

UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE MEDECINE

ANNEE 2013

THESE N°....

Etude de l'EGFR
et de marqueurs moléculaires
dans des gliomes infiltrants et non infiltrants

THESE
EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN MEDECINE,
SPECIALITE ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES

présentée et soutenue publiquement le 5 avril 2013

par

Laura MESTUROUX
née le 27 décembre 1983 à Tulle

DIRECTEUR DE THESE

M. le Professeur François LABROUSSE

EXAMINATEURS

M. le Pr. François LABROUSSE	Président
Mme le Pr. Marie-Odile JAUBERTEAU-MARCHAN	Juge
M. le Pr. Benoît FUNALOT	Juge
M. le Dr. François CAIRE	Juge
Mme le Dr. Isabelle POMMEPUY	Membre invité
Mme le Dr. Karine DURAND-FAUCHER	Membre invité

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE MEDECINE

DOYEN DE LA FACULTE: Monsieur le Professeur VALLEIX Denis

ASSESEURS: Monsieur le Professeur LASKAR Marc
Monsieur le Professeur MOREAU Jean-Jacques
Monsieur le Professeur PREUX Pierre-Marie

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS:

*C.S = Chef de Service

ABOYANS Victor	CARDIOLOGIE
ACHARD Jean-Michel	PHYSIOLOGIE
ADENIS Jean-Paul	OPHTALMOLOGIE
ALAIN Sophie	BACTERIOLOGIE, VIROLOGIE
ALDIGIER Jean-Claude	NEPHROLOGIE
ARCHAMBEAUD Françoise (C.S)	MEDECINE INTERNE
ARNAUD Jean-Paul	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
AUBARD Yves (C.S)	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
AUBRY Karine	O.R.L.
BEDANE Christophe (C.S)	DERMATOLOGIE-VENERELOGIE
BERTIN Philippe (C.S)	THERAPEUTIQUE
BESSEDE Jean-Pierre (C.S)	OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
BONNAUD François	PNEUMOLOGIE
BORDESSOULE Dominique (C.S)	HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION
CHARISSOUX Jean-Louis	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE

CLAVERE Pierre (C.S)	RADIOTHERAPIE
CLEMENT Jean-Pierre (C.S)	PSYCHIATRIE ADULTES
COGNE Michel (C.S)	IMMUNOLOGIE
COLOMBEAU Pierre	UROLOGIE
CORNU Elisabeth	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO- VASCULAIRE
COURATIER Philippe (C.S)	NEUROLOGIE
DANTOINE Thierry	GERIATRIE ET BIOLOGIE DU VIEILLISSEMENT
DARDE Marie-Laure (C.S)	PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE
DAVIET Jean-Christophe	MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION
DESCAZEAUD Aurélien	UROLOGIE
DESSPORT Jean-Claude	NUTRITION
DRUET-CABANAC Michel (C.S)	MEDECINE ET SANTE AU TRAVAIL
DUMAS Jean-Philippe (C.S)	UROLOGIE
ESSIG Marie	NEPHROLOGIE
FAUCHAIS Anne-Laure	MEDECINE INTERNE
FEISS Pierre	ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE
FEUILLARD Jean (C.S)	HEMATOLOGIE
FOURCADE Laurent (C.S)	CHIRURGIE INFANTILE
FUNALOT Benoît	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
GAINANT Alain (C.S)	CHIRURGIE DIGESTIVE
GUIGONIS Vincent	PEDIATRIE
JACCARD Arnaud	HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION
JAUBERTEAU-MARCHAN Marie-Odile	IMMUNOLOGIE
LABROUSSE François (C.S)	ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES
LACROIX Philipe	MEDECINE VASCULAIRE
LASKAR Marc (C.S)	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO- VASCULAIRE
LIENHARDT-ROUSSIE Anne (C.S)	PEDIATRIE
LOUSTAUD-RATTI Véronique	HEPATOLOGIE

MABIT Christian (C.S)	ANATOMIE
MAGY Laurent	NEUROLOGIE
MARQUET Pierre (C.S)	PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE
MATHONNET Muriel	CHIRURGIE DIGESTIVE
MELLONI Boris (C.S)	PNEUMOLOGIE
MERLE Louis (C.S)	PHARMACOLOGIE CLINIQUE
MONTEIL Jacques (C.S)	BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE
MOREAU Jean-Jacques (C.S)	NEUROCHIRURGIE
MOULIES Dominique	CHIRURGIE INFANTILE
MOUNAYER Charbel	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
NATHAN-DENIZOT Nathalie (C.S)	ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE
PARAF François (C.S)	MEDECINE LEGALE et DROIT de la SANTE
PLOY Marie-Cécile (C.S)	BACTERIOLOGIE, VIROLOGIE
PREUX Pierre-Marie	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE DE LA SANTE ET PREVENTION
ROBERT Pierre-Yves (C.S)	OPHTALMOLOGIE
SALLE Jean-Yves (C.S)	MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION
SAUTEREAU Denis (C.S)	GASTRO-ENTEROLOGIE, HEPATOLOGIE
STURTZ Franck (C.S)	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
TEISSIER-CLEMENT Marie-Pierre	ENDOCRINOLOGIE, DIABETE ET MALADIES METABOLIQUES
TREVES Richard	RHUMATOLOGIE
TUBIANA-MATHIEU Nicole (C.S)	CANCEROLOGIE
VALLAT Jean-Michel	NEUROLOGIE
VALLEIX Denis	ANATOMIE - CHIRURGIE GENERALE
VERGNENEGRE Alain (C.S)	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE DE LA SANTE ET PREVENTION
VERGNE-SALLE Pascale	THERAPEUTIQUE
VIDAL Elisabeth (C.S)	MEDECINE INTERNE
VIGNON Philippe	REANIMATION MEDICALE
VINCENT François	PHYSIOLOGIE
VIROT Patrice (C.S)	CARDIOLOGIE

WEINBRECK Pierre (C.S)

YARDIN Catherine (C.S)

MALADIES INFECTIEUSES

CYTOLOGIE ET HISTOLOGIE

MAITRE DE CONFERENCE DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS:

AJZENBERG Daniel

ANTONINI Marie-Thérèse (C.S)

BOURTHOUMIEU Sylvie

BOUTEILLE Bernard

CHABLE Hélène

DURAND-FONTANIER Sylvaine

ESCLAIRE Françoise

HANTZ Sébastien

LAROCHE Marie-Laure

LE GUYADER Alexandre

MARIN Benoît

MOUNIER Marcelle

PICARD Nicolas

QUELVEN-BERTIN Isabelle

TERRO Faraj

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE

PHYSIOLOGIE

CYTOLOGIE ET HISTOLOGIE

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE

BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE

ANATOMIE - CHIRURGIE GENERALE

BIOLOGIE CELLULAIRE

BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE

PHARMACOLOGIE CLINIQUE

CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-
VASCULAIRE

EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et
PREVENTION

BACTERIOLOGIE - VIROLOGIE - HYGIENE
HOSPITALIERE

PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE

BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE

BIOLOGIE CELLULAIRE

PRATICIEN HOSPITALIER

UNIVERSITAIRE:

CAIRE François

NEUROCHIRURGIE

P.R.A.G.:

GAUTIER Sylvie

ANGLAIS

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS:

BUCHON Daniel

MEDECINE GENERALE

BUISSON Jean-Gabriel

MEDECINE GENERALE

DUMOITIER Nathalie

MEDECINE GENERALE

PREVOST Martine

MEDECINE GENERALE

**MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE
A MI-TEMPS:**

MENARD Dominique

MEDECINE GENERALE

Au Professeur Labrousse,

Merci de m'avoir accueillie au sein de votre service, de m'avoir fait confiance, de m'avoir permis de découvrir et d'apprécier l'Anatomie pathologique, et d'avoir dirigé cette Thèse. J'ai pu, grâce aux travaux de Master 2 et de Thèse, profiter de votre expérience en Neuropathologie. Malgré votre emploi du temps, vous avez toujours ouvert votre bureau pour répondre à mes questions. Puissiez-vous trouver ici, l'expression de mon profond respect.

Au Professeur Jauberteau-Marchan,

Merci de m'avoir accueillie au sein de l'équipe de recherche, de m'avoir guidée dans ce travail et de siéger dans ce jury.

Au Professeur Funalot, au Professeur Sturtz,

Merci de m'avoir mis sur la voie de la Biologie Moléculaire en me proposant mon premier travail en Master 1. Merci au Pr. Funalot d'avoir accepté de critiquer ce travail, et de siéger dans ce jury.

Au Docteur Caire,

Merci d'avoir accepté, au pied levé, de siéger dans ce jury. Il était important pour moi d'avoir le regard d'un Neurochirurgien sur ce travail.

Au Docteur Durand,

Tout simplement, Merci. Je suis admirative de la voie que tu as décidée de suivre, de ton implication au quotidien, de tes connaissances en Biologie Moléculaire et en Mycologie, de ta gentillesse, de ta disponibilité, de ton soutien, ... Si seulement un jour je pouvais te rendre la moitié de ce que tu m'as donné ! Merci d'avoir encadré ce travail et de siéger dans ce jury.

Au Docteur Pommepuy,

Merci pour tes conseils en Anatomie pathologique au quotidien. Merci d'avoir accepté de critiquer ce travail en Neuropathologiste avertie que tu es, et d'avoir accepté de siéger dans ce jury.

A l'équipe de recherche EA 3842 « Homéostasie Cellulaire et Pathologies » de la Faculté de Médecine de Limoges,

Merci pour vos conseils, votre gentillesse, votre disponibilité et votre aide. Merci plus particulièrement à Barbara.

A l'équipe de cytogénétique du CHU de Limoges,

Merci pour votre aide et vos conseils pour les techniques FISH, qui ne figurent pas dans ce travail mais qui me donnent encore du fil à retordre.

Aux Médecins du service d'Anatomie Pathologique du CHU de Limoges,

Merci de votre apprentissage tout au long de l'internat, qui va encore durer je l'espère pendant mon assistanat, et de m'avoir laissé le temps de faire mes techniques.

Aux techniciens de la Plateforme d'Oncologie Moléculaire du CHU de Limoges,

A Alain Chaunavel,

Merci pour vos explications, votre patience, votre rigueur, votre capacité à la dérision qui rendent plus surmontables les problèmes de tous les jours. Merci à Alain pour ta disponibilité, tes explications, ta gentillesse et tes conseils vestimentaires.

Aux techniciens hospitaliers et universitaire, aux secrétaires, aux agents de service, du laboratoire d'Anatomie Pathologique du CHU de Limoges,

C'est un plaisir de travailler au quotidien avec vous. Merci de votre disponibilité, de m'avoir initiée au vaste côté technique de cette discipline, de m'avoir conseillée, guidée, aidée, corrigée voire soutenue dès que c'était nécessaire. Merci pour votre bonne humeur et votre gaieté, quasi quotidiennes !

A Fabrice,

Merci d'avoir bien voulu partager ton bureau, de m'avoir acceptée comme co-interne, de m'avoir aidée, soutenue, guidée, supportée pendant notre internat. Je suis triste que cette période soit terminée, mais je suis sûre que ta nouvelle vie à Toulouse t'apportera bonheur et réussite, que tu mérites amplement.

A Aurélie,

Merci de m'avoir supportée pendant cette terrible épreuve qu'est la rédaction d'une thèse ! Je n'ai pas été assez disponible pour te guider dans ce monde impitoyable de l'Anatomie pathologique, mais tu es forte, brillante, d'une gentillesse incroyable et tu n'auras besoin de personne pour continuer à t'accomplir. Ne change rien.

A mes parents,
A ma famille et mes amis,
et à tous ceux qui m'ont soutenue et supportée jusqu'ici,
de quelque manière que ce soit.

Table des matières

I. INTRODUCTION	15
II. GENERALITES	18
II. 1. GLIOMES : DEFINITION, INCIDENCE	18
II. 1. a) Définition	18
II. 1. b) Incidence	18
II. 2. TUMEURS GLIONEURONALES : DEFINITION, INCIDENCE	19
II. 2. a) Définition	19
II. 2. b) Incidence	19
II. 3. ASPECTS CLINIQUES	19
II. 4. STRUCTURE SPATIALE ET ASPECTS RADIOLOGIQUES	21
II. 4. a) Structure spatiale	21
II. 4. b) Aspects radiologiques	22
II. 5. CLASSIFICATION OMS 2007	25
II. 5. a) Les gliomes astrocytaires	26
II. 5. b) Les oligodendrogliomes	29
II. 5. c) Les gliomes mixtes	31
II. 5. e) Référentiel gliomes diffus de l'adulte	32
II. 5. d) Les tumeurs glioneuronales	32
II. 5. e) Classification de l'Hôpital Sainte-Anne	34
II. 6. VOIES DE SIGNALISATION ET MARQUEURS MOLECULAIRES DANS LES GLIOMES INFILTRANTS ET NON INFILTRANTS	35
II. 6. a) Voies de signalisation	35
II. 6. b) Marqueurs moléculaires validés	37
II. 6. b1) Codélétion 1p19q	37
II. 6. b2) EGFR	38
II. 6. b3) TP53	41
II. 6. b4) Mutations des gènes des IDH (Isocitrate Déshydrogénase)	41
II. 6. b5) BRAF	42
II. 6. b6) MGMT (O ₆ -méthylguanine-DNA méthyltransférase)	43
II. 6. b7) Marqueurs de différenciation et de prolifération	44
II. 6. c) Autres marqueurs moléculaires	44
II. 6. c1) PTEN	44
II. 6. c2) CDKN2A	44
II. 6. c3) Neurotrophines et récepteurs des neurotrophines	45
II. 7. HYPOTHESES ONCOGENETIQUES	46
II. 8. PRONOSTIC ET PRISE EN CHARGE	47
II. 8. a) Pronostic	47
II. 8. b) Prise en charge (recommandations Haute Autorité Santé, 2010)	47
II. 8. c) Suivi et évaluation de la réponse aux traitements	51
II. 8. d) Traitement des récurrences	51
II. 8. e) Traitements expérimentaux	51
III. JUSTIFICATION DE L'ETUDE ET OBJECTIFS	54
IV. MATERIELS ET METHODES	56
IV. 1. DONNEES CLINICOPATHOLOGIQUES ET HISTOPATHOLOGIQUES	56
IV. 2. EXTRACTION D'ADN GENOMIQUE ET TECHNIQUE MLPA	57
IV. 2. a) Extraction de l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique)	57
IV. 2. b) Technique MLPA	57
IV. 3. EXTRACTION D'ARN ET RT-PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL	59
IV. 3. a) Broyage des tissus	59
IV. 3. b) Extraction d'ARN	59
IV. 3. c) RT-PCR quantitative en temps réel	60
IV. 4. TISSUE MICRO ARRAY MANUEL	61
IV. 5. IMMUNOHISTOCHIMIE	62
IV. 5. a) Technique automatisée : technique immuno-enzymatique en 3 temps, simple marquage	62
IV. 5. b) Technique manuelle : technique immuno-enzymatique en 2 temps, simple marquage	64

IV. 5. c) Double marquage.....	65
IV. 5. d) Interprétation.....	65
IV. 6. ANALYSE STATISTIQUE	66
V. RESULTATS.....	67
V. 1. DONNEES CLINIQUES ET HISTOPATHOLOGIQUES.....	67
V. 2. ETUDE DES CONTINGENTS CELLULAIRES DANS DES GLIOMES INFILTRANTS ET NON INFILTRANTS	70
V. 2. a) Analyse génétique : perte 1p19q, amplification EGFR.....	70
V. 2. b) Analyse génomique : IDH, BRAF, PTEN, CDKN2A	71
V. 2. c) Analyse protéique : INA, IDH1, p53, Ki67, CD34, neurotrophines.....	72
V. 2. c1) Marqueurs immunohistochimiques et types histologiques.....	72
V. 2. c2) Marqueurs immunohistochimiques et contingents cellulaires tumoraux.....	73
V. 2. c3) Expression des neurotrophines et de leurs récepteurs	74
V. 3. ETUDE DE L'EXPRESSION DE L'EGFR DANS DES GLIOMES INFILTRANTS ET NON INFILTRANTS.....	75
V. 3. a) Analyse génétique : amplification de l'EGFR.....	75
V. 3. b) Analyse transcriptomique des variants de l'EGFR.....	76
V. 3. c) Analyse de l'expression protéique de l'EGFR	78
V. 3. c1) Expression de l'EGFR et types histologiques.....	78
V. 3. c2) Expression de l'EGFR et contingents cellulaires tumoraux	79
V. 3. c3) EGFR phosphorylé et doubles marquages	80
V. 4. ANALYSE DE SURVIE	81
V. DISCUSSION	83
V. 1. PROFILS DES CONTINGENTS CELLULAIRES DE GLIOMES NON INFILTRANTS ET INFILTRANTS : AIDE AU DIAGNOSTIC ?.....	83
V. 2. EXPRESSION DE L'EGFR : IMPLICATION DANS LES MECANISMES D'INVASION TUMORALE ?	88
VI. CONCLUSION	91
BIBLIOGRAPHIE.....	92
ANNEXES.....	98

ABREVIATIONS

ADN	Acide DésoxyRiboNucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADNg	AND génomique
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	ARN messenger
BDNF	“Brain-Derived Neurotrophic Factor”
BSA	“Bovine Serum Albumin “
CTI	Cellules Tumorales Isolées
DAB	DiAminoBenzidine
EGF	“Epidermal Growth Factor”
DNET	Tumeur NeuroEpithéliale Dysembryoplasique
EGFR	“EGF Receptor”
EGFR _{DIC}	Domaine Intra-Cellulaire de l’EGFR
EGFR _{DEC}	Domaine Extra-Cellulaire de l’EGFR
FGFR	“Fibroblast Growth Factor Receptor”
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-Phosphate DésHydrogénase
GBM	Glioblastome Multiforme
GFAP	“Glial Fibrillary Acidic Protein”
HB-EGF	“Heparin-Binding EGF”
HER	“Human Epidermal Receptor”
HIF1 α	“Hypoxia Inducible Factors 1 alpha”
HLH	Hémianopsie Latérale Homonyme
HPRT	Hypoxanthine PhosphoRibosyl Transférase
HPS	Hémalun Phloxine Safran
HRP	“HorseRadish Peroxidase” ou peroxydase de raifort
HTIC	Hypertension Intra-Crânienne
IDH	Isocitrate DésHydrogénase
Ig	Immunoglobuline
IGFR	“Insulin-like Growth Factor Receptor”
IK	Indice de Karnofsky
INA	Alpha-InterNexine
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
MAPK	“Mitogen Activated Protein Kinase”
MGMT	« O ₆ -méthylguanine-DNA méthyltransférase »
MLPA	“Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification”
NeuN	“Neuronal Nuclei”
NGF	Nerve Growth Factor
NF	NeuroFilament
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
p75 ^{NTR}	“p75 NeuroTrophin Receptor”

P-EGFR	EGFR phosphorylé
PAS	“Periodic Acid Schiff”
PBS	“Phosphate Buffer Saline”
PCR	“Polymerase Chain reaction”
PDGFR	“Platelet Derived Growth Factor Receptor”
PI3K	“Phosphatidyl Inositol 3 Kinase”
RCP	Réunion de Concertation Pluridisciplinaire
RIN	Nombre d’Intégrité des ARN
STIC	Soutien aux techniques innovantes et coûteuses
SNC	Système nerveux central
TBP	TATA box binding protein
TDM	TomoDensitoMétrie
TGF α	“Transforming Growth Factor α “
TGN	Tumeur GlioNeuronale
TK	Tyrosine-Kinase
TMA	Tissue Micro-Array
Trk	“Tropomyosin receptor kinase”
TT	Tissu Tumoral solide
URA	Unité Relative Arbitraire
VEGF	« Vascular Endothelial Growth factor »

I. INTRODUCTION

Les tumeurs primitives gliales (ou gliomes) sont les tumeurs primitives les plus fréquentes du système nerveux central (SNC) et en représentent plus de la moitié des cas quel que soit l'âge.

Le type histologique d'une tumeur cérébrale est actuellement défini par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) sur la reconnaissance de caractères morphologiques que possèdent les cellules tumorales comparativement aux cellules normales telles que les astrocytes, les oligodendrocytes ou les neurones. Parmi les gliomes, les astrocytomes, les oligodendrogliomes et les tumeurs mixtes oligo-astrocytaires sont les plus fréquents. Ils sont composés d'un ou plusieurs contingents d'origine gliale. Les tumeurs glioneurales (TGN), les gangliogliomes par exemple, possèdent un contingent glial et un contingent neuronal. Pour chaque type histopathologique l'OMS distingue quatre grades de malignité croissante (I à IV). Les tumeurs de grade IV, les glioblastomes, ont une médiane de survie d'environ 12 mois.

Différents types de gliomes peuvent être distingués selon la présence ou l'absence d'un contingent de tissu tumoral compact et d'un contingent de cellules tumorales isolées (CTI). Les CTI infiltrent le parenchyme cérébral qui en général a conservé ses propriétés fonctionnelles. Elles induisent une gliose réactionnelle. A l'inverse, le tissu tumoral compact ne se constitue que de cellules tumorales et d'un stroma formé de néo-vaisseaux et de cellules inflammatoires. Cette configuration spatiale conditionne le traitement des gliomes. Dans les tumeurs bien limitées, dépourvues de contingent de CTI, un traitement chirurgical seul peut être curateur tandis que dans les autres formes, la prise en charge associera le plus souvent chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie.

Dans les gliomes, l'hypothèse oncogénétique actuellement admise est la transformation de cellules souches ou de cellules progénitrices qui auraient la capacité de s'auto-renouveler et de se différencier (cellules pluri- ou multipotentes). Elles seraient donc capables d'engendrer les différents types morphologiques des cellules tumorales au sein d'une même tumeur.

Ceci pourrait expliquer la grande hétérogénéité cellulaire rencontrée dans les gliomes, rendant leur classification histologique difficile et peu reproductible. Ainsi, des contingents cellulaires ayant une morphologie similaire peuvent être présents dans des tumeurs de type et de pronostic très différents. Par exemple un contingent de type oligodendrogliale ou « oligodendrocyte-like » (« oligo-like ») peut être observé dans des oligodendrogliomes, des glioblastomes, des astrocytomes pilocytiques ou des gangliogliomes. En conséquence, dans ces tumeurs complexes et de prise en charge délicate que sont les gliomes, il est nécessaire d'associer à l'analyse

morphologique l'étude de marqueurs moléculaires. Ces deux approches sont complémentaires et permettent d'établir ce que l'on appelle la classification histomoléculaire des gliomes.

Les données actuelles de la littérature indiquent que les gliomes diffus de bas grade (grade II de l'OMS : astrocytome diffus, oligo-astrocytome, oligodendrogliome) se caractérisent par une fréquence élevée de mutations *IDH1/2* (plus de 80 %) qui apparaissent à un stade très précoce. Par ailleurs, la majorité des astrocytomes diffus (environ 60 %) présentent des mutations de *TP53*, qui constituent un marqueur pronostique de survie plus courte. A l'inverse, dans les oligodendrogliomes, on constate fréquemment une délétion du bras court du chromosome 1 (1p) et/ou du bras long du chromosome 19 (19q) (environ 70 % des cas) associée à une meilleure chimiosensibilité et à une survie plus longue, sans amplification de l'*EGFR* (« Epidermal Growth Factor Receptor »)

Les mutations *IDH1/2* sont fréquentes (> 80 %) dans les glioblastomes secondaires qui se sont développés à partir d'astrocytomes de grade II ou III. En revanche, elles sont rares dans les glioblastomes primaires dits *de novo* (< 5 %). Les mutations *IDH1/2* constituent le plus important facteur pronostique de la maladie chez les patients souffrant d'un glioblastome. Leur fréquence élevée dans les oligodendrogliomes, les astrocytomes et dans les glioblastomes secondaires qui en dérivent, suggèrent que ces tumeurs puissent avoir en commun une même population de cellules progénitrices. En revanche, l'absence de ce marqueur moléculaire dans les glioblastomes primaires suggère une origine cellulaire différente. Les deux sous-types de glioblastome présentent cependant un phénotype histologique similaire, ce qui pourrait être dû à la présence d'autres altérations génétiques, notamment la perte de gènes suppresseurs de tumeur sur le chromosome 10q.

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 pouvant influencer le pronostic et le choix du traitement. Elles sont d'ordre clinique, radiologique, histopathologique et moléculaire.

La première partie de ce travail a comparé le profil moléculaire du contingent « oligo-like » de gliomes non infiltrants et d'oligodendrogliomes. Les différents contingents cellulaires ont été isolés afin d'étudier l'expression de marqueurs diagnostiques et pronostiques comme l'expression de p53, d'*IDH1*, d'*INA*, de *CD34* et d'estimer l'index Ki67. Nous avons également recherché la présence ou l'absence des délétions 1p et 19q, de mutation d'*IDH* et de *BRAF* par des techniques de MLPA (« Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification »). Les résultats obtenus ont été analysés comparativement avec les données cliniques (survie) et radiologiques.

A la suite de cette étude, nous avons dans un deuxième temps analysé l'expression de différents variants de l'*EGFR* dans des gliomes infiltrants et non infiltrants (astrocytomes pilocytiques, gangliogliomes, oligodendrogliomes, oligo-astrocytomes, glioblastomes), afin d'étudier son implication potentielle dans l'infiltration tumorale. En effet, l'*EGFR* est à l'origine de plusieurs transcrits (variants 1, 2, 3 et 4) qui codent plusieurs isoformes protéiques (a, b, c et d). De plus, des mutations géniques sont à l'origine d'un transcrit mutant appelé EGFRvIII qui code un récepteur tronqué mutant. Nous avons étudié l'amplification génique, l'expression génique et protéique de l'*EGFR*.

II. GENERALITES

II. 1. GLIOMES : DEFINITION, INCIDENCE

II. 1. a) Définition

Tumeurs primitives du SNC, 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.

II. 1. b) Incidence

L'incidence des cancers primitifs du SNC a été estimée en France à 4 491 cas en 2009 (1). Elle a augmenté au cours des dernières décennies, notamment pour les tumeurs survenant chez les personnes âgées. Les cancers du SNC représentent environ 2% des tumeurs malignes de l'adulte et sont un peu plus fréquents chez l'homme, aux alentours de 60 ans. Ce sont globalement des cancers de mauvais pronostic. Le nombre de décès estimé en 2009 est de 2 984 (2).

Les gliomes sont les tumeurs primitives les plus fréquentes du SNC (40%) de l'adulte et les secondes après les leucémies chez l'enfant. Les glioblastomes sont les tumeurs cérébrales les plus fréquentes, représentant 15% de toutes les tumeurs intracrâniennes, et 60 à 75% des tumeurs astrocytaires (3).

La cause des cancers primitifs du SNC est inconnue dans la grande majorité des cas. Il y a peu de facteurs de risque clairement établis hormis la notion d'antécédent d'irradiation cérébrale thérapeutique, notamment pendant l'enfance. Les formes familiales sont exceptionnelles, principalement dans les neurofibromatoses de type 1 (ou maladie de Von Recklinghausen). Le glioblastome peut exceptionnellement être dû à une exposition à certains carcinogènes chimiques d'origine professionnelle : nitrosoguanidine et nitrosourées (utilisés dans les laboratoires, reconnus dans le tableau 85 des maladies professionnelles). Des études sont en cours sur le rôle des ondes électromagnétiques et des pesticides, mais n'ont pas permis de documenter une aggravation des risques (4).

II. 2. TUMEURS GLIONEURONALES : DEFINITION, INCIDENCE

II. 2. a) Définition

Chez l'enfant ou l'adulte jeune, un diagnostic de gliome, quel qu'en soit le type histologique, ne doit être affirmé qu'après avoir éliminé une TGN. Ces tumeurs possèdent un contingent glial et un contingent neuronal. Les TGN sont majoritairement de grade I ou II, et représentent un diagnostic différentiel des gliomes non infiltrants (versus gangliogliome et tumeur neuroépithéliale dysembryoplasique) et des gliomes malins (versus TGN malignes).

II. 2. b) Incidence

Les TGN représentent moins de 1% des tumeurs du SNC, et sont le plus souvent de localisation temporale (plus de 70% des cas) (5).

II. 3. ASPECTS CLINIQUES

La symptomatologie clinique peut être très variable, fonction de la localisation et de la dynamique de la croissance tumorale. Les tumeurs bénignes croissent lentement et peuvent atteindre des dimensions très élevées avant de devenir symptomatiques. Une tumeur cérébrale doit être suspectée devant des signes neurologiques d'aggravation progressive, avec extension des symptômes dite « en tâche d'huile », mais le mode de révélation peut également être brutal. Le cerveau est dépourvu de lymphatique, compromettant le drainage de l'œdème, ce qui favorise la compression du cerveau et l'hypertension intracrânienne (HTIC). L'œdème ainsi formé diminue le débit sanguin cérébral. Le syndrome d'HTIC correspond à un ensemble de signes dus à une augmentation de la pression dans les vaisseaux du cerveau. L'HTIC peut être provoquée par des lésions à l'intérieur du cerveau telles que des tumeurs mais également par des hématomes, des accidents vasculaires, des infections, ou encore par une accumulation de liquide dans les cavités du cerveau (hydrocéphalie). Elle se manifeste par des céphalées, des vomissements, des troubles de la vision et peut évoluer vers un coma.

La plupart des signes cliniques apparaît lorsque :

- l'expansion tumorale comprime ou déplace le cerveau,
- la tumeur empêche la circulation normale du LCR favorisant l'hydrocéphalie,
- la lésion infiltre une ou plusieurs aires fonctionnelles,
- des remaniements hémorragiques, nécrotiques ou kystiques se produisent au sein de la tumeur.

Les symptômes révélateurs sont principalement :

- des céphalées (50%) : souvent homolatérales à la lésion (tumeurs sus-tentorielles), rétro-orbitaires, rétro-auriculaires ou occipitales (tumeurs sous-tentorielles), fixées, d'intensité croissante chez une personne sans antécédent céphalalgique,
- une crise d'épilepsie (20%) : souvent partielle, possible valeur localisatrice (troubles psychiatriques aigus ou atypiques (crise temporelle partielle complexe) ou déficit neurologique focalisé),
- un déficit neurologique focalisé selon la topographie (cf. infra),
- une HTIC : céphalées inhabituelles et persistantes (typiquement réveillant en deuxième partie de nuit), nausées matinales, vomissements (classiquement au réveil et soulageant les céphalées), troubles de la vigilance, troubles visuels, troubles de l'équilibre, étourdissements, troubles du comportement,
- une augmentation du périmètre crânien chez le jeune enfant, lié à l'HTIC,
- des troubles cognitifs : changement de personnalité, troubles de l'humeur ou du caractère, ralentissement idéo-moteur,
- un syndrome d'engagement.

