

Introduction générale

Les tumeurs primitives du système nerveux central représentent un groupe très hétérogène avec plusieurs entités anatomopathologiques. Dans la littérature, la valeur de l'incidence globale de ces tumeurs varie d'une étude à l'autre. Actuellement, les données américaines (CBTRUS) et européennes (Wöhrer *et al.*, 2009; Baldi *et al.*, 2011; Crocetti *et al.*, 2012) estiment une incidence dans les pays occidentaux, d'environ 18/100 000 habitants par an.

Au Maroc, le registre du grand Casablanca estime l'incidence standardisée des tumeurs du système nerveux central à 2,0 pour 100 000 hommes / an et 1,1 cas pour 100 000 femmes / an (Ferlay J *et al.*, 2004).

A Fès, le profil épidémiologique de 5532 cas de cancers colligés au CHU de Fès entre 2004 et 2010, a permis d'identifier 129 cas de cancer du SNC (Chbani L *et al.*, 2013).

Compte tenu du nombre important de types et de sous-types histologiques de ces tumeurs, l'incidence spécifique de chaque entité est faible à très faible.

Chez l'enfant, Les tumeurs du système nerveux central sont les plus fréquentes des tumeurs solides et représente le deuxième cancer de l'enfant (20 %) derrière les leucémies (30 %). Les tumeurs les plus fréquentes se situent à l'étage sous-tentorial (les gliomes diffus du tronc cérébral, les astrocytomes pilocytiques) et à l'étage sus-tentorial (les gliomes, les craniopharyngiomes).

De manière globale, les gliomes représentent plus de 28% de toutes les tumeurs cérébrales et 80% des tumeurs cérébrales malignes (CBTRUS). Toutefois, les tumeurs du SNC restent des tumeurs rares qui ne représentent qu'environ 1% de l'ensemble des cancers.

Le pronostic de ces tumeurs reste sombre et l'arsenal thérapeutique (chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie) a pour objectif principal de ralentir l'évolution de la maladie puisque la guérison est exceptionnelle.

La prise en charge des patients est actuellement basée sur les données cliniques, anatomopathologiques et radiologiques. En effet, le diagnostic de certitude repose sur l'analyse histologique d'un fragment tumoral obtenu par biopsie chirurgicale stéréotaxique ou lors d'un geste d'exérèse. La classification utilisée est celle de l'OMS révisée en 2007, qui distingue les tumeurs en fonction de leur type histologique et de leur grade de malignité. Cette classification permet de différencier entre trois grands groupes tumoraux d'histologie différente à savoir les astrocytomes, les oligodendrogliomes et les oligo-astrocytomes. Le grade de malignité est une échelle de I à IV qui caractérise le degré d'évolution des tumeurs en se basant sur un ensemble de critères d'anaplasie à savoir l'hypercellularité, les atypies nucléaires, la prolifération cellulaire, les mitoses atypiques, la prolifération vasculaire endothéliale et la nécrose.

Les critères diagnostiques de la classification de l'OMS purement morphologiques laissent une grande part à l'interprétation et à la subjectivité, expliquant le taux élevé de discordance inter-observateurs en terme de grade, mais aussi de lignage oligodendroglial ou astrocytaire. En effet, cette classification souffre d'une grande variabilité aussi bien d'évolution, d'agressivité que de pronostic. Par ailleurs, on note un manque de reproductibilité inter-observateurs et intra-observateurs qui est estimé entre 20 et 30 % (Van den Bent MJ, 2010). Cette hétérogénéité entre les tumeurs gliales est plus marquée au niveau des gliomes de grade II et III, puisque la survie s'étale respectivement entre 3 et 20 ans et entre 2 et 10 ans. De ce fait, la classification actuelle de l'OMS basée sur l'histologie ne permet pas une prise en charge thérapeutique optimale (chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie). C'est dans cette optique et grâce aux progrès de la biologie moléculaire, que de nombreux travaux ont tenté d'établir une classification histo-moléculaire plus affinée des gliomes et plusieurs altérations génétiques spécifiques ont été identifiées. Plusieurs travaux scientifiques ont permis de révéler que certaines de ces altérations moléculaires ont une valeur pronostique importante et sont associées à la réponse au traitement, tandis que d'autres peuvent servir de marqueurs diagnostiques permettant une classification plus précise de ces tumeurs (Weller M et *al.*, 2015). Ainsi, l'objectif majeur dans le diagnostic actuel des gliomes est l'intégration des avancées moléculaires dans la classification tumorale. C'est dans cette optique que la classification de l'OMS version 2016 a vu le jour (Juin 2016). Elle permet pour la première fois d'établir un diagnostic basé à la fois sur des critères histologiques et moléculaires. L'utilisation intégrée de ces deux paramètres ajoutera de l'objectivité au processus diagnostique mais également permettra de prédire le pronostic et la survie des patients porteurs de ces tumeurs. Dans le même sens, le laboratoire d'anatomopathologie et de pathologie moléculaire du CHU Hassan II de Fès avait pour but de mettre en évidence la présence de certains de ces marqueurs moléculaires. Ainsi, notre travail de thèse, qui s'est étalé sur une période de 6ans et qui portait sur 133 tumeurs gliales, avait pour objectif majeur la caractérisation protéique et génétique d'un certain nombre de marqueurs moléculaires spécifiques des gliomes. La confrontation des résultats radiologiques avec l'histologie a permis d'affiner la classification des gliomes. De plus, certains de ces marqueurs ont aidé à poser le diagnostic alors que d'autres permettraient, après inclusion d'un effectif plus important, une meilleure stratification des grands groupes moléculaires des glioblastomes. Ce travail de recherche est réparti en quatre chapitres :

- le 1^{er} chapitre de ce mémoire consiste à présenter une revue de la littérature incluant les dernières actualités et publications dans le domaine.
- le 2^{ème} chapitre est consacré à la description et à la mise au point des différentes techniques cytogénétiques et moléculaires utilisées dans cette thèse.
- le 3^{ème} chapitre consiste à présenter les résultats de notre étude, permettant ainsi d'établir un profil épidémiologique, histologique, immunohistochimique et moléculaire des patients atteints de gliomes dans la région du nord-est du Maroc.
- le 4^{ème} chapitre a pour objectif de discuter les différents résultats obtenus et de les confronter avec la littérature internationale afin de confirmer certains résultats et expliquer les divergences notées dans d'autres.

A travers l'utilisation d'un ensemble de techniques diversifiées (IHC, FISH, qPCR, PCR-Séquençage), nous avons essayé d'une part d'identifier les biomarqueurs caractérisant les différents groupes de tumeurs gliales dans notre population marocaine et d'autre part de montrer l'intérêt de l'intégration de ces biomarqueurs dans le processus de diagnostic et de prise en charge thérapeutique des patients.

Chapitre I : Etude bibliographique

1. Anatomie et physiologie des cellules gliales

Le système nerveux contient principalement du tissu nerveux très riche en cellule avec très peu d'espace extracellulaire. Malgré la complexité et la densité cellulaire du tissu nerveux, il n'est composé que de deux grands types de cellules :

- Les neurones : cellules nerveuses excitables qui produisent, conduisent et transmettent l'influx nerveux ;
- Les cellules gliales (appelées aussi gliocytes ou névroglie): cellules de soutien qui entourent et protègent les neurones. Ces cellules sont beaucoup plus petites que les neurones mais environ 10 fois plus nombreuses.

La névroglie comprend six types de cellules : quatre se trouvent dans le système nerveux central (SNC) et deux dans le système nerveux périphérique (SNP). La névroglie du SNC comprend les astrocytes, les oligodendrocytes, les épendymocytes et les microglies alors que la névroglie du SNP est constituée de cellules satellites et cellules de Schwann (Elaine N *et al.*, 2014).

Les astrocytes constituent la principale population de cellules gliales du SNC. Leurs nombreux prolongements en forme d'étoile adhèrent aux neurones et à leurs terminaisons synaptiques. Ils soutiennent donc et affermissent les neurones.

En plus de leur rôle de soutien du tissu nerveux, les astrocytes exercent de multiples fonctions dont plusieurs sont encore en phase d'étude. Ainsi, ces cellules :

- jouent un rôle primordial dans la formation de la barrière hémato-encéphalique ;
- assurent l'approvisionnement des neurones en oxygène et nutriments ;
- contribuent à maintenir un milieu chimique approprié à la production des potentiels d'action par les neurones ;
- captent l'excès des neurotransmetteurs et participent à leur métabolisme ;
- réalisent des cicatrices gliales dans les régions altérées du cerveau ;
- permettent de diriger la migration des neurones jusqu'à leurs localisations définitives lors du développement (Elaine N *et al.*, 2014).

Le marqueur moléculaire typique des astrocytes est la protéine fibrillaire gliale GFAP (Bignami A *et al.*, 1972).

Les oligodendrocytes sont des cellules plus petites avec moins de prolongements que les astrocytes (oligos : peu nombreux ; dendro : ramifications). Ils sont alignés le long des axones épais du SNC, et leurs prolongements cytoplasmiques s'enroulent fermement autour de ceux-

ci. Ils constituent ainsi des enveloppes isolantes appelées gaines de myéline qui servent à augmenter la vitesse de conduction de l'influx nerveux (Elaine N *et al.*, 2014).

Les épendymocytes sont des cellules de forme cubique ou cylindrique ciliées formant un épithélium simple qui tapisse les différentes cavités du SNC : les ventricules cérébraux et le canal épendymaire médullaire. Le battement des cils des épendymocytes facilite la circulation du liquide céphalo-rachidien qui forme un coussin protecteur pour l'encéphale et la moelle épinière (Elaine N *et al.*, 2014).

Les microglies ou cellules microgliales sont de petites cellules ovoïdes dotées de prolongements épineux relativement longs. Ils ont rôle principalement immunitaire et ont les mêmes origines que les monocytes et les macrophages. Ainsi :

- Les microglies protègent les cellules du système nerveux central contre les agressions infectieuses ou toxiques.
- Elles peuvent migrer vers les régions lésées et éliminer les débris des cellules mortes. Leur rôle protecteur revêt une grande importance car les cellules du système immunitaire n'ont pas accès au système nerveux central (Elaine N *et al.*, 2014).

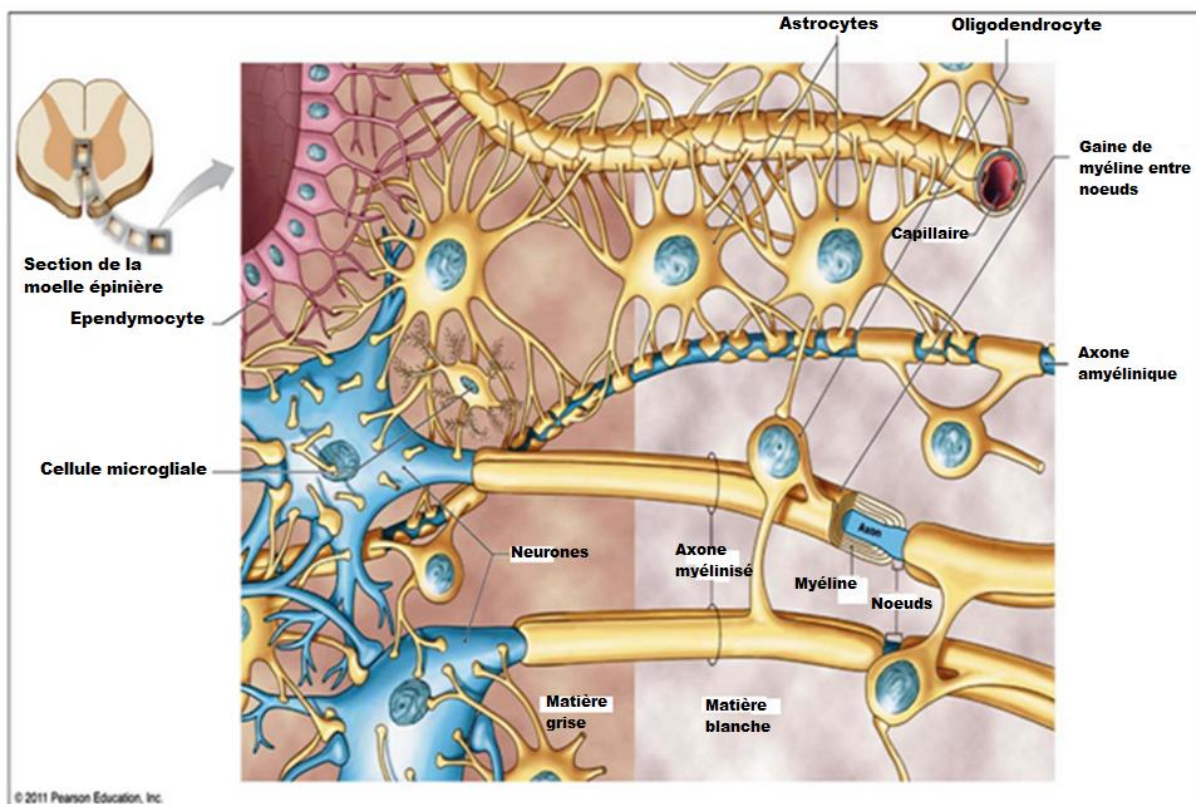


Figure 1 : Schéma de l'organisation cellulaire du SNC par examen du microscope optique.
<http://highlands.edu/academics/divisions/scipe/biology/faculty/harnden/2121/images/neuroglialcns.jpg>

Il est à noter que les tumeurs primaires les plus fréquentes du SNC sont développées aux dépens des cellules gliales et sont appelées gliomes ou tumeurs gliales. Cette particularité proviendrait de la capacité de division presque illimitée des cellules gliales contrairement aux neurones amitotiques une fois matures.

Les gliomes se répartissent en plusieurs sous types avec des pronostics très différents en fonction du type histologique, du grade et de la localisation de la tumeur (opérable ou non).

Selon le mode de développement de ces tumeurs, on oppose les gliomes circonscrits bénins, observés généralement chez l'enfant aux gliomes infiltrants survenant majoritairement chez l'adulte et qui sont caractérisés par leur capacité à diffuser dans le parenchyme cérébral et à dégénérer inévitablement vers des formes plus malignes.

2. Epidémiologie et facteurs de risques des gliomes

2.1. Epidémiologie descriptive

L'épidémiologie des tumeurs cérébrales est variable. Elle repose essentiellement sur le recueil de données hétérogènes (origine géographique, données neurochirurgicales, radiologiques, anatomopathologiques, etc.). L'estimation de leur incidence est ardue du fait de :

- L'absence de confirmation histologique pour certaines tumeurs ;
- Le recueil incomplet et non exhaustif des données ;
- Le manque de reproductibilité des classifications qui reposent sur des critères subjectifs (Adam C *et al.*, 2011).

Aux Etats-Unis, ce recueil des données est centralisé par un registre spécialisé appelé CBTRUS pour Cerebral Brain Tumor Registry of the United-States (www.cbtrus.org). (Ostrom QT *et al.*, 2014).

En France, deux sources de données principales existent : le Registre spécialisé des tumeurs du système nerveux central de la Gironde depuis 1999 (Baldi I *et al.*, 2011) et le recensement national histologique des tumeurs primitives du système nerveux central depuis 2005 (Rigau V *et al.*, 2011; Zouaoui S *et al.*, 2012).

Ainsi, l'incidence des tumeurs du système nerveux central est actuellement évaluée à environ 18/100000 en France (Baldi I *et al.*, 2011; Rigau V *et al.*, 2011; Zouaoui S *et al.*, 2012) et 21.42/100000 aux Etats-Unis (Ostrom QT *et al.*, 2014).

L'incidence des tumeurs neuro-épithéliales, qui représentent les tumeurs cérébrales primaires les plus fréquentes, est estimée à 7.94/100000 en France (Baldi I *et al.*, 2011) et 6.61/100000 aux Etats-Unis (Ostrom QT *et al.*, 2014).

Les tumeurs cérébrales les plus fréquemment rencontrées sont les méningiomes et les glioblastomes représentant respectivement 36.1% et 15.4% de l'ensemble des tumeurs primitives cérébrales (Ostrom QT *et al.*, 2014) (Fig. 3).

Chez l'enfant, les tumeurs du système nerveux central, en particulier les tumeurs neuro-épithéliales, sont les plus fréquentes. L'incidence annuelle est estimée à 3.66/100000 habitants aux Etats-Unis entre 2007-2011 (Ostrom QT *et al.*, 2014). Les types histologiques diffèrent par rapport à ceux observés chez l'adulte. On observe essentiellement les tumeurs non infiltrantes, en particulier les astrocytomes pilocytiques.

Une augmentation de l'incidence annuelle des tumeurs cérébrales primitives a été notée dans l'ensemble des pays industrialisés. Ceci est dû essentiellement au vieillissement de la population d'une part et à l'amélioration des outils diagnostiques grâce à l'avènement de nouvelles techniques d'imagerie.

Au Maroc, il n'existe pas de registre national pour le recensement des tumeurs. Cependant, il existe des registres régionaux, comme le registre du Grand Casablanca, qui permettent d'estimer l'incidence à l'échelle nationale. Ainsi, l'incidence standardisée estimée du cancer du SNC chez les hommes est de 2,0 pour 100 000 hommes/an, voisine de celle observée en Algérie et en Tunisie (1,9 et 2,0 pour 100 000 hommes/an respectivement). Elle est très faible en comparaison avec d'autres pays comme la Croatie et la Grèce où l'incidence atteint (10,9 et 10,5 pour 100 000 hommes/an respectivement) (Ferlay J *et al.*, 2004).

Chez les femmes l'incidence standardisée observée est de 1,1 cas pour 100 000 femmes/an et les mêmes tendances que chez les hommes sont notées lors de la comparaison de l'incidence au Maroc avec celles d'autres pays (Ferlay J *et al.*, 2004).

A Fès, il n'existe pas de registre des cancers. Cependant, une étude rétrospective a essayé d'établir le profil épidémiologique de 5532 cas de cancers recueillis au centre hospitalier universitaire de Fès entre 2004 et 2010. 129 cas (2,3%) de cancers du système nerveux ont été rapportés au cours de cette même période (Chbani L *et al.*, 2013).

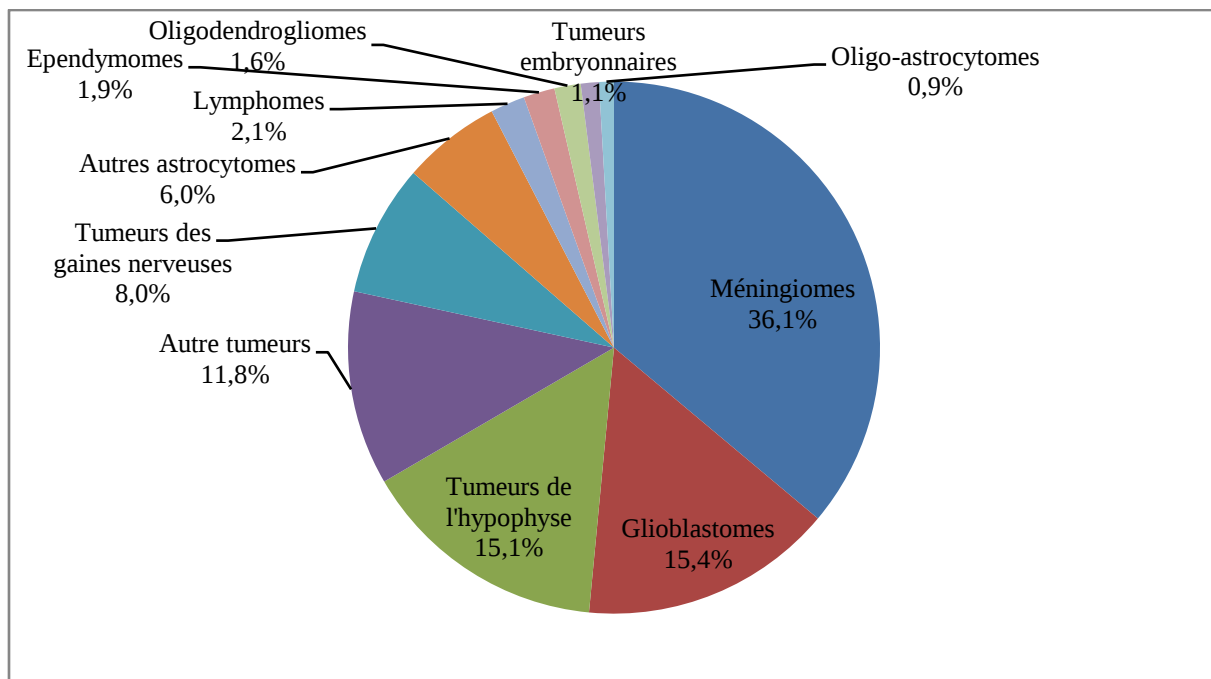


Figure 2 : Répartition de l'ensemble des tumeurs primaires du système nerveux central par regroupement histologique. CBTRUS Statistical Report: NPCR and SEER, 2007–2011.

2.2. Facteurs de risque

De nombreux facteurs de risque ont été suspectés mais peu ont finalement pu être établis avec certitude. Ils sont divisés en facteurs de risque intrinsèques et extrinsèques.

2.2.1. Facteurs de risque intrinsèques

L'âge est le premier facteur mis en évidence puisque l'incidence des tumeurs du SNC augmente avec l'âge (Bondy ML *et al.*, 2008; Loiseau H *et al.*, 2009). Pour le sexe, les gliomes sont plus fréquents chez les hommes avec un sex-ratio de 1.5 à 1.8 (Bondy ML *et al.*, 2008; Loiseau H *et al.*, 2009). Aux Etats Unies, l'incidence de développer une tumeur cérébrale est plus importante chez les sujets d'origine caucasienne par rapport aux sujets afro-américains (Bondy ML *et al.*, 2008; Ostrom QT *et al.*, 2014). Néanmoins, le facteur de risque majeur reste, sans aucun doute, la prédisposition génétique liée à certains syndromes héréditaires (syndrome de Li Fraumeni, syndrome de Turcot, neurofibromatose NF1, syndrome de Gardner, etc...). Ces syndromes représentent environ 1% des gliomes chez l'adulte et 2% chez l'enfant (Wrensch M *et al.*, 1997; Almairac F *et al.*, 2010).

Un nombre croissant d'études plaident en faveur d'une implication de certains polymorphismes génétiques, notamment des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN comme les gènes XRCC (pour *X-Ray repair cross-complementing group*) (Xu C *et al.*, 2014) et ERCC (pour *Excision repair cross-complementing group*) (Geng P *et al.*, 2015). De ce fait, une

vaste étude internationale nommée GLIOGENE sur les cas familiaux des tumeurs cérébrales a débuté en 2007 et devrait apporter quelques éclaircissements sur les gènes en cause dans ces gliomes familiaux (Malmer B *et al.*, 2007 ; Shete S *et al.*, 2011). Le séquençage de l'exome de 90 personnes issues de 55 familles a permis d'identifier deux familles avec des mutations au niveau du gène *POT1* (p.G95C, p.E450X). Chacune de ces deux familles avaient des membres avec un oligodendrogliome, un type spécifique de gliome, plus sensible à l'irradiation. Ces résultats préliminaires pourraient contribuer à la compréhension de l'origine des gliomes familiaux.

A l'inverse, une étude épidémiologique réalisée en Allemagne sur 1178 gliomes, a montré une association inverse entre le développement d'une tumeur gliale et la présence de maladies allergiques (asthme, eczéma) (Schlehofer B *et al.*, 1999).

2.2.2. Facteurs de risque extrinsèques

Le seul facteur de risque environnemental prouvé est l'exposition à des radiations ionisantes à forte dose. En effet, dans l'étude *Childhood Cancer Survivor Study* de suivi des enfants ayant eu une irradiation thérapeutique cérébrale, on a noté une augmentation du risque de développer un gliome de 6.78 et de 7.07 pour l'ensemble des tumeurs cérébrales (Neglia JP *et al.*, 2006 ; Schmiegelow K *et al.*, 2013). Néanmoins, aucune augmentation du nombre de tumeurs cérébrales n'a été signalée dans le cadre des irradiations à titre diagnostique, ni chez les employés de l'industrie nucléaire, ni chez les manipulateurs en imagerie médicale (Bondy ML *et al.*, 2008 ; Loiseau H *et al.*, 2009).

De très nombreux autres facteurs comme l'exposition à divers agents chimiques carcinogènes, le tabagisme, la consommation de l'alcool, des régimes alimentaires particuliers, les antécédents de traumatisme crânien, ont été suggérés, mais aucun lien n'a pu être formellement établi par les différentes études réalisées (Ohgaki H *et al.*, 2009). Récemment, de nombreuses études ont essayé d'établir un lien entre l'exposition aux champs électromagnétiques émis par les téléphones portables et le risque de développer une tumeur cérébrale. Ces études difficiles à conduire et comportant plusieurs biais de confusion n'ont pas permis de démontrer l'existence d'un lien (Ahlbom A *et al.*, 2009 ; Swerdlow AJ *et al.*, 2011).

3. Aspects cliniques et radiologiques des gliomes

3.1. Présentation clinique

La symptomatologie clinique des tumeurs gliales malignes est celui de tout processus expansif du système nerveux central intracrânien qui agit par deux mécanismes physiopathologiques : l'infiltration tumorale du parenchyme cérébral et les phénomènes compressifs liés à l'œdème périlésionnel, aux compressions veineuses péri-tumorales, ou au blocage des voies du liquide céphalorachidien (LCR) (Chanalet S *et al.*, 2004). L'énoncé de ces deux mécanismes physiopathologiques élémentaires laisse présager des symptômes et signes possibles que l'on classe sous trois rubriques:

- ✓ symptômes neurologiques directement dus à la lésion ;
- ✓ symptômes liés au caractère expansif de la lésion ;
- ✓ symptômes de dysfonctionnement général.

Symptômes neurologiques directement dus à la lésion : Les tumeurs de localisation corticale et cortico-sous-corticale peuvent entraîner soit des phénomènes critiques épileptiques, soit des phénomènes déficitaires dont la séméiologie dépend de la localisation lésionnelle. En effet, toute épilepsie focale survenant chez un sujet sans antécédent pathologique, de même que tout syndrome déficitaire franc évoluant de façon progressive, moteur, sensitif, sensoriel ou cognitif doivent faire suspecter un processus expansif tumoral (Chatel M *et al.*, 2005 ; Baron MH *et al.*, 2008).

Symptômes liés au caractère expansif de la lésion : Ce deuxième type de symptomatologie est lié à l'augmentation du contenu intracrânien qui entraîne soit un syndrome céphalgique focal (douleurs à localisation précise) attribué au développement de la masse lésionnelle et aux étirements vasculaires ou méningés, soit un syndrome d'hypertension intracrânienne qui associe céphalées et vomissements évoluant de façon subaiguë ou chronique (Chatel M *et al.*, 2005 ; Baron MH *et al.*, 2008).

Symptômes de dysfonctionnement général : chez ces patients, on note la présence d'une asthénie importante, d'une perte de l'élan vital, de difficultés à poursuivre des tâches nécessitant une concentration prolongée, une diminution de la libido, l'apparition de réactions anxieuses devant toute action à entreprendre même sans difficulté réelle (Chatel M *et al.*, 2005 ; Baron MH *et al.*, 2008).

Il existe des corrélations entre la localisation, le grade histologique et les manifestations révélatrices de la maladie (Buckner JC *et al.*, 2007). La figure 3 résume les différents tableaux pouvant être rencontrés.

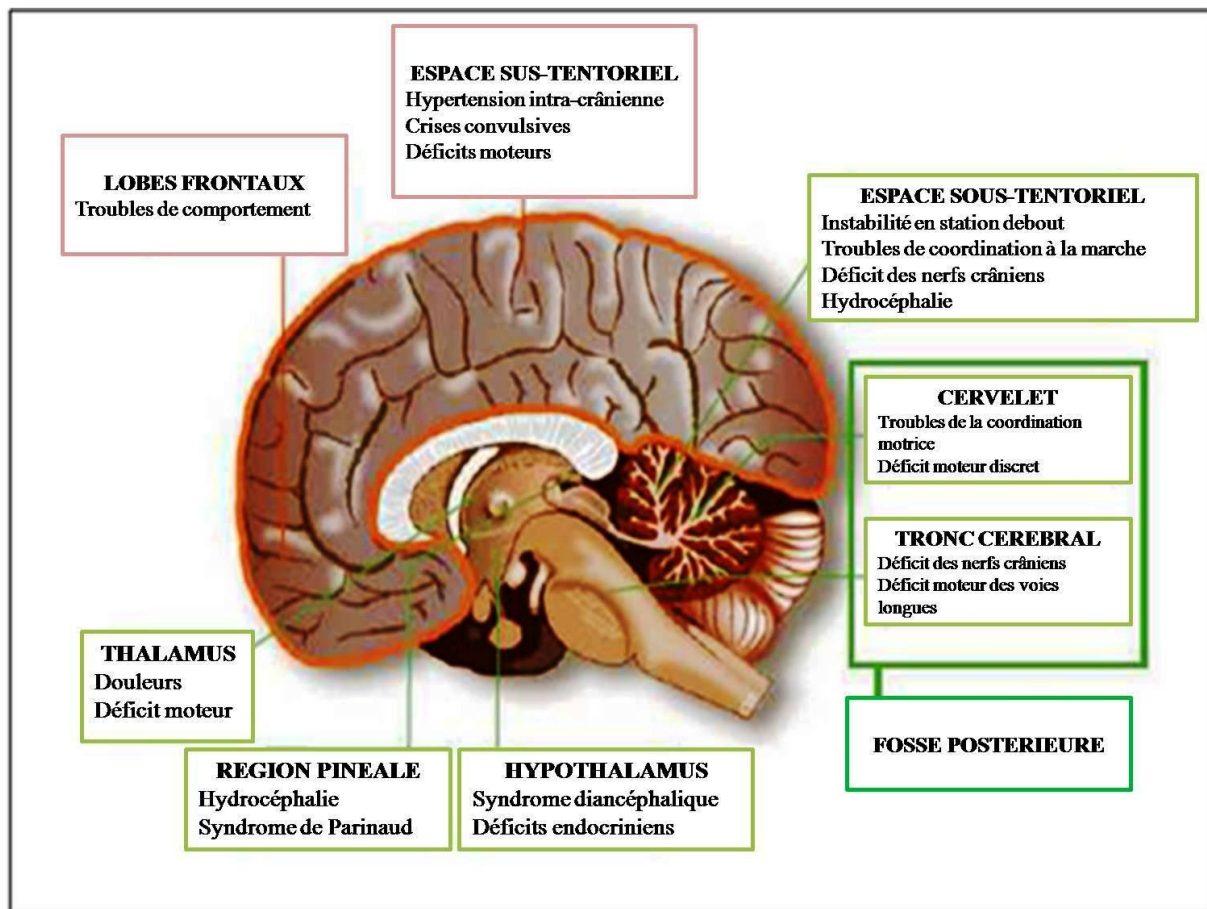


Figure 3 : Signes cliniques des tumeurs cérébrales selon la topographie. Andon *et al*, *Les tumeurs du système nerveux central*, 2005.

3.2. Présentation radiologique

Les objectifs majeurs de l'imagerie peuvent être résumés comme suit :

- Porter le diagnostic des tumeurs cérébrales et éliminer les lésions non tumorales ;
- Préciser la localisation de cette tumeur par rapport au parenchyme cérébral (intra ou extraparenchymateuse ou encore intraventriculaire) ;
- Décrire les caractéristiques morphologiques et de rehaussement (structure, limites, volume, extension) de cette lésion et son retentissement sur les structures cérébrales (effet de masse, engagements, hydrocéphalie) ;
- Evoquer la nature et tenter d'évaluer le degré de malignité de la lésion ;

- Guider l'indication et la planification du geste chirurgical ou de la biopsie stéréotaxique ;
- Assurer le suivi post-thérapeutique (Chanalet S *et al.*, 2004).

La scannographie ou tomodensitométrie (TDM) reste souvent la première étape du diagnostic. Elle est encore très utilisée du fait de son moindre coût et de sa plus grande disponibilité. C'est un bon moyen de débrouillage en attendant de réaliser une IRM. Elle a pour avantages de caractériser les calcifications de petite taille non visibles en IRM et de mieux analyser les structures osseuses. Cependant, elle est moins performante que l'IRM pour les tumeurs isodenses, les tumeurs de la fosse postérieure, les tumeurs de la ligne médiane et l'analyse de l'extension tumorale (Martin-Duverneuil N *et al.*, 2008).

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) reste la technique d'imagerie de référence pour le diagnostic, le bilan pré-thérapeutique et le suivi post-thérapeutique des gliomes. Elle permet globalement de mettre en évidence un processus expansif de taille variable, en iso-hyposignal T1 et hypersignal Flair/T2 avec un oedème périlésionnel en règle limité (en dehors des glioblastomes) (Martin-Duverneuil N *et al.*, 2008).

Actuellement, de nouvelles techniques IRM multimodalités (séquence de diffusion, de perfusion et spectroscopie) permettent d'appréhender de façon de plus en plus fiable les composantes évolutives des gliomes telles que l'infiltration cellulaire tumorale et commencent à être utilisées en pratique courante. En effet, les séquences de diffusion, qui permettent d'évaluer le mouvement aléatoire des molécules d'eau dans les tissus, apprécient la cellularité lésionnelle. L'imagerie de perfusion fournit une cartographie du volume sanguin cérébral et permet une évaluation de l'angiogenèse tumorale. La spectroscopie par résonance magnétique analyse certains métabolites cellulaires tumoraux et permet d'obtenir des informations métaboliques corrélées à l'agressivité de la tumeur (Young GS *et al.*, 2007 ; Guilloton L *et al.*, 2008).

Chaque type histologique des gliomes est caractérisé sur le plan radiologique par un certain nombre de critères spécifiques. Nous présentons dans ce qui suit les caractéristiques radiologiques des principales tumeurs gliales.

Astrocytome pilocytique (grade I)

En TDM, la composante solide est hypo-isodense, les calcifications sont assez rares et les remaniements hémorragiques sont peu fréquents. Un rehaussement après contraste d'aspect variable est noté.

En IRM, la tumeur est bien limitée avec un hyposignal T1 et un hypersignal T2. Les remaniements nécrotiques sont possibles. L'œdème périlésionnel est en règle modéré et des remaniements hémorragiques spontanés sont rares . La prise de contraste est d'aspect et d'intensité variables, classiquement intense, mais peut être modérée voire absente. Une prise de contraste péri-kystique est possible.

En diffusion , la faible cellularité de l'astrocytome pilocytique se traduit par des valeurs élevées de l'ADC. Les courbes de spectroscopie: montrent une élévation variable du pic de choline, avec une baisse modérée du NAA et de la créatine, et parfois une résonance des lactates. Il n'existe pas de résonance de lipides (POPE WB *et al.*, 2016).

Astrocytome diffus (grade II)

En TDM, la masse est mal limitée et hypodense, sans prise de contraste ou avec de discrets rehaussements. Une composante kystique peut être observée . Les hémorragies sont très rares . Des calcifications peuvent être notées.

En IRM, la lésion cortico-sous-corticale est en hyposignal T1, en hypersignal T2 et FLAIR. Les limites sont nettes dans les deux tiers des cas. Sous-cortical à l'origine , elle infiltre la substance blanche en se développant en profondeur jusqu'aux ventricules , puis le cortex avec élargissement des structures anatomiques atteintes . L'œdème péritumoral est rare et en règle limité. Les hémorragies sont très rares.

