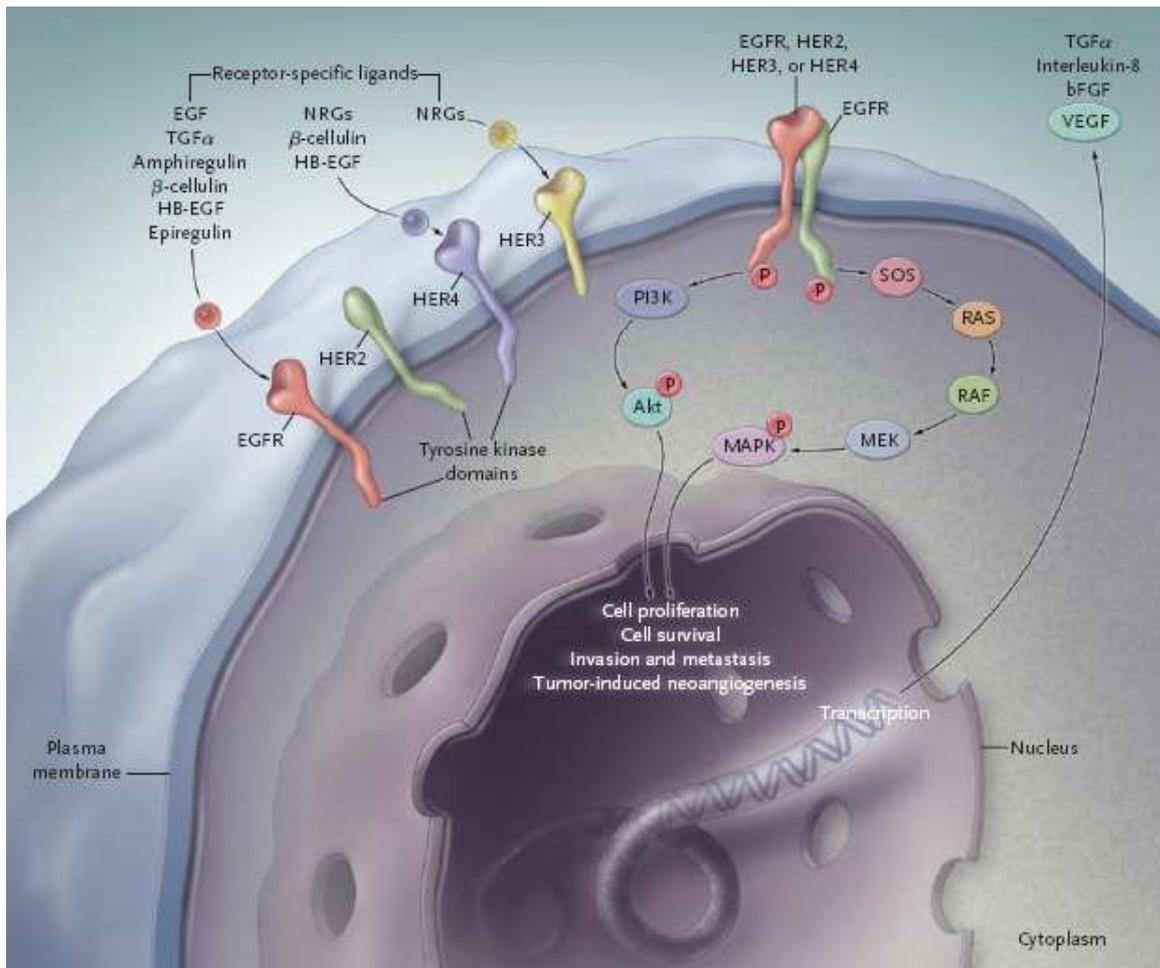


Figure 11 : Voie de signalisation de l'EGFR , Fortunato Ciardiello *et al*, 2008 (80).

Trois étapes peuvent être décrites dans la voie de signalisation dépendant de l'activation de l'EGFR. La première correspond à la fixation du ligand spécifique au niveau du domaine extracellulaire du récepteur. La seconde consiste en la formation d'un homodimère EGFR-EGFR ou d'un hétérodimère EGFR-HER2, EGFR-HER3 ou EGFR-HER4 correspondant aux formes actives et aboutissant à la phosphorylation ATP-dépendante de résidus tyrosine de la partie intracellulaire du récepteur. Finalement, cette phosphorylation induit l'activation de la voie de signalisation intracellulaire. Les deux voies majeures concernées par l'activation de l'EGFR sont la voie de RAS-RAF-MEK-MAPK qui contrôle la transcription de gènes, la progression du cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S et la prolifération cellulaire, et la voie de PI3K-Akt laquelle active une cascade de signaux anti-apoptotiques.(bFGF= basic fibroblast growth factor, HB-EGF= héparin-binding EGF, MAPK=mitogen-activated protein kinase, PI3K=phosphatidyl inositol kinase, TGFα=transforming growth factor α, VEGF=vascular endothelial growth factor).

Activité de l'EGFR et de ses isoformes

Le récepteur EGFR est activé par la fixation d'un de ses ligands. Plusieurs ligands sont connus : l'EGF (epidermal growth factor), TGF α (transforming growth factor α), l'Amphiréguline, la β -celluline, HB-EGF (heparin-binding EGF) ou l'Epiréguline. Dans le cerveau, le TGF α pourrait induire la dédifférenciation des astrocytes en cellules progénitrices puis en cellules souches en agissant comme un mitogène (81). La fixation de l'un de ces ligands sur le récepteur EGFR (isoforme a) entraîne une dimérisation de ce dernier. Il s'agit soit d'une homodimérisation lorsqu'il s'associe à un autre EGFR soit d'une hétérodimérisation lorsque l'association s'effectue avec un autre récepteur de la famille HER (*Human Epithelial Receptor*) (HER2, HER3 ou HER4). Cette dimérisation induit par phosphorylation l'activité tyrosine kinase du domaine intracellulaire, ce qui déclenche alors l'activation de deux principales voies de transduction en aval : la voie de signalisation RAS-RAF- MEK-MAPK et celle de PI3K-Akt (80). Ces deux voies contrôlent la transcription de gènes qui interviennent dans les mécanismes fondamentaux de l'oncogenèse tels que la prolifération et la survie cellulaire, le caractère invasif et métastatique des cellules tumorales et la néoangiogenèse (Figure 11).

Les isoformes b, c et d sont des récepteurs solubles ou tronqués dont l'action a été très peu étudiée. Heaney *et al* (78) expliquent que les isoformes solubles modulent l'action des récepteurs cellulaires transmembranaires comme l'EGFR. Les mécanismes d'action possibles sont variés et dépendent du récepteur transmembranaire considéré, de l'activité catalytique propre de chaque récepteur soluble et de leur capacité d'ancrage au niveau de la membrane plasmique. Les récepteurs solubles peuvent ainsi agir par compétition réversible ou irréversible avec le récepteur membranaire au niveau du ligand ou au niveau de la formation des dimères membranaires actifs. L'interaction des différents récepteurs peut alors entraîner une inhibition ou une activation de la voie concernée.

En 1988, Basu *et al* (82) isolent un récepteur tronqué de l'EGFR de 100 kDa qui contient le domaine de liaison à l'EGFR mais pas le site catalytique intracellulaire. Ils montrent que ce récepteur de 100 kDa est responsable d'une inhibition du récepteur à l'EGFR (isoforme a) non pas par compétition au niveau de la liaison avec le ligand mais par hétérodimérisation avec l'isoforme a.

Le transcrit EGFR variant 3 et la protéine qu'elle code ont été étudiés par Reiter *et al* (77). Ce variant code pour une protéine tronquée, l'isoforme c, constituée de la partie extracellulaire de l'isoforme a comprenant le site de liaison à l'EGFR et ayant perdu le domaine transmembranaire et intracellulaire avec l'activité catalytique tyrosine kinase.

L'isoforme c est, d'après Reiter *et al* (77), reconnue par des anticorps anti-EGFR dirigés contre la partie du domaine extracellulaire commune aux isoformes a et c. Cette isoforme a été détectée dans le placenta, dans des cultures de fibroblastes, dans le sang et dans les urines. Elle correspond à une forme tronquée soluble capable de se lier à des ligands de l'EGFR, notamment au TGF α . Lorsqu'elle est fixée, cette isoforme pourrait alors constituer des hétérodimères avec l'isoforme a et moduler l'activité du récepteur à l'EGFR. Cette modulation ne semble pas liée à une compétition vis-à-vis du ligand mais bien à une interaction entre les différentes isoformes de l'EGFR. L'isoforme c a par ailleurs été mise en évidence dans des cerveaux de rats et plus spécifiquement au niveau des astrocytes. Elle aurait un rôle dans le contrôle de la prolifération cellulaire et dans la différenciation. De plus, en concentrations variables selon les tissus et au cours du développement, notamment pendant l'embryogénèse, les différentes isoformes solubles auraient vraisemblablement une activité régulatrice envers l'isoforme a (77-79, 82).

1.1.4.5.2. EGFR et gliomes

L'amplification du gène s'observe dans 40 à 60% des glioblastomes selon les séries (83-85) et dans 15 à 20 % des oligodendrogliomes et des astrocytomes de grade III de l'OMS (86, 87). Il s'agit d'une amplification du gène qui peut être mise en évidence par différentes techniques : PCR (réaction de polymérisation en chaîne) quantitative, CGH (*hybridation génomique comparative*), FISH (hybridation *in situ* révélée par fluorescence). L'amplification du gène *EGFR* est d'intensité variable : de quelques copies à des milliers pour chaque cellule. L'expression protéique peut être évaluée par immunohistochimie. Le score le plus utilisé (88-91) est le score de Hirsch qui correspond à un score semiquantitatif obtenu en multipliant un score d'intensité de marquage (1 : absence de marquage ou quelques traces, 2 : marquage faible, 3 : marquage modéré et 4 : marquage fort) par le pourcentage de cellules marquées. L'amplification est alors corrélée avec une surexpression protéique et un mauvais pronostic (92, 93).

De nombreuses mutations peuvent être observées au niveau du gène *EGFR*. Elles concernent aussi bien les régions codantes pour le domaine intracellulaire à activité tyrosine kinase que le domaine extracellulaire. Dans les gliomes, les anomalies rencontrées au niveau de la région codante pour le domaine intracellulaire correspondent à des duplications, des délétions, des zones d'instabilité de microsatellites « CA » et des duplications/insertions se situant entre les exons 18 à 21 (94-96). La région codante pour le domaine extracellulaire peut être le site de délétions de tailles variées et de mutations ponctuelles (97). Dans cette région la

plupart des anomalies aboutissent à la formation d'un transcrit mutant appelé EGFRvIII. Il diffère du variant 1 de l'EGFR par une délétion intéressant les bases 273 à 1076 soit les exons 2 à 7 (8). La forme mutante EGFRvIII s'observe dans des gliomes de haut grade et surtout dans 20 à 50% des glioblastomes. Elle pourrait être associée à l'amplification du gène *EGFR* (98). Cette mutation donnerait une protéine tronquée ayant perdu les acides aminés 6 à 273 (95) et donc le domaine de liaison à son ligand. En revanche, elle conserve son activité tyrosine kinase intracellulaire qui serait activée de manière constitutionnelle.

En général, les glioblastomes qui présentent une amplification du gène de l'EGFR montrent simultanément des délétions sur le bras long du chromosome 10. Cette zone comporte notamment les gènes suppresseurs de tumeur *PTEN* et *DMTB1* (*deleted in malignant brain tumours 1*). *PTEN* est muté dans 45% des glioblastomes (99). Des délétions du gène codant DMTB1, un membre de la superfamille des « scavenger receptor cysteine-rich » (SRCR), ont été mises en évidence dans approximativement 25% des glioblastomes (100). Les membres de la famille des SRCR sont impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires, notamment l'initiation de la prolifération ou de la différenciation des cellules du système immunitaire et les interactions protéine-protéine.

Les tumeurs surexprimant l'*EGFR* ont un mauvais pronostic (40, 89) et présentent une chimiorésistance au traitement utilisé PCV et/ou Témzolomide (51, 91, 101-103). En revanche, il a été montré que des molécules visant à inhiber l'activité de l'EGFR seraient susceptibles d'améliorer la survie dans les tumeurs surexprimant ce récepteur (91, 101, 102).

1.1.5. Prise en charge et traitement

1.1.5.1. Prise en charge actuelle recommandée et évolution

Il n'existe actuellement pas de consensus pour la prise en charge des gliomes de grade II OMS ou de grade A HSA. Une attitude de surveillance peut être proposée si les données de l'imagerie sont suffisamment évocatrices, si la symptomatologie clinique est contrôlée, et si la tumeur est située au sein ou à proximité de zones fonctionnelles.

1.1.5.1.1. Concertation pluridisciplinaire

En dehors des cas d'urgence, il est recommandé que toute stratégie thérapeutique soit discutée par un comité pluridisciplinaire. Celui-ci réunit au minimum un chirurgien, un

oncologue médical et/ou un oncologue radiothérapeute. La présence d'un pathologiste, d'un neuroradiologue et d'un médecin de soins palliatifs est souhaitable.

1.1.5.1.2. Bilan d'imagerie

L'imagerie intervient aux différentes étapes de la prise en charge. Si l'examen TDM est souvent réalisé, pour des raisons de disponibilité, au moment du diagnostic, l'IRM demeure l'examen de choix. En effet, et en dehors de contre-indications, cette modalité d'imagerie intervient dans la bilan préthérapeutique (en particulier avant une exérèse chirurgicale et avant la radiothérapie) et dans le suivi (aussi bien pour évaluer la qualité du geste chirurgical que pour le suivi après une radiothérapie ou une chimiothérapie). Ceci s'explique par la possibilité d'obtenir différents plans d'acquisition dont la définition est supérieure à celle d'un examen TDM.

1.1.5.1.3. Chirurgie

La chirurgie a deux principaux objectifs : obtenir une confirmation histologique du processus tumoral et réaliser un geste curatif.

L'intérêt d'une résection chirurgicale la plus large possible est clairement démontré (24), sa faisabilité dépend cependant de la localisation du processus tumoral par rapport aux aires fonctionnelles. Une IRM fonctionnelle complétée par une cartographie peropératoire par stimulation et l'utilisation de la neuronavigation apparaissent comme des méthodes complémentaires souhaitables afin d'améliorer la qualité de l'exérèse et de réduire les complications. L'intérêt de la radiothérapie est discuté. L'évolution péjorative est liée à la récurrence et/ou à la progression du processus tumoral initial mais surtout au changement de grade.

Pour les gliomes de haut grade, l'exérèse chirurgicale est réalisée dans 75% des cas, avec un triple objectif : confirmer le diagnostic histologique, améliorer l'état fonctionnel (35% d'amélioration, 50% de stabilisation, 10 à 15% d'aggravation et 3% de mortalité chirurgicale) et augmenter la survie des patients. Une radiothérapie et/ou une chimiothérapie complémentaire sont réalisées respectivement dans 87 et 54% des cas.

La confirmation histologique étant indispensable à la mise en route d'un traitement antitumoral (radiothérapie et/ou chimiothérapie), la chirurgie est le seul moyen d'obtenir des échantillons représentatifs de la tumeur. Dans les cas où l'exérèse chirurgicale n'est pas

retenue par le comité pluridisciplinaire ou si la lésion est profonde, une biopsie diagnostique, en conditions stéréotaxiques ou non est alors réalisée

Pour guider le geste chirurgical, des aides techniques sont utilisées : IRM fonctionnelle préopératoire, bistouri à ultra sons, microscope opératoire, neuronavigation, cartographie per-opératoire, échographie per-opératoire, examen extemporané.

1.1.5.1.4. Anatomopathologie et biologie moléculaire

Les prélèvements examinés doivent être représentatifs de la tumeur et doivent intéresser, lorsqu'elles existent, les zones de prise de contraste. Ils doivent permettre de poser un diagnostic anatomopathologique : détermination du type de gliome et du grade.

L'examen extemporané peut être réalisé si la réponse du pathologiste est déterminante pour guider l'acte chirurgical.

Les étalements cellulaires (smears) permettent de préciser la cytologie en particulier lors d'un examen extemporané.

Un fragment est congelé dans de l'azote liquide pour les analyses de biologie moléculaire et la tumorothèque. Un échantillon prélevé en regard de la zone congelée sert de contrôle. Un fragment peut également être fixé dans du glutaraldéhyde à 2,5% en vue d'une étude en microscopie électronique.

Le reste des prélèvements est fixé dans du formol-zinc à 10% pour inclusion en paraffine. Après coupe, coloration standard et étude immunohistochimique à visée diagnostique ou pronostique, le diagnostic et le grade des gliomes sont définis en fonction des classifications OMS et HSA.

Les analyses moléculaires les plus utiles en pratique sont la recherche d'une perte des bras chromosomiques 1p et 19q, d'une amplification de l'*EGFR* et d'une méthylation de *MGMT*.

1.1.5.1.5. Radiothérapie

Le délai entre la chirurgie et la première séance de radiothérapie doit être le plus court possible, logiquement inférieur à 5 semaines (104).

Le principe de la radiothérapie repose sur l'utilisation de rayonnements ionisants tels que les rayons X. Ils provoquent l'ionisation des acides nucléiques, responsables de l'altération des chromosomes, ce qui perturbe les divisions cellulaires. Elle est pratiquée de

façon systématique au niveau de la tumeur et d'une zone péri-tumorale de 3 cm d'épaisseur, zone où se situent les infiltrations tumorales responsables des récurrences.