Les crises focales ou les déficits neurologiques observés permettent de faire un diagnostic neurologique topographique du processus (figure 1) :

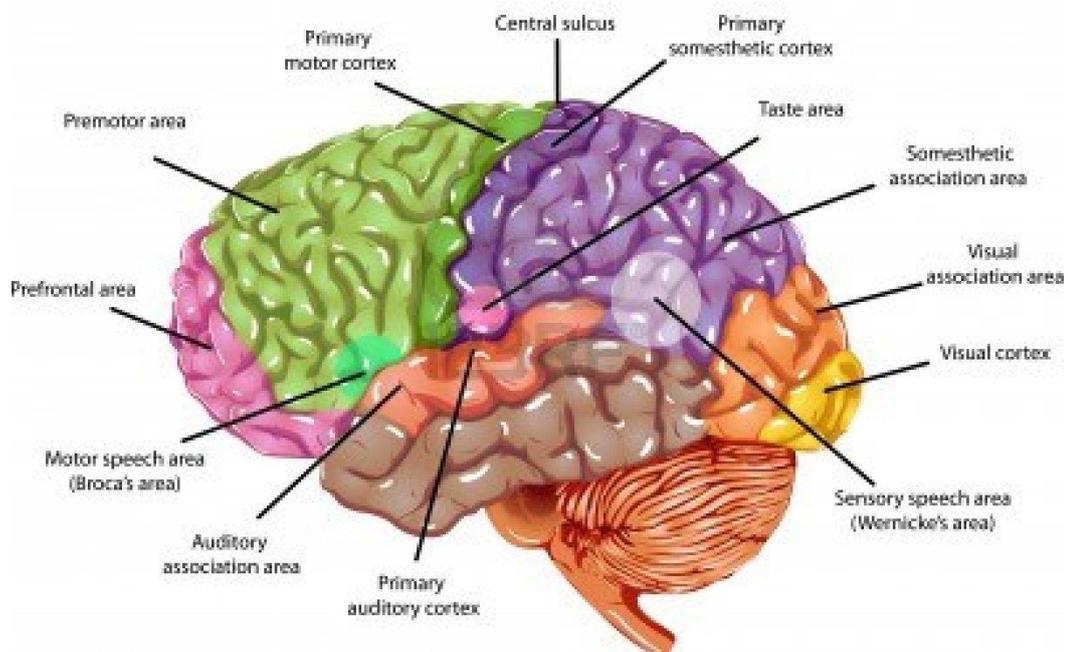


Figure 1 : Les régions du cerveau humain :les déficits neurologiques observés permettent de faire un diagnostic neurologique topographique du processus tumoral (6).

- localisation frontale : syndrome frontal (problèmes de mise en route, d'attention, de personnalité ou d'émotion), hémiparésie, aphasie si atteinte de l'hémisphère dominant, anosmie homolatérale (base des lobes frontaux), incontinence urinaire ou miction impérieuse (face interne).

- localisation pariétale : crises focales sensitives, hémianopsie latérale homonyme (HLH) controlatérale, si atteinte de l'hémisphère dominant : troubles de la parole, agraphie et agnosie digitale.

- localisation temporale : si hémisphère dominant : aphasie ou dysphasie mixte, si hémisphère mineur : désorientation spatiale, apraxie constructive, HLH gauche.

- localisation occipitale : quadranopsie controlatérale voire hémianopsie, agnosie faciale.

- localisation sous-corticale :

- capsule interne : hémiplégie controlatérale,
- thalamus : troubles de la sensibilité ou douleurs, controlatérales,
- noyaux gris : tremblements atypiques, dystonie,
- hypothalamus : troubles de l'alimentation, déficit endocrinien.

- localisations sous-tentorielles :

- fosse postérieure : HTIC précoce, syndrome cérébelleux
- tronc cérébral : déficit des nerfs crâniens uni- ou bilatéral (V, VI, VII, X), HTIC tardive (obstruction aqueduc de Sylvius), hémiplégie, hémianesthésie ou troubles cérébelleux.

II. 4. STRUCTURE SPATIALE ET ASPECTS RADIOLOGIQUES

II. 4. a) Structure spatiale

La croissance tumorale des gliomes se distingue de celle des autres tumeurs malignes. D'une part, une évolution métastatique est exceptionnelle (encéphale, moëlle, 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. Les travaux de C. Daumas-Duport et coll. ont montré qu'il y avait deux types de tissu tumoral : le tissu tumoral solide (TT) composé uniquement de cellules tumorales et le tissu formé de cellules tumorales infiltrantes (CTI) (7). Les gliomes infiltrants peuvent être composés uniquement de CTI avec une densité de cellules tumorales variable dans la tumeur, ou bien être constitués de TT avec une composante associée de CTI. Lorsqu'une tumeur présente une composante de TT, il s'y associe une néoangiogenèse qui n'existe pas dans le contingent de CTI.

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

II. 4. b) Aspects radiologiques

L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) cérébrale est l'examen de référence, sans puis avec injection de gadolinium, qui permet de confirmer le syndrome de masse et d'orienter vers un diagnostic (tableau 1). L'absence de prise de contraste à l'IRM n'est pas prédictive du grade de gliome.

La place de la tomodensitométrie (TDM), sans puis avec injection de produit de contraste, est limitée :

- aux patients ayant une contre-indication à l'IRM ;
- au défaut d'accès à l'IRM en situation d'urgence (signes HTIC, état de mal épileptique,...). La TDM sera ensuite systématiquement complétée par une IRM. Les signes TDM très évocateurs sont une hyperdensité après injection du produit de contraste et aspect hétérogène avec un œdème péri-lésionnel (tableau 2). Une TDM thoraco-abdomino-pelvienne est souvent réalisée afin d'éliminer une origine métastatique qui est plus fréquente qu'une tumeur primitive du SNC.

La connaissance des données radiologiques permet de vérifier la représentativité des prélèvements notamment biopsiques en s'assurant par exemple, de la présence d'une angiogenèse sur les lames d'une tumeur prenant le contraste sur l'imagerie. Les aspects sont schématiquement dus :

- au tissu tumoral solide : les aspects sont secondaires à la néovascularisation avec au scanner un renforcement de la prise de contraste et un hypersignal T1 sur l'IRM, renforcé après injection de produit de contraste,
- à la nécrose : hypodensité sur le scanner et hyposignal T1 sur l'IRM,
- à la composante de CTI : elle ne prend pas le contraste mais, par l'intermédiaire de l'œdème qui lui est généralement associé, elle se traduit par une hypodensité à la TDM et en IRM par un hypersignal T2 et un hyposignal T1 à l'IRM.

IRM	T1	T1 + Gadolinium	T2
Astrocytome Grade I	hypointense	-/+	hyperintense
Astrocytome Grade II	hypointense	-/+	hyperintense
Astrocytome Grade III	hypointense	+, irrégulière	hyperintense
Oligodendrogliome	hypo/isointense +/- calcification	-/+ si - : forme purement infiltrante	hyperintense (peu œdème périfocal)
Glioblastome	hypo/isointense	++	hyperintense
Gangliogliome	hypointense		hyperintense
Métastase	hypointense (sauf hémorragie ou mélanome primitif)	+++ (néovascularisation et perméabilité vasculaire)	hyperintense (œdème périfocal)

Tableau 1 : Aspects à l'IRM des gliomes.

TDM	Non injecté	Prise de contraste
Astrocytome Grade I	iso/hypodense souvent kystique, sans calcification	+ , massive, 95% cas
Astrocytome Grade II	hypodense, 20% calcifications, pas d'hémorragie, kyste rare	-/+, peu spécifique → IRM
Astrocytome Grade III	hypodense, hétérogène, remaniements kystiques, hémorragiques, rares calcifications	+, hétérogène
Oligodendrogliome	hypodense, calcification (1/3)	-/+ (multinodulaire)
Glioblastome	hypo/iso/hyperdense	+++
Gangliogliome	iso/hypodense solide ou kystique, bien limitée, +/- calcification	souvent +
Métastase	isodense, hypodensité en couronne de l'œdème périphérique, remaniements nécrotiques Ou hyperdense = hémorragique Ou très hyperdense = calcifiée	+++ , en anneau périphérique pour les grandes lésions

Tableau 2 : Aspects des gliomes à la TDM.



Figure 2 : IRM d'un astrocytome pilocytique (7).
Coupe sagittale en séquence T1 avec injection de gadolinium. Lésion du tronc cérébral constituée d'une lésion nodulaire prenant le contraste et d'une portion kystique (hyposignal). Hydrocéphalie (dilatation ventriculaire).

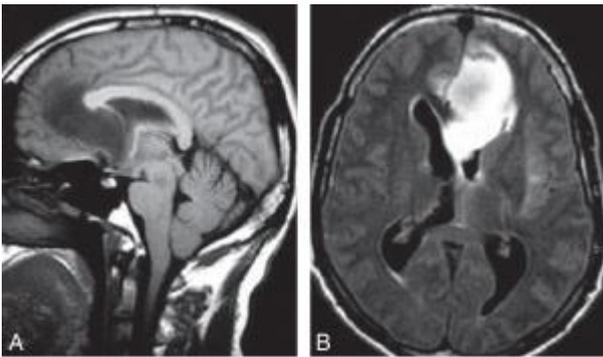


Figure 3 : IRM d'un astrocytome diffus de bas grade frontal gauche (grade II) (7).
Lésion intracérébrale fronto-cingulaire gauche, expansive et infiltrante, assez mal limitée. Effet de masse modéré sur les structures médianes antérieures (déviation controlatérale de la faux).
A. Sagittal T1.
B. Axial FLAIR.
C. Axial T1 sans injection.
D. Axial T1 après injection de gadolinium.

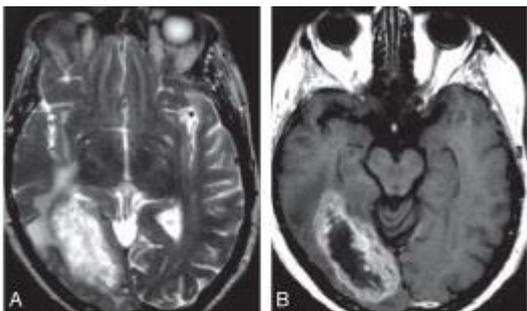
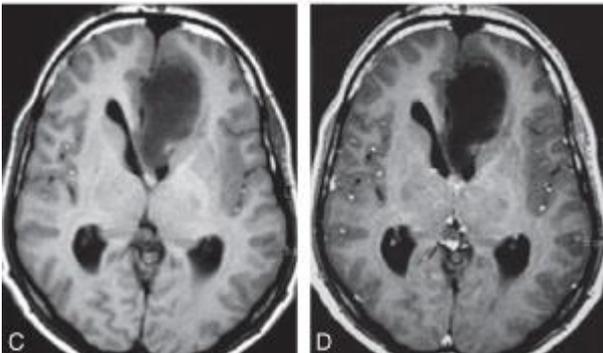
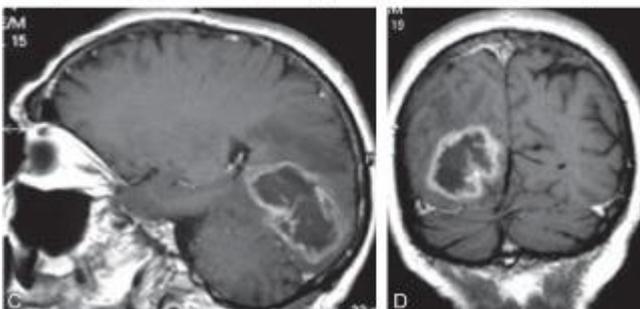


Figure 4 : IRM d'un glioblastome temporo-occipital droit (grade IV) (7).
Lésion intracérébrale infiltrante temporo-occipitale droite, mal limitée, spontanément hypodense. Nécrose centrale, œdème péri-lésionnel et effet de masse important sur le carrefour ventriculaire droit dévié en avant (déplacement de la calcification du plexus choroïde) et partiellement effacé.
Lésion en hypersignal T2, entourée d'œdème, nécrosée en son centre (nécrose : hypersignal T2 et hyposignal T1). Après injection, rehaussement annulaire, épais et irrégulier.
A. Axial T2.
B. Axial T1 après injection.
C. Sagittal T1 après injection.
D. Frontal T1 après injection.



Les gangliogliomes sont des tumeurs souvent kystiques, avec éventuellement un nodule intratumoral. Ils présentent un hyposignal T1 et un hypersignal T2 à l'IRM, d'aspect comparable à d'autres tumeurs de bas grade comme les astrocytomes pilocytiques ou les xantho-astrocytomes. En l'absence de kyste, ils prennent l'aspect d'une tumeur solide, bien limitée, avec peu d'effet de masse et une infiltration tissulaire limitée. Les calcifications sont fréquentes. Comme les astrocytomes pilocytiques, les gangliogliomes peuvent donner une fausse impression de malignité s'ils se développent dans l'espace sous-arachnoïdien. Hémorragie et nécrose sont rares (5).

Une tumeur neuroépithéliale dysembryoplasique (DNET), qui fait partie des tumeurs glioneuronales, doit être évoquée devant une tumeur d'aspect glial dans un contexte d'épilepsie partielle souvent pharmacorésistante, ayant débuté avant l'âge de 20 ans, sans déficit neurologique, de topographie corticale, sans œdème, sans effet de masse ni prise de contraste.

II. 5. CLASSIFICATION OMS 2007

Le diagnostic de certitude repose sur l'examen anatomopathologique du tissu tumoral. Plusieurs types de procédure chirurgicale permettent d'en obtenir : biopsie diagnostique stéréotaxique (avec un cadre), sous neuronavigation (assistée par ordinateur), ou résection tumorale partielle ou totale. Le choix de la procédure se fait selon la topographie et la taille de la lésion, l'état neurologique et général du patient et les orientations diagnostiques radiologiques. Les indications de « non-biopsie » sont prises et justifiées en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP).

La classification est fonction du type cellulaire prédominant et de la présence de critères d'anaplasie : faible différenciation, densité cellulaire élevée, atypies nucléaires, activité mitotique, mitoses atypiques, nécrose, prolifération vasculaire et endothéliale, permettant de donner un grade. Des problèmes de reproductibilité se posent, qui résultent de la difficulté à distinguer les cellules tumorales du parenchyme résiduel infiltré, de la difficulté de reconnaître le type précis de la cellule tumorale astrocyte ou oligodendrocyte (sans doute en raison de leur histogénèse probable à partir de progéniteurs gliaux transformés) et de la possible non-représentativité des prélèvements (9).

Le grade définit le degré de malignité des gliomes :

- gliome de grade I (astrocytome pilocytique, 5% des gliomes). Il s'agit d'une tumeur gliale, non infiltrante, d'évolution bénigne, curable par la chirurgie quand celle-ci peut être totale, qui dans sa prise en charge nécessite surtout l'analyse et le suivi de symptômes neurologiques liés à sa topographie (épilepsie, déficit), justifiant alors une évaluation régulière.

- à partir du grade II, les gliomes sont infiltrants et toujours malins. On distingue les gliomes de bas grade (II, 20 à 25% des gliomes) et de haut grade (III et IV, 70 à 75% des gliomes) dont la prise en charge et l'évolution sont différentes. Les tumeurs de grade II peuvent être des oligodendrogliomes, astrocytomes ou oligo-astrocytomes, celles de grade III des oligodendrogliomes ou astrocytomes ou oligo-astrocytomes anaplasiques, les glioblastomes étant de grade IV. Les données de la génétique moléculaire ont permis de distinguer les glioblastomes *de novo* des glioblastomes « secondaires » qui résulteraient de la transformation maligne des tumeurs astrocytaires de grade II et III. En effet, l'évolution naturelle d'un gliome de bas grade est la transformation en un gliome de haut grade, dans un délai variable.

Les gliomes sont le plus souvent des tumeurs uniques mais il existe également des formes multifocales qui posent le problème du diagnostic différentiel avec des métastases cérébrales. Une gliomatose cérébrale est une forme particulière de gliome, infiltrant plus de 3 lobes. À la différence des autres cancers, les tumeurs cérébrales primitives ne métastasent qu'exceptionnellement en dehors du SNC (encéphale et moelle).

II. 5. a) Les gliomes astrocytaires

L'astrocytome pilocytique (figures 5 et 6), 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. Les astrocytomes pilocytiques sont des tumeurs bien limitées constituées uniquement de TT sans composante de CTI. Ils se caractérisent par une architecture biphasique, avec des cellules fusiformes, bipolaires, pouvant contenir un matériel éosinophile hyalin (fibres de Rosenthal constituées d'alpha-béta cristalline) alternant avec des astrocytes protoplasmiques correspondant à des cellules plus rondes avec des prolongements cytoplasmiques stellaires. Un contingent « oligo-like » peut être présent, au sein d'une architecture microkystique. On peut observer des corps granulaires éosinophiles. La vascularisation est souvent anormale avec des vaisseaux remaniés, télangiectasiques et parfois une prolifération micro-vasculaire, expliquant la prise de contraste en imagerie (diagnostic différentiel avec un astrocytome diffus grade II). Les mitoses sont rares mais peuvent être présentes de même que de la nécrose ischémique, sans architecture palissadique en périphérie. Si elle existe, elle est de type ischémique. Les cellules bipolaires expriment typiquement la protéine gliofibrillaire acide des astrocytes (GFAP), également exprimée par les astrocytes protoplasmiques de manière plus inconstante. Les cellules rondes peuvent exprimer le facteur de transcription Olig2 (10).

La variante pilomyxoïde se caractérise par des cellules bipolaires se disposant le plus souvent en pseudo-rosettes péri-vasculaires dans une substance myxoïde dépourvue de fibre de

Rosenthal ou de corps granuleux éosinophiles. 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 %. Le pronostic est plus réservé, en raison de la dissémination plus fréquente dans le LCR et de la fréquence des récives locales. Cette variante est classée grade II de l'OMS.

Le xantho-astrocytome pléiomorphe est une tumeur astrocytaire de grade II, de l'enfant ou de l'adulte jeune, avec des cellules très pléiomorphes, certaines avec un cytoplasme spumeux abondant, avec une expression de la GFAP pouvant être refoulée en périphérie du contenu lipidique. Des cellules multinucléées et des corps granuleux peuvent être observés. Une activité mitotique significative (≥ 5 mitoses) et/ou la présence de nécrose conduisent à un « xantho-astrocytome pléiomorphe avec aspects anaplasiques ». L'index Ki67 est en général $< 1\%$.

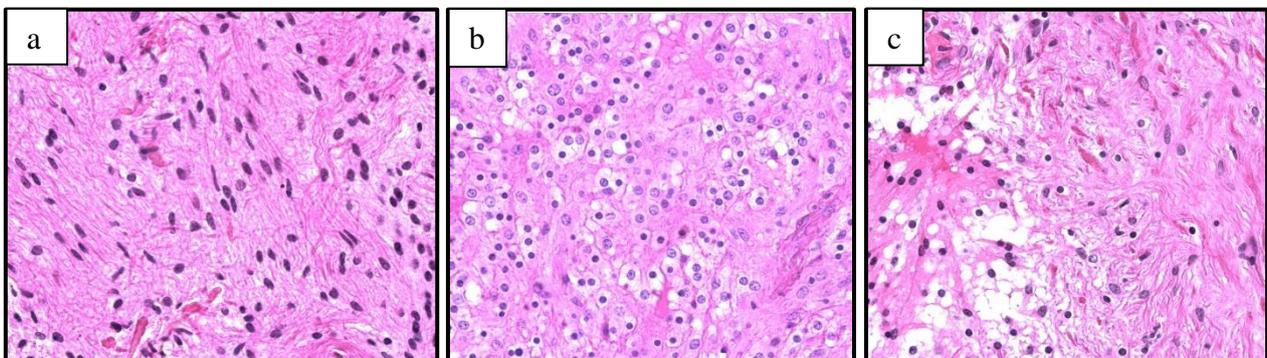


Figure 5 : Astrocytome pilocytique a) contingent piloïde ou fibrillaire, b) contingent « oligo-like », c) contingent fibrillaire et « oligo-like » d'architecture microkystique, (HPS, x400).

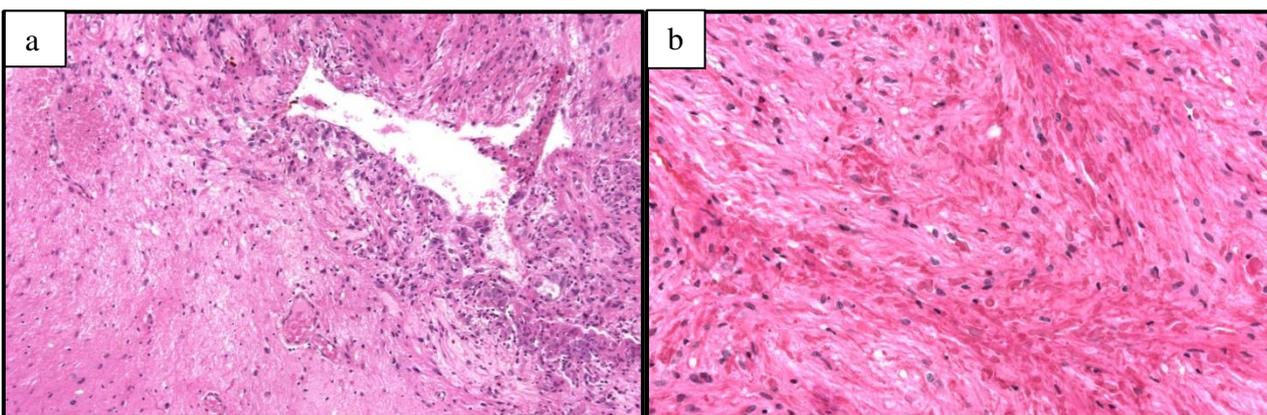


Figure 6 : Astrocytome pilocytique a) bien limité par rapport au tissu cérébral adjacent (HPS, x100), avec des fibres de Rosenthal (HPS, x200).

L'astrocytome diffus (grade II) est défini par une cellularité augmentée par rapport à la substance blanche normale, des atypies cytonucléaires et par la présence d'une mitose au maximum. Il n'y a pas de nécrose ni de prolifération microvasculaire. Selon l'aspect des cellules, on identifie les sous-types :

- fibrillaire : le plus fréquent, constitué d'astrocytes tumoraux fibrillaires, avec des limites cytoplasmiques floues donnant un aspect de « noyaux nus », ces noyaux étant hyperchromatiques et élargis. L'aspect microkystique est fréquent. Quelques cellules gémistocytiques sont possibles.
- gémistocytique : composé d'au moins 20% d'astrocytes tumoraux gémistocytiques, avec un cytoplasme éosinophile abondant, un noyau refoulé en périphérie. Ces cellules expriment GFAP et souvent p53. Des infiltrats lymphocytaires péri-vasculaires sont fréquents.
- protoplasmique : le plus rare, constitué d'astrocytes tumoraux avec un petit corps cellulaire avec des prolongements cytoplasmiques exprimant la GFAP. Les aspects microkystiques et mucoïdes sont fréquents.

L'astrocytome anaplasique (grade III) se caractérise par une densité cellulaire nettement plus importante, des atypies nucléaires marquées et des mitoses (tableau 3).

La gliomatose cérébrale (grade III) est un gliome diffus avec une infiltration importante du SNC (au moins 3 lobes cérébraux), souvent bilatérale, avec possible extension cérébelleuse ou médullaire. Le phénotype est le plus souvent astrocytaire, mais peut aussi être oligodendrogial ou oligo-astrocytaire.

La présence de nécrose et d'une prolifération microvasculaire (endothélio-capillaire) caractérise *les glioblastomes multiformes* (GBM, grade IV, figure 7). La nécrose est typiquement en carte de géographie avec palissades cellulaires périnécrotiques, ou prend l'aspect de vastes plages de nécrose de type ischémique. Les mitoses sont nombreuses. 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, les glioblastomes à composante oligodendrogiale qui comportent des territoires typiquement « oligo-like », les glioblastomes à cellules géantes multinucléées (5% des GBM), gémistocytiques, à cellules granuleuses (positives sur la coloration de PAS) ou à cellules lipidiques en fonction du contingent majoritaire. Les gliosarcomes sont caractérisés par une architecture biphasique, gliale et mésenchymateuse (2% des GBM). L'histologie peut simuler celle d'un plus bas grade si le prélèvement a porté sur la périphérie de la tumeur (CTI) ou dans un territoire ne prenant pas le produit de contraste.

Astrocytomes	Différen- ciation	Densité cellulaire	Atypies nucléaires	Activité mitotique	Nécrose	Prolifération vasculaire
Grade II	bien	modérée	occasionnelles	0 ou 1 mitose	non	non
Grade III	moyennement	augmentée	présentes	présente (≥ 2)	non	non
Grade IV	peu	élevée	marquées	marquée	oui	oui

Tableau 3 : Grading OMS 2007 des astrocytomes.

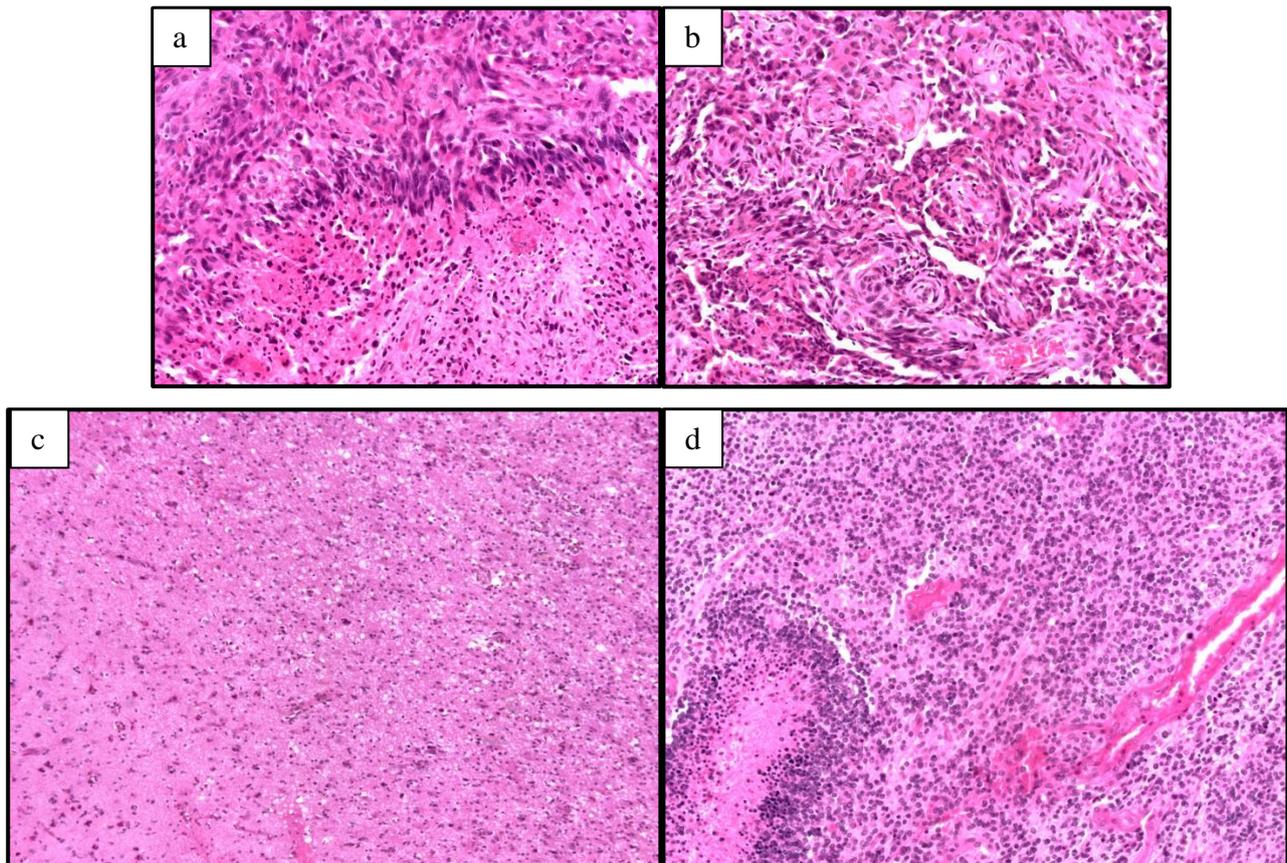


Figure 7 : Glioblastome multiforme a) nécrose palissadique (HPS, x200), b) néovascularisation gloméruloïde (HPS, x200), c) front d'invasion mal limité (HPS, x100), d) nécrose palissadique et contingent « oligo-like » dans un glioblastome avec contingent oligodendroglial (HPS, x200).

II. 5. b) Les oligodendrogliomes

Les oligodendrogliomes (figure 8) représentent 5 % des gliomes. Ils sont composés de cellules oligodendrogliales, arrondies, monomorphes, à noyaux réguliers, avec un halo-clair périnucléaire formant un aspect caractéristique dit en « œuf sur le plat » ou en « nid d'abeille ». Ces aspects peuvent parfois manquer, comme dans des formes purement infiltrantes où le cytoplasme n'est pas visualisé, ces cellules ne pouvant être identifiées que par leurs caractéristiques nucléaires. Les noyaux sont ronds ou ovoïdes, à membrane nucléaire nette, avec des amas chromatiniens « en bouton de chemise ». Ces cellules à petits noyaux sombres sont associées en proportion variable à

des cellules à noyaux clairs nucléolés plus volumineux. La population tumorale présente alors une anisocaryose, pouvant être accentuée par la présence de noyaux pycnotiques (7). Une satellitose périneuronale par des oligodendrocytes peut être observée dans les territoires d'infiltration corticale.

Parfois, on observe des cellules arrondies, à cytoplasme éosinophile, avec un noyau excentré présentant les caractéristiques nucléaires des oligodendrocytes, exprimant la GFAP, correspondant à de mini-gémistocytes, de taille inférieure à celle des astrocytes gémistocytiques. Leur disposition anarchique permet de les différencier des astrocytes réactionnels. Les oligodendrocytes gliofibrillaires sont des cellules tumorales de petite taille avec un cytoplasme éosinophile arrondi et un noyau central typique des oligodendrocytes. Des corps granuleux peuvent être rarement rencontrés. Ces tumeurs comportent généralement des zones microkystiques, des calcifications, et leur vascularisation est constituée par un réseau dense de capillaires fins et ramifiés, dite « endocrinoïde ».

D'autres cellules tumorales n'ont pas un morphotype oligodendrogial typique. Certaines ont un noyau plus volumineux avec un nucléole éosinophile tandis que d'autres ont un noyau allongé. Ces cellules doivent rester peu nombreuses. Dans le cas contraire il faut envisager selon l'OMS, le diagnostic de tumeur mixte oligo-astrocytaire.

Il n'existe pas de marqueur immunohistochimique spécifique des cellules oligodendrogiales. L'anticorps anti-GFAP soulignera également la gliose astrocytaire réactionnelle, constituée d'astrocytes régulièrement répartis en damier, qui se développe lors de toute agression du système nerveux central, quelle que soit sa cause.

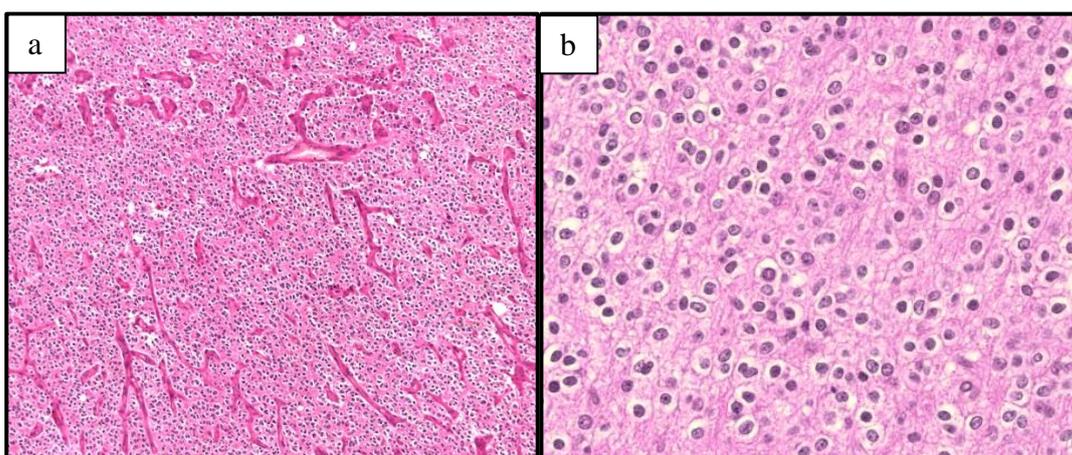


Figure 8 : Oligodendrogliome a) néovascularisation fine (HPS, x100), b) contingent oligodendrogial formé de cellules rondes avec un halo clair péri-nucléaire (HPS, x400).