En diffusion, les gliomes de bas grade montrent peu de modification de l'ADC. Les courbes de spectroscopie montrent une élévation modérée du pic de choline avec un aspect variable de la créatine et une baisse du pic de NAA. Pas de résonance de lipides ou de lactates. En perfusion, pas d'anomalie significative du rCBV (POPE WB *et al.*, 2016).

Oligodendrogliome diffus (grade II)

En TDM, la tumeur est hypodense, plus rarement isodense voire hyperdense. Parfois, elle est non détectable en TDM. Les calcifications massives sont fréquentes et évocatrices du

diagnostic. Des zones de dégénérescence kystique et plus rarement des hémorragies intratumorales sont possibles.

En IRM, la lésion est en hyposignal en T1 et en hypersignal en T2 et FLAIR. Les contours sont réguliers dans les deux tiers des cas, ils deviennent flous en cas de lésion très étendue. L'œdème périlésionnel est modéré. On note des calcifications du siège central ou périphérique, nodulaires, en masse ou en ruban. La prise de contraste est minime ou absente.

En diffusion, l'ADC est peu modifié. Les courbes de spectroscopie montrent une augmentation du pic de choline avec une baisse de celui du NAA. Une élévation du myoinositol et une résonance en glutamine-glutamate est également notée. En perfusion, le rCBV est augmenté jusqu'à 4. Cette tumeur fait l'exception de l'hyperperfusion pour une tumeur gliale de bas grade (POPE WB *et al.*, 2016).

Astrocytome anaplasique (grade III)

En TDM, elle est représentée par une masse hypodense, infiltrante, de taille variable, prédominante dans la substance blanche hémisphérique, bien ou mal limitée. Les calcifications et les hémorragies sont rares. La prise de contraste est variable. La prise de contraste annulaire traduit le plus souvent l'évolution vers un glioblastome.

En IRM, elle représente une masse infiltrant le cortex sus-jacent et s'étendant dans la substance blanche profonde vers les ventricules. Elle est, iso ou hypointense en pondération T1, hyperintense en pondération T2 et FLAIR. La prise de contraste est variable. Les hémorragies et les formations kystiques sont rares. En diffusion, l'élévation de la cellularité lésionnelle tend à réduire l'ADC.

Les courbes de spectroscopie montrent une élévation du pic de choline, une baisse du pic de la créatine et surtout du NAA. L'élévation des rapports Cho/ Cr et Cho/ NAA est également noté avec l'apparition d'une résonance de lipides et/ou de lactates. La résonance du myoinositol s'effondre. Les séquences de perfusion montrent une nette élévation du rCBV, en corrélation avec le grade tumoral. Une valeur supérieure à 1.75 apparaît comme un indice de passage à la malignité. Le stade anaplasique avéré se situe dans des valeurs plus élevées proches de 5 (varie entre 1.75 et 7). Des valeurs supérieures à 2.3 étant considérées comme de mauvais pronostic (POPE WB *et al.*, 2016).

Oligodendrogliome anaplasique (grade III)

En TDM, la masse est infiltrante, expansive et préférentiellement sus-tentorielle, cortico-sous-corticale. Des calcifications sont fréquentes.

En IRM, la masse est hypointense en T1, hyperintense en T2, souvent hétérogène, siège de zones de dégénérescence kystique, d'hémorragie ou de nécrose. L'œdème périlésionnel reste limité. Au niveau des séquences de perfusion on note une élévation du rCBV (notée également dans l'oligodendrogliome de bas grade). Dans ce cas précis, la cartographie de l'ADC permet le guidage des biopsies et le suivi de ces tumeurs devant la suspicion de la présence de foyers anaplasiques.

Les courbes de spectroscopie objectivent une élévation importante du pic de choline, une baisse de la créatine et surtout du NAA, avec une apparition de résonance de lactates/ lipides (POPE WB *et al.*, 2016).

Glioblastome (grade IV)

La TDM avec injection se caractérise par une prise de contraste et une nécrose intra tumorale.

En IRM, la masse du signal est hétérogène avec un hyposignal en T 1 et un hypersignal en T 2 et FLAIR . La prise de contraste est également hétérogène . On note également des remaniements hémorragiques qui se traduisent par un hyposignal en T2, des calcifications rares et un œdème périlésionnel.

En diffusion, les zones solides sont en hypersignal avec un ADC bas. Les courbes de spectroscopie montrent une élévation de la choline avec effondrement de NAA et une augmentation des ratios Cho/Cr et Cho/NAA. On note une absence de pic de myoinositol et une apparition de résonance de lactates/ lipides, témoins respectifs de l'anabolisme tumoral et de la nécrose. Ceci permet la distinction entre glioblastome et des lésions d'aspects similaires en imagerie conventionnelle, essentiellement les abcès et les métastases (POPE WB *et al.*, 2016).

4. Classifications des gliomes et difficultés diagnostiques

4.1. Historique

Bailey et Cushing furent les premiers à proposer en 1926 (Bailey P *et al.*, 1926) une classification histologique des tumeurs cérébrales basée sur le principe de l'histogenèse et la théorie des restes embryonnaires de Conheim. D'après cette classification, les tumeurs se développeraient à partir de cellules embryonnaires arrêtées à différents stades de développement et susceptibles de se différencier. Ainsi, les tumeurs gliales furent classées en quatre types de gliomes astrocytaires (Glioblastome, Spongioblastome polaire, Astroblastome et Astrocytome protoplasmique) et un type d'oligodendrogliome.

En 1949, Kernohan *et al.* introduisirent la notion de grading histologique de malignité.

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

En 1979, en associant les éléments de la classification de Bailey et Cushing et ceux de Kernohan, la première classification de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) vit le jour. Elle a depuis subi plusieurs révisions (1993, 2000 et 2007). Les principales modifications ont concerné le cadre nosologique des glioblastomes. Classés en 1976 dans le cadre nosologique des tumeurs mal différenciées et embryonnaires, les glioblastomes ont intégré en 1993 le groupe des tumeurs astrocytaires et en 2007, la notion de glioblastome à composante oligodendrogliale a été retenue. La classification de l'OMS distingue les gliomes selon deux paramètres : la morphologie des cellules tumorales et le grade de malignité (Kleihues PCW, 2000 ; Louis DN *et al.*, 2007). Cette classification, bien qu'elle soit internationalement reconnue, souffre d'un défaut majeur de reproductibilité. De ce fait, une classification anatomopathologique alternative a été proposée, dès 1987, par l'équipe du Professeur Daumas-Duport de l'hôpital Sainte-Anne. Dans cette classification, les données cliniques ont été associées à l'imagerie et l'histologie, offrant ainsi une meilleure reproductibilité (Daumas-Duport C *et al.*, 1987).

4.2. Classification de l'OMS 2007 des gliomes et ses limites

La classification de référence des gliomes reconnue par la communauté scientifique internationale est celle établie par l'OMS et révisée en 2007 (Louis DN *et al.*, 2007). Cette classification anatomopathologique permet de séparer les gliomes en fonction de leur origine

cellulaire (astrocytaire, oligodendrogial ou mixte). Elle associe ces caractéristiques morphologiques à un grade de malignité de I à IV qui dépend essentiellement de la présence de critères d'anaplasie tels que l'hypercellularité, le polymorphisme cellulaire, les atypies nucléaires, l'activité mitotique, les mitoses atypiques, la prolifération vasculaire endothéliale et la nécrose (Louis DN *et al.*, 2007).

Tableau 1 : Classification histologique des tumeurs gliales diffuses selon l'OMS 2007.(*Louis DN et al., 2007*)

	Type histologique	Différenciation	Densité cellulaire	Atypies nucléaires	Activité mitotique	Nécrose	Prolifération vasculaire
Tumeurs astrocytaires	Astrocytomes diffus (grade II)	haut degré de différenciation	modérée	occasionnelles	absente ou 1 mitose	absente	absente
	Astrocytomes anaplasiques (grade III)	anaplasie focale ou dispersée	augmentée diffusément ou focalement	présentes	présente	absente	absente
	Glioblastomes (grade IV)	faible	élevée	marquées	marquée	présente	présente
Tumeurs oligodendrogiales	Oligodendrogliomes (grade II)	bien différencié	modérée	possiblement marquées	absente ou mitoses occasionnelles	absente ou peu conséquente	non proéminente
	Oligodendrogliomes anaplasiques (grade III)	Anaplasie focale ou diffuse	éventuellement augmentée	éventuellement marquées	éventuellement forte	possible	possible
Tumeurs oligoastrocytaires	Oligoastrocytomes (grade II)	bien différencié	faible ou modérée	-	absente ou faible	absente	absente
	Oligoastrocytomes anaplasiques (grade III)	-	éventuellement forte	éventuellement présentes	éventuellement forte	absente	possible

4.2.1. Les astrocytomes

Ce sont les tumeurs les plus fréquentes des gliomes. Parmi les astrocytomes, on trouve tous les grades de malignité allant des astrocytomes pilocytiques (Grade I) aux glioblastomes (Grade IV).

L'astrocytome pilocytique est une tumeur bénigne qui affecte essentiellement les enfants et en même temps associée à un bon pronostic. Il est généralement curable si la résection de la tumeur est complète. Il se retrouve principalement au niveau du cervelet, du tronc cérébral, du chiasma et du nerf optique. L'astrocytome pilocytique se caractérise par une architecture biphasique, avec des cellules bipolaires et des fibres de Rosenthal alternant avec des cellules rondes pseudooligodendrogiales formant des microkystes. La vascularisation est souvent anormale avec des vaisseaux remaniés, télangectasiques et parfois une prolifération microvasculaire. Les mitoses sont rares mais peuvent être présentes. Si de la nécrose est présente, elle est de type ischémique. Les cellules bipolaires et les fibres de Rosenthal expriment typiquement la protéine gliofibrillaire acide des astrocytes (GFAP) alors que les cellules rondes expriment le facteur de transcription Olig2.

La variante pilomyxoïde se caractérise par des cellules bipolaires se disposant le plus souvent en pseudorosettes périvasculaires dans une substance myxoïde dépourvue de fibre de Rosenthal ou de corps granuleux. Quelques mitoses peuvent être présentes (Collins VP *et al.*, 2015).

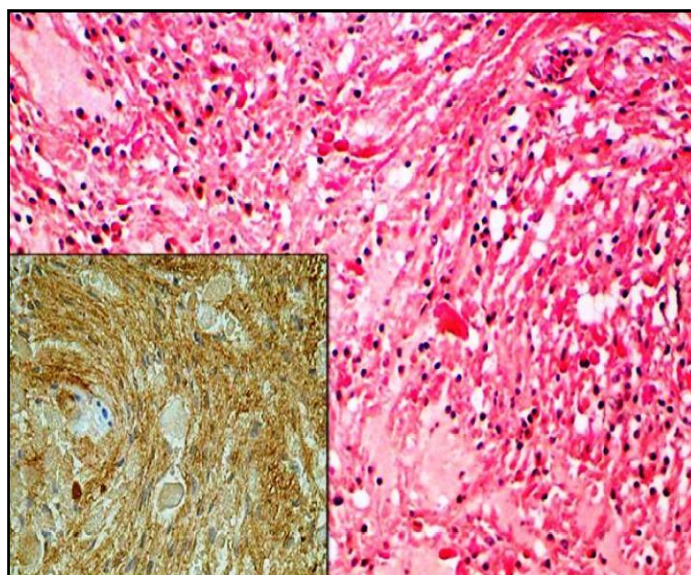


Figure 4 : Coupes HES mettant en évidence une prolifération tumorale à faible densité cellulaire, faite de cellules monomorphes de petite taille reposant sur un fond fibrillaire. Des fibres de Rosenthal sont visualisées. Les cellules tumorales expriment la GFAP. (Grossissement $\times 40$) [Laboratoire d'anatomie pathologique- CHU Hassan II de Fès].

L'astrocytome de grade II ou astrocytome diffus est une tumeur diffuse se caractérisant par un degré élevé de différenciation astrocytaire par rapport à la substance blanche, des atypies cytonucléaires, une croissance lente et une infiltration diffuse des structures cérébrales adjacentes. Ils affectent typiquement les adultes jeunes et ont tendance à progresser vers l'astrocytome anaplasique (Grade III) puis le glioblastome (Grade IV). Histologiquement, l'OMS distingue trois variantes d'astrocytomes diffus en fonction de la ressemblance avec certains types d'astrocytes normaux ou réactionnels : l'astrocytome fibrillaire, l'astrocytome gemistocytaire et l'astrocytome protoplasmique (Baron MH *et al.*, 2008).

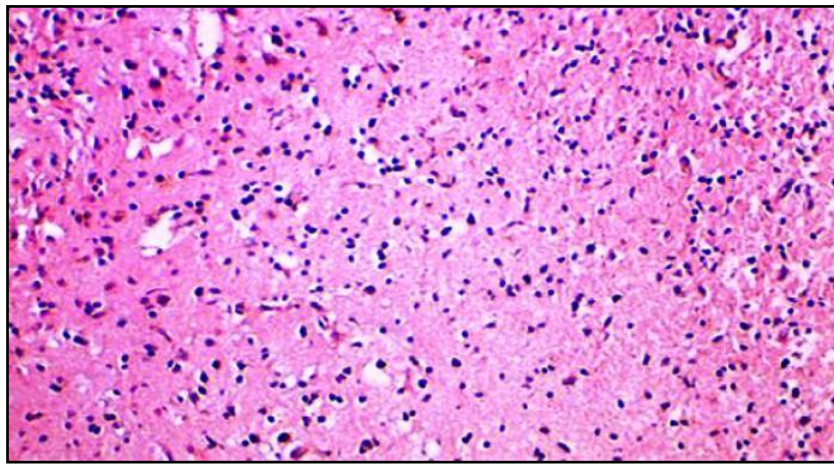


Figure 5 : Coupe histologique d'un astrocytome diffus. HES vue au grossissement 200 objectivant une prolifération tumorale de faible densité cellulaire disposée en nappes diffuses, faite de cellules dotées de cytoplasmes abondant éosinophiles et de noyaux allongés, reposant sur un fond fibrillaire. Pas vu de nécrose ou de prolifération endothéliale-capillaire. (Grossissement $\times 40$) [Laboratoire d'anatomie pathologique- CHU Hassan II-Fès]

L'astrocytome de grade III ou astrocytome anaplasique est définie par une activité mitotique importante, une densité cellulaire élevée, des atypies nucléaires souvent franches et une évolution inévitable vers le glioblastome (Chatel M *et al.*, 2005).

L'astrocytome de grade IV ou glioblastome est caractérisé par la présence de nécrose et une prolifération endothéliale-capillaire, en plus des autres altérations. La nécrose tumorale est de type ischémique avec des palissades cellulaires périnécrotiques. Elle peut être très étendue. 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 des glioblastomes à composante oligodendrogliale qui comportent des territoires typiquement oligodendrogliaux.

Le glioblastome est le gliome diffus le plus fréquent puisqu'il représente plus de la moitié des tumeurs gliales. Le glioblastome reste la tumeur gliale la plus maligne avec un pronostic

sombre (médiane de survie d'environ 15mois). La majorité des glioblastomes (90%) se manifeste d'emblée, chez les sujets âgés, sans aucune évidence d'une lésion tumorale précoce de bas grade. Ils sont ainsi décrits comme glioblastomes primaires ou *de novo*. Les glioblastomes qui se développent suite à l'évolution d'un gliome préexistant de grade II ou III, sont moins fréquent et touchent principalement les patients avant l'âge de 40 à 45ans. Ils se définissent comme glioblastomes secondaires (Chatel M *et al.*, 2005).

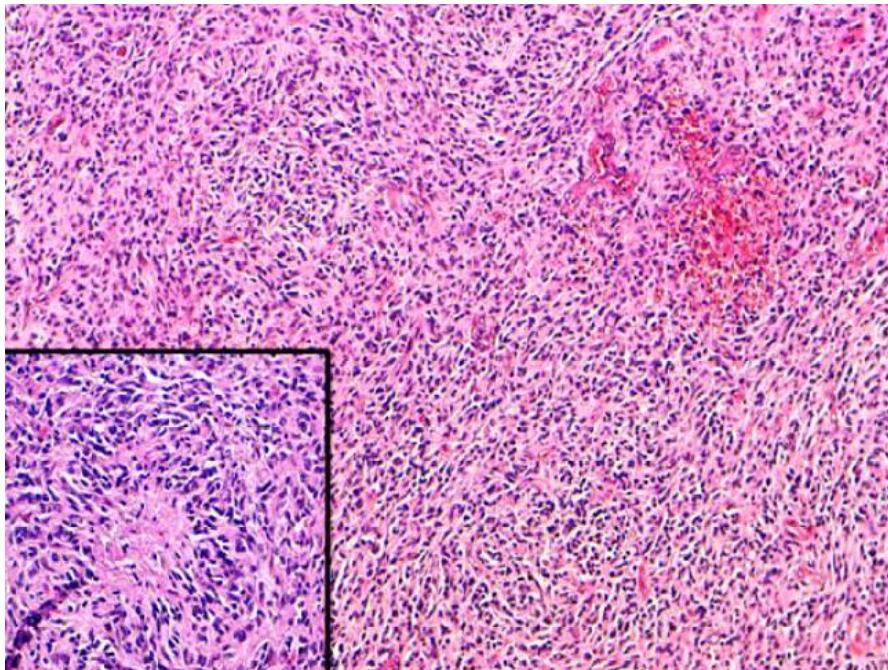


Figure 6 : Aspect histologique caractéristique d'un glioblastome. Prolifération tumorale hautement cellulaire, d'architecture fusocellulaire. Elle est faite de cellules polymorphes. Les vaisseaux sont abondants. Des foyers de nécrose pallissadique sont observés. (Grossissement $\times 40$) [Laboratoire d'anatomie pathologique-CHU Hassan II de Fès].

4.2.2. Les oligodendrogliomes

Les oligodendrogliomes sont classés en deux grades : le grade II et le grade III anaplasique. Sur le plan histologique, les oligodendrogliomes sont modérément cellulaires et composés de cellules à noyau rond, à chromatine dense et inhomogène, localisée au centre d'un cytoplasme souvent clair, ce qui leur donne un aspect typique dit en « œuf sur le plat ». A faible grossissement, la clarification du cytoplasme confère à la tumeur un aspect dit en « nid d'abeilles ». Les autres caractéristiques histologiques des oligodendrogliomes sont les microcalcifications, un réseau de capillaires ramifiés et la dégénérescence myxoïde.

Des atypies cytonucléaires marquées et des mitoses occasionnelles restent compatibles avec un grade II. L'activité mitotique et la prolifération endothélio-capillaire marquée indiquent une progression vers un grade III (Baron MH *et al.*, 2008 ; Wesseling P *et al.*, 2015).

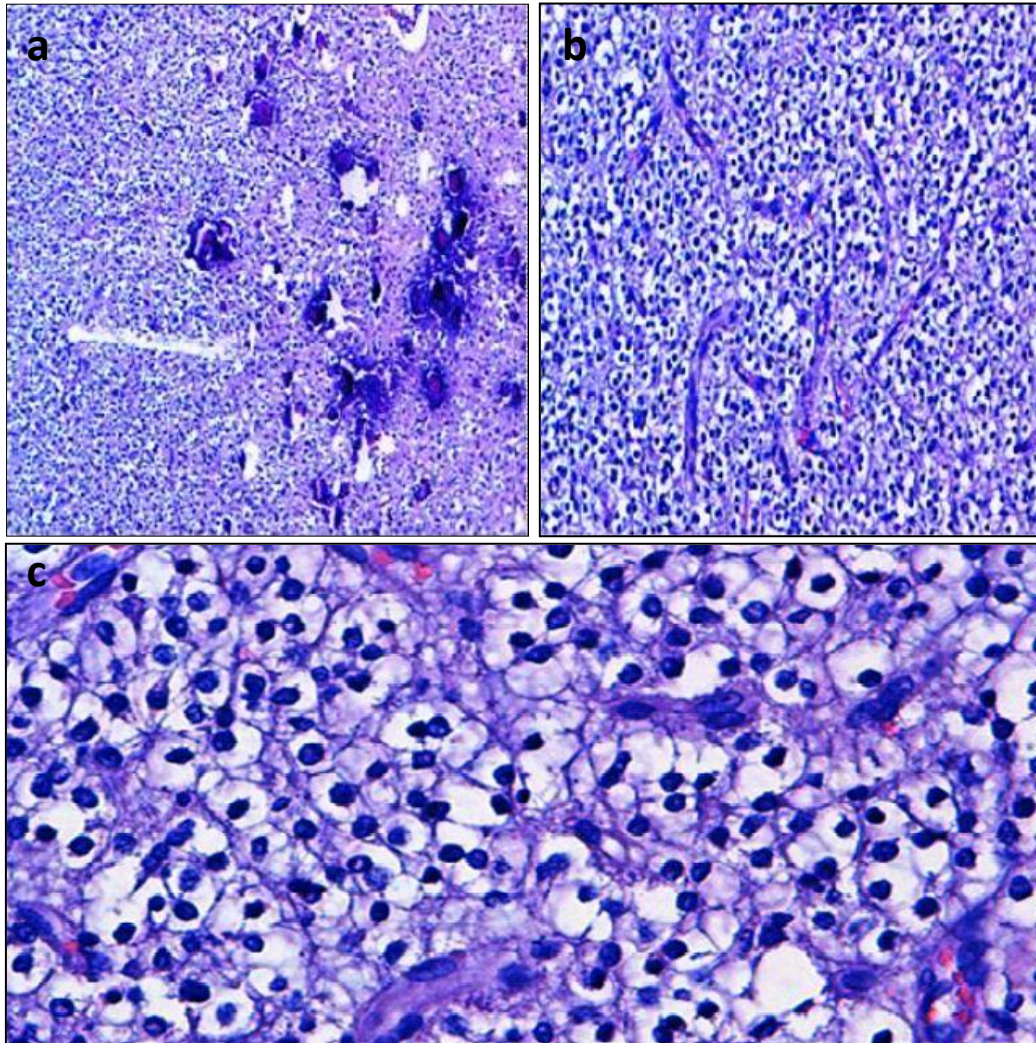


Figure 7 : Aspect histologique d'un oligodendrogliome de grade II. Prolifération tumorale faite de cellules monomorphes grossièrement arrondies dotées d'halo clairs périnucléaires (b-c). Des calcifications sont notées (a). La vascularisation est branchée réalisant un aspect en brechet de poulet (b). (a : Gr $\times 10$, b : Gr $\times 40$, c : Gr $\times 100$) [Laboratoire d'anatomie pathologique- CHU Hassan II-Fès].

4.2.3. Les gliomes mixtes

Selon la classification de l'OMS, les oligoastrocytomes ou gliomes mixtes se définissent par la présence évidente de deux types cellulaires ressemblant morphologiquement aux cellules tumorales des astrocytomes et aux cellules tumorales des oligodendrogliomes. Les deux composantes astrocytaire et oligodendrogliale peuvent être distinctes (variante compacte) ou entremêlées (variante diffuse). Les oligoastrocytomes sont classés en grade II ou III en fonction des différents critères de malignité décrites par l'OMS : densité cellulaire, atypies nucléaires, activité mitotique et prolifération vasculaire. De plus, la découverte de foyers nécrotiques au sein d'un gliome mixte anaplasique amène à porter le diagnostic de glioblastome à composante oligodendrogliale (Baron MH *et al.*, 2008).

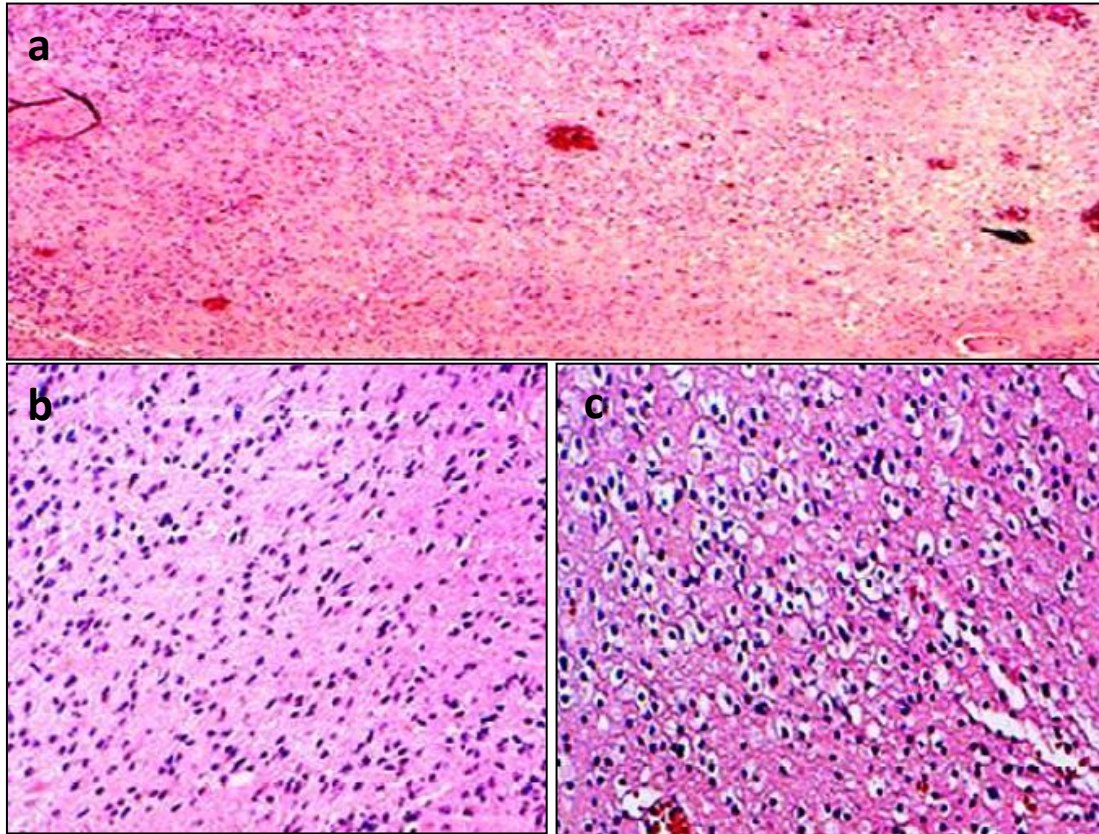


Figure 8 : Aspect histologique d'un oligo-astrocytome de grade II. Prolifération tumorale disposée en nappe diffuse, à double composante cellulaire; une composante astrocytaire (à gauche), et une composante oligodendrogliale (à droite) (a : Gr ×10, b : Gr ×40, c : Gr ×40). [Laboratoire d'anatomie pathologique-CHU Hassan II-Fès]

La classification de l'OMS pose plusieurs problèmes : elle n'est pas reproductible et repose sur des critères morphologiques qualitatifs qui laissent une grande part à l'interprétation et à la subjectivité. Ceci explique notamment le taux élevé de discordance interobservateurs et intraobservateurs. De plus, ce système de classification ne tient pas compte de l'hétérogénéité tumorale et n'intègre pas les données de la clinique et de l'imagerie (Figarella-Branger D *et al.*, 2005 ; Van den Bent MJ, 2010). Pour pallier à ces problèmes d'autres classifications ont été proposées dont la plus importante est celle proposée par la neuropathologiste Catherine Daumas-Duport de l'hôpital Sainte-Anne (Daumas-Duport C *et al.*, 1987).

4.3. Classification de l'hôpital Sainte-Anne des gliomes et ses limites

La classification de l'hôpital Sainte-Anne découle de l'étude de biopsies stéréotaxiques étagées prélevées au niveau de différentes composantes lésionnelles observées en imagerie, permettant d'établir une corrélation anatomoradiologique et de mieux comprendre le mode de croissance des gliomes ainsi que leur organisation spatiale.

Selon cette classification, deux types de structures histologiques sont individualisées :

- une structure spatiale infiltrante, se composent de « cellules tumorales isolées » infiltrant un parenchyme nerveux supposé préservé tant sur le plan morphologique que fonctionnel. Dans ces formes infiltrantes, il n'existe pas de micro-angiogenèse se traduisant par une prise de contraste à l'imagerie.
- la composante dite « tissu tumoral solide » est constituée de cellules tumorales en contact les unes avec les autres sans parenchyme nerveux ou avec très peu de parenchyme résiduel. Cette forme s'associe à une micro-angiogenèse se caractérisant sur le plan histologique par une hyperplasie endothéliale et sur le plan radiologique par une prise de contraste importante (Daumas-Duport C *et al.*, 1987 ; Daumas-Duport C *et al.*, 1997).

Deux critères qui sont l'hyperplasie endothélio-capillaire et la prise de contraste permettent de distinguer entre deux grades de malignité :

- Grade A (bas grade ou bénin) : absence d'hyperplasie endothéliale et de prise de contraste.
- Grade B (haut grade ou malin) : présence d'une hyperplasie endothéliale et/ou d'une prise de contraste (Daumas-Duport C *et al.*, 1997 ; Daumas-Duport C *et al.*, 2000).
- La classification de l'hôpital Sainte-Anne ne distingue ainsi parmi les formes communes des gliomes que trois catégories : oligodendrogliomes ou oligoastrocytomes de grade A ou de grade B et glioblastomes :
- Gliomes ne prenant pas de contraste : oligodendrogliomes ou oligoastrocytomes de grade A.
- Gliomes prenant le contraste : glioblastomes et oligodendrogliomes ou oligoastrocytomes de grade B (Daumas-Duport C *et al.*, 1997 ; Daumas-Duport C *et al.*, 2000).

Ce système de classification est certes reproductible mais s'avère inadapté à la pratique neuro-oncologique. En effet, le passage de la classification de Sainte-Anne à celle de l'OMS (ou l'inverse) n'est pas toujours facile. A l'ère des essais cliniques multicentriques, il apparaît plus logique de recourir à une terminologie universelle permettant aux pathologistes d'adopter un langage unique. L'utilisation de la classification de l'OMS reste donc la référence à

l'échelle internationale et le recours à d'autres systèmes de classification tels que celui de l'hôpital Sainte-Anne n'est qu'optionnel.

4.4. Consensus de la société internationale de neuropathologie 2014 (ISN-Haarlem)

L'histologie seule ou associée aux données cliniques et à l'imagerie ne permet pas à l'heure actuelle une prise en charge thérapeutique optimale des gliomes. De nombreux travaux ont donc été menés ces dernières années, afin d'identifier des anomalies génétiques, épigénétiques et transcriptionnelles majeures rencontrées dans les différents types de gliomes. Cette identification n'a pas seulement amélioré nos connaissances sur la pathogenèse de ces tumeurs mais elle a également permis de révéler que certaines de ces altérations moléculaires ont une valeur pronostic importante et sont associées à la réponse au traitement, tandis que d'autres peuvent servir de marqueurs diagnostiques permettant une classification plus précise de ces tumeurs (Weller M *et al.*, 2015). Ainsi, l'objectif majeur dans le diagnostic actuel des gliomes est l'intégration des avancées moléculaires dans la classification tumorale.

Pour discuter de la possibilité d'inclure des données moléculaires dans la prochaine édition de la classification de l'OMS des tumeurs du SNC, une réunion sous le patronage de la Société internationale de neuropathologie (*International Society of Neuropathology ISN*) a été tenue en Mai 2014 à Haarlem, aux Pays-Bas. Elle a réuni 27 neuropathologistes de 10 pays différents et a examiné comment les critères moléculaires peuvent être intégrés dans le diagnostic des tumeurs du SNC sans pour autant perturber la prise en charge actuelle du patient et les études à long terme des corrélations cliniques et épidémiologiques (Louis DN *et al.*, 2014).

Les recommandations de "l'ISN-Haarlem" proposent de définir des entités diagnostiques aussi étroites que possibles et inclure, quand c'est nécessaire, les données moléculaires pour arriver à un "diagnostic intégré". Le but étant d'optimiser la reproductibilité interobservateurs, les prévisions clinicopathologiques et la prise en charge thérapeutique. Cela pourrait conduire, par exemple, à une classification séparant les astrocytomes et les oligodendrogliomes en fonction des mutations *IDH1/IDH2* et du statut 1p/19q, laissant probablement de côté un petit groupe des tumeurs provisoirement appelé "gliome diffus, non spécifié" dont les altérations n'ont pas été déterminées (Louis DN *et al.*, 2014).

Une étude récente a démontré la faisabilité de cette approche intégrée et a montré qu'elle a permis une meilleure stratification pronostique ainsi qu'une classification plus précise d'entités gliales biologiquement distinctes (Reuss DE *et al.*, 2015).

Les recommandations de "l'ISN-Haarlem" ont été adoptées par la classification de l'OMS version 2016 qui définit les principaux types de gliomes sur la base des caractéristiques histologiques et moléculaires.

4.5. Classification de l'OMS 2016 des gliomes

Une collaboration internationale de 117 experts de 20 pays et des délibérations pendant une conférence consensus de trois jours incluant 35 neuropathologistes, neurooncologues et scientifiques de 10 pays différents a permis d'élaborer la classification de l'organisation mondiale de la santé des tumeurs du système nerveux central version 2016 (OMS 2016) (Louis DN *et al.*, 2016).

La classification OMS 2016 du SNC est à la fois une avancée conceptuelle et pratique par rapport à la classification précédente de 2007. En effet, c'est pour la première fois qu'une classification de l'OMS des tumeurs du SNC intègre des paramètres moléculaires qui, avec l'histologie, permettront de définir plusieurs entités tumorales et par conséquent d'établir un diagnostic basé à la fois sur des critères histologiques et moléculaires. De ce fait, la classification OMS 2016 présente des restructurations majeures des gliomes diffus, médulloblastomes et autres tumeurs embryonnaires et intègre de nouvelles entités définies à la fois par des caractéristiques histologiques et moléculaires. Cette révision de la classification de l'OMS rompt avec l'ancien paradigme du diagnostic entièrement basée sur la microscopie par l'incorporation de paramètres moléculaires dans la classification de certaines entités tumorales du SNC (Louis DN *et al.*, 2016).

L'utilisation intégrée de paramètres phénotypiques et génotypiques dans la classification des tumeurs SNC ajoute de l'objectivité au processus de diagnostic qui a été fréquemment absente dans l'ancienne classification. L'espoir est que cette objectivité supplémentaire puisse donner des entités diagnostiques biologiquement plus homogènes et étroitement définies par rapport aux classifications antérieures, ce qui devrait conduire à une plus grande précision de diagnostic, ainsi que une amélioration de la prise en charge des patients, une prédiction de la réponse au traitement et une évaluation précise du pronostic. Toutefois, cette classification a potentiellement créée de grands groupes de tumeurs qui ne possèdent pas les caractéristiques de ces entités tumorales ou dont les tests moléculaires n'ont pas pu être réalisés (Exemple : la désignation NOS (*the not otherwise specified*)) (Louis DN *et al.*, 2016).