Cette thérapie est facile à mettre en place mais la radiorésistance des tumeurs la rend plutôt inefficace. Par ailleurs, elle est responsable d'effets toxiques liés à l'exposition des tissus sains. Ils peuvent être précoces et transitoires (fatigue, perte d'appétit, nausées et perte de la mémoire à court terme), causés essentiellement par une démyélinisation temporaire au niveau des oligodendrocytes et des œdèmes (105) ou par une perméabilité capillaire (106) et peuvent être traités avec des corticoïdes. Les effets tardifs, survenant de plusieurs mois à plusieurs années après le traitement, sont quant à eux souvent irréversibles et sont liés aux dommages directs causés au cerveau et aux vaisseaux.

Pour les astrocytomes de bas grade dont la résection a été complète, la radiothérapie ne semble pas apporter de bénéfice notable sur la médiane de survie (107). En revanche, pour les gliomes de hauts grades, elle permet de doubler la survie (108).

1.1.5.1.6 Chimiothérapie

La chimiothérapie correspond à l'utilisation de molécules chimiques ayant un effet sur les cellules engagées dans le cycle cellulaire. Elle est administrée oralement ou par injection. Elle peut être utilisée seule, en combinaison avec d'autres drogues ou en association avec la radiothérapie et la chirurgie.

Jusqu'à ces dernières années, le choix des drogues pour le traitement des gliomes était limité aux molécules capables de franchir la barrière hémato-encéphalique. Les protocoles incluaient alors généralement un agent de la famille des nitrosourées telle que la carmustine (BCNU[®]) ou la lomustine (CCNU[®]). La barrière hémato-encéphalique qui constitue un obstacle pour de nombreuses drogues peut être contournée par différents moyens : le mannitol qui interrompt la barrière transitoirement, ou le placement d'éponges biodégradables imprégnées de carmustine dans la cavité tumorale.

Les drogues de chimiothérapie les plus couramment utilisées sont :

- des agents alkylants (ou assimilés) de l'ADN : la procarbazine, le témozolomide, des nitrosourées tels que la carmustine, le fotémustine et la lomustine, des composés platinés tels que le cisplatine et le carboplatine. Ils créent une liaison covalente entre

eux-mêmes et un ou plusieurs groupements carboxyle de l'ADN. La séparation des deux brins d'ADN lors de la division cellulaire et alors impossible. La transcription est alors bloquée.

- des anti-métabolites : ils inhibent la synthèse des acides nucléiques, étape nécessaire à la multiplication cellulaire. Ils regroupent 2 sous-classes : les inhibiteurs d'enzymes (méthotrexate) et les médicaments leurres.
- des alcaloïdes : ils agissent quant à eux au niveau des fuseaux de micro-tubules.

Le cocktail PCV (Procarbazine, CCNU, Vincristine) a longtemps été considéré comme le traitement le plus efficace en neuro-oncologie. Il est généralement basé sur un cycle de 6 semaines avec la Procarbazine administrée entre les jours 8 et 21 à raison de 60 mg/m²/jour, le CCNU à 110 mg/m² le premier jour et la vincristine en injection intraveineuse de 1,4 mg/m² les jours 14 et 29. Au maximum, souvent pour des raisons de toxicité, un patient bénéficie de 6 cycles de PCV.

Une étude menée conjointement par l'Organisation Européenne pour la Recherche et le Traitement du Cancer (OERTC) et le Groupe d'Etudes Cliniques de l'Institut National du Cancer du Canada (GEC INCC), a démontré que l'agent méthylant témozolomide (Témodal[®]), administré pendant et après la radiothérapie prolongeait la survie des patients de manière significative comparativement à la radiothérapie seule (58, 103). La survie médiane est augmentée de 2,5 mois dans le groupe expérimental. Ces essais de phase III mettent en évidence la première utilisation efficace de la chimiothérapie dans le traitement du glioblastome. À la suite de cette étude, la FDA (Food and Drug Administration) et l'Agence Européenne pour l'Evaluation des Produits Médicinaux ont approuvé en 2005 le témozolomide pour son utilisation dans le glioblastome, en administration concomitante à la radiothérapie. Le témozolomide est un dérivé de la dacarbazine. Il est converti spontanément au pH physiologique en un métabolite actif, le 5-(3-méthyl)-1-triazén-1-yl-imidazole-4-carboxamide (MTIC). Cette molécule est administrée par voie orale et présente une excellente pénétration dans le tissu cérébral et le liquide cébrospinal (109). La conversion spontanée du témozolomide en MTIC produit un composé capable de méthyler l'ADN (110). La formation de O⁶-méthylguanine est responsable de mésappariements des bases au sein de l'ADN, et en cas de déficience du système cellulaire de réparation des mésappariements, entraîne l'apoptose de la cellule concernée.

Ainsi, idéalement, le choix de la chimiothérapie peut être guidé par les résultats de biologie moléculaire. En effet, le statut MGMT est un critère prédictif de réponse et de survie sans progression : la méthylation du promoteur du gène *MGMT* induit l'inactivation de la protéine MGMT qui ne peut alors plus réverser l'alkylation des guanines générées par le témozolomide. La connaissance du statut méthylé ou non du gène *MGMT* dans l'ADN tumoral du patient permet donc de choisir entre la radiothérapie seule et la radiothérapie combinée au témozolomide. Cependant, actuellement, aucun consensus n'existe sur la méthode à utiliser pour déterminer le statut MGMT.

La chimiothérapie systémique peut être également associée à une chimiothérapie locale. Une étude de phase III concernant l'implantation d'éponges imprégnées de carmustine (Gliadel[®]) directement dans le lit de la tumeur lors de la résection chirurgicale a montré un bénéfice de survie chez les patients traités comparativement aux patients implantés avec un placebo (111, 112).

Pour les gliomes de grade II, en absence de standard, on peut utiliser du témozolomide, de la carmustine (BCNU[®]) ou le classique PCV.

Pour les glioblastomes, la chimiothérapie standard correspond à six cures mensuelles de témozolomide en association concomitante à la radiothérapie ou seules. Pour les patients atteints d'un gliome accessible à une résection optimale, elle peut être associée à une chimiothérapie locale : implantation de Gliadel[®] (carmustine) à la primochirurgie. En cas de contre-indication au témozolomide, il est possible d'utiliser le BCNU[®].

Pour les oligodendrogliomes et les oligoastrocytomes de grade III, en absence de standard, en adjuvant à la radiothérapie, il est possible d'utiliser du témozolomide.

Lors de rechute, la chimiothérapie peut être locale (Gliadel[®] si réintervention chirurgical) ou systémique. La chimiothérapie systémique dépendra du type tumoral : témozolomide ou BCNU[®] ou carboplatine ou carboplatine –étoposide pour les glioblastomes et les astrocytomes anaplasiques, témozolomide ou BCNU[®] ou PCV pour les oligoastrocytomes et les oligodendrogliomes anaplasiques. L'abstention thérapeutique et/ou les soins palliatifs pourront également être discutés.

1.1.5.1.7 Traitements médicaux associés

Ils sont utilisés en fonction des besoins au moment du diagnostic à la phase de soins palliatifs. De façon systématique, seront associés des traitements anti-épileptiques, des traitements préventifs des infections opportunistes et des traitements préventifs ou curatifs de la maladie thromboembolique. En fonction des symptômes cliniques seront proposés des traitements anti-œdémateux, des traitements préventifs des complications gastriques, des traitements antalgiques ou des traitements par des facteurs de croissance hématopoïétiques.

1.1.5.2. Les traitements expérimentaux

Outre une meilleure utilisation des moyens thérapeutiques existants, les progrès de la biologie ont permis d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Cependant, malgré des résultats expérimentaux encourageants, les traitements se sont révélés relativement décevants chez l'homme. Les nombreuses stratégies de traitement non concluantes sont malheureusement des illustrations du problème de l'adéquation des modèles expérimentaux à la pathologie humaine.

1.1.5.2.1. La chimiothérapie intra-artérielle ou intra-tumorale

Le franchissement de la barrière hémato-encéphalique par les drogues de chimiothérapie reste la principale limitation pour le traitement des tumeurs cérébrales. L'administration locale des molécules de chimiothérapie via une angiographie cérébrale sélective pourrait permettre d'augmenter la concentration de ces produits dans la tumeur et ainsi limiter la toxicité systémique. Plusieurs études de phase I et II portant sur la chimiothérapie intra-artérielle de vincristine ou de dérivés du platine ont montré un certain bénéfice (113). Cependant, la communauté des neuro-oncologues attend une étude de phase III définitive démontrant le bénéfice de ce mode d'administration face à la chimiothérapie intraveineuse classique. La combinaison avec d'autres drogues est en cours d'étude.

1.1.5.2.2. La thérapie moléculaire

L'ensemble des altérations génétiques identifiées dans le glioblastome a conduit les chercheurs à mettre en place des approches thérapeutiques innovantes qui ont atteint le stade

des essais cliniques. La thérapie moléculaire englobe ainsi des traitements plus ciblés en fonction des nombreux sous-types génétiques de glioblastome pouvant être définis.

Les inhibiteurs de l'EGFR

Les inhibiteurs de tyrosine kinase ciblant l'EGFR sont les traitements les plus avancés pour le traitement du glioblastome. Administrés par voie orale, ces composés bloquent l'activité tyrosine kinase du récepteur et donc sa phosphorylation, inhibant ainsi la cascade de signalisation et les effets cellulaires qui en résultent. Les agents les plus avancés dans leur développement clinique sont le gefitinib (Iressa[®]) et l'erlotinib (Tarceva[®]) (114). Ces inhibiteurs sont particulièrement intéressants pour le traitement du glioblastome, puisque leur faible poids moléculaire leur permet de franchir la barrière hémato-encéphalique. Le gefitinib et l'erlotinib ont été approuvés pour le traitement du cancer du poumon métastatique non à petites cellules après l'échec de la chimiothérapie de première intention. Les nombreux essais cliniques de phase I et II menés pour leur utilisation dans le traitement du glioblastome ont montré que ces deux molécules présentaient une activité encourageante, accompagnée d'un profil de toxicité raisonnable en monothérapie ou en combinaison avec le témozolomide (115, 116).

Des anticorps monoclonaux sont également à l'étude de manière à inhiber spécifiquement la fixation des ligands à l'EGFR (117). Les anticorps monoclonaux anti-EGFR les plus utilisés sont le cetuximab et le panitumumab. Tous les deux sont des anticorps dirigés contre le domaine extracellulaire de la forme inactive c'est à dire sans ligand. Ils agissent par compétition irréversible avec le ligand (80, 118).

Les inhibiteurs de l'angiogénèse

La croissance et le maintien du glioblastome dépendent d'un apport sanguin adéquat. La formation de nouveaux vaisseaux sanguins est coordonnée par l'interaction complexe de plusieurs facteurs angiogéniques incluant le VEGF (*Vascular Epithelial Growth Factor*), le bFGF, et le PDGF (119, 120). Le ciblage des facteurs ou des voies impliqués dans l'angiogénèse représente donc une approche potentielle pour le traitement de ces tumeurs.

Le VEGF étant l'un des facteurs majeurs responsable de l'initiation de l'angiogénèse, plusieurs molécules ont été développées de façon à inhiber le récepteur au VEGF (121). Des études récentes utilisant le thalidomide en monothérapie du fait de ses effets anti-

angiogéniques, ont montré une activité antitumorale modérée chez des patients atteints de glioblastome récidivant (122, 123). Néanmoins, la combinaison de thalidomide à d'autres molécules de chimiothérapie semble être plus efficace (123). Un rapport préliminaire suggère l'activité antitumorale du bevacizumab (Avastin[®]), un anticorps humanisé monoclonal anti-VEGF, en combinaison avec l'irinotécan pour le traitement des glioblastomes récidivants (124, 125).

L'imatinib mésylate, un inhibiteur du récepteur au PDGF, a démontré une bonne activité antitumorale dans plusieurs études de phase II en combinaison avec l'hydroxyurée (119).

Autres cibles moléculaires

Plusieurs molécules ont été développées dans le but d'inactiver certaines voies de signalisation jouant un rôle dans la croissance des gliomes et également dans la capacité de migration des cellules tumorales dans le parenchyme cérébral. L'objectif est de restaurer la sensibilité des cellules tumorales aux différentes drogues proapoptotiques pour lesquelles elles sont souvent résistantes. Parmi ces molécules, la rapamycine cible la voie PI3K/Akt (126), les inhibiteurs de farnesyltransférase bloquent la voie des protéines RAS. Certains inhibiteurs de la protéine kinase C sont également à l'étude (127).

1.1.5.2.3. Thérapies cellulaires, toxines et immunothérapie

Plusieurs essais de phase I ont montré que l'administration de cellules dendritiques activées par des ARNs, des peptides ou des lysats tumoraux, était capable d'induire une réponse immunitaire antitumorale dans les gliomes (128).

Les toxines ont également été étudiées pour leur potentiel antitumoral. Un conjugué de la toxine diphtérique couplé à la transferrine a montré une activité dans des essais de phase I et II sans induire de toxicité sévère. La toxine diphtérique fusionnée à l'IL-13 ou à l'EGF a induit la régression complète de glioblastomes implantés chez la souris nude (129). Des études de phase I ont montré la sécurité et l'efficacité antitumorale chez certains patients de la fusion de l'exotoxine A de *Pseudomonas aeruginosa* avec le TGF α ou l'IL-4 (130, 131).

1.1.5.2.4. La thérapie génique

De nombreux gènes candidats, vecteurs et combinaisons ont été étudiés dans le cadre de la thérapie génique appliquée au glioblastome. Si les effets antitumoraux obtenus sur les modèles animaux ont été encourageants, l'efficacité sur les patients s'est révélée relativement décevante. L'optimisation des systèmes de délivrance des gènes et les récents résultats obtenus ont permis de renouveler l'intérêt de ce type de thérapie.

Les tumeurs gliales en général, présentent des caractéristiques originales qui rendent leur traitement difficile mais qui expliquent également que les glioblastomes aient été parmi les premières tumeurs à bénéficier de ce traitement expérimental (132). En effet, ces tumeurs sont généralement focales et possèdent un faible pouvoir métastatique, ce qui les rend plus faciles à cibler localement. Se développant dans un tissu à renouvellement très lent, les tumeurs gliales permettent d'obtenir une certaine spécificité des traitements dépendant du cycle cellulaire. Enfin, le cerveau constituant un environnement immunologique privilégié du fait du faible nombre de cellules immunitaires présentes, il permet une meilleure biodisponibilité des produits de thérapie génique.

Les rétrovirus ont été les premiers vecteurs viraux utilisés au cours des essais de thérapie génique visant le traitement des gliomes de haut-grade. Puis, diverses stratégies se sont développées avec l'utilisation des adénovirus, du virus Herpes simplex (HSV), des rétrovirus ou du virus de la maladie de Newcastle. Outre le système HSV-tk/GCV, les vecteurs viraux ont été largement utilisés pour la délivrance de gènes immunomodulateurs. Le virus HSV a été utilisé pour délivrer les interleukines IL-4, IL-10 et IL-12 dans des études précliniques montrant une augmentation de la survie chez les souris implantées avec des tumeurs et traitées par IL-4 et IL-12 (133). Les mêmes effets ont été obtenus avec des vecteurs adénoviraux transduisant IL-12 et TNF α (134). Différents vecteurs ont également été construits afin de cibler les molécules de régulation du cycle cellulaire. Ainsi, l'adénovirus ONYX-015, un virus oncolytique, a été utilisé dans une étude de phase I pour sa capacité à se répliquer spécifiquement dans les cellules présentant une altération de la voie p53. L'adénovirus Ad5-s24, quant à lui, ciblait spécifiquement les cellules présentant une altération dans la voie Rb (135).

1.2. Caractérisation, classification et marqueurs des gliomes

La caractérisation d'une tumeur repose sur la recherche de particularités (ou de caractères) physiques ou biologiques déterminées par l'expression d'un ou plusieurs gènes et dont l'ensemble constitue le phénotype tumoral. En Médecine et en recherche médicale, ce phénotype est appréhendé sous des aspects différents selon l'approche que l'on a du malade ou de la maladie, par exemple sur le plan diagnostique, thérapeutique ou physiopathologique.

Etablir une classification d'un groupe de tumeurs, c'est en quelque sorte constituer une distribution scientifique selon des critères de nature variable, morphologique, anatomique, génétique ou autre. Pour les gliomes et dans l'état actuel de nos connaissances, il est clair qu'aucune classification fondée sur un seul type de critère ne permet une approche satisfaisante de ces pathologies. C'est la raison pour laquelle les classifications doivent évoluer en intégrant de nouvelles données reconnues comme pertinentes.

Ces dernières années, nous avons vu apparaître dans la littérature relative aux gliomes, le terme de marqueur. Pour nous, ce terme se rapproche de la notion de "caractère" que nous avons évoqué plus haut. Sa connotation est plus moderne et plus scientifique. Ce terme ne doit pas être réduit à la seule notion moléculaire. Il existe d'authentiques marqueurs morphologiques fiables et reproductibles. De même, dans les gliomes diffus, certains caractères cliniques ou radiologiques peuvent être considérés comme des marqueurs diagnostiques ou pronostiques, par exemple l'âge ou la présence d'une prise de contraste et de nécrose sur l'imagerie.

Dans notre travail sur les gliomes diffus, nous avons pour but de rechercher, quelle que soit leur nature, des marqueurs ou des critères pertinents susceptibles d'améliorer la prise en charge de ces tumeurs ou de mieux comprendre leur oncogénèse.

Ces marqueurs peuvent être :

- diagnostiques : ils permettent un diagnostic positif ou un typage tumoral,
- pronostiques : ils évaluent le degré de malignité,
- prédictifs ou théranostiques : ils prédisent la probabilité de réponse à un traitement spécifique,

- certains marqueurs peuvent être à la fois : diagnostiques, et/ou pronostiques et/ou prédictifs.

Il faut que ces marqueurs soient

- pertinents : ils permettent de définir des groupes de pronostics différents ou des groupes de sujets répondeurs ou non répondeurs
- fiables : ils sont recherchés par des techniques éprouvées et reproductibles.