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

Les oligodendrogliomes anaplasiques se composent généralement de CTI avec une composante de TT. Les cellules tumorales conservent des caractères oligodendrogliaux mais peuvent montrer des variations morphologiques. Les oligodendrocytes mini-gémistocytiques ou gliofibrillaires sont fréquents. La vascularisation est caractéristique, composée de petits capillaires ramifiés. Des zones de nécrose, notamment avec des aspects palissadiques périphériques, peuvent être observées, comme dans les glioblastomes (tableau 4).

Oligodendrogliomes	Différen- ciation	Densité cellulaire	Atypies nucléaires	Activité mitotique	Nécrose	Prolifération vasculaire
Grade II	bien	modérée	+/- marquées	occasionnelle (≤ 5 mitoses)	non (ou peu)	absente
Grade III	anaplasie focale ou diffuse	augmentée	présentes	nombreuses	possible	possible, proéminente

Tableau 4 : Grading OMS 2007 des oligodendrogliomes (les mitoses sont exprimées pour 10 champ à fort grossissement).

II. 5. c) Les gliomes mixtes

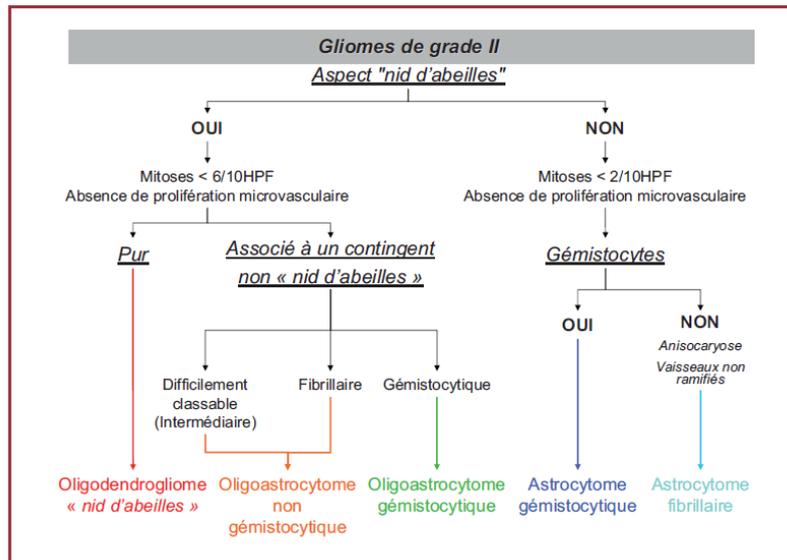
Les auteurs de l'AFIP soulignent que la plupart des astrocytomes et des oligodendrogliomes sont phénotypiquement mixtes ou hybrides par rapport à leur composition cytologique (5). Rarement il apparaît deux populations distinctes histologiquement et géographiquement présentant des caractères oligodendrogliaux ou astrocytaires. Les termes de gliome mixte 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 oligo-astrocytaire. Le grading OMS de ces tumeurs est présenté dans le tableau 5.

Oligo- astrocytomes	Différen- ciation	Densité cellulaire	Atypies nucléaires	Activité mitotique	Nécrose	Prolifération vasculaire
Grade II	bien	modérée	occasionnelles	rare	non	non
Grade III	moyennement	augmentée	présentes	nombreuses	non	possible
Grade IV	peu	élevée	marquées	nombreuses	oui	oui

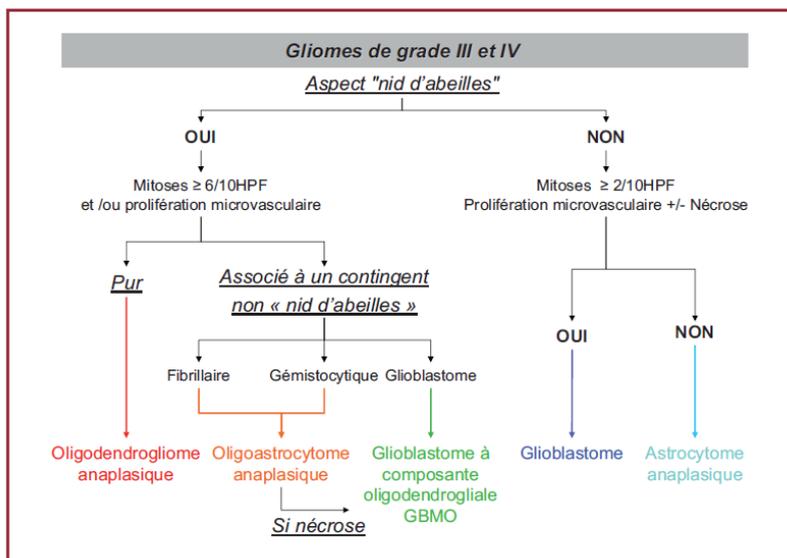
Tableau 5 : Grading OMS 2007 des oligo-astrocytomes.

II. 5. e) Référentiel gliomes diffus de l'adulte

Des algorithmes décisionnels ont été proposés pour les gliomes de bas grade et de haut grade, sur la base de la classification OMS (figures 9).



Figures 9 : Algorithmes diagnostiques pour les gliomes de bas et de haut grade, pour les gliomes de grade II (en haut) et les gliomes de grade III et IV (en bas) (8).



II. 5. d) Les tumeurs glioneurales

Les *gangliogliomes* sont des TGN qui se développent préférentiellement chez l'enfant ou l'adulte jeune, qui sont bien limitées et le plus souvent de grade I (figure 10). Ils peuvent exceptionnellement se transformer en tumeur de grade III (gangliogliome anaplasique) lors d'apparition de critères d'anaplasie dans le contingent glial. Des critères de grade II ont été suggérés, mais ne sont pas encore établis (3). En raison de ce risque même très faible de transformation, ce type de tumeur fait partie des diagnostics différentiels des tumeurs gliales chez l'enfant et l'adulte jeune.

Ces tumeurs de croissance lente sont composées de cellules gliales tumorales avec des cellules ganglionnaires matures tumorales (5). Le composant glial est variable, mais constitue le contingent cellulaire proliférant. Il peut contenir des cellules retrouvées dans les astrocytomes fibrillaires, les oligodendrogliomes ou les astrocytomes pilocytiques (3). Les fibres de Rosenthal et les corps granuleux éosinophiles sont présents dans de nombreux cas. Les neurones dysplasiques sont caractérisés par une perte d'organisation architecturale, une localisation anormale (sous-corticale), des regroupements en amas, une cytomégalie et des corps de Nissl agrégés. Des neurones bi- ou multinucléés sont fréquents (> 50% des cas). Le contingent neuronal, indispensable au diagnostic de gangliogliome, est parfois peu abondant et doit être recherché attentivement sur des coupes, notamment dans les cas présentant des corps granuleux. Une matrice fibrillaire peut être prééminente et contenir des cavités microkystiques ou une substance mucoïde. Les mitoses sont occasionnelles. La nécrose est absente. Seul le contingent glial peut présenter une progression maligne. On peut observer des calcifications, des infiltrats lymphoïdes autour des espaces vasculaires voire au sein du parenchyme cérébral ou tumoral. Ils peuvent infiltrer la leptoméninge en regard, sans pour autant avoir un caractère agressif.

En immunohistochimie, le contingent neuronal exprime NeuN, une protéine neurofilamentaire (NF) et la synaptophysine. Il n'est pas connu de marqueur pour différencier les neurones dysplasiques des neurones non tumoraux résiduels, mais CD34 serait exprimé par les neurones dysplasiques dans 70 à 80% des gangliogliomes, surtout en localisation temporale. Le contingent glial est le plus souvent de type astrocytaire, marqué par la GFAP. L'expression de la p53 est corrélée avec le potentiel agressif. L'index Ki67 est situé entre 1 et 3 % (3).

Les DNET sont des tumeurs mixtes glioneuronales se développant durant l'embryogénèse, de localisation plutôt supra-tentorielle. L'aspect histologique des DNET est polymorphe. Trois composantes histologiques y sont observées : l'élément glio-neuronal, la dysplasie corticale et les nodules gliaux. Cette tumeur est strictement bénigne et non évolutive, sauf à type d'hématome ou d'infarctus hémorragique intra-tumoral (7).

Les tumeurs glioneuronales malignes ne sont pas reconnues par la classification OMS, mais sont identifiées comme rares par l'AFIP (5), difficiles à classer et pouvant être confondues avec des glioblastomes (7,11). Cette entité est définie dans la classification de l'hôpital Sainte-Anne comme la présence d'une différenciation neuronale repérée à l'aide de l'immunohistochimie, au sein de gliomes malins présentant :

- un aspect histologique inhabituel : notamment en cas de présence d'une double composante tumorale astrocytaire et oligodendrogliale formant des foyers distincts,

- et/ou un aspect radiologique atypique : présence d'une composante « charnue » prenant le contraste, en hypersignal T2 et refoulant les structures environnantes.

En effet certaines cellules tumorales, d'aspect non neuronal, exprimeraient NF et/ou la synaptophysine. Ces tumeurs seraient assez fréquentes (20% des glioblastomes), et de mauvais pronostic.

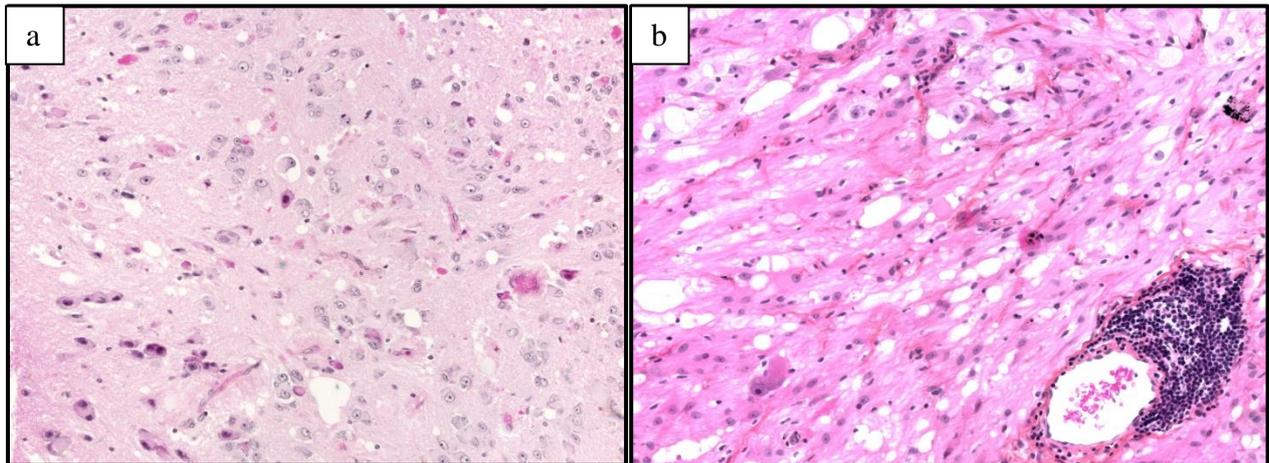


Figure 10 : Gangliogliome a) contingent neuronal (HPS, x200), b) contingent neuronal avec infiltrat lymphoïde péri-vasculaire (HPS, x200).

II. 5. e) Classification de l'Hôpital Sainte-Anne

La classification de l' Hôpital Sainte-Anne découle de l'étude de biopsies stéréotaxiques étagées systématiques le long des trajets biopsiques, et de l'imagerie. Elle n'est pas reconnue par l'OMS. Elle distingue parmi les gliomes de l'adulte, 3 catégories histologiques : les oligodendrogliomes ou oligo-astrocytomes de grade A ou de grade B, et les glioblastomes (7).

Le grading des oligodendrogliomes est basé sur la prise de contraste et l'hyperplasie des cellules endothéliales, définie par une hyperplasie endothéliale de tous les capillaires dans au moins un champ au faible grossissement (objectif 10), et par la présence ponctuelle de noyaux de cellules endothéliales jointifs. On distingue :

- le grade A : absence d'hyperplasie endothéliale et de prise de contraste,
- le grade B : présence d'une hyperplasie endothéliale et/ou d'une prise de contraste.

Les oligo-astrocytomes selon cette classification incluent les tumeurs à composante astrocytaire et oligodendrogliale, et les astrocytomes gémistocytiques puisque la classification OMS tolère la présence de 20% d'oligodendrocytes tumoraux dans ces tumeurs.

Les glioblastomes multiformes sont définis avec les mêmes critères de base que ceux de l'OMS, en définissant les CTI de GBM comme indifférenciées, à cytoplasme peu ou non visible,

sans expression de la GFAP, à noyau oblongue, à membrane nucléaire peu visible et ne comportant généralement pas d'amas chromatiniens.

II. 6. VOIES DE SIGNALISATION et MARQUEURS MOLECULAIRES dans les GLIOMES INFILTRANTS ET NON INFILTRANTS

L'absence de marqueur fiable de l'oligodendrocyte tumoral et le caractère subjectif du grading OMS rendent nécessaire l'utilisation de marqueurs complémentaires afin d'améliorer la classification des gliomes. En ce sens les examens de biologie moléculaire deviennent de plus en plus importants. Ils peuvent avoir une valeur diagnostique, pronostique, ou être prédictifs de la réponse à certains traitements.

Ces examens sont réalisés à partir de prélèvements tissulaires (inclus en paraffine ou congelés en tumorotheque) et sanguins.

II. 6. a) Voies de signalisation

La voie Ras/MAPK (« Mitogen Activated Protein Kinase ») est, en général, activée par le biais d'un récepteur membranaire, lui-même stimulé par un facteur de croissance ou une cytokine qui, sans entrer dans la cellule, va transmettre le signal extracellulaire à l'intérieur de la cellule (figure 11). Les récepteurs membranaires ont la particularité d'avoir une activité enzymatique de phosphorylation de résidus tyrosine, appelée activité tyrosine-kinase (TK) permettant l'activation du récepteur par phosphorylation, et ainsi l'activation d'une cascade de phosphorylations de nombreuses protéines intra-cytoplasmiques qui sont généralement d'autres kinases. La voie Ras/MAPK constitue, avec la voie PI3K (Phosphatidyl Inositol 3-Kinase)/AKT, une des voies de transmission du signal les mieux connues aboutissant, à la mise en jeu de facteurs de transcription capables d'activer des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, mais aussi dans l'invasion et la migration cellulaires, l'angiogenèse et la survie cellulaire.

Parmi les récepteurs de facteurs de croissance capables d'activer la voie Ras/MAPK, les principaux sont l'EGFR et les autres membres de la famille HER (« Human Epidermal Receptor »), le FGFR (« Fibroblast Growth Factor Receptor »), l'IGFR (« Insulin-like Growth Factor Receptor ») et le PDGFR (« Platelet Derived Growth Factor Receptor »). La voie Ras/MAPK est anormalement activée dans de nombreux cancers. Les mécanismes d'activation de cette voie sont principalement l'activation de récepteurs membranaires tels que l'EGFR, mais aussi la survenue de

mutations somatiques, notamment au niveau des proto-oncogènes codant pour les protéines Ras ou Raf, qui constituent des cibles thérapeutiques potentiellement intéressantes (12).

L'autre grande voie de signalisation intracellulaire est la voie PI3K/AKT qui joue un rôle important dans un certain nombre de fonctions cellulaires, notamment la régulation de la glycogénèse, la régulation de la taille de la cellule, la migration, l'apoptose et la prolifération. Cette voie peut être activée, soit directement par activation du récepteur à activité TK, soit par l'intermédiaire de la protéine Ras. Les connexions qui existent entre ces deux voies sont, en fait, probablement plus complexes encore et font intervenir d'autres voies de signalisation intracellulaire (figures 11 et 12) (12).

Les altérations génétiques rencontrées dans les gliomes de haut grade activent certaines voies de transduction du signal ou entraînent une dérégulation du cycle cellulaire.

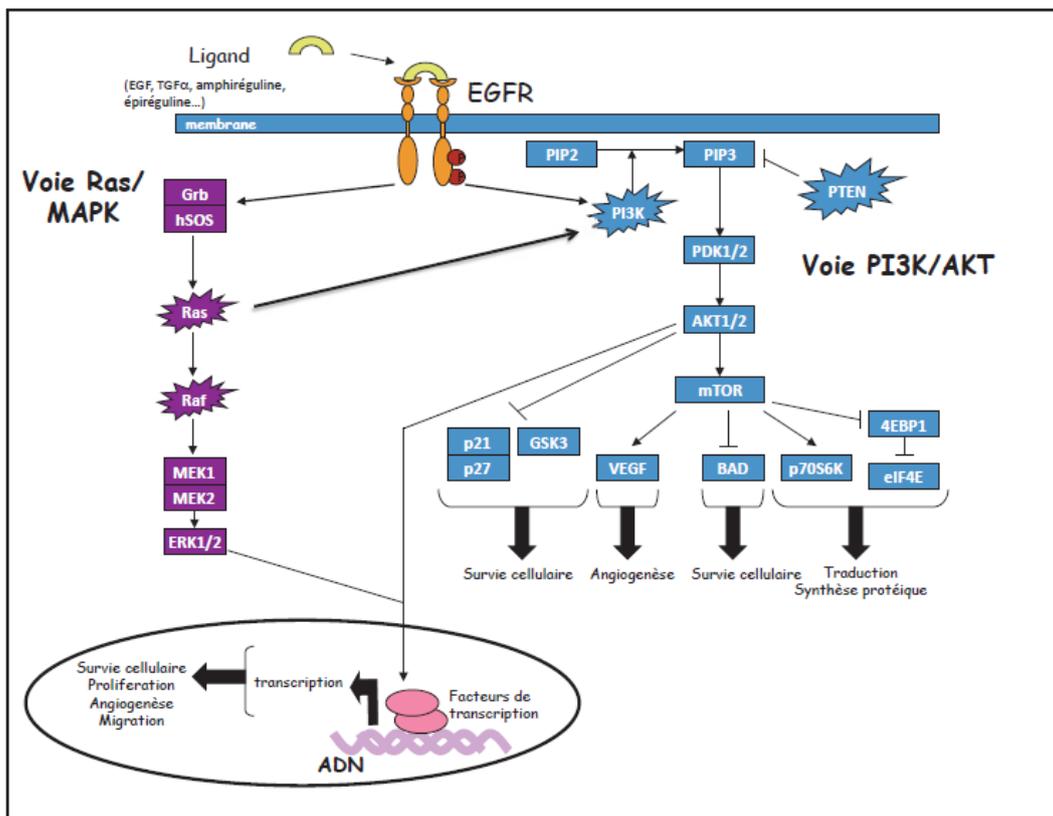


Figure 11 : Schéma général simplifié des voies de signalisation RAS/MAPK et PI3K/AKT, intimement interconnectées (12).

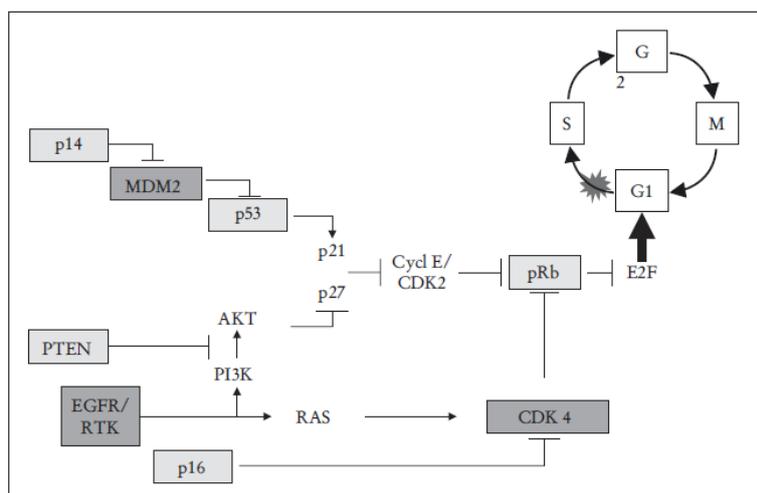


Figure 12 : Principales cibles des altérations génétiques dans les gliomes (en gris clair : gène suppresseur de tumeur, en gris foncé : proto-oncogène) (13).

II. 6. b) Marqueurs moléculaires validés

II. 6. b1) Codélétion 1p19q

La perte complète des bras chromosomiques 1p et 19q est considérée comme un marqueur diagnostique des oligodendrogliomes (et des gliomes à composante oligodendrogliale) (14, 15). Elle est due à une translocation déséquilibrée $t(1;19)(q10;p10)$. C'est également un facteur de bon pronostic et/ou prédictif d'une bonne réponse à la chimiothérapie (15).

A l'inverse, les pertes partielles 1p/19q et les pertes complètes de l'un ou de l'autre bras sont de pronostic généralement défavorable (15). Cette divergence est fonction des critères de sélection des tumeurs, des techniques utilisées et des loci analysés sur les chromosomes.

Les tumeurs astrocytaires présentent une perte d'hétérozygotie assez fréquente (25 à 40%) pour le bras 19q, mais la perte 1p/19q complète est un évènement rare (moins de 10%) (16). Une étude a montré que 11% des astrocytomes de grade II et 23% des astrocytomes de grade III présentent une perte partielle 1p36 (17). De rares patients atteints d'un glioblastome avec une perte 1p/19q ont une meilleure survie (18,19). Une autre équipe a montré qu'il n'y avait pas d'association significative entre la présence ou l'absence des pertes 1p ou 19q et la survie dans les astrocytomes pilocytiques (19).

Les tumeurs glioneuronales malignes avec un contingent oligodendroglial présentent également des pertes 1p et/ou 19q dans 71% des cas (20). Dans les gangliogliomes, aucune altération concernant 1p et 19q n'a été rapportée (21).

L'interne-alpha (INA), un filament intermédiaire exprimé dans les neurones, est surexprimée dans de nombreux gliomes, notamment les oligodendrogliomes mais peu ou pas dans les astrocytomes pilocytiques et les glioblastomes. La surexpression de l'INA est fortement liée à la perte 1p/19q et représente un marqueur de bon pronostic et prédictif d'une bonne réponse à la chimiothérapie (22).

II. 6. b2) EGFR

La surexpression du facteur de croissance EGF (« Epidermal Growth Factor ») et de ses récepteurs (comme EGFR) joue un rôle dans la progression tumorale par l'intermédiaire, entre autres, de l'activation de voies de transduction du signal utilisant Ras ou AKT (16). Des niveaux élevés d'EGFR peuvent être induits par une amplification du gène, une surexpression, des mutations activatrices ou une activation par des facteurs de croissance autocrines. Ces niveaux élevés d'EGFR jouent un rôle dans la tumorigénicité et sont associés à un pronostic défavorable.

L'EGFR est un récepteur TK transmembranaire. Il est codé par le proto-oncogène *c-erbB1* (chromosome 7). Différents ARNm (ARNm) de l'*EGFR*, résultant d'un épissage alternatif, codent différentes isoformes protéiques (figure 13). Le variant 1 (28 exons) code le récepteur entier à l'EGF ou isoforme a ou HER1. Il se compose d'une région intracellulaire, d'une région transmembranaire et d'une région extracellulaire (figure 13). La partie intracellulaire comporte un domaine TK. La partie extracellulaire se divise en quatre domaines :

- I : domaine de liaison à l'EGF,
- II : domaine riche en cystéines,
- III : domaine de liaison à l'EGF,
- IV : domaine riche en cystéines.

Les variants 2, 3 et 4 codent respectivement les isoformes b, c et d de l'EGFR correspondant à des récepteurs tronqués et à priori solubles, composés d'une partie extracellulaire du récepteur et dépourvus de domaine transmembranaire et TK intracellulaire (23). Les différentes isoformes sont identiques sur les 403 premiers acides aminés.

Il existe également une isoforme formée par clivage de l'EGFR (PI-sEGFR), ayant une séquence identique au domaine extra-cellulaire, qui serait produite après fixation du ligand sur l'EGFR. En effet le clivage protéolytique est un processus commun de régulation des protéines transmembranaires. Ce clivage peut être induit par la voie de la PKC suite à la phosphorylation du récepteur, soit par des métalloprotéases (24,25).

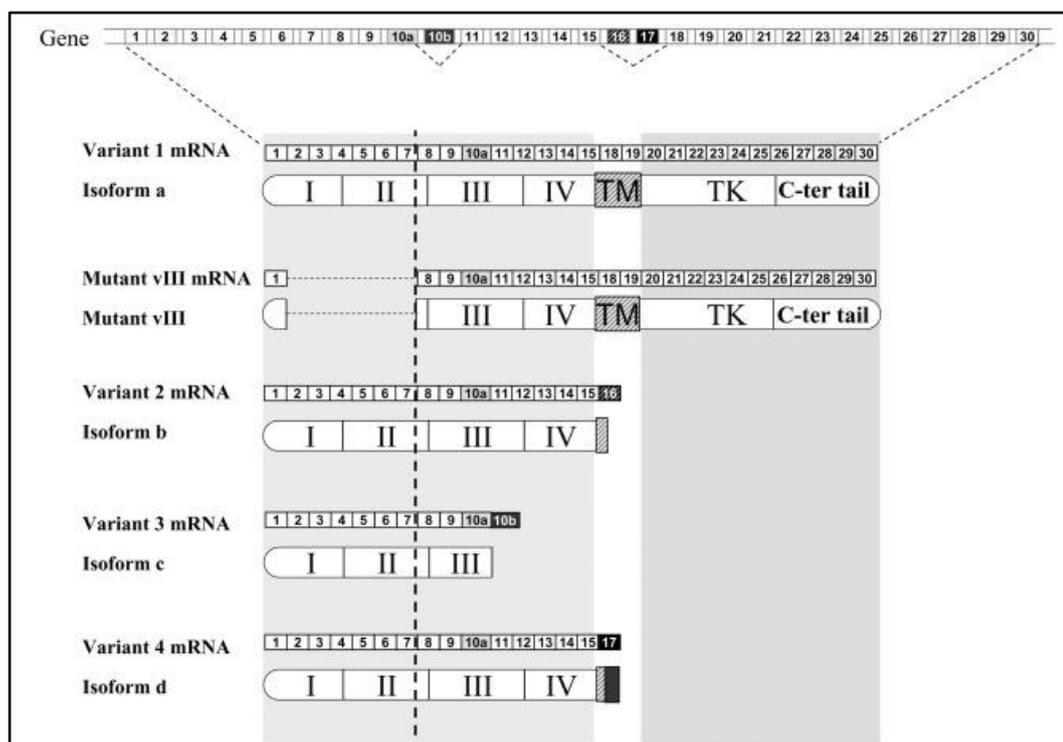


Figure 13 : Schéma récapitulatif des variants et des isoformes de l'EGFR (26).

Un variant muté, le variant vIII (déléte pour les exons 2 à 7 du domaine extra-cellulaire) a été observé dans 20 à 50% des glioblastomes. Ce variant mutant code une protéine ayant perdu le domaine de liaison au ligand, mais avec une activité TK constitutive ce qui stimule la voie de transduction du signal en permanence et augmente son pouvoir tumorigène en favorisant la prolifération cellulaire (16).

L'EGFR est activé lors de la fixation d'un de ses ligands. Plusieurs ligands sont connus : l'EGF, le 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 (27). La fixation du ligand EGF peut induire la phosphorylation des résidus tyrosine en position 845, 992, 1068 et 1173 de l'EGFR dans des lignées cellulaires de glioblastomes (28). Il a également été montré que la transactivation de l'EGFR par HSP90 α extracellulaire favorise la migration de cellules de glioblastome (29).

La fixation de l'un de ces ligands sur l'EGFR (isoforme a) entraîne une dimérisation de ce dernier. Il s'agit soit d'une homodimérisation, soit d'une hétérodimérisation. Cette dimérisation induit, par phosphorylation, l'activité TK du domaine intracellulaire, déclenchant alors l'activation des deux principales voies en aval : Ras-MAPK et PI3K-AKT (30).

Les isoformes b, c et d sont des récepteurs tronqués, « solubles », dont l'action a été peu étudiée (31). Ces isoformes moduleraient l'action de récepteurs transmembranaires comme l'EGFR. Les mécanismes d'action possibles sont variés et dépendent du récepteur considéré, de l'activité catalytique propre de chaque récepteur soluble et de leur capacité d'ancrage au niveau de la membrane plasmique. En effet, l'isoforme d possède un motif d'ancrage pour le GPI (Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol), qui est un phospholipide situé dans le feuillet externe de la membrane plasmique et qui peut servir de structure d'ancrage à des glycoprotéines.

Les récepteurs « solubles » peuvent agir par compétition réversible ou irréversible avec le ligand, ou au moment de la dimérisation. L'interaction des différents récepteurs peut alors entraîner une inhibition ou une activation de la voie concernée.

Basu et coll. ont isolé 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 (30).

Le transcrit EGFR variant 3 et la protéine qu'elle code ont été étudiés par Reiter and al. Ce variant code une protéine tronquée, l'isoforme c, constituée de la partie extracellulaire de l'isoforme a comprenant le site de liaison à l'EGFR mais ayant perdu le domaine transmembranaire et intracellulaire avec l'activité TK. L'isoforme c serait reconnue par des anticorps anti-EGFR dirigés contre la partie du domaine extracellulaire commune aux isoformes a et c (32). 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 de 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 rat et plus spécifiquement au niveau d'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.

L'amplification de l'*EGFR* est fréquemment associée avec une perte du chromosome 10, et des délétions et/ou mutations de *CDKN2A*. L'amplification de l'*EGFR* est en revanche rarement associée à une mutation de *TP53* et ces deux voies de progression tumorale semblent exclusives

l'une de l'autre. L'amplification de l'*EGFR* est fréquente dans 40 à 60 % des glioblastomes *de novo* et s'observe dans 15 à 20% des oligodendrogliomes et astrocytomes de grade III. C'est une anomalie d'intensité variable, de quelques copies à des milliers pour chaque cellule. Mais la valeur pronostique de cette amplification n'est pas démontrée, en dehors de quelques sous-populations de patients. Il n'existe pas toujours de corrélation entre la surexpression de la protéine en immunohistochimie et l'amplification du gène. Cependant, il a été montré que dans les glioblastomes, une forte expression de l'*EGFR* était fortement prédictive d'une amplification du gène (33,34).

Dans les gangliogliomes, l'altération la plus fréquente est un gain du chromosome 7, sans amplification de l'*EGFR*, sans expression anormale de l'*EGFR*, ni mutation *TP53* ou *PTEN* (3).

II. 6. b3) TP53

La voie des MAPK est également régulée par un gène suppresseur de tumeur, *TP53*, qui inhibe le cycle cellulaire. Les mutations de *TP53* conduisent à la formation d'une protéine p53 anormale qui s'accumule dans le noyau et devient détectable en immunohistochimie. La dérégulation de p53 compromet l'apoptose habituellement déclenchée par toute altération du génome. Les mutations de *TP53* concernent environ 50% des cancers et, dans les tumeurs où le gène n'est pas muté, il existe fréquemment une altération fonctionnelle de la protéine. De très nombreuses mutations ont été décrites dans les tumeurs gliales. Ces altérations sont fréquentes dans les tumeurs astrocytaires (grade II et III), les glioblastomes secondaires et seraient un facteur de progression maligne des gangliogliomes (3,35,36). Des études sur des séries de gliomes pédiatriques de grade I et II n'ont pas mis en évidence de mutation de *TP53* (37). Mais il n'y a pas de mutation spécifique aux gliomes, et elles ne sont pas recherchées en pratique diagnostique courante. Par contre, l'immunohistochimie anti-p53 peut remplacer (dans une certaine mesure) la mise en évidence des mutations de *TP53*.