Le schéma suivant présente un algorithme simplifié de la classification des gliomes selon les critères de l'OMS version 2016 :

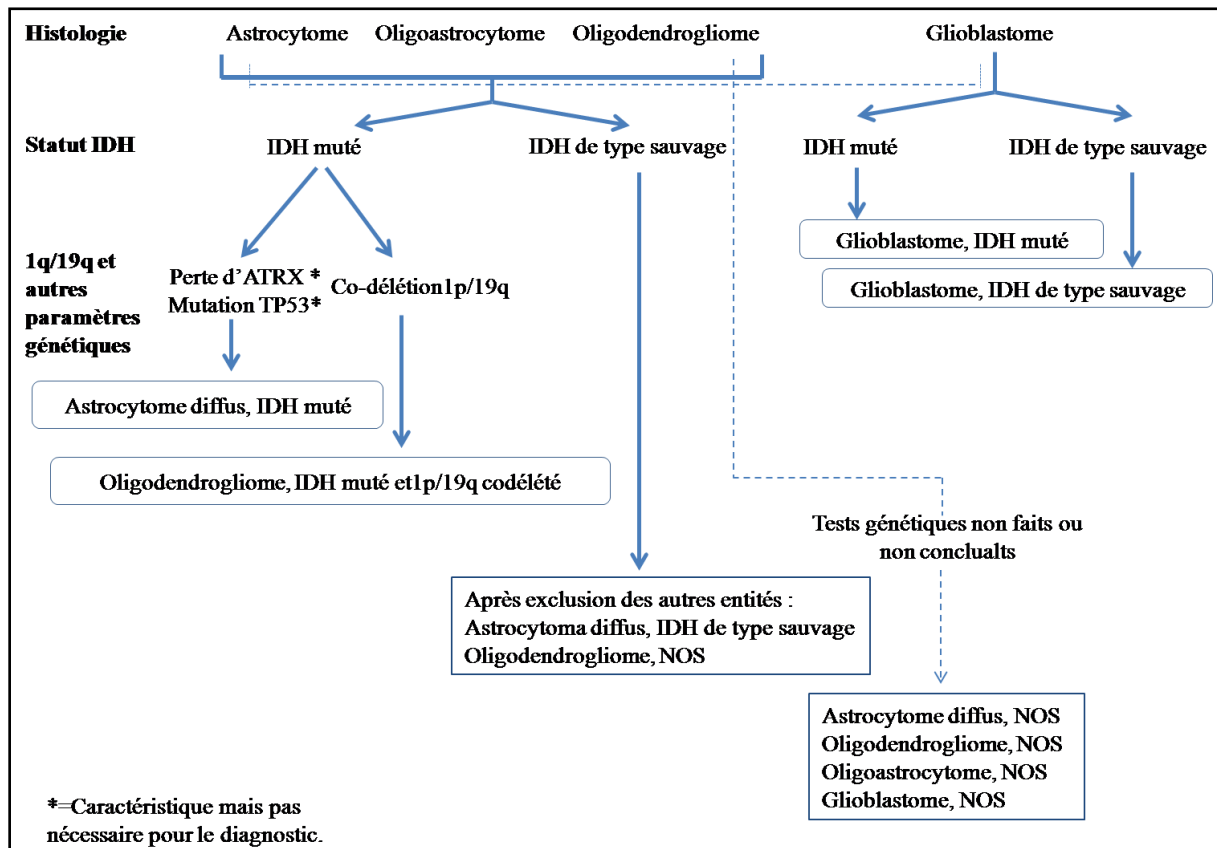


Figure 9 : Un algorithme simplifié pour la classification des gliomes sur la base des caractéristique histologiques et génétiques de la classification de l'OMS 2016.

4.5.1. Gliomes diffus (Grade II et III)

Ce groupe inclut les astrocytomes et les oligodendrogliomes de grade II et III qui se développent majoritairement au niveau des hémisphères cérébraux de jeunes adultes, montre une croissance intraparenchymale infiltrative diffuse et possèdent une tendance inévitable vers la récurrence et la progression maligne. L'altération moléculaire majeure caractérisant ce groupe de tumeurs est la mutation du gène *IDH* (*IDH1/2*) (Balss *et al.*, 2008; Hartmann *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2009). La mutation *IDH* représente une altération précoce caractérisant une grande majorité des gliomes diffus et anaplasiques de grade II et III. Néanmoins, il semble que cette aberration moléculaire ne soit pas suffisante pour induire la croissance tumorale (Sasaki *et al.*, 2012). De ce fait, d'autres altérations génétiques sont nécessaires pour le développement des gliomes et qui incluent principalement les mutations des gènes *TP53* et *ATRX* dans les astrocytomes diffus et anaplasiques et la codélétion 1p/19q ainsi que les

mutations du promoteur du gène *TERT* au niveau des oligodendrogliomes diffus et anaplasiques (Brat *et al.*, 2015; Suzuki *et al.*, 2015). En effet, ces deux profils génétiques à savoir « mutations *IDH*, *TP53* et *ATRX* » versus « mutations *IDH*, *TERT*, co-délétion 1p/19q » sont généralement mutuellement exclusives et considérés comme étant les caractéristiques moléculaires définissant le lignage tumoral astrocytaire versus oligodendrogial (Brat *et al.*, 2015; Suzuki *et al.*, 2015).

Concernant les oligoastrocytomes, il a été démontré dans plusieurs études scientifiques que ces tumeurs présentent soit un génotype astrocytaire soit un génotype oligodendrocytaire. Ceci implique que celles-ci ne constituent pas une entité distincte (Sahm *et al.*, 2014; Brat *et al.*, 2015; Suzuki *et al.*, 2015). C'est dans ce sens que la nouvelle classification OMS 2016 décourage fortement les diagnostics d'oligoastrocytomes diffus et anaplasiques et recommande les tests moléculaires qui permettent d'attribuer à ces tumeurs le caractère astrocytaire ou oligodendrocytaire. Pour les gliomes qui présentent histologiquement un phénotype mixte ou ambigu et qui ne peut être clarifié par les tests moléculaires, la classification de l'OMS 2016 a gardé les catégories de "oligoastrocytomes, NOS" et "oligoastrocytomes anaplasiques, NOS" (Louis DN *et al.*, 2016).

4.5.2. Glioblastomes (Grade IV)

Les glioblastomes représentent les tumeurs gliales les plus communes et les plus malignes. Ils sont subdivisés en deux grandes entités : les glioblastomes avec *IDH* sauvage qui représentent plus de 90% de tous les glioblastomes et ceux avec *IDH* muté qui ne dépassent pas 10 % des cas. La catégorie glioblastomes NOS est réservée aux cas dont la détection moléculaire des mutations *IDH* est impossible.

Les glioblastomes avec *IDH* sauvage correspondent majoritairement aux glioblastomes primaires ou de novo. Ces tumeurs touchent préférentiellement les sujets âgés et se développent sans aucune preuve de lésion tumorale préexistante de grade inférieur (courte histoire clinique). En revanche, les cas de glioblastomes avec *IDH* muté sont généralement observés chez les jeunes adultes et comprennent majoritairement les glioblastomes secondaires qui se sont développés à partir de la progression maligne d'une tumeur gliale diffuse ou anaplasique préexistante (Ohgaki et Kleihues, 2013). La distinction de ces deux types de glioblastomes (*IDH* sauvage et *IDH* muté) est importante non seulement du fait qu'ils représentent des entités biologiques distinctes, mais également ils sont associés à une survie globale (OS) différente et qui est significativement plus longue chez les patients ayant un glioblastome avec *IDH* muté (Sanson *et al.*, 2009; Weller *et al.*, 2009).

Plus de 70% des glioblastomes avec *IDH* de type sauvage possèdent des mutations *TERT*, qui sont souvent associés à l'amplification du récepteur de facteur de croissance épidermique (*EGFR*) et ont été liés à une mauvaise survie (Killela *et al.*, 2014; Labussiere *et al.*, 2014; Eckel-Passow *et al.*, 2015). Toutefois, une étude récente a montré que l'amplification et/ou la surexpression de l'*EGFR* chez les patients porteurs de glioblastomes entraîne un bénéfice du traitement au Témzolomide (Cominelli M *et al.*, 2015).

En revanche, les mutations du promoteur du gène *TERT* dans les gliomes avec *IDH* muté touchent préférentiellement les oligodendrogliomes avec co-délétion 1p/19q et sont liés à un pronostic plus favorable (Arita *et al.*, 2013; Killela *et al.*, 2014).

5. Principales voies d'oncogénèse

5.1. Voie EGFR/ RAS / NF1 /PTEN / PI3K

Les récepteurs des facteurs de croissance à activité tyrosine kinase (EGFR, PDGFRA) sont activés suite à la fixation de leurs ligands respectifs (EGF, TGF- α , PDGF) à leur domaine extracellulaire, ce qui entraîne le recrutement de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) à la membrane cellulaire. La PI3K est un hétérodimère composé de deux sous-unités, une sous-unité catalytique p110 α (codée par PIK3CA) portant une activité de lipide kinase et une sous-unité régulatrice p85 α (codée par PIK3R1), dotée d'un domaine SH2 qui lui permet de reconnaître des phosphotyrosines de RTK activés et de transmettre cette activation à la sous-unité catalytique. La PI3 kinase permet la phosphorylation en position 3 d'un lipide membranaire particulier, le phosphatidylinositol-4,5-disphosphate (PIP2) afin de le transformer en phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3). La phosphorylation en position 3 de l'inositide par la PI3K est contrebalancée par une déphosphorylation assurée par une phosphatase PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*). Le phosphate en position 3 de l'inositol est reconnu par des sérine/thréonine kinases à domaine PH, PDK1 et AKT, la première phosphorylant la seconde. L'activation de l'AKT lui permet de phosphoryler un large éventail de protéines qui sont ainsi activées ou inhibées. L'une de ces protéines cibles est TSC2, dont la phosphorylation inhibe la stimulation de l'activité GTPasique du RHEB qu'elle exerce normalement. Le maintien du RHEB à l'état activé (lié au GTP) stimule la protéine MTOR. Engagée, d'une part, dans un complexe TORC1 avec la protéine RAPTOR, MTOR phosphoryle à son tour plusieurs protéines cibles ; et d'autre part, engagée dans un complexe TORC2 avec la protéine RICTOR, elle phosphoryle AKT et renforce son action par feed-back positif. Les différentes cibles d'AKT et de MTOR ont toutes un effet positif sur la

survie, la croissance et/ou la prolifération cellulaires et bien entendu un effet négatif sur l'apoptose (Robert J, 2010).

Le gène suppresseur de tumeur NF1 code pour un neurofibromine qui fonctionne principalement comme un régulateur négatif RAS (Lee MJ et Stephenson DA, 2007).

L'amplification de l'*EGFR* survient dans environ 40% des glioblastomes primaires, mais elle est très rare dans les glioblastomes secondaires (Ohgaki H et Kleihues P, 2009).

Le gène *PTEN* est muté dans 15 à 40% des glioblastomes primaires, mais rares dans les glioblastomes secondaires. Les mutations / amplification de *PIK3CA* sont rares (5% et 13%) (Kita D *et al.*, 2007) aussi bien pour les glioblastomes primaires que secondaires. Environ les deux tiers des glioblastomes primaires (63%) et un tiers des glioblastomes secondaires montrent des altérations dans au moins un des gènes *EGFR*, *PTEN* ou *PIK3CA*. Le projet pilote de Cancer Genome Atlas (TCGA) a identifié des altérations génétiques supplémentaires dans les glioblastomes (surtout primaires) : mutations / délétions homozygotes de *NF1* (18%) et mutations de *PIK3R1* (10%), avec une fréquence globale d'altérations de la voie EGFR/ RAS / NF1 /PTEN / PI3K de 88% des glioblastomes (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008).

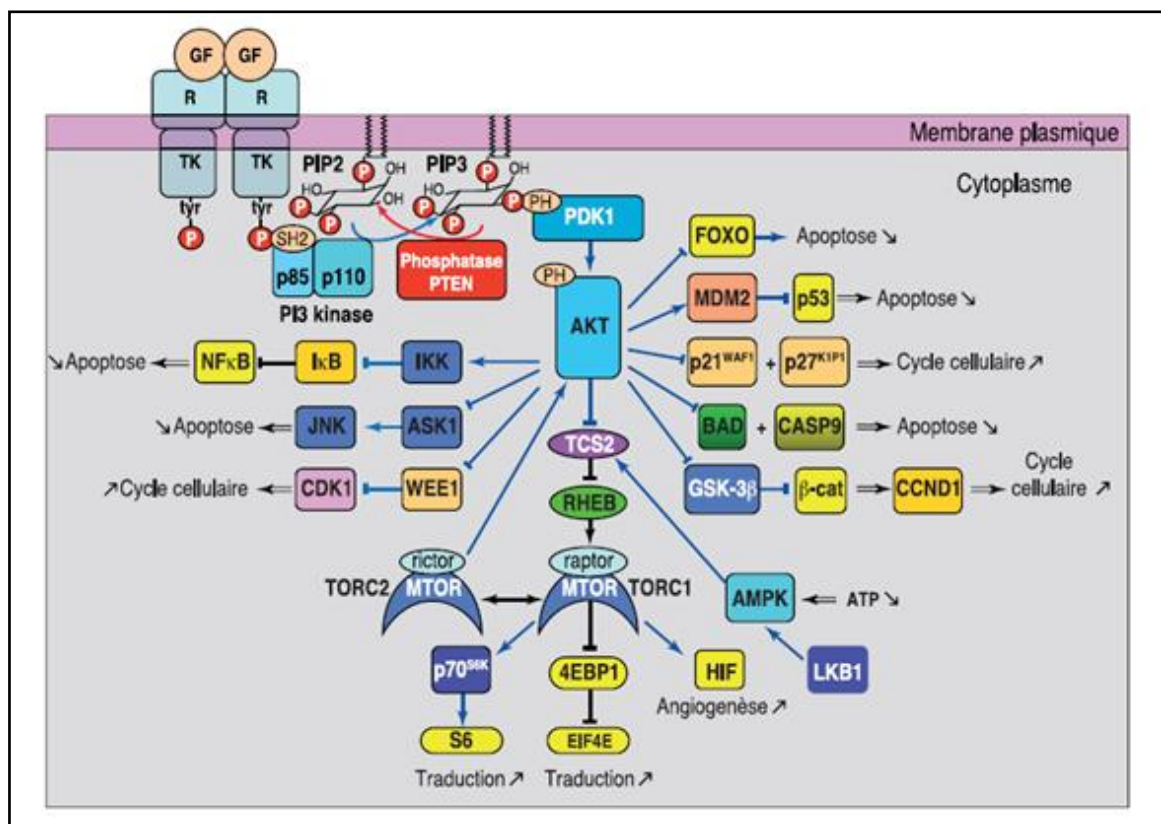


Figure 10 : Schéma récapitulatif de la voie de la PI3 kinase après activation par un récepteur tyrosine kinase (RTK). Jacques Robert. *Signalisation cellulaire et cancer*. Edition Springer 2010.

5.2. Voie TP53/MDM2/MDM4/p14^{ARF}

Le cycle cellulaire contient un nombre de points de contrôle (*checkpoints*) qui peuvent arrêter son déroulement. Ces points de contrôle sont sous la dépendance des protéines qui surveillent la qualité de l'ADN néosynthétisé et l'absence de lésions qui conduiraient à des anomalies héréditaires. Ces protéines sont des kinases dont l'invalidation conduit à des maladies caractéristiques de la fragilité de l'ADN : ATM (pour Ataxia telangiectasia mutated), ATR (Ataxia telangiectasia and Rad-3 related) et la protéine kinase ADN-dépendante (DNA-PK). Ces trois kinases ont pour propriété d'activer par phosphorylation d'autres kinases CHK1 et CHK2 (pour Checkpoint kinases 1 et 2), qui elles-mêmes inhibent par phosphorylation des phosphatases CDC25, empêchant ainsi la formation et l'activation des complexes cyclin-CDK nécessaires soit à la transition G1→S, soit au cours de la réplication, soit à la transition G2→M.

La protéine CHK2 est capable d'activer par phosphorylation le facteur de transcription p53, qui est ainsi au carrefour de l'information reçue sur l'état de l'ADN et la mise en route des moyens visant à empêcher la progression des lésions mutagènes. En effet, p53 est ordinairement présente à très faible concentration en raison de sa liaison avec son ubiquitine ligase MDM2 qui l'entraîne vers le protéasome. Son activation par phosphorylation la libère de MDM2 et lui permet de jouer, après homo-tétramérisation, son rôle de facteur de transcription. Plus d'une centaine de gènes sont activables par p53. Cette protéine est capable d'induire et d'activer les toutes petites protéines p21^{CIP1} jouant ainsi le rôle de CKI (cyclin kinase inhibitors) au niveau des complexes cyclin D-CDK4/6. Elle est également capable d'induire l'apoptose via les protéines pro-apoptotiques *BH3 only* que sont PUMA et NOXA. Elle est enfin capable, via p14^{ARF}, d'inhiber sa propre destruction dans le protéasome vers lequel l'entraîne MDM2. Signalons enfin que MDM2 est elle-même inactivée directement par un produit alternatif du gène CDKN2A qui code également la protéine p16^{INK4a} (Shangary S *et al.*, 2009 ; Van Meir EG *et al.*, 2010).

D'autres découvertes montrent que la P53 régule également la prolifération, la différenciation et la survie des cellules souches (Zawlik I *et al.*, 2009). Après le stress, l'activité de TP53 est bloquée par son régulateur négatif MDM2, dont la transcription est induite par P53, générant une boucle de rétroaction négative qui régule l'activité des P53 et l'expression de MDM2 (Shangary S *et al.*, 2009). En outre, l'activation de P53 est obtenue grâce à l'inactivation de MDM2 par liaison CDKN2A-p14^{ARF}. MDM4, la protéine de liaison homologue de TP53

(appelé aussi MDMX) régule également l'activité P53 et la petite protéine p14^{ARF} est régulée négativement par P53.

La voie de signalisation P53 est perturbée dans les GBM en raison des mutations et / ou amplification de *TP53*, de la surexpression de MDM2 et / ou de la perte d'expression de *CDKN2A-p14^{ARF}*. Toutes ces modifications bloquent l'activité de la protéine P53 et peuvent aboutir à une prolifération cellulaire incontrôlée et à la formation de tumeurs.

Dans les gliomes humains, les mutations de *TP53* sont des mutations faux-sens et ciblent les domaines hautement conservés situés dans les exons 5, 7 et 8, cruciales pour la liaison à l'ADN. Au moins une modification de la voie TP53 / MDM2 / CDKN2A-p14^{ARF} est signalée dans environ 50% des glioblastomes primaires et dans plus de 70% des glioblastomes secondaires (Zawlik I et al., 2009). Les auteurs du projet pilote TCGA a montré une fréquence globale d'altérations génétiques de la voie TP53 / MDM2 / MDM4 / CDKN2A-p14^{ARF} dans 87% des glioblastomes. De telles modifications étant associées à des mutations ou délétions homozygotes de *TP53* dans 35% des cas, l'amplification de *MDM2* dans 14% des cas, l'amplification *MDM4* dans 7%, et les mutations ou délétions homozygotes *CDKN2A-p14^{ARF}* dans 49% de tous les cas de GBM (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008).

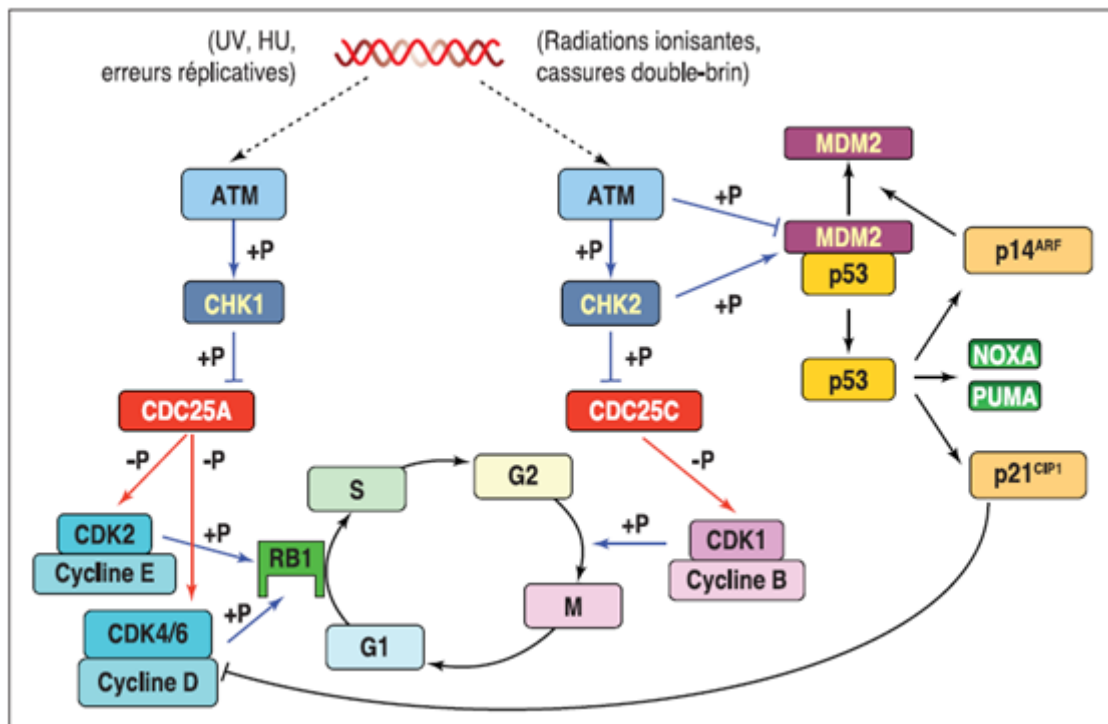


Figure 11 : Les points de contrôle du cycle cellulaire et le contrôle de l'état de l'ADN. Jacques Robert. *Signalisation cellulaire et cancer*. Edition Springer 2010.

5.3. Voie p16^{INK4a} / CDK4 / RB1

La protéine RB1 contrôle la progression du cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S. Le complexe CDK4-6/cycline D phosphoryle la protéine RB1, induisant ainsi la libération du facteur de transcription E2F, qui active les gènes impliqués dans la transition de G1 à S. Contrairement à la protéine RB1, la p16^{INK4a} se lie à CDK4, inhibe le complexe CDK4-6/cycline D et inhibe ainsi la transition G1 → S. Par conséquent, la perte de la fonction normale RB1 peut résulter de l'expression altérée de p^{16INK4a}, CDK4 ou des gènes *RB1* (Knudsen ES et Wang JY, 2010 ; Crespo I *et al.*, 2015).

La délétion homozygote du gène de p16^{INK4a}, l'amplification *CDK4* et la perte de *RB1* sont en général mutuellement exclusives. La fréquence globale de ces modifications est de 50% dans les glioblastomes primaires et d'environ 40% dans les glioblastomes secondaires. Le projet pilote TCGA a montré que la fréquence globale des altérations génétiques dans la voie de signalisation RB1 était de 78%. Les plus fréquentes concernent les délétions homozygotes ou mutations p16^{INK4a} (52%) et les délétions homozygotes p15^{INK4b} (47%). Les délétions homozygotes p18^{INK4c} (2%) sont plus rares. Cependant RB1 peut également être inactivé par amplifications *CDK4* (18%), *cycline D2* (*CCND2*) (2%) ou *CDK6* (1%) (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008).

6. Principales altérations génétiques et épigénétiques

6.1. Mutations *IDH 1* et *IDH 2*

Les gènes *IDH1* et *IDH2* codent pour les isocitrates déshydrogénases 1 et 2 qui catalysent la décarboxylation oxydative de l'isocitrate en alpha-cétoglutarate au cours du cycle de Krebs. L'enzyme IDH1 est localisée dans le cytosol et dans les peroxysomes, alors que l'IDH2 est retrouvée au niveau mitochondrial. L'enzyme IDH est donc la source principale de production de NADPH cytosolique dans le cerveau humain. Elle est également considérée comme une source importante de NADPH dans d'autres tissus. NADPH protège contre les dommages oxydatifs en réduisant le glutathion oxydé et le thiorédoxine. Il a été démontré que la génération de NADPH par IDH1, à travers la décarboxylation oxydative de l'isocitrate, protège contre la peroxydation lipidique et les dommages oxydatifs de l'ADN. L'activité IDH1/2 est également impliquée dans la protection contre la sénescence répliquative, en réduisant les dommages oxydatifs de l'ADN et la peroxydation des lipides dans la culture cellulaire. En accord avec le rôle antioxydant de l'IDH, d'autres études ont montré que

l'activité de production de la NADPH par l'IDH protège contre les rayons UVB qui induisent la phototoxicité et limite les lésions ischémiques du rein. Généralement, IDH joue un rôle important dans la gestion du stress oxydatif en réponse à divers stimuli cellulaires.

En 2009, Dang et al ont rapporté que les mutations *IDH* provoquent non seulement une perte de fonction de la décarboxylation oxydative de l'enzyme, mais aussi un gain de fonction, car l'enzyme mutée est capable de réduire l'alpha-cétoglutarate en D-2-hydroxyglutarate (D2HG) de manière à consommer le NADPH (Fig. 12). La découverte que des mutations *IDH* causent une production aberrante du D2HG suggère que ce dernier pourrait jouer un rôle causal dans la genèse des tumeurs malignes du cerveau et conduit à l'hypothèse que le D2HG pourrait être un oncométabolite. Cet "oncométabolite" inhibe de manière compétitive les enzymes alpha-cétoglutarate dépendantes qui jouent un rôle important dans la régulation des gènes et de l'homéostasie tissulaire. L'expression de l'*IDH* muté modifie la différenciation cellulaire et favorise le développement de la tumeur (Clark O *et al.*, 2016).

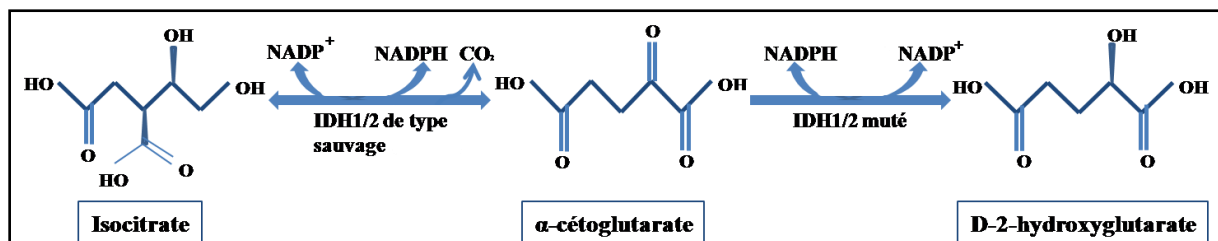


Figure 12 : L'activité enzymatique des protéines IDH1/2 de type sauvage et mutée.

L'acquisition des mutations *IDH1* ou *IDH2* est parmi les événements génétiques précoces dans le gliomagenèse bien avant la transformation maligne (Watanabe T et al, 2009 ; Leu S et *al.*, 2016). Ce qui suggère que les mutations *IDH* représentent un événement causal précoce dans la genèse de ce groupe de tumeurs cérébrales.

Le gène *IDH1*, situé en 2q33, et le gène *IDH2*, localisé en 15q26, sont généralement la cible de mutations ponctuelles hétérozygotes dans les gliomes. La mutation de ces deux gènes est mutuellement exclusive.

Les mutations du gène *IDH1* ont été identifiées pour la première fois en 2008 au cours du séquençage systématique d'une série de 20661 gènes au niveau de 22 glioblastomes (Parsons DW *et al.*, 2008). Toutes ces mutations ont été localisées au niveau du nucléotide 395 de l'exon 4 du transcrit *IDH1* (résidu amino-acide 132) et correspondaient pour la plupart à une mutation CGT → CAT qui entraîne une substitution Arg¹³² → His (mutation majoritaire R132H). En effet, cette mutation R132H est retrouvée dans plus de 90% des cas *IDH1* mutés. Néanmoins, d'autres mutations *IDH1* minoritaires ont été décrites (tableau 2). Les patients

n'ayant pas de mutation d'*IDH1*, peuvent présenter une mutation au niveau du résidu analogue (Arg172) du gène *IDH2* (Nobusawa S *et al.*, 2009 ; Sanson M *et al.*, 2009 ; Watanabe T *et al.*, 2009). Ainsi, 59,5% des gliomes grade II et III et 63,4% des glioblastomes secondaires présentent une mutation *IDH* contre 7,13% seulement des glioblastomes primaires de novo (Zou P *et al.*, 2013).

Tableau 2 : Types et fréquences des mutations *IDH1* et *IDH2* dans les gliomes. (Mellai M *et al.*, 2013).

Gène	changement du nucléotide	changement de l'acide-amino	Total des cas mutés	%
<i>IDH1</i>			1791	
	c.G395A	p.R132H	1655	92.4
	c.C394T	p.R132C	58	3.2
	c.C394G	p.R132G	38	2.1
	c.C394A	p.R132S	29	1.6
	c.G395T	p.R132L	11	0.6
<i>IDH2</i>			45	
	c.G515A	p.R172K	27	60
	c.G515T	p.R172M	12	26.7
	c.A514T	p.R172W	5	11.1
	c.G516T	p.R172S	1	2.2

Il existe une corrélation étroite entre les mutations d'*IDH1/IDH2* et le profil génétique. En effet, des associations significatives ont été observées entre les mutations *IDH* et la codélétion 1p/19q ($P < 0,001$), les mutations *TP53* ($P < 0,001$) et la méthylation du promoteur *MGMT* ($P < 0,001$). Par contre, une association inverse entre les mutations *IDH* et l'amplification *EGFR* ($P < 0,001$) a été notée (Zou P *et al.*, 2013).

La mutation du gène *IDH* semble être un bon marqueur de diagnostic, mais aussi un marqueur pronostique puissant. En effet plusieurs méta-analyses ont montré que la présence de mutations *IDH* prédit significativement une meilleure survie globale (OS) et une meilleure survie sans progression (PFS), en particulier pour les patients atteints de gliome de grade III (Weller M *et al.*, 2009; Van den Bent MJ *et al.*, 2010; Houillier C *et al.*, 2010; Mellai M *et al.*, 2011; Lv S *et al.*, 2011; Leeper HE *et al.*, 2015; Eckel-Passow JE *et al.*, 2015; Cancer Genome Atlas Research Network *et al.*, 2015; Xia . L *et al.*, 2015; Chen JR *et al.*, 2016).

Par ailleurs, il a été démontré que si les échantillons ne sont pas suffisants ou s'ils sont contaminés avec du tissu normal, le séquençage direct utilisé pour la détection des mutations *IDH1* peut donner des résultats faux négatifs. De ce fait, Un anticorps monoclonal spécifiquement dirigé contre la séquence protéique mutée d'*IDH1* majoritaire, *IDH1*^{R132H}, a

été développé et a nettement facilité la détection de cette altération en routine, contribuant ainsi à l'amélioration du diagnostic et du pronostic des ces tumeurs. En effet, l'immunohistochimie s'est révélée être une technique cliniquement avantageuse en terme de gain de temps et de coût, en plus de la simplicité de son implantation dans les laboratoires de pathologie. La sensibilité et la spécificité de cette technique atteint 100% (Krell D *et al.*, 2013).

Les mutations *IDH* avec d'autres altérations génétiques (telles que la co-délétion 1p/19q) permettent actuellement de guider les décisions thérapeutiques pour les gliomes diffus et ils permettront probablement, dans l'avenir, l'ajustement du traitement avec le profil moléculaire (Juratli TA *et al.*, 2015).

D'un autre côté, un inhibiteur de IDH1 (AGI-5198) a été développé et qui se lie spécifiquement et inhibe l'IDH1 muté. D'autres études ont tenté de cibler la fonction des protéines en amont ou en aval de l'IDH muté. Les résultats peuvent donner naissance à de nouvelles stratégies thérapeutiques (Davis M *et al.*, 2013; Rohle D *et al.*, 2013; Agnihotri S *et al.*, 2014). De plus, les résultats prometteurs des plusieurs études récentes qui ont tenté d'étudier la possibilité d'une immunothérapie ciblant les mutations *IDH* indiquent que celle-ci peut provoquer une réponse immunitaire anti-tumorale puissante (Schumacher T *et al.*, 2014; Pellegatta S *et al.*, 2015 ; Waitkus MS *et al.*, 2016).

6.2. Codélétion 1p / 19q

Les oligodendrogliomes se distinguent des autres tumeurs gliales par la présence de délétions récurrentes des chromosomes 1p et 19q. En effet, dans la version révisée 2016 de la classification de l'OMS, la co-délétion 1p/19q sert de marqueur biologique de diagnostic qui, conjointement avec la mutation *IDH*, définit les groupes d'oligodendrogliomes diffus et anaplasiques (Louis DN *et al.*, 2016). Cette codélétion est détectée dans environ 80% des oligodendrogliomes diffus, 60% des oligodendrogliomes anaplasiques, 40% des oligoastrocytomes diffus, 30% des oligoastrocytomes anaplasiques et moins de 10% des astrocytomes diffus (Pekmezci M *et al.*, 2015).

La codélétion 1p/19q fût pour la première fois observée au niveau du groupe oligodendrogliol par Reifenberger *et al.* en 1994. Plus tard, d'autres chercheurs ont démontré sa valeur prédictive à la chimiosensibilité (Cairncross JG *et al.*, 1998) et l'association de la codélétion 1p/19q à un meilleur pronostic a été validée dans plusieurs essais cliniques. En effet, les données de suivi à long terme des essais cliniques de phase III de RTOG 9402 et EORTC

26951 ont également révélé le rôle de la co-délétion 1p/19q dans la prédiction de la survie à long terme après un traitement agressif multimodal comprenant une résection chirurgicale suivie d'un traitement par radiothérapie combinée à la chimiothérapie utilisant la procarbazine, le CCNU et la vincristine (PCV) (Cairncross et al., 2013; Van den Bent et al., 2013). Dans les deux essais, l'analyse rétrospective des sous-groupes a montré que les patients possédant un oligodendrogliome anaplasique avec une co-délétion 1p/19q, avait significativement une survie globale (OS) plus longue lorsqu'ils reçoivent un traitement initial à base de radiothérapie plus PCV par rapport à un traitement initial à base de radiothérapie seule. En revanche, la survie des patients ayant un oligodendrogliome anaplasique avec 1p/19q intact a été significativement plus courte et ne diffère pas quelque soit le traitement administré radio-chimiothérapie concomitante ou radiothérapie seule. Ces données soulignent l'importance de la détection moléculaire de la co-délétion 1p/19q non seulement pour une classification plus précise des gliomes diffus et anaplasiques, mais aussi pour une meilleure stratification des patients soumis au traitement (Weller *et al.*, 2014).

Néanmoins, il convient de distinguer la vraie codélétion 1p/19q secondaire à la translocation centromérique déséquilibrée $t(1;19)(q10;p10)$, des pertes partielles du 1p et/ou du 19q, car seule la vraie codélétion est associée à un pronostic plus favorable, avec le gène chimérique hypothétique qui reste pour le moment encore inconnu (Ducray F, 2011).

Les tumeurs avec une codélétion 1p/19q possèdent presque invariablement les mutations de l'isocitrate déshydrogénase (*IDH*) (Labussiere M *et al.*, 2010).