Dans ce mémoire, le terme de marqueur moléculaire regroupe :

- les protéines détectables en immunohistochimie ou par d'autres techniques de routine,
- les anomalies génomiques et génétiques que l'on recherche en FISH ou par des méthodes de biologie moléculaire (FISH, LOH, CGH- array ou autres).

2. Objectifs et déroulement du travail

La prise en charge d'un patient atteint d'un gliome repose actuellement sur une démarche multidisciplinaire mais qui nécessite une évaluation diagnostique pertinente. Cette évaluation intègre des données cliniques, radiologiques, histopathologiques, immunologiques et génétiques. Certains marqueurs moléculaires ont, au-delà de leur valeur diagnostique, un sens pronostique et théranostique. Ils constituent une voie important de recherche, compte tenu des difficultés diagnostiques et de la résistance aux traitements conventionnels de l'immense majorité des gliomes infiltrants. De plus, en l'absence d'anomalie significative, clairement identifiée, il n'y a pas, actuellement, de thérapie ciblée dans ce type de maladie contrairement à beaucoup d'autres cancers, à l'exception des astrocytomes sous-épendymaires à cellules géantes de la maladie de Bourneville, où les inhibiteurs de la voie mTOR peuvent être utilisés avec un certain résultat.

Dans ce but, notre travail s'est orienté dans deux axes :

1) Etude de la valeur diagnostique et pronostique de certains marqueurs moléculaires :

- Délétions 1p et 19q : les données de la littérature montraient plusieurs types de délétion 1p et 19q de valeurs diagnostique et pronostique discutées. Notre travail publié dans l'article "1p19q LOH patterns and expression of p53 and Olig2 in gliomas: relation with histological types and prognosis" a permis d'établir une cartographie de ces délétions et de préciser leurs valeurs diagnostique et pronostique.
- Expression de l'Alpha-internexine (INA) et délétions 1p, 19q, 10p et 10q : l'expression de l'INA recherchée par immunohistochimie ayant été considérée comme prédictive des délétions 1p et 19q, nous avons étudié l'expression de cette protéine et comparé nos résultats d'une part avec la présence ou l'absence des délétions 1p19q et 10p10q, et d'autre part avec l'expression d'autres marqueurs utilisés dans le typage des gliomes infiltrants. Les résultats de ce travail ont donné lieu à un deuxième article : « Alpha-internexin expression in gliomas: relationship with histological type and 1p, 19q, 10p and 10q status ».

2) Analyse technique de la pertinence d'autres marqueurs moléculaires comme l'expression de l'EGFR. Ainsi, l'amplification du gène de l'EGFR pouvant être considérée

comme un marqueur diagnostique, notamment dans les glioblastomes, et comme sa voie d'activation représente une cible thérapeutique potentielle, nous avons analysé l'expression génique et protéique de l'EGFR et la pertinence de ses différents transcrits :

- Analyse comparative de l'amplification de l'EGFR et de son expression protéique. Ce travail a été publié dans un troisième article : « Determination of EGFR status in gliomas: usefulness of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization »
- Les résultats obtenus dans l'étude précédente nous ont conduits à compléter notre travail par l'analyse l'expression des différents variants et isoformes de l'EGFR. Ce travail a fait l'objet de notre quatrième publication : « Adult diffuse gliomas produce mRNA transcripts encoding EGFR isoforms lacking tyrosine kinase domain ».

3. Résultats

3.1. Publication N°1: 1p19q LOH patterns and expression of p53 and Olig2 in gliomas: relation with histological types and prognosis

3.1.1. Synthèse

Introduction : La perte combinée des bras chromosomiques 1p et 19q, liée à une translocation déséquilibrée $t(1;19)(q10;p10)$, est considérée comme un marqueur moléculaire d'oligodendrogliome. Les altérations des bras 1p et 19q dans les astrocytomes et les glioblastomes sont plus rares et consistent en des pertes partielles ou télomériques. Les régions 1p36 (7Mb) et 19q13.3 (0,9Mb) ont été identifiées comme des régions très souvent délétées. Ces délétions sont variables selon le type histologique et pourraient se révéler une aide précieuse pour la classification des gliomes.

Nous avons analysé la perte d'hétérozygotie (LOH) de marqueurs microsatellites par PCR sur l'ensemble des bras 1p et 19q. Les différents types de délétions ont été comparés avec les types histologiques et avec d'autres marqueurs utilisés pour caractériser les gliomes : expression des protéines p53 et Olig2, amplification de l'EGFR. Enfin nous avons évalué la valeur pronostique de la perte 1p et 19q.

Résultats et discussion : l'analyse de la LOH des microsatellites a permis de distinguer 5 types de délétion 1p et 19q :

- Rétention complète du bras chromosomique ou absence de délétion
- Perte télomérique englobant au moins le marqueur le plus télomérique, mais sans perte interstitielle et centromérique,
- Délétion interstitielle avec rétention des marqueurs centromériques et télomériques,
- Perte dispersée portant sur un marqueur situé n'importe où sur le chromosome,
- Perte complète, portant sur tous les marqueurs situés entre le télomère et le centromère.

La perte complète du bras 1p est associée à une perte complète du bras 19q dans 90% des cas ($p < 0,0001$).

Une délétion complète 1p19q est présente dans tous les oligodendrogliomes classiques tandis que les autres types de délétion 1p19q sont plus fréquemment observés dans les oligoastrocytomes.

La perte complète 1p19q est significativement associée à la surexpression d'Olig2 ($p=0,02$), mais n'est jamais observée dans les tumeurs surexprimant la protéine p53. Nous avons également constaté que les patients dont les tumeurs prennent le contraste ont une survie plus longue lorsqu'une perte complète 1p19q est présente.

Nous avons observé que la perte combinée complète des bras 1p et 19q se rencontrait dans tous les oligodendrogliomes de type classique. Dans la littérature, la fréquence des délétions complètes 1p et 19q dans les oligodendrogliomes varie de 40 et 70%. La différence avec nos résultats pourrait s'expliquer par le choix des critères histopathologiques utilisés pour le diagnostic d'oligodendrogliome ou bien dans la sélection des zones tumorales sur lesquelles l'analyse moléculaire a été effectuée. Dans notre étude, nous avons sélectionné pour l'étude moléculaire des secteurs tumoraux typiques d'un oligodendrogliome, c'est à dire formé de cellules ayant un noyau caractéristique, entouré d'un halo clair (aspect "d'œuf sur le plat"), avec ou sans minigémistocytes et dans des zones tumorales de densité cellulaire élevée.

Nous avons trouvé une perte restreinte à la région 1p36 dans 25% des astrocytomes et 35% des oligoastrocytomes. D'autres types de délétion 1p et 19q ont été observés, particulièrement dans les oligoastrocytomes. Ces résultats sont le témoin de l'hétérogénéité génomique des tumeurs gliales.

Nous avons également observé une relation entre les résultats de l'analyse moléculaire et ceux obtenus pour d'autres marqueurs. La présence des pertes complètes 1p et 19q était associée à un haut niveau d'expression d'Olig2. Ces deux marqueurs sont en fait tous les deux associés au type histologique oligodendrogliol. La surexpression de p53 et les pertes complètes associées 1p et 19q sont mutuellement exclusives. Le caractère "mixte" des oligoastrocytomes était bien illustré par les niveaux d'expression d'Olig2 et de p53 qui ont des valeurs intermédiaires comprises entre celles des oligodendrogliomes et celles des glioblastomes.

Une amplification de l'EGFR n'a été observée que dans les oligoastrocytomes (14%) et les glioblastomes (60%). Elle n'était jamais associée avec les pertes complètes 1p et 19q.

Un seul patient avec une perte 1p et 19q était décédé après 45 mois alors que pour les autres patients la médiane de survie était de 22 mois et le taux de mortalité de 42%. La prise de contraste sur l'imagerie est reconnue comme un critère de malignité. Dans notre série, les patients dont les tumeurs ne présentaient pas de prise de contraste avaient une meilleure survie (45 vs 22 mois). De façon intéressante, parmi les 31 patients avec une tumeur prenant le contraste, 5 des 6 patients avec une perte complète 1p et 19q étaient encore en vie après 23 mois alors qu'en absence de ces délétions la médiane de survie était de 13 mois avec un taux de mortalité de 60%.

Ainsi, déterminer les types des délétions 1p et 19q dans les gliomes infiltrants apparaît important pour classer ces tumeurs et évaluer leur pronostic. Les délétions complètes 1p et 19q sont associées avec le phénotype classique d'oligodendrogliome et à une survie globale ou sans récurrence plus longue alors que la perte partielle télomérique 1p est plus souvent rencontrée dans les tumeurs astrocytaires et associée à un plus mauvais pronostic. En pratique, les techniques permettant une analyse complète des bras chromosomiques 1p et 19q telles que la CGH ou la recherche de LOH sont plus appropriées que la FISH qui n'explore que les zones 1p36 et 19q13.

(Les références bibliographiques sont identiques à celles de l'article)

3.1.2. Article

3.2. Publication N°2: Alpha-internexin expression in gliomas: relationship with histological type and 1p, 19q, 10p and 10q status

3.2.1. Synthèse

Introduction : les délétions complètes des bras chromosomiques 1p et 19q s'observent dans les oligodendrogliomes. Les délétions des bras chromosomiques 10p et 10q ont été rapportées dans les astrocytomes et les glioblastomes et sont associées à un mauvais pronostic. La fréquence et le type de délétion 10p et 10q varient en fonction du type histologique. Les anomalies sur le chromosome 10 sont rares ou absentes dans les astrocytomes de bas grade, tandis que des pertes d'hétérozygotie s'observent dans 35 à 60% des astrocytomes anaplasiques et qu'une délétion complète du chromosome 10 est observée dans 60 à 80% des glioblastomes. Les pertes des bras chromosomiques 1p et 19q seraient exclusives des pertes 10q ou 10p10q.

L'INA dont le gène se situe en 10q24.33 est un filament intermédiaire de classe IV impliqué dans la synthèse des neurofilaments et la morphogenèse des neurones. Elle interagit avec d'autres filaments intermédiaires comme la nestine et elle est exprimée dans les neuroblastomes et les médulloblastomes. L'expression de l'INA est plus importante dans les oligodendrogliomes que dans les autres gliomes. Les tumeurs avec les délétions 1p et 19q ont un profil d'expression proneural et l'INA est le gène de la lignée neuronale le plus exprimé dans ces tumeurs. Une étude récente a montré que l'expression de l'INA évaluée par immunohistochimie pourrait être un bon marqueur pronostique et prédictif de la délétion 1p19q.

Dans différents types de gliomes infiltrants, nous avons étudié l'expression de l'INA par immunohistochimie. Les niveaux d'expression ont été analysés en fonction de la présence ou de l'absence des délétions 1p, 19q, 10p et 10q déterminées par recherche de LOH. La relation entre l'expression de l'INA et le statut d'autres marqueurs utilisés pour caractériser les gliomes comme l'expression de p53, d'Olig2 et de la nestine ainsi que l'amplification, de l'EGFR a également été étudiée.

Résultats et discussion : L'analyse des LOH sur les bras chromosomiques 1p, 19q, 10p et 10q mettait en évidence différents types de délétions : délétions complètes de bras chromosomiques, délétions interstitielles ou télomériques, absence de délétion.

Les délétions complètes des bras 1p et 19q étaient statistiquement associées, de même que les pertes complètes 10p et 10q. En revanche, les codélétions 1p 19q et les pertes complètes 10p et/ou 10q s'excluaient mutuellement ($p=0,0007$, $p=0,0025$ et $p=0,004$).

La fréquence des délétions complètes 10p10q variait en fonction du type histologique. Elles étaient présentes dans 75% des glioblastomes, 20% des astrocytomes et 36% des oligoastrocytomes mais elles étaient absentes dans les oligodendrogliomes ($p=0,002$). A l'inverse, les délétions complètes 1p et 19q étaient présentes dans tous les oligodendrogliomes et absentes dans les autres tumeurs gliales étudiées ($p<0,0001$). Deux glioblastomes et un oligoastrocytome présentent une perte complète 1p sans perte complète 19q associée.

En immunohistochimie, l'expression de l'INA se matérialisait par un marquage cytoplasmique et périnucléaire dans les cellules tumorales. Les neurones étaient aussi marqués mais leur morphologie permettait de les distinguer des cellules tumorales. Il est à noter que l'expression de l'INA était hétérogène dans une même tumeur. Nous avons évalué l'expression de l'INA comme : absente, faible ($< 10\%$ de cellules tumorales) ou forte ($> 10\%$). Dans ces conditions, son expression différait de façon significative en fonction du type histologique : dans tous les astrocytomes et les glioblastomes et 91% des oligoastrocytomes l'expression de l'INA était faible ou absente alors que 73% des oligoastrocytomes l'exprimaient fortement ($p=0,0005$). Huit des neuf tumeurs avec une forte expression avaient des délétions complètes 1p et 19q ($p<0,0001$). Ainsi une expression de l'INA s'observait dans les oligodendrogliomes, tous codélétés 1p19q, alors qu'elle était absente ou faible dans les tumeurs astrocytaires ou mixtes, ce qui est conforme aux données de la littérature. Comme Ducray *et al* (136), nous avons retrouvé une association entre les pertes 1p et 19q et la forte expression de l'INA. Cependant, nous avons observé une discordance dans 10% de nos cas. Trois oligodendrogliomes sur 11 avec délétions 1p et 19q exprimaient faiblement l'INA (expression de l'INA dans moins de 10% des cellules tumorales) et un oligoastrocytome sans perte 1p ou 19q exprimait l'INA. Ces trois oligodendrogliomes ne différaient pas des autres sur les plans morphologiques, immunohistochimiques (expression de p53, Olig2, nestine et index Ki67) et génomiques. De plus, le marquage obtenu était hétérogène en immunohistochimie dans une même tumeur, avec des zones positives et des zones négatives. Ces dernières peuvent être à l'origine de faux négatifs lors d'exploration biopsiques.

L'expression de l'INA était inversement liée à une perte 10p10q ($p= 0,008$). Aucune tumeur avec une perte 10q, c'est à dire une perte du bras qui porte le gène de l'INA, ne

présentait de surexpression de l'INA ($p=0,003$). Cependant, toutes les tumeurs avec la rétention de ce bras chromosomique n'exprimaient pas l'INA. Cela indique que la rétention du bras 10q est nécessaire mais pas suffisante à l'expression de l'INA. Ainsi, l'INA est un marqueur intéressant à utiliser dans les gliomes en association avec les autres marqueurs, mais l'étude de son expression en immunohistochimie ne permet pas de remplacer l'analyse moléculaire lorsque l'on cherche à mettre en évidence les délétions chromosomiques 1p, 19q, 10p et 10q.

Le rôle de l'INA dans l'oncogenèse des gliomes est inconnu. Son expression dans les oligodendrogliomes suggère que ces tumeurs pourraient dériver d'un progéniteur commun aux neurones et aux oligodendrocytes. Dans notre étude, une forte expression de l'INA est apparue comme un facteur de meilleur pronostic.

L'expression de p53 et de la nestine variait en fonction des types tumoraux. Les oligodendrogliomes exprimaient moins p53 ($p=0,01$) et la nestine ($p=0,0003$) que les autres tumeurs. Les oligodendrogliomes et les oligoastrocytomes exprimaient plus fortement Olig2 ($p=0,009$). L'index Ki67 et l'expression de nestine étaient plus élevés dans les tumeurs avec pertes 10p et 10q complète ($p=0,007$ et $p=0,001$). Les tumeurs sans perte d'hétérozygotie pour 1p et 19q sous exprimaient Olig2 ($p=0,004$) mais sur exprimaient p53 ($p=0,003$) et la nestine ($p<0,0001$) en comparaison avec les tumeurs ayant une perte 1p et 19q.

Six tumeurs présentaient une amplification du gène de l'EGFR. Aucune de ces tumeurs ne présentait de délétion 1p et 19q ($p=0,0001$). Cinq d'entre elles avaient une perte 10p10q ($p=0,03$). La survie globale était meilleure pour les patients dont les tumeurs avaient une délétion 1p et 19q sans perte du chromosome 10. Dans les tumeurs avec rétention 1p et 19q, la perte 10q était de plus mauvais pronostic que la perte 10p ($p=0,05$). Une perte combinée et complète de 10p et 10q a été observée dans 50% des astrocytomes anaplasiques et 75% des glioblastomes. Les délétions complètes 1p et 19q étaient mutuellement exclusives des pertes complètes 10p isolée, 10q isolée ou 10p10q. Ces résultats démontrent qu'il existe dans les gliomes infiltrants deux voies oncogénétiques distinctes.

(Les références bibliographiques sont identiques à celles de l'article)

3.2.2. Article

3.3. Publication N°3: Determination of EGFR status in gliomas: usefulness of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization.

3.3.1. Synthèse

Introduction : En pathologie tumorale, l'EGFR et sa voie de signalisation interviennent dans la prolifération, l'invasion et la survie cellulaires. Dans les gliomes infiltrants, l'inhibition de la voie de l'EGFR que ce soit à l'aide d'anticorps monoclonaux ou d'inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase pourrait être une approche thérapeutique intéressante. Dans ces tumeurs, les modifications les plus souvent observées sont une amplification du gène de l'EGFR, la présence d'un variant mutant (EGFRvIII) et une surexpression protéique.

Nous avons étudié l'amplification génique et l'expression protéique de l'EGFR dans une série de 35 gliomes. L'amplification a été recherchée par FISH et l'expression protéique a été évaluée par immunohistochimie.