Dans les grades II, les mutations de *TP53* et la perte 1p19q s'excluent mutuellement, sauf exception. Il est classiquement admis que les tumeurs de grade II avec mutations de *TP53* ont un moins bon pronostic que celles présentant une perte 1p19q (38).

II. 6. b4) Mutations des gènes des IDH (Isocitrate Déshydrogénase)

C'est un marqueur diagnostique et de bon pronostic pour les gliomes infiltrants de grade II et III, et les glioblastomes secondaires.

Il a été rapporté dans les gliomes des mutations du gène de l'isocitrate déshydrogénase (*IDH*). Il existe 3 enzymes (*IDH1*, 2 et 3). La fonction d'*IDH1* (située dans le cytoplasme et les

péroxyosomes) est mal connue. IDH2 serait impliquée dans la production d'énergie (mitochondrie) et dans la défense cellulaire contre le stress oxydatif. Les mutations les plus fréquemment retrouvées dans les gliomes sont R132H (pour *IDH1*) et R172K (pour *IDH2*). Les mutations d'*IDH1* et d'*IDH2* sont exclusives l'une de l'autre, et entraînent une réduction de l'activité enzymatique de la protéine correspondante. Les mutations d'*IDH1* favoriseraient l'augmentation du facteur transcriptionnel HIF1 α (« Hypoxia Inducible Factor ») impliqué dans la croissance tumorale en hypoxie (39) et dans la promotion de l'angiogenèse via BDNF (« Brain Derived Growth Factor ») et son récepteur TrkB (« Tropomyosin receptor kinase B ») (40). De plus ces mutations ne sont pas associées à une amplification de l'*EGFR* (35,41).

Le mécanisme de tumorigenèse via ces mutations est encore peu connu (42). Aucune donnée publiée dans la littérature ne permet d'expliquer la meilleure survie des patients dont les tumeurs sont porteuses de ces mutations (39).

Le taux de mutation d'*IDH1* dans les astrocytomes pilocytiques est très faible (42). Il est respectivement de 70% et 50% dans les tumeurs astrocytaires de grade II et III, de 72 à 100% dans les oligodendrogliomes et rare dans les glioblastomes primaires (5%) (35). Un travail portant sur les gangliogliomes a retrouvé 8% de mutations d'*IDH1* et 8% de mutations silencieuses ou non-sens d'*IDH2* (43). Une série japonaise de gliomes n'a pas mis en évidence de mutation *IDH* dans les astrocytomes pilocytiques ni dans les gangliogliomes (44).

II. 6. b5) BRAF

Des réarrangements du gène *BRAF* ont été décrits dans les astrocytomes pilocytiques sporadiques mais pas dans ceux associés à une neurofibromatose de type 1 (45). Ceci témoigne du rôle de la voie de signalisation des MAPK dans la tumorigenèse des astrocytomes pilocytiques. En effet B-Raf est l'isoforme de Raf dans les cellules nerveuses, et l'activation de la voie des MAPK existerait dans 82% des astrocytomes pilocytiques (et dans 100% des astrocytomes pilocytiques de la fosse postérieure). Ces altérations du gène *BRAF* peuvent être de différentes natures :

- la mutation V600E de *BRAF* a été retrouvée dans 9% des astrocytomes pilocytiques, 18% des gangliogliomes de grade I mais elle est quasi-absente dans les glioblastomes (46),
- une duplication en tandem en 7q34 formant un gène de fusion *KIAA1549-BRAF* entraînant l'activation constitutive de B-Raf et donc de la voie des MAPK a été retrouvée dans 60% à 70% des astrocytomes pilocytiques et 36% des tumeurs glioneurales de bas grade (42,47,48),
- une duplication en tandem en 3p25 (2% des astrocytomes pilocytiques) produisant un gène de fusion incluant l'oncogène *RAF1* (entraînant l'activation constitutive du domaine kinase de Raf) (42,47,49).

A l'inverse, une autre équipe a mis en évidence la mutation *BRAF* V600E dans 25% des cas d'une série de gliomes pédiatriques de grades II à IV, sans mise en évidence du gène de fusion *KIAA1549-BRAF* (37).

Une équipe a montré que l'expression de B-Raf (avec activation constitutive du domaine kinase) serait suffisante pour induire la formation d'astrocytome pilocytaire dans des cellules nerveuses progénitrices de souris (50).

La présence ou l'absence d'altération de *BRAF* n'aurait pas d'influence sur la survie. La présence du transcrite de fusion *KIAA1549-BRAF* peut avoir une utilité diagnostique, mais la valeur pronostique et la signification thérapeutique de ces altérations restent à déterminer (42,48,51).

II. 6. b6) MGMT (*O*₆-méthylguanine-DNA méthyltransférase)

Le gène de la MGMT est localisé sur le chromosome 10q26 et code une protéine de réparation de l'ADN (Acide Désoxyribonucléique), qui répare les lésions induites par des agents alkylants. En effet l'alkylation induit une cytotoxicité et l'apoptose, mais la MGMT excise ces groupes alkyles en position *O*₆ de la guanine pour éviter l'apoptose. Or une concentration élevée de MGMT inhibe l'action thérapeutique des agents alkylants utilisés en chimiothérapie et contribue à l'échec de ce traitement. La méthylation du promoteur de la MGMT est responsable d'une inactivation de l'enzyme, associée à une meilleure réponse aux traitements par agents alkylants (témozolomide, Témodal®).

Environ 40% des glioblastomes et la majorité des oligodendrogliomes présentent une inactivation de MGMT par hyperméthylation de son promoteur. Une large étude a démontré une meilleure survie pour les patients présentant un glioblastome avec méthylation du promoteur de la MGMT et traités par radiothérapie et témozolomide par rapport à ceux traités par radiothérapie seule (24% survie à 2 ans contre 15%). Cette méthylation aurait également une valeur prédictive positive de réponse aux agents alkylants dans les grades II et III. Il n'y a pas encore de technique de référence pour la recherche du statut MGMT mais l'immunohistochimie semblerait intéressante pour prédire la réponse au traitement. Il n'existe cependant pas de corrélation fiable entre l'expression de la protéine et la méthylation du promoteur, et l'expression de MGMT en immunohistochimie est difficile à analyser. Le STIC ECOM (phase rétrospective) a étudié quatre techniques de biologie moléculaire analysant la méthylation du promoteur MGMT et l'immunohistochimie, et a montré que la meilleure technique pour prédire la survie globale et sans récurrence dans une population de patients atteints de glioblastome était le pyroséquençage (8).

II. 6. b7) Marqueurs de différenciation et de prolifération

Les cellules tumorales des gliomes et des tumeurs glioneuronales sont susceptibles d'exprimer des marqueurs de cellules peu différenciées (marqueurs de cellules souches ou progénitrices) tels que la nestine, Olig2, CD34, ou des marqueurs de différenciation astrocytaire comme la GFAP, ou neuronaux comme NeuN, NF, synaptophysine. La chromogranine A est exprimée le plus souvent par des neurones dystrophiques. L'anticorps Ki67 reconnaît une protéine exprimée lorsqu'une cellule est engagée dans le cycle cellulaire et dont l'expression nucléaire permet de définir un indice de prolifération corrélé au grade tumoral dans les gliomes (3).

II. 6. c) Autres marqueurs moléculaires

II. 6. c1) PTEN

Le gène suppresseur de tumeur *PTEN*, codant pour une protéine phosphatase inhibitrice de la voie de signalisation PI3K/AKT, est aussi la cible de mutations inactivatrices dans les gliomes. *PTEN* est muté dans 15 à 40% des glioblastomes, le plus souvent des glioblastomes primaires, mais moins de 2% ont une délétion homozygote. Plus 80 mutations de *PTEN* ont été détectées.

L'association de la forme mutée EGFRvIII avec la perte de *PTEN* induit la transformation de précurseurs neuraux chez la souris, alors que séparément, ces anomalies n'ont pas d'effet tumorigène (52).

II. 6. c2) CDKN2A

La protéine p14^{ARF} est un des produits du locus *CDKN2A*. La liaison de la protéine p14^{ARF} avec la protéine MDM2 induit une stabilisation des protéines MDM2 et p53. Cette stabilisation provoque une augmentation des taux de p53 et un arrêt du cycle en phase G1 et G2/M (53). La voie p53 /p21 /MDM2 /p14ARF est altérée dans 87% des glioblastomes (54).

Les gènes *CDKN2A* et *CDKN2B*, situés en 9p21, codent respectivement les protéines p16^{INK4a} et p15^{INK4b}, qui inhibent la formation des complexes cycline-CDK4/CDK6 et la phosphorylation de la protéine RB1 (3,55). Leur surexpression entraîne l'arrêt du cycle cellulaire. Dans les gliomes, leur inactivation résulte dans la majorité des cas d'une délétion homozygote, retrouvé dans 33% des glioblastomes et 24% des astrocytomes anaplasiques (56). D'autres mécanismes, comme des mutations ponctuelles ou l'hyperméthylation des îlots CpG dans les régions promotrices peuvent expliquer le défaut d'expression de p16, observé dans 50% des astrocytomes anaplasiques (3).

La délétion homozygote de *CDKN2A* a été rapportée comme favorisant la progression de certains oligodendrogliomes (57). Une autre étude suggère qu'une délétion homozygote de *CDKN2A* associée à une activation de *BRAF* pourrait être promotrice de malignité dans certains astrocytomes pédiatriques (58). Une autre équipe a montré que 86% des glioblastomes avaient des altérations de *CDKN2A* et que la majorité des glioblastomes présentait une inactivation de la voie p16/cdk4/cyclineD1/pRb (59).

II. 6. c3) Neurotrophines et récepteurs des neurotrophines

D'autres récepteurs TK pourraient intervenir dans l'oncogenèse des gliomes comme les récepteurs des neurotrophines. Les neurotrophines sont des facteurs essentiels pour la croissance, la survie et la différenciation des neurones. Elles regroupent le « Nerve Growth Factor » (NGF), la NeuroTrophine 3 (NT3) et le BDNF. Il existe 2 types de récepteurs des neurotrophines :

- de haute affinité : Trk A, B et C (« Tropomyosine receptor kinase ») impliqués dans l'activation de voies de survie et de différenciation cellulaire et dont les ligands sont respectivement NGF, BDNF et NT3,

- de faible affinité : p75^{NTR} (« p75 NeuroTrophin Receptor ») impliqué dans la survie et la mise en route de signaux apoptotiques et dont les ligands sont le pro-NGF et le pro-BDNF (forme immature des neurotrophines).

La forme mature des neurotrophines est associée à la survie cellulaire en agissant sur leurs récepteurs TK. La forme immature induit un signal de mort, dépendant de p75^{NTR} et de son corécepteur, la sortiline. Les gènes du NGF et de la sortiline sont localisés sur le bras court du chromosome 1 et il serait donc possible qu'ils soient impliqués dans l'oncogenèse gliale. De plus, la présence d'une surexpression de BDNF dans les gliomes indique que cette neurotrophine pourrait être impliquée dans la tumorigenèse de ces tumeurs (60).

Par ailleurs, des interactions entre les récepteurs des neurotrophines et ceux de l'EGF ont été mises en évidence mais diffèrent selon les types cellulaires étudiés. Ainsi, une transactivation de TrkB et EGFR a été détectée dans des cellules de carcinome ovarien (61). A l'inverse, l'activation de TrkA par le NGF diminue l'expression d'EGFR dans un modèle de cellules de phéochromocytome de rat (62), alors que la transactivation de l'EGFR par TrkA et NGF a été décrite dans des monocytes humains (63).

II. 7. HYPOTHESES ONCOGENETIQUES

Dans les gliomes, l'hypothèse oncogénétique actuellement admise est la transformation de cellules souches ou de cellules progénitrices qui auraient la capacité de s'auto-renouveler et de se différencier (cellules pluri- ou multipotentes). Elles seraient donc capables d'engendrer les différents types morphologiques des cellules tumorales au sein d'une même tumeur (35). Ceci pourrait expliquer la grande hétérogénéité cellulaire rencontrée dans les gliomes. Ce caractère hétérogène rend leur classification histologique difficile et peu reproductible.

La mise en évidence de mutations *IDH* dans les gliomes de grade II, III et les glioblastomes secondaires mais pas dans les glioblastomes de novo, a permis de proposer 2 voies de gliomagenèse.

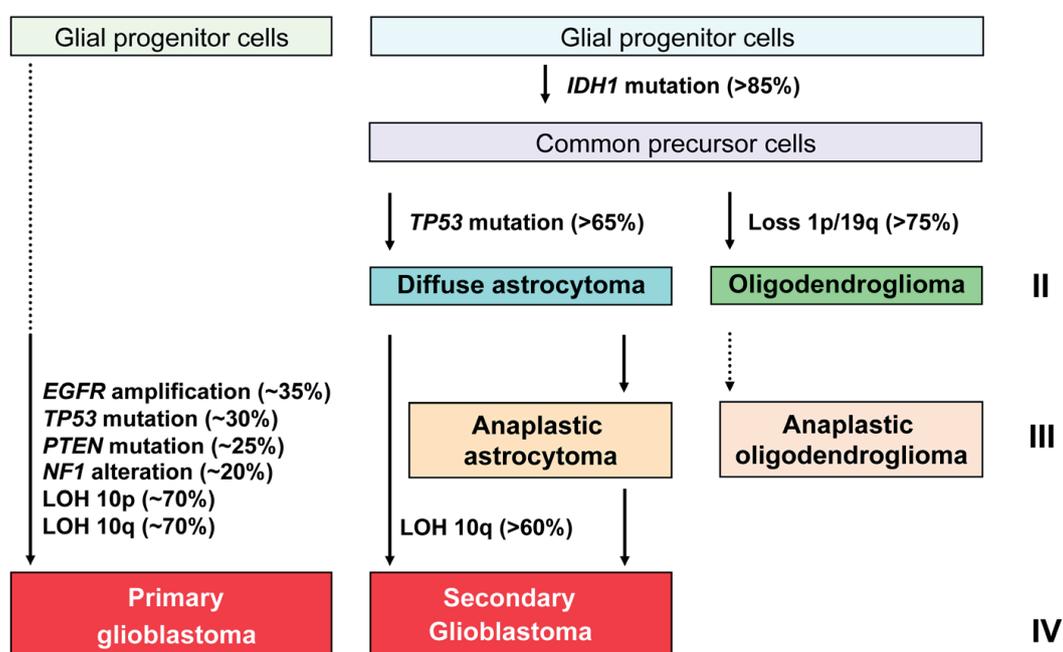


Figure 14 : Classification histo-moléculaire et gliomagenèse (64).

La gliomagenèse *IDH*-dépendante, à l'origine de plus de 85% des gliomes infiltrants de grade II. La cible pourrait être un précurseur glial. En fonction des altérations moléculaires concernant *TP53* et 1p19q, on distingue :

- les gliomes $IDH^+/p53^-/perte\ 1p19q^-$, rares.
- les gliomes $IDH^+/p53^+/perte\ 1p19q^-$, le plus souvent de phénotype astrocytaire,
- les gliomes $IDH^+/p53^-/perte\ 1p19q^+$, le plus souvent de phénotype oligodendrogial.

Ces différents sous-types n'ont pas été analysés dans les grades III (38).

La gliomagenèse *IDH*-indépendante, dont le précurseur glial n'est pas connu à ce jour, est un groupe hétérogène comprenant :

- les grades II triples négatifs (*IDH*⁻/*p53*⁻/codé11p19q⁻), de pronostic plus péjoratif,
- les gliomatoses primitives.

Les glioblastomes *de novo* dériveraient de la transformation maligne d'une cellule souche neurale. Quatre sous-types ont été décrits en fonction des altérations génétiques (65) :

- glioblastomes classiques, avec amplification de l'*EGFR*,
- groupes proneural et neural : souvent *IDH1*⁺/*p53*⁺/amplification *PDGFR* α ⁺,
- glioblastomes mésenchymateux, avec altérations *NF1*, délétions de *PTEN* et *CDKN2A*.

II. 8. PRONOSTIC ET PRISE EN CHARGE

II. 8. a) Pronostic

Le pronostic est déterminé par un ensemble de paramètres relatifs à la tumeur (type, taille, éventuelle extension controlatérale, grade, opérabilité, anomalies moléculaires (perte 1p19q, mutations *IDH* et *TP53*)) mais également au patient (âge, état cognitif, degré de handicap). Certains facteurs moléculaires (comme la méthylation du promoteur du gène de la *MGMT*) ne sont pas encore de pratique courante même si leur impact pronostique est fortement suspecté (2). L'indice de Karnofsky (IK), présenté en annexe 1, évalue l'état fonctionnel et général du patient.

Pour les astrocytomes pilocytiques, le pronostic est favorable, surtout après exérèse complète. Il en est de même pour les DNET et les gangliogliomes de grade I, avec 84 % de survie à 5 ans si la chirurgie est complète.

Pour les gliomes de grade II : la médiane de survie évolue de 2 à 9 ans. Pour les gliomes de grade III : le pronostic est très fortement influencé, indépendamment des facteurs cliniques et radiologiques, par la perte 1p19q : si elle est présente, la médiane de survie est doublée (7 ans versus 3 ans). Pour les glioblastomes, la médiane de survie se situe entre 10 et 17 mois.

II. 8. b) Prise en charge (recommandations Haute Autorité Santé, 2010)

La prise en charge thérapeutique est définie en RCP et a pour objectif d'améliorer le pronostic, mais également l'état fonctionnel du patient. Cette prise en charge se fait en accord avec le patient, et la personne de confiance le cas échéant, sur la base de l'avis rendu en RCP. La prise en charge est présentée au patient au cours d'une consultation d'annonce et fait l'objet d'un accord

mutuel. La prise en charge thérapeutique peut faire appel à la chirurgie, à la radiothérapie et à la chimiothérapie, diversement combinées.

Stratégies thérapeutiques :

- pour le glioblastome, le traitement de référence est une exérèse chirurgicale large si possible, suivie d'une radiothérapie et d'une chimiothérapie par témozolomide concomitante puis adjuvante (protocole de Stupp). Pour les patients présentant un état général altéré (IK < 70), il n'y a pas de traitement de référence, la stratégie thérapeutique est discutée en RCP.
- pour les autres gliomes : la stratégie thérapeutique est discutée en RCP. Il n'existe actuellement pas de consensus pour la prise en charge. Pour les gliomes de haut grade, l'exérèse chirurgicale est réalisée dans 75% des cas.

Néanmoins, si aucun consensus n'est bien défini, il existe des recommandations pour la prise en charge des gliomes infiltrants de l'adulte, proposées par certains réseaux de cancérologie. Ils visent à guider les différents intervenants médicaux dans la prise en charge des patients.

Prise en charge chirurgicale. La chirurgie est généralement l'approche thérapeutique initiale pour réduire le volume tumoral. En plus de son rôle de confirmation histologique, elle contribue à la qualité et à la durée de la survie, selon la localisation de la tumeur et les facteurs cliniques du patient. Une chirurgie maximaliste ne doit pas aggraver l'état fonctionnel du patient. Elle n'est donc proposée qu'à condition de préserver sa qualité de vie. La chirurgie éveillée a pour objectif de préserver la fonctionnalité. Dans un certain nombre de cas, pour des raisons topographiques, fonctionnelles ou encore liées à l'état général du patient ou à son refus, une chirurgie d'exérèse n'est pas réalisable. Le type histologique présumé de tumeur est déterminant pour choisir entre biopsie et exérèse : pour un gliome de bas grade, la biopsie et l'exérèse sont à discuter. C'est la plupart du temps la résection chirurgicale qui est choisie en présence d'un foyer circonscrit dans un lobe cérébral. Si la lésion est profonde, la biopsie stéréotaxique est retenue. Pour un gliome de haut grade, l'exérèse est préférée lorsqu'elle est possible.

L'étendue de la résection et la détermination de la maladie résiduelle sont évaluées dans les 24 à 72 heures suivant la chirurgie par la réalisation d'une IRM post-opératoire, ou à défaut d'une TDM sans et avec injection. L'exérèse est considérée totale en l'absence de résidu tumoral visible. Elle est dite sub-totale si le résidu tumoral post-opératoire est inférieur à 1,5 cm³ et incomplète si le résidu tumoral est supérieur à 1,5 cm³.

Anatomie pathologique. 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 tumeur 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 de l'examen extemporané. Un fragment sera congelé dans de l'azote liquide pour les analyses de biologie moléculaire et pour constituer une tumorothèque. Un échantillon prélevé en regard de la zone congelée sert de contrôle. Un fragment peut 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 est défini en fonction de la classification OMS. Les analyses moléculaires sont ensuite réalisées (nécessité de prélèvements sanguins concomitants au geste opératoire).

Radiothérapie. La radiothérapie peut être post-chirurgicale, exclusive ou associée à la chimiothérapie de manière concomitante ou séquentielle. La radiothérapie post-chirurgicale est débutée dans les 6 semaines suivant l'intervention chirurgicale (délai le plus court possible). Elle est focale (dirigée sur le volume tumoral avec une marge), conformationnelle (conforme à l'image), en 3 dimensions (utilise l'imagerie (IRM, TDM) pour délimiter les volumes). Une aggravation du tableau clinique peut s'observer au cours de la première semaine d'irradiation. Si l'indication de radiothérapie est retenue, le schéma de traitement varie selon le grade du gliome.

Chimiothérapie. La chimiothérapie est fréquemment utilisée (tableau 6). Elle est le plus souvent administrée par voie systémique (orale ou IV), et parfois par voie locale (implant intracavitaire dans le temps opératoire).

Voie d'administration	Molécules	Modalités d'administration
Voie orale	Témozolomide	En continu (7 j/7) pendant la radiothérapie ou en discontinu (5 j tous les 28 j)
	Lomustine	En discontinu
Voie intraveineuse	Carmustine	En discontinu
	Fotémustine	En discontinu
Mixte (selon les molécules)	Protocole PCV (procarbazine, lomustine, vincristine)	En discontinu
Implant intracavitaire	Carmustine	Unique, peropératoire

Tableau 6 : Principales chimiothérapies utilisées dans le traitement des gliomes.

Le témozolomide est converti spontanément 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. La conversion spontanée du témozolomide en MTIC produit un composé capable de méthyler l'ADN. 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. La connaissance du statut MGMT permettrait donc de choisir entre la radiothérapie seule et la radiothérapie combinée au témozolomide. Il serait également important dans le choix de l'utilisation ou non d'alkylant autre que le témozolomide (carmustine, procarbazine,...).

Corticothérapie. Les corticoïdes oraux ou parentéraux sont fréquemment utilisés en neuro-oncologie. Ils agissent essentiellement sur l'œdème péri-tumoral. Par ce biais, ils permettent une réduction de l'HTIC et une amélioration fonctionnelle rapide (réduction des déficits et des crises comitiales). Mais il existe de nombreux effets indésirables (aspect cushingoïde, myopathie, complications psychiatriques, diabète cortico-induit, ostéoporose, ostéonécrose aseptique des têtes fémorales ou parfois humérales, hémorragies et perforations digestives, syndrome de sevrage, etc.).

Traitement antiépileptique. Un traitement antiépileptique est nécessaire à titre prophylactique pendant la période péri-opératoire et chez les patients ayant présenté une crise inaugurale ou continuant à souffrir de crises itératives. Sauf exception, il n'est pas indiqué au long cours chez les patients dont l'histoire ne comporte aucune crise. Le choix du traitement utilisé ne présente pas de spécificité ; les médicaments les plus fréquemment utilisés en première intention sont le lévétiracétam (Keppra®), l'acide valproïque (Dépakine®), la lamotrigine (Lamictal®) et la carbamazépine (Tégréto®) en monothérapie. En cas de chimiothérapie envisagée, on privilégiera les agents non inducteurs enzymatiques. Ils nécessitent une surveillance des effets indésirables.

Autres traitements symptomatiques. Divers traitements peuvent être nécessaires au cours de l'évolution d'une tumeur cérébrale : antidépresseurs, anxiolytiques, anticoagulants, antalgiques, antiémétiques, protecteurs gastriques, anti-œdémateux autres que les corticoïdes (Mannitol®, Diamox®).

Prise en charge globale. La prise en charge globale des patients tient compte à la fois du patient et de son entourage. Elle intègre également, en raison du pronostic défavorable à court terme, une possible prise en charge palliative d'emblée.

II. 8. c) Suivi et évaluation de la réponse aux traitements

Le suivi varie selon le grade tumoral : environ tous les 6 mois pour un gliome de bas grade, de l'ordre de 2 à 3 mois pour les gliomes de haut grade. Le suivi repose sur l'examen clinique et l'IRM cérébrale, pour évaluer la réponse aux traitements et rechercher d'éventuelles complications. Le principal critère d'évaluation est la taille de la prise de contraste. Des aspects d'augmentation de taille de la tumeur à l'IRM dans les suites immédiates (généralement moins de 3 mois) de protocole Stupp peuvent exister sans qu'il n'y ait de progression tumorale véritable. Ce phénomène est dénommé pseudo-progression. Le diagnostic différentiel avec une récurrence tumorale authentique est difficile, et un avis RCP est demandé. Le suivi est alors souvent plus rapproché. Devant un tableau de dégradation clinique, brutal ou progressif, la décision de changement ou d'interruption des traitements oncologiques doit être précédée d'une évaluation clinico-radiologique.

Le suivi à distance par IRM a pour but de dépister les récurrences, les transformations et éventuellement les radio-nécroses après radiothérapie.

II. 8. d) Traitement des récurrences

Lors de rechute, la chimiothérapie peut être locale (Gliadel® si ré-intervention chirurgicale) ou systémique. La chimiothérapie systémique dépendra du type tumoral. L'abstention thérapeutique et/ou les soins palliatifs pourront également être discutés.

II. 8. e) Traitements expérimentaux

Le traitement des gliomes diffus reste décevant malgré les progrès significatifs de la chirurgie, de la radiothérapie et des chimiothérapies cytotoxiques. L'échec de ces traitements s'explique par le caractère très infiltrant de ces tumeurs limitant l'efficacité des thérapies locales, et leur résistance intrinsèque à la radiothérapie et aux chimiothérapies cytotoxiques. Depuis quelques années, de nouvelles approches thérapeutiques se sont développées. Les gliomes de par leur biologie constituent des tumeurs candidates aux thérapies moléculaires ciblées. En effet, l'activation des voies PDGFR et EGFR dans les gliomes a conduit à évaluer l'efficacité de plusieurs agents inhibant l'activité tyrosine kinase des récepteurs membranaires de ces facteurs de croissance.

Ainsi, l'imatinib (Glivec®) qui est un inhibiteur de l'activité TK du PDGFR, le gefitinib (Iressa®) et l'erlotinib (Tarceva®) qui sont des inhibiteurs oraux des domaines TK de l'EGFR ont fait l'objet d'essais thérapeutiques en monothérapie ou en association dans les gliomes malins en récurrence. Les résultats sont à ce jour décevants avec un taux de réponse globalement inférieur à 15%. L'échec des traitements anti-EGFR pourrait s'expliquer par une diffusion insuffisante de ces traitements au sein de la tumeur, par une activation concomitante de multiples récepteurs à TK

distincts de l'EGFR, ou, de l'activation de la voie des RTK qui ne passe pas par une stimulation au niveau du récepteur membranaire mais en rapport avec une activation de la voie de signalisation en aval comme une inactivation de *PTEN*. Cependant, les authentiques réponses obtenues valident le concept de thérapie ciblée dans les gliomes. Les efforts sont actuellement poursuivis pour identifier les tumeurs les plus susceptibles de répondre à ces traitements et pour apprécier dans quelle mesure ces agents peuvent être combinés de façon avantageuse entre eux et avec les traitements radio-chimiothérapie en première ligne de traitement.

Des inhibiteurs de PI3K et de mTOR (comme des analogues de la rapamycine) font l'objet d'essais cliniques en cours. La forme mutante EGFRvIII observée dans un tiers des GBM a été aussi administrée par des injections sous-cutanées dans une approche thérapeutique de type vaccinale, avec des résultats prometteurs en combinaison avec la radio-chimiothérapie qui demandent à être confirmés dans un essai contrôlé. Les résultats des thérapies moléculaires ciblées les plus intéressants obtenus à ce jour l'ont été avec les anti-angiogéniques et en particulier le bévacizumab (Avastin®) qui est un anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF (« Vascular Endothelial Growth Factor ») nécessaire au développement de la néovascularisation et à la croissance tumorale des gliomes malins (66).

TAVAREC est un essai de phase 2, randomisé, multicentrique, européen, (environ 150 inclusions), évaluant l'efficacité du témozolomide associé ou non à du bévacizumab, chez des patients ayant un gliome en rechute. L'objectif de cet essai est d'évaluer l'efficacité du témozolomide associé ou non à du bévacizumab, chez des patients présentant un gliome de grade II ou III, non 1p/19q codéleté, en rechute après une ligne de traitement.

IGR TARCEVA est un essai de phase 1 européen et multicentrique évaluant l'erlotinib (Tarceva®) seul chez des enfants ayant une tumeur cérébrale maligne réfractaire ou récidivante, et évaluant l'erlotinib associé à une radiothérapie en traitement de première ligne, chez des enfants ayant un gliome du tronc cérébral. L'objectif de cet essai est de déterminer la dose la mieux tolérée d'erlotinib (un inhibiteur de l'EGFR) chez ces enfants.

MYOCET est un essai de phase 1 (12 inclusions) évaluant la tolérance de la doxorubicine chez des patients jeunes ayant un gliome malin réfractaire ou en rechute. L'objectif de cet essai est de déterminer la dose de doxorubicine recommandée, chez des patients jeunes (entre 3 et 18 ans) ayant un gliome malin.

CILENT est un essai de phase 1, français, multicentrique, évaluant la tolérance d'un traitement associant du cilengitide à une radiothérapie, chez des patients jeunes (6 mois à 21 ans, 40

inclusions) ayant un gliome infiltrant du tronc cérébral. L'objectif de cet essai est de déterminer la dose recommandée de cilengitide, lors d'un traitement administré en association avec une radiothérapie, chez des patients jeunes ayant un gliome infiltrant du tronc cérébral.

III. JUSTIFICATION DE L'ETUDE ET OBJECTIFS

Les gliomes sont des tumeurs hétérogènes. Sur le plan clinique, certaines de ces tumeurs ont un potentiel infiltrant comme les oligodendrogliomes ou les glioblastomes tandis que d'autres sont caractérisées par leur bonne limitation comme les astrocytomes pilocytiques et les gangliogliomes. Cette hétérogénéité se manifeste également, dans un même sous type histopathologique, sur le plan morphologique. Ainsi, des contingents cellulaires ayant une morphologie similaire peuvent être présents dans des tumeurs de type et de pronostic très différents. Par exemple un contingent formé de cellules claires qui caractérise les oligodendrogliomes, peut être observé dans des glioblastomes comme dans des astrocytomes pilocytiques ou des gangliogliomes.

D'autre part, les anomalies de l'*EGFR* présentes dans les gliomes infiltrants et de haut grade font suspecter le rôle de cette voie dans la capacité d'invasion des cellules tumorales.

En conséquence, dans ces tumeurs complexes et de prise en charge délicate, il est justifié d'associer à l'analyse morphologique l'étude de marqueurs moléculaires. Cette approche a pour objectif de compléter ce que l'on appelle la classification histomoléculaire des gliomes et de mieux comprendre la physiopathologie dans l'oncogenèse des gliomes.

Ainsi, dans ce travail, nous avons :

- comparé le profil immuno-moléculaire de différents contingents tumoraux de gliomes non infiltrants (astrocytomes pilocytiques) et de tumeurs glioneurales de bas grade (gangliogliomes) avec celui d'oligodendrogliomes de grade II et III, afin de savoir si un même morphotype présente les mêmes marqueurs moléculaires,
- comparé l'expression génique et protéique de l'*EGFR*, ainsi que son activation (forme phosphorylée du récepteur) dans ces tumeurs et dans des oligo-astrocytomes de grade II et III et des glioblastomes, afin d'estimer l'implication de l'*EGFR* dans les capacités d'infiltration tumorale,
- analysé les résultats en fonction des données cliniques et des types histologiques selon la classification de l'OMS.