Ils portent aussi fréquemment des mutations au niveau du gène *CIC* sur le chromosome 19q et moins fréquemment au niveau du gène *FUBP1* sur le chromosome 1p (Bettegowda C *et al.*, 2011 ; Jiao Y *et al.*, 2012). Ces tumeurs ne montrent généralement ni d'amplifications du récepteur du facteur de croissance épidermique (*EGFR*) qui sont fréquemment observées dans les glioblastomes primaires, ni des mutations *TP53* et *ATRX* qui sont communes dans les glioblastomes secondaires et les astrocytomes de grade inférieur (Liu XY *et al.*, 2012 ; Kannan K *et al.*, 2012). La combinaison de ces marqueurs multiples est particulièrement utile dans le diagnostic différentiel des oligodendrogliomes anaplasiques avec les astrocytomes à petites cellules, qui malgré la ressemblance morphologique considérable diffèrent radicalement en terme de comportement biologique.

L'évaluation de la codélétion 1p/19q est le plus souvent réalisée soit par hybridation in situ fluorescente (FISH) ou par l'analyse de perte d'hétérozygotie (LOH) sur un échantillon tumoral. De nouvelles techniques, telles que l'hybridation génomique comparative deviennent disponibles pour une utilisation clinique. Le choix de la technique dépend de l'expertise du

laboratoire, de l'équipement disponible pour les tests et de la préférence du clinicien et du pathologiste.

L'expression de l'alpha-internexine (INA), une protéine du neurofilament, a été proposée comme un marqueur de substitution à la codélétion 1p/19q, avec une sensibilité de 96% et une spécificité de 86% (Ducray F *et al.*, 2009). En effet, L'INA est exprimée par un grand nombre d'oligodendrogliomes présentant une codélétion 1p/19q. Le seuil d'expression de l'INA requis est de 10% sous forme de cluster. Toutefois, d'autres études ont rapporté des combinaisons de sensibilité/spécificité de 92%/64%, 79%/80% et 52%/85%, s'opposant ainsi à la détection immunohistochimique de l'INA comme technique suffisamment fiable pour remplacer les méthodes moléculaires actuelles (Eigenbrod S *et al.*, 2011 ; Buckley PG *et al.*, 2011 ; Nagaishi M *et al.*, 2014).

6.3. Altérations de l'*EGFR*

Le récepteur du facteur de croissance épidermique ou EGFR (epidermal growth factor receptor) est un récepteur à tyrosine kinase codé par le proto-oncogène *c-erbB1*. Le gène de l'*EGFR* se situe en 7p12. L'EGFR est une glycoprotéine transmembranaire qui contient un domaine de liaison de ligand extracellulaire et un domaine cytoplasmique contenant une tyrosine kinase. Cette liaison active la dimérisation et l'autophosphorylation du domaine cytoplasmique du récepteur.

L'altération génétique la plus fréquemment associée aux glioblastomes de novo est l'amplification de l'*EGFR*. Elle est identifiée dans 40% des glioblastomes primaires et rarement dans les glioblastomes secondaires. Il est important de signaler que tous les glioblastomes primaires avec une amplification de l'*EGFR* montrent une surexpression de l'EGFR. Cependant, 70 à 90% des glioblastomes primaires avec surexpression de l'EGFR montrent une amplification de l'*EGFR* (AH Thorne *et al.*, 2016). Une étude récente a démontré que les glioblastomes avec amplification et/ou surexpression de l'*EGFR* bénéficient fortement de thérapies à base de témozolomide (Cominelli M *et al.*, 2015).

De plus, les tumeurs avec amplification de l'*EGFR* pourraient montrer des altérations supplémentaires au niveau du même gène. Cela inclut la délétion des exons 2-7 (*EGFRvIII*), qui est présente dans 50 à 60% des glioblastomes avec *EGFR* amplifié.

Comme l'*EGFRvIII* n'est pas exprimé dans les tissus normaux, il constitue donc une cible pour une immunothérapie efficace. Pour cette raison, les stratégies vaccinales basées sur cette séquence peptidique unique, ont été développées et ont été testées dans différents essais de phase II. Actuellement, deux études évaluent l'effet thérapeutique du vaccin dirigé contre

EGFRvIII, rindopepimut, sur les cas de glioblastomes nouvellement diagnostiqués (CT01480479) mais aussi sur les cas récurrents (CT01498328). Une étude récente a également démontré que l'amélioration de la survie des patients atteints de glioblastome bénéficiant de thérapies à base de témozolomide et montrant une surexpression de l'EGFR est associée à l'activation de la voie EGFR / PI3K / Akt indépendamment de la présence du variant *EGFRvIII* (Cominelli M *et al.*, 2015).

Il est donc important de déterminer le statut du gène *EGFR* pour une meilleure stratification des patients inclus dans les essais cliniques, mais aussi dans le cas des thérapies personnalisées (Faulkner C *et al.*, 2014).

L'amplification de l'*EGFR* est détectée par FISH en calculant le rapport de l'*EGFR*/CEP7. Cette méthode, cependant, ne permet pas de détecter les mutations de l'EGFR, y compris la variante *EGFRvIII*. D'autres techniques comprennent entre autres l'hybridation in situ chromogène avec des limitations similaires. La PCR quantitative peut également être utilisée pour détecter à la fois l'amplification et les mutations. L'IHC est une méthode sensible mais non spécifique pour évaluer l'amplification de l'*EGFR* parce que tous les cas d'amplification *EGFR* montrent une surexpression de l'EGFR par IHC, mais certains gliomes sont immunopositifs en raison de la surexpression en dépit d'un manque d'amplification génique. En outre, différents clones avec une meilleure sensibilité et une spécificité contre-*EGFR* de type sauvage et *EGFRvIII* ont été rapportés.

6.4. Méthylation du promoteur du gène *MGMT*

Le gène *MGMT* (O6-méthylguanine ADN méthyltransférase) est un gène de 299kb, situé en 10q26 et code pour une protéine de réparation des lésions d'ADN. Elle a pour fonction principale de réparer les adduits alkyls en position O6 des guanines. Ainsi, les cellules tumorales présentant des niveaux élevés d'activité *MGMT* peuvent conduire à une chimiorésistance après traitement par Témozolomide (agent alkylant). Inversement, l'inhibition de *MGMT* par méthylation de son promoteur conduit à une faible expression de la protéine *MGMT* et diminue ainsi son activité réparatrice de l'ADN, ce qui augmente la sensibilité aux agents alkylants et rend la tumeur chimiosensible (Weller M *et al.*, 2012).

Dans les glioblastomes, le mécanisme d'inactivation de *MGMT* le plus fréquent est la méthylation de la région promotrice retrouvée dans 40 à 57% des cas (Hegi ME *et al.*, 2005 ; Bleeker FE *et al.*, 2012). Cette méthylation est un marqueur prédictif de la réponse au

traitement par le Témzolomide (Hegi ME *et al.*, 2005 ; Bleeker FE *et al.*, 2012). Néanmoins, des études récentes ont montré que les patients porteurs de cette modification épigénétique et qui ont reçu un traitement par témzolomide en association à une radiothérapie ou à un traitement par carmustine, ont une augmentation de la médiane de survie de 5 à 9 mois (Kim YS *et al.*, 2012 ; Lechapt-Zalcman E *et al.*, 2012). Ceci implique que cette méthylation représenterait un marqueur de bon pronostic.

Compte tenu de l'importance du statut *MGMT* dans la prise en charge thérapeutique, plusieurs techniques moléculaires ont été développées pour mettre en évidence cette méthylation du promoteur (MS-PCR qui reste la technique de référence, HRM, MethylLight, COBRA, le pyroséquençage et l'immunohistochimie). La sensibilité et la spécificité de ces techniques varient d'une étude à l'autre (Von Deimling A *et al.*, 2011). Néanmoins, le STIC ECOM a montré, dans sa phase rétrospective, que le pyroséquençage était la meilleure technique analysant la méthylation du promoteur *MGMT* et permettant de prédire la survie globale et sans récurrence de patients atteints de glioblastomes et traités à l'initial par radiochimiothérapie concomitante (Quillien V *et al.*, 2012). D'un autre côté, plusieurs équipes ont tenté de montrer l'intérêt de l'immunohistochimie dans la prédiction de la réponse aux traitements alkylants (Chinot OL *et al.*, 2007). Cependant, il n'existe pas de corrélation fiable entre l'expression de la protéine et la méthylation du promoteur. De plus, l'expression de *MGMT* en immunohistochimie est difficile à analyser.

6.5. Fusion *BRAF* et mutations

BRAF est un membre de la voie RAS / RAF / MEK / ERK protéine kinase (mitogen-activated protein kinase, MAPK). Cette voie joue un rôle important dans la prolifération cellulaire, la survie cellulaire et la différenciation (Von Deimling A *et al.*, 2011).

Les altérations du gène *BRAF* impliquées dans les tumeurs primaires du système nerveux central peuvent être sous forme de gènes de fusion oncogéniques (*KIAA1549: BRAF*) ou des mutations faux-sens de type V600E (Schindler G *et al.*, 2011).

En 2008, une duplication focale d'environ 2,5 Mb située en 7q34 a été signalée comme étant une caractéristique commune d'un large nombre d'astrocytomes pilocytiques (Jones DT *et al.*, 2008). Peu de temps après, il a été montré qu'un gain dans cette région a entraîné une nouvelle fusion entre le gène *KIAA1549* et l'oncogène *BRAF* (Jones DT *et al.*, 2008 ; Jones DT *et al.*, 2009). L'étude menée par Jones *et al.* a démontré en outre que cette fusion a donné lieu à une

activation constitutive de l'activité kinase de BRAF. La duplication en tandem entre les gènes *KIAA1549* et *BRAF* se produit dans 70% des astrocytomes pilocytiques (Jones DT *et al.*, 2008 ; Jones DT *et al.*, 2009) et un total de cinq combinaisons exoniques différentes des deux gènes ont été décrits *KIAA1549: BRAF* exon 16-exon 9, exon 15-exon 9, exon 16-exon 11, exon 18-exon 10 et l'exon 19-exon 9 (Jeuken JW *et al.*, 2010). Dans environ 2% de ces tumeurs, il se produit un autre mécanisme d'activation de la voie MAPK, par duplication en tandem en 3p25 conduisant à la fusion oncogénique entre *SRGAP3* et *RAF1* (Forsheew T *et al.*, 2009 ; Jones DT *et al.*, 2009).

La mutation faux-sens du gène *BRAF* de type V600E constitue un autre mécanisme d'activation de la voie MAP / ERK. Cette mutation est due à un échange d'un nucléotide T en A au niveau du codon 600, qui se traduit par le remplacement de la valine par l'acide glutamique (V600E) (Horbinski C *et al.*, 2012). Cette dernière est notée dans environ 10% des astrocytomes pilocytiques pédiatriques, et cela semble être plus fréquent dans les tumeurs extra-cérébelleuses (Jeuken JW *et al.*, 2010 ; Horbinski C *et al.*, 2012). Il est à noter que cette même mutation est courante dans d'autres gliomes pédiatriques de bas grade : 80% des cas de xanthoastrocytomes pléomorphiques et 25% des gangliogliomes (Horbinski C *et al.*, 2012), ce qui en fait un marqueur de diagnostic précieux pour ces tumeurs rares.

D'une manière générale, la voie de signalisation de *BRAF* est altérée dans 85% des astrocytomes pilocytiques, soit du fait du gène de fusion *KIAA1549: BRAF*, ou du fait d'une mutation de *NF1* (qui inhibe *RAS* qui est en amont de *BRAF*), soit encore du fait de mutations de *BRAF* (Jones DT *et al.*, 2008). La recherche de l'une de ces altérations est utile pour différencier les astrocytomes pilocytiques des astrocytomes diffus de bas grade, constituant ainsi un biomarqueur diagnostique important.

7. Prise en charge thérapeutique des gliomes

La chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie sont actuellement les trois modalités thérapeutiques disponibles. La stratégie thérapeutique commencera, dans la mesure du possible, par réséquer la tumeur de manière aussi complète que possible et dans l'idéal sans séquelles. On fait appel pour cela à des techniques opératoires modernes, telles que le marquage par fluorescence avec l'acide 5-aminolavulinique (ALA), à des interventions sur patients éveillés, à l'IRM fonctionnelle peropératoire, au monitoring électrophysiologique avec mapping, etc. Toutes ces techniques visent une résection aussi complète que possible tout en préservant au maximum le tissu fonctionnel. Quel que soit leur grade histologique, les

gliomes sont des tumeurs infiltrantes et ne sont donc pas vraiment accessibles à une résection complète. Une intervention seule ne saurait ainsi être curative et les prélèvements de matériel de biopsie retrouvent parfois de manière isolée des cellules gliomateuses très éloignées du site de résection. La radiothérapie adjuvante avec ou sans chimiothérapie est préconisée en fonction du grade tumoral et de l'histologie.

Les astrocytomes pilocytiques sont principalement traités par chirurgie (Résection complète). Cela peut être suivie par la radiothérapie, en particulier quand il y a eu une résection incomplète. La chimiothérapie peut être administrée dans les cas où la tumeur progresse, en particulier lorsque la chirurgie n'est pas possible.

Pour les gliomes de haut grade, le traitement est difficile du fait que l'entreprise thérapeutique n'est que palliative et l'évolution vers un grade supérieur est d'emblée prévisible. L'objectif donc est d'obtenir, dans la mesure du possible, une prolongation de qualité de vie acceptable.

7.1. Chirurgie

L'acte neurochirurgical est au cœur du processus diagnostique et thérapeutique : le temps chirurgical est premier et est celui autour duquel tout s'organise. Il est classique de lui attribuer trois objectifs :

- obtenir des prélèvements tumoraux qui permettront de confirmer le diagnostic : biopsie stéréotaxique ou geste d'exérèse;
- améliorer l'état clinique en réduisant l'expression symptomatique de la lésion : par réduction du volume tumoral, évacuation d'un contenu kystique, libération ou dérivation des voies du liquide céphalorachidien;
- participer au traitement oncologique en diminuant la masse tumorale et en supprimant les sanctuaires faiblement vascularisés qui échapperaient aux effets de l'irradiation ou à l'action des agents chimiothérapeutiques. (Chang EF *et al.*, 2008)

L'intérêt d'une résection chirurgicale la plus large possible est clairement démontré. En effet, plusieurs études rétrospectives de qualité ont montré qu'il existait une corrélation entre l'étendue de la résection et la survie sans progression, la survie globale et le délai avant virage anaplasique (Smith JS *et al.*, 2008 ; McGirt MJ *et al.*, 2008). Cependant, la faisabilité de l'acte chirurgical dépend de la localisation du processus tumoral par rapport aux aires fonctionnelles. Quand la tumeur est située en zone fonctionnelle ou à proximité, la chirurgie

éveillée avec stimulations corticales et sous-corticales peropératoires est probablement la technique chirurgicale qui permet d'aboutir à l'exérèse la plus large avec la morbidité la moins importante (Duffau H, 2005 ; Smith JS *et al.*, 2008).

7.2. Radiothérapie

La radiothérapie est une méthode de traitement locorégional utilisant des radiations pour détruire les cellules cancéreuses en bloquant leur capacité à se multiplier. L'irradiation a pour but de détruire toutes les cellules tumorales tout en épargnant les tissus sains périphériques.

La radiothérapie occupe, après la chirurgie, une place importante dans le traitement des tumeurs cérébrales. Elle a permis d'améliorer le pronostic global de ces tumeurs. Cependant, le délai entre la chirurgie et la première séance de radiothérapie doit être le plus court possible, logiquement inférieur à 5 semaines (Stupp R *et al.*, 2005).

La radiothérapie reste le traitement complémentaire de référence des gliomes de bas grade. Elle permet un ralentissement de la croissance tumorale, souvent une diminution du volume lésionnel et une amélioration des symptômes, notamment de l'épilepsie (van den Bent MJ *et al.*, 2005).

Deux études de phase III ont montré que la dose optimale se situe entre 45-50 Gy et que des doses supérieures n'apportent pas de bénéfice en termes de survie globale ou sans progression (Karim AB *et al.*, 2002 ; Shaw E *et al.*, 2002).

La radiothérapie fait partie du traitement standard de tout gliome malin, mais la réponse n'est que de courte durée et la récurrence va survenir le plus souvent au niveau de la berge de résection lésionnelle et des champs d'irradiation.

Par ailleurs, elle est responsable d'effets toxiques liés à l'exposition des tissus sains. Ils peuvent être précoces et transitoires (fatigue, perte d'appétit, nausées et perte de la mémoire à court terme), causés essentiellement par une démyélinisation temporaire au niveau des oligodendrocytes et des œdèmes (Hoffman WF *et al.*, 1979) ou par une perméabilité capillaire (Delattre JY *et al.*, 1988) et peuvent être traités avec des corticoïdes. Les effets tardifs, survenant de plusieurs mois à plusieurs années après le traitement, sont quant à eux souvent irréversibles et sont liés aux dommages directs causés au cerveau et aux vaisseaux.

7.3. Chimiothérapie

Le caractère transitoire des résultats obtenus par l'association « chirurgie plus radiothérapie » a conduit, dans les années 1970, à poser la question de l'intérêt de traitements complémentaires ou combinés, par chimiothérapie (Chatel M *et al.*, 1993).

La chimiothérapie correspond à l'utilisation de molécules chimiques ayant un effet sur les cellules engagées dans le cycle cellulaire. Elle est administrée oralement ou par injection. Cependant, les substances sensées agir au niveau du cerveau doivent avoir des propriétés lipophiles pour traverser la barrière hématoencéphalique. Dans les glioblastomes, la barrière hématoencéphalique est certes partiellement perméable (prise du produit de contraste), mais ceci uniquement au sein de la masse tumorale et non dans la zone d'infiltration.

Historiquement, les nitrosourées (Carmustine [BCNU], la lomustine [CCNU]) ont été les premières substances reconnues comme étant efficaces contre les tumeurs cérébrales. Jusqu'à la fin des années 1990, les études sur les chimiothérapies ont toujours inclus une nitrosourée seule ou la CCNU en combinaison avec la procarbazine et la vincristine (schéma dit PCV). Le témozolomide (Temodal®) est commercialisé depuis l'année 2000; sa bonne tolérance globale et la flexibilité de son dosage a depuis largement remplacé les anciennes substances dans le traitement de première ligne.

Le témozolomide est un dérivé de la dacarbazine. Il est converti spontanément au pH physiologique en un métabolite actif, le 5-(3-méthyl)-1-triazén-1-yl-imidazole-4-carboxamide (MTIC). Cette molécule est administrée par voie orale et présente une excellente pénétration dans le tissu cérébral et le liquide cérébrospinal (Newlands ES *et al.*, 1992). La conversion spontanée du témozolomide en MTIC produit un composé capable de méthyle l'ADN (Denny BJ *et al.*, 1994). 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.

Il est recommandé de débiter le traitement environ trois à quatre semaines après la résection chirurgicale avec une radiothérapie focale sur le site de la lésion avec des marges d'environ 2 cm, administrée pour un total d'environ 60 Gy, en fractions de 1,8 à 2 Gy par jour (en général une trentaine de sessions sur six semaines). Une prophylaxie antiémétique par antagoniste de 5-HT3 n'est recommandée que pour les premiers jours de traitement. Par la suite, la majorité des patients n'ont besoin d'aucune prophylaxie. Les autres effets secondaires immédiats de ce traitement sont en général minimes et consistent principalement en fatigue et constipation (Hottinger AF *et al.*, 2008).

Chapitre II : Matériel et méthodes

1. Description de la population d'étude :

Il s'agit d'une étude rétrospective qui a concerné 133 patients recrutés au service d'anatomopathologie et de pathologie tumorale au centre hospitalier universitaire Hassan II de Fès durant la période de Janvier 2010 à Décembre 2014. L'analyse histologique a été effectuée par un à deux anatomopathologistes différents. Les critères d'inclusion dans l'étude étaient le diagnostic d'une tumeur gliale avec son grading (de I à IV) selon les critères de la classification de l'OMS version 2007.

Le tableau suivant décrit en détail la répartition de ces tumeurs gliales incluses dans notre étude en fonction de l'histologie et du grade selon les recommandations de la classification de l'OMS 2007 :

Grade de malignité	Type histologique	Nombre de cas
Grade I	Astrocytome pilocytaire	20
	Astrocytome	13
Grade II	Oligodendrogliome	7
	Oligo-astrocytome	3
	Astrocytome	6
Grade III	Oligodendrogliome	23
	Oligo-astrocytome	3
Grade IV	Glioblastome	58
Total		133

2. Etude histologique des tumeurs gliales

2.1. Examen histologique extemporané

Il s'agit d'un examen anatomopathologique demandé par le chirurgien lors d'un acte chirurgical alors que le patient est toujours en salle d'opération. Cet examen a pour but d'orienter ou de conditionner le geste thérapeutique chirurgical. Ce type d'examen est considéré comme urgent. Le résultat doit être communiqué dans les plus brefs délais.

Les motifs les plus fréquents de demandes d'examens histologiques extemporanés consistent en :

- ✓ La confirmation de la nature tumorale du prélèvement (surtout lorsqu'il s'agit d'une biopsie stéréotaxique) ;
- ✓ La détermination de la nature de la tumeur : primitive versus secondaire, bas grade versus haut grade ;

Le plus souvent, des coupes au cryostat sont nécessaires (utiles pour les tumeurs denses). S'en suit une coloration rapide, qui permet un résultat en moins de 30 min. En complément la réalisation d'un « ecrasi » ou « smear » est possible.

Cependant, au cours d'un examen extemporané, la morphologie tissulaire n'est pas d'aussi bonne qualité qu'après une fixation et inclusion en paraffine, en raison de la congélation qui altère la morphologie cellulaire. En outre, ce type d'examen est obligatoirement complété par l'inclusion en paraffine afin de pouvoir contrôler le diagnostic proposé.

2.2. Fixation du tissu

La fixation est indispensable pour conserver la morphologie tissulaire la plus proche possible de la situation "in vivo". Elle doit être immédiate ou au moins très rapidement débutée après l'obtention du prélèvement afin de prévenir toute autolyse ou attaque microbienne. Toute fixation défectueuse rend l'étude anatomopathologique difficile voire impossible.

La durée de la fixation dépend de la taille du prélèvement : un minimum de 2 à 5 heures pour une biopsie et de 24 à 48 heures pour une pièce opératoire est recommandée.

Le choix du type de fixateur incombe aux laboratoires de pathologie. Cependant, seuls les prélèvements histologiques fixés au formol à 10% tamponné à pH neutre pourront être analysés par les techniques de biologie moléculaire. Il est à noter que, pour une fixation optimale, la quantité de formol doit recouvrir en totalité l'échantillon et correspondre à au moins 5 fois son volume.

2.3. Etude macroscopique

L'examen macroscopique détaillé est une partie essentielle de l'étude d'une pièce opératoire : la pièce est examinée, mesurée, pesée puis disséquée.

Après le choix des prélèvements destinés à l'analyse microscopique, les restes de la pièce opératoire sont conservés pendant quelques jours ou semaines afin de pouvoir en cas de nécessité effectuer des prélèvements complémentaires.

On note que pour les tumeurs cérébrales, il est recommandé d'inclure, chaque fois que c'est possible, la totalité du prélèvement sinon effectuer un prélèvement par centimètre.

2.4. Imprégnation et inclusion

Les prélèvements sont déposés dans des cassettes en plastique avec une référence appropriée (Index Patient : IP). Les tissus contenus dans les cassettes sont ensuite déshydratés par passage dans l'alcool. L'alcool est éliminé par des solvants (xylène ou toluène), puis la paraffine liquide à 56 °C imprègne les tissus et est refroidie. Ces étapes sont automatisées dans des appareils à inclusion. Cependant, l'étape finale de l'inclusion reste manuelle et consiste à réorienter convenablement le fragment tissulaire dans le sens de la coupe dans un moule de paraffine.

2.5. Coupes et coloration

Des coupes de 3 à 5 microns d'épaisseur sont effectuées par un microtome et étalées sur des lames en verre. La coloration hématoxyline-éosine (HE) est alors réalisée. C'est une coloration dichromatique qui est obtenue par l'utilisation de deux colorants, l'hématoxyline qui colore les noyaux en violet foncé et l'éosine qui colore le cytoplasme en rose. C'est la coloration de base pour toute étude histologique en anatomopathologie.

Suite au passage des lames contenant les tissus coupés à l'étuve réglée à 60°C pendant toute une nuit, elles sont traitées par deux bains successifs de toluène pour une durée de 5min chacun. Ensuite, le tissu est mis dans des bains d'éthanol à concentration croissante (70%, 80% et 100%) durant 5min pour chaque bain. Puis, un lavage pendant 1min à l'eau courante est réalisé. L'étape de déparaffinage est alors terminée et nous passons à l'application des différentes colorations. Les lames sont alors immergées dans un bain d'hématoxyline pendant 5min puis lavées à l'eau courante pendant 1min avant un passage dans des bains d'alcool chlorhydrique et d'alcool ammoniacal. Après un rinçage à l'eau courante, les lames sont mises dans un bain d'éosine à 2% pendant 5min. Ensuite, un passage rapide dans une

succession de bains d'éthanol à concentrations croissantes est réalisé. Les lames passent alors dans un bain d'éthanol-méthanol pendant 1min puis dans un bain de toluène.

La coupe colorée est protégée par une lamelle de verre collée. Elle est alors prête à être analysée au microscope photonique.

3. Etude immunohistochimique des tumeurs gliales

3.1. Protocole d'étude

Pour chacune des 133 tumeurs étudiées, un bloc de paraffine représentatif de la tumeur est sélectionné par un anatomopathologiste. Des coupes de 5µm sont réalisées et montées à l'eau distillée sur des lames de verre prétraitées pour une adhésion maximale du fragment tissulaire. Les lames sont ensuite incubées une nuit à l'étuve à 58°C. Le lendemain, les lames sont déparaffinées dans deux bains de toluène, puis plongées dans trois bains d'éthanol avant d'être réhydratées et rincées à l'eau courante.

Les coupes histologiques sont ensuite incubées dans une solution de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) pendant 10 min afin d'inhiber les activités enzymatiques endogènes et améliorer ainsi la qualité de l'immunomarquage. Un démasquage antigénique par la chaleur est ensuite effectué pour pallier aux changements de conformation des épitopes induits par la fixation des tissus. Les lames sont alors immergées dans une solution de tampon de citrate à pH=6 préalablement chauffé à 96°C. Un rinçage au PBS (Phosphate Buffered Saline) pendant 5min est réalisé après refroidissement des lames, s'en suit une incubation à la protéine bloquante pendant 15min puis une incubation avec l'anticorps primaire. Le temps d'incubation de ce dernier diffère selon la nature de l'anticorps. En effet, cette durée d'incubation a été mise au point et ajustée pour chaque anticorps et peut durer jusqu'à 60 min. Après passage dans deux bains de PBS, l'anticorps secondaire est appliqué pendant 30 à 60 min. Ensuite, après un nouveau rinçage au PBS, le complexe peroxydase-streptavidine est appliqué durant 15 à 20 min. Les lames étaient alors recouvertes, pendant 4 à 10min, d'une solution de révélation composée de 5ml d'Amino-Ethyl-Carbazole (AEC) avec 2 gouttes de chromogène. Par la suite, un rinçage à l'eau courante (10min) était effectué puis dans un bain d'hématoxyline qui permet une coloration intense des noyaux et de façon moins prononcée du cytoplasme. Par ailleurs, cette contre-coloration ne doit pas être forte à défaut de masquer l'immunomarquage de faible intensité. Pour cela, nous avons réduit le temps d'incubation des lames dans l'hématoxyline de 4 min à 30 sec. Enfin, les lames sont trempées dans un bain de carbonate de lithium saturé et le montage des lamelles d'immunohistochimie est un montage à l'eau.

3.2. Evaluation du marquage immunohistochimique

Le pannel d'anticorps utilisé pour le diagnostic d'un gliome diffus de l'adulte est assez riche. Elle associe des marqueurs de lignage (GFAP, Olig2), des marqueurs de prolifération (Ki67) et le trépied à visée pronostic IDH1/p53/INA :

- Anticorps anti-Ki67 : le Ki67 fait partie des marqueurs de prolifération cellulaire. Cet antigène est présent au niveau du noyau des cellules prolifératives et persiste tout au long des différentes phases du cycle cellulaire (G1, S, G2, M). Il est absent en phase G0. En pratique, l'index Ki67 représente le pourcentage de noyaux colorés par l'anticorps anti-Ki67 au sein de la prolifération tumorale.
- Anticorps anti-P53 : la mutation du gène *TP53*, fréquemment observée dans les tumeurs astrocytaires, s'accompagne d'une accumulation nucléaire de la protéine P53 mutée. Le marquage est interprété comme positif si plus de 10% des cellules tumorales présentent un marquage nucléaire de forte intensité.
- Anticorps anti-GFAP : la GFAP est une protéine du cytosquelette exprimée par les tumeurs astrocytaires. Le marquage est considéré positif lorsque les cellules tumorales présentent un marquage cytoplasmique.
- Anticorps anti-IDH1 : cet anticorps reconnaît la mutation majoritaire R132H. L'expression intéresse la totalité des cellules gliomateuses et se caractérise par un marquage cytoplasmique fort et diffus avec un renforcement nucléaire.
- Anticorps anti-Olig2 : L'Olig2 est un facteur de transcription exprimé par les précurseurs oligodendrogliaux du tube neural au cours du développement embryonnaire et par les oligodendrocytes matures. Le marquage est exprimé au niveau nucléaire.
- Anticorps anti-INA : L'interneuxine alpha est un neurofilament de classe IV impliqué dans la morphogenèse neuronale. C'est un marqueur immunohistochimique prédictif de la codélétion 1p19q. Son expression est cytoplasmique sous forme d'un croissant ou d'une boule paranucléaire. L'expression immunohistochimique de l'INA est prédictive de la codélétion 1p19q si plus de 10% des cellules tumorales sont positives avec au moins un amas (« cluster ») tumoral.

Sur le plan technique, nous avons procédé à des dilutions en cascade pour chaque anticorps. Le but était de déterminer la concentration adéquate que nous devons déposer sur le tissu, tout en évitant les marquages aspécifiques et les bruits de fond qui altèrent la qualité des lames étudiées.

Les dilutions utilisées ainsi que les caractéristiques de chacun des anticorps étudiés sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 3 : Caractéristiques des différents anticorps utilisés dans notre étude immunohistochimique.

Anticorps	Fournisseur	Espèce	Pré-traitement	Dilution
Ki-67	DAKO	Polyclonal de lapin	Tampon citrate	1 : 20
p53	DAKO	Monoclonal de souris	Tampon citrate	1 : 20
GFAP	DAKO	Polyclonal de lapin	Tampon citrate	1 : 100
IDH1	DIANOVA	Monoclonal de souris	Tampon citrate	1 : 100
Olig2	IMGENEX	Polyclonal de lapin	Tampon citrate	1 : 50
INA	ABGENT	Monoclonal de souris	Tampon citrate	1 : 40

Il est à noter que des témoins positifs et négatifs ont été inclus dans chaque étude immunohistochimique comme contrôles externes. Ces témoins nous ont permis de valider la spécificité de la technique d'immunohistochimie et d'éviter les faux marquages (faux positifs et faux négatifs).

4. Etude moléculaire des tumeurs gliales

4.1. Extraction d'ADN génomique pour analyses moléculaires

Après sélection d'un bloc tumoral pour chaque patient, la zone tumorale est déterminée par un pathologiste dans le but d'augmenter le nombre de cellules tumorales et d'éviter par conséquent les faux positifs. L'extraction d'ADN sur tissus inclus en paraffine est ainsi réalisée sur la zone tumorale sélectionnée. Le protocole d'extraction d'ADN par Kit (QIAamp® DNA FFPE Tissue) se déroule en 5 étapes majeures :

4.1.1. Déparaffinage

Dans un tube eppendorf de 1,5 ml, 10 coupes de 5µm sont réalisées et 1ml de toluène est ajouté pour retirer la paraffine. Après centrifugation et rejet du surnageant, 1ml d'éthanol est ajouté afin d'éliminer les résidus de toluène sur l'échantillon. Une nouvelle centrifugation permet d'éliminer le surnageant et une incubation des échantillons pendant 10min à 37°C permet l'évaporation des résidus d'éthanol.

4.1.2. Lyse des tissus

Le culot ainsi obtenu est resuspendu dans 180µl de tampon de lyse (tampon ATL) et 20µl de protéinase K est ajoutée. Le tout est alors incubé, toute la nuit, sous agitation dans une étuve à 56°C. Si au bout de cette nuit le tissu est digéré, le temps d'incubation sera augmenté jusqu'à dégradation totale du fragment tissulaire.

4.1.3. Isolement de l'ADN

2µl de RNase A (100 mg/ml) est ajouté et est incubé durant 2min à température ambiante pour obtenir un ADN génomique sans ARN.

L'isolement de l'ADN des débris cellulaires et protéiques se fait par un mélange Tampon AL/Ethanol préparé au préalable (200µl du tampon AL + 200µl d'éthanol).

L'ensemble du lysat est transféré soigneusement dans une colonne *QIAamp MinElute*. Une centrifugation à 8000rpm pendant 1min permet d'écouler le lysat à travers la membrane de la colonne, sinon une centrifugation à vitesse supérieure est requise jusqu'à ce que la colonne *QIAamp MinElute* se vide complètement.

4.1.4. Lavage de l'ADN des contaminants résiduels

500µl du tampon de lavage AW1 est ajouté à la colonne. Le tout est centrifugé à 8000rpm pendant 1min et le volume écoulé est éliminé. Un nouveau lavage avec 500µl du tampon AW2 est effectué, suivi d'une centrifugation à 8000rpm pendant 1min et rejet du volume écoulé. Ensuite, une centrifugation à vitesse maximale (14000rpm) pendant 3min est requise pour sécher la membrane de la colonne de toute trace d'éthanol contenu dans les solutions de lavage.

4.1.5. Elution et quantification de l'ADN

60µl du tampon d'élution ATE est appliqué au centre de la membrane de la colonne *QIAamp MinElute*. Le tout est incubé pendant 20min à 70°C puis pendant 5min à température ambiante. La centrifugation à vitesse maximale (14000rpm) pendant 1min, permet de récupérer la solution contenant l'ADN dans un tube eppendorf de 1,5ml.

Enfin, L'ADN extrait est dosé par spectrophotométrie à 260nm sur Nanodrop®. Cette étape finale permet de quantifier l'ADN et déterminer sa pureté.

4.2. Recherche des mutations *IDH*

4.2.1. Réaction en chaîne par polymérase (PCR)

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique d'amplification d'ADN *in vitro*. Elle permet d'obtenir une quantité suffisante et détectable d'une séquence d'ADN choisie (matrice) à partir d'amorces spécifiques. Le procédé nécessite la succession de nombreux cycles. Chaque cycle de PCR est constitué de trois étapes, effectuées à températures différentes, permettant ainsi de contrôler l'activité enzymatique :

1. l'étape de dénaturation (réalisée à environ 95°C) pour une dissociation complète des deux brins d'ADN.
2. l'étape d'hybridation se fait à une température qui est définie selon la nature des amorces (entre 50 à 60°C). Cette température va déterminer la stabilité des hybrides une fois que l'appariement amorces / matrice est réalisé.
3. l'étape de polymérisation est à environ 72°C, température de fonctionnement optimal de la Taq polymérase. Au cours de cette étape, les brins complémentaires d'ADN sont synthétisés à partir des extrémités 3'OH libre des amorces hybridées.