Résultats et discussion : Une amplification de l'EGFR a été observée dans 11 des 32 tumeurs analysées (34,4%). 72,7% des glioblastomes présentaient une amplification alors qu'elle était absente dans les astrocytomes de grade II et III. Dans les tumeurs oligodendrogiales, elle s'observait dans 50% des oligodendrogliomes de grade III mais dans aucun des grades II. Dans notre étude, la présence d'une amplification du gène de l'EGFR est un marqueur de malignité liée au type histologique et au grade. Certains auteurs ont trouvé une amplification dans des gliomes de bas grade. Cependant, d'autres travaux suggèrent qu'au niveau moléculaire, les astrocytomes de grade III avec amplification correspondent à des glioblastomes. Nous avons observé une amplification de l'*EGFR* dans 3 oligodendrogliomes de grade III. Ces tumeurs n'ont pas bénéficié d'une analyse du statut 1p19q ni 10p10q. Il se pourrait donc qu'ils s'agissent de tumeurs mixtes dont seule la composante oligodendrogiale a été intéressée par les prélèvements.

Dans ce travail, nous avons utilisé un anticorps dirigé contre le domaine extracellulaire du récepteur. Trois niveaux d'expression protéique ont été définis : absence d'expression, expression intermédiaire et forte expression. Une expression protéique a été observée dans 18 des 35 tumeurs étudiées. Aucun astrocytome de grade I ou II n'exprimait l'EGFR alors que

son expression était présente dans 50% des astrocytomes de grade III, 75% des glioblastomes, 83% des oligodendrogliomes de grade III et 25% des oligodendrogliomes de grade II. Dans notre série, l'expression protéique de l'EGFR détectée par immunohistochimie s'observe dans 51,4% des gliomes et plus particulièrement dans les tumeurs de haut degré de malignité. Ces résultats sont en accord avec plusieurs études qui montrent une expression de l'EGFR plus importante dans les gliomes de haut grade.

Une relation existait entre la présence d'une amplification de l'*EGFR* et le pourcentage de cellules marquées en immunohistochimie ($p=0,0004$) ainsi que avec le score de Hirsch ($p=0,0003$). Seize des 17 tumeurs ne montrant pas d'expression protéique ne présentaient pas d'amplification génique. A l'inverse, 10 des 15 tumeurs exprimant la protéine avait une amplification du gène. Pour ces 10 tumeurs, cela suggèrerait une régulation au niveau transcriptionnel. Une forte expression de l'EGFR sans amplification du gène que nous avons observé dans cinq tumeurs, pourrait témoigner d'une régulation de l'expression protéique de l'EGFR à un autre niveau : transcriptionnel, post-transcriptionnel ou translationnel. En revanche, parmi les tumeurs sans expression protéique de l'EGFR, une seule présentait une amplification. Dans cette tumeur, la protéine a été en fait détectée au niveau des cellules des néovaisseaux tumoraux. L'étude par FISH ayant été réalisée sur étalement cellulaire, il était difficile de préciser si l'amplification observée se situait dans les cellules tumorales ou au niveau de la néovascularisation.

Notre étude permet de préciser les indications respectives de l'immunohistochimie et de la FISH pour déterminer le profil d'expression de l'EGFR. Nos résultats indiquent qu'il n'est pas utile de réaliser une étude par FISH en l'absence d'expression protéique puisque l'amplification est absente dans ces tumeurs. Pour nous, la FISH n'est utile que dans les tumeurs où l'immunohistochimie détecte une expression protéique.

Des résultats légèrement différents concernant la relation entre l'immunohistochimie et l'amplification de l'EGFR dans les gliomes ont été publiés dans la littérature. Coulibaly *et al* (137) mettait en évidence un lien direct entre l'amplification génique et l'expression protéique. Dans cette étude, l'anticorps utilisé était dirigé contre le domaine extracellulaire. La différence de marquage au niveau d'un certain nombre de tumeurs ayant été observée dans notre série lors de l'utilisation de cet anticorps, nous avons été amenés à évoquer une régulation transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle. Ainsi, nous avons été amenés à étudier l'expression génique du gène de l'EGFR et à rechercher d'éventuels variants

transcriptionnels à l'origine d'isoformes protéiques reconnues de manière différentes par les anticorps utilisés.

(Les références bibliographiques sont identiques à celles de l'article)

3.3.2. Article

3.4. Publication N°4 : Adult diffuse gliomas produce mRNA transcripts encoding EGFR isoforms lacking tyrosine kinase domain

3.4.1. Synthèse

Introduction : Plusieurs études ont montré que l'EGFR intervient dans l'oncogénèse des gliomes. L'anomalie la plus fréquente est l'amplification du gène. Dans les glioblastomes, l'expression d'un mutant constitutionnellement actif, l'EGFRvIII, a été rapportée et son expression peut être associée à une amplification génique.

Le gène de l'EGFR est situé en 7p12 et génère différents transcrits. Le premier transcrit correspond au variant 1 (EGFRv1) qui code pour le récepteur complet EGFR appelé également isoforme a. Cette isoforme est une protéine transmembranaire avec un domaine intracellulaire à activité tyrosine kinase. Par épissage alternatif, le gène de l'EGFR peut donner d'autres transcrits (variants v2, v3, v4) qui codent pour des formes tronquées du récepteur, les isoformes b, c et d, qui ne présentent pas de domaine cytoplasmique avec activité tyrosine kinase. Leur rôle est peu connu. In vitro, ces isoformes sont responsables d'une diminution de la prolifération. Différentes hypothèses ont été avancées pour expliquer cet effet inhibiteur comme une liaison compétitive des isoformes tronquées avec le ligand ou la formation d'hétérodimères inactifs.

L'expression des isoformes tronquées et de leur transcrits n'a jamais été étudiée dans les gliomes. Nous avons donc analysé l'expression des isoformes et des transcrits respectivement par immunohistochimie et RT-PCR quantitative. Pour l'étude immunohistochimique, nous avons utilisé deux anticorps, l'un dirigé contre le domaine extracellulaire et reconnaissant toutes les isoformes protéiques y compris le mutant vIII et l'autre dirigé contre le domaine intra cellulaire de l'EGFR (Figure 12).

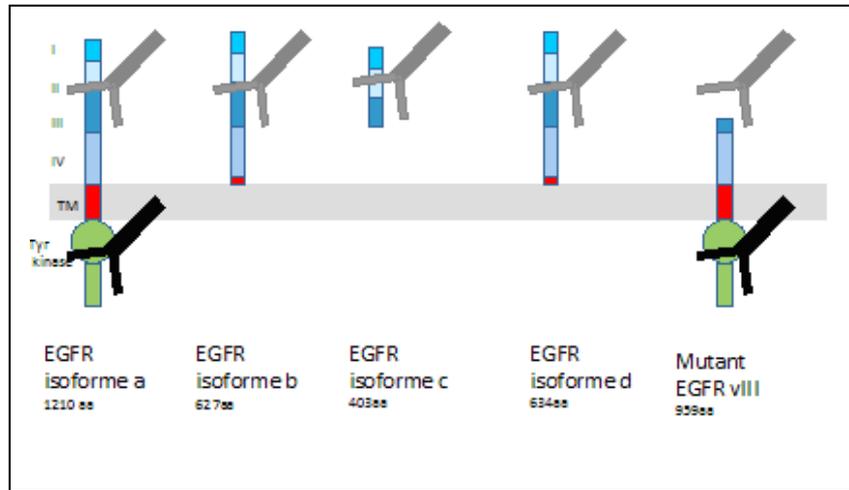


Figure 12 : Domaines protéiques détectés par les anticorps :

- reconnaissance du domaine extracellulaire par l'anticorps Ventana (gris)
- reconnaissance du domaine intracellulaire par l'anticorps Novocastra (noir)

Résultats et discussion : Le pourcentage de gliomes marqués avec un anticorps dirigé contre le domaine extracellulaire était de 98% alors que seulement 78% des gliomes étaient marqués lorsque l'on utilisait un anticorps dirigé contre le domaine intracellulaire. Pour certaines tumeurs, le marquage obtenu avec les deux anticorps est vraiment différent alors qu'il est identique dans d'autres tumeurs. Dans toutes les tumeurs, le marquage avec l'anticorps dirigé contre le domaine intracellulaire est équivalent ou plus faible que celui obtenu avec l'anticorps dirigé contre le domaine extracellulaire. C'est à dire que aucun marquage obtenu avec l'anticorps dirigé contre le domaine intracellulaire n'est supérieur à celui obtenu avec l'anticorps dirigé contre le domaine extracellulaire. Les résultats de l'immunohistochimie sont en faveur de l'hypothèse d'une expression des isoformes protéiques tronquées. Les fortes intensités de marquage obtenues avec l'anticorps Ext-Ab reflètent leur expression en plus de celles de l'isoforme fonctionnelle de l'EGFR et du mutant EGFRvIII lesquels sont ciblés par l'anticorps Int-Ab. En effet, ce dernier ne permettant pas de mettre en évidence les formes tronquées, sans domaine intracellulaire, la différence de marquage observé peut être attribué à leur présence. La détection ou non de ces dernières dépend donc de l'anticorps utilisé et cela pourrait expliquer les discordances observées dans la littérature concernant l'étude de l'expression de l'EGFR dans différentes tumeurs.

Nous montrons dans cette étude que les gliomes diffus expriment les différentes isoformes protéiques : tous les variants de l'EGFR étaient exprimés. Leur niveau d'expression était variable : le variant EGFRv1+vIII avait une médiane d'expression à 7, 3 [0,4-390,2], le variant EGFRv2 0.02 [0-0,5], le variant EGFRv3 6.2 [0,1-1396,8] et le variant EGFRv4 94.6

[2,1-4445,2]. Il existait une relation très étroite entre les niveaux d'expression de chacun des variants ($p < 0,0001$). Une expression du mutant EGFRvIII a été mise en évidence dans 26% des tumeurs.

Les niveaux d'expression des variants EGFRv1+vIII, v2, v3 et v4 étaient plus élevés dans les glioblastomes ($p < 0,05$). La présence du mutant EGFRvIII était associée au type histologique et elle a été observée dans un astrocytome, 10 glioblastomes et un oligoastrocytome mais dans aucun oligodendrogliome ($p = 0,01$). Par ailleurs, l'expression du variant EGFRv1+vIII était plus fortement corrélée avec l'immunomarquage obtenu avec l'anticorps dirigé contre le domaine intracellulaire (Int-Ab) qu'avec celui obtenu avec l'anticorps dirigé contre le domaine extracellulaire (Ext-Ab). Il est à souligner également que les profils d'expression des variants diffèrent selon le type histologique. Les glioblastomes ont des niveaux d'expression plus élevés des variants EGFRv3, -v4 et du mutant EGFRvIII que les autres types tumoraux.

Huit glioblastomes sur 20 présentaient une amplification du gène de l'*EGFR* tandis qu'elle était absente dans les autres tumeurs ($p = 0,007$). Les glioblastomes avec une amplification du gène de l'*EGFR* exprimaient plus fortement les variants EGFRv1, v2, v3 et v4. La présence du mutant EGFRvIII était associée à la présence d'une amplification. Comme nous l'avons déjà observée dans notre précédent travail, un faible marquage avec l'anticorps Ext-Ab était associé à l'absence d'amplification alors qu'un fort marquage avec l'anticorps Int-Ab était lié à une amplification de l'*EGFR*. Cela suggère que l'amplification génique est étroitement liée à une forte expression des isoformes possédant le domaine intracellulaire à activité tyrosine kinase c'est à dire l'isoforme a et le mutant EGFRvIII.

Nos résultats indiquent que le rôle de l'EGFR dans l'oncogenèse des gliomes, au travers de l'expression de ses différents variants et isoformes, est très complexe. Actuellement le rôle des isoformes tronquées est mal connu, particulièrement *in vivo*. *In vitro*, elles pourraient avoir un effet régulateur de la voie de l'EGFR dans les cellules normales et tumorales. Elles seraient capables de diminuer la prolifération cellulaire, soit par compétition au niveau de la fixation du ligand soit par formation d'hétérodimère dépourvus d'activité tyrosine kinase.

La synthèse des formes protéiques tronquées devrait être prise en compte lors de la mise en place d'un traitement anti-EGFR. Elles pourraient interagir avec des thérapies dirigées

contre le domaine extracellulaire et ainsi expliquer leur échec. Néanmoins, il a été rapporté que la présence de formes tronquées serait prédictive de la réponse au gefitinib sur des cultures cellulaires d'adénocarcinomes endométriaux.

A notre connaissance, cette étude est la première à rapporter l'expression des différents transcrits de l'EGFR dans les gliomes. Le rôle des isoformes pour lesquelles ils codent doit être clarifié. Leur présence pourrait modifier la prise en charge diagnostique et thérapeutique de ces tumeurs.

(Les références bibliographiques sont identiques à celles de l'article)

3.4.2. Article

4. Discussion et perspectives

4.1. Marqueurs moléculaires des gliomes

Dans nos différents travaux, nous avons étudié différents marqueurs de gliomes : l'expression du Ki67, de l'Olig2, de p53, de la nestine, de l'alpha-internexine, la présence des délétions 1p, 19q, 10p et 10q, l'amplification de l'EGFR. Certains sont diagnostiques et d'autres pronostiques. Nous allons discuter successivement de la signification de chacun d'entre eux.

4.1.1. Marqueurs immunohistochimiques usuels : Ki67, Olig2, p53, Nestine

Nous avons qualifié ces marqueurs "d'usuels" car ils sont d'utilisation aisée et reproductible en immunohistochimie dans tous les laboratoires.

Le Ki67 est un marqueur de prolifération utilisé en routine pour le diagnostic de nombreuses tumeurs. Nous avons mis en évidence une relation entre l'index Ki67, le grade et la survie. Ces résultats sont concordants avec ceux de la littérature (14, 57) : l'index Ki67 est un marqueur de prolifération et son expression est liée au grade tumoral dans les gliomes infiltrants.

Olig2, est un facteur de transcription nucléaire exprimé par les cellules progénitrices lors de la différenciation oligodendrogliale. Dans nos travaux, l'expression d'Olig2 est très forte dans les oligodendrogliomes (78% de cellules tumorales marquées en moyenne) tandis qu'elle est plus faible dans les tumeurs astrocytaires (46 à 52% de cellules tumorales marquées en moyenne). Pour expliquer la présence d'une expression d'Olig2 à la fois dans les tumeurs astrocytaires et oligodendrogliales, plusieurs hypothèses peuvent être avancées : soit Olig2 n'est pas un marqueur spécifique de différenciation oligodendrogliale en condition tumorale, soit les populations tumorales sont hétérogènes, soit l'expression d'Olig2 qui est détectée est due à des cellules oligodendrogliales normales résiduelles dans les composantes infiltrantes (138).

Les mutations du gène *p53* codant pour la protéine p53 qui surviennent à un stade précoce semblent préférentiellement être associées aux tumeurs astrocytaires caractérisées par une évolution progressive vers la malignité (astrocytomes de bas grade, astrocytomes anaplasiques, glioblastomes dits secondaires). Ainsi, dans les glioblastomes, la voie de transduction du signal dépendante de p53 est altérée par des mutations du gène *p53* (31, 35, 36). Lorsque le gène p53 est muté, la dégradation de la protéine est diminuée, ce qui conduit à son accumulation et elle peut être détectée par immunohistochimie. Nous avons trouvé une plus forte expression de p53 dans les tumeurs astrocytaires et oligoastrocytaires que dans les oligodendrogliomes et dans les tumeurs de grade III comparées à celles de grade II.

La nestine, est une protéine des filaments intermédiaires exprimée dans les cellules souches et progénitrices. Elle est progressivement remplacée par la GFAP au cours de la maturation cellulaire. Son expression est très variable. Elle apparaît comme un marqueur pronostic intéressant car lorsqu'elle est faiblement exprimée, la médiane de survie est nettement plus élevée (85). L'expression de la nestine est plus forte dans les glioblastomes (85). Les cellules exprimant la nestine ont un aspect indifférencié ou un morphotype astrocytaire.

Les bonnes corrélations que nous avons retrouvées entre leur expression et le type histologique et/ou le grade indiquent qu'ils peuvent faire partie du panel de marqueurs diagnostiques ou pronostiques des gliomes infiltrants.

4.1.2. L'alpha-internexine

L'étude de l'expression de l'INA dans les gliomes est plus récente. Elle s'observe dans les oligodendrogliomes et les gliomes avec pertes 1p et 19q alors qu'elle est absente ou faible dans les tumeurs astrocytaires ou mixtes dépourvues de ces altérations génomiques. D'autre part, les tumeurs avec perte 10q n'expriment pas ou faiblement l'INA contrairement à celle avec rétention de ce bras chromosomique. Dans notre série, toutes les tumeurs avec une forte expression de l'INA ont une rétention du bras chromosomique 10q. Cependant toutes les tumeurs avec cette rétention n'expriment pas l'INA. Cela indiquerait que la rétention du bras 10q est nécessaire mais pas suffisante à l'expression de l'INA.

Nous avons retrouvé comme d'autres auteurs (136) une association entre les pertes 1p et 19q et la forte expression de l'INA. Cependant 3 oligodendrogliomes avec délétions 1p et 19q expriment faiblement l'INA et un oligoastrocytome sans perte 1p ou 19q exprime l'INA. De plus, le marquage obtenu est hétérogène dans une même tumeur. Ainsi, l'INA est un marqueur intéressant à utiliser dans les gliomes en association avec les autres marqueurs déjà utilisés mais ne permet pas de remplacer l'étude moléculaire à la recherche des délétions chromosomiques 1p, 19q, 10p et 10q.

4.1.2. Les marqueurs génomiques et génétiques

4.1.2.1. Les délétions 1p et 19q, 10p, 10q

Un autre moyen de caractériser les tumeurs gliales est l'étude des marqueurs génomiques. L'anomalie qui présente le plus d'intérêt sur le plan diagnostique et pronostique correspond à la codélétion 1p19q (14). Les techniques les plus fréquemment utilisées pour rechercher cette anomalie sont les techniques de FISH et de PCR (recherche d'une perte d'hétérozygotie) (102, 139-142). La CGH est une technique intéressante mais son application en routine est difficile à mettre en œuvre en routine.