Dans nos travaux, nous avons :

- utilisé du matériel biologique cryopréservé et inclus en paraffine (obtenu grâce à la Tumorothèque du Limousin) des patients opérés au CHU de Limoges et pour lesquels un diagnostic d'astrocytome pilocytique, de gangliogliome, d'oligodendrogliome, d'oligo-astrocytome ou de glioblastome a été posé,
- analysé l'aspect histopathologique des tumeurs en utilisant la classification de l'OMS 2007 et en identifiant les différents contingents cellulaires tumoraux,

- évalué l'expression de marqueurs en immunohistochimie sur coupes en paraffine en mettant au point une technique de Tissue Micro-Array (TMA) manuelle afin d'analyser les profils des différents contingents histologiques d'une même tumeur, y compris l'expression des récepteurs aux neurotrophines (TrkA, TrkB, p75^{NeuroTrophin Receptor} (p75^{NTR})) et de leurs ligands (« Nerve Growth factor » (NGF), BDNF),
- recherché des altérations génétiques concernant les pertes 1p, 19q, et les mutations de *BRAF*, *IDH1* et *IDH2* par MLPA sur tissu tumoral (et tissu non tumoral si disponible) à partir de matériel fixé au formol-zinc et inclus en paraffine,
- analysé l'expression génique de l'*EGFR*, en recherchant une amplification du gène par MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification), en quantifiant l'expression des variants ARNm (Acide RiboNucléique messenger) codant les formes de l'EGFR à partir des fragments tumoraux cryoconservés par technique de RT-PCR (Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction) quantitative en temps réel,
- étudié l'expression protéique de l'EGFR en immunohistochimie à l'aide de trois anticorps, l'un dirigé contre le domaine extra-cellulaire (EGFR_{DEC}), l'autre contre le domaine intra-cellulaire (EGFR_{DIC}), et un reconnaissant une forme phosphorylée du récepteur (P-EGFR),
- recueilli les données de survie à l'aide des dossiers cliniques,
- évalué l'association des différentes données entre elles et déterminé leur utilité.

IV. MATERIELS ET METHODES

IV. 1. Données clinicopathologiques et histopathologiques

L'étude porte sur 14 astrocytomes pilocytiques, 12 gangliogliomes, 13 oligodendrogliomes, 5 oligo-astrocytomes et 17 glioblastomes provenant de pièces opératoires de patients pris en charge au CHU de Limoges entre 1996 et 2009.

L'utilisation des prélèvements pour cette étude s'est faite dans le respect de la Loi de Bioéthique 2004, notamment son article L1211-2 qui indique que « l'utilisation d'éléments et de produits du corps humain à une fin médicale ou scientifique autre que celle pour laquelle ils ont été prélevés ou collectés est possible, sauf opposition exprimée par la personne sur laquelle a été opéré ce prélèvement ou cette collecte, dûment informée au préalable de cette autre fin. Lorsque cette personne est un mineur ou un majeur sous tutelle, l'opposition est exercée par les titulaires de l'autorité parentale ou le tuteur ». A ce titre, le CHU de Limoges a mis en place une procédure institutionnelle d'information et de recueil des oppositions des patients à l'utilisation de leur(s) prélèvement(s) à des fins de recherche. Lors de la consultation médicale, le patient est informé par le personnel médical et sous réserve de son consentement, de la possibilité de l'utilisation de ces prélèvements à des fins de recherche. En cas d'opposition du patient, un formulaire d'opposition est envoyé à la "cellule de gestion des échantillons et collections biologiques du CHU de Limoges". En l'absence d'opposition, les prélèvements sont dits requalifiés pour la recherche. Avant toute utilisation des prélèvements à des fins de recherche, la « cellule de gestion des échantillons et collections biologiques du CHU de Limoges » est consultée pour vérifier que les prélèvements des patients sélectionnés pour l'étude ont été requalifiés pour la recherche.

Dès l'arrivée des tumeurs dans le laboratoire d'Anatomie Pathologique, la nature (tumorale ou non) de l'échantillon a été contrôlée par un étalement cytologique, puis un fragment a été congelé dans l'azote liquide puis conservé à -140°C dans la tumorothèque du service. Le reste de la pièce opératoire a été fixé dans une solution de formol-zinc (formaldéhyde 30%, chlorure de sodium 9 g/L, sulfate zinc 3 g/L) pendant 12 à 24h puis déshydraté et inclus en paraffine. Les renseignements cliniques et les données de survie ont été obtenus par une enquête rétrospective.

Le diagnostic anatomopathologique a été établi selon la classification de l'OMS 2007, en double relecture.

Les contingents ont été définis comme suit :

- contingent piloïde : prolifération d'astrocytes fusiformes bipolaires, avec parfois des fibres de Rosenthal, exprimant la GFAP.

- contingent oligodendroglial : cellules au noyau rond avec une chromatine dense formant des amas chromatiniens, et un cytoplasme souvent clair.
- contingent « oligo-like » : cellules ressemblant au contingent oligodendroglial, mais retrouvées dans un astrocytome pilocytique (cellules rondes dans les zones microkystiques) ou dans un gangliogliome.
- contingent fibrillaire et « oligo-like » : zone tumorale dans laquelle des cellules fusiformes d'aspect fibrillaire et des cellules rondes « oligo-like » sont intriquées.
- contingent neuronal : éléments cellulaires de grande taille à cytoplasme vaste et au noyau nucléolé, parfois binucléé correspondant à des neurones dystrophiques, seuls ou associés à des cellules gliales astrocytaires et/ou oligodendrogiales pouvant prédominer.

IV. 2. Extraction d'ADN génomique et technique MLPA

IV. 2. a) Extraction de l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique)

Après contrôle sur coupes colorées à l'hémalun-phloxine-safran (HPS), l'ADN génomique (ADNg) a été extrait à partir du tissu inclus en paraffine (zone tumorale présentant au moins 20% de cellules tumorales, et zone non tumorale si présente).

L'extraction a été faite avec le kit QIAamp® DNA MicroKit (Qiagen). Un déparaffinage (10 minutes au xylène puis 2 fois 30 secondes à l'éthanol absolu) est réalisé à partir d'un poids maximal de 10 mg de tissu. Après évaporation de l'éthanol à 37°C, l'extraction a été poursuivie selon le protocole fourni par le fabricant. L'ARN (Acide RiboNucléique) résiduel a été éliminé par incubation des échantillons dans une solution de RNase. Les ADNg ont été élués dans 20µl d'eau sans nucléase et leurs concentrations ont été évaluées par spectrophotométrie (spectrophotomètre NanoDrop ND1000, Labtech).

IV. 2. b) Technique MLPA

La MLPA permet, en une seule réaction, la détection de variations du nombre de copies de nombreux loci et la recherche de points de mutation de plusieurs gènes. Le principe est d'obtenir pour chaque locus à étudier, un fragment amplifié dont la taille permet de l'identifier et de le quantifier après électrophorèse.

A chaque locus étudié correspond un couple de sondes. Ces sondes comportent chacune deux parties : l'une complémentaire de la séquence du locus cible (hybridation spécifique), l'autre correspondant à une séquence oligonucléotidique commune à chaque couple de sonde. La réaction

se déroule en trois phases, (i) hybridation : l'ADNg dénaturé du patient est mis en présence des couples de sondes, les sondes de chaque couple se fixant à 1 ou 2 bases de distance, (ii) ligation : chaque couple de sondes hybridées va être lié par une ligase, (iii) amplification par PCR multiplex en utilisant un couple d'amorces commun à tous les fragments. Les produits d'amplification obtenus ont été dénaturés dans une solution de formamide-ROX 500 (marqueur de taille fluorescent), puis séparés en fonction de leur taille et quantifiés par électrophorèse capillaire sur séquenceur (Genetic analyzer 3130XL, Applied Biosystems). Grâce au logiciel GeneMapper® (Applied Biosystems), chaque fragment peut alors être visualisé sous la forme d'un pic qui, selon son amplitude par rapport au tissu non tumoral, permet la détection du nombre de copies au niveau d'un locus. L'interprétation des résultats a été faite à l'aide d'un tableur Microsoft Excel® qui a permis de déterminer pour chaque pic d'intérêt, la « fraction de pic » après comparaison avec les sondes contrôles. La comparaison de ces fractions avec le tissu contrôle a donné un ratio. Un « gain » correspond à un ratio supérieur ou égal à 1.2, une « perte » à un ratio inférieur à 0.8. Les ratios supérieurs à 2 définissent des amplifications et ceux inférieurs à 0.4 des délétions homozygotes (67,68). Pour les mutations ponctuelles, la simple détection d'un pic est interprétée comme présence de cette mutation.

Nous avons utilisé cette technique pour mettre en évidence la présence de délétion 1p et/ou 19q, l'amplification de l'*EGFR*, la délétion de *PTEN* et *CDKN2A*, la recherche du gène de fusion *KIAA1549-BRAF*, du mutant *BRAFV600E* et de quatre mutations concernant *IDH1* et *IDH2* (kits SALSA® MLPA® P088 Oligodendroglioma, SALSA® MLPA® P105 Glioma-2, SALSA® MLPA® P370 BRAF-IDH1-IDH2, MRC-Holland).

Un seul kit MLPA permet l'analyse d'*EGFR*, *PTEN* et *CDKN2A*. En cas d'amplification de l'*EGFR*, la manipulation a été reproduite en présence de compétiteurs oligonucléotidiques des sondes *EGFR* en suivant le protocole du fournisseur (MRC-Holland). Cette étape permet d'empêcher l'amplification par PCR des sondes se fixant sur *EGFR*, et de pouvoir visualiser celles de *PTEN* et *CDKN2A* de manière quantitative.

En l'absence de tissu cérébral non tumoral disponible pour chaque patient, l'échantillon contrôle utilisé correspond à la moyenne des fractions obtenues dans les tissus cérébraux non tumoraux de six patients de la série. Les résultats pour trois astrocytomes pilocytiques et deux gangliogliomes sont ininterprétables en raison d'une trop faible quantité d'ADNg.

En l'absence de recommandation pour l'interprétation de cette technique, le gène de fusion *KIAA1549-BRAF* lié à une duplication en tandem en 7q34 a été considéré comme présent si :

- au moins 2 sondes s'hybridant aux exons de *BRAF* (exons 12, 14 et 17 inclus dans la zone de duplication) ont un ratio $\geq 1,2$,
- les sondes s'hybridant sur les exons 4 et 11 de *KIAA* (situés dans la zone de duplication) ont un ratio $\geq 1,2$,
- au moins une sonde s'hybridant sur un gène situé dans la zone de duplication (*HIPK2*, *MKRNI*) à un ratio $\geq 1,2$,
- les sondes s'hybridant sur les exons 4 et 8 de *BRAF* et l'exon 19 de *KIAA* (situés hors de la zone de duplication) ont un ratio ≤ 1 ,
- au moins 3 sondes s'hybridant sur les gènes situés en dehors de la zone de duplication (*ADAM22*, *DPP6*, *FKBP9*, *GLI3*, *LFNG*, *TFR2*) ont un ratio ≤ 1 .

IV. 3. Extraction d'ARN et RT-PCR quantitative en temps réel

IV. 3. a) Broyage des tissus

La nature et la densité tumorale des échantillons cryopréservés à -140°C ont été contrôlées grâce à une coupe au cryostat colorée à l'hémalun-phloxine. Le broyage de 10 à 30 mg de tissu permet de dissocier les composants tissulaires par pulvérisation avec des billes en céramiques (CK14, Ozyme) dans un tampon de lyse (QiaZol® Lysis Reagent, Qiagen) à l'aide d'un broyeur par oscillation (Précelllys24®, Ozyme), selon le protocole du fournisseur. A la fin du broyage, les microtubes ont été laissés 5 minutes à température ambiante avant transfert du surnageant dans un microtube stérile. Dans deux cas (un astrocytome pilocytique et un gangliogliome), l'étude n'a pu être réalisée en raison de la faible quantité de matériel cryopréservé.

IV. 3. b) Extraction d'ARN

Elle repose sur une méthode chromatographique réalisée manuellement à température ambiante selon le protocole du fournisseur avec le kit RNeasy®Lipid Tissue Mini (Qiagen) pour les prélèvements d'au moins 10 mg, ou avec le kit RNeasy®Micro (Qiagen) pour les prélèvements de moins de 10 mg. Les ARN sont retenus sur une membrane de silice alors que l'ADNg, les protéines, et le reste des composants cellulaires et tissulaires sont exclus. Les ARN ont été élués avec 30 μL (Mini kit) ou 14 μL (Micro kit) d'eau sans RNase et leurs concentrations ont été évaluées par spectrophotométrie (spectrophotomètre NanoDrop ND1000, Labtech).

La qualité des ARN a été contrôlée par électrophorèse capillaire (RNA 6000 Nano Kit, Bioanalyser 2100, Agilent). Les électrophorégrammes des ARN ribosomiques 18S et 28S ont

permis de déterminer un nombre d'intégrité des ARN (RIN). La qualité des ARN augmente avec le RIN, qui ne doit pas être inférieur à 6.

IV. 3. c) RT-PCR quantitative en temps réel

Après dénaturation des structures secondaires de l'ARN (500 ng) et des hexamères (2 µL) de nucléotides à 65°C pendant 10 minutes, la transcription réverse a été réalisée avec le kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis® (Roche) selon le protocole fourni par le fabricant dans un thermocycleur GeneAmp PCR System 9700 (AppliedBiosystems). L'ADN complémentaire (ADNc) obtenu a été stocké à -20°C.

Les amorces spécifiques des isoformes de l'*EGFR* et des gènes de référence ont été sélectionnées sur Primer 3 (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>). Leur spécificité pour la région cible a été vérifiée sur Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Le gène de référence est *HPRT* (Hypoxanthine PhosphoRibosyl Transférase), connu comme gène stable dans les gliomes. Les gènes *GAPDH* (Glycéraldéhyde-3-Phosphate DésHydrogénase) et *TBP* (TATA box binding protein) ont été testés comme gène de référence pour les tumeurs non infiltrantes de notre série, au cas où *HPRT* varierait de manière trop importante dans ces tumeurs. La localisation des amorces sur les gènes et la séquence des amorces sont présentées dans le tableau 7. La taille maximale des amplicons est de 160 paires de base. Lors de manipulations antérieures dans le laboratoire, la séquence des gènes amplifiés avait déjà été vérifiée par séquençage, et la taille des produits obtenus vérifiée par électrophorèse (sur gel d'agarose à 4% marqué au bromure d'éthidium).

La PCR quantitative en temps réel a été réalisée sur un appareil Rotor Gene (Corbett Research) avec le kit LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche), selon le protocole du fabricant, en présence de 3 mM de MgCl₂, de 0,2 à 0,5 µM d'amorces et de 2 µL d'ADNc dilués au 1/5^e pour un volume réactionnel total de 20 µL. Chaque cas a été étudié en duplicate. Le nombre de cycles est de 45 pour *EGFRvIII*, 50 pour *v2* et 40 pour les autres gènes. Les gammes standards d'amplification (de 10 à 10⁵ copies) pour chaque gène ont été obtenues à partir de l'ADNc de cellules U87 (lignée cellulaire de glioblastome). La reproductibilité de l'amplification a été vérifiée pour chaque PCR par l'utilisation de calibrateurs (2 points de la gamme standard). La courbe de fusion (« melting curve ») réalisée à la fin de chaque PCR a permis de confirmer la spécificité de la réaction par obtention d'une seule température de fusion.

Gène	Amorce	Localisation	Séquence 5'-3'	Tm	Efficacité	C° amorce (μ M)	Ta
EGFR v1	sens	exon 29-30	CTCCCAGTGCCTGAATACATA	58°C	1	0,5	58°C
	anti-sens	exon 30	GGCTGATTGTGATAGACAGGA	58°C			
EGFR v2	sens	exon 15	TGCACCTACGGGTCCTAAT	58°C	0,98	0,5	58°C
	anti-sens	exon 16	TGAAGCAAAGGGAGAAATTG	58°C			
EGFR v3	sens	exon 10	AAGGAAATCACAGGTTTGAGC	58°C	0,99	0,5	58°C
	anti-sens	exon 10bis	TCCAAGGGAACAGGAAATATG	58°C			
EGFR v4	sens	exon 15	CTACGGG CCAGGAAATGAG	60°C	0,98	0,2	62°C
	anti-sens	exon 17	CGCTGCCATCATTACTTTGA	60°C			
EGFR vIII	sens	exon 1-8	GCTCTGGAGGAAAAGAAAGGTAAT	60°C	0,92	0,2	62°C
	anti-sens	exon 8	TCCTCCATCTCATAGCTGTGC	60°C			
HPRT	sens	exon 6	CTTTCCTTGGTCAGGCAGTA	58°C	0,99	0,5	58°C
	anti-sens	exon 7	TGGCTTATATCCAACACTTCG	58°C			
GAPDH	sens	exon 6	AGATCCCTCCAAAATCAAGTGG	65°C	0,86	0,25	60°C
	anti-sens	exon7	GGCAGAGATGATGACCCTTTT	64°C			
TBP	sens	exon6	GAGCTGTGATGTGAAGTTCC	61°C	1,01	0,5	60°C
	anti-sens	exon 7	TCTGGGTTTGATCATTCTGTAG	61°C			

Tableau 7 : Caractéristiques des amorces utilisées pour la PCR quantitative (C° : concentration, Tm : température de fusion des amorces, Ta : température de la réaction).

La quantification relative des échantillons a été effectuée par la méthode comparative des déviations des cycles threshold ($\Delta\Delta$ Ct modifié selon Pfaffl) (69) en appliquant une correction en fonction de l'efficacité de la réaction. Le taux d'ARNm est exprimé en unité relative arbitraire (URA) d'un gène d'intérêt (EGFR variant 1 à 4) normalisé par celui d'un ou plusieurs gène(s) de référence.

Pour EGFRvIII, l'analyse est qualitative (présent ou absent), la quantification étant impossible du fait d'une importante quantité de dimères d'amorces à la fin de chaque PCR.

IV.4. Tissue Micro Array manuel

La technique de TMA consiste à prélever des carottes de tissu tumoral et non tumoral, si disponible, inclus en paraffine, au sein de zones repérées sur les coupes histologiques correspondantes colorées à l'hémalum-phloxine. Dans la mesure du possible, deux carottes de 2 mm de diamètre par contingent tumoral à étudier ont été utilisées pour éviter la perte d'information en cas de décollement des spots. Ces carottes ont été prélevées manuellement à l'aide d'un stylet. Elles

ont ensuite été déposées selon un plan pré-établi dans un bloc de paraffine receveur pouvant contenir jusqu'à 24 échantillons. Les blocs ont été laissés 12h à l'étuve à 37°C pour solidariser les carottes avec le bloc de paraffine receveur, puis placés à 4°C avant la coupe au microtome. Les coupes de 5 µm d'épaisseur ont été déposées sur lames Superfrost®plus et incubées une nuit à l'étuve à 56°C. Une lame contrôle a été colorée à l'HPS, et les autres lames ont été utilisées pour l'immunohistochimie.

En raison d'artéfacts de décollement des spots lors de la réalisation de la technique, cinq cas ne disposent d'aucune donnée immunohistochimique (un astrocytome pilocytique, trois gangliogliomes et un oligodendrogliome). Pour les cas disposant de deux spots interprétables, le résultat correspond à la moyenne des deux valeurs sauf pour l'évaluation de l'index Ki67 dont la valeur la plus élevée a été conservée.

IV. 5. Immunohistochimie

IV. 5. a) Technique automatisée : technique immuno-enzymatique en 3 temps, simple marquage

Cette technique de routine est réalisée grâce à un automate Benchmark XT (Ventana Medical Systems®), selon les recommandations du fournisseur. Les caractéristiques des anticorps sont récapitulées dans le tableau 8.

Les étapes de la technique sont : déparaffinage, réhydratation, prétraitement par la chaleur, inhibition des peroxydases endogènes, blocage des sites non spécifiques, fixation de l'anticorps primaire spécifique, puis de l'anticorps secondaire (anticorps biotinylé) suivi de l'avidine couplée à la peroxydase, révélation avec le chromogène DAB (diaminobenzidine), contre coloration à l'hématoxyline suivie d'un bain au carbonate de lithium. Les lames ont été déshydratées manuellement dans de l'éthanol absolu puis immergées dans du toluène avant d'être montées en milieu non aqueux. Les contrôles isotypiques pour les techniques utilisant EGFR_{DEC}, EGFR_{DIC} et P-EGFR (anticorps non utilisés en routine) ont été réalisés avec des anticorps isotypiques à la même concentration que l'anticorps primaire. Ces contrôles étaient négatifs.

Antigène reconnu par l'anticorps	Localisation du marquage	Structure marquée	Anticorps primaire			
			espèce d'origine	nature (clone)	dilution	fournisseur
Ki67	Nucléaire	protéine nucléaire exprimée au cours des phases G1, S, G2 et M du cycle cellulaire	souris	IgG1 monoclonale (Mib-1)	1/200	Dako
p53	Nucléaire	protéine p53 (sauvage et mutée)	souris	IgG2 monoclonale (DO-7)	1/50	Dako
NF	Cytoplasmique	filaments intermédiaires spécifiques des neurones	souris	IgG1 monoclonale (2F11)	1/600	Dako
INA	Cytoplasmique	protéine des filaments intermédiaires neuronaux	souris	IgG1 monoclonale (2E3)	1/2000	Invitrogen
GFAP	Cytoplasmique	principale protéine des filaments intermédiaires des cellules gliales : marquage astrocytaire voire épendymaire	souris	IgG1 monoclonale (6f2)	1/1000	Dako
Nestine	Cytoplasmique	protéine du cytosquelette de cellules souches neurales et de cellules progénitrices	souris	IgG1 monoclonale	1/10000	Millipore
NeuN	Nucléaire	protéine nucléaire spécifique des neurones	souris	IgG1 monoclonale (A60)	1/300	Millipore
Synaptophysine	Cytoplasmique	protéine transmembranaire des vésicules synaptiques neuronales	souris	IgG1 monoclonale (27G12)	1/10	Novocastra
Chromogranine	Cytoplasmique	protéine sécrétée par les neurones dystrophiques et de rares neurones non tumoraux	lapin	polyclonale	1/3000	Dako
Olig2	Nucléaire	facteur de transcription exprimé par les cellules progénitrices oligodendrogiales	lapin	IgG polyclonale	1/200	IBL
IDH1	Cytoplasmique	isocitrate déshydrogénase 1	souris	IgG2a monoclonale (H09)	1/100	Dianova
CD34	Membranaire	protéine membranaire de progéniteurs hématopoïétiques, voire de cellules souches neurales dans les gangliogliomes	souris	IgG1 monoclonale (My10)	1/25	B-D
EGFR_{DEC}	Membranaire	domaine extracellulaire de l'EGFR (toutes les isoformes)	souris	IgG1 monoclonale (3C6)	1/500	Ventana
EGFR_{DIC}	Membranaire +/- Cytoplasmique	domaine intracellulaire de l'EGFR (isoforme a et variant III)	souris	IgG1 monoclonale (EGFR.25)	1/500	Novocastra
P-EGFR	Cytoplasmique à renforcement membranaire	tyrosine 1068 phosphorylée (domaine intracellulaire de l'EGFR)	souris	IgG1 monoclonale (1H12)	1/2500	Cell Signaling

Tableau 8 : Anticorps utilisés pour l'immunohistochimie en technique automatisée.

IV. 5. b) Technique manuelle : technique immuno-enzymatique en 2 temps, simple marquage

Cette technique a été mise au point pour les marquages de neurotrophines et de leurs récepteurs (tableau 9) sur carcinome canalaire infiltrant du sein, connu pour exprimer ces antigènes à l'état normal et pour les surexprimer dans les lésions carcinomateuses. Elle a été réalisée à l'aide d'un kit (EnVision+ System-HRP®, Dako) utilisant un polymère marqué à la peroxydase de raifort (HRP) conjugué à des anticorps secondaires.

Antigène reconnu par l'anticorps	Localisation du marquage	Structure marquée	Anticorps primaire			
			espèce d'origine	nature (clone)	dilution	fournisseur
TrkA	cytoplasmique et/ou membranaire	récepteur TrkA	lapin	Ig monoclonale (14G6)	1/150	Cell Signaling
TrkB	cytoplasmique et/ou membranaire	domaine extracellulaire du récepteur TrkB	lapin	IgG polyclonale (H181)	1/25	Santa Cruz
BDNF	cytoplasmique	peptide soluble mature (BDNF) et précurseur (pro-BDNF)	lapin	IgG polyclonale (N20)	1/75	Santa Cruz
NGF	cytoplasmique	peptide soluble mature (NGF) et précurseur (pro-NGF)	lapin	IgG polyclonale (H20)	1/125	Santa Cruz
p75^{NTR}	cytoplasmique et/ou membranaire	corécepteur p75 ^{NTR}	lapin	IgG polyclonale (H137)	1/150	Santa Cruz

Tableau 9 : Anticorps utilisés pour l'immunohistochimie en technique manuelle.

Les étapes de la technique sont :

- déparaffinage des lames par 2 bains de toluène de 10 minutes, 2 bains d'éthanol absolu de 3 minutes, puis réhydratation dans l'eau courante pendant 5 minutes et dans du PBS (Phosphate Buffer Saline, 1X) pendant 1 minute,
- prétraitement par la chaleur : immersion des lames dans un tampon citrate à pH7 (3 tours de 5 min au micro-ondes à 750W), puis refroidissement au moins 30 minutes,
- inhibition des peroxydases endogènes : dépôt de 100 µL par lame de la solution « Peroxydase Block » du kit pendant de 5 minutes, puis 2 lavages de 5 minutes avec de l'eau distillée puis du PBS,
- blocage des biotines endogènes (Biotin Blocking System®, Dako) selon le protocole du fournisseur, puis 2 lavages de 3 minutes dans du PBS,
- saturation des sites antigéniques aspécifiques par de la BSA (Bovine Serum Albumin) diluée à 3% dans du PBS : dépôt de 150 µL, incubation 30 minutes dans une chambre humide,

- dépôt de 100 à 150 μ L d'anticorps primaire dilué avec la solution PBS-BSA 3%, avec une incubation en chambre humide d'1 heure à température ambiante pour TrkB, BDNF et NGF ou toute la nuit à 4°C pour TrkA et p75^{NTR}, puis 3 bains de PBS de 3 minutes,
- dépôt de l'anticorps secondaire du kit (immunoglobulines de chèvre anti-lapin) : 100 μ L pendant 30 minutes en chambre humide, puis 3 lavages successifs dans des bains PBS de 3 minutes chacun,
- révélation : incubation avec le chromogène diaminobenzidine (DAB) pendant maximum 5 minutes, lavage à l'eau courante suivi d'une contre coloration à l'hématoxyline, d'un rinçage à l'eau et d'un bain de carbonate de lithium pour bleuir les cellules. Les lames sont rincées à l'eau courante, déshydratées dans 2 bains d'éthanol absolu puis immergées dans du toluène avant montage.

Les contrôles isotypiques sont négatifs.

IV. 5. c) Double marquage

Des doubles marquages P-EGFR/Olig2 et P-EGFR/p53 ont été réalisés pour vérifier la nature astrocytaire des cellules exprimant le P-EGFR. Les étapes de la technique sont :

- marquage nucléaire (Olig2 ou p53) à l'aide de la technique automatisée, jusqu'à l'étape de révélation par le chromogène,
- deux bains de PBS de 10 min chacun,
- marquage cytoplasmique (P-EGFR) en suivant le protocole de technique manuelle à partir du dépôt de l'anticorps primaire, en utilisant un kit LSAB+ System-HRP (Dako), et révélation avec un chromogène amino-éthylcarbazole (AEC),
- les lames sont montées en milieu aqueux.

IV. 5. d) Interprétation

Les marquages avec les anticorps anti-EGFR et anti-nestine ont été évalués avec le score de Hirsch (70) qui correspond à un score semi-quantitatif 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. Pour les anticorps anti-EGFR_{DEC} et anti-EGFR_{DIC}, le score obtenu détermine trois groupes d'expression protéique :

- score inférieur à 200 : pas de surexpression protéique de l'EGFR,
- score de 201 à 300 : surexpression protéique intermédiaire de l'EGFR,
- score de 301 à 400 : forte surexpression protéique de l'EGFR.

Pour l'anticorps anti-nestine, le seuil de surexpression choisi est également de 200.

Les marquages avec les anticorps anti-Ki67, anti-INA, anti-IDH1, anti-p53 et anti-Olig2 ont été interprétés de manière quantitative, en évaluant le pourcentage de cellules marquées. Le seuil de surexpression de Ki67 à 4% est discriminant de manière significative dans notre série. Les seuils de surexpression utilisés pour le marquage d'INA, IDH1 et p53 sont ceux habituellement appliqués aux gliomes, c'est-à-dire 10% de cellules marquées.

Pour les anticorps anti-CD34, anti-P-EGFR et les doubles marquages, l'évaluation a été qualitative : marquage présent (positif) ou absence de marquage (négatif).

Les marqueurs suivants ont été utilisés pour confirmation diagnostique et n'ont pas été étudiés dans la partie résultats. La GFAP a permis de confirmer la différenciation astrocytaire des cellules piloïdes ou fibrillaires. La chromogranineA, la synaptophysine, NeuN et NF ont permis de vérifier la présence du contingent neuronal dans les gangliogliomes.

IV. 6. Analyse statistique

Les comparaisons des variables qualitatives ont été réalisées par des tests du Chi-2. Les comparaisons de moyennes entre groupes ont été calculées par des tests de Mann-Whitney (comparaison de 2 variables) ou de Kruskal-Wallis (comparaison de plus 2 variables). Le test de Spearman a été utilisé pour étudier la corrélation entre 2 données quantitatives. L'analyse de survie a été réalisée par la méthode de Kaplan-Meier. La date d'origine est la date de diagnostic anatomopathologique. Les comparaisons des courbes de survie ont été faites par le test de log-rank. Le seuil de significativité p choisi pour l'ensemble des analyses statistiques est de 0,05.

V. RESULTATS

V. 1. Données cliniques et histopathologiques

V. 1. a) Cas pour l'étude des contingents cellulaires

Les données cliniques et histopathologiques sont indiquées dans le tableau 10. Les tumeurs prenaient le contraste en imagerie, sauf deux oligodendrogliomes (cas n°33 et 37). Tous les astrocytomes pilocytiques et les gangliogliomes ont été traités par chirurgie d'exérèse seule, sans chimiothérapie ni radiothérapie.

Type tumoral	Cas (numéro)	Grade OMS	Sexe	Age au diagnostic (année)	Contingent				
					piloïde	oligodendrogial	« oligo-like »	fibrillaire et « oligo-like »	neuronal
Astrocytomes pilocytiques (14 cas)	1	I	M	10				1	
	2	I	M	19	1				
	3	I	M	11	1				
	4	I	M	16				1	
	5	I	M	15	1				
	6	I	F	2				1	
	7	I	F	18	1				
	8	I	M	13	1				
	9	I	F	16			1	1	
	10	I	F	6	1			1	
	11	I	F	15	1				
	12	I	F	9	1			1	
	13	I	M	20			1	1	
	14	I	F	2				1	
Gangliogliomes (12 cas)	15	II	M	34			1		1
	16	I	F	13					1
	17	I	M	6	1			1	1
	18	II	M	10					1
	19	I	F	62					1
	20	II	F	13					1
	21	I	M	36			1		1
	22	I	F	72			1		1
	23	II	M	30					1
	24	I	F	48	1				1
	25	II	F	16					1
	26	I	M	16					1
Oligodendrogliomes (13 cas)	27	II	M	28		1			
	28	II	M	48		1			
	29	III	M	70		1			
	30	III	M	53		1			
	31	III	F	42		1			
	32	II	M	33		1			
	33	III	F	57		1			
	34	II	M	52		1			
	35	III	M	50		1			
	36	II	M	45		1			
	37	II	M	38		1			
	38	III	M	42		1			
	39	III	M	31		1			

Tableau 10 : Caractéristiques cliniques et histopathologiques en fonction des types tumoraux.