Pour cette étude, nous nous intéressons à la recherche des mutations ponctuelles au niveau de l'exon 4 du gène *IDH1* et l'exon 4 du gène *IDH2*. Deux couples d'amorces sont ainsi utilisées et représentées dans le tableau suivant :

Tableau 4 : Amorces utilisées pour la mise en évidence des mutations des gènes *IDH 1* et *2*.

Nom de l'amorce	Séquence nucléotidique
IDH1 - F	5'-AGA AGA GGG TTG AGG AGT TCA A-3'
IDH1 - R	5'-CAC ATA CAA GTT GGA AAT TTC TGG-3'
IDH2 - F	5'-TTG GCA GAC TCC AGA GCC CA-3'
IDH2 - R	5'-GCC CGG TCT GCC ACA AAG TC-3'

Le milieu réactionnel est préparé à partir d'une concentration d'ADN de 100 ng/μl selon les indications du tableau 5. Les conditions de PCR sont résumées dans le tableau 6.

Tableau 5 : Composition du milieu réactionnel pour la détection des mutations des gènes *IDH 1* et *2*.

Mix PCR	Concentration initiale	Volume pour une réaction
Tampon PCR	10X	10 µl
dNTP	10 mM	2 µl
Amorce F	10 µM	2 µl
Amorce R	10 µM	2 µl
Taq polymérase		0,4 µl
Eau pure (qsp 50µl)	---	28,6 µl
ADN amplifié	100ng/µl	5 µl

Tableau 6 : Programme PCR de l'exon 4 des gènes *IDH1* et *IDH2*.

Cycles	Temps	Température
Dénaturation	5 min	94°C
Dénaturation	30 sec	94°C
Hybridation	45 sec	60°C
Elongation	1 min	72°C
Elongation finale	10 min	72°C
Conservation	∞	8°C

A la fin de la PCR, un gel d'agarose à 2% est préparé. Pour chaque échantillon, 5 µl du produit PCR est mélangé avec 2 µl de tampon de charge. La migration se déroule à 100V et la visualisation des bandes est faite sous ultraviolet.

4.2.2. Purifications et séquençage

L'exoSAP permet des purifications du produit PCR simples et rapides pour le séquençage d'ADN. Lorsque l'amplification par PCR est terminée, le réactif ExoSAP élimine les contaminants de types dNTPs et amorces non consommées qui, restant dans le mélange, pourraient interférer avec les étapes de séquençage. L'exoSAP utilise deux enzymes

hydrolytiques, l'exonucléase I et la phosphatase alcaline. L'exonucléase I supprime les amorces simple brin résiduelles et tous les ADN simple brin étrangers produits dans la PCR. La phosphatase alcaline supprime les dNTPs restant dans le mélange de la PCR.

Pour la purification de nos produits PCR, 2,5µl d'exoSAP était ajouté directement à 5.5µl de produit PCR et le tout était incubé à 37°C pendant 30min. Le réactif ExoSAP était ensuite inactivé par un simple chauffage à 80°C pendant 30min.

Après purification des produits PCR, nous procédons à la préparation du mix de PCR de séquence. La réaction de séquence que nous utilisons au laboratoire repose sur la méthode de SANGER ou méthode des interrupteurs de chaîne. Le principe de ce séquençage est de réaliser, à partir d'amorces, des copies incomplètes d'une molécule d'ADN (matrice), interrompues au hasard. L'interruption est provoquée par l'incorporation aléatoire lors de la copie, d'un didésoxyribonucléotide (ddNTP) couplé à un marqueur fluorescent (ou fluorophore), qui bloque la réaction de PCR. Comme nous travaillons sur un très grand nombre de molécules de matrice (amplicon), nous obtenons toutes les copies partielles possibles. Les différents fragments sont ensuite séparés selon leur taille par électrophorèse capillaire. Le fluorophore étant différent selon la base, il est possible d'identifier le nucléotide au niveau duquel la copie s'est interrompue et reconstituer la succession des nucléotides tout au long de la copie. De ce fait, tous les fragments d'ADN synthétisés porteront ce fluorophore terminal appelé terminateur d'élongation ou "BigDye Terminator".

La technologie Big Dye Terminator (BDT) utilise un système de transfert d'énergie par résonance (FRET) entre deux fluorochromes fixés sur le même ddNTP et reliés entre eux par un linker. Le premier est une fluorescéine (6 carboxyfluorescéine) appelé fluorochrome donneur, commun aux quatre ddNTP. Le second est une dichlororhodamine (dRhodamine) qui joue le rôle de fluorochrome accepteur.

Le fluorochrome donneur est excité par un rayon laser à argon émettant à 488nm et 514,5nm. Son énergie de fluorescence émise (515-520nm) est captée intégralement par le fluorochrome accepteur qui est excité à son tour. Le fluorochrome accepteur ou dichloroRhodamine est différent pour chaque type de ddNTP.

Tableau 7 : Spectre d'émission des dichloroRhodamines spécifiques de chaque type de ddNTP.		
ddNTP	DichloroRhodamines utilisées	Spectre d'émission Maximum
A	dR6G	560-565nm
T	dROX	615-620nm
C	dR110	530-535nm
G	dTAMRA	590-595nm

Le spectre de la fluorescence réémise sera ainsi spécifique de chaque type de ddNTP. Le transfert du signal de la fluorescéine vers la dRhodamine permet une amplification du signal et, par conséquent, une augmentation de la sensibilité de la technique (fig. 13).

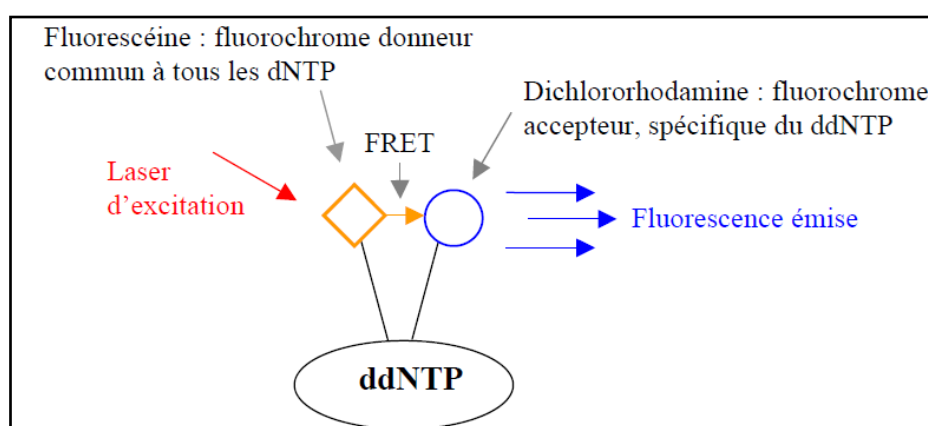


Figure 13 : Mécanisme de la fluorescence par la technique du transfert d'énergie par résonance.

La composition du mix réactionnel de la PCR de séquence ainsi que les conditions de programmation sont résumées dans les tableaux 8 et 9.

Tableau 8 : Composition du mix de PCR de séquence.

Réactifs	Volume (µl)
Big Dye terminator V3.1	1
Amorces F ou R (6 µM)	2
Sequencing buffer	1.5
Eau stérile	3.5
Produit PCR purifié	2

Tableau 9 : Programmation de la PCR de séquence.

Température et cycles		Temps
96°C		1 min
95°C	} ×25	10 sec
50°C		5 sec
60°C		4 min
8°C		∞

Une fois la réaction de séquence effectuée, il est nécessaire de procéder à une purification des produits de séquence. Nous utilisons pour cela le kit BigDye® Xterminator™ composé de deux flacons : un contenant la « Solution SAM » et l'autre la « Solution XTerminator ». Ce kit permet la capture des dyes non incorporés dans la réaction de séquence, les sels et autres molécules chargées pouvant interférer lors de la détection des bases par électrophorèse capillaire. Nous ajoutons pour cela 45µl de la solution SAM et 10µl de la solution XTerminator à 10µl de produits de la réaction de séquence.

Après avoir vortexé le mélange à 1800rpm pendant 30min, les tubes sont centrifugés à 100000rpm pendant 3min. Ensuite, 15µl du surnageant de chaque tube est pipeté et déposé dans une plaque. Celle-ci est placée au niveau du séquenceur automatique 3500Dx (Applied Biosystems) disponible au niveau du laboratoire. Les électrophérogrammes sont ensuite analysés à l'aide du logiciel Sequencing Analyzing à la recherche des mutations ponctuelles *IDH1* et *IDH2* décrites dans la littérature.

4.3. Recherche de la mutation V600E du gène *BRAF*

4.3.1. PCR

Pour l'amplification de la région génique comprenant la mutation V600E au niveau de l'exon 15 du gène *BRAF*, un couple d'amorces spécifique a été utilisé (Tableau 10).

Tableau 10 : Amorces utilisées pour la mise en évidence de la mutation V600E du gène *BRAF*.

Nom de l'amorce	Séquence nucléotidique
BRAF – 15 F	5'-TGC TTG CTC TGA TAG GAA AAT G-3'
BRAF – 15 R	5'-GTA ACT CAG CAG CAT CTC AGG G-3'

La composition du mix réactionnel ainsi que le programme PCR ont été mis au point pour une amplification optimale de l'exon 15 du gène *BRAF*. Ces conditions sont résumées dans les tableaux 11 et 12.

Tableau 11 : Composition du milieu réactionnel pour l'amplification de l'exon 15 du gène *BRAF*.

Mix PCR	Concentration initiale	Volume pour une réaction
Tampon PCR	10X	5
MgCl ₂	50 mM	2
dNTP	10 mM	1
Amorce F	10 µM	1
Amorce R	10 µM	1
Taq polymérase		0,4
Eau pure (qsp 50µl)	---	34,6
ADN amplifié	100ng/µl	5

Tableau 12 : Programme PCR de l'exon 15 du gène *BRAF*.

Cycles		Temps	Température
Dénaturation		10 min	95°C
Dénaturation	} ×35	30 sec	95°C
Hybridation		45 sec	58°C
Elongation		45 sec	72°C
Elongation finale		20 min	72°C
Conservation		∞	10°C

4.3.2. Purifications et séquençage

Le protocole de purification et séquençage des produits PCR issus de l'amplification de l'exon 15 du gène *BRAF* est le même que celui utilisé pour la mise en évidence des mutations IDH.

4.4. Recherche de l'amplification des gènes *EGFR* et *MDM2* par qPCR

4.4.1. Principe de la PCR en temps réelle

La PCR quantitative en temps réel repose sur la possibilité de suivre au cours du temps (et donc en temps réel) le processus de PCR à l'aide de la fluorescence. Par conséquent, tous les systèmes de PCR en temps réel reposent sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent pendant le processus d'amplification. L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR.

Il existe deux principes généraux pour la détection quantitative des amplicons : les agents se liant à l'ADN double brin (exemple du SYBR Green I) et les sondes fluorescentes. Pour cette dernière catégorie, il existe actuellement quatre principales technologies : hydrolyse de sondes (Taqman assay), hybridation de 2 sondes (HybProbes), balises moléculaires (Molecular Beacons) et amorces scorpion (Scorpion primers).

Les sondes utilisées lors de l'étude de l'amplification des gènes *EGFR* et *MDM2* par qPCR sont des sondes Taqman. En effet, la technologie Taqman est basée sur l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase pour hydrolyser une sonde hybridée à sa séquence cible sur l'amplicon durant l'étape d'hybridation/extension de la PCR. Un fluorochrome émetteur (reporter) est fixé à l'extrémité 5' de la sonde d'hybridation et son émission est inhibée par un

second fluorochrome suppresseur (quencher) présent à l'extrémité 3'. Si l'amplicon est correctement amplifié par les 2 amorces PCR, la sonde Taqman va s'hybrider sur sa cible après l'étape de dénaturation. Lorsque la taq atteint la sonde hybridée, son activité exonucléasique va déplacer la sonde et la dégrader. Cette étape entraîne la séparation du rapporteur du quencher et donc une émission de fluorescence qui augmente à chaque cycle proportionnellement au taux d'hydrolyse de la sonde.

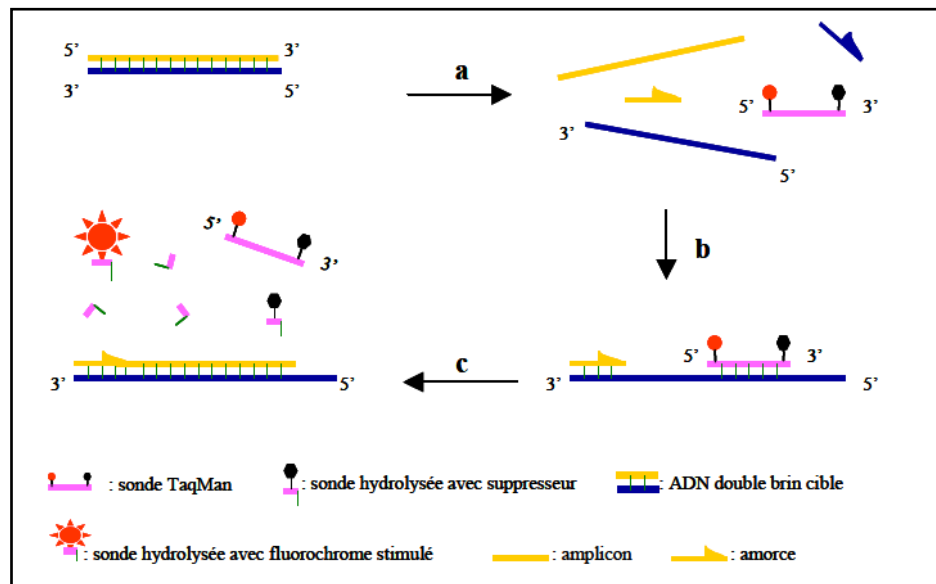


Figure 14 : Hydrolyse de sondes Taqman. (a) Durant l'étape de dénaturation, la sonde est libre en solution. (b) À la température d'appariement, la sonde et les amorces s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. La polymérisation débute. (c) La polymérase déplace et hydrolyse la sonde. Le fluorochrome émetteur est libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de la fluorescence.

4.4.2. Protocole d'étude

Pour cette étude, nous nous intéressons à l'amplification de l'exon 20 du gène *EGFR* et l'exon 4 du gène *MDM2*. Deux couples d'amorces sont ainsi utilisées et représentées dans le tableau 13. Les séquences nucléotidiques des sondes Taqman s'hybridant aux séquences cibles des gènes *EGFR* et *MDM2* sont spécifiées au niveau du tableau 14.

Tableau 13 : Amorces utilisées pour la mise en évidence de l'amplification des gènes *EGFR* et *MDM2*.

Nom de l'amorce	Séquence nucléotidique
EGFR - F	5'- GTGCAGATCGCAAAGGTAATCAG -3'
EGFR - R	5'- GCAGACCGCATGTGAGGAT -3'
MDM2 - F	5'- TTGGTTTCTAGACCATCTACCTCATCT -3'
MDM2 - R	5'- AAAAGCTGTGTGAATGCGTCAAAT -3'

Tableau 14 : Sondes Taqman spécifiques des gènes *EGFR* et *MDM2*.

Sonde Taqman	Séquence nucléotidique
EGFR	5'- CCCCTCCCCGTATCTC -3'
MDM2	5'- ACCTGTCTCACTAATTGC 3'

Le milieu réactionnel est préparé à partir d'un PCR Master Mix prêt à l'emploi. Celui-ci est constitué d'une solution concentrée 2X contenant à la fois la Taq polymérase, les dNTP et tous les composants nécessaires pour la PCR, à l'exception des amorces, de la sonde et de l'ADN. L'utilisation de ce produit pré-mélangé permet un gain de temps mais surtout une réduction des contaminations. La composition des milieux réactionnels ainsi que les conditions de PCR sont résumées dans les tableaux 15, 16 et 17.

Tableau 15 : Composition du milieu réactionnel avec L'ADN du gène cible pour la détection de l'amplification des gènes *EGFR* et *MDM2*.

Mix PCR	Concentration initiale	Volume pour une réaction
Master Mix	2X	5,4
Amorce F	10 µM	0,2
Amorce R	10 µM	0,2
Sonde (EGFR ou MDM2)	10 µM	0,2
Eau pure	---	2
ADN	25ng/µl	2

Tableau 16 : Composition du milieu réactionnel avec le contrôle endogène RNaseP pour la détection de l'amplification des gènes *EGFR* et *MDM2*.

Mix PCR	Concentration initiale	Volume pour une réaction
Master Mix	2X	5,4
Amorce F	10 μ M	0,2
Amorce R	10 μ M	0,2
RNaseP	10 μ M	0,2
Eau pure	---	2
ADN	25ng/ μ l	2

Tableau 17 : Programme PCR pour la détection de l'amplification des gènes *EGFR* et *MDM2*.

	Température	Temps
Stage I	50°C	2 min
Stage II	95°C	15 min
Stage III	95°C	15 sec
	60°C	1 min

4.4.3. Analyse des résultats de la qPCR

Le profil type d'amplification par qPCR est généralement composé de 3 parties :

- ✓ Une première partie dans laquelle le nombre d'amplicons formés ne permet pas d'obtenir une fluorescence détectable par l'appareil ;
- ✓ Une deuxième partie où la fluorescence augmente de manière exponentielle ;
- ✓ Une troisième partie de plateau correspondant à une saturation de la réaction d'amplification.

Ces courbes permettent de calculer le cycle, à partir duquel, la fluorescence devient détectable. Cette valeur seuil est appelée Ct (Cycle Treshold). La valeur de Ct est déterminée dans la phase exponentielle, à l'intersection de la ligne Treshold (ligne de bruit de fond) avec la courbe de fluorescence. Le Ct est inversement proportionnel à la concentration initiale de l'échantillon. En effet, plus la concentration d'ADN est grande plus la valeur du Ct est petite.

Pour la quantification relative des amplicons, il est nécessaire de définir un gène cible servant de contrôle endogène et un second gène cible servant de standard. Dans notre étude, nous avons utilisé le RNaseP Kit assay (Applied Biosystems) comme contrôle endogène, alors qu'un ADN sanguin a servi de standard.

A chaque cycle de la phase exponentielle la quantité de produits PCR formés est en théorie doublée. Un calcul en 3 étapes permet la quantification relative du niveau d'expression du gène d'intérêt par rapport à celle du contrôle endogène.

Etape 1 : Normalisation par rapport au contrôle endogène

$$Ct_{\text{gène cible}} - Ct_{\text{contrôle endogène}} = \Delta Ct$$

Etape 2 : Normalisation par rapport au standard

$$\Delta Ct_{\text{échantillon}} - \Delta Ct_{\text{standard}} = \Delta \Delta Ct$$

Etape 3 : Détermination de la variation du nombre de copie du gène d'intérêt

$$2^{-\Delta \Delta Ct}$$

Ce calcul permet de connaître la variation du nombre de copie d'intérêt par rapport aux témoins utilisés.

5. Cytogénétique moléculaire : recherche de l'amplification de l'*EGFR* et de la co-délétion 1p/19q par hybridation *in situ* fluorescente

5.1. Principe général et caractéristiques des sondes utilisées

L'hybridation *in situ* fluorescente (FISH) est une technique de cytogénétique moléculaire ciblée qui permet la mise en évidence d'une très grande majorité d'anomalies cytogénétiques des cancers comme les translocations associées à des types histologiques de tumeurs (hémopathies et sarcomes principalement), les délétions chromosomiques (oligodendrogliomes ou lymphomes par exemple) ou les amplifications géniques (tumeurs du sein, sarcomes ou lymphomes). Ceci est réalisé à l'aide de sondes spécifiques de gènes ou de loci marquées par un traceur fluorescent ou fluorochrome. Chaque fluorochrome est caractérisé par une longueur d'onde d'excitation (λ_{exc}) et une longueur d'onde d'émission (λ_{em}). Les fluorochromes couramment utilisés sont :

- le DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (λ_{exc} 310nm - λ_{em} 372nm) est une contre-coloration nucléaire utilisée fréquemment dans les techniques fluorescentes multicolores. Il colore de façon spécifique le noyau pour laisser distinguer les autres sondes fluorescentes;
- le FITC (Fluorescein isothiocyanate) (λ_{exc} 495nm - λ_{em} 519nm) fluoresce dans le vert;
- La Cyanine 3 (Cy3) (λ_{exc} 495nm - λ_{em} 519nm) fluoresce dans l'orange;
- Le Texas red (λ_{exc} 589nm - λ_{em} 615nm) fluoresce dans le rouge;
- La Cyanine 5 (λ_{exc} 650nm - λ_{em} 670nm) fluoresce dans le rouge;
- La Cyanine 5.5 (λ_{exc} 675nm - λ_{em} 694nm) fluoresce dans le rouge.

De plus, l'analyse par FISH peut être réalisée sur pratiquement n'importe quel type de prélèvement cellulaire ou tissulaire, à l'état frais, congelé ou fixé par le formol. Il existe trois principaux types de sondes utilisées pour l'analyse par FISH des tumeurs utilisant des fluorochromes distincts Rouge (R) et Vert (V) :

- les sondes double couleur sont composées de deux sondes test et contrôle, marquées par deux fluorochromes distincts. La sonde test s'hybride sur le locus à étudier. La sonde contrôle sert de témoin d'hybridation et marque généralement une séquence du même chromosome (centromère ou autre séquence locus spécifique). En pathologie tumorale, ces sondes permettent la détection d'aneuploïdies, d'amplifications ou de délétions;

- les sondes double couleur double fusion sont constituées de deux sondes marquées par deux fluorochromes R et V. Ces sondes chevauchent les deux points de cassure des deux partenaires de translocations réciproques. L'hybridation de ces sondes génère un profil composé de deux signaux rouges (2R) et de deux signaux verts (2V). La translocation fusionne un signal rouge et un signal vert sur les deux chromosomes dérivés générant deux signaux de fusion jaunes (F). Le profil d'hybridation est alors 1R1V2F. Ces sondes dites de fusion permettent de diagnostiquer les translocations réciproques impliquant la juxtaposition de gènes comme *C-MYC* et *IGH* dans la t(8;14)(q24;q32) des lymphomes de Burkitt.
- le troisième type de sonde correspond aux sondes encadrantes d'un point de cassure. Elles permettent la détection d'un point cassure sur un locus d'intérêt. Ce point est encadré par deux sondes marquées chacune par un fluorochrome différent R et V. Ces sondes génèrent un signal de fusion par allèle normal et donc deux signaux de fusion (2F) pour un noyau diploïde. Une cassure de l'ADN au locus d'intérêt induit une séparation du signal de fusion en deux signaux distincts R et V. Le profil d'hybridation devient 1R1V1F. Ce type de sondes appelées « split » ou « break-apart » selon les fournisseurs permet la détection d'une translocation au locus étudié indépendamment de son partenaire. Ce système est particulièrement intéressant pour la détection des remaniements de gènes à plusieurs partenaires comme *MLL* dans les leucémies qui peut être impliqué dans une translocation avec au moins 50 partenaires différents.

En ce qui concerne notre étude, nous avons utilisé, que ce soit pour la détection de la codélétion 1p/19q ou l'amplification de l'*EGFR*, le premier type de sondes décrit ci-dessus.

En effet, le kit «Vysis LSI *EGFR*/CEP 7 Probe» est utilisé pour la mise en évidence des amplifications *EGFR*. Ce kit comporte une sonde locus spécifique (LSI) *EGFR* en 7p12 à fluorescence orange et une sonde témoin centromérique (CEP) localisée en 7p11.1- q11.1 à fluorescence verte.

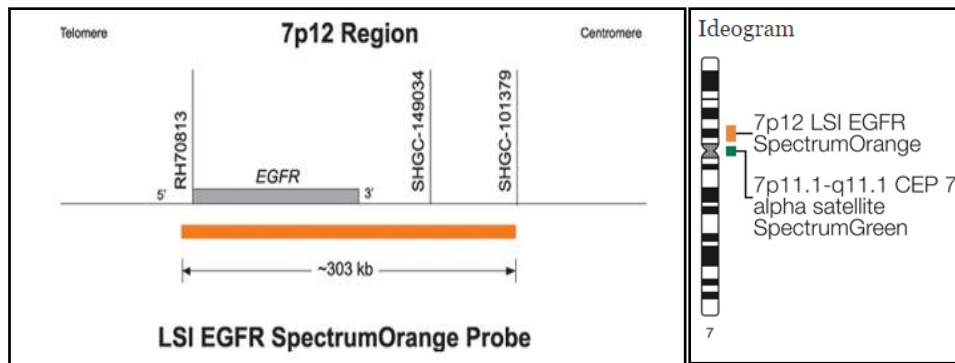


Figure 15 : Localisation des sondes LSI EGFR/CEP 7 sur le chromosome 7.

Nous avons également utilisé le kit «Vysis 1p36/1q25 and 19q13/19p13 FISH Probe». Ce kit comporte deux couples de sonde chacun contenu dans un flacon séparé. Le premier couple est une sonde LSI localisée en 1p36 à fluorescence orange et une sonde LSI au niveau de 1q25 à fluorescence verte. Le deuxième couple comprend deux sondes LSI 19q13 et 19p13 à fluorescence orange et verte respectivement.

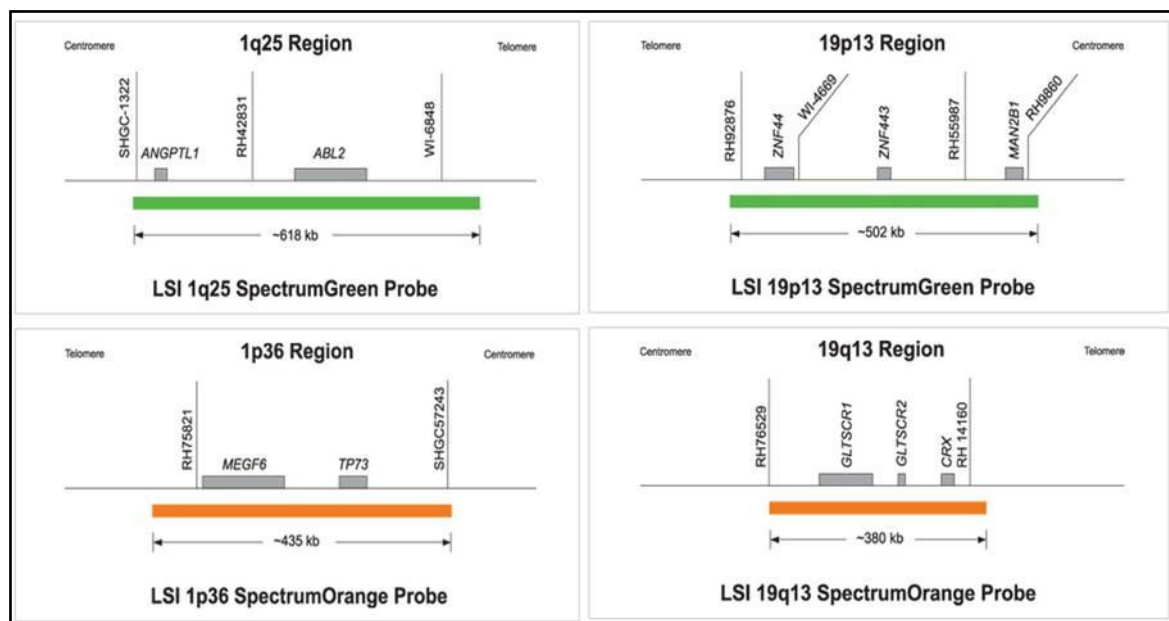


Figure 16 : Cartes géniques des sondes 1q25/ 1p36 et 19q13/19p13.

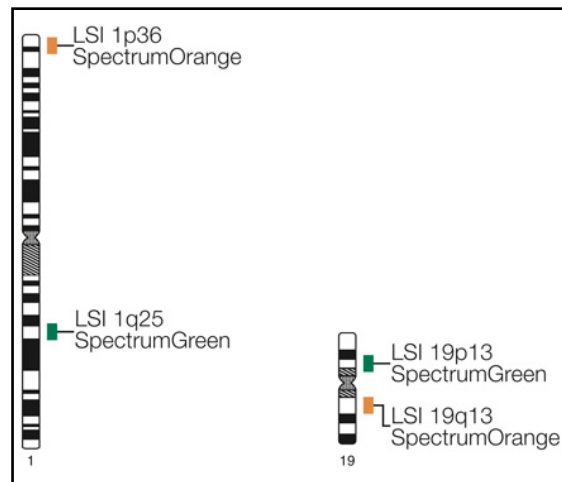


Figure 17 : Localisation des sondes 1q25/1p36 et 19q13/19p13 sur les chromosomes 1 et 19.

5.2. Protocole standard de FISH

Puisque nous appliquons la technique FISH sur tissus, nous disposons pour chaque patient d'une lame Superfrost® portant une coupe du tissu tumoral fixé et inclus en paraffine. Le repérage de la zone tumorale à étudier doit se faire au préalable sur une lame colorée de façon standard (HES). Le reste du tissu ne comprenant pas cette zone tumorale peut alors être éliminée de la lame Superfrost®.

La technique FISH s'est déroulée selon les étapes suivantes :

5.2.1. Déparaffinage

Les lames sont déparaffinées par deux bains successifs de toluène (10min chacun) et réhydratées dans deux bains successifs d'éthanol (5min chacun) puis séchées dans le Thermobrite réglé à 45°C pendant 3 à 5min.

5.2.2. Prétraitements et traitement à la pepsine

Les lames sont placées pendant 15min dans une solution de prétraitement 1XSSC préalablement chauffée à 98°C au bain-marie. La température et la durée du prétraitement ont été mises au point. Ensuite, les lames sont immergées 3min dans de l'eau distillée à température ambiante.

Une digestion enzymatique est alors réalisée à l'aide de la pepsine avec une concentration de pepsine fixée à 5mg/ml. Cette digestion est réalisée à 37°C dans le Thermobrite.

Après un lavage à l'eau distillée pendant 3min à température ambiante, les préparations sont déshydratées par passage dans un gradient d'éthanol (70, 80 puis 100%) et séchées.

5.2.3. Hybridation des sondes

Les sondes sont décongelées et ramenées à température ambiante et 10µl est déposé sur les préparations. Il est important de signaler que lorsque le tissu tumoral est petit ou ne comporte que peu de cellules, le volume de sonde déposé peut être réduit à 8µl voir même 5µl dans certains cas.

Les préparations sont enfin recouvertes par des lamelles en évitant toute formation de bulle. L'ensemble est scellé à l'aide de Rubber-cement pour éviter le dessèchement.

Les lames sont ensuite placées dans le ThermoBrite et incubées à 37°C pendant 5mn avant de lancer le programme suivant de dénaturation/hybridation (tableau 18).

Tableau 18 : Programme Thermobrite de dénaturation / hybridation des sondes.

	Température	Temps
Dénaturation	74°C	5min
Hybridation	37°C	16h

5.2.4. Lavages post-hybridation

A partir de cette étape, le travail est effectué en lumière réduite de manière à préserver les fluorochromes des sondes présents sur les lames. A la fin de l'hybridation, les lames sont sorties du ThermoBrite et placées dans la solution de lavage 2XSSC/0,3% NP40 à température ambiante pendant 30 secondes à 1min, après avoir retiré le Rubber-cement. Les lamelles sont ensuite délicatement retirées et les lames sont transférées dans la solution 2XSSC/0,3% NP40 à 73°C pendant 3mn. Enfin, un rinçage rapide dans la même solution à température ambiante est effectué et les lames sont mises à sécher à l'obscurité.

5.2.5. Contre-coloration au DAPI

Une contre-coloration des noyaux est réalisée par dépôt de 10µl de DAPI. Les lames sont stockées dans des boîtes opaques à +4°C jusqu'à observation au microscope à épifluorescence.

5.3. Mise au point de la technique FISH sur tumeurs cérébrales

Le protocole habituel cité ci-dessus n'a pas donné de résultats interprétables pour les tumeurs cérébrales. Une mise au point de la technique FISH pour l'identification de la codélétion 1p/19q était indispensable. Cette phase de mise au point s'est étalée sur une période assez longue et a concerné les étapes suivantes : la nature et la durée de la fixation, l'épaisseur du tissu, la température et la durée du prétraitement, le temps de digestion enzymatique et la température de dénaturation.

5.3.1. Nature et durée de la fixation

Pour assurer une bonne qualité de la technique FISH, la nature du fixateur utilisé au préalable doit être précisé et doit s'éloigner de tous les composants qui dégradent ou altèrent les acides nucléiques. L'utilisation, à titre d'exemple, du liquide de Bouin est déconseillée voire même interdite car le résultat de la cytogénétique moléculaire est ininterprétable.

De plus, la durée de la fixation est aussi importante pour assurer un bon rendement de la technique FISH car une fixation prolongée induit un signal fluorescent faible ou absent.

Puisque les biopsies et les pièces d'exérèse des tumeurs cérébrales sont de petites tailles, le temps de fixation ne doit pas dépasser les six heures. Par ailleurs, nous avons remarqué qu'un meilleur résultat est obtenu avec les coupes issues de l'examen extemporané.

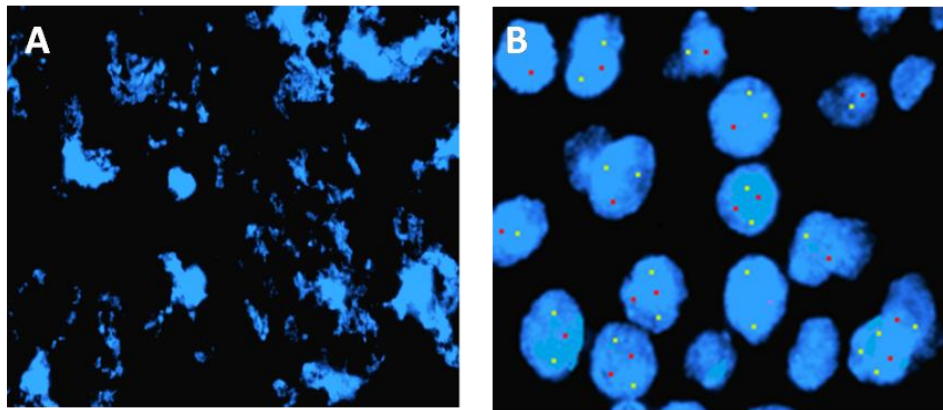


Figure 18 : Résultat de la technique FISH d'un cas de tissu fixé avec le liquide de Bouin (A) et d'un cas de tissu fixé avec le formol tamponné à 10% pendant une durée de 6h (B) (Gx100).

5.3.2. Epaisseur de la coupe tissulaire

Nous avons travaillé avec différentes épaisseurs de tissu (3, 4 et 5 μ m) et nous avons remarqué que l'épaisseur de la coupe influence la qualité des résultats observés. En effet, pour une épaisseur de 4 μ m, qui est l'épaisseur standard de la technique FISH sur les autres tumeurs, nous avons observé, dans les tumeurs cérébrales, un dépôt aspécifique d'amas de sondes

fluorescentes avec superpositions des cellules tumorales, ce qui rend l'interprétation des résultats impossible. Cependant, pour une épaisseur de 3 μ m, nous avons obtenu un signal fluorescent clair et facilement interprétable.