Dans un travail personnel réalisé dans le laboratoire et non publié, nous avons comparé les techniques de FISH et de PCR. Parmi les 25 cas analysés avec ces deux techniques, nous avons relevé des résultats discordants dans trois observations :

- Dans un astrocytome pilocytique la FISH permettait d'observer seulement 3,92% de cellules présentant une délétion de la région 1p36 alors que la PCR mettait en évidence la présence de la délétion.

- Dans un oligo-astrocytome de grade III OMS et de grade B HSA, la FISH mettait en évidence 1,20% de cellules présentant une délétion en 19q13 alors que la PCR conclue à la présence de la délétion 1p et 19q.

- Dans un oligo-astrocytome de grade II OMS et de grade B HSA. La FISH de ce cas est bien réalisée sur du tissu tumoral solide et montre une délétion 19q (dans 37,25% des cellules) mais qui n'est pas confirmée par la technique de PCR.

Ces discordances peuvent avoir différentes explications :

- La sensibilité des méthodes et les anomalies qu'elles détectent,
- Les cellules tumorales peuvent présenter une morphologie, un immunophénotype ou un génotype variable,
- En raison de la structure spatiale infiltrante des gliomes, la proportion de cellules tumorales varie, de même que celle de la population de cellules réactionnelles.

La recherche d'une LOH est réalisée à partir de matériel inclus en paraffine. L'ADN tumoral extrait est comparé à de l'ADN non tumoral témoin en général leucocytaire. Pour éviter les faux négatifs, nous effectuons nos analyses dans des zones tumorales contenant au moins 50 % de cellules tumorales. Des coupes sériées colorées permettent un contrôle précis de la zone étudiée et de sa densité tumorale contrairement à la CGH pour laquelle l'analyse est réalisée sur tissu congelé et ne peut donc permettre de contrôle histologique précis.

Les techniques de FISH peuvent s'effectuer sur étalements cytologiques ou sur coupes en paraffine. Chacune de ces méthodes présente ses avantages. Sur smears, comme l'analyse porte sur des noyaux entiers, le seuil diagnostique est de 10% de cellules délétées. En revanche, cette technique ne permet qu'une analyse médiocre de la densité cellulaire tumorale et du microenvironnement. L'utilisation de coupes sériées permet de pallier à ces difficultés. Cependant, l'analyse sur sections tissulaires nécessite de mettre en évidence 35 à 50% de cellules comportant la délétion pour conclure à la présence de cette dernière dans la tumeur (50, 102, 143, 144).

En utilisant un grand nombre de marqueurs, la technique de LOH permet de préciser si la délétion porte sur un bras chromosomique complet ou bien si elle est restreinte à un ou quelques loci. A l'opposé, les sondes FISH proposées dans le commerce ne permettent de mettre en évidence que les délétions en 1p36 et 19q13.

Ces deux techniques FISH et PCR nous semblent complémentaires, chacune pouvant pallier le manque de sensibilité de l'autre (50).

Dans la première série que nous avons étudiée, la proportion de codélétion 1p/19q (78,57%) retrouvée dans les tumeurs oligodendrogiales de la classification OMS est concordante avec les données de la littérature (102, 145). Nos résultats montrent donc que la

codélétion est plus fréquente dans les oligodendrogliomes « classiques ». Il existe donc bien une relation étroite entre différenciation oligodendrogliale et présence de la codélétion 1p/19q (49, 146). Néanmoins des tumeurs à différenciation astrocytaire présentent cette codélétion lorsque l'on regarde que les régions 1p36 et 19q13. Ces données sont conformes à celle de la littérature (145).

Le support moléculaire du meilleur pronostic des tumeurs avec pertes 1p et 19q n'est pas connu. Quelques gènes candidats localisés sur les bras 1p et 19q ont été identifiés comme susceptible de favoriser ou de limiter la progression tumorale. Des études(93, 147) montrent la récurrence de mutations en présence de la translocation déséquilibrée t(1;19) . C'est le cas du gène CIC situé en 19q13.2 et codant pour un répresseur transcriptionnel intervenant sur des gènes du développement mais également dans la régulation de la voie RAS/MAPK. Ces auteurs décrivent également des mutations sur d'autres chromosomes et notamment dans les gènes IDH1 (chromosome 2), NOTCH1 (chromosome 9) et IDH2 (chromosome 15) qui seraient plus fréquentes en présence de la translocation t(1 ; 19).

Nous avons montré que déterminer le statut 1p19q est utile pour discriminer les différents types histologiques de gliomes et pour identifier les tumeurs prenant le contraste de meilleur pronostic. Ainsi le statut 1p19q est un bon marqueur diagnostique et pronostique si l'ensemble des bras chromosomiques 1p et 19q sont analysés.

Différentes types de délétions 10p et 10q peuvent être observées. 50% des astrocytomes anaplasiques et 75% des glioblastomes présentent une perte combinée et complète de 10p et 10q. Les délétions complètes 1p et 19q sont mutuellement exclusives avec les pertes complètes 10p isolées, 10q isolées ou 10p et 10q. Cela témoigne de l'existence de deux voies oncogéniques distinctes pour les tumeurs porteuses de l'un ou de l'autre type de délétion.

Il existe donc deux profils distincts dans les gliomes concernant les délétions 1p, 19q, 10p et 10q. Le premier correspond aux oligodendrogliomes qui présentent une codélétion 1p/19q sans perte 10p ou 10q. Il s'agit d'anomalies retrouvées aussi bien dans les oligodendrogliomes de grade II que de grade III. Les délétions 1p et 19q signent ainsi une voie oncogénétique particulière et apparaissent également comme des marqueurs diagnostiques. Le second profil correspond aux tumeurs astrocytaires avec une absence de délétion 1p et 19q et à la présence de délétions 10p, 10q et ou 10p10q. Les délétions du

chromosome 10 sont principalement observées dans les tumeurs de grades III et IV. Leur présence est un signe de progression tumorale dans une voie d'oncogénèse qui est propre aux tumeurs astrocytaires et différente de celle des oligodendrogliomes.

PTEN est un gène suppresseur de tumeurs situé en (10q23). Il code pour une protéine dont l'activité lui permet d'inhiber la voie Ras/Mek/Erk, ainsi que FAK, la kinase d'adhésion focale et la voie PI3K/Akt. Elle agit ainsi à la fois sur la morphologie, le caractère invasif et la prolifération des cellules tumorales. Le gène *PTEN* est plus souvent délété dans les glioblastomes. La mutation de *TP53* et la perte de *PTEN* semblent mutuellement exclusifs (35).

4.1.2.2 Amplification de l'EGFR

Un autre marqueur de mauvais pronostic décrit dans la littérature est l'amplification de l'EGFR (148). L'implication de l'EGFR dans de la tumorigénèse des gliomes est à l'origine du développement de thérapies anti-EGFR. Certaines études (101, 103) montrent que l'amplification génique de l'EGFR ou son expression protéique ont une valeur prédictive péjorative par rapport à la réponse aux traitements.

Dans nos différents travaux, la présence d'une amplification génique de l'EGFR apparaît comme un marqueur de malignité. Elle s'observe dans 40 à 50% des glioblastomes.

Nos études ont également permis d'évaluer l'utilité de l'immunohistochimie et de la FISH pour étudier le profil d'expression de l'EGFR. La FISH est une technique lourde et fastidieuse au contraire de l'immunohistochimie. Nos résultats indiquent qu'il n'est pas utile de réaliser la FISH en l'absence d'expression protéique recherchée avec un anticorps dirigé contre le domaine extracellulaire puisque l'amplification est absente dans ces tumeurs ou en présence d'une expression retrouvée avec un anticorps dirigé contre le domaine intracellulaire puisque l'amplification est présente dans ces tumeurs. A notre avis, la FISH n'est utile que dans les tumeurs pour lesquelles les résultats de l'étude immunohistochimique ne correspondent à aucune de ces deux situations.

4.1.3. Type histologique et profil moléculaire

Les différents marqueurs que nous avons utilisés dans nos travaux permettent de définir plusieurs profils :

- Les oligodendrogliomes de morphologie classique présentent une expression de l'INA dans plus de 10% des cellules tumorales, une forte expression d'Olig2, une perte complète des bras chromosomiques 1p et 19q et une rétention du bras 10q.
- Les glioblastomes et les astrocytomes se caractérisent par une expression de l'INA dans moins de 10% des cellules tumorales, une surexpression de p53 et de la nestine, des pertes des bras chromosomiques 10p10q ou 10q et une amplification de l'EGFR
- Les oligoastrocytomes ont un profil se rapprochant des tumeurs de type astrocytaire mais sans marqueur spécifique.

Jusqu'au développement des techniques de biologie moléculaire, le diagnostic des gliomes reposait sur l'aspect histologique. Avec la mise en évidence d'anomalies moléculaires caractéristiques de certains types de tumeurs gliales, des classifications moléculaires ont été proposées. Cependant, aucune analyse de biologie moléculaire ne peut se faire sans étude morphologique. Celle-ci intervient non seulement au moment de la sélection des zones tumorales à étudier mais également lors de l'interprétation des résultats de biologie moléculaire.

La bonne corrélation entre le diagnostic histologique et le diagnostic moléculaire génomique repose sur la rigueur avec laquelle la zone analysée en biologie moléculaire a été sélectionnée. Ainsi, dans notre expérience, les délétions 1p et 19 q sont quasi-constantes dans les zones présentant des caractéristiques histologiques oligodendrogliales typiques : des cellules tumorales avec un noyau rond, à chromatine mottée et au cytoplasme clarifié éventuellement associées à un contingent minigémistocytaire GFAP positif.

L'interprétation de l'analyse moléculaire nécessite un contrôle histologique. Quelle que soit la technique de biologie moléculaire utilisée, il existe un seuil de sensibilité et des valeurs limites pour lesquelles il peut être difficile de porter un diagnostic formel. Par exemple, lorsque la densité tumorale est insuffisante (inférieure à 20% de cellules tumorales)

les techniques de PCR ne sont pas assez sensibles pour détecter une anomalie génomique et cela peut avoir comme conséquence de méconnaître une anomalie ou bien de ne pas pouvoir conclure (zone d'incertitude). De plus, alors que la zone sélectionnée était identique pour tous les marqueurs testés, nous avons trouvé pour certains marqueurs de LOH des valeurs ambiguës ne permettant pas d'affirmer s'ils étaient délétés ou retenus (publication n° 2, Figure 1). D'autre part, il n'est pas certain que les CTI présentent le même génotype que les cellules constituant le TT et que ces deux contingents réagissent d'une manière identique aux traitements. Ceci est illustré par les récurrences observées dans les glioblastomes traités par anti-VEGF. Après une période d'amélioration liée à l'effet toxique sur le contingent cellulaire du TT, ces tumeurs récidivent à partir de la composante de CTI dont la sensibilité au traitement est différente(149).

Les techniques de biologie moléculaire sont réalisées sur des lysats cellulaires ce qui ne permet pas d'identifier le type cellulaire porteur de l'anomalie génétique. Seule une analyse morphologique permet de distinguer le type cellulaire en cause, cellules tumorales ou cellules stromales. On peut espérer que dans les années à venir, les techniques de microdissection et de microanalyses se simplifieront et permettront une approche combinée moléculaire et morphologique.

L'étude immunohistochimique représente à la fois un complément et une alternative à l'analyse moléculaire génomique. En apportant une approche morphologique, en technique standard ou en double marquage, elle permet ainsi une meilleure caractérisation du type cellulaire. L'immunohistochimie permet également de démontrer qu'une protéine est bien exprimée, même s'il faut dans certains cas l'associer à d'autres méthodes comme le Western blot. Ces aspects nous sont clairement apparus lorsque nous avons étudié l'expression de l'EGFR. De plus, l'étude immunohistochimique peut se substituer à l'analyse génomique dans la mise en évidence d'une anomalie génétique. IDH1 en est un exemple, nous y reviendrons.

Ainsi, à l'heure actuelle, si l'on souhaite qu'une classification des gliomes diffuses réponde à ce que l'on attend d'elle pour une prise en charge optimale des malades, elle doit nécessairement associer des données morphologiques (cytologiques, histologiques et immunohistochimiques) et génomiques. Ces données ne sont cependant pas suffisantes à elles seules. L'intégration des caractéristiques radiologiques est une étape essentielle de la démarche diagnostique et la décision thérapeutique finale prend en compte d'autres facteurs comme la localisation de la tumeur et son étendue, l'âge et l'état général du malade.

4.2. Les variants de l'EGFR

Notre dernier axe de travail a été l'étude de l'expression des isoformes protéiques et des variants ARN de l'*EGFR*. Les résultats obtenus en immunohistochimie appuient l'hypothèse de l'expression d'isoformes tronquées de l'EGFR. La détection ou non de ces dernières dépend de l'anticorps utilisé et cela pourrait expliquer les discordances observées dans la littérature concernant l'analyse de l'expression de l'EGFR dans différentes tumeurs. En combinaison avec d'autres marqueurs comme Olig2, p53 ou les délétions 1p19q, l'étude de l'expression de l'EGFR pourrait aider à caractériser les gliomes.

L'étude de l'expression génique des variants montre que les formes tronquées EGFRv2, v3 et v4 codant pour les isoformes b, c et d sont exprimés avec le variant EGFRv1 et le mutant EGFRvIII et que les profils d'expression des variants dépendent des types histologiques. Ces variants v2, v3 et v4 dérivent tous du variant 1. Ils seraient obtenus par épissage alternatif. Ce mécanisme reposerait sur la modification des sites donneurs et accepteurs d'épissages. Si l'expression des différents variants est liée, elle reste dépendante des sites de polyadénylation de chacun des exons concernés.

4.3. Perspectives

4.3.1. Analyser nos résultats en fonction de la classification de l'Hôpital Sainte-Anne

L'utilisation de cette classification permettra probablement de reclasser un certain nombre d'oligoastrocytomes et de glioblastomes, et d'identifier parmi eux des tumeurs glioneuronales malignes (TGNM). Dans, ce travail, nous compléterons le panel de marqueurs avec la recherche des mutations IDH1/2 et d'une polysomie du chromosome 1.

4.3.2. IDH1 et 2

Les mutations d'IDH1/2 ont récemment été décrites dans les gliomes infiltrants quelques soit le sous type histologique (62 à 70%) le plus souvent il s'agit de mutations de IDH1 (150). La présence de telles mutations serait associée à une meilleur survie au contraire de la présence d'une amplification de l'EGFR qui serait associée à une pronostic péjoratif (151). Plusieurs auteurs proposent d'inclure le statut mutationnel de IDH1 dans la classification de l'OMS (152). Nous n'avons pas étudié ces mutations dans nos travaux et nous avons le projet de compléter l'analyse de nos séries par leur recherche.

Les mutations du gène *IDH1* et de *IDH2* (63-65) correspondent dans 90% des cas aux mutations notées R132H pour IDH1 et R172H pour IDH2. Elles s'observent dans 59% à 88% des astrocytomes diffus de grade II, 50% à 78% des astrocytomes anaplasiques et 50% à 88% des glioblastomes secondaires (63, 65, 68-74). Le produit de la mutation R132H est sélectivement reconnu par l'anticorps anti-R132H et donc peut une étude immunohistochimique peut remplacer en routine diagnostique la recherche de la mutation (153). Deux études récentes montrent que la présence de ces mutations est associée à une augmentation de la survie des patients porteurs de gliomes de grade II, III et IV (70, 75). La mutation d'*IDH1* ou *IDH2* est étroitement associée au profil moléculaire : elle est constante dans les gliomes avec codélétion 1p19q, et pratiquement absente dans les gliomes avec amplification de l'EGFR(74). La mutation d'*IDH1* ou *IDH2* est un facteur majeur de bon pronostic, quel que soit le grade et ce indépendamment du profil moléculaire (76). Il est donc nécessaire de rechercher dans tous les gliomes l'expression du mutant R132H de IDH1 par immunohistochimie et en cas de négativité de compléter cette étude par une étude de biologie moléculaire pour rechercher directement une mutation sur IDH1 ou IDH2.

4.3. 3. Les variants de l'EGFR et ses isoformes : rôle et expression dans les autres tumeurs

Nos résultats indiquent que le rôle de l'EGFR dans l'oncogenèse des gliomes est très complexe et que les isoformes tronquées pourraient intervenir. Actuellement la fonction de ces isoformes tronquées est mal connue, particulièrement *in vivo*. Leur présence ont été mise en évidence dans les adénocarcinomes mammaires et endométriaux (154, 155), les carcinomes cervicaux (156) et les cancers pulmonaires non à petite cellules (157). Notre étude

est la première à rapporter l'expression des différents transcrits de l'EGFR dans les gliomes. *In vitro*, elles pourraient avoir un rôle régulateur de la voie de l'EGFR dans les cellules normales et tumorales. Elles seraient capables de diminuer la prolifération cellulaire, soit par compétition au niveau de la fixation du ligand soit par formation d'hétérodimère donc sans activité tyrosine kinase. La présence des formes tronquées doit ainsi être prise en compte dans la prise en charge thérapeutique. Les interactions entre ces isoformes et les traitements anti-EGFR ne sont pas connues. Leur présence pourrait expliquer l'échec des thérapies dirigées contre le domaine extracellulaire. Ainsi, il a été rapporté que l'expression de formes tronquées serait prédictive de la réponse au gefitinib dans des adénocarcinomes mammaires. Muller *et al* (155) détectent ainsi une isoforme soluble de 110kd (isoforme D) circulante dans le sérum dont la faible expression serait liée à un plus mauvais pronostic et dont la décroissance serait proportionnelle à la réponse thérapeutique. D'autres études montrent un polymorphisme d'expression de l'EGFR avec des variants présentant des pronostics différents et une susceptibilité variable aux traitements usuels dans les adénocarcinomes endométriaux (158). Halle *et al* mettent en évidence un plus mauvais pronostic en présence des isoformes solubles (156).