V. 1. b) Cas pour l'étude de l'expression de l'EGFR

Aux 39 cas précédents, 5 oligo-astrocytomes et 17 glioblastomes ont été ajoutés (tableau 11).

Type tumoral	Cas (numéro)	Grade OMS	Sexe	Age au diagnostic (année)	Traitement 1 ^{ère} ligne		
					Chirurgie	Radiothérapie	Chimiothérapie
Oligo-dendrogliomes (13 cas)	27	II	M	28	ex. totale	oui	non
	28	II	M	48	ex. sub-totale	non	oui
	29	III	M	70	ex. sub-totale	non	oui
	30	III	M	53	ex. sub-totale	oui	oui (PCV)
	31	III	F	42	ex. sub-totale	non	non
	32	II	M	33	ex. totale	oui	non
	33	III	F	57	ex. sub-totale	oui	oui (PCV)
	34	II	M	52	ex. sub-totale	oui	oui (Temodal®)
	35	III	M	50	ex. sub-totale	oui	oui (PCV)
	36	II	M	45	ex. sub-totale	non	non
	37	II	M	38	ex. sub-totale	non	non
	38	III	M	42	non	oui	oui (PCV)
	Oligo-astrocytomes (5 cas)	39	III	M	31	ex. totale	oui
40		II	M	43	ex. sub-totale	non	non
41		II	M	49	ex. sub-totale	non	non
42		II	F	58	ex. sub-totale	oui	non
43		III	F	57	ex. sub-totale	oui	oui (PCV)
Glioblastomes (17 cas)	44	III	F	42	ex. sub-totale	oui	oui (PCV)
	45	IV	M	41	ex. sub-totale	non	oui (PCV)
	46	IV	F	69	ex. totale	oui	non
	47	IV	M	43	ex. totale	oui	oui (Cisplatine® et BICNU)
	48	IV	F	34	ex. sub-totale	oui	non
	49	IV	M	60	ex. totale	oui	oui (Temodal®)
	50	IV	F	57	ex. totale	oui	oui (Temodal® puis PCV)
	51	IV	M	68	ex. sub-totale	non	oui (PCV)
	52	IV	F	46	ex. totale	oui	oui (Temodal®)
	53	IV	M	48	ex. totale	oui	oui (Temodal®)
	54	IV	F	59	ex. sub-totale	oui	oui (Temodal®)
	55	IV	M	43	ex. sub-totale	oui	oui (Gliadel® in situ + Temodal®)
	56	IV	F	59	ex. sub-totale	oui	oui (Temodal®)
	57	IV	F	59	ex. incomplète	oui	oui (Temodal®)
	58	IV	F	69	ex. sub-totale	oui	oui (Temodal®)
	59	IV	M	66	ex. totale	oui	oui (Temodal®)
	60	IV	M	40	ex. incomplète	oui	oui (Gliadel® in situ)
61	IV	M	63	non	oui	oui (Temodal®)	

Tableau 11 : Caractéristiques cliniques et traitement en fonction des types tumoraux (« ex. » pour exérèse, exérèse totale en l'absence de résidu tumoral visible, sub-totale si le résidu tumoral post-opératoire est inférieur à 1,5 cm³ et incomplète si le résidu tumoral est supérieur à 1,5 cm³).

V. 2. Etude des contingents cellulaires dans des gliomes infiltrants et non infiltrants

V. 2. a) Analyse génétique : perte 1p19q, amplification *EGFR*

La perte des bras chromosomiques 1p et/ou 19q n'a été retrouvée dans aucun des contingents cellulaires des astrocytomes pilocytiques et des gangliogliomes, alors que 12 des 13 oligodendrogliomes présentent une perte complète 1p et 19q (cas n°36 sans perte 1p19q). Les résultats des oligo-astrocytomes et des glioblastomes sont également présentés.

Type tumoral	Perte 1p/19q		
	OUI	NON	
Astrocytomes pilocytiques	0	14	<i>p</i> < 0,0001
Gangliogliomes	0	12	
Oligodendrogliomes	12	1	
Oligo-astrocytomes	0	5	
Glioblastomes	0	17	

Tableau 12 : Recherche de la perte 1p19q par MLPA.

L'amplification de l'*EGFR* n'a pas été mise en évidence dans les contingents des tumeurs non infiltrantes ni des oligodendrogliomes. La figure 15 présente un exemple de résultat obtenu par MLPA pour un astrocytome pilocytique non amplifié *EGFR* (cas n°10) en comparaison d'un glioblastome témoin avec amplification de l'*EGFR*.

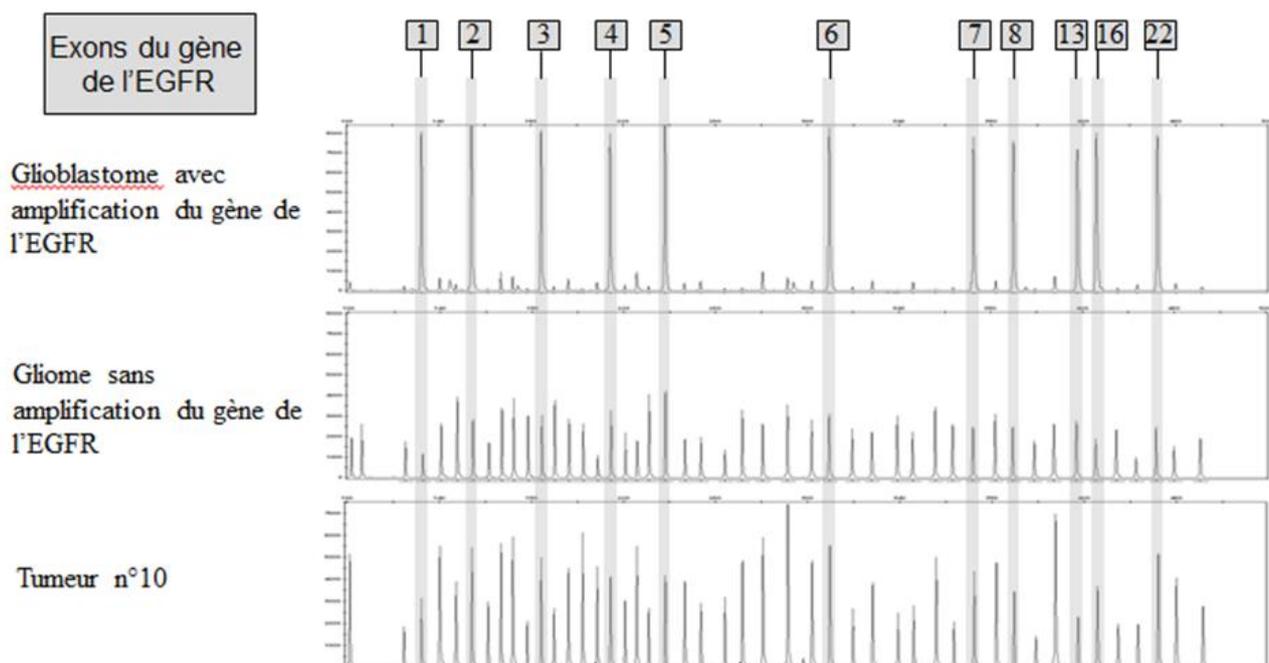


Figure 15: Exemples de résultats obtenus par MLPA pour la recherche d'amplification de l'*EGFR*. Un pic correspond à un produit d'amplification pour chaque locus étudié (exons de l'*EGFR* ou gènes de référence), répartis en fonction de leur taille. La hauteur du pic est corrélée au nombre de copies observé.

V. 2. b) Analyse génomique : *IDH*, *BRAF*, *PTEN*, *CDKN2A*

Aucun astrocytome pilocytique ni aucun gangliogliome ne présente de mutation d'*IDH1* ou d'*IDH2*, quel que soit le contingent cellulaire étudié. 12 oligodendrogliomes sur 13 cas possèdent la mutation R132H d'*IDH1* ($p < 0,0001$) (tableau 13), le cas non muté étant le n°36 (cas sans perte 1p19q).

Type tumoral	Mutation <i>IDH1</i>		
	OUI	NON	
Astrocytomes pilocytiques	0	14	$p < 0,0001$
Gangliogliomes	0	12	
Oligodendrogliomes	12	1 (cas n°36)	
Oligo-astrocytomes	0	5	
Glioblastomes	0	17	

Tableau 13 : Recherche de mutation d'*IDH1* par MLPA.

La présence du gène de fusion *KIAA1549:BRAF* a été mise en évidence dans trois astrocytomes pilocytiques et deux gangliogliomes. Seul un gangliogliome présente une mutation *BRAF* V600E. Lorsqu'une anomalie moléculaire est mise en évidence dans une tumeur, elle est retrouvée dans tous les contingents de cette tumeur (tableau 14). Aucune altération de *BRAF* n'a été retrouvée dans les oligodendrogliomes, les oligo-astrocytomes ni les glioblastomes.

Type tumoral	<i>BRAF</i>	Contingent					<i>p</i>
		piloïde	fibrillaire et « oligo-like »	« oligo-like »	oligodendrogliol	neuronal	
Astrocytomes pilocytiques	cas n°3	fusion					0,17
	cas n°5	fusion					
	cas n°10	fusion	fusion				
Gangliogliomes	cas n°17	fusion	fusion			fusion	
	cas n°21			fusion		fusion	
	cas n°15			V600E		V600E	
Oligo-dendrogliomes	aucun						
<i>p</i>				0,07			

Tableau 14 : Tumeurs avec anomalie de *BRAF*, résultats en fonction des contingents cellulaires tumoraux.

Nous avons conclu à une délétion lorsqu'au moins 7 des 11 sondes se fixant sur *PTEN* avaient un ratio $< 0,8$, et au moins 3 des 5 sondes se fixant sur *CDKN2A* avaient un ratio $< 0,8$. La même règle a été appliquée pour la recherche de délétion homozygote, avec un ratio $< 0,4$.

Les délétions de *PTEN* et *CDKN2A* ont été observées dans tous les types tumoraux de notre série (tableau 15). Lorsque que plusieurs contingents cellulaires étaient identifiés, tous ont présenté la même délétion. La délétion homozygote de *CDKN2A* n'a été observée que dans les glioblastomes

et dans un oligo-astrocytome (cas n°44), pour chaque cas associée à une délétion de *PTEN* ($p < 0,005$) et une amplification de l'*EGFR* ($p < 0,0001$).

Type tumoral	Délétion <i>PTEN</i>		Délétion <i>CDKN2A</i>	
	OUI	NON	OUI	NON
Astrocytomes	5	6	3	8
Gangliogliomes	1	9	4	6
Oligodendrogliomes	1	12	4	9
Oligo-astrocytomes	3	2	1 (dont 1 DH)	4
Glioblastomes	13	4	16 (dont 4 DH)	1
<i>p</i>	< 0,0006		< 0,002	

Tableau 15 : Recherche de délétion de *PTEN* et *CDKN2A* par MLPA (DH : délétion homozygote).

V. 2. c) Analyse protéique : INA, IDH1, p53, Ki67, CD34, neurotrophines

V. 2. c1) Marqueurs immunohistochimiques et types histologiques

Le tableau 16 présente les résultats des marqueurs immunohistochimiques en fonction des types tumoraux, tels qu'ils sont interprétés en diagnostic de routine. Certaines données sont manquantes, en raison du « décollement » des spots liés à la technique TMA.

Anticorps	Seuil	Astrocytomes pilocytiques	Gangliogliomes	Oligodendrogliomes	<i>p</i>
INA	< 10%	13	6	7	
	≥ 10 %	0	2	6	0,01
IDH1	< 10%	13	8	1	
	≥ 10%	0	0	12	< 0,0001
p53	< 10%	10	4	7	
	≥ 10%	2	4	4	0,28
Ki67	< 4%	13	7	8	
	≥ 4%	0	3	4	0,01
CD34	négatif	10	1	12	
	positif	0	7	0	< 0,0001

Tableau 16 : Analyse immunohistochimique en fonction des types tumoraux (seuil du marquage par les anticorps en % de cellules marquées, qualitatif pour CD34).

Les astrocytomes pilocytiques n'expriment pas l'ensemble des marqueurs, excepté deux cas exprimant p53, sans corrélation avec les données cliniques.

Les gangliogliomes expriment essentiellement p53 (50% des cas) et CD34 (88% des cas), ce dernier étant spécifique des gangliogliomes ($p < 0,0001$). La nestine est exprimée par le cytoplasme des astrocytes (corps cellulaire et prolongements) quel que soit le type tumoral, mais de manière

plus intense dans les gangliogliomes. L'INA est exprimée dans 25% des gangliogliomes, sans aucune perte 1p ou 19q.

Les oligodendrogliomes sont caractérisés par une expression d'IDH1 (sauf cas n°36 non muté *IDH*) et d'INA (46% des cas). La figure 16 présente un exemple de marquage immunohistochimique de nestine, CD34 et INA sur TMA.

L'index Ki67 est associé de manière significative et directe avec le grade tumoral ($p < 0,001$), comme rapporté dans l'OMS. L'index Ki67 n'est pas corrélé aux autres variables.

Il n'existe pas d'association significative entre l'expression des marqueurs testés en immunohistochimie et l'âge ou le sexe des patients, la localisation tumorale ni la prise de contraste radiologique.

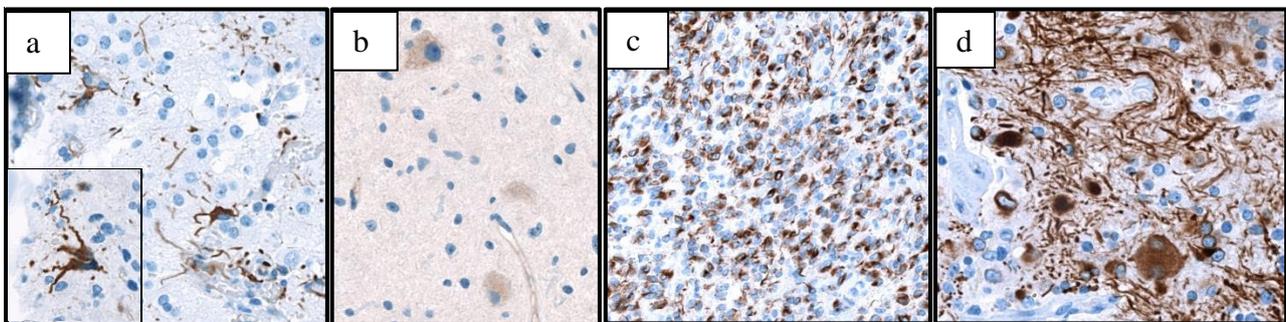


Figure 16: Immunohistochimie a) expression de la nestine par les astrocytes d'un gangliogliome, b) expression du CD34 par les neurones d'un gangliogliome, expression de l'INA c) par le contingent oligodendroglial dans un oligodendrogliome et d) par des neurones dans un gangliogliome (x400).

V. 2. c2) Marqueurs immunohistochimiques et contingents cellulaires tumoraux

Le tableau 17 présente les résultats de l'analyse immunohistochimique en fonction des contingents tumoraux. Excepté p53, les contingents piloïde, fibrillaire et « oligo-like » expriment très peu l'ensemble des marqueurs. Le contingent oligodendroglial est caractérisé par une forte expression d'IDH1, alors que les contingents « oligo-like » et « fibrillaire et oligo-like » sont négatifs. Le contingent neuronal est caractérisé par l'expression de CD34.

L'expression d'IDH1 est strictement corrélée à la détection de mutation d'*IDH* en MLPA, sauf pour un oligo-astrocytome (n°41) sans mutation *IDH* détectée en MLPA mais avec une expression d'IDH1 par 60% des cellules tumorales.

Anticorps	Seuil	Contingent					p
		piloïde	fibrillaire et « oligo-like »	« oligo-like »	oligodendroglial	neuronal	
INA	< 10%	9	7	4	6	6	0,02
	≥ 10 %	0	0	0	6	2	
IDH1	< 10%	9	7	4	1	8	< 0,0001
	≥ 10%	0	0	0	11	0	
p53	< 10%	7	6	2	7	5	0,39
	≥ 10%	2	0	2	4	3	
Ki67	< 4%	9	7	3	8	7	0,06
	≥ 4%	0	0	1	4	2	
CD34	négatif	10	8	4	12	1	< 0,0001
	positif	0	0	0	0	7	

Tableau 17 : Analyse immunohistochimique en fonction des contingents tumoraux (seuil du marquage par les anticorps en % de cellules marquées et qualitatif pour CD34).

Olig2 est exprimé dans les trois types tumoraux, par des cellules « rondes » du contingent oligodendroglial et du contingent « oligo-like », ainsi que par des cellules fusiformes du contingent fibrillaire (cf. figure 17).

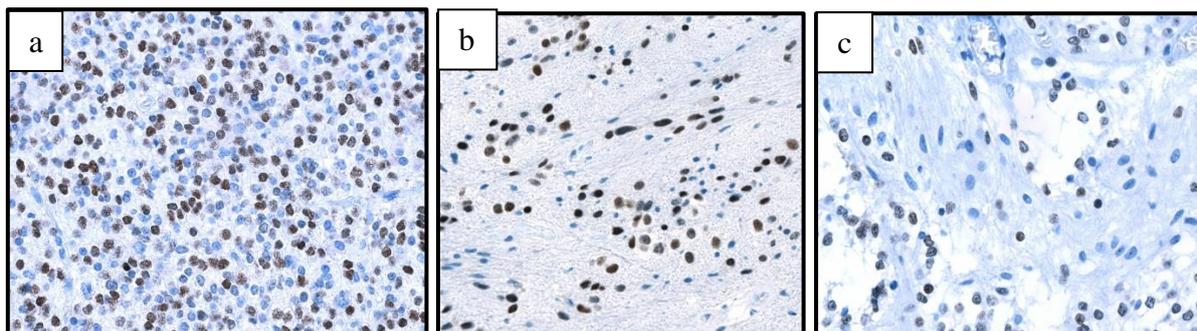


Figure 17 : Marquage avec l'anticorps anti-Olig2 en immunohistochimie a) positif sur le contingent oligodendroglial d'un oligodendrogliome, positif sur les contingents « oligo-like » et fibrillaire (b) d'un gangliogliome et (c) d'un astrocytome pilocytique (x400).

V. 2. c3) Expression des neurotrophines et de leurs récepteurs

Les marquages obtenus sont difficilement interprétables dans les contingents oligodendroglial, « oligo-like » et astrocytaire, en raison d'un important bruit de fond, de la difficulté à analyser le type de cellules marquées et de la présence d'un marquage d'intensité identique sur tissu cérébral sain. Les tissus témoins de carcinome canalaire infiltrant du sein (figure 18a) et les tumeurs gliales et glioneurales (figure 18b) présentent une expression diffuse des neurotrophines et de leurs récepteurs par des cellules d'allure gliale non tumorales et tumorales. Dans les gangliogliomes, les neurones dystrophiques expriment de manière plus intense NGF, TrkA

et TrkB en intra- cytoplasmique alors que BDNF est surexprimé dans les noyaux de neurones et de petites cellules rondes de type « oligo-like ».

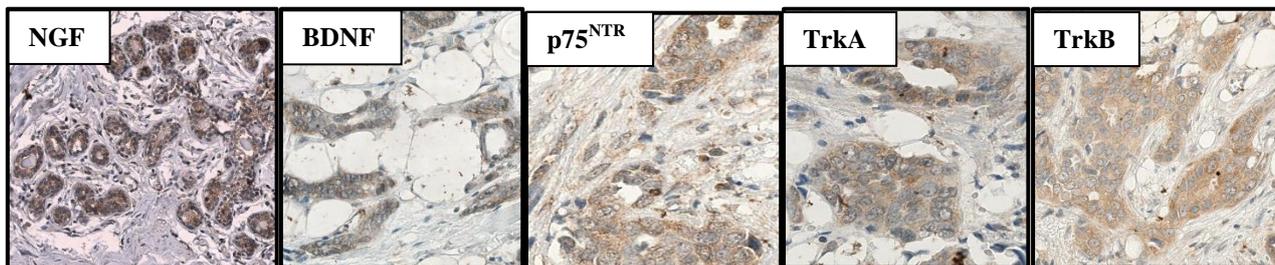


Figure 18 a) : Marquages immunohistochimiques des neurotrophines et des récepteurs aux neurotrophines dans un carcinome canalaire infiltrant du sein (x 400, sauf NGF x 200).

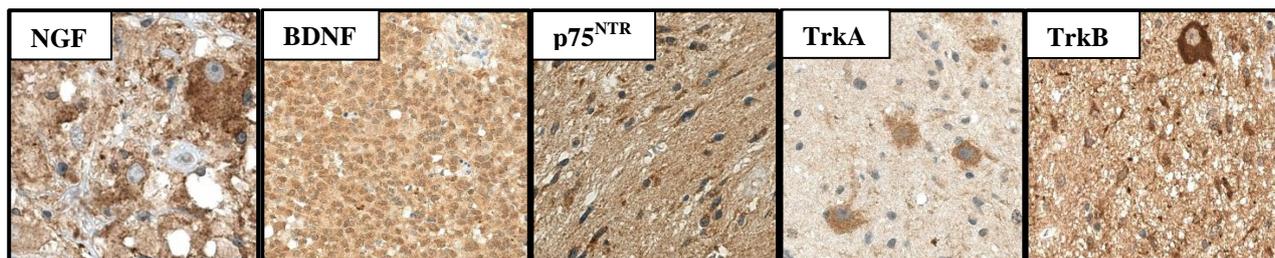


Figure 18 b) : Marquages immunohistochimiques des neurotrophines et des récepteurs aux neurotrophines dans un gangliogliome (NGF, TrkA et TrkB), dans un oligodendrogliome (BDNF) et dans un astrocytome pilocytique (p75^{NTR}) (x 400).

V. 3. Etude de l'expression de l'EGFR dans des gliomes infiltrants et non infiltrants

V. 3. a) Analyse génétique : amplification de l'EGFR

L'ensemble des cas interprétés avec une amplification de l'EGFR présentait un ratio > 2 pour au moins 10 sondes se fixant sur les exons d'EGFR (sur les 11 sondes du kit MLPA). 41 % des glioblastomes et un oligo-astrocytome (cas n°44) présentent une amplification de l'EGFR (tableau 18). Cette anomalie n'est pas observée dans les autres types tumoraux.

Type tumoral	Amplification EGFR	
	OUI	NON
Astrocytomes pilocytiques	0	14
Gangliogliomes	0	12
Oligodendrogliomes	0	13
Oligo-astrocytomes	1	4
Glioblastomes	7	10

p = 0,01

Tableau 18 : Recherche de l'amplification de l'EGFR par MLPA.

V. 3. b) Analyse transcriptomique des variants de l'EGFR

L'étude de l'expression des variants ARNm de l'EGFR a été réalisée sur 13 astrocytomes pilocytiques et 11 gangliogliomes. Nous avons étudié la stabilité d'expression des trois gènes de référence *HPRT*, *TBP* et *GAPDH* dans ces deux types tumoraux (figure 19). *GAPDH* présente un niveau d'expression plus élevé que *TBP* et *HPRT* dans les tissus étudiés. *TBP* et *HPRT* ont un niveau d'expression comparable.

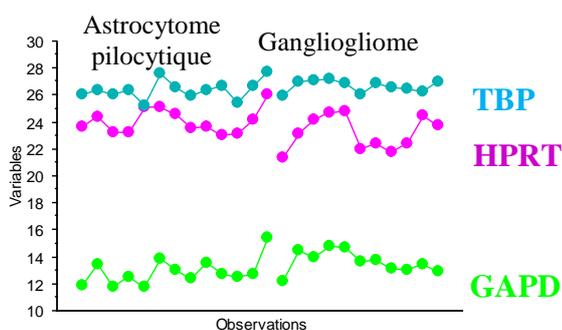


Figure 19 : Variations des CT des gènes de référence en fonction des types tumoraux.

Les ARNm ont des RIN compris entre 5,7 à 8,6. Tous les gènes, excepté celui codant le variant 2 de l'EGFR, ont pu être amplifiés de manière spécifique (figure 20).

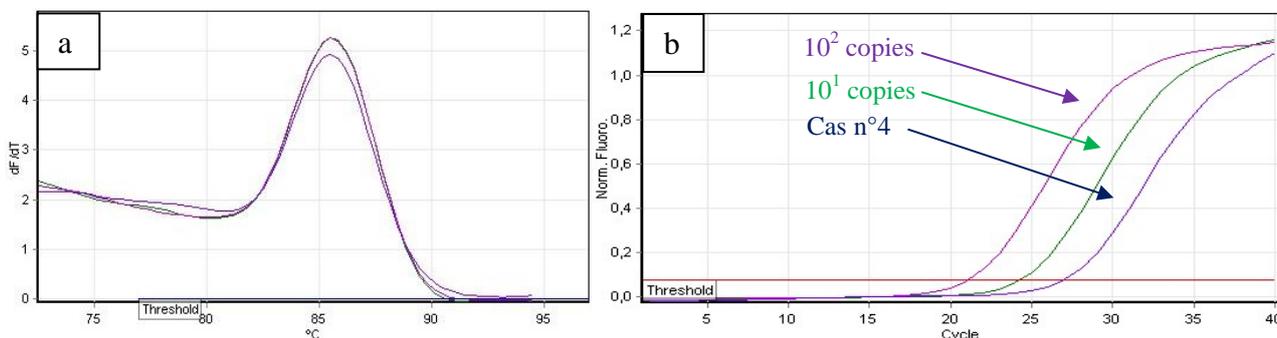


Figure 20 : Exemple de courbes obtenues en PCR quantitative pour le cas n°4 (astrocytome pilocytique) avec 2 calibrateurs (10^1 et 10^2 copies) : (a) courbe de fusion (dérivée première de la variation de fluorescence (dFI/dT) en fonction de la température) et (b) courbe d'amplification (intensité de fluorescence en fonction du nombre de cycles).

L'expression des variants a donc été comparée entre les 5 types tumoraux en utilisant *HPRT* comme gène de référence (figure 21).

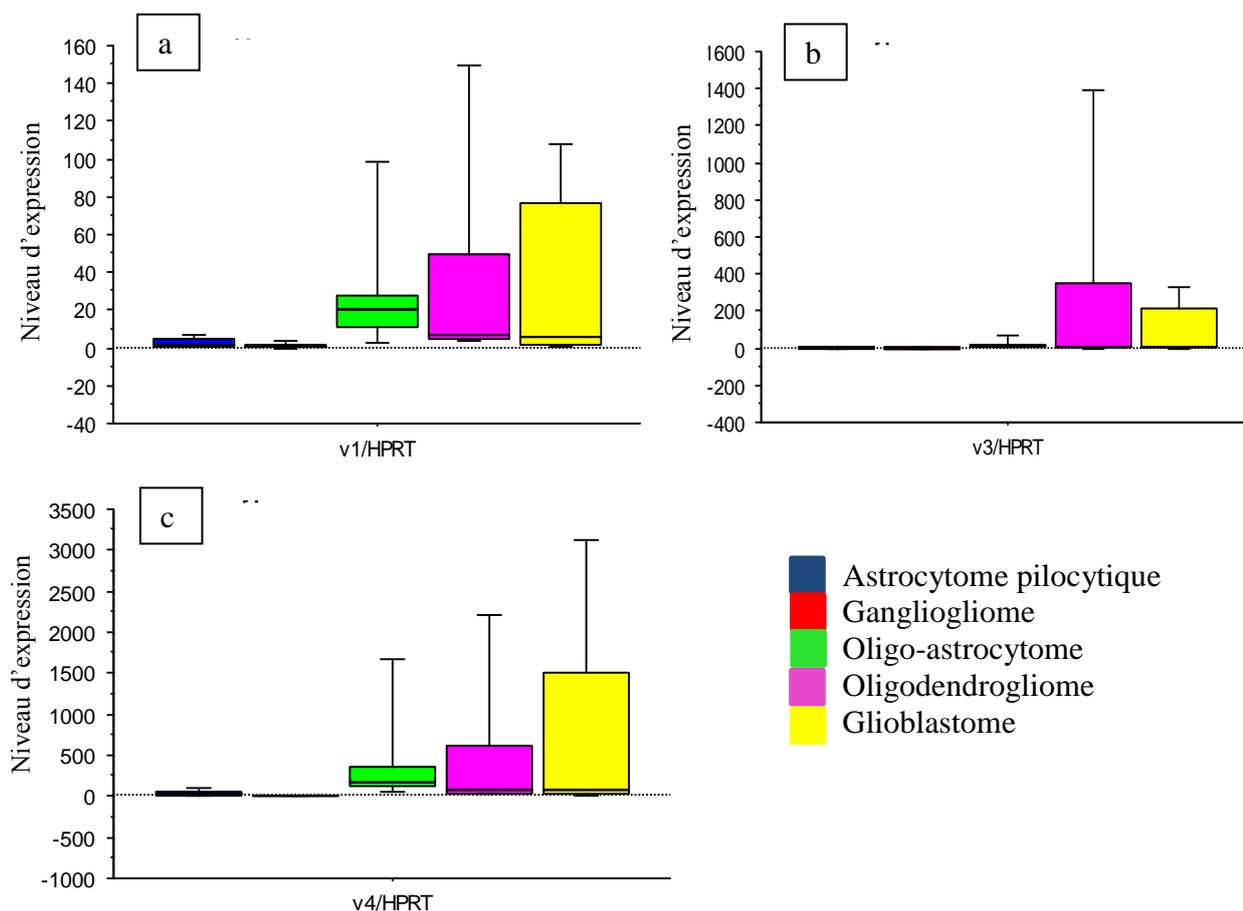


Figure 21 : Expression des variants de l'EGFR en fonction des différents types tumoraux. Variant 1 en a), variant 3 en b) et variant 4 en c).

Les niveaux d'expression des variants sont plus faibles dans les tumeurs non infiltrantes que dans les gliomes infiltrants. Nous avons fixé un seuil de surexpression, correspondant à la médiane pour chaque variant (tableau 19).

Taux ARNm	Variant 1 Médiane [min-max]	Variant 3 Médiane [min-max]	Variant 4 Médiane [min-max]
Médiane	4,5 [0,03-390,2]	3,2 [0,04-1396,8]	51,2 [0,19-6769,4]
Astrocytomes pilocytiques (13 cas)	1,2 [0,1-8,0]	1,7 [0,16-5,46]	30,1 [2,5-122,38]
Gangliogliomes (11 cas)	0,7 [0,03-4,2]	0,6 [0,04-3,61]	3,7 [0,19-25,1]
Oligodendroglomes (13 cas)	20,5 [1,3-374,9]	12,8 [2,7-266,9]	177,8 [32,7-6769,4]
Oligo-astrocytomes (5 cas)	7,3 [3,4-149,1]	5,2 [1,01-1396,8]	88,0 [31,7-2214,4]
Glioblastomes (17 cas)	5,4 [0,4-390,2]	6,2 [0,4-573,3]	74,1 [3,5-4445,2]

Tableau 19 : Taux d'ARNm des variants de l'EGFR (exprimés en URA) en fonction des types tumoraux.