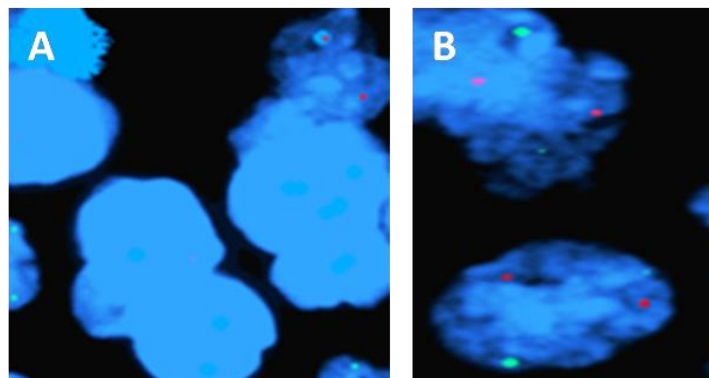


Figure 19 : Effet de l'épaisseur sur la qualité de la FISH. A: tissu d'une épaisseur de 5 μ m (Gx100); B: tissu d'une épaisseur de 3 μ m (Gx100).

5.3.3. Température et durée du prétraitement

Après l'étape de déparaffinage, les lames contenant le tissu sont placées dans une solution de prétraitement 1XSSC afin de préparer le tissu à la digestion enzymatique. Dans le protocole standard, il était recommandé de placer les lames dans une solution 1XSSC chauffé à 80°C pendant 35min. Néanmoins, les résultats n'ont pas été satisfaisants et nous avons remarqué parfois un décollement du tissu traité. De ce fait, nous avons essayé de changer la température et la durée du prétraitement et nous avons constaté qu'un prétraitement avec une solution 1XSSC chauffée à 98°C pendant une durée de 15min est idéal pour une conservation et un traitement meilleur du tissu.

5.3.4. Digestion enzymatique

La digestion enzymatique à la pepsine est une étape primordiale qui permet aux sondes d'atteindre les noyaux et s'hybrider avec l'ADN cible.

Le protocole standard proposait 20min comme temps d'incubation de la pepsine. Cependant, nous avons remarqué que cette durée ne permettait pas à la sonde d'arriver aux noyaux et de se fixer spécifiquement à son locus. Différents temps d'incubation ont été alors testés (20, 25, 30, 32, 34, 36, 38, 40 et 42 min) avec une concentration de pepsine fixée à 5mg/ml. Nous avons remarqué qu'une sous digestion des fragments tissulaires (temps d'incubation inférieur à 40 min) laisse les membranes imperméables à la sonde, ce qui entraîne un dépôt de sonde à l'extérieur des cellules. Une sur-digestion des tissus (42 min) provoque des perforations cellulaires altérant la qualité des résultats. Par conséquent, la durée optimale de digestion

enzymatique d'un tissu cérébral par la pepsine à 5mg/ml a été fixée à 40 min. Cette digestion est réalisée à 37°C dans le Thermobrite.

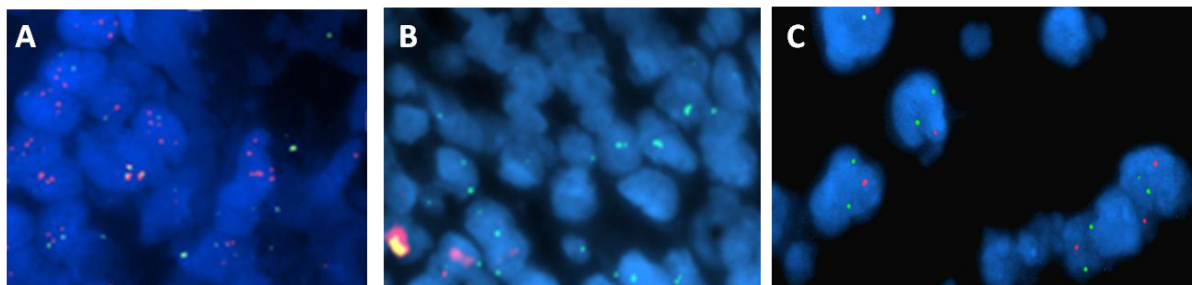


Figure 20 : Effet de la durée de digestion enzymatique sur la qualité des résultats FISH. A: digestion pendant 25min (Gx100); B: digestion pendant 30min (Gx100); C: digestion pendant 40min (Gx100).

5.3.5. Température de dénaturation

La température de dénaturation a été mise au point et fixée à 74°C pour une adhésion optimale et plus spécifique des sondes.

5.4. Analyse des résultats FISH

Le nombre des noyaux analysés a été fixé après une revue générale de la littérature internationale et selon les recommandations les plus plausibles.

Concernant le gène EGFR, au moins 30 noyaux interphasiques sont examinés et le rapport EGFR / CEP7 est calculé et interprété comme suit :

- ✓ $EGFR / CEP7 \geq 20$: Forte amplification du gène EGFR.
- ✓ $2 \leq EGFR / CEP7 < 20$: amplification modérée du gène EGFR.
- ✓ $EGFR / CEP7 < 2$: pas d'amplification du gène EGFR.

Pour la codélétion 1p/19q, au moins 200 noyaux interphasiques sont examinés. Les rapports 1p/1q et 19q/19p sont calculés en divisant le nombre de signaux oranges sur le nombre de signaux verts. L'interprétation des résultats se faisait comme suit :

- ✓ $1p/1q \leq 0,7$: Délétion 1p.
- ✓ $19q/19p \leq 0,8$: Délétion 19q.

Chapitre III : Résultats

Dans ce chapitre, nous allons présenter les résultats de l'étude épidémiologique des gliomes de manière générale puis des glioblastomes de manière plus spécifique. Ensuite, nous allons décrire les résultats des différentes études histologiques, immunohistochimiques qui seront enchaînés par des études moléculaires et cytogénétiques. Enfin, nous procéderons à l'analyse des corrélations possibles entre les différentes variables.

1. Epidémiologie descriptive des gliomes :

Il s'agit d'une étude rétrospective portant sur 133 patients recrutés au service d'anatomopathologie et de pathologie tumorale au centre hospitalier universitaire Hassan II de Fès durant la période allant de Janvier 2010 à Décembre 2014. L'analyse histologique a été effectuée par un à deux anatomopathologistes. Les critères d'inclusion dans l'étude étaient le diagnostic d'une tumeur gliale avec son grading (de I à IV) selon les critères de la classification de l'OMS version 2007.

1.1 Répartition des patients selon le sexe :

Notre série d'étude est caractérisée par une légère prédominance masculine. En effet, cette population comprend 79 hommes (59,40%) contre 54 femmes (40,60%), soit un sexe ratio de 1.5:1.

1.2 Répartition des patients selon l'âge :

L'âge moyen et l'âge médian des patients inclus dans l'étude est de 38 ans avec des extrêmes allant de 2 à 83 ans.

La distribution de la population selon les tranches d'âge est représentée dans le tableau 19.

Tableau 19 : Distribution des gliomes selon les tranches d'âge.		
Classes d'âge	Nombre de cas	Pourcentage
2 à 9 ans	12	9,02%
10 à 19 ans	16	12,03%
20 à 29 ans	16	12,03%
30 à 39 ans	20	15,03%
40 à 49 ans	18	13,53%
50 à 59 ans	22	16,54%
60 à 69 ans	15	11,28%
70 à 83 ans	6	4,52%
Non déterminé	8	6,02%
Total	133	100%

Nous remarquons un pic de fréquences dans la tranche d'âge [50 – 59 ans] alors que les classes d'âges extrêmes [2 – 9 ans] et [70 – 83 ans] caractérisent les fréquences les plus faibles.

Il est à noter que 8 dossiers correspondant à 8 patients de notre population d'étude ne contenaient pas d'informations sur l'âge. De ce fait, la répartition des patients selon l'âge a concerné au total 125 patients.

1.3 Répartition des tumeurs selon le grade histologique :

Toutes les tumeurs reçues du service de Neurochirurgie ont été diagnostiquées et gradées, par un anatomopathologiste, selon les critères de la classification de l'OMS version 2007 qui permet de définir 4 grades différents de I à IV.

Concernant notre série, presque la moitié (43,61%) des cas étudiés est représentée par les tumeurs malignes de grade IV, suivie de gliomes anaplasiques de grade III (24,06%), puis de gliomes diffus de grade II (17,29%) et enfin de tumeurs bénignes de grade I (15,04%).

1.4 Répartition des tumeurs en fonction du type histologique prédominant :

La figure 21 représente les différents types histologiques caractérisant cette étude. Nous remarquons une prédominance du profil astrocytaire par rapport au profil oligodendroglial et une rareté du profil mixte (Oligoastrocytomes).

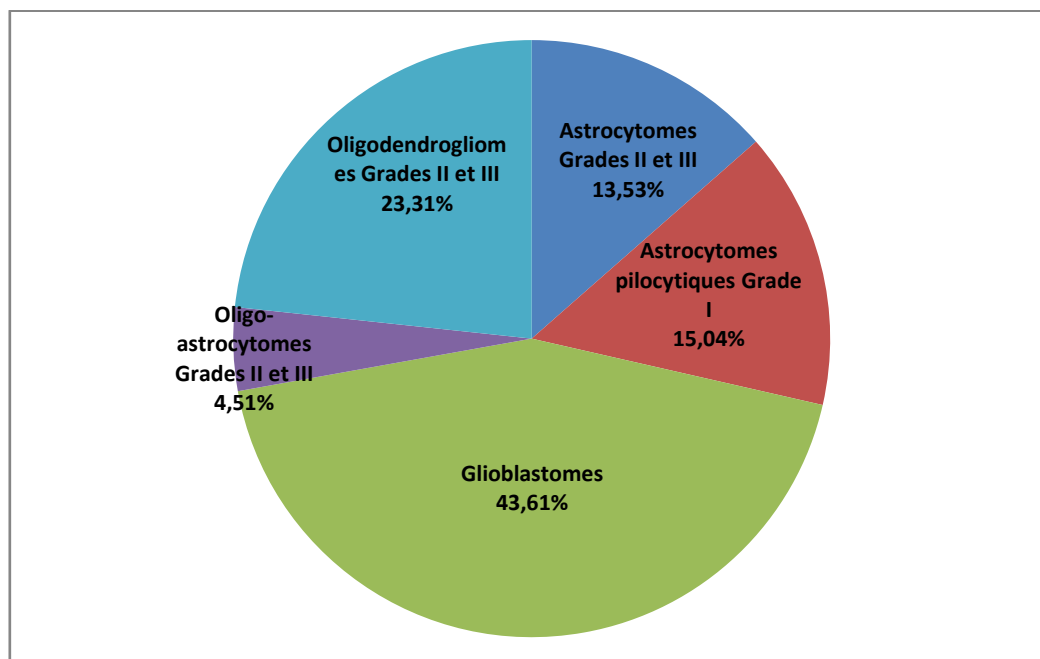


Figure 21 : Distribution des gliomes en fonction du type histologique.

1.5 Répartition des tumeurs selon le siège :

Les tumeurs gliales se caractérisent par différentes localisations tumorales. Cette dernière a un impact direct sur l'évolution symptomatologique du patient et la nature de l'acte chirurgical. Les résultats concernant notre population sont illustrés au niveau du tableau 20 :

Tableau 20 : Distribution des gliomes en fonction du siège tumoral.		
Siège de la tumeur	Nombre de cas	fréquence
Lobe frontal	52	39,10%
Lobe temporal	10	7,52%
Lobe pariétal	5	3,76%
Lobe occipital	1	0,75%
Deux lobes cérébraux touchés	35	26,31%
Autre localisation	16	12,03%
Non déterminé	14	10,53%
Total	133	100%

1.6 Répartition des patients en fonction des tranches d'âge et du grade :

Nous remarquons une forte présence des gliomes bénins de grade I chez les patients jeunes (enfants et jeunes adultes) dans les deux premières tranches d'âge. Cette fréquence diminue dans la troisième tranche jusqu'à disparaître complètement par la suite.

Concernant le grade le plus malin (Grade IV), nous constatons une fréquence qui croît avec l'âge. En effet, les personnes âgées (> 40 ans) sont de plus en plus touchés par un glioblastome avec un pic observé chez les patients de tranche d'âge 60 à 69 ans.

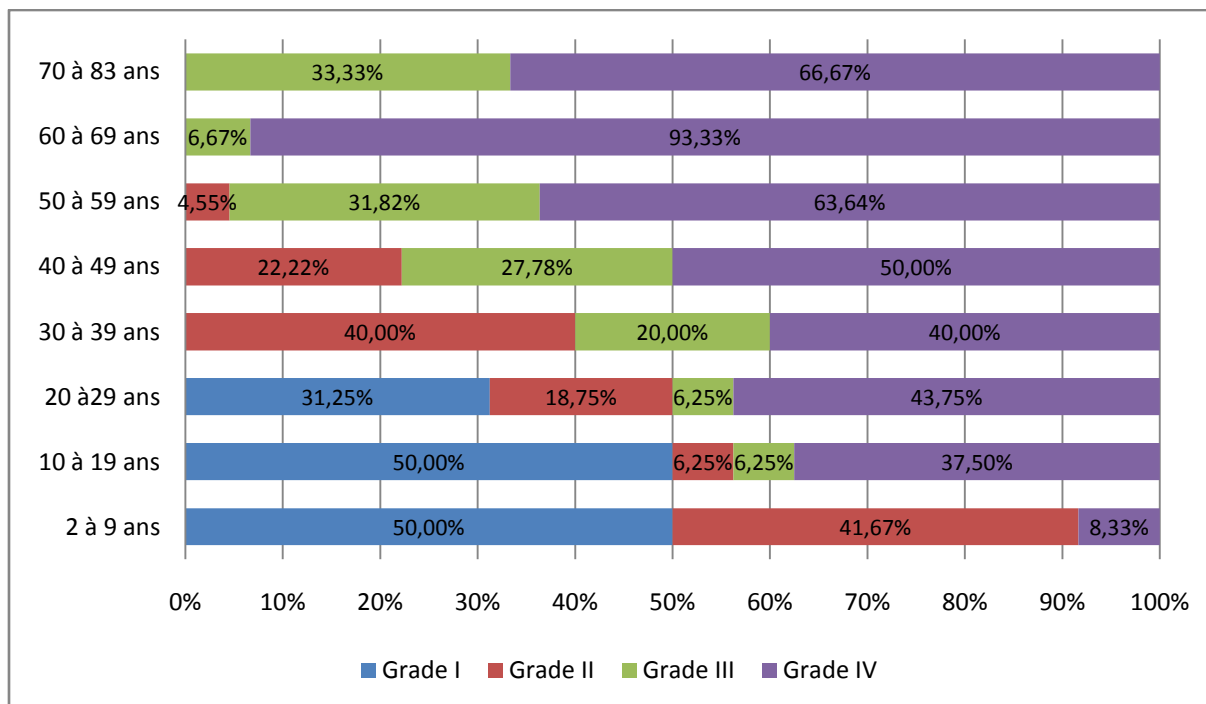


Figure 22 : Distribution des gliomes selon les tranches d'âge et le grade.

2. Épidémiologie descriptive des glioblastomes :

Les glioblastomes sont les tumeurs primitives du cerveau les plus fréquentes et les plus agressives. Du fait de leur importance, nous avons choisi de réaliser une étude épidémiologique descriptive indépendante de ce groupe de tumeurs avec les différentes corrélations possibles.

2.1 Répartition des glioblastomes en fonction du sexe :

Cette population se caractérise par une prévalence masculine légèrement plus importante (58,62%) et un sexe ratio de l'ordre de 1.4 :1.

Tableau 21 : Distribution des glioblastomes en fonction du sexe.

Sexe	Nombre de cas	Pourcentage
Féminin	24	41,38%
Masculin	34	58,62%
Total	58	100%

2.2 Répartition des glioblastomes selon l'âge :

Les patients porteurs de glioblastomes inclus dans notre étude ont une moyenne d'âge de 47 ans et une médiane de 51 ans avec des extrémités allant de 8 à 83 ans.

L'âge de l'établissement du diagnostic est un des critères caractérisant les deux formes de glioblastomes primaires et secondaires. La distribution des patients selon les tranches d'âge nous permet de constater une fréquence plus importante des patients dont l'âge est compris entre 40 et 60 ans (44,83%).

Tableau 22 : Distribution des glioblastomes en fonction de l'âge.

Classes d'âge	Nombre de cas	Pourcentage
< 40 ans	18	31,03%
[40 – 60ans]	26	44,83%
> 60 ans	14	24,14%
Total	58	100%

2.3 Le siège de la tumeur dans les glioblastomes :

Pour le groupe de glioblastomes, nous avons remarqué une localisation de la tumeur majoritairement frontale (40%), suivie d'une localisation au niveau de deux lobes cérébraux différents (35,38%).

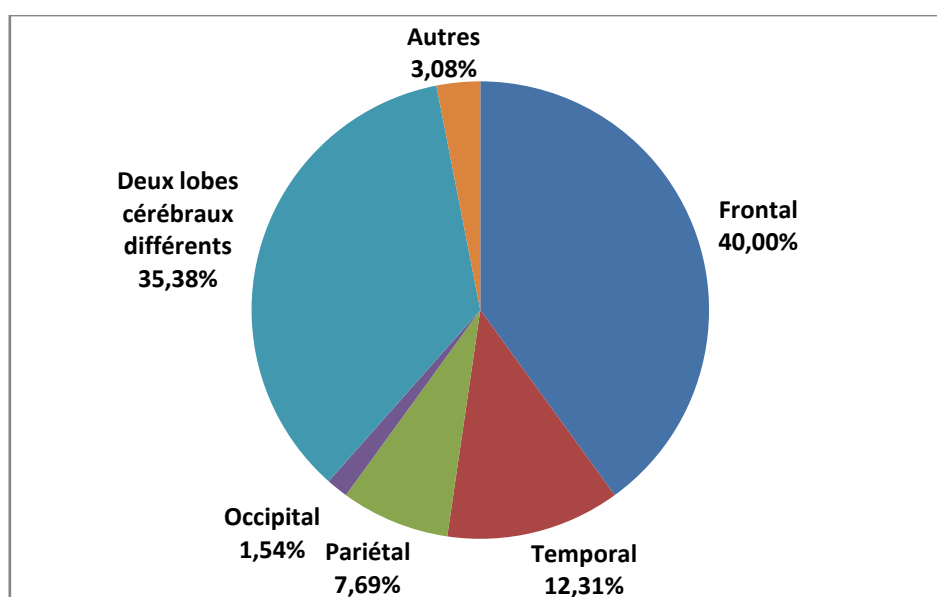


Figure 23: Répartition des glioblastomes en fonction du siège tumoral.

2.4 L'évaluation de l'indice KPS dans les glioblastomes :

Le score de Karnofsky (KPS) permet aux cliniciens de classer les patients selon leurs déficiences fonctionnelles. C'est une échelle qui va de 100% (pour les patients pouvant mener une activité normale) à 0% (caractérisant l'état de décès). Notre population présente 91,30% des patients avec un indice KPS supérieur à 70%, montrant ainsi une certaine autonomie et une capacité à se prendre en charge.

Tableau 23 : Evaluation de l'indice KPS des patients porteurs de glioblastomes.

Indice KPS	Nombre de cas	Pourcentage
0%	0	0,00%
10%	0	0,00%
20%	0	0,00%
30%	0	0,00%
40%	1	4,35%
50%	0	0,00%
60%	1	4,35%
70%	0	0,00%
80%	3	13,04%
90%	4	17,39%
100%	14	60,87%

Il est important de signaler que les données se rapportant à l'indice de KPS ne figuraient que dans 23 dossiers de patients inclus dans cette étude. Ce qui laisse 35 autres patients porteurs de glioblastomes avec un indice KPS non déterminé.

2.5 La prise en charge chirurgicale des glioblastomes :

La chirurgie est la première étape indispensable dans le traitement des gliomes et reste la méthode la plus efficace pour enlever la plus grande masse de cellules tumorales sans léser le cerveau sain. Elle prépare généralement le malade pour la suite du traitement avec radiothérapie et éventuellement chimiothérapie.

L'approche chirurgicale de l'exérèse de la tumeur est généralement dictée par sa localisation anatomique définie par l'imagerie. Dans la plupart des cas, la résection tumorale est une résection totale du tissu macroscopiquement anormal et permet d'améliorer le déficit neurologique. Cependant, la dissection entre tissu tumoral et tissu normal peut parfois être très difficile spécialement en profondeur. Le chirurgien pourrait alors opter pour une exérèse partielle voire même une biopsie stéréotaxique.

Dans notre étude, plus de la moitié des patients (61,90%) ont subi une exérèse totale de la tumeur recommandée, dans la mesure du possible, pour une meilleure évolution et par conséquent une meilleure survie.

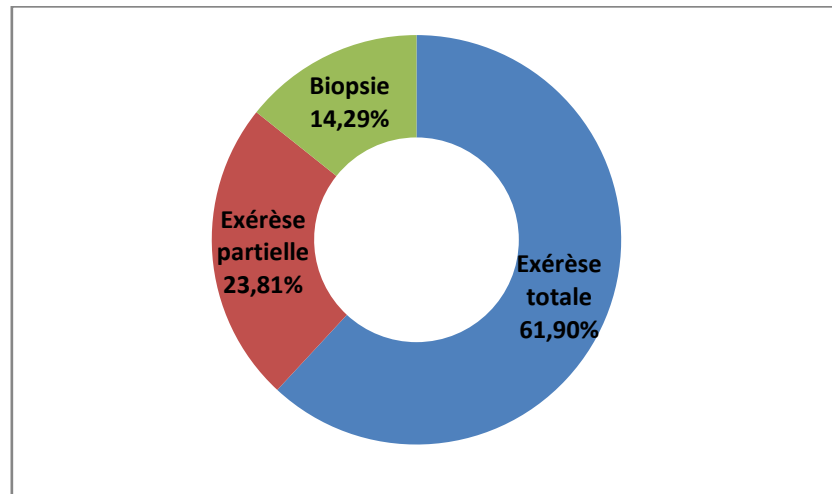


Figure 24 : Prise en charge chirurgicale des glioblastomes.

La réalisation d'un scanner cérébral et surtout d'une IRM cérébrale est essentielle pour la prise de décision d'opérabilité d'une tumeur cérébrale. Ces examens vont permettre de localiser le processus expansif, préciser ses caractéristiques (hétérogénéité tumorale, prise de contraste, effet de masse sur les structures avoisinantes, présence de calcifications, présence de plages kystiques, présence de plages d'allure nécrotique, etc.), apporter des arguments pour le diagnostic différentiel et diagnostiquer certaines complications (hémorragie, hydrocéphalie, méningite tumorale). La répétition de l'imagerie encéphalique permettra par la suite d'apprécier l'impact du traitement sur la tumeur (réponse, stabilité ou progression) et de déceler une éventuelle progression ou récurrence.

La figure 25 présente une volumineuse tumeur cérébrale, qui fait partie de notre série d'étude, de siège hémisphérique droit (Asterix bleu), hétérogène et nécrotique, associée à un important œdème péri-tumoral (Asterix jaune). Pic de choline (flèche rouge) témoin d'une importante prolifération cellulaire avec pic de lipides (flèche jaune) témoin de la nécrose.

Cet aspect morphologique et spectroscopique évoque fortement un glioblastome.

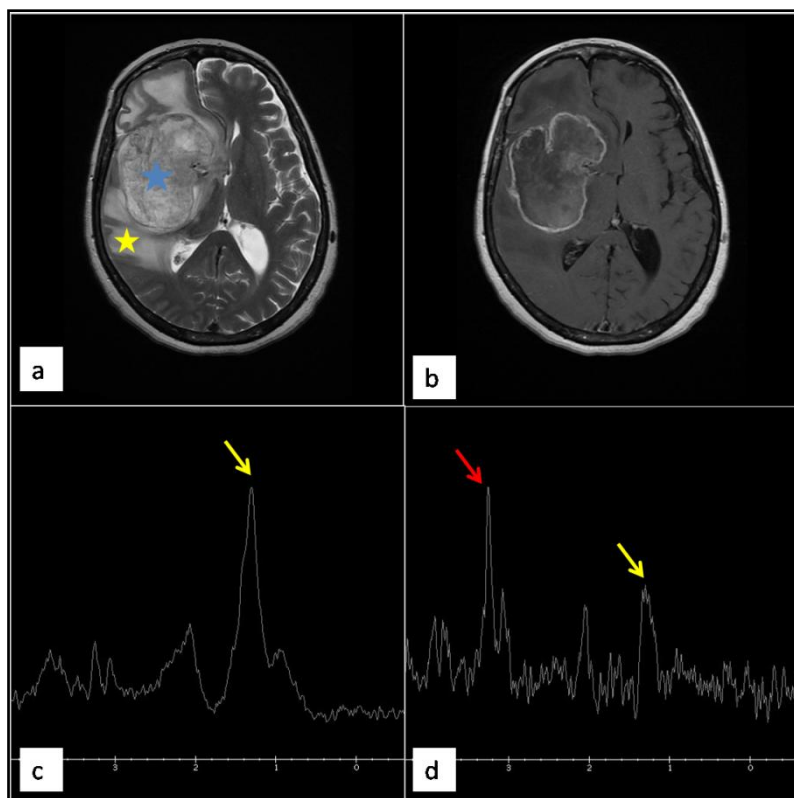


Figure 25 : IRM cérébrale en séquence T2 (a), séquence T1 injectée (b), spectroscopie TE court (c), spectroscopie TE long (d).

3. Etude histologique et immunohistochimique

Du point de vue histologique et sur la base de critères purement morphologiques de la classification de l'OMS 2007, toutes les tumeurs incluses dans l'étude (133 cas) ont été revues par des anatomopathologistes afin de confirmer le diagnostic et le grading des gliomes.

Les critères purement morphologiques de la classification de l'OMS 2007 ont pour conséquence directe une large discordance interobservateurs d'où l'intérêt de compléter avec d'autres techniques, à titre d'exemple étude immunohistochimique et/ou moléculaire. La technique d'immunohistochimie a permis, en cas de doute, d'établir un diagnostic différentiel entre astrocytomes, oligodendrogliomes et glioblastomes. En effet, elle est caractérisée par l'utilisation d'un large éventail d'anticorps associant des marqueurs de lignage représentés par la GFAP et l'Olig-2, un marqueur de prolifération cellulaire Ki67, un marqueur prédictif de la codélétion 1p/19q qui est l'INA. L'anticorps P53 révélant l'altération de la protéine et du gène dans les glioblastomes.

3.1 Détermination de l'expression de l'interneurine α et de l'Olig-2 dans les oligodendrogliomes et les oligoastrocytomes :

L'interneurine-alpha (INA) est un filament intermédiaire exprimé dans les neurones. Elle est exprimée par un nombre variable de cellules tumorales des oligodendrogliomes présentant une codélétion 1p/19q. Le seuil d'expression de l'INA requis est de 10 % sous forme d'un halot périnucléaire (cluster).

L'Olig2 est un facteur de transcription qui a un rôle crucial dans le développement des oligodendrocytes. Dans les tissus normaux du cerveau humain, l'Olig2 marque les oligodendrocytes. Dans les tumeurs cérébrales, il est exprimé dans toutes les cellules gliales oligodendrocytaires et astrocytaires. Toutefois, on a remarqué une expression plus forte de l'Olig2 dans les oligodendrogliomes par rapport aux astrocytomes. Cependant, dans les tumeurs bénignes précisément dans les épendymomes, l'Olig2 est absent. Cela fournit aux anatomopathologistes des informations utiles en cas de diagnostic différentiel.

La technique d'IHC avec l'utilisation des anticorps monoclonaux INA et Olig-2 a permis de démontrer que la grande majorité des oligodendrogliomes et certains oligo-astrocytomes inclus dans cette étude expriment fortement ces deux protéines. Le tableau suivant représente les pourcentages propres à chaque anticorps selon le grade de malignité:

Tableau 24 : Expression de l'internexine α et de l'Olig-2 dans les oligodendrogliomes et les tumeurs mixtes (Etude portée sur 32 cas).

Tumeurs gliales	INA	Olig-2
Oligodendrogliomes grade II	5/7 (71,42%)	6/7 (85,71%)
Oligo-astrocytomes grade II	0/1 (0%)	1/1 (100%)
Oligodendrogliomes grade III	21/21 (100%)	21/21 (100%)
Oligo-astrocytomes grade III	3/3 (100%)	3/3 (100%)
TOTAL	29/32 (90,63%)	31/32 (96,88%)

D'après le tableau, nous constatons qu'un seul cas n'exprime pas l'OLIG-2 parmi les 31 tumeurs à composante oligodendrogliale étudiées. L'INA, quant à lui, est exprimé dans la totalité des tumeurs anaplasiques oligodendrogliales et mixtes de grade III, alors qu'il marque 71,42% des oligodendrogliomes diffus de grade II.

Il est à noter que cette étude n'a porté que sur 32 cas d'oligodendrogliomes et d'oligoastrocytomes de grade II et III. Ceci est dû principalement au fait que la technique d'immunohistochimie utilisant l'INA et l'Olig2 a été réalisée en dernier lieu après toutes les autres études histologiques et moléculaires. C'est ce qui explique l'épuisement de blocs de 4 patients qui n'ont pas fait partie de cette étude immunohistochimique.

La figure 26 montre un cas d'oligodendrogliome anaplasique (grade III) exprimant fortement les deux anticorps INA et Olig-2. On remarque que l'INA est caractérisé par un marquage diffus cytoplasmique et périnucléaire d'intensité élevée. De son côté, l'Olig-2 marque spécifiquement les noyaux des cellules gliales.

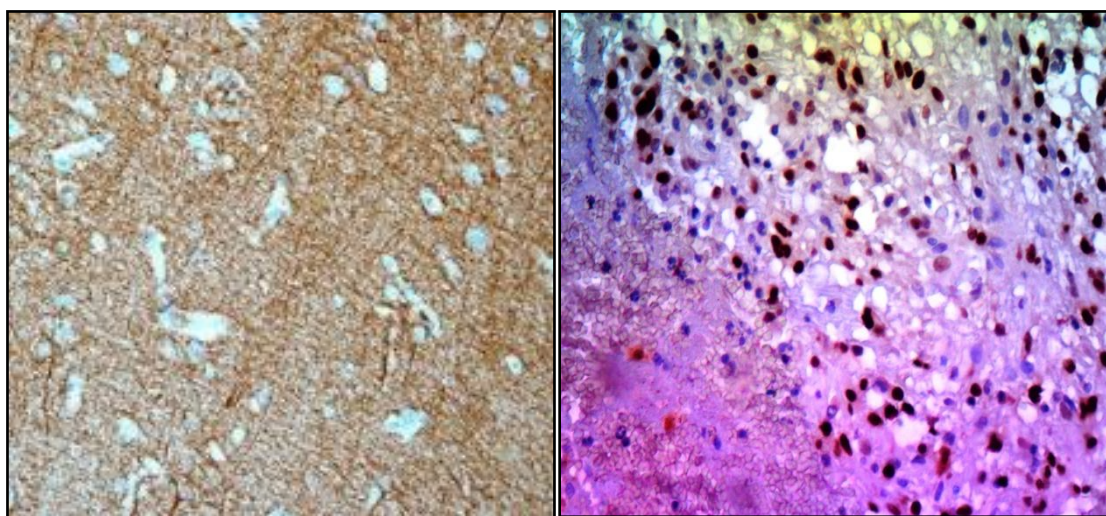


Figure 26 : Marquages immunohistochimiques positifs de l'INA et l'OLIG-2 dans un cas d'oligodendrogliome anaplasique.

3.2 Détermination de l'expression de P53 dans les glioblastomes :

La protéine P53 est une phosphoprotéine de 393 acides aminés et de poids moléculaire de 53 kDa. On la trouve en très petite quantité dans les cellules normales, mais en grande abondance dans les cellules tumorales. L'accumulation nucléaire de la protéine P53 est fréquemment observée dans les tumeurs astrocytaires (tous grades confondus) et certains glioblastomes.

A l'aide de la technique d'immunohistochimie (IHC), nous avons pu déterminer l'expression de P53 dans les glioblastomes (58cas). Selon la littérature, le seuil limite significatif d'une expression positive doit être supérieur à 10% avec un signal d'expression nucléaire intense.

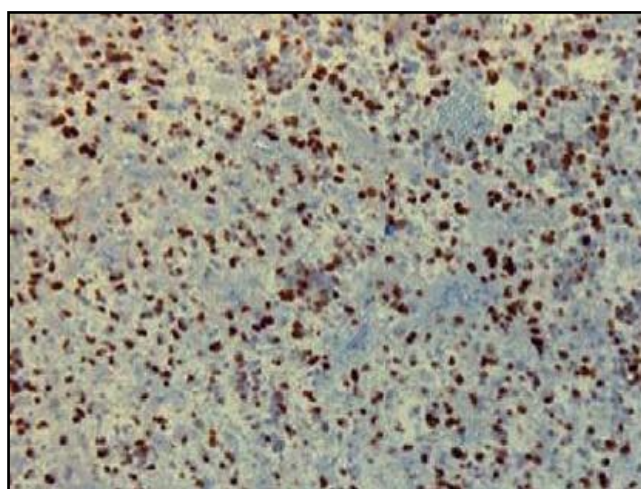


Figure 27 : Marquage nucléaire de la protéine P53 dans un cas de glioblastome.

Les résultats de l'étude de l'immunomarquage P53 sont résumés dans le tableau 25 ci-dessous :

Tableau 25 : Fréquence de l'expression de la protéine P53 dans le groupe de glioblastomes.		
Intensité du marquage	Nombre de cas	Fréquence
Négatif (P53<10%)	34	58,62%
Positif (P53 ≥10%)	24	41,38%
Total	58	100%

Nous constatons que plus de la moitié des glioblastomes explorés (58,62%) ne présentent pas d'altérations d'expression de la protéine P53, alors que cette dernière présente un immunomarquage positif dans 41,38% cas de glioblastomes.

3.3 Détermination de l'expression de Ki67 dans les glioblastomes :

Le Ki67 est un marqueur de prolifération cellulaire. Il augmente tout au long de la division cellulaire pour atteindre un pic en phase S. L'estimation du taux de prolifération des cellules tumorales est actuellement l'un des paramètres pronostiques les plus importants.

La détermination de l'index Ki67 a été réalisée pour tous les glioblastomes inclus dans l'étude à l'aide de la technique d'immunohistochimie en comptant le pourcentage de cellules tumorales dont le noyau est marqué par l'anticorps monoclonal Ki67. Les résultats de cette étude sont représentés dans le tableau 26 où nous remarquons que la majorité des cas de glioblastomes (79,31%) présente un marquage positif du Ki67 partagé entre un immunomarquage intense et moyen.

Tableau 26 : Statut de l'indice de prolifération cellulaire Ki67 dans les glioblastomes.		
Intensité du marquage	Nombre de cas	Fréquence
Faible (Ki67<10%)	12	20,69%
Positif (Ki67 ≥10%)	46	79,31%
Total	58	100%

La figure 28 montre un cas avec une forte expression de la protéine Ki67.