Pour tenter d'apporter quelques éclaircissements sur le rôle de ces isoformes dans la gliomagenèse, nous développons actuellement des cultures cellulaires de glioblastomes (lignée U87). Cette étude s'effectuera selon deux modèles. Dans le premier modèle, les cellules seront transfectées de manière stable par les ADNc correspondant aux isoformes, seuls ou en association, afin de les surexprimer. Dans un second modèle, les cellules seront soumises à des ShRNA spécifiques de chaque isoforme, afin d'en inhiber l'expression de manière isolée ou en association. Les modèles seront ensuite utilisés pour observer le rôle des isoformes dans les mécanismes cellulaires après stimulation des cellules par des facteurs de croissance (ligands) spécifiques de l'EGFR (épiréguline, TGF α , EGF) ou en présence ou non des molécules de thérapies classique et ciblant l'EGFR (Cetuximab, Gefitinib, Panitumumab...). Le rôle des isoformes de l'EGFR dans la modification des mécanismes cellulaires par stimulation sera étudié par l'analyse de la croissance et de la prolifération des cellules, des processus apoptotiques et de l'activité de la voie de transduction de l'EGFR (phosphorylation de la partie intracellulaire de l'isoforme α , activation de facteurs de signalisation en aval (BRAF, KRAS, PI3K, mTOR...)).

Parallèlement, nous analysons l'expression génique et protéique de l'EGFR dans d'autres tumeurs. Ces travaux se déroulent au sein de l'Equipe Accueil 3842. Certains résultats sont en cours de publication.

Ainsi, dans une série de 69 méningiomes, nous avons montré que les différents variants sont exprimés avec un profil propre aux méningiomes (une forte expression des variants v1 et v4) et qu'une forte expression de ces variants serait de bon pronostic. Il semblerait que le mécanisme oncogénétique impliquant la voie de l'EGFR dans les méningiomes serait différent de celui des gliomes (159).

Deux études sont en cours dans le service et concernent des tumeurs dont le traitement peut faire appel à des thérapies anti-EGFR, les adénocarcinomes colorectaux et les adénocarcinomes pulmonaires. L'approche sera superposable à celle développée pour les gliomes avec une analyse de l'expression protéique et génique sur des tumeurs humaines, couplée à une analyse expérimentale sur cultures cellulaires en utilisant différents modèles.

Notre objectif est de préciser le rôle des variants de l'EGFR dans l'apparition de résistances à des thérapies ciblant la voie de l'EGFR.

5. Conclusion

Concernant les délétions 1p et 19q nous avons pu établir une cartographie de ces délétions et préciser leurs valeurs diagnostique et pronostique. Les délétions complètes 1p et 19q sont associées avec le phénotype classique d'oligodendrogliome et à une survie globale ou sans récurrence plus longue.

L'expression de l'INA recherchée par immunohistochimie est prédictive des délétions 1p et 19q. Les délétions des bras chromosomiques 10p et 10q ont été rapportées dans les astrocytomes et les glioblastomes et sont associées à un mauvais pronostic. L'expression de l'INA est plus importante dans les oligodendrogliomes que dans les autres gliomes. Les tumeurs avec les délétions 1p et 19q ont un profil d'expression proneural et l'INA est le gène de la lignée neuronale le plus exprimé dans ces tumeurs. Les anomalies moléculaires apparaissent ainsi comme des marqueurs diagnostiques mais mettent également en évidence des voies oncogénétiques différentes.

L'amplification du gène de l'EGFR est considérée comme un marqueur diagnostique, notamment dans les glioblastomes, et sa voie d'activation représente une cible thérapeutique potentielle. L'amplification est observée dans les glioblastomes. C'est un marqueur de malignité liée au type histologique et au grade.

Concernant l'analyse des variants et des isoformes de l'EGFR, les résultats montrent que les gliomes diffus expriment les différentes isoformes protéiques : tous les variants sont exprimés et leurs profils d'expression diffèrent selon le type histologique. Actuellement le rôle de ces isoformes est mal connu, particulièrement *in vivo*. A notre connaissance, cette étude est la première à rapporter l'expression des différents transcrits de l'EGFR dans les gliomes.

L'oncogénèse des gliomes et les anomalies moléculaires qui les caractérisent sont de mieux en mieux connus. La classification histologique peut maintenant s'appuyer sur des marqueurs moléculaires caractéristiques de chacun des types histologiques. Ces marqueurs permettent également de mieux appréhender le pronostic de ces tumeurs et leur réponse aux thérapeutiques.

De nombreux points restent néanmoins à éclaircir : corréler l'ensemble des ces anomalies moléculaires avec les groupes histologiques définis selon la classification HSA, rechercher les mutations d'IDH1/2, valider ces résultats en fonction des densités tumorales, évaluer l'expression des isoformes de l'EGFR dans d'autres tumeurs et comparer leurs profils d'expression à ceux des gliomes, déterminer le rôle de ces isoformes et leur valeur théranostique.

6. Annexes

6.1. Publications scientifiques dans des revues à comité de lecture référencées

2012

- **Guillaudeau A**, Durand K, Rabinovitch-Chable H, Pommepuy I, Mesturoux L, Robert S, Chaunavel A, Moreau JJ, Labrousse F. Adult diffuse gliomas produce mRNA transcripts encoding EGFR isoforms lacking a tyrosine kinase domain. *Int J Oncol* 2012;40:1142-52. IF=2,571. SIGAPS C.

- Vincent-Fabert C, Fiancette R, Rouaud P, Baudet C, Truffinet V, Magnone V, **Guillaudeau A**, Cogné M, Dubus P, Denizot Y. A defect of the INK4-Cdk4 checkpoint and *c-myc* collaborate in blastoid mantle cell lymphoma (MCL)-like lymphoma formation in mice. *Am J Pathol*, article accepté. IF=5, 224. SIGAPS A.

- Giraud S, Bounaix Morand du Puch C, Fermeaux V, **Guillaudeau A**, Lautrette C. Oncogramme responses of breast tumour cells treated with Herceptin correlate with C-erb B2 pathologic status. *Anticancer Res*, article accepté. IF=1,656. SIGAPS D.

2011

- Thirant C, Varlet P, Lipecka J, Le Gall M, Broussard C, Chafey P, Studler JM, Lacombe J, Lions S, **Guillaudeau A**, Camoin L, Daumas-Duport C, Junier MP, Chneiweiss H. Proteomic analysis of oligodendrogliomas expressing a mutant isocitrate dehydrogenase-1. *Proteomics* 2011;11:4139-54. IF= 4,815. SIGAPS B.

- Durand K, **Guillaudeau A**, Pommepuy I, Mesturoux L, Chaunavel A, Gadeau E, Porcheron M, Moreau JJ, Labrousse F. Alpha-internexin expression in gliomas: relationship with histological type, and 1p, 19q, 10p and 10q status. *J Clin Pathol* 2011;64:793-801. IF = 2,342. SIGAPS C.

2010

- De Armas R, Durand K, **Guillaudeau A**, Weinbreck N, Robert S, Moreau JJ, Caire F, Acosta G, Pebet M, Chaunavel A, Marin B, Labrousse F, Denizot Y. mRNA levels of enzymes and receptors implicated in arachidonic acid metabolism in gliomas. *Clin Biochem* 2010;43:827-35. IF = 2. SIGAPS C.

- **Guillaudeau A***, Durand K*, Weinbreck N, DeArmas R, Robert S, Chaunavel A, Pommepuy I, Bourtoumieux S, Caire F, Sturtz F, Labrousse F. * contribution équivalente. 1p19q LOH patterns and expression of p53 and Olig2 in gliomas: relation with histological types and prognosis. *Mod Pathol* 2010;23:619-28. IF = 4,678. SIGAPS B.

- Jacques J, Dickson Z, Carrier P, Essig M, **Guillaudeau A**, Lacour C, Bocquentin F, Aldigier JC, Rerolle JP. Severe sirolimus-induced acute hepatitis in a renal transplant recipient. *Transpl Int* 2010;23:967-70. IF = 3,115. SIGAPS B.

- Gantois C, Cendras J, **Guillaudeau A**, Bedane C, Bonnetblanc JM. Miliun en plaque de la lèvre avec atteinte de la muqueuse : complication d'un piercing. *Ann Dermatol Venereol.* 2010;137:667-8. IF = 0,482. SIGAPS E.

- Woillard JB, Rerolle JP, Picard N, Rousseau A, **Guillaudeau A**, Munteanu E, Essig M, Drouet M, Le Meur Y, Marquet P. Donor P-gp polymorphisms strongly influence renal function and graft loss in a cohort of renal transplant recipients on cyclosporine therapy in a long-term follow-up. *Clin Pharmacol Ther* 2010;88:95-100. IF = 7,586. SIGAPS A.

- Koffi B, **Guillaudeau A**, Sekkal S, Paraf F, Labrousse F, Weinbreck N. Une lésion valvulaire cardiaque inhabituelle. *Ann Pathol* 2010;30 :40-2. IF = 0,474. SIGAPS E.

2009

- **Guillaudeau A**, Durand K, Pommepuy I, Robert S, Chaunavel A, Lacorre S, De Armas R, Bourtoumieux S, El Demery M, Moreau JJ, Labrousse F. Determination of EGFR status in gliomas: usefulness of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2009;17:220-6. IF = 1,487. SIGAPS NC.

- Koffi B, **Guillaudeau A**, Delage-Corre M, Labrousse F, Paraf F. Polypose lipomateuse colique. *Ann Pathol* 2009;29:421-3. IF = 0,474. SIGAPS E.

Article soumis

- **Guillaudeau A**, Durand K, Bessette B, Pommepuy I, Progetti F, Robert S, Chaunavel A, Caire F, Rabinovitch-Chable H, Labrousse F. Transcripts encoding EGFR lacking a tyrosine kinase domain are expressed in meningiomas, *Plos One*. IF=4,411. SIGAPS B.

6.2. Communications Orales (CO) et Affichée (CA)

2012

- **Guillaudeau A**, Chable-Rabinovitch H, Durand K, Robert S, Labrousse F. EGFR Expression Pattern in Meningiomas. 101th Annual Meeting of the United States and Canadian Academy of Pathology. Vancouver, BC, Canada, March 17-23, 2012 (CA)

2011

- **Guillaudeau A**, Durand K, Rabinovitch-Chable H, Pommepuy I, Robert S, Moreau JJ, Labrousse F. Etude de l'expression des variants et des isoformes de l'EGFR dans les gliomes. 7^{èmes} Journées du Cancéropôle Grand Sud-Ouest, 19 et 20 octobre 2011 (CO). Résumé paru dans Bull Cancer 2011;98S.

- **Guillaudeau A**, Chable-Rabinovitch H, Durand K, Robert S, Labrousse F. EGFR/HER1 isoforms expression in gliomas. 100th Annual Meeting of the United States and Canadian Academy of Pathology. San Antonio, February 26-March 4 2011 (CO) Résumé paru dans Modern Pathol 2010;24S1:380A.

2010

- **Guillaudeau A**, Durand K, Pommepuy I, Robert S, Labrousse F. Expression des variants de l'EGFR dans les gliomes infiltrants. Société Française de Neuropathologie. Paris, 3 décembre 2010, (CO).

- **Guillaudeau A**, Durand K, Pommepuy I, Weinbreck N, Caire F, Robert S, Gadeaud E, Chaunavel A, Labrousse F. Etude des délétions 1p, 19q, 10p, 10q et de l'expression de l'alpha-internexine dans les gliomes. Carrefour Pathologie, Paris, novembre 2010 (CO). Résumé paru dans Ann Pathol 2010;30:S135.

- **Guillaudeau A**, Durand K, Robert S, Chaunavel A, Labrousse F. Gestion et exploitation des collections biologiques en pathologie cancéreuse digestive : exemple du CHU de Limoges. Cancéropôle du Grand Sud-Ouest. Toulouse, 18-19 juin 2010 (CO).

2009

- Durand K, Weinbreck N, **Guillaudeau A**, Pommepuy I, Caire F, Robert S, Chaunavel A, Labrousse F. 1p/19q loss of heterozygosity patterns in infiltrative gliomas. 98th Annual Meeting of the United States and Canadian Academy of Pathology, Boston, march 7-13, 2009. (CA) Résumé paru dans Modern Pathol 2009;22S1:329A

2008

- **Guillaudeau A**, DeArmas R, Robert S, Durand A, Pommepuy I, Labrousse F, Acosta G, Mañana G. Expression de p53, olig2, nestina, GFAP y amplificación del EGFR en tumores de estirpe glial. 1er Congreso Uruguayo de Neurocirugía - 1er Congreso Uruguayo de Neurorradiología. Curso pre – congreso de la World Federation of Neurosurgical Societes. ” 3 – 6 Abril, 2008. Montevideo, Uruguay, (CA).

- **Guillaudeau A**, Durand K, DeArmas R, Robert S, Durand A, Pommepuy I, Labrousse F, Acosta G, Mañana G. Codelección 1p/19q por FISH et PCR en tumores de estirpe glial. Resultados preliminares. 1er Congreso Uruguayo de Neurocirugía - 1er Congreso Uruguayo de Neurorradiología. Curso pre – congreso de la World Federation of Neurosurgical Societes. ” 3 – 6 Abril, 2008. Montevideo, Uruguay, (CA).

- Durand K, **Guillaudeau A**, Weinbreck N, Pommepuy I, Caire F, Robert S, Gadeaud E Chaunavel A, Labrousse F. Perte des chromosomes 1p et 19q dans les gliomes infiltrants. Société Française de Neuropathologie. Paris, 5 décembre 2008, (CO).

2007

- **Guillaudeau A**, Pommepuy I, de Armas R, Bourthoumieux S, Delage-Corre M, Robert S, Durand A, Preux PM, Labrousse F. Expression de p53, olig2, nestine, GFAP et amplification de l’EGFR : analyse de 35 gliomes. Société Française de Neuropathologie. Limoges, 1 et 2 juin 2007, (CO).

- **Guillaudeau A**, Durand K, de Armas R, Robert S, Caire F, Bourthoumieux S, Pommepuy I, Preux PM, Sturtz F, Labrousse F. Recherche de la codélétion 1p/19q par FISH et PCR dans une série de 35 gliomes. Résultats préliminaires. Société Française de Neuropathologie. Limoges, 1 et 2 juin 2007, (CO).

7. Bibliographie

1. Hadjipanayis CG, Van Meir EG. Brain cancer propagating cells: biology, genetics and targeted therapies. *Trends Mol Med.* 2009 Nov;15(11):519-30.
2. Colleoni F, Torrente Y. The new challenge of stem cell: brain tumour therapy. *Cancer Lett.* 2008 Dec 8;272(1):1-11.
3. DeAngelis LM. Brain tumors. *N Engl J Med.* 2001 Jan 11;344(2):114-23.
4. Surawicz TS, McCarthy BJ, Kupelian V, Jukich PJ, Bruner JM, Davis FG. Descriptive epidemiology of primary brain and CNS tumors: results from the Central Brain Tumor Registry of the United States, 1990-1994. *Neuro Oncol.* 1999 Jan;1(1):14-25.
5. Louis DN, Oh, Wiestler OD, Cavenee WK. WHO Classification of tumours of the central nervous system. Lyon: IARC Press; 2007.
6. Daumas-Duport C, Scheithauer B, O'Fallon J, Kelly P. Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method. *Cancer.* 1988 Nov 15;62(10):2152-65.
7. Andon A, Grill J, Vassal G, Couanet D, Hartmann O. Les tumeurs du système nerveux central. 2005.
8. Figarella-Branger D, Colin C, Coulibaly B, Quilichini B, Maues De Paula A, Fernandez C, et al. Classification histologique et moléculaire des gliomes. *Rev Neurol (Paris).* 2008 Jun-Jul;164(6-7):505-15.
9. Kernohan JW, Mabon RF, et al. A simplified classification of the gliomas. *Mayo Clin Proc.* 1949 Feb 2;24(3):71-5.
10. Ringertz N. Grading of gliomas. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1950;27(1):51-64.
11. Mennel HD. Grading of intracranial tumors following the WHO classification. *Neurosurg Rev.* 1991;14(4):249-60.
12. Singh SK, Clarke ID, Hide T, Dirks PB. Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene.* 2004 Sep 20;23(43):7267-73.
13. Kleihues P, Cavenee WK. World Health Organization classification of tumors of the central nervous system pathology and genetics of tumors of the nervous system. Lyon: IARC Press; 2000.
14. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007 Aug;114(2):97-109.
15. Daumas-Duport C, Beuvon F, Varlet P, Fallet-Bianco C. Gliomes: classifications de l'OMS et de l'Hôpital Sainte-Anne. *Ann Pathol.* 2000 Oct;20(5):413-28.
16. Daumas-Duport C, Tucker ML, Kolles H, Cervera P, Beuvon F, Varlet P, et al. Oligodendrogliomas. Part II: A new grading system based on morphological and imaging criteria. *J Neurooncol.* 1997 Aug;34(1):61-78.
17. Daumas-Duport C, Varlet P, Tucker ML, Beuvon F, Cervera P, Chodkiewicz JP. Oligodendrogliomas. Part I: Patterns of growth, histological diagnosis, clinical and imaging correlations: a study of 153 cases. *J Neurooncol.* 1997 Aug;34(1):37-59.
18. Pekny M, Nilsson M. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia.* 2005 Jun;50(4):427-34.
19. Joachim T, Ram Z, Rappaport ZH, Simon M, Schramm J, Wiestler OD, et al. Comparative analysis of the NF2, TP53, PTEN, KRAS, NRAS and HRAS genes in sporadic and radiation-induced human meningiomas. *Int J Cancer.* 2001 Oct 15;94(2):218-21.
20. Colin C, Virard I, Baeza N, Tchoghandjian A, Fernandez C, Bouvier C, et al. Relevance of combinatorial profiles of intermediate filaments and transcription factors for glioma histogenesis. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2007 Aug;33(4):431-9.