Il n'y a pas de différence du niveau d'expression des variants 1, 3 et 4 entre les astrocytomes pilocytiques, les gangliogliomes et le tissu cérébral non tumoral. Il n'y a pas de différence significative entre les oligodendrogliomes, les oligo-astrocytomes et les glioblastomes.

Il y a une expression différentielle entre tumeurs non infiltrantes et tumeurs infiltrantes pour les variant 1, 3 et 4 ($p < 0,0001$ pour chaque variant). Le niveau d'expression du variant 4 est jusqu'à 4 fois plus important dans les tumeurs infiltrantes, par rapport aux tumeurs non infiltrantes, sans différence significative entre les oligodendrogliomes, oligo-astrocytomes et glioblastomes. 62% des astrocytomes pilocytiques et tous les gangliogliomes ont une expression de variant v4 inférieure au seuil, alors que 92 % des oligodendrogliomes, 60 % des oligo-astrocytomes et 59 % des glioblastomes ont une surexpression du variant 4.

Il n'y a pas d'association significative entre l'expression des variants, l'âge ou le sexe.

Le mutant EGFRvIII a été détecté dans 35 % des glioblastomes (tableau 20). La présence du mutant EGFRvIII est corrélée à la présence d'une amplification de l'*EGFR* ($p = 0,001$).

Type tumoral	Mutant EGFRvIII	
	présent	absent
Astrocytomes pilocytiques	0	13
Gangliogliomes	0	11
Oligodendrogliomes	0	13
Oligo-astrocytomes	0	5
Glioblastomes	6	11

$p = 0,002$

Tableau 20 : Recherche du mutant EGFRvIII par PCR qualitative.

V. 3. c) Analyse de l'expression protéique de l'EGFR

V. 3. c1) Expression de l'EGFR et types histologiques

L'anticorps anti-EGFR_{DEC} se fixe sur le domaine extra-cellulaire du récepteur, il peut donc marquer toutes les isoformes du récepteur. L'anticorps anti-EGFR_{DIC} reconnaît l'EGFR complet et le mutant EGFRvIII, seules isoformes possédant un domaine intra-cellulaire (figure 22).

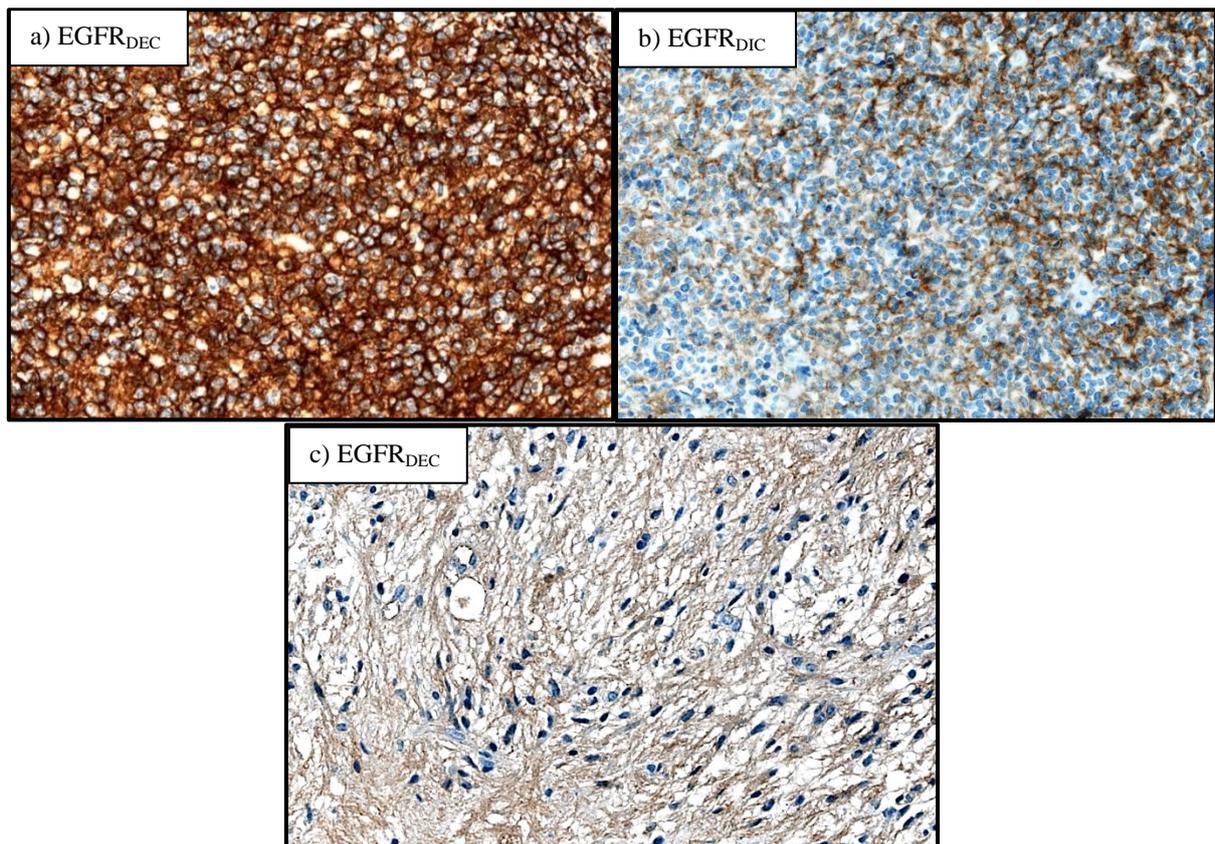


Figure 22 : Exemple d'expression d'EGFR a) forte expression d'EGFR_{DEC} dans un oligodendrogliome (x200), b) expression modérée et hétérogène d'EGFR_{DIC} dans un oligodendrogliome (x200), c) faible expression d'EGFR_{DEC} dans un astrocytome pilocytique (x200).

Le tableau 21 présente les résultats de l'expression de l'EGFR_{DEC} et EGFR_{DIC} en fonction du type tumoral. L'expression de l'EGFR_{DEC} est corrélée au diagnostic de gliome infiltrant, mais pas l'expression de l'EGFR_{DIC}. Lorsqu'une tumeur exprime EGFR_{DIC}, on observe une expression d'EGFR_{DEC}. L'inverse n'est pas vérifié. L'expression de l'EGFR_{DEC} est liée au grade tumoral ($p < 0,0001$).

Anticorps	Seuil	Astrocytomes pilocytiques	Gangliogliomes	Oligo-dendrogliomes	Oligo-astrocytomes	Glioblastomes	<i>p</i>
EGFR_{DEC}	< 200	13	8	5	2	3	<0,0001
	≥ 200	0	0	7	3	13	
EGFR_{DIC}	< 200	13	9	11	4	10	0,02
	≥ 200	0	0	1	1	6	

Tableau 21: Analyse immunohistochimique de l'expression de l'EGFR en fonction des types tumoraux (selon le score de Hirsch).

V. 3. c2) Expression de l'EGFR et contingents cellulaires tumoraux

L'analyse du profil d'expression d'EGFR dans les contingents cellulaires des tumeurs non infiltrantes et des oligodendrogliomes montre que seul le contingent oligodendrogliol exprime EGFR (tableau 22). Les autres contingents des tumeurs non infiltrantes ne l'expriment pas.

Anticorps	Seuil	Contingent					p
		piloïde	fibrillaire et « oligo-like »	« oligo-like »	oligodendrogial	neuronal	
EGFR_{DEC}	< 200	9	8	4	5	8	0,0003
	≥ 200	0	0	0	7	0	
EGFR_{DIC}	< 200	10	8	4	11	9	0,64
	≥ 200	0	0	0	1	0	

Tableau 22 : Analyse immunohistochimique de l'expression de l'EGFR en fonction des contingents cellulaires tumoraux (selon le score de Hirsch).

V. 3. c3) EGFR phosphorylé et doubles marquages

Onze glioblastomes (sur 17 cas) présentent une expression de P-EGFR, allant de 2 à 60 % de cellules tumorales marquées. Ce marquage est hétérogène, il a donc été testé sur coupe entière (et non sur spot de TMA) (figure 23). Aucune autre tumeur de la série n'a montré d'expression de P-EGFR.

L'expression de P-EGFR est associée à l'expression d'EGFR_{DIC} ($p = 0,036$), en effet 83% des GBM avec expression d'EGFR_{DIC} présentent une expression de P-EGFR. Mais l'expression de P-EGFR n'est pas corrélée à l'expression d'EGFR_{DEC} ($p = 0,08$), ni à la présence du mutant EGFR_{vIII} ($p = 0,73$), ni à une amplification de l'EGFR ($p = 0,17$).

Après comparaison de la topographie des zones exprimant P-EGFR et EGFR_{DIC}, les zones « P-EGFR positives » sont incluses dans les zones « EGFR_{DIC} positives », mais sans superposition vraie puisque l'expression de P-EGFR est plus hétérogène au sein d'une même tumeur que celle d'EGFR_{DIC}.

Les doubles marquages P-EGFR avec Olig2 ou p53 (figure 24) montrent que ce sont bien des cellules tumorales gliales qui expriment P-EGFR.

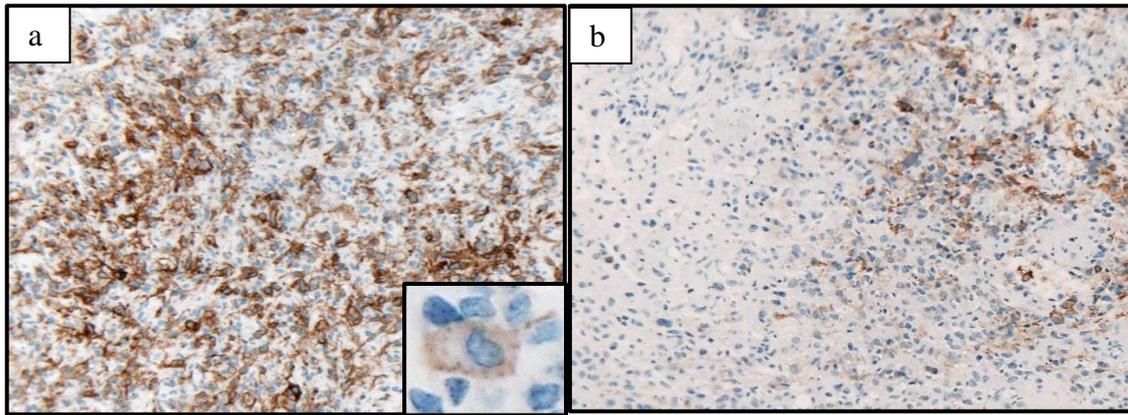


Figure 23 : Expression de P-EGFR dans un glioblastome, a) expression cytoplasmique, à renforcement membranaire, pouvant être intense et diffuse, ou b) très focale (x100).

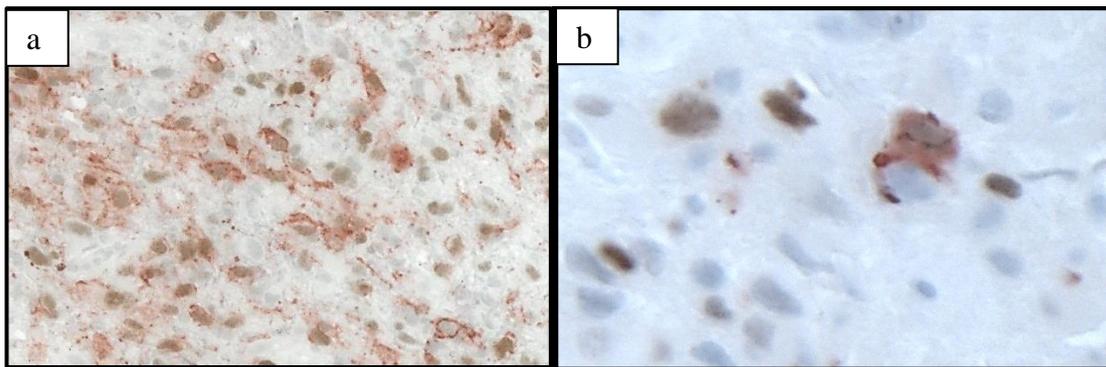


Figure 24 : double marquage en immunohistochimie avec un anticorps anti-P-EGFR (cytoplasmique à renforcement membranaire, rouge) et un anticorps nucléaire (rouge), anti-Olig2 (x200) en a) et anti-p53 (x400) en b).

V. 4. Analyse de survie

Les pourcentages de décès sont faibles : 0%, 8%, 18% et 20 % pour les patients atteints d'astrocytomes pilocytiques, de gangliogliomes, d'oligodendrogliomes et d'oligo-astrocytomes respectivement (annexes 2 et 3). Ils ne permettent pas de calculer la médiane de survie globale sauf pour les glioblastomes : 11 mois (76% décès). Le seul décès observé dans les cas de gangliogliome est lié à un carcinome mammaire métastatique.

La médiane de survie sans progression n'est pas atteinte pour les astrocytomes pilocytiques (une seule récurrence), est supérieure à 8 ans pour les gangliogliomes et les oligo-astrocytomes, 45 mois pour les oligodendrogliomes et 9 mois pour les glioblastomes (figure 26).

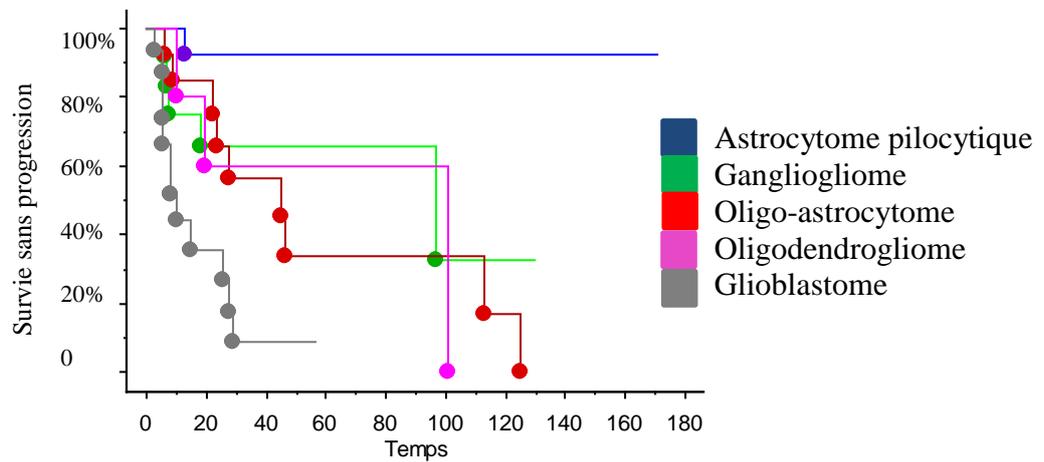


Figure 25: Probabilité de survie sans progression en mois en fonction des types tumoraux.

Il n'existe pas d'association significative de la survie avec l'âge, l'expression des variants de l'EGFR, l'expression protéique de l'EGFR, le P-EGFR, les mutations de *BRAF*, *IDH*, *PTEN*, *CDKN2A*, les autres caractéristiques immunohistochimiques, la localisation tumorale ou la prise de contraste en imagerie.

Dans les oligodendrogliomes, la présence de mutation *IDH* ($p = 0,0005$) et/ou de la perte complète 1p19q ($p = 0,0005$) sont corrélées à une meilleure survie sans récurrence.

V. DISCUSSION

V. 1. Profils des contingents cellulaires de gliomes non infiltrants et infiltrants : aide au diagnostic ?

Les gliomes sont des tumeurs dont le diagnostic histopathologique demeure problématique et dont la physiopathologie reste très largement méconnue. Un des objectifs de ce travail était de comparer des marqueurs moléculaires dans des contingents cellulaires de morphologie identique dans des tumeurs histologiquement différentes. Dans ce travail, l'analyse de marqueurs génomiques, génétiques, transcriptomiques et protéiques dans les différents contingents cellulaires a permis d'une part de caractériser les tumeurs et d'autre part de tester l'hypothèse d'une cellule souche progénitrice commune.

Dans notre série, l'étude des anomalies génétiques et génomiques n'a montré aucune perte partielle ou complète du bras 1p et/ou 19q dans les astrocytomes pilocytiques et les gangliogliomes quel que soit le contingent cellulaire considéré, tandis que la perte 1p/19q est un marqueur caractéristique des oligodendrogliomes. Ces résultats sont en accord avec la littérature (14,71).

Nous avons mis en évidence le gène de fusion *KIAA1549-BRAF* dans 27% des astrocytomes pilocytiques et 20% des gangliogliomes tandis qu'un seul gangliogliome présente la mutation *BRAF* V600E (10%). Lorsqu'une de ces altérations est présente, elle l'est dans tous les contingents cellulaires d'une même tumeur. Malheureusement, sur les 6 cas présentant une anomalie de *BRAF*, aucun n'a de contingent « oligo-like ». Aucun oligodendrogliome de la série ne présente d'altération de *BRAF*, alors que le gène de fusion peut être présent dans des oligodendrogliomes, des oligo-astrocytomes et de rares glioblastomes (72). Dans cette étude, les fréquences de ces altérations génétiques dans les astrocytomes pilocytiques et les gangliogliomes sont inférieures à celles rapportées dans la littérature (42,46). Plusieurs explications peuvent être avancées. Le nombre de cas de notre série est restreint, et nous avons utilisé des tissus inclus en paraffine pour lesquels la qualité de l'ADN est inférieure à celle des tissus cryopréservés. La question de la sensibilité de la technique MLPA pour la détection de la duplication des gènes *KIAA1549* et *BRAF* a été soulevée. En effet, cette technique ne permet pas de mettre en évidence le gène de fusion lui-même mais l'augmentation du nombre de copie des gènes intéressés par la duplication. Cette augmentation est difficile à interpréter en raison de l'absence de tissu non tumoral de référence pour chaque patient. De plus, il n'existe aucun référentiel d'interprétation pour cette technique.

Afin de vérifier les résultats obtenus par MLPA, nous avons testé, à la suite des travaux présentés précédemment, une technique de recherche du gène de fusion par RT-PCR puis séquençage après extraction d'ARN à partir des blocs de paraffine (73). L'amplification se produit seulement si les deux amorces du couple, l'une sur *BRAF* et l'autre sur *KIAA1549*, sont rapprochées par la fusion des gènes. C'est une analyse qualitative, dont la fiabilité n'est pas altérée par la possible dégradation de l'ADN des tissus inclus en paraffine, puisque quelques copies intactes du transcrite de fusion suffisent pour le mettre en évidence. Ainsi, la nature du gène de fusion peut être identifiée précisément à l'aide d'amorces se fixant sur les exons impliqués (exons 15, 16, 18, 19 de *KIAA1549* et exons 9, 10, 11 de *BRAF*). Par cette technique, nous avons mis en évidence le gène de fusion *KIAA1549-BRAF* dans deux cas d'astrocytome pilocytique (cas n°2 et 6), ayant été rendus négatifs en MLPA.

La mutation R132H d'*IDH1* est présente dans 92 % des oligodendrogliomes mais pas dans les deux autres types tumoraux. Les mutations d'*IDH1* sont fréquentes dans les gliomes infiltrants de grade II et III (74), associées à des mutations de *TP53* dans les astrocytomes diffus ou avec une perte 1p19q dans les oligodendrogliomes (75). Ces mutations sont impliquées dans la gliomagenèse précoce. Cependant les mutations d'*IDH1* habituellement rapportés se situent entre 50 et 70% des oligodendrogliomes (76,77), contre 92 % dans notre série. Dans notre travail, les oligodendrogliomes ont été diagnostiqués sur la présence d'un contingent typique à cellules claires. D'autre part, nous n'avons pas retrouvé ces caractéristiques moléculaires dans les autres types tumoraux. Ceci indique que le groupe des oligodendrogliomes tel que nous l'avons constitué est homogène sur les plans morphologique et moléculaire. Il est possible que dans d'autres travaux, un contingent astrocytaire réactionnel intra-tumoral ait pu être interprété comme tumoral à part entière, et orienter vers un oligo-astrocytome. Nos résultats confirment également qu'il est essentiel de déterminer les statuts *IDH1* et 1p19q en diagnostic de routine.

Le cas n°36 d'oligodendrogliome de grade II est discordant. Malgré une morphologie évocatrice, l'étude moléculaire ne montre pas de perte 1p19q, pas de mutation *IDH*, pas d'expression d'*IDH1*, d'*INA*, ni de *p53*. L'index *Ki67* faible est faible (3%), mais cette tumeur a récidivé précocément à 6 mois (survie globale non disponible car patient perdu de vue). Le problème de la représentativité des prélèvements peut être écarté, l'exérèse tumorale ayant été sub-totale. En revanche, le niveau expression des transcrits *EGFR* est surprenant, avec des valeurs très élevées, correspondant plutôt à des valeurs observées dans les glioblastomes (variant 1 à 14 URA, variant 3 à 7 URA et variant 4 à 14 URA) et concordant avec la mauvaise survie sans progression. Il n'y avait pas d'amplification d'*EGFR* ni de mutant *EGFRvIII*, pas de délétion *PTEN* ou *CDKN2A*, pas de surexpression de l'*EGFR* ni d'expression de P-*EGFR*. Ce cas pourrait donc faire partie des

cas triples négatifs : *IDH*⁻/*p53*⁻/*perte1p19q*⁻, liés à une gliomagenèse *IDH*-indépendante et de pronostic plus péjoratif.

Les délétions de *PTEN* et *CDKN2A* peuvent être rencontrées dans tous les types tumoraux de notre série, et dans tous les contingents cellulaires d'une même tumeur. La délétion homozygote de *CDKN2A* n'a été observée que dans les glioblastomes et dans un oligo-astrocytome (cas n°44), toujours associée à une délétion de *PTEN* et une amplification de l'*EGFR*. On peut noter que le cas d'oligo-astrocytome présente des caractéristiques moléculaires et une durée de survie globale (22 mois) qui correspondent à celles d'un glioblastome, bien que l'aspect morphologique soit différent. Selon Verhaak (65), les glioblastomes *de novo* pourraient être classés en 4 sous-types en fonction des altérations génétiques : les glioblastomes classiques avec amplification de l'*EGFR*, les groupes proneural et neural : souvent *IDH1*⁺/*p53*⁺/amplification *PDGFRα*⁺, et les glioblastomes mésenchymateux avec altérations *NF1* et délétions de *PTEN* et *CDKN2A*. Les résultats de notre étude ne confirment pas cette classification, puisque tous les glioblastomes de la série avec délétion homozygote de *CDKN2A*, présentent une amplification de l'*EGFR* (l'inverse n'étant pas vérifié). L'amplification de l'*EGFR* serait donc bien un évènement précoce dans la tumorigenèse des glioblastomes, sélectionnant des clones tumoraux. Chacun de ces clones pouvant ensuite accumuler d'autres anomalies moléculaires et constituer des populations clonales, rendant difficile un génotypage caractéristique.

Nos résultats génétiques et génomiques renforcent l'hypothèse qu'une même cellule souche tumorale serait à l'origine des différents contingents d'une même tumeur, mais que des mécanismes oncogénétiques distincts seraient à l'origine des gliomes non infiltrants et infiltrants. En effet, les cellules tumorales du contingent « oligo-like » des astrocytomes pilocytiques et des gangliogliomes et celles du contingent oligodendroglial ont une morphologie similaire mais possèdent pourtant des génotypes radicalement différents. Il n'y a donc pas de correspondance entre le morphotype et le génotype.

Les données obtenues en immunohistochimie confortent également cette hypothèse.

L'expression d'*IDH1* est liée à la présence d'un contingent oligodendroglial dans un gliome infiltrant ($p < 0,0001$), mais pas à celle du contingent « oligo-like » dans les tumeurs non infiltrantes. En effet tous les autres contingents, y compris ce dernier, sont négatifs.

L'INA est une protéine des filaments intermédiaires neuronaux dont la surexpression dans les oligodendrogliomes est fortement liée à la perte 1p19q (78,79). Dans notre série, les contingents gliaux non-oligodendrogliaux ont une expression faible d'INA, alors que 25% des contingents

neuronaux et 50% des contingents oligodendrogliaux ont une expression forte ($\geq 10\%$). Le marquage par l'anticorps anti-INA est significativement lié ($p = 0,02$) à la présence d'un contingent oligodendroglial.

Les mutations de *TP53* conduisent à la formation d'une protéine p53 anormale qui s'accumule dans le noyau et devient détectable en immunohistochimie. Ces mutations sont typiquement observées dans les astrocytomes de grade II et III et les glioblastomes. La mutation d'*IDH1* apparaît précocement, avant celle de *TP53* (80). Les mutations de *TP53* et la perte 1p19q sont mutuellement exclusives. Pourtant dans notre série, 36% des oligodendrogliomes ont une expression nucléaire de p53 en immunohistochimie contre 20% des astrocytomes pilocytiques et 50% des gangliogliomes. Il pourrait donc s'agir d'une accumulation nucléaire de p53 non mutée pouvant être liée à un défaut de dégradation, par exemple un excès de régulation négative de p14^{ARF} sur MDM2, puisque MDM2 a pour rôle de faciliter la dégradation de p53 par ubiquitinylation (81). Une mutation activatrice ou une surexpression de p14^{ARF}, voire une mutation inactivatrice de MDM2 pourrait conduire à l'accumulation nucléaire de p53 et à sa détection en immunohistochimie, sans pour autant de mutation de *TP53*. Cette hypothèse nécessite d'être vérifiée puisqu'une étude sur des carcinomes de localisations diverses ont indiqué que la concordance entre la détection de p53 en immunohistochimie et la présence d'une mutation de *TP53* était de 70% seulement (82), alors qu'une autre étude a rapporté une concordance de 89% dans une série de 149 tumeurs gliales de grade II (83).

Les modifications de l'expression de l'*EGFR* sont fréquentes dans les gliomes de haut grade (33,84). En revanche, l'absence d'amplification de l'*EGFR* et du mutant EGFRvIII dans les tumeurs non infiltrantes de notre série est en accord avec les données de la littérature (16).

Le marqueur de prolifération Ki67 est utilisé en routine pour le diagnostic de nombreuses tumeurs. Dans notre série de gliomes, nous avons mis en évidence une association directe entre l'index de Ki67 et le grade. Ces résultats sont concordants avec ce qui est communément admis, à savoir que Ki67 est un marqueur de prolifération et qu'il est donc logique que son expression soit reliée au grade tumoral, lui-même en partie déterminé en fonction de l'index mitotique.

CD34 est une protéine exprimée par des précurseurs neuronaux ou par des cellules souches pluripotentes dans les gangliogliomes. Pour certains auteurs, les cellules CD34+ seraient des cellules progénitrices glioneurales (85). Nous avons observé un marquage dans le contingent neuronal de 88% des gangliogliomes, sans marquage des autres contingents cellulaires quel que soit

le type histologique de la tumeur. Le marquage par l'anticorps anti-CD34 est associée ($p < 0,0001$) au contingent neuronal des gangliogliomes.

Olig2 est un facteur de transcription nucléaire exprimé par les cellules progénitrices lors de la différenciation oligodendrogliale. Pourtant, nous n'avons pas pu mettre en évidence de relation statistiquement significative entre le marquage anti-Olig2 et le type tumoral ou un contingent cellulaire, puisqu'Olig2 est détecté dans les tumeurs oligodendrogiales mais également dans des tumeurs astrocytaires. En effet Olig2 contrôle la capacité de réplication dans les cellules souches neurales et dans les gliomes malins (86), donc il n'est pas un marqueur spécifique de différenciation oligodendrogliale en condition tumorale, mais peut être considéré comme un marqueur de prolifération de nature gliale.

La nestine est une protéine des filaments intermédiaires exprimée dans les cellules souches et progénitrices. Un marquage fort (score de Hirsch ≥ 200) est observé dans 30 % des gangliogliomes (contingent neuronal) et aucun astrocytome pilocytique ni aucun oligodendroglione. La nestine n'est pas associée à un type tumoral ni à un contingent cellulaire tumoral ($p = 0,05$).

Les neurotrophines interviennent dans la croissance, la différenciation, la survie et l'apoptose des cellules nerveuses en se liant à des récepteurs TK (TrkA, TrkB) et au corécepteur p75^{NTR}. Ces récepteurs sont souvent présents sur la même cellule pour moduler la réponse aux neurotrophines qui utilise la voie de PI3K-Akt ou celle de Ras-Raf-MAPK (87). Des interactions entre les récepteurs des neurotrophines et ceux de l'EGF ont été mises en évidence mais différent selon les types cellulaires étudiés (61–63). Dans notre série, les cellules gliales tumorales et non tumorales présentent une expression diffuse des neurotrophines et de leurs récepteurs. Les contingents oligodendroglial, « oligo-like » et astrocytaire, sont difficilement identifiables, du fait d'un important bruit de fond, de la difficulté à analyser le type de cellules marquées et de la présence d'un marquage d'intensité identique sur tissu cérébral sain. Plusieurs raisons peuvent être avancées pour expliquer ces résultats. Les dilutions d'anticorps utilisées sur le tissu mammaire test peuvent ne pas correspondre aux dilutions à utiliser sur tissu cérébral, en effet le fixateur utilisé est différent, formol dilué à 10% pour le tissu mammaire et formol-zinc pour le tissu cérébral. En raison d'une expression physiologique des neurotrophines dans le tissu cérébral non tumoral il se peut que l'immunohistochimie ne soit pas une méthode assez discriminante pour identifier d'éventuelles variations d'expression.

Dans les contingents neuronaux, les neurones dystrophiques expriment de manière plus intense le NGF, TrkA et TrkB en intracytoplasmique alors que BDNF est surexprimé par les noyaux des neurones et de petites cellules rondes (« oligo-like »). Les récepteurs semblent être séquestrés dans le cytoplasme, ce phénomène ayant été rapporté dans des neurones du système nerveux central (88). Dans le tissu non tumoral, BDNF est transporté, après sa synthèse, de manière antérograde vers les terminaisons nerveuses. Il jouerait un rôle dans la plasticité synaptique (89). L'accumulation de BDNF dans le noyau des neurones dystrophiques n'a jamais été rapportée, mais la surexpression de BDNF dans les gliomes a été impliquée dans la tumorigenèse de ces tumeurs (60). La réalisation de RT-PCR ou de Western-blot permettrait d'étudier les niveaux d'expression dans les tissus tumoraux et non tumoraux des neurotrophines et de leurs récepteurs.

Dans notre série l'analyse des données concernant la survie est conforme à la littérature. Les tumeurs non infiltrantes (astrocytomes pilocytiques et gangliogliomes) bénéficient d'un meilleur pronostic que les gliomes infiltrants. Parmi ces derniers, les oligodendrogliomes ont une évolution moins défavorable que les oligo-astrocytomes et les glioblastomes. Dans les oligodendrogliomes, la présence d'une mutation *IDH* ($p = 0,0005$) est corrélée à une meilleure survie sans récurrence, ce qui concorde avec les données connues.

V. 2. Expression de l'EGFR : implication dans les mécanismes d'invasion tumorale ?

Les cellules tumorales infiltrantes sont un problème majeur pour l'efficacité thérapeutique, puisqu'elles constituent le reliquat tumoral post-chirurgical. Les facteurs intervenant dans l'angiogenèse sont assez bien connus, mais ceux participant à l'infiltration tumorale le sont moins. Il a été montré qu'après implantation de cellules de glioblastomes humains dans le système nerveux central de rats immunodéficients, les tumeurs se développaient sur un mode invasif durant de longues périodes, sans angiogenèse prédominante. Il existerait donc bien des voies de signalisation différentes de celle de l'angiogenèse, impliquées dans l'invasion tumorale (90).

L'EGFR est impliqué dans l'invasion tumorale. Une étude a montré qu'il existait une corrélation entre la réponse au géfitinib (traitement anti-TK de l'EGFR) et le statut moléculaire de cultures de cellules de glioblastomes humains. Dans les tumeurs non traitées, l'amplification de l'*EGFR* était associée à une invasion tumorale profuse, cette invasion étant réduite de manière dose-dépendante après traitement, mais sans véritable effet anti-prolifératif ni anti-angiogénique. Les tumeurs avec perte de *PTEN* étaient résistantes au traitement (91).