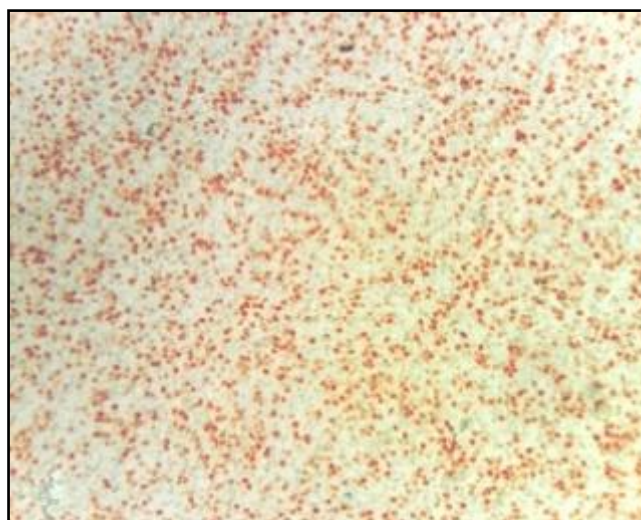


Figure 28 : Marquage nucléaire de la protéine Ki67 dans un cas de glioblastome.

La relecture de toutes les lames histologiques a été effectuée par un deuxième anatomopathologiste pour confirmer le diagnostic clinique. Cela a permis l'exclusion d'un cas de l'étude. De plus, la discordance entre l'imagerie et les résultats histologiques nous ont poussés à exclure trois patients de l'étude, y compris le cas exclu par l'étude histologique.

L'étude histologique a identifié 15 cas douteux de glioblastomes suite à un désaccord sur le diagnostic entre les anatomopathologistes. Par conséquent, une étude immunohistochimique a été réalisée en utilisant les anticorps Alpha-internexine et OLIG-2 pour définir le type histologique et permettre le reclassement de ces tumeurs. Cette technique a permis de confirmer le diagnostic de 8 cas de glioblastomes et de reclasser au sein d'un autre groupe, 7 cas restants qui ont montré un immunomarquage positif à la fois de l'INA et de l'OLIG-2. Ces tumeurs sont passées du groupe de glioblastomes au groupe d'oligodendrogliomes anaplasiques (Grade III).

4. Etude moléculaire

La discordance intra et inter-observateurs ainsi que les difficultés à classer certaines tumeurs gliales en astrocytomes, oligodendrogliomes ou gliomes mixtes sont sans doute les limites majeures que présente la classification de l'OMS version 2007. Il est actuellement primordial de compléter l'étude histologique par une recherche des principales altérations des gènes impliqués dans l'oncogénèse de ces tumeurs cérébrales. Concernant notre étude, nous nous sommes intéressés à la détection des altérations moléculaires touchant le gène *BRAF* dans les astrocytomes pilocytiques, les gènes *EGFR* et *MDM-2* dans les glioblastomes et enfin les gènes *IDH1* et *IDH2* dans les gliomes de grade II, III et IV.

4.1 Identification de la mutation V600E du gène *BRAF*

L'utilisation des techniques de séquençage à haut débit sur l'ensemble du génome a démontré que des anomalies touchant la voie des MAPK (mitogen-activating protein kinase) sont exclusives du groupe d'astrocytomes pilocytiques. Le mécanisme le plus commun est une duplication en tandem d'un fragment d'environ 2 Mb en 7q, ce qui donne lieu à une fusion de deux gènes, résultant en une protéine transformante de fusion, constituée par l'extrémité N-terminale de KIAA1549 et le domaine kinase de BRAF. D'autres partenaires de fusion rares ont été aussi identifiés. De plus, il existe d'autres anomalies d'activation de la voie des MAPK comme la mutation par substitution *BRAF* V600E. Elle est observée dans environ 10% des cas d'astrocytomes pilocytiques. Cette mutation est due à un échange d'un nucléotide T en A au niveau du codon 600, qui se traduit par le remplacement de la valine par l'acide glutamique. Dans notre population d'étude, nous avons tenté de détecter la mutation faux-sens V600E. Parmi tous les cas d'astrocytomes pilocytiques explorés, aucune mutation V600E n'a pu être mise en évidence. Néanmoins, nous avons identifié, dans un seul cas, une insertion de 3

nucléotides (TAC) conduisant à un décalage du cadre de lecture. Cette insertion a déjà été décrite dans des publications scientifiques antérieures.

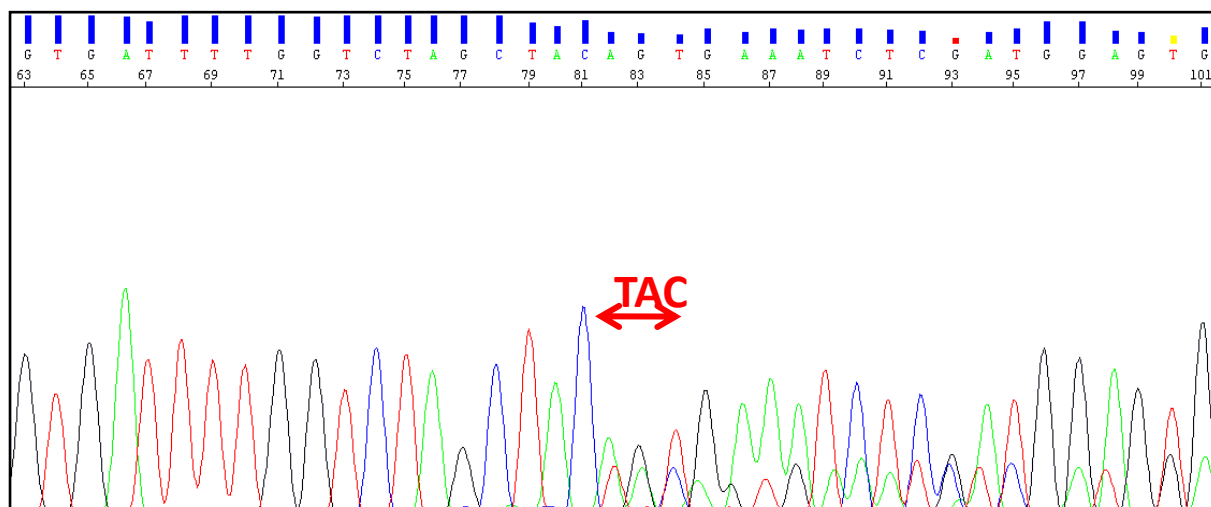


Figure 29 : Electrophorégramme d'un patient porteur d'un astrocytome pilocytique et présentant une insertion TAC au niveau du gène BRAF.

4.2 Détection des mutations du gène IDH :

Des mutations touchant l'isocitrate déshydrogénase (*IDH*) 1 et 2 caractérisent la grande majorité des gliomes de grades II/III et les glioblastomes secondaires de grade IV. Ces mutations, qui se produisent au début de la gliomagenèse, changent la fonction des enzymes, les obligeant à produire le 2 hydroxyglutarate, un éventuel oncométabolite, et de ne pas produire le NADPH. De plus, les gliomes avec un *IDH1/2* muté présentent un meilleur pronostic par rapport aux gliomes avec un *IDH* de type sauvage, d'où l'intérêt de sa détection. Dans les gliomes, la grande majorité des mutations au niveau du gène *IDH1* (plus de 90%) affecte le résidu d'acide aminé 132 correspondant à une mutation hétérozygote faux-sens et conduisant au remplacement de l'arginine par l'histidine (R132H). Ce résidu est situé dans le site actif de l'enzyme et est essentiel pour son fonctionnement. En l'absence des mutations *IDH1*, les patients peuvent présenter une mutation au niveau du résidu analogue (Arg172) du gène *IDH2*. Ces deux mutations (*IDH1* et *IDH2*) sont mutuellement exclusives.

L'analyse moléculaire de l'exon 4 des gènes *IDH1* et *IDH2* a été réalisée pour toutes les tumeurs gliales malignes (du grade II à IV). Concernant le gène *IDH1*, la mutation ponctuelle au niveau du codon 132 (CGT → CAT) et correspondant à la substitution Arginine-histidine (R132H) a été identifiée chez 43 patients (36,8%) (figure 30).

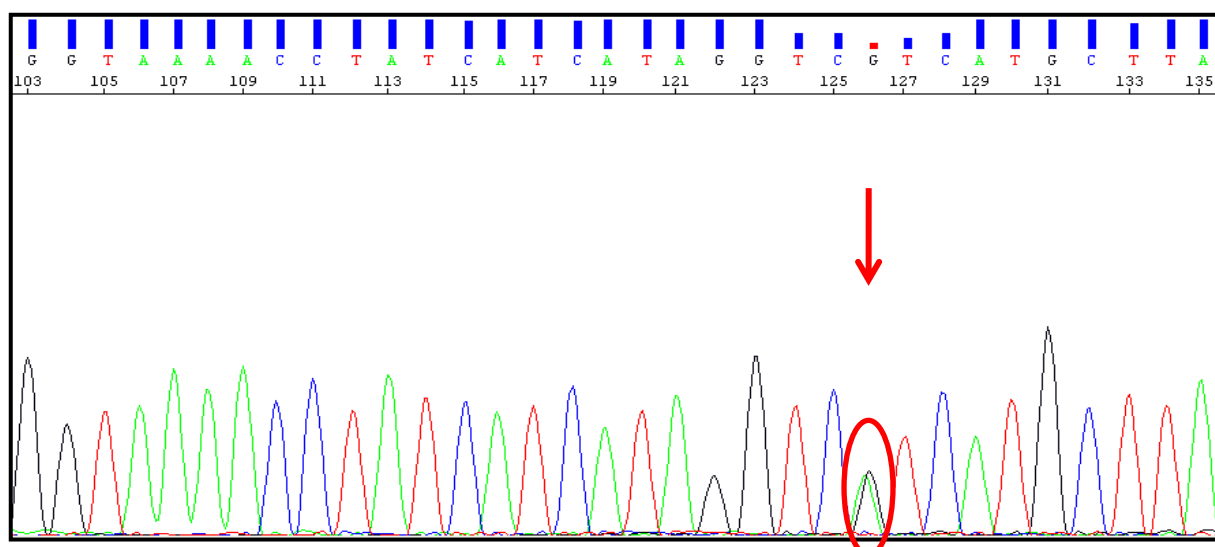


Figure 30 : Electrophorégramme d'un patient porteur d'un glioblastome et présentant la mutation majoritaire R132H au niveau du gène IDH1.

La répartition de cette mutation R132H dans les différents grades de gliomes est représentée en détail au niveau du tableau 27. On remarque que cette mutation est présente principalement au niveau des astrocytomes et des oligodendrogliomes de grade II et III alors qu'elle est moins fréquente dans les gliomes mixtes et encore plus rare dans les glioblastomes.

Tableau 27 : Répartition de la mutation R132H du gène IDH1 dans les gliomes de grades II, III et IV.

Type histologique		Age médian	Nombre de patients avec mutation <i>IDH1</i> / Nombre total	%
Grade II	A	32.5	8/13	61.5
	O	30	3/7	42.9
	OA	17	1/3	33.3
Grade III	A	33.5	4/6	66.7
	O	39.5	18/23	78.3
	OA	56	1/3	33.3
Grade IV	GBM	51	8/58	13.79
Total		41	43/113	38.05

La détection de la mutation *IDH1* peut être réalisée par immunohistochimie. En effet, le clone H09 (Dianova) est un anticorps spécifiquement dirigé contre la mutation majoritaire R132H du gène *IDH1*. Un immunomarquage positif est caractérisé par une coloration cytoplasmique diffuse. Ce marquage a été observé chez les 43 patients présentant la mutation R132H (sensibilité 100%) (figure 31). Aucun cas possédant le gène *IDH1* non muté n'a été marqué (Spécificité 100%).

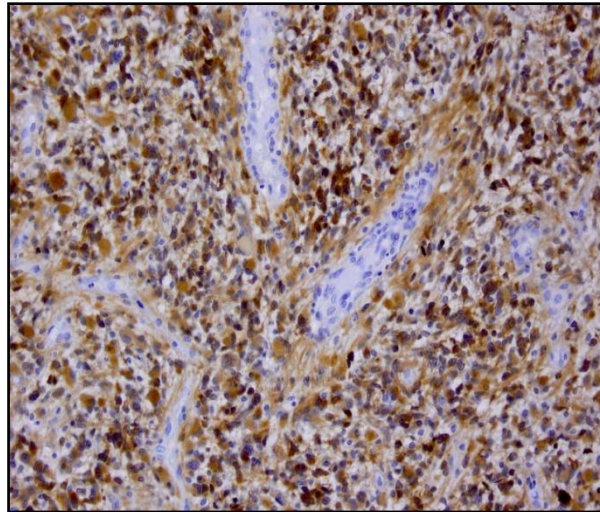


Figure 31 : Marquage cytoplasmique de l'anticorps anti-IDH1R132H.

Pour ce qui est du gène *IDH2*, une mutation ponctuelle a été détectée dans un seul cas d'oligodendrogliome anaplasique (figure 32) et correspond à la substitution Arginine-Lysine au niveau du résidu analogue 172.

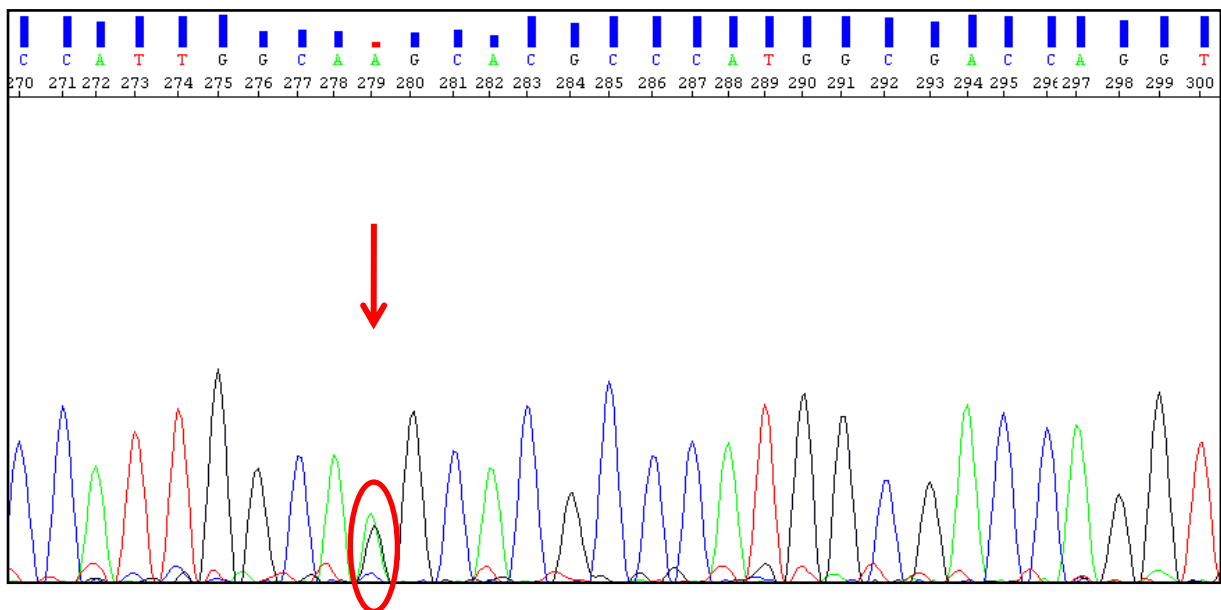


Figure 32 : Electrophorégramme d'un patient porteur d'un glioblastome et présentant la mutation majoritaire R172H au niveau du gène *IDH2*.

4.3 Détection de l'amplification du gène *EGFR* dans les glioblastomes par qPCR :

L'altération la plus commune du gène *EGFR* associée aux glioblastomes est l'amplification. Elle a été identifiée dans la littérature internationale dans environ 40% de glioblastomes primaires et rarement dans les glioblastomes secondaires. De plus, d'autres altérations au

niveau du gène *EGFR* ont été identifiées telles que la délétion des exons 2-7 (*EGFRvIII*) qui est présente dans une large proportion de glioblastomes avec *EGFR* amplifié.

Dans notre étude, la technique de qPCR a permis d'évaluer l'état d'amplification du gène *EGFR*. En effet, cette amplification, calculée à partir du ΔCt et du $\Delta \Delta Ct$ (Voir le détail du calcul dans la partie matériel et méthodes), a été identifiée dans 17 cas (29,31%) de glioblastomes. Une forte amplification, caractérisée par un $\Delta Ct > 5$, a été détectée dans 15 cas (88,24%) parmi les 17 présentant une amplification *EGFR*.

Tableau 28 : Détermination du statut d'amplification du gène *EGFR* pour les 17 cas de glioblastomes *EGFR* amplifié.

Glioblastomes	2e- $\Delta\Delta Ct$	Etat d'amplification
GBM 63	2,5	amplification modérée
GBM 31	10,06	forte amplification
GBM 87	9,71	forte amplification
GBM 101	41,93	forte amplification
GBM 111	7,73	forte amplification
GBM 70	7,84	forte amplification
GBM 62	78,25	forte amplification
GBM 32	13,09	forte amplification
GBM 126	9,92	forte amplification
GBM 127	4,35	amplification modérée
GBM 138	72	forte amplification
GBM 141	117,78	forte amplification
GBM 36	3,81	forte amplification
GBM 41	7,89	forte amplification
GBM 80	6,54	forte amplification
GBM 86	8,11	forte amplification
GBM 97	12,3	forte amplification

4.4 Détection de l'amplification du gène *MDM2* :

L'oncoprotéine Mdm2 inhibe l'activité de p53, non seulement en masquant son domaine de transactivation, mais aussi en stimulant la dégradation du suppresseur de tumeur grâce à son activité E3-ubiquitine ligase. Mdm2 est également une des cibles transcriptionnelles de p53, ce qui crée l'opportunité d'un rétro-contrôle négatif de l'activité de p53.

L'amplification *MDM2* est une altération génétique retrouvée dans 10 à 15% des glioblastomes primaires. Toutefois, notre étude a montré un taux d'amplification un peu plus élevé qui atteint 22,41% des cas avec 13 glioblastomes amplifiés sur les 58 étudiés.

5. Cytogénétique moléculaire :

5.1 Détection de la co-délétion 1p/19q

L'utilisation du kit «Vysis 1p36/1q25 and 19q13/19p13 FISH Probe» sur du tissu tumoral fixé et inclus en paraffine a permis de détecter, dans les groupes des tumeurs oligodendrogiales et des tumeurs mixtes, la présence ou non de la co-délétion 1p/19q.

Cependant, à ce jour nous avons pu réaliser la technique FISH sur seulement 7 cas d'oligodendrogliomes parmi les 30 tumeurs incluses dans cette étude. En effet les différentes mises au point de la technique FISH et son adaptation avec les tumeurs cérébrales n'ont aboutit à un résultat satisfaisant que très récemment. Par conséquent, nous projetons continuer cette partie ultérieurement et réaliser une étude comparative entre les résultats de la technique FISH et les résultats immunohistochimiques de l'expression de l'INA.

En ce qui concerne les 7 cas étudiés, la co-délétion 1p/19q a été observée dans 4 oligodendrogliomes, alors qu'une délétion du 1p seulement a été observée dans un cas.

Les deux figures suivantes présentent un cas d'oligodendrogliome diffus de grade II qui présente une co-délétion 1p/19q, caractérisée par la présence dans la majorité des noyaux d'un signal fluorescent rouge avec deux signaux fluorescents verts. Les spots rouges caractérisent la sonde test qui s'hybride spécifiquement aux gènes d'intérêts (gènes concernés par la délétion), alors que les spots verts représentent la sonde contrôle qui sert de témoin d'hybridation.

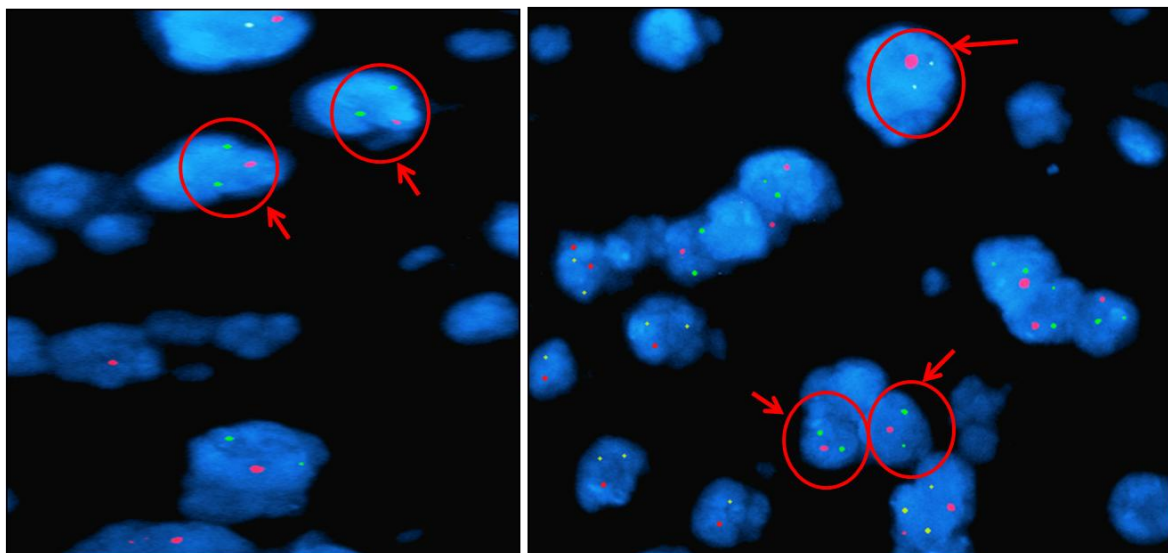


Figure 33 : Résultats FISH d'un cas d'oligodendrogliome anaplasique présentant une co-délétion 1p/19q (à gauche : la délétion 1p et à droite : la délétion 19q).

5.2 Détection de l'amplification du gène *EGFR* par FISH

La technique de qPCR a permis d'identifier 17 cas de glioblastomes présentant une amplification du gène *EGFR*. Ces cas *EGFR* amplifié ont été réévalués par la technique d'hybridation in situ fluorescente (FISH) en utilisant le kit «Vysis LSI EGFR/CEP 7 Probe». Ce kit contient la sonde test, avec une fluorescence rouge, spécifique de la partie du gène *EGFR* sujette à l'amplification et une sonde contrôle centromérique à fluorescence verte.

Au total, 14 glioblastomes présentant une amplification du gène *EGFR* ont été confirmés par la technique FISH alors qu'un seul cas a été ininterprétable.

La figure 34 montre un glioblastome *EGFR* amplifié où nous remarquons deux spots verts dans chaque noyau avec un amas de spots rouges caractéristiques du phénomène de l'amplification génique.

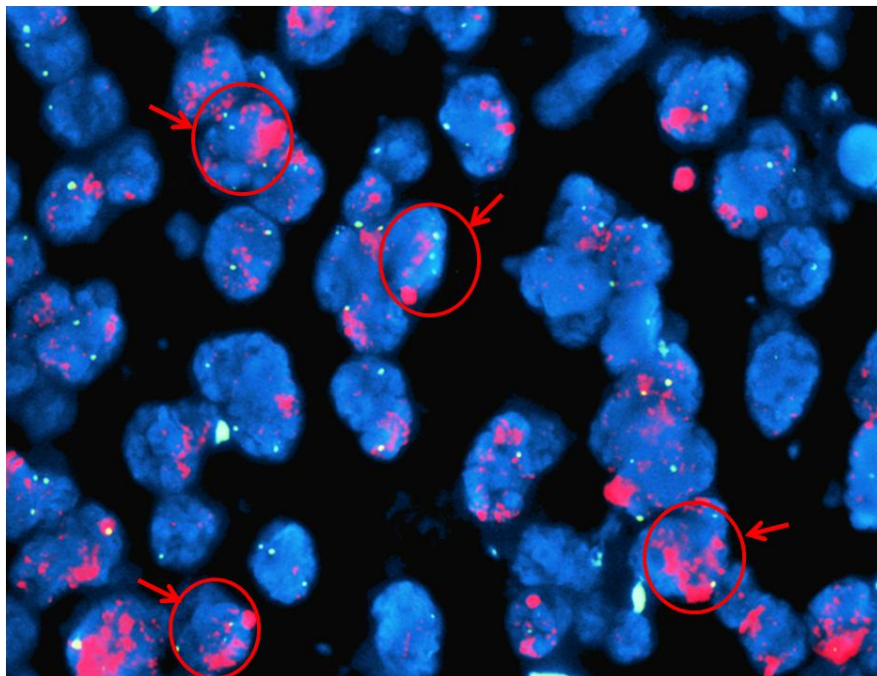


Figure 34 : Résultats FISH d'un cas d'oligodendrogliome anaplasique présentant une amplification au niveau du gène *EGFR*.

6. Survie globale des patients porteurs de glioblastomes

Pour évaluer le pronostic et la réponse au traitement des patients porteurs de glioblastomes, l'étude de la survie globale est essentielle.

Il est à noter que la collecte des données concernant la survie et la progression des malades atteints de glioblastomes a été très difficile. Au total, 30 glioblastomes seulement ont été intégrés dans cette étude et ont fait l'objet de corrélations avec les altérations moléculaires

caractérisant ce groupe de tumeurs (*IDH1*, *EGFR*, *MDM2*, *P53* et *Ki67*). Vu l'effectif très faible de la population étudiée, des différences statistiquement significatives ($p < 0,05$) n'ont pas pu être établies. Néanmoins, l'analyse des courbes de survie montre des différences de probabilités de survie à 6mois et à 9mois.

Notre population d'étude a été caractérisée par une moyenne de survie globale d'environ 9,5 mois (287 jours) et une médiane de 6,5 mois avec des extrémités allant de 1 à 40 mois.

6.1 Corrélation entre le statut du gène *IDH1* et la survie globale :

Dans cette étude, nous avons essayé de chercher une possible corrélation entre le statut du gène *IDH1* et la survie. Nous remarquons d'après les courbes une survie meilleure des patients porteurs du gène *IDH1* muté. En effet, la probabilité de survie à 6mois passe de 46% pour les patients avec le gène *IDH1* de type sauvage à 75% pour ceux porteurs de la mutation. De même, la probabilité de survie à 9mois est passée de 30% à 50% pour les glioblastomes ayant une mutation *IDH1*.

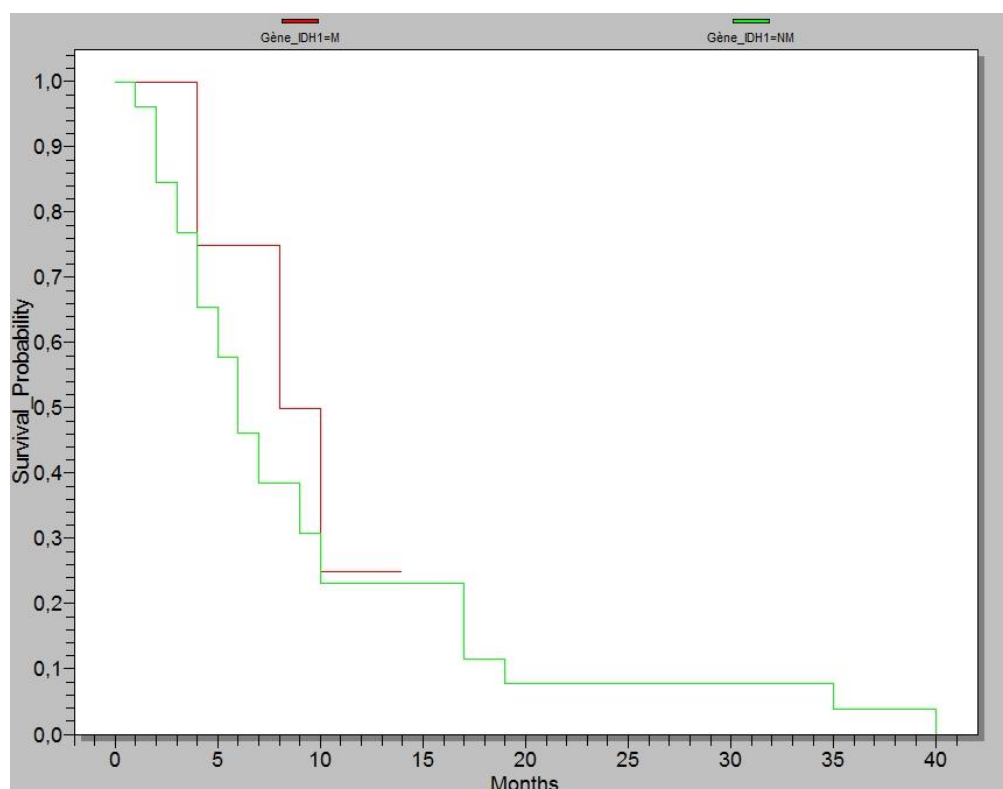


Figure 35 : Probabilité de survie globale des patients porteurs de glioblastomes en fonction du statut *IDH1*: M caractérise les cas mutés, NM caractérise les cas non mutés ; ($p=0,6024$; test Log-Rank).

6.2 Corrélation entre le statut du gène *EGFR* et la survie globale :

Concernant la corrélation entre le statut du gène *EGFR* et la survie, nous observons une légère différence de la survie à 6mois. En effet, cette probabilité de survie est passée de 44% caractérisant le groupe de glioblastomes qui présentent une amplification de l'*EGFR* à 52% pour les glioblastomes dépourvus de cette amplification.

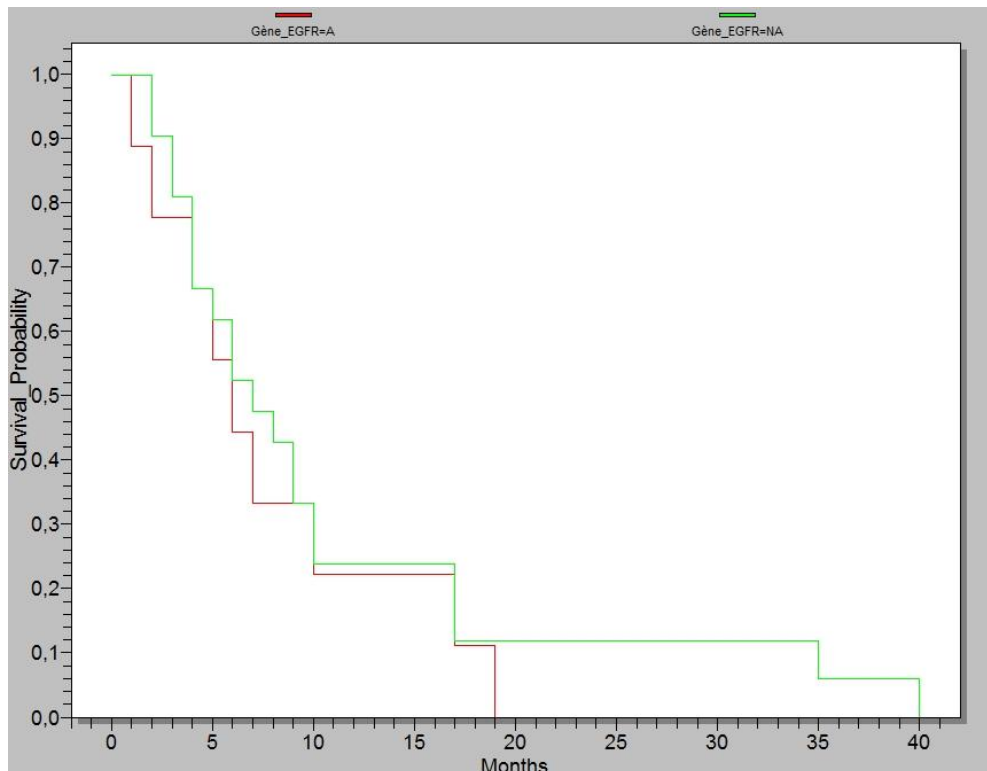


Figure 36 : Probabilité de survie globale des patients porteurs de glioblastomes en fonction du statut d'amplification EGFR : A caractérise les cas amplifiés, NA caractérise les cas non amplifiés ; ($p=0,5719$; test Log-Rank).

6.3 Corrélation entre le statut du gène *MDM2* et la survie globale :

Une légère différence de survie a été également notée entre les glioblastomes avec une amplification du gène *MDM2* et les glioblastomes sans amplification. En effet, la probabilité de survie à 6mois est passée de 43% pour les tumeurs avec *MDM2* amplifié à 52% pour celles sans amplifications du gène *MDM2*. La survie à 9mois, quant à elle, est passée de 28% à 35% pour les glioblastomes à *MDM2* amplifié et ceux à *MDM2* non amplifié respectivement.

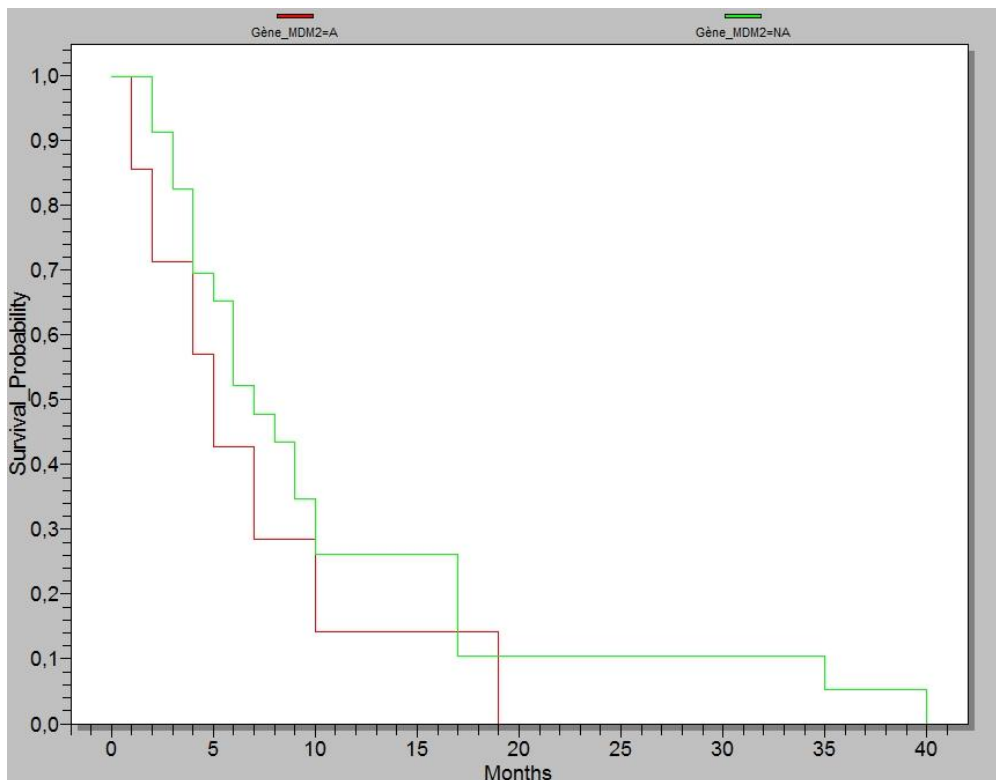


Figure 37 : Probabilité de survie globale des patients porteurs de glioblastomes en fonction du statut d'amplification du gène MDM2 : A caractérise les cas amplifiés, NA caractérise les cas non amplifiés ; ($p=0,375$; test Log-Rank).

6.4 Corrélation entre l'expression de la protéine Ki67 et la survie globale :

Nous avons noté un pronostic meilleur des patients présentant un indice de prolifération cellulaire faible ($Ki67 < 10\%$). En effet, la probabilité de survie à 6mois est de 38% pour les tumeurs à prolifération cellulaire rapide alors qu'elle atteint 54% pour les tumeurs à faible prolifération. De la même manière, la probabilité de survie à 9mois varie de 13% à 38% respectivement pour un $Ki67 > 10\%$ et un $Ki67 < 10\%$.