21. Burger P, Scheithauer B. *Tumors of the Central Nervous System: Armed Forces Institute of Pathology (AFIP); 2008.*
22. Kelly PJ, Daumas-Duport C, Scheithauer BW, Kall BA, Kispert DB. *Stereotactic histologic correlations of computed tomography- and magnetic resonance imaging-defined abnormalities in patients with glial neoplasms. Mayo Clin Proc. 1987 Jun;62(6):450-9.*
23. Varlet P, Soni D, Miquel C, Roux FX, Meder JF, Chneiweiss H, et al. *New variants of malignant glioneuronal tumors: a clinicopathological study of 40 cases. Neurosurgery. 2004 Dec;55(6):1377-91: discussion 91-2.*
24. Dietemann J-L. *Neuro-Imagerie diagnostique. précis Im, editor: Masson; 2007.*
25. Shimura T, Hirano A, Nakasu S, Llena JF, Leeds NE. *[Multifocal glioma of the brain--an autopsy case]. No Shinkei Geka. 1986 Jan;14(1):97-101.*
26. Chamberlain MC. *Radiographic patterns of relapse in glioblastoma. J Neurooncol. 2011 Jan;101(2):319-23.*
27. Louis DN, Holland EC, Cairncross JG. *Glioma classification: a molecular reappraisal. Am J Pathol. 2001 Sep;159(3):779-86.*
28. Mischel PS, Cloughesy TF. *Targeted molecular therapy of GBM. Brain Pathol. 2003 Jan;13(1):52-61.*
29. Mischel PS, Nelson SF, Cloughesy TF. *Molecular analysis of glioblastoma: pathway profiling and its implications for patient therapy. Cancer Biol Ther. 2003 May-Jun;2(3):242-7.*
30. Mischel PS, Shai R, Shi T, Horvath S, Lu KV, Choe G, et al. *Identification of molecular subtypes of glioblastoma by gene expression profiling. Oncogene. 2003 Apr 17;22(15):2361-73.*
31. Ohgaki H, Kleihues P. *Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. J Neuropathol Exp Neurol. 2005 Jun;64(6):479-89.*
32. Smith JS, Jenkins RB. *Genetic alterations in adult diffuse glioma: occurrence, significance, and prognostic implications. Front Biosci. 2000 Jan 1;5:D213-31.*
33. Smith JS, Perry A, Borell TJ, Lee HK, O'Fallon J, Hosek SM, et al. *Alterations of chromosome arms 1p and 19q as predictors of survival in oligodendrogliomas, astrocytomas, and mixed oligoastrocytomas. J Clin Oncol. 2000 Feb;18(3):636-45.*
34. Smith JS, Tachibana I, Passe SM, Huntley BK, Borell TJ, Iturria N, et al. *PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. J Natl Cancer Inst. 2001 Aug 15;93(16):1246-56.*
35. Kleihues P, Ohgaki H. *Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. Neuro Oncol. 1999 Jan;1(1):44-51.*
36. Gross MW, Kraus A, Nashwan K, Mennel HD, Engenhart-Cabillic R, Schlegel J. *Expression of p53 and p21 in primary glioblastomas. Strahlenther Onkol. 2005 Mar;181(3):164-71.*
37. Soussi T. *The p53 tumor suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation. Ann N Y Acad Sci. 2000 Jun;910:121-37; discussion 37-9.*
38. Collins VP. *Brain tumours: classification and genes. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2004 Jun;75 Suppl 2:ii2-11.*
39. Ichimura K, Bolin MB, Goike HM, Schmidt EE, Moshref A, Collins VP. *Deregulation of the p14ARF/MDM2/p53 pathway is a prerequisite for human astrocytic gliomas with G1-S transition control gene abnormalities. Cancer Res. 2000 Jan 15;60(2):417-24.*
40. Okada Y, Hurwitz EE, Esposito JM, Brower MA, Nutt CL, Louis DN. *Selection pressures of TP53 mutation and microenvironmental location influence epidermal growth*

factor receptor gene amplification in human glioblastomas. Cancer Res. 2003 Jan 15;63(2):413-6.

41. Ueki K, Nishikawa R, Nakazato Y, Hirose T, Hirato J, Funada N, et al. Correlation of histology and molecular genetic analysis of 1p, 19q, 10q, TP53, EGFR, CDK4, and CDKN2A in 91 astrocytic and oligodendroglial tumors. *Clin Cancer Res. 2002 Jan;8(1):196-201.*

42. Schmidt EE, Ichimura K, Reifenberger G, Collins VP. CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion or CDK4 amplification occurs in the majority of glioblastomas. *Cancer Res. 1994 Dec 15;54(24):6321-4.*

43. Jen J, Harper JW, Bigner SH, Bigner DD, Papadopoulos N, Markowitz S, et al. Deletion of p16 and p15 genes in brain tumors. *Cancer Res. 1994 Dec 15;54(24):6353-8.*

44. Burns KL, Ueki K, Jhung SL, Koh J, Louis DN. Molecular genetic correlates of p16, cdk4, and pRb immunohistochemistry in glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol. 1998 Feb;57(2):122-30.*

45. Ueki K, Ono Y, Henson JW, Efird JT, von Deimling A, Louis DN. CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated. *Cancer Res. 1996 Jan 1;56(1):150-3.*

46. Costello JF, Berger MS, Huang HS, Cavenee WK. Silencing of p16/CDKN2 expression in human gliomas by methylation and chromatin condensation. *Cancer Res. 1996 May 15;56(10):2405-10.*

47. Fueyo J, Gomez-Manzano C, Bruner JM, Saito Y, Zhang B, Zhang W, et al. Hypermethylation of the CpG island of p16/CDKN2 correlates with gene inactivation in gliomas. *Oncogene. 1996 Oct 17;13(8):1615-9.*

48. Bortolotto S, Chiado-Piat L, Cavalla P, Bosone I, Chio A, Mauro A, et al. CDKN2A/p16 inactivation in the prognosis of oligodendrogliomas. *Int J Cancer. 2000 Nov 15;88(4):554-7.*

49. Barbashina V, Salazar P, Holland EC, Rosenblum MK, Ladanyi M. Allelic losses at 1p36 and 19q13 in gliomas: correlation with histologic classification, definition of a 150-kb minimal deleted region on 1p36, and evaluation of CAMTA1 as a candidate tumor suppressor gene. *Clin Cancer Res. 2005 Feb 1;11(3):1119-28.*

50. Bouvier C, Roll P, Quilichini B, Metellus P, Calisti A, Gilles S, et al. Deletions of chromosomes 1p and 19q are detectable on frozen smears of gliomas by FISH: usefulness for stereotactic biopsies. *J Neurooncol. 2004 Jun;68(2):141-9.*

51. Cairncross JG. Cognition in survivors of high-grade glioma. *J Clin Oncol. 1998 Sep;16(9):3210-1.*

52. Hashimoto N, Murakami M, Takahashi Y, Fujimoto M, Inazawa J, Mineura K. Correlation between genetic alteration and long-term clinical outcome of patients with oligodendroglial tumors, with identification of a consistent region of deletion on chromosome arm 1p. *Cancer. 2003 May 1;97(9):2254-61.*

53. Griffin CA, Burger P, Morsberger L, Yonescu R, Swierczynski S, Weingart JD, et al. Identification of der(1;19)(q10;p10) in five oligodendrogliomas suggests mechanism of concurrent 1p and 19q loss. *J Neuropathol Exp Neurol. 2006 Oct;65(10):988-94.*

54. Jenkins RB, Blair H, Ballman KV, Giannini C, Arusell RM, Law M, et al. A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. *Cancer Res. 2006 Oct 15;66(20):9852-61.*

55. Soni D, King JA, Kaye AH, Hovens CM. Genetics of glioblastoma multiforme: mitogenic signaling and cell cycle pathways converge. *J Clin Neurosci. 2005 Jan;12(1):1-5.*

56. Bleeker FE, Molenaar RJ, Leenstra S. Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma. *J Neurooncol. 2012 Jan 20.*

57. Hegi ME, Diserens AC, Godard S, Dietrich PY, Regli L, Ostermann S, et al. Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. *Clin Cancer Res.* 2004 Mar 15;10(6):1871-4.
58. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005 Mar 10;352(10):997-1003.
59. Kim YS, Kim SH, Cho J, Kim JW, Chang JH, Kim DS, et al. MGMT Gene Promoter Methylation as a Potent Prognostic Factor in Glioblastoma Treated with Temozolomide-Based Chemoradiotherapy: A Single-Institution Study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2012 Mar 11.
60. Havik AB, Brandal P, Honne H, Dahlback HS, Scheie D, Hektoen M, et al. MGMT promoter methylation in gliomas - assessment by pyrosequencing and quantitative methylation-specific PCR. *J Transl Med.* 2012 Mar 6;10(1):36.
61. Lechapt-Zalcman E, Levallet G, Dugue AE, Vital A, Diebold MD, Menei P, et al. O(6) -methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation and low MGMT-encoded protein expression as prognostic markers in glioblastoma patients treated with biodegradable carmustine wafer implants after initial surgery followed by radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide. *Cancer.* 2012 Feb 22.
62. Kang MR, Kim MS, Oh JE, Kim YR, Song SY, Seo SI, et al. Mutational analysis of IDH1 codon 132 in glioblastomas and other common cancers. *Int J Cancer.* 2009 Jul 15;125(2):353-5.
63. Balss J, Meyer J, Mueller W, Korshunov A, Hartmann C, von Deimling A. Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol.* 2008 Dec;116(6):597-602.
64. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science.* 2008 Sep 26;321(5897):1807-12.
65. Ducray F, Marie Y, Sanson M. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med.* 2009 May 21;360(21):2248-9; author reply 9.
66. Marcucci G, Maharry K, Wu YZ, Radmacher MD, Mrozek K, Margeson D, et al. IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol.* 2010 May 10;28(14):2348-55.
67. Combs SE, Rieken S, Wick W, Abdollahi A, von Deimling A, Debus J, et al. Prognostic significance of IDH-1 and MGMT in patients with glioblastoma: one step forward, and one step back? *Radiat Oncol.* 2011;6:115.
68. Bleeker FE, Lamba S, Leenstra S, Troost D, Hulsebos T, Vandertop WP, et al. IDH1 mutations at residue p.R132 (IDH1(R132)) occur frequently in high-grade gliomas but not in other solid tumors. *Hum Mutat.* 2009 Jan;30(1):7-11.
69. Hartmann C, Meyer J, Balss J, Capper D, Mueller W, Christians A, et al. Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta Neuropathol.* 2009 Oct;118(4):469-74.
70. Sanson M, Marie Y, Paris S, Idbaih A, Laffaire J, Ducray F, et al. Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J Clin Oncol.* 2009 Sep 1;27(25):4150-4.
71. Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am J Pathol.* 2009 Apr;174(4):1149-53.

72. *Ichimura K, Pearson DM, Kocialkowski S, Backlund LM, Chan R, Jones DT, et al. IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas. Neuro Oncol. 2009 Aug;11(4):341-7.*
73. *Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. N Engl J Med. 2009 Feb 19;360(8):765-73.*
74. *Huse JT, Holland EC. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. Nat Rev Cancer. 2010 May;10(5):319-31.*
75. *Nobusawa S, Watanabe T, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. Clin Cancer Res. 2009 Oct 1;15(19):6002-7.*
76. *Zhu J, Zuo J, Xu Q, Wang X, Wang Z, Zhou D. Isocitrate dehydrogenase mutations may be a protective mechanism in glioma patients. Med Hypotheses. 2011 Apr;76(4):602-3.*
77. *Reiter JL, Maihle NJ. A 1.8 kb alternative transcript from the human epidermal growth factor receptor gene encodes a truncated form of the receptor. Nucleic Acids Res. 1996 Oct 15;24(20):4050-6.*
78. *Heaney ML, Golde DW. Soluble receptors in human disease. J Leukoc Biol. 1998 Aug;64(2):135-46.*
79. *Reiter JL, Threadgill DW, Eley GD, Strunk KE, Danielsen AJ, Sinclair CS, et al. Comparative genomic sequence analysis and isolation of human and mouse alternative EGFR transcripts encoding truncated receptor isoforms. Genomics. 2001 Jan 1;71(1):1-20.*
80. *Ciardello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. N Engl J Med. 2008 Mar 13;358(11):1160-74.*
81. *Sharif A, Legendre P, Prevot V, Allet C, Romao L, Studler JM, et al. Transforming growth factor alpha promotes sequential conversion of mature astrocytes into neural progenitors and stem cells. Oncogene. 2007 Apr 26;26(19):2695-706.*
82. *Basu A, Raghunath M, Bishayee S, Das M. Inhibition of tyrosine kinase activity of the epidermal growth factor (EGF) receptor by a truncated receptor form that binds to EGF: role for interreceptor interaction in kinase regulation. Mol Cell Biol. 1989 Feb;9(2):671-7.*
83. *Demuth T, Rennert JL, Hoelzinger DB, Reavie LB, Nakada M, Beaudry C, et al. Glioma cells on the run - the migratory transcriptome of 10 human glioma cell lines. BMC Genomics. 2008;9:54.*
84. *Demuth T, Reavie LB, Rennert JL, Nakada M, Nakada S, Hoelzinger DB, et al. MAP-ing glioma invasion: mitogen-activated protein kinase kinase 3 and p38 drive glioma invasion and progression and predict patient survival. Mol Cancer Ther. 2007 Apr;6(4):1212-22.*
85. *Zhang M, Song T, Yang L, Chen R, Wu L, Yang Z, et al. Nestin and CD133: valuable stem cell-specific markers for determining clinical outcome of glioma patients. J Exp Clin Cancer Res. 2008;27:85.*
86. *Franco-Hernandez C, Martinez-Glez V, Alonso ME, De Campos JM, Isla A, Vaquero J, et al. Gene dosage and mutational analyses of EGFR in oligodendrogliomas. Int J Oncol. 2007 Jan;30(1):209-15.*
87. *Scrideli CA, Carlotti CG, Jr., Mata JF, Neder L, Machado HR, Oba-Sinjo SM, et al. Prognostic significance of co-overexpression of the EGFR/IGFBP-2/HIF-2A genes in astrocytomas. J Neurooncol. 2007 Jul;83(3):233-9.*
88. *Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA, Jr., Di Maria MV, Veve R, Bremmes RM, et al. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. J Clin Oncol. 2003 Oct 15;21(20):3798-807.*

89. Varella-Garcia M. Stratification of non-small cell lung cancer patients for therapy with epidermal growth factor receptor inhibitors: the EGFR fluorescence in situ hybridization assay. *Diagn Pathol.* 2006;1:19.
90. Hanawa M, Suzuki S, Dobashi Y, Yamane T, Kono K, Enomoto N, et al. EGFR protein overexpression and gene amplification in squamous cell carcinomas of the esophagus. *Int J Cancer.* 2006 Mar 1;118(5):1173-80.
91. Ionescu DN, Sasatomi E, Cieply K, Nola M, Dacic S. Protein expression and gene amplification of epidermal growth factor receptor in thymomas. *Cancer.* 2005 Feb 1;103(3):630-6.
92. Andersson U, Guo D, Malmer B, Bergenheim AT, Brannstrom T, Hedman H, et al. Epidermal growth factor receptor family (EGFR, ErbB2-4) in gliomas and meningiomas. *Acta Neuropathol.* 2004 Aug;108(2):135-42.
93. Yip S, Iafrate AJ, Louis DN. Molecular diagnostic testing in malignant gliomas: a practical update on predictive markers. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2008 Jan;67(1):1-15.
94. Eley G, Frederick L, Wang XY, Smith DI, James CD. 3' end structure and rearrangements of EGFR in glioblastomas. *Genes Chromosomes Cancer.* 1998 Nov;23(3):248-54.
95. Fenstermaker RA, Ciesielski MJ. Deletion and tandem duplication of exons 2 - 7 in the epidermal growth factor receptor gene of a human malignant glioma. *Oncogene.* 2000 Sep 14;19(39):4542-8.
96. Fenstermaker RA, Ciesielski MJ, Castiglia GJ. Tandem duplication of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase and calcium internalization domains in A-172 glioma cells. *Oncogene.* 1998 Jul 2;16(26):3435-43.
97. Wong AJ, Ruppert JM, Bigner SH, Grzeschik CH, Humphrey PA, Bigner DS, et al. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Apr 1;89(7):2965-9.
98. Wong KK, Tsang YT, Chang YM, Su J, Di Francesco AM, Meco D, et al. Genome-wide allelic imbalance analysis of pediatric gliomas by single nucleotide polymorphic allele array. *Cancer Res.* 2006 Dec 1;66(23):11172-8.
99. Schmidt EE, Ichimura K, Goike HM, Moshref A, Liu L, Collins VP. Mutational profile of the PTEN gene in primary human astrocytic tumors and cultivated xenografts. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1999 Nov;58(11):1170-83.
100. Mollenhauer J, Wiemann S, Scheurlen W, Korn B, Hayashi Y, Wilgenbus KK, et al. DMBT1, a new member of the SRCR superfamily, on chromosome 10q25.3-26.1 is deleted in malignant brain tumours. *Nat Genet.* 1997 Sep;17(1):32-9.
101. Cairncross G, Berkey B, Shaw E, Jenkins R, Scheithauer B, Brachman D, et al. Phase III trial of chemotherapy plus radiotherapy compared with radiotherapy alone for pure and mixed anaplastic oligodendroglioma: Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402. *J Clin Oncol.* 2006 Jun 20;24(18):2707-14.
102. Korshunov A, Sycheva R, Golanov A. Molecular stratification of diagnostically challenging high-grade gliomas composed of small cells: the utility of fluorescence in situ hybridization. *Clin Cancer Res.* 2004 Dec 1;10(23):7820-6.
103. van den Bent MJ, Hegi ME, Stupp R. Recent developments in the use of chemotherapy in brain tumours. *Eur J Cancer.* 2006 Mar;42(5):582-8.
104. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005 Mar 10;352(10):987-96.
105. Hoffman WF, Levin VA, Wilson CB. Evaluation of malignant glioma patients during the postirradiation period. *J Neurosurg.* 1979 May;50(5):624-8.