Une autre équipe a montré que l'invasion tumorale était fortement associée à la présence d'une amplification de l'*EGFR* et à l'activation d'EGFR par phosphorylation sur la tyrosine 1173 dans les glioblastomes (90). Dans notre série, 41% des glioblastomes présentent une amplification de l'*EGFR*, et 65 % une expression de P-EGFR. Il est donc possible que ces mécanismes soient impliqués dans le processus d'invasion tumorale, mais pour une partie seulement de ces tumeurs.

Les transcrits de l'*EGFR*, en particulier le variant 4, sont surexprimés dans les gliomes infiltrants comparativement aux tumeurs non infiltrantes, dans lesquelles les taux sont comparables à ceux observés dans le tissu cérébral non tumoral (92). Ces résultats suggèrent que la surexpression des variants de l'*EGFR* pourrait être impliquée de manière assez précoce dans l'oncogenèse des gliomes diffus (dès le grade II pour les oligodendrogliomes) et ce notamment via le variant 4. Ceci est concordant avec la présence d'une expression des variants de l'*EGFR* à des niveaux élevés dans les glioblastomes (92).

La surexpression de l'EGFR dans de nombreuses tumeurs est associée avec le grade. Dans notre série, une association existe entre l'expression d'EGFR_{DEC} et le grade tumoral ($p < 0,0001$). L'anticorps EGFR_{DIC} est dirigé contre l'isoforme 1 (complète) de l'EGFR et contre le mutant vIII. L'absence de marquage dans les astrocytomes pilocytiques et les gangliogliomes et le faible marquage dans les oligodendrogliomes concordent avec l'absence de détection de mutant vIII et le faible niveau d'expression du variant vI dans les astrocytomes pilocytiques et les gangliogliomes. Sur 4 échantillons de tissu cérébral non tumoral testés en TMA, aucune expression d'EGFR_{DIC} n'a été retrouvée et 3 échantillons ont une faible expression d'EGFR_{DEC}. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus dans les gliomes non infiltrants et concordent avec l'étude des variants ARNm. Ils indiquent donc que la voie de l'EGFR serait peu ou pas impliquée dans l'oncogenèse des tumeurs glioneuronales et des gliomes non infiltrants.

Les résultats que nous avons obtenus concernant l'expression du P-EGFR posent la question de l'activation de la voie de l'EGFR dans les gliomes. Il est admis que la phosphorylation du domaine TK est une étape nécessaire à l'activation de la voie de l'EGFR. Nous avons mis en évidence une expression de P-EGFR dans 65% des glioblastomes de notre série. De plus, le marquage ne concerne que des sous-populations de cellules tumorales, mais jamais la tumeur dans son ensemble. Cependant, l'expression de P-EGFR est liée à celle d'EGFR_{DIC}, ce qui est logique puisque seules les isoformes avec un domaine intra-cellulaire (a et mutant vIII) possèdent un domaine TK. Nous avons utilisé un anticorps anti-P-EGFR ne détectant que la phosphorylation de la tyrosine en position 1068, qui fait partie des sites de phosphorylation principaux retrouvés dans les gliomes (93). D'autres sites de phosphorylation (tyrosines 1045 ou 1086) pourraient être étudiés.

Une autre explication peut être proposée, celle de l'hétérogénéité tumorale. Reconnue d'abord sur le plan morphologique, elle est maintenant admise sur le plan moléculaire. Les tumeurs solides sont formées de sous-populations cellulaires présentant à la fois des anomalies génomiques communes et des altérations spécifiques à différents contingents. Une telle structure peut être le résultat d'un processus évolutif clonal dans lequel la pression de sélection avantage continuellement la croissance des clones les mieux adaptés.

L'équipe de Halle a montré, dans les cancers du col utérin traités par chimiothérapie, que la présence d'une expression membranaire des isoformes tronquées seules était de mauvais pronostic (94). Le pronostic serait indépendant de la présence d'une expression de l'EGFR forme entière, et de l'autophosphorylation du récepteur. La capacité tumorigène de l'EGFR serait donc liée pour une part à l'activation TK, mais aussi à une voie indépendante de la phosphorylation du récepteur qui ferait intervenir les isoformes tronquées.

Le rôle des isoformes de l'EGFR n'est pas bien connu. Elles pourraient avoir une fonction inhibitrice en se dimérisant avec un récepteur complet, l'absence de DIC empêchant la phosphorylation activatrice et bloquant alors la transduction du signal en aval. Un rôle activateur est aussi possible. En effet, il a été montré que la fixation de l'EGF favorise la formation d'exosomes contenant le couple EGF/récepteur. Certains couples seraient recyclés à la membrane, alors que d'autres subirait un clivage protéolytique du DEC. Les isoformes tronquées contenues dans ces exosomes seraient ensuite relarguées dans le milieu extérieur. Des travaux ont montré que ces isoformes ont encore la capacité de lier l'EGF (24). Cette isoforme protéolytique PI-sEGFR est relarguée par certaines lignées cellulaires, notamment d'adénocarcinomes du sein, lorsque la quantité d'EGFR transmembranaire est supérieure à $7 \cdot 10^5$ EGFR/cellule. Cette isoforme protéolytique serait associée au phénotype malin, et pourrait être responsable d'une activation de l'EGFR indépendante du ligand (25).

VI. CONCLUSION

L'étude immuno-moléculaire des différents contingents cellulaires tumoraux de gliomes non infiltrants (astrocytomes pilocytiques) et de tumeurs glioneuronales de bas grade (gangliogliomes) en comparaison avec des oligodendrogliomes, indique que des contingents morphologiquement identiques ont un profil moléculaire différent. L'oncogenèse des gliomes non infiltrants (astrocytomes pilocytiques) et des tumeurs glioneuronales de bas grade (gangliogliomes) est bien différente de celle des gliomes infiltrants (oligodendrogliomes). Les gliomes infiltrants et non infiltrants ne dériveraient donc pas de la même cellule souche tumorale.

Nous n'avons pas mis en évidence de facteurs pronostiques parmi les marqueurs moléculaires étudiés, en dehors de ceux connus (IDH, perte 1p19q). La MLPA est une technique permettant de mettre en évidence une perte 1p19q, ou une amplification de l'*EGFR*, mais sa sensibilité est insuffisante pour rechercher le gène de fusion *KIAA1549/BRAF*.

L'étude immunohistochimique est utile pour le diagnostic différentiel entre astrocytome pilocytique et oligodendrogliome en utilisant les anticorps anti-INA, anti-IDH1 et anti-EGFR_{DEC}, et pour le diagnostic positif des gangliogliomes (contingent neuronal) une expression du CD34 et une forte expression de la nestine (80% des cas).

La voie de l'EGFR est donc bien impliquée dans la tumorigenèse des gliomes infiltrants, notamment dans le processus d'invasion tumorale, plus que dans celui de la néo-angiogenèse. Mais cette voie ne semble activée que pour une partie des glioblastomes, même si la présence d'isoformes tronquées de l'EGFR semble jouer un rôle plus important que le statut de phosphorylation du récepteur.

Nos résultats incitent à poursuivre ce travail en réunissant plus de cas, en explorant par d'autres méthodes la voie des neurotrophines (notamment pour le contingent neuronal), en étudiant la voie de PI3K-AKT (activée par la voie des neurotrophines), en utilisant des cultures de cellules de glioblastomes pour préciser le rôle des isoformes solubles et pour tester les effets en présence de différents ligands de l'EGFR.

BIBLIOGRAPHIE

1. Institut de Veille Sanitaire. Projections de l'incidence et de la mortalité par cancer en France en 2009. 2009.
2. HAS. Guide ALD n°30. Cancer primitif du système nerveux central de l'adulte. 2010.
3. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler O., Cavenee W. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System, Fourth Edition. 2007.
4. Site internet de l'Institut National du Cancer.
<http://www.e-cancer.fr/prevention/environnement-et-cancers/ondes-electromagnetiques>,
<http://www.e-cancer.fr/prevention/environnement-et-cancers/pesticides>.
5. Burger PC, Scheithauer B. Tumors of the Central Nervous System. Afip Atlas of Tumor Pathology. Afip Atlas of Tumor Pathology; 2007.
6. Site internet 123RF. Les régions du cerveau de l'homme.
http://fr.123rf.com/photo_13699569_les-regions-du-cerveau-de-l-homme.
7. Daumas-Duport C, Beuvon F, Varlet P, Fallet-Bianco C. Gliomes : classifications OMS et Sainte-Anne. *Ann Pathol.* Oct 2000;20(5):413-428.
8. Site internet du Collège des Enseignants de neurologie. <http://www.cen-neurologie.fr/2eme-cycle>.
9. Figarella-Branger D, Labrousse F, Mohktari K. Référentiel gliomes diffus de l'adulte de grade OMS II, III et IV : anatomie pathologique et biologie. *Ann Pathol.* Oct 2012;(32):318-327.
10. 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;33(4):431-439.
11. Varlet P, Soni D, Miquel C, Roux F-X, Meder J-F, Chneiweiss H, et al. New variants of malignant glioneuronal tumors: a clinicopathological study of 40 cases. *Neurosurgery.* Déc 2004;55(6):1377-1391: discussion 1391-1392.
12. Lièvre A, Laurent-Puig P. La voie de signalisation Ras/MAPK. *Cancéro dig.* 2010;2(1):38-42.
13. Hoang-Xuan K. Vers une classification moléculaire des gliomes. *Bull Cancer.* Avr 2005;92(4).
14. Durand KS, Guillaudeau A, Weinbreck N, DeArmas R, Robert S, Chaunavel A, et al. 1p19q LOH patterns and expression of p53 and Olig2 in gliomas: relation with histological types and prognosis. *Mod. Pathol.* 2010;23(4):619-628.
15. Idbaih A, Marie Y, Pierron G, Brennetot C, Hoang-Xuan K, Kujas M, et al. Two types of chromosome 1p losses with opposite significance in gliomas. *Ann. Neurol.* Sept 2005;58(3):483-487.
16. Bouvier C, Fernandez C, Meyronet D, Figarella-Branger D. Examens cytologique, histologique, immunohistochimique et génétique des tumeurs du système nerveux central. *EMC-Neurologie.* 2005;2:557-585.
17. Ichimura K, Vogazianou AP, Liu L, Pearson DM, Bäcklund LM, Plant K, et al. 1p36 is a preferential target of chromosome 1 deletions in astrocytic tumours and homozygously deleted in a subset of glioblastomas. *Oncogene.* 2008;27(14):2097-2108.
18. Schmidt MC, Antweiler S, Urban N, Mueller W, Kuklik A, Meyer-Puttlitz B, et al. Impact of genotype and morphology on the prognosis of glioblastoma. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2002;61(4):321-328.
19. Horbinski C, Hamilton RL, Nikiforov Y, Pollack IF. Association of molecular alterations, including BRAF, with biology and outcome in pilocytic astrocytomas. *Acta Neuropathol.* 2010;119(5):641-649.
20. Takeuchi H, Kubota T, Kitai R, Matsuda K, Hashimoto N, Sato K. Chromosome 1p and 19q deletions in malignant glioneuronal tumors with oligodendroglioma-like component. *J. Neurooncol.*

2009;91(1):33-38.

21. Hoischen A, Ehrler M, Fassunke J, Simon M, Baudis M, Landwehr C, et al. Comprehensive characterization of genomic aberrations in gangliogliomas by CGH, array-based CGH and interphase FISH. *Brain Pathol.* 2008;18(3):326-337.
22. Ducray F, Crinière E, Idhahbi A, Mokhtari K, Marie Y, Paris S, et al. alpha-Internexin expression identifies 1p19q codeleted gliomas. *Neurology.* 2009;72(2):156-161.
23. 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;71(1):1-20.
24. Sanderson MP, Keller S, Alonso A, Riedle S, Dempsey PJ, Altevogt P. Generation of novel, secreted epidermal growth factor receptor (EGFR/ErbB1) isoforms via metalloprotease-dependent ectodomain shedding and exosome secretion. *J. Cell. Biochem.* 2008;103(6):1783-1797.
25. Perez-Torres M, Valle BL, Maihle NJ, Negron-Vega L, Nieves-Alicea R, Cora EM. Shedding of epidermal growth factor receptor is a regulated process that occurs with overexpression in malignant cells. *Exp. Cell Res.* 2008;314(16):2907-2918.
26. Guillaudeau A, Durand K, Bessette B, Chaunavel A, Pommepuy I, Progetti F, et al. EGFR soluble isoforms and their transcripts are expressed in meningiomas. *PLoS ONE.* 2012;7(5):e37204.
27. Sharif A, Legendre P, Prévot V, Allet C, Romao L, Studler J-M, et al. Transforming growth factor alpha promotes sequential conversion of mature astrocytes into neural progenitors and stem cells. *Oncogene.* 2007;26(19):2695-2706.
28. Huang J, Hu J, Bian X, Chen K, Gong W, Dunlop NM, et al. Transactivation of the epidermal growth factor receptor by formylpeptide receptor exacerbates the malignant behavior of human glioblastoma cells. *Cancer Res.* 2007;67(12):5906-5913.
29. Thuringer D, Hammann A, Benikhlef N, Fourmaux E, Bouchot A, Wettstein G, et al. Transactivation of the epidermal growth factor receptor by heat shock protein 90 via Toll-like receptor 4 contributes to the migration of glioblastoma cells. *J. Biol. Chem.* 2011;286(5):3418-3428.
30. 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;9(2):671-677.
31. Heaney ML, Golde DW. Soluble receptors in human disease. *J. Leukoc. Biol.* 1998;64(2):135-146.
32. 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;24(20):4050-4056.
33. Guillaudeau A, Durand K, Pommepuy I, Robert S, Chaunavel A, Lacorre S, et al. Determination of EGFR status in gliomas: usefulness of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 2009;17(3):220-226.
34. 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;41(6):815-823.
35. Huse JT, Holland EC. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nat. Rev. Cancer.* 2010;10(5):319-331.
36. Pandita A, Balasubramaniam A, Perrin R, Shannon P, Guha A. Malignant and benign ganglioglioma: a pathological and molecular study. *Neuro-oncology.* 2007;9(2):124-134.
37. Dougherty MJ, Santi M, Brose MS, Ma C, Resnick AC, Sievert AJ, et al. Activating mutations in BRAF characterize a spectrum of pediatric low-grade gliomas. *Neuro Oncol.* 2010;12(7):621-630.
38. Figarella-Branger D. Marqueurs moléculaires des gliomes de l'adulte: vers une classification histo-moléculaire. *Déc* 2011;(54):5-11.

39. 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;76(4):602-603.
40. Nakamura K, Martin KC, Jackson JK, Beppu K, Woo C-W, Thiele CJ. Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB induces vascular endothelial growth factor expression via hypoxia-inducible factor-1alpha in neuroblastoma cells. *Cancer Res*. 2006;66(8):4249-4255.
41. Guo C, Pirozzi CJ, Lopez GY, Yan H. Isocitrate dehydrogenase mutations in gliomas: mechanisms, biomarkers and therapeutic target. *Curr. Opin. Neurol*. 2011;24(6):648-652.
42. Von Deimling A, Korshunov A, Hartmann C. The next generation of glioma biomarkers: MGMT methylation, BRAF fusions and IDH1 mutations. *Brain Pathol*. 2011;21(1):74-87.
43. Horbinski C, Kofler J, Yeane G, Camelo-Piragua S, Venneti S, Louis DN, et al. Isocitrate dehydrogenase 1 analysis differentiates gangliogliomas from infiltrative gliomas. *Brain Pathol*. 2011;21(5):564-574.
44. Mukasa A, Takayanagi S, Saito K, Shibahara J, Tabei Y, Furuya K, et al. The Significance of IDH Mutations Varies with Tumor Histology, Grade, and Genetics in Japanese Glioma Patients. *Cancer Sci*. 2011.
45. Yu J, Deshmukh H, Gutmann RJ, Emmett RJ, Rodriguez FJ, Watson MA, et al. Alterations of BRAF and HIPK2 loci predominate in sporadic pilocytic astrocytoma. *Neurology*. 2009;73(19):1526-1531.
46. Schindler G, Capper D, Meyer J, Janzarik W, Omran H, Herold-Mende C, et al. Analysis of BRAF V600E mutation in 1,320 nervous system tumors reveals high mutation frequencies in pleomorphic xanthoastrocytoma, ganglioglioma and extra-cerebellar pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol*. 2011;121(3):397-405.
47. Jones DTW, Kocialkowski S, Liu L, Pearson DM, Bäcklund LM, Ichimura K, et al. Tandem duplication producing a novel oncogenic BRAF fusion gene defines the majority of pilocytic astrocytomas. *Cancer Res*. 2008;68(21):8673-8677.
48. Lin A, Rodriguez FJ, Karajannis MA, Williams SC, Legault G, Zagzag D, et al. BRAF Alterations in Primary Glial and Glioneuronal Neoplasms of the Central Nervous System With Identification of 2 Novel KIAA1549: BRAF Fusion Variants. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*. 2012;71(1):66-72.
49. Forsheo T, Tatevossian RG, Lawson ARJ, Ma J, Neale G, Ogunkolade BW, et al. Activation of the ERK/MAPK pathway: a signature genetic defect in posterior fossa pilocytic astrocytomas. *J. Pathol*. 2009;218(2):172-181.
50. Gronych J, Korshunov A, Bageritz J, Milde T, Jugold M, Hambardzumyan D, et al. An activated mutant BRAF kinase domain is sufficient to induce pilocytic astrocytoma in mice. *J. Clin. Invest*. 2011;121(4):1344-1348.
51. Jones DTW, Gronych J, Lichter P, Witt O, Pfister SM. MAPK pathway activation in pilocytic astrocytoma. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS [Internet]*. 13 déc 2011 [cité 9 janv 2012]; Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22159586>
52. Li L, Dutra A, Pak E, Labrie JE 3rd, Gerstein RM, Pandolfi PP, et al. EGFRvIII expression and PTEN loss synergistically induce chromosomal instability and glial tumors. *Neuro-oncology*. 2009;11(1):9-21.
53. Smith JS, Jenkins RB. Genetic alterations in adult diffuse glioma: occurrence, significance, and prognostic implications. *Front. Biosci*. 2000;5:D213-231.
54. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC-H, Leary RJ, Angenendt P, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*. 2008;321(5897):1807-1812.
55. Rao RD, James CD. Altered molecular pathways in gliomas: an overview of clinically relevant issues. *Semin. Oncol*. 2004;31(5):595-604.
56. Rasheed BK, Wiltshire RN, Bigner SH, Bigner DD. Molecular pathogenesis of malignant gliomas. *Curr Opin Oncol*. 1999;11(3):162-167.
57. Jeon YK, Park K, Park CK, Paek SH, Jung HW, Park S-H. Chromosome 1p and 19q status

- and p53 and p16 expression patterns as prognostic indicators of oligodendroglial tumors: a clinicopathological study using fluorescence in situ hybridization. *Neuropathology*. 2007;27(1):10-20.
58. Schiffman JD, Hodgson JG, VandenBerg SR, Flaherty P, Polley M-YC, Yu M, et al. Oncogenic BRAF mutation with CDKN2A inactivation is characteristic of a subset of pediatric malignant astrocytomas. *Cancer Res*. 2010;70(2):512-519.
59. 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;56(1):150-153.
60. Yan Q, Yu H, Li J. [Study on the expression of BDNF in human gliomas]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2009;40(3):415-417.
61. Qiu L, Zhou C, Sun Y, Di W, Scheffler E, Healey S, et al. Crosstalk between EGFR and TrkB enhances ovarian cancer cell migration and proliferation. *Int. J. Oncol*. 2006;29(4):1003-1011.
62. Liu XW, Katagiri Y, Jiang H, Gong LJ, Guo LY, Shibutani M, et al. Cloning and characterization of the promoter region of the rat epidermal growth factor receptor gene and its transcriptional regulation by nerve growth factor in PC12 cells. *J. Biol. Chem*. 2000;275(10):7280-7288.
63. El Zein N, D'Hondt S, Sariban E. Crosstalks between the receptors tyrosine kinase EGFR and TrkA and the GPCR, FPR, in human monocytes are essential for receptors-mediated cell activation. *Cell. Signal*. 2010;22(10):1437-1447.
64. Ohgaki H. Section Pathologie Moléculaire, WHO, <http://www.iarc.fr/fr/publications>. 2011.
65. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 2010;17(1):98-110.
66. Hoang-Xuan K, Idbaih A. Progrès récents dans la génomique et dans le traitement médical des gliomes cérébraux. *Bull. Acad. Natle Méd*. 2011;195(1):11-21.
67. Jeuken JWM, Sijben A, Bleeker FE, Boots-Sprenger SHE, Rijntjes J, Gijtenbeek JMM, et al. The nature and timing of specific copy number changes in the course of molecular progression in diffuse gliomas: further elucidation of their genetic « life story ». *Brain Pathol*. 2011;21(3):308-320.
68. Van Dijk MC, Rombout PD, Boots-Sprenger SH, Straatman H, Bernsen MR, Ruiter DJ, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification for the detection of chromosomal gains and losses in formalin-fixed tissue. *Diagn. Mol. Pathol*. 2005;14(1):9-16.
69. Tse C, Capeau J. [Real time PCR methodology for quantification of nucleic acids]. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*. 2003;61(3):279-293.
70. 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;21(20):3798-3807.
71. Perry A, Burton SS, Fuller GN, Robinson CA, Palmer CA, Resch L, et al. Oligodendroglial neoplasms with ganglioglioma-like maturation: a diagnostic pitfall. *Acta Neuropathol*. 2010;120(2):237-252.
72. Badiali M, Gleize V, Paris S, Moi L, Elhouadani S, Arcella A, et al. KIAA1549-BRAF fusions and IDH mutations can coexist in diffuse gliomas of adults. *Brain Pathol*. 2012;22(6):841-847.
73. Kim Y-H, Nonoguchi N, Paulus W, Brokinkel B, Keyvani K, Sure U, et al. Frequent BRAF gain in low-grade diffuse gliomas with 1p/19q loss. *Brain Pathol*. 2012;22(6):834-840.
74. Jeuken J, Cornelissen S, Boots-Sprenger S, Gijzen S, Wesseling P. Multiplex ligation-dependent probe amplification: a diagnostic tool for simultaneous identification of different genetic markers in glial tumors. *J Mol Diagn*. 2006;8(4):433-443.
75. Birner P, Toumangelova-Uzeir K, Natchev S, Guentchev M. Expression of mutated

- isocitrate dehydrogenase-1 in gliomas is associated with p53 and EGFR expression. *Folia Neuropathol.* 2011;49(2):88-93.
76. Mellai M, Piazzini A, Caldera V, Monzeglio O, Cassoni P, Valente G, et al. IDH1 and IDH2 mutations, immunohistochemistry and associations in a series of brain tumors. *J. Neurooncol.* 2011;105(2):345-357.
77. Mukasa A, Takayanagi S, Saito K, Shibahara J, Tabei Y, Furuya K, et al. Significance of IDH mutations varies with tumor histology, grade, and genetics in Japanese glioma patients. *Cancer Sci.* 2012;103(3):587-592.
78. Ducray F, Mokhtari K, Crinière E, Idbaih A, Marie Y, Dehais C, et al. Diagnostic and prognostic value of alpha internexin expression in a series of 409 gliomas. *Eur. J. Cancer.* 2011;47(5):802-808.
79. Durand K, Guillaudeau A, Pommepuy I, Mesturoux L, Chaunavel A, Gadeaud E, et al. Alpha-internexin expression in gliomas: relationship with histological type and 1p, 19q, 10p and 10q status. *J. Clin. Pathol.* 2011;64(9):793-801.
80. Ichimura K. Molecular pathogenesis of IDH mutations in gliomas. *Brain Tumor Pathology.* 2012; Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22399191>
81. Preusser M, Haberler C, Hainfellner JA. Malignant glioma: neuropathology and neurobiology. *Wien Med Wochenschr.* juin 2006;156(11-12):332-337.
82. Royds JA, Iacopetta B. p53 and disease: when the guardian angel fails. *Cell Death Differ.* 2006;13(6):1017-1026.
83. Peraud A, Kreth FW, Wiestler OD, Kleihues P, Reulen H-J. Prognostic impact of TP53 mutations and P53 protein overexpression in supratentorial WHO grade II astrocytomas and oligoastrocytomas. *Clin. Cancer Res.* 2002;8(5):1117-1124.
84. Mukasa A, Wykosky J, Ligon KL, Chin L, Cavenee WK, Furnari F. Mutant EGFR is required for maintenance of glioma growth in vivo, and its ablation leads to escape from receptor dependence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010;107(6):2616-2621.
85. Deb P, Sharma MC, Tripathi M, Sarat Chandra P, Gupta A, Sarkar C. Expression of CD34 as a novel marker for glioneuronal lesions associated with chronic intractable epilepsy. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2006;32(5):461-468.
86. Figarella-Branger D, Maues de Paula A, Colin C, Bouvier C. Histomolecular classification of adult diffuse gliomas: the diagnostic value of immunohistochemical markers. *Rev. Neurol. (Paris).* 2011;167(10):683-690.
87. Kaplan DR, Miller FD. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2000;10(3):381-391.
88. Patapoutian A, Reichardt LF. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2001;11(3):272-280.
89. Dieni S, Matsumoto T, Dekkers M, Rauskolb S, Ionescu MS, Deogracias R, et al. BDNF and its pro-peptide are stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons. *J. Cell Biol.* 19 2012;196(6):775-788.
90. Talasila KM, Soentgerath A, Euskirchen P, Rosland GV, Wang J, Huszthy PC, et al. EGFR wild-type amplification and activation promote invasion and development of glioblastoma independent of angiogenesis. *Acta Neuropathol.* 2013 (en cours d'impression).
91. Guillamo J-S, De Boüard S, Valable S, Marteau L, Leuraud P, Marie Y, et al. Molecular mechanisms underlying effects of epidermal growth factor receptor inhibition on invasion, proliferation, and angiogenesis in experimental glioma. *Clin. Cancer Res.* 2009;15(11):3697-3704.
92. Guillaudeau A, Durand K, Rabinovitch-Chable H, Pommepuy I, Mesturoux L, Robert S, et al. Adult diffuse gliomas produce mRNA transcripts encoding EGFR isoforms lacking a tyrosine kinase domain. *Int. J. Oncol.* 2012;40(4):1142-1152.
93. Madshus IH, Stang E. Internalization and intracellular sorting of the EGF receptor: a model for understanding the mechanisms of receptor trafficking. *J. Cell. Sci.* 2009;122(Pt 19):3433-3439.

94. Halle C, Lando M, Svendsrud DH, Clancy T, Holden M, Sundfør 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;17(16):5501-5512.

ANNEXES

Annexe 1 : Indice de Karnofsky.

Situation clinique	
Le patient ne présente aucun signe ou symptôme de maladie	100 %
Le patient est capable de réaliser les activités normales de la vie quotidienne, symptômes ou signes mineurs de la maladie	90 %
Le patient est capable de réaliser les activités normales de la vie quotidienne avec effort, quelques symptômes ou signes mineurs	80 %
Le patient est capable de se prendre en charge, mais est incapable de mener une vie normale ou de travailler	70 %
Le patient nécessite une aide occasionnelle, mais peut prendre en charge la plupart des soins personnels	60 %
Le patient nécessite une aide suivie et des soins médicaux fréquents	50 %
Le patient est handicapé et nécessite une aide et des soins particuliers	40 %
Le patient est sévèrement handicapé	30 %
Le patient, très malade, nécessite un traitement de soutien actif	20 %
Le patient est moribond, le processus fatal progressant rapidement	10 %

Annexe 2 : Données du suivi des patients présentant une tumeur non infiltrante (VV : vivant, DCD : décédé, PDV : perdu de vue, n.a.: non applicable car pas de récurrence).

Type tumoral	Cas (numéro)	Grade OMS	Sexe	Age au diagnostic (année)	Durée du suivi (mois)	Récurrence (mois)	Dernières nouvelles
Astrocytomes pilocytiques (14 cas)	1	I	M	10	45	n.a.	PDV
	2	I	M	19	5	n.a.	PDV
	3	I	M	11	88	n.a.	VV
	4	I	M	16	93	n.a.	VV
	5	I	M	15	69	n.a.	VV
	6	I	F	2	56	n.a.	VV
	7	I	F	18	83	13	VV
	8	I	M	13	38	n.a.	VV
	9	I	F	16	55	n.a.	VV
	10	I	F	6	54	n.a.	VV
	11	I	F	15	171	n.a.	VV
	12	I	F	9	163	n.a.	VV
	13	I	M	20	70	n.a.	PDV
	14	I	F	2	136	n.a.	VV
Gangliogliomes (12 cas)	15	II	M	34	227	97	VV
	16	I	F	13	81	n.a.	VV
	17	I	M	6	79	n.a.	VV
	18	II	M	10	59	18	VV
	19	I	F	62	33	n.a.	VV
	20	II	F	13	26	n.a.	VV
	21	I	M	36	21	n.a.	VV
	22	I	F	72	15	n.a.	VV
	23	II	M	30	163	7	VV
	24	I	F	48	130	n.a.	DCD
	25	II	F	16	34	6	VV
	26	I	M	16	13	8	PDV

Annexe 3 : Données du suivi des patients présentant une tumeur infiltrante (VV : vivant, DCD : décédé, PDV : perdu de vue, n.a.: non applicable car pas de récurrence).

Type tumoral	Cas (numéro)	Grade OMS	Sexe	Age au diagnostic (année)	Durée du suivi (mois)	Récurrence (mois)	Dernières nouvelles
Oligo-dendrogliomes (13 cas)	27	II	M	28	63	45	VV
	28	II	M	48	167	185	VV
	29	III	M	70	51	n.a.	VV
	30	III	M	53	42	65	VV
	31	III	F	42	34	24	DCD
	32	II	M	33	13	n.a.	VV
	33	III	F	57	15	9	DCD
	34	II	M	52	12	n.a.	VV
	35	III	M	50	137	158	VV
	36	II	M	45	16	6	PDV
	37	II	M	38	30	n.a.	VV
	38	III	M	42	52	47	PDV
	Oligo-astrocytomes (5 cas)	39	III	M	31	51	28
40		II	M	43	143	101	VV
41		II	M	49	54	20	VV
42		II	F	58	42	n.a.	VV
43		III	F	57	22	n.a.	DCD
Glioblastomes (17 cas)	44	III	F	42	7	10	VV
	45	IV	M	41	17	15	DCD
	46	IV	F	69	1	n.a.	DCD
	47	IV	M	43	9	5	DCD
	48	IV	F	34	10	8	DCD
	49	IV	M	60	11	5	DCD
	50	IV	F	57	11	5	DCD
	51	IV	M	68	11	10	DCD
	52	IV	F	46	57	n.a.	VV
	53	IV	M	48	24	3	DCD
	54	IV	F	59	29	26	DCD
	55	IV	M	43	15	8	DCD
	56	IV	F	59	40	29	DCD
	57	IV	F	59	7	5	DCD
	58	IV	F	69	10	n.a.	VV
	59	IV	M	66	28	28	VV
	60	IV	M	40	3	n.a.	VV
61	IV	M	63	6	n.a.	DCD	

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des maîtres de cette école, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je dispenserai mes soins sans distinction de race, de religion, d'idéologie ou de situation sociale.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser les crimes.

Je serai reconnaissante envers mes maîtres, et solidaire moralement de mes confrères. Conscient de mes responsabilités envers les patients, je continuerai à perfectionner mon savoir.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir de l'estime des hommes et de mes condisciples, si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.