106. Delattre JY, Fuks Z, Krol G, Rottenberg DA, Posner JB. Cerebral necrosis following neutron radiation of an extracranial tumor. *J Neurooncol.* 1988 Sep;6(2):113-7.
107. Shaw EG, Daumas-Duport C, Scheithauer BW, Gilbertson DT, O'Fallon JR, Earle JD, et al. Radiation therapy in the management of low-grade supratentorial astrocytomas. *J Neurosurg.* 1989 Jun;70(6):853-61.
108. Sheline GE. Radiation therapy of primary tumors. *Semin Oncol.* 1975 Mar;2(1):29-42.
109. Newlands ES, Blackledge GR, Slack JA, Rustin GJ, Smith DB, Stuart NS, et al. Phase I trial of temozolomide (CCRG 81045: M&B 39831: NSC 362856). *Br J Cancer.* 1992 Feb;65(2):287-91.
110. Denny BJ, Wheelhouse RT, Stevens MF, Tsang LL, Slack JA. NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA. *Biochemistry.* 1994 Aug 9;33(31):9045-51.
111. Westphal M, Hilt DC, Bortey E, Delavault P, Olivares R, Warnke PC, et al. A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro Oncol.* 2003 Apr;5(2):79-88.
112. Westphal M, Lamszus K, Hilt D. Intracavitary chemotherapy for glioblastoma: present status and future directions. *Acta Neurochir Suppl.* 2003;88:61-7.
113. Madajewicz S, Chowhan N, Tfayli A, Roque C, Meek A, Davis R, et al. Therapy for patients with high grade astrocytoma using intraarterial chemotherapy and radiation therapy. *Cancer.* 2000 May 15;88(10):2350-6.
114. Halatsch ME, Schmidt U, Behnke-Mursch J, Unterberg A, Wirtz CR. Epidermal growth factor receptor inhibition for the treatment of glioblastoma multiforme and other malignant brain tumours. *Cancer Treat Rev.* 2006 Apr;32(2):74-89.
115. Krishnan S, Brown PD, Ballman KV, Fiveash JB, Uhm JH, Giannini C, et al. Phase I trial of erlotinib with radiation therapy in patients with glioblastoma multiforme: results of North Central Cancer Treatment Group protocol N0177. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006 Jul 15;65(4):1192-9.
116. Prados MD, Lamborn KR, Chang S, Burton E, Butowski N, Malec M, et al. Phase I study of erlotinib HCl alone and combined with temozolomide in patients with stable or recurrent malignant glioma. *Neuro Oncol.* 2006 Jan;8(1):67-78.
117. Crombet T, Torres O, Rodriguez V, Menendez A, Stevenson A, Ramos M, et al. Phase I clinical evaluation of a neutralizing monoclonal antibody against epidermal growth factor receptor in advanced brain tumor patients: preliminary study. *Hybridoma.* 2001 Apr;20(2):131-6.
118. Ciardiello F, Tortora G. Epidermal growth factor receptor (EGFR) as a target in cancer therapy: understanding the role of receptor expression and other molecular determinants that could influence the response to anti-EGFR drugs. *Eur J Cancer.* 2003 Jul;39(10):1348-54.
119. Reardon DA, Egorin MJ, Quinn JA, Rich JN, Gururangan S, Vredenburgh JJ, et al. Phase II study of imatinib mesylate plus hydroxyurea in adults with recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol.* 2005 Dec 20;23(36):9359-68.
120. Reardon DA, Wen PY. Therapeutic advances in the treatment of glioblastoma: rationale and potential role of targeted agents. *Oncologist.* 2006 Feb;11(2):152-64.
121. Goldbrunner RH, Bendszus M, Wood J, Kiderlen M, Sasaki M, Tonn JC. PTK787/ZK222584, an inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases, decreases glioma growth and vascularization. *Neurosurgery.* 2004 Aug;55(2):426-32; discussion 32.

122. Fine HA, Figg WD, Jaeckle K, Wen PY, Kyritsis AP, Loeffler JS, et al. Phase II trial of the antiangiogenic agent thalidomide in patients with recurrent high-grade gliomas. *J Clin Oncol*. 2000 Feb;18(4):708-15.
123. Fine HA, Wen PY, Maher EA, Viscosi E, Batchelor T, Lakhani N, et al. Phase II trial of thalidomide and carmustine for patients with recurrent high-grade gliomas. *J Clin Oncol*. 2003 Jun 15;21(12):2299-304.
124. Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE, 2nd, Dowell JM, Reardon DA, Quinn JA, et al. Phase II trial of bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma. *Clin Cancer Res*. 2007 Feb 15;13(4):1253-9.
125. Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE, 2nd, Marcello J, Reardon DA, Quinn JA, et al. Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol*. 2007 Oct 20;25(30):4722-9.
126. Newton HB. Molecular neuro-oncology and development of targeted therapeutic strategies for brain tumors. Part 2: PI3K/Akt/PTEN, mTOR, SHH/PTCH and angiogenesis. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2004 Feb;4(1):105-28.
127. Graff JR, McNulty AM, Hanna KR, Konicek BW, Lynch RL, Bailey SN, et al. The protein kinase Cbeta-selective inhibitor, Enzastaurin (LY317615.HCl), suppresses signaling through the AKT pathway, induces apoptosis, and suppresses growth of human colon cancer and glioblastoma xenografts. *Cancer Res*. 2005 Aug 15;65(16):7462-9.
128. Liau LM, Prins RM, Kiertscher SM, Odesa SK, Kremen TJ, Giovannone AJ, et al. Dendritic cell vaccination in glioblastoma patients induces systemic and intracranial T-cell responses modulated by the local central nervous system tumor microenvironment. *Clin Cancer Res*. 2005 Aug 1;11(15):5515-25.
129. Liu TF, Hall PD, Cohen KA, Willingham MC, Cai J, Thorburn A, et al. Interstitial diphtheria toxin-epidermal growth factor fusion protein therapy produces regressions of subcutaneous human glioblastoma multiforme tumors in athymic nude mice. *Clin Cancer Res*. 2005 Jan 1;11(1):329-34.
130. Sampson JH, Akabani G, Archer GE, Bigner DD, Berger MS, Friedman AH, et al. Progress report of a Phase I study of the intracerebral microinfusion of a recombinant chimeric protein composed of transforming growth factor (TGF)-alpha and a mutated form of the Pseudomonas exotoxin termed PE-38 (TP-38) for the treatment of malignant brain tumors. *J Neurooncol*. 2003 Oct;65(1):27-35.
131. Rainov NG, Heidecke V. Long term survival in a patient with recurrent malignant glioma treated with intratumoral infusion of an IL4-targeted toxin (NBI-3001). *J Neurooncol*. 2004 Jan;66(1-2):197-201.
132. Lesniak MS, Upadhyay U, Goodwin R, Tyler B, Brem H. Local delivery of doxorubicin for the treatment of malignant brain tumors in rats. *Anticancer Res*. 2005 Nov-Dec;25(6B):3825-31.
133. Andreansky S, He B, van Cott J, McGhee J, Markert JM, Gillespie GY, et al. Treatment of intracranial gliomas in immunocompetent mice using herpes simplex viruses that express murine interleukins. *Gene Ther*. 1998 Jan;5(1):121-30.
134. Yamini B, Yu X, Gillespie GY, Kufe DW, Weichselbaum RR. Transcriptional targeting of adenovirally delivered tumor necrosis factor alpha by temozolomide in experimental glioblastoma. *Cancer Res*. 2004 Sep 15;64(18):6381-4.
135. Lusa E, Gutmann DH. Meningioma: an update. *Curr Opin Neurol*. 2004 Dec;17(6):687-92.
136. Ducray F, Criniere E, Idbaih A, Mokhtari K, Marie Y, Paris S, et al. alpha-Internexin expression identifies 1p19q codeleted gliomas. *Neurology*. 2009 Jan 13;72(2):156-61.

137. Coulibaly B, Nanni I, Quilichini B, Gaudart J, Metellus P, Fina F, et al. Epidermal growth factor receptor in glioblastomas: correlation between gene copy number and protein expression. *Hum Pathol*. 2010 Jun;41(6):815-23.
138. Ligon KL, Alberta JA, Kho AT, Weiss J, Kwaan MR, Nutt CL, et al. The oligodendroglial lineage marker OLIG2 is universally expressed in diffuse gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2004 May;63(5):499-509.
139. Burger PC, Minn AY, Smith JS, Borell TJ, Jedlicka AE, Huntley BK, et al. Losses of chromosomal arms 1p and 19q in the diagnosis of oligodendroglioma. A study of paraffin-embedded sections. *Mod Pathol*. 2001 Sep;14(9):842-53.
140. Johnson MD, Vnencak-Jones CL, Toms SA, Moots PM, Weil R. Allelic losses in oligodendroglial and oligodendroglioma-like neoplasms: analysis using microsatellite repeats and polymerase chain reaction. *Arch Pathol Lab Med*. 2003 Dec;127(12):1573-9.
141. Jeuken JW, von Deimling A, Wesseling P. Molecular pathogenesis of oligodendroglial tumors. *J Neurooncol*. 2004 Nov;70(2):161-81.
142. Belaud-Rotureau MA, Meunier N, Eimer S, Vital A, Loiseau H, Merlio JP. Automated assessment of 1p36-19q13 status in gliomas by interphase FISH assay on touch imprints of frozen tumours. *Acta Neuropathol*. 2006 Mar;111(3):255-63.
143. Buckner JC, Gesme D, Jr., O'Fallon JR, Hammack JE, Stafford S, Brown PD, et al. Phase II trial of procarbazine, lomustine, and vincristine as initial therapy for patients with low-grade oligodendroglioma or oligoastrocytoma: efficacy and associations with chromosomal abnormalities. *J Clin Oncol*. 2003 Jan 15;21(2):251-5.
144. Gelpi E, Ambros IM, Birner P, Luegmayr A, Drlicek M, Fischer I, et al. Fluorescent in situ hybridization on isolated tumor cell nuclei: a sensitive method for 1p and 19q deletion analysis in paraffin-embedded oligodendroglial tumor specimens. *Mod Pathol*. 2003 Jul;16(7):708-15.
145. Houillier C, Lejeune J, Benouaich-Amiel A, Laigle-Donadey F, Criniere E, Mokhtari K, et al. Prognostic impact of molecular markers in a series of 220 primary glioblastomas. *Cancer*. 2006 May 15;106(10):2218-23.
146. Eoli M, Bissola L, Bruzzone MG, Pollo B, Maccagnano C, De Simone T, et al. Reclassification of oligoastrocytomas by loss of heterozygosity studies. *Int J Cancer*. 2006 Jul 1;119(1):84-90.
147. Yip S, Butterfield YS, Morozova O, Chittaranjan S, Blough MD, An J, et al. Concurrent CIC mutations, IDH mutations, and 1p/19q loss distinguish oligodendrogliomas from other cancers. *J Pathol*. 2012 Jan;226(1):7-16.
148. Fuller CE, Schmidt RE, Roth KA, Burger PC, Scheithauer BW, Banerjee R, et al. Clinical utility of fluorescence in situ hybridization (FISH) in morphologically ambiguous gliomas with hybrid oligodendroglial/astrocytic features. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2003 Nov;62(11):1118-28.
149. Guillamo JS. [Anti-angiogenic strategies in glioblastoma]. *Rev Neurol (Paris)*. 2011 Oct;167(10):662-7.
150. Kim YH, Pierscianek D, Mittelbronn M, Vital A, Mariani L, Hasselblatt M, et al. TET2 promoter methylation in low-grade diffuse gliomas lacking IDH1/2 mutations. *J Clin Pathol*. 2011 Oct;64(10):850-2.
151. Shibahara I, Sonoda Y, Kanamori M, Saito R, Yamashita Y, Kumabe T, et al. IDH1/2 gene status defines the prognosis and molecular profiles in patients with grade III gliomas. *Int J Clin Oncol*. 2011 Oct 6.
152. Gupta R, Webb-Myers R, Flanagan S, Buckland ME. Isocitrate dehydrogenase mutations in diffuse gliomas: clinical and aetiological implications. *J Clin Pathol*. 2011 Oct;64(10):835-44.

153. Capper D, Weissert S, Balss J, Habel A, Meyer J, Jager D, et al. Characterization of R132H mutation-specific IDH1 antibody binding in brain tumors. *Brain Pathol.* 2010 Jan;20(1):245-54.
154. Albitar L, Pickett G, Morgan M, Wilken JA, Maihle NJ, Leslie KK. EGFR isoforms and gene regulation in human endometrial cancer cells. *Mol Cancer.* 2010;9:166.
155. Muller V, Witzel I, Pantel K, Krenkel S, Luck HJ, Neumann R, et al. Prognostic and predictive impact of soluble epidermal growth factor receptor (sEGFR) protein in the serum of patients treated with chemotherapy for metastatic breast cancer. *Anticancer Res.* 2006 Mar-Apr;26(2B):1479-87.
156. Halle C, Lando M, Svendsrud DH, Clancy T, Holden M, Sundfor K, et al. Membranous expression of ectodomain isoforms of the epidermal growth factor receptor predicts outcome after chemoradiotherapy of lymph node-negative cervical cancer. *Clin Cancer Res.* 2011 Aug 15;17(16):5501-12.
157. Maramotti S, Paci M, Micciche F, Ciarrocchi A, Cavazza A, De Bortoli M, et al. Soluble epidermal growth factor receptor isoforms in non-small cell lung cancer tissue and in blood. *Lung Cancer.* 2011 Dec 15.
158. Costa BM, Viana-Pereira M, Fernandes R, Costa S, Linhares P, Vaz R, et al. Impact of EGFR Genetic Variants on Glioma Risk and Patient Outcome. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011 Oct 25.
159. Guillaudeau A DK, Bessette B, Pommepuy I, Projetti F, Robert S, Chaunavel S, Caire F, Rabinovitch-Chable H, Labrousse F. Transcripts encoding EGFR lacking a tyrosine kinase domain are expressed in meningiomas. *Plos One (article soumis).* 2011.

TITRE: Etude de marqueurs moléculaires et des variants de l'EGFR dans les gliomes infiltrants de l'adulte

RESUME:

Les difficultés de classification et les traitements décevants des gliomes infiltrants conduisent à rechercher des marqueurs diagnostiques, pronostiques et théranostiques. Dans notre travail, nous avons i) recherché les délétions 1p, 19q, 10p, 10q et une amplification de l'*EGFR*, et étudié l'expression de l'INA, ii) analysé l'expression génique et protéique de l'EGFR.

La délétion complète 1p19q est associée au phénotype oligodendrogial et à une survie plus longue alors que les pertes 10p et 10q sont liées au phénotype astrocytaire et à un pronostic défavorable. Une forte expression d'INA est un marqueur de bon pronostic, prédictif de la délétion 1p19q mais l'étude immunohistochimique ne permet de remplacer l'analyse génomique. La présence d'une amplification du gène de l'*EGFR* est un marqueur de malignité lié au type histologique et au grade (glioblastomes et astrocytomes de grade III) ainsi qu'à la présence du mutant vIII.

Par épissage alternatif, le gène de l'*EGFR* donne les transcrits variants v1, v2, v3, v4 qui codent pour les isoformes protéiques a, b, c et d. Nos résultats montrent que les profils d'expression des variants et des isoformes diffèrent selon le type histologique. Les glioblastomes ont des niveaux d'expression plus élevés des variants EGFRv3, -v4 et du mutant EGFRvIII que les autres types tumoraux.

Nous avons comme projets de corrélérer nos résultats à la présence ou l'absence des mutations IDH1/2, d'analyser l'expression génique et protéique de l'EGFR dans d'autres types tumoraux et de préciser le rôle des isoformes en utilisant des modèles expérimentaux de cultures cellulaires.

TITLE: Molecular markers and Variants of EGFR in Infiltrating Gliomas in Adults

ABSTRACT:

Due to difficulties in classifying infiltrating gliomas and disappointing treatment results we looked for diagnostic, prognostic and theranostic markers. In our study we i) assessed 1p, 19q, 10p, and 10q deletions as well as EGFR amplification and studied INA expression and ii) analyzed EGFR gene and protein expression.

Complete 1p19q deletion was associated with an oligodendrocyte phenotype and longer survival while loss of 10p and 10q was linked to an astrocyte phenotype and poor prognosis. Strong INA expression was a marker of good prognosis and predictive of a 1P19q deletion but immunohistochemistry could not replace genetic analysis. Amplification of the EGFR gene was an indicator of malignancy correlated with histological type and grade (grade III glioblastomas and astrocytomas) as well as the vIII mutant.

Alternative splicing of the EGFR gene gave the transcript variants v1, v2, v3, v4 which coded for the protein isoforms a, b, c and d. Our data showed that expression profiles of transcript variants and isoforms differed according to histological type. Glioblastomas expressed higher levels of EGFRv3 and -v4 variants and the EGFRvIII mutant compared to other tumor types.

Our perspectives include correlating our results with the presence or absence of IDH1/2 mutations, analysis of EGFR gene and protein expression in other tumor types and to clarify the role of isoforms using experimental models and cell culture.