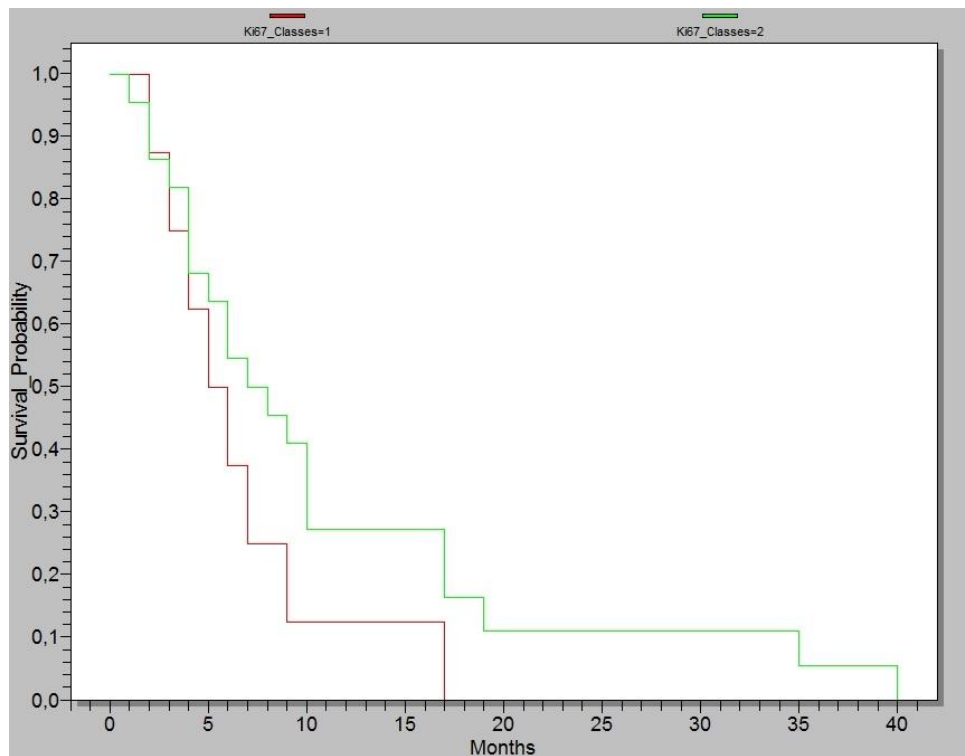


Figure 38 : Probabilité de survie globale des patients porteurs de glioblastomes en fonction du statut de l'indice de prolifération cellulaire Ki67 : Classe 1 caractérise les glioblastomes avec Ki67>10%, Classe 2 caractérise les glioblastomes avec Ki67<10% ; ($p=0,1934$; test *Log-Rank*).

6.5 Distribution des glioblastomes en groupes moléculaires

En tenant compte des altérations moléculaires clés touchant le groupe de glioblastomes, il est possible de classer ces tumeurs très hétérogènes en groupes moléculaires. Le tableau 29 montre la distribution des glioblastomes en fonction du statut des gènes *IDH1* et *EGFR* et de l'expression de la protéine P53.

Tableau 29 : Distribution des glioblastomes en groupes moléculaires.

Groupes moléculaires	Nombre de cas	Fréquence
IDH(-) / EGFR (-) / P53 (+)	15	25,86%
IDH(-) / EGFR (+) / P53 (-)	8	13,79%
IDH(-) / EGFR (+) / P53 (+)	6	10,34%
IDH(+) / EGFR (-) / P53 (-)	5	8,62%
IDH(+) / EGFR (-) / P53 (+)	2	3,45%
IDH(-) / EGFR (-) / P53 (-)	21	36,22%
IDH(+) / EGFR (+) / P53 (+)	1	1,72%

On remarque que 25,86% expriment seulement la P53, 13,79% présentent une amplification du gène *EGFR* alors que 8,62% se caractérisent par une mutation touchant le gène *IDH*. Cependant il est à noter qu'un taux important de ces tumeurs (36,22%) ne présentent aucune de ces altérations. Ceci devra nous pousser à rechercher d'autres altérations pouvant être corrélées avec ceux étudiées jusqu'à présent.

L'étude de la moyenne de survie globale des différents groupes moléculaires n'a pas permis de dégager des différences significatives. L'inclusion d'un effectif plus large et la détection d'autres altérations moléculaires sont essentielles pour une meilleure stratification des glioblastomes en groupes moléculaires à pronostics différents.

Chapitre IV : Discussion

Les gliomes représentent les tumeurs primaires intracrâniennes les plus fréquentes. Ils constituent plus de 80% des tumeurs cérébrales. Par conséquent, l'épidémiologie descriptive des gliomes est souvent traitée dans un contexte plus large des tumeurs du système nerveux central. De plus, l'estimation de l'incidence des tumeurs cérébrales est souvent très difficile en raison du caractère incomplet des données recueillies, du manque de reproductibilité des classifications actuelles, de l'absence dans certains cas de confirmation histologique et de la difficulté de saisir les récurrences et les autres transformations anaplasiques (Loiseau H *et al.*, 2009).

Aux États-Unis, la collecte des données est centralisée par un registre spécialisé appelé Registre des tumeurs cérébrales des États-Unis (CBTRUS). Ce dernier est le registre le plus exhaustif et le plus détaillé et constitue par conséquent la première référence mondiale des études épidémiologiques portant sur les tumeurs du système nerveux central (Ostrom QT *et al.*, 2014). En Europe, une étude datant de 2012 a essayé d'établir le profil épidémiologique des tumeurs cérébrales gliales et non gliales en se basant sur les données collectées à partir des registres de cancers des pays européens participant au projet RARECARE. 44 947 cas de cancers du SNC diagnostiqués entre 1995 et 2002 ont fait l'objet de cette étude épidémiologique européenne (Crocetti E *et al.*, 2012). En France, deux principales sources de données sont disponibles: le registre spécialisé des tumeurs du système nerveux central de la Gironde existant depuis 1999 et le Recensement national histologique des tumeurs primitives du système nerveux central (FBTDB) existant depuis 2005. L'incidence des tumeurs du système nerveux central est actuellement d'environ 18/100000 en France (Baldi I *et al.*, 2011; Rigau V *et al.*, 2011; Zouaoui S *et al.*, 2012) et 21,42 / 100.000 aux États-Unis (Ostrom QT *et al.*, 2014). En Europe, l'incidence des tumeurs gliales est estimée à 11.9 / 100.000 par an (Crocetti *et al.*, 2012).

Actuellement au Maroc, il existe un registre global des cancers de la région du Grand Casablanca. L'incidence standardisée estimée des cancers du système nerveux central est de 2,0 pour 100 000 hommes / an et 1,1 cas pour 100 000 femmes / an (Ferlay J *et al.*, 2004).

Dans la région de Fès, il n'existe pas de vrai registre des cancers. Cependant, une étude rétrospective dressant le profil épidémiologique de 5532 cas de cancers du CHU de Fès a identifié 129 (2,3%) cas de cancer du SNC (Chbani L *et al.*, 2013).

L'étude des principales caractéristiques épidémiologiques de notre population Nord Est du Maroc, représentée par les patients recrutés et diagnostiqués au CHU Hassan II de Fès, en comparaison avec la littérature internationale montre une prédominance masculine de l'ensemble des tumeurs gliales avec un sexe ratio de 1,5. Ce résultat concorde avec les données du registre américain spécialisé dans les tumeurs du SNC (CBTRUS) qui parle d'un sexe ratio compris entre 1,3 et 1,6 (Ostrom QT *et al.*, 2014). De même un sexe ratio de 1,4 pour les tumeurs astrocytaires et de 1,3 pour les tumeurs oligodendrogiales a été décrit en Europe (Crocetti *et al.*, 2012). Toutes ces données confirment le risque plus important de développer une tumeur gliale chez les hommes par rapport aux femmes.

Aux Etats Unis, l'âge médian de survenue d'un gliome est de 59ans (Ostrom QT *et al.*, 2014). Pour ce qui est de notre population, l'âge médian est de 38ans. Par conséquent, ce type de tumeurs survient précocement dans notre population par rapport à la population américaine. On note un écart de 21 ans. Un tel phénomène a été observé dans d'autres types de tumeurs, comme le cancer du sein, où l'âge médian décrit dans les pays du Maghreb est très inférieur à celui caractérisant les pays occidentaux avec un écart de 10 ans (Europe, Amérique du Nord) (Znati *et al.*, 2012).

Le CBTRUS note un pic de fréquence dans le groupe de glioblastomes à l'âge de 65ans (Ostrom QT *et al.*, 2014). En Europe, les tumeurs astrocytaires affectent les sujets les plus âgés (60ans et plus) alors que les gliomes à composante oligodendrogiale présente un pic d'incidence dans le groupe d'âge 40-59ans (Crocetti *et al.*, 2012). Dans notre étude, nous avons également décrit une fréquence plus élevée de gliomes dans la tranche d'âge 50 – 59ans. Nos résultats sont par conséquent en homogénéité avec les données internationales.

Parmi les différents groupes composant les tumeurs gliales, les glioblastomes représentent la fraction la plus importante avec un taux de 43,61%. Les glioblastomes en association avec les astrocytomes des autres grades représentent dans notre étude 72% de la totalité des gliomes. En effet, une répartition similaire a été observée aux Etats Unis avec une fréquence des Glioblastomes de 54,7% de l'ensemble des gliomes (Ostrom QT *et al.*, 2014). Ce pourcentage atteint les environs de 75% pour toutes les tumeurs gliales à composante astrocytaire. La dominance des tumeurs astrocytaires par rapport aux tumeurs oligodendrogiales a été également signalée dans l'étude européenne (Crocetti *et al.*, 2012).

Dans les différents registres cités précédemment, l'âge avancé constitue un facteur de mauvais pronostic pour les patients porteurs de gliomes (Crocetti *et al.*, 2012 ; Ostrom QT *et al.*, 2014).

En ce qui concerne les astrocytomes pilocytiques, nous avons remarqué qu'ils touchent la population jeune et que son taux diminue avec l'âge pour disparaître complètement dans la tranche d'âge 30 – 39ans. Ces données sont là encore en accord avec la littérature internationale qui décrit ces tumeurs comme touchant principalement les sujets jeunes (Collins VP *et al.*, 2015). De plus, le CBTRUS décrit un sexe ratio de 1 pour ce groupe de tumeurs. Ceci nous l'avons également noté dans notre étude où nous avons un nombre égal de patients de sexe masculin et de sexe féminin présentant un astrocytome pilocytique (10 garçons / 10 filles).

A côté du sexe et de l'âge, la localisation de la tumeur est parmi les facteurs déterminants de l'évolution des gliomes. Nous avons observé que les tumeurs gliales siègent principalement au niveau des lobes cérébraux (77,44%) avec une légère prédominance du lobe frontal (39,1%) suivi du lobe temporal (7,52%). Le registre américain décrit aussi, une fréquence importante des tumeurs gliales au niveau cérébral (60,9%) surtout au niveau des lobes frontal et pariétal avec des taux de 25,8% et 19,7% respectivement et une rareté de localisation au niveau du lobe occipital avec un pourcentage de 3,2% dans la population américaine contre un faible pourcentage de 0,75% (1cas) dans notre population d'étude.

Le glioblastome est un groupe de tumeurs gliales caractérisé par une forte malignité et agressivité. Il a été noté que ces tumeurs sont 1,6 fois plus fréquentes chez les hommes par rapport aux femmes (CBTRUS). Ce ratio se rapproche de celui décrit dans notre étude qui est de l'ordre de 1,4.

Selon le registre américain, il y a une augmentation de l'incidence des glioblastomes avec l'âge et un pic observé dans la tranche d'âge comprise entre 75 et 84ans. Cependant, dans notre population, nous avons remarqué que la fréquence des glioblastomes augmente avec l'âge jusqu'à 60ans pour diminuer par la suite chez les sujets plus âgés. Ceci peut être expliqué par l'espérance de vie qui est largement plus grande dans les pays industrialisés par rapport aux pays de Maghreb, ce qui réduit le nombre de patients très âgés dans notre population. En effet, les patients de plus de 70ans ne dépassent pas 6 cas de la totalité des 133 tumeurs gliales étudiées.

Le KPS (Karnofsky Performance Score) est un indice clinique d'évaluation de l'état de performance des patients atteints de glioblastomes. Il est largement utilisé en neuro-oncologie du fait de la possibilité de sa corrélation avec la survie et est maintenant l'une des variables de la classification en oncologie (Classification RPA). L'analyse réursive par répartition (RPA) est une classification qui a été élaborée pour comparer les catégories de survie et obtenir des sous-groupes homogènes de patients. Dans les grands essais randomisés, la RPA a également le potentiel de déterminer si un groupe particulier de patients peut bénéficier le plus de nouvelles approches thérapeutiques ou si certains patients peuvent être épargnés des traitements inutiles.

A partir des données de plusieurs essais sur des gliomes malins du Groupe de Radiothérapie Oncologique américain (RTOG), 6 classes pronostiques ont été identifiées. Il s'agit d'une évaluation globale, basée sur des critères cliniques (âge, KPS, résection complète/subtotale ou biopsie). Les glioblastomes sont classés dans les groupes III à VI. La survie globale était statistiquement différente entre les classes RPA III, IV et V, avec des temps de survie médiane de 17, 15 et 10 mois, respectivement, et des taux de survie à 2 ans de 32%, 19% et 11%, respectivement. La survie après traitement concomitant de radiothérapie/chimiothérapie avec Témzolomide (RT / TMZ) était plus élevée dans la classe RPA III, avec une médiane de survie de 21 mois et un taux de survie à 2 ans de 43%, contre 15 mois et 20% pour la radiothérapie seule. Dans la classe IV RPA, l'avantage de survie est resté significatif, avec des temps de survie médiane de 16 versus 13 mois respectivement, et des taux de survie à 2 ans de 28% versus 11% respectivement. Dans la classe V RPA, cependant, l'avantage de survie de RT / TMZ était de signification limite (Mirimanoff RO *et al.*, 2006).

Par ailleurs, une étude récente (Sacko *et al.*, 2015) a montré que les malades porteurs de GBM vivent 73% du temps de leur maladie avec un KPS $\geq 70\%$. En effet, dans notre population, plus de 90% des patients présentent un indice KPS $\geq 70\%$, ce qui concorde parfaitement avec l'étude précédemment décrite.

Pour les patients présentant des signes cliniques suggérant la présence d'une tumeur, la première étape est la réalisation d'une imagerie cérébrale. Ces examens vont permettre de localiser la tumeur si elle existe, de préciser ses caractéristiques et de diagnostiquer certaines complications (hémorragie, hydrocéphalie...). L'IRM reste la technique radiologique de choix. Cependant, de par sa disponibilité et sa facilité d'utilisation, le scanner est encore une technique largement employée dans le repérage des lésions cérébrales.

Généralement, l'aspect radiologique des GBM est le plus souvent évocateur du diagnostic. Mais parfois, deux pathologies peuvent avoir la même apparence radiologique avec le scanner ou même avec les séquences d'IRM classiques (abcès, métastase, gliome de haut grade...). Le diagnostic différentiel devient alors difficile. Les progrès de l'IRM (spectro-IRM, diffusion, perfusion) facilitent de plus en plus le diagnostic différentiel. En IRM, après injection de gadolinium (produit de contraste), les glioblastomes apparaissent en séquence pondérée en T1 comme une lésion avec une zone centrale en hyposignal caractéristique de la nécrose. Une prise de contraste périphérique, dite « en anneau » est secondaire à une angiogenèse massive et associée à la rupture de la barrière hémato-encéphalique. Enfin un hypersignal en séquence pondérée en T2 ou en FLAIR et un hyposignal en séquence pondérée en T1 autour de la masse tumorale correspondent à un œdème péritumoral et à une infiltration des cellules de gliome dans le parenchyme sain (Martin-Duverneuil N *et al.*, 2008)

La spectroscopie par IRM permet de déterminer la présence de métabolites comme la choline, la créatine, le myoinositol, le N-acétylaspartate (NAA). Le rapport relatif de ces composants peut apporter des arguments lorsque l'on considère les diagnostics d'astrocytomes (bas grades, anaplasiques), de glioblastomes, de gliomatoses cérébrales, etc. Dans les glioblastomes, il existe généralement une élévation très importante de la choline et un effondrement du NAA traduisant une prolifération marquée. Cet aspect s'associe à des signes intenses de néoangiogenèse en IRM de perfusion (Mabray MC *et al.*, 2015 ; Skogen K *et al.*, 2016).

Le diagnostic et le grading des tumeurs cérébrales par imagerie reposent sur la régularité du contour tumoral, l'hémorragie, la nécrose et l'infiltration de la tumeur et non pas sur l'identification directe des cellules tumorales et de leurs caractéristiques. Par conséquent, il ne constitue pas un diagnostic définitif. Le diagnostic de certitude ne peut être établi qu'en présence d'un examen anatomopathologique après biopsie ou exérèse de la tumeur, qui permet d'identifier le type histologique et le grade après étude de la morphologie cellulaire. Toutefois, dans notre étude, nous avons noté trois cas discordants entre l'histologie et la radiologie. Ces discordances ont été déjà décrites dans d'autres études. En effet, Callovini a montré dans son étude des discordances entre les résultats radiologiques et histologiques qui varient selon le grade de malignité. En effet, le taux de discordance passe de 13% pour les gliomes de haut grade à 30% pour ceux de bas grade (Callovini GM, 2008).

D'un autre côté, 61,9% des patients porteurs d'un glioblastome ont subi une exérèse totale de la tumeur. C'est la pratique chirurgicale recommandée quand la tumeur n'est pas très profonde et permet une meilleure survie et une meilleure prise en charge du patient (Duffau H, 2011). S'il reste un résidu post-opératoire, la résection est alors partielle ou subtotale. Elle

est dans notre cas de l'ordre de 23,81% et devra être suivie d'un traitement par radiothérapie et/ou chimiothérapie. Lorsque l'exérèse est impossible, le neurochirurgien se limite à une biopsie qui sera envoyée en anatomo-pathologie pour le diagnostic (14,29% des cas étudiés).

Les gliomes forment un groupe hétérogène des tumeurs cérébrales avec plusieurs types histologiques et différents grades de malignité. Jusqu'à récemment, le diagnostic histologique (classification de l'OMS version 2007) était la méthode de référence pour la classification, l'évaluation du pronostic et par conséquent la prise en charge des patients porteurs de ces tumeurs. Dans notre étude, toutes les tumeurs gliales ont été classées selon les critères de la classification de l'OMS 2007. L'analyse microscopique se basait essentiellement sur l'étude des lames colorées à l'hématoxyline et l'éosine et éventuellement l'immunohistochimie. Afin de parvenir à un diagnostic précis, le neuropathologiste suit généralement un arbre décisionnel ou algorithme de diagnostic. Dans la pratique clinique quotidienne, les gliomes montrent souvent des caractéristiques très différents. En outre, la classification des gliomes peut se révéler difficile en raison de la quantité insuffisante des tissus, des critères de diagnostic imprécis et subjectifs mais surtout parce que la biologie des gliomes n'est pas entièrement représentée par son histologie. Ceci a pour principales conséquences et inconvénients des discordances intra et interobservateurs décrites dans plusieurs travaux antérieurs (Figarella-Branger D *et al.*, 2005; Van den Bent MJ, 2010), et nous avons également remarqué les mêmes discordances dans notre étude. En effet, après relecture de toutes les lames HE des gliomes par trois anatomopathologistes, nous avons noté une discordance interobservateurs de 23%. La difficulté se posait surtout dans la classification des tumeurs gliales de grade III (Van den Bent MJ, 2010). Ceci est en parfait accord avec la littérature internationale qui décrit une discordance allant de 20 à 30% (Van den Bent MJ, 2010). Ces divergences de diagnostic auront pour principale conséquence un manque de précision pronostique ainsi qu'un manque de précision pour la prédiction de la réponse aux traitements.

Durant ces deux dernières décennies, la technique d'immunohistochimie est devenue de plus en plus utilisée. Ainsi, l'identification de nombreux marqueurs moléculaires a considérablement élargi l'utilisation de l'immunohistochimie et son rôle capital dans le diagnostic et le pronostic des gliomes. Actuellement, il est devenu clair que certains biomarqueurs moléculaires ont une meilleure corrélation avec la biologie de ces tumeurs que le diagnostic histologique. À ce jour, le biomarqueur le plus utile pour la classification des oligodendrogliomes est la co-délétion 1p / 19q et qui a été étroitement associée au phénotype oligodendrogliol (Reifenberger J *et al.*, 1994 ; Bello MJ *et al.*, 1995 ; Kraus JA *et al.*, 1995).

Cette altération génétique est liée à une augmentation de la sensibilité à la chimiothérapie et par conséquent à un pronostic favorable (McDonald JM *et al.*, 2005 ; van den Bent MJ *et al.*, 2006). En effet le suivi à long terme de l'essai clinique en phase III (étude EORTC 26951) dirigée par l'organisation européenne pour la recherche et le traitement du cancer (EORTC) et qui a concerné 368 oligodendrogliomes et oligo-astrocytomes anaplasiques, dont 80 présentant une co-délétion 1p/19q, a démontré que le groupe de tumeurs avec une codélétion présente un pronostic favorable avec une augmentation significative de la survie globale et la survie sans progression quelque soit le traitement administré (Radio-chimiothérapie concomitante ou radiothérapie seule). Chez ces patients porteurs de tumeurs avec la codélétion 1p/19q, la survie globale a été de 112 mois pour le groupe de patients recevant comme traitement la radiothérapie seule. Chez les patients ne présentant pas de codélétion, la survie globale était de 21 mois pour les patients traités seulement par radiothérapie. L'augmentation de la survie sans progression (PFS) a également été plus importante dans le groupe de tumeurs avec une codélétion 1p/19q. Dans ce groupe, la PFS était de 157 mois après traitement par radiothérapie et chimiothérapie concomitante (RT/PCV) et 50 mois après traitement par radiothérapie seule (RT). Chez les patients ne présentant pas de codélétion 1p/19q, la PFS était de 15 mois dans le groupe recevant une thérapie combinée (RT/PCV) et 9 mois dans le groupe recevant la radiothérapie seule (RT) (van den Bent MJ *et al.*, 2013). De ce fait, la signification clinique des résultats liés à la co-délétion 1p / 19q est plus importante que celle des caractéristiques morphologiques distinguant ce groupe de tumeurs.

D'un autre côté, l'INA est un filament neuronal intermédiaire qui est largement exprimée dans les neurones et peut potentiellement être impliquée dans la neurogenèse. L'expression de l'INA est fréquemment détectée dans les cellules tumorales oligodendrogliales et a été indiquée comme un substitut immunohistochimique de la co-délétion 1p/19q dans les oligodendrogliomes. Plusieurs études ont démontré la corrélation significative entre l'expression de l'alpha internexine (INA) et la co-délétion 1p/19q dans les oligodendrogliomes (Ducray F *et al.*, 2009 ; Ducray F *et al.*, 2010 ; Nagaishi M *et al.*, 2014).

Dans notre cas, l'INA était exprimée dans la totalité des oligodendrogliomes et oligo-astrocytomes anaplasiques (Grade III) alors qu'elle était présente dans 71,42% des oligodendrogliomes diffus (Grade II). En totalité, l'INA s'est exprimée dans 90,63% des tumeurs oligodendrogliales et mixtes. Ce résultat est largement supérieur par rapport à l'étude de Ducray *et al.* qui a identifié l'expression de l'INA dans 37,98% des tumeurs oligodendrogliales et mixtes (59% des oligodendrogliomes de grade II, 45% des

oligodendrogliomes de grade III, 15% des oligo-astrocytomes de grade II et 12% des oligo-astrocytomes de grade III) (Ducray F *et al.*, 2010). Ceci pourrait être dû à la difficulté d'interprétation de l'immunomarquage par l'INA. En effet, l'INA n'est considérée positive que si le marquage est cytoplasmique diffus avec une expression périnucléaire sous forme de cluster et un immunomarquage d'au moins 10% des cellules tumorales. Elle nécessite une analyse de neuropathologistes spécialisés et expérimentés. D'un autre côté l'effectif faible de notre population de tumeurs oligodendrogliales et mixtes pourraient expliquer cette divergence. En effet, alors que l'étude de Ducray et al. a porté sur 409 tumeurs gliales, nous sommes limités à l'étude de 32 cas d'oligodendrogliomes et d'oligo-astrocytomes grades II et III. L'élargissement de cette population d'étude est donc recommandé et pourrait rapprocher les résultats obtenus avec ceux de la littérature.

Par ailleurs, vu le temps assez important entrepris dans la mise au point de la technique FISH et son adaptation aux tumeurs cérébrales, la recherche de la co-délétion 1p/19q n'a concerné que 7 cas d'oligodendrogliomes et d'oligo-astrocytomes. Parmi les cas étudiés, 4 ont présenté une co-délétion parfaite du 1p/19q alors qu'un seul cas s'est caractérisé par une délétion du 1p seulement et 2 autres cas n'ont pas présenté cette altération. Il est également important de noter que les 4 cas d'oligodendrogliomes co-délétés se caractérisaient par un marquage franchement positif de l'INA, alors que les cas non délétés ne présentaient pas d'immunomarquage. En revanche, le cas ayant une délétion du 1p seulement avait été INA positif. De ce fait, la spécificité de l'INA à détecter la co-délétion 1p/19q dans notre population est assez importante (85,71%) et rejoint d'autres publications scientifiques (Ducray et *al.*, 2010) qui parle d'une spécificité de 80% et d'une sensibilité de 85% (Ducray et *al.*, 2010).

Un marqueur plus récemment décrit pour la différenciation gliale est l'Olig-2, un facteur de transcription considéré comme essentiel pour le développement des oligodendrocytes. Ce marqueur ne permet pas la discrimination univoque entre oligodendrogliomes et astrocytomes diffus (Grade II) ou pilocytiques (Grade I), mais peut être utile dans le diagnostic différentiel entre un gliome diffus (Grade II) et une tumeur épémdymaire ou d'autres types de tumeurs non gliales, puisque l'immunomarquage à l'Olig-2 est généralement absent dans ces groupes (Ligon KL *et al.*, 2004; Preusser M *et al.*, 2007). Pour expliquer la présence de l'expression de l'Olig2 à la fois dans les tumeurs astrocytaires et oligodendrogliales, plusieurs hypothèses ont été avancées : soit que l'Olig2 n'est pas un marqueur spécifique de différenciation oligodendrogliale en condition tumorale, soit que les populations tumorales sont hétérogènes

ou bien que l'expression d'Olig2 détectée est due à des cellules oligodendrogiales normales résiduelles dans les composantes infiltrantes (Ligon KL *et al.*, 2004).

Concernant notre étude portant sur l'expression de l'Olig-2 dans les tumeurs oligodendrogiales et mixtes, nous avons observé qu'un seul cas d'oligodendrogliome de grade II n'exprimait pas la protéine Olig-2. Ceci nous a poussé à remettre en question le diagnostic de ce patient. Après réévaluation des lames HE et du résultat de l'immunohistochimie par l'Olig-2, cette tumeur a été confirmée comme tumeur épendymaire et exclut du groupe d'oligodendrogliomes.

L'analyse immunohistochimique peut être très utile pour la reconnaissance adéquate des différents sous-type de gliomes. Un marqueur clé de la reconnaissance de la différenciation des cellules gliales est la protéine GFAP (Dunbar et Yachnis, 2010). La GFAP est un filament du cytosquelette intermédiaire exprimée par les cellules gliales normales, en particulier par les astrocytes et les cellules épendymaires. Les cellules neuronales néoplasiques, épithéliales et lymphoïdes sont presque toujours GFAP négative. L'immunomarquage des cellules tumorales par la GFAP soutient donc fortement le diagnostic de gliome, mais l'absence de marquage ne permet pas de se prononcer sur ce diagnostic.

Notre étude portait sur des patients atteints de gliomes dont 58 glioblastomes. Ces derniers expriment un marquage sur un panel d'anticorps. En effet, nous avons remarqué que la totalité des 58 glioblastomes inclus dans notre étude exprimait fortement la GFAP. Ceci confirme la nature gliale de ces tumeurs.

L'immunomarquage de l'anticorps Ki-67 cible une protéine nucléaire présente pendant toutes les phases du cycle cellulaire à l'exception du G0. Par conséquent, la fraction de noyaux de tumeurs positives reflète le niveau d'activité proliférative. L'indice de marquage Ki-67 dans les gliomes diffus augmente généralement avec le degré de malignité et d'agressivité de la tumeur (environ <5% dans les gliomes diffus de bas grade, 5-10% dans les gliomes anaplasiques et > 10% dans les glioblastomes) (Giannini *et al.*, 1999). Néanmoins, la prolifération des cellules endothéliales et inflammatoires peuvent augmenter l'indice Ki67 témoignant de marquages faux positifs.

En outre, aucun des seuils cités précédemment n'est préconisé par l'OMS, étant donné le chevauchement de l'indice Ki-67 dans les différents grades de malignité et les résultats variables entre les différents laboratoires (Johannessen et Torp, 2006). Concernant notre étude qui a porté sur 58 glioblastomes, nous avons trouvé que la majorité des cas (79,31%) exprimait fortement le Ki67 avec un indice de prolifération dépassant les 10%. Ceci est

complètement en homogénéité avec la littérature. En effet, Skjulsvik et al., 2014 ont décrit des corrélations positives entre l'indice de prolifération Ki-67 et le grade de malignité des gliomes. Nous avons constaté que cet indice était franchement positif dans la majorité des gliomes de haut grade (grade IV). Ainsi, Ki-67 est utile pour différencier entre gliomes de haut et de bas grade, mais la différenciation entre le grade I et grade II ou le grade III et le grade IV est plus problématique en raison du chevauchement des valeurs entre ces différents grades tumoraux. Ce chevauchement est une limitation majeure de cet immunomarquage. C'est pour cette raison que le Ki-67 ne doit pas être utilisé comme seul marqueur du grading tumoral mais en complément de plusieurs caractéristiques histologiques.

Nous avons noté un pronostic meilleur des patients présentant un faible taux de prolifération cellulaire (Ki67<10%). Ceci est en parfait accord avec les études scientifiques précédemment publiées qui définissent une survie globale meilleure des patients avec un indice Ki67 faible (Wakimoto H *et al.*, 1996 ; Huang L *et al.*, 2009).

D'un autre côté, il a été récemment rapporté qu'une forte expression du Ki-67 est dominante dans les gliomes à *IDH1/2* de type sauvage (Cai J *et al.*, 2014) et qu'une faible expression du Ki-67 est associée aux mutations *IDH1* dans les glioblastomes primaires (Yan W *et al.*, 2012). L'expression du Ki-67 en combinaison avec le statut mutationnel des gènes *IDH1 / 2* indique de manière rapide et simple le pronostic des gliomes (Zeng A *et al.*, 2015). Olar et al. rapportent que l'indice mitotique est significativement associé au pronostic dans les tumeurs à *IDH* de type sauvage, mais pas dans les tumeurs à *IDH* muté (Olar *et al.*, 2015). Ces résultats démontrent la relation entre l'expression du Ki-67 et les mutations *IDH1/2* dans les gliomes. Cependant, aucune corrélation statistiquement significative entre ces deux paramètres n'a été démontrée dans notre étude. Ceci pourrait être dû au faible effectif de glioblastomes avec le gène *IDH* muté (8cas) qui ne permet pas encore de tirer des conclusions sur les liaisons possibles entre ces deux paramètres.

D'autre part, le gène *TP53* est un gène suppresseur de tumeur et joue un rôle essentiel dans le contrôle du cycle cellulaire et l'apoptose. Il régule également la transcription de plusieurs gènes impliqués dans les voies de signalisation de la carcinogenèse. La protéine p53 est une cible thérapeutique prometteuse et est sujette à de nouvelles thérapies ciblées dans les gliomes. Des études récentes ont confirmé que p53 joue un rôle important dans la régulation des gliomes mais les résultats ne sont pas concluants. En 2005, Mokhtari K et al. ont montré que l'expression de p53 peut être utilisée dans la classification actuelle des gliomes pour les études cliniques. En effet, l'expression de p53 est généralement associée à un mauvais

pronostic avec une survie globale plus courte dans le groupe d'astrocytomes et d'oligoastrocytomes (Mokhtari K *et al.*, 2005). En 2010, Antonelli M *et al.* ont, quant à eux, identifié que les mutations *TP53* mais pas l'expression de P53 étaient corrélées avec une survie plus courte dans les gliomes pédiatriques de haut grade. De plus, une méta-analyse a montré que l'expression de p53 a été associée avec les grades histo-pathologiques des gliomes. Cette association significative a également été trouvée dans l'analyse de la survie globale à 1, 3 et 5 ans (Jin Y *et al.*, 2016).

Dans notre étude nous avons constaté une expression positive de p53 dans 41,38% des glioblastomes. Ce taux obtenu est légèrement plus faible par rapport à celui décrit dans la méta-analyse (Jin Y *et al.*, 2016) qui décrit un taux de 63.8% pour les tumeurs gliales de haut grade (III et IV). De même, une étude américaine décrit un taux de 60% pour le groupe de glioblastomes (Martha L *et al.*, 2001). Dans notre étude, l'expression de la protéine p53 n'a pas pu être corrélée avec la survie. D'où la nécessité de chercher les altérations touchant plutôt le gène *TP53* pour une meilleure précision des résultats.

Le diagnostic de certitude des gliomes repose essentiellement sur l'étude histologique basée sur les critères de classification de l'OMS 2007 et accessoirement sur une étude immunohistochimique. Plus récemment, l'identification de marqueurs moléculaires et génétiques permet de déterminer de nouveaux sous-types histologiques et montre parfois une valeur pronostique. Actuellement, la recherche des mutations des gènes *IDH*, de la codélétion 1p/19q font désormais partie de la prise en charge thérapeutique. D'autres altérations ont été identifiées (*EGFR*, *MDM2*, *BRAF*, *MGMT*, *TERT*, etc...) et permettent une meilleure classification histomoléculaire des gliomes.

Des publications récentes ont montré que la détermination du statut *IDH* est essentielle pour le diagnostic et le pronostic des tumeurs gliales. Le statut mutationnel des gènes *IDH* peut aider à différencier entre gliomes et glioses réactives en particulier dans le cas de petites biopsies. De plus, les mutations *IDH* peuvent aider dans la différenciation de nombreuses tumeurs telles que les gliomes de grade II et les astrocytomes pilocytiques ou les xanthoastrocytomas polymorphes. Un autre exemple de différenciation à base du statut du gène *IDH* est la distinction entre les glioblastomes secondaires et les glioblastomes primaires ou alors la différenciation entre les oligodendrogliomes et les oligoastrocytomes avec d'autres tumeurs cérébrales à phénotype histologique proche des oligodendrogliomes (Capper D *et al.*, 2009 ; Capper D *et al.*, 2010; Camelo-Piragua S *et al.*, 2010; Capper D *et al.*, 2011). Il convient également de noter qu'un certain nombre d'études ont démontré que les mutations *IDH* prédisent significativement une meilleure survie globale et une meilleure survie sans

progression pour les patients porteurs de gliomes (Weller M *et al.*, 2009; Van den Bent MJ *et al.*, 2010; Houillier C *et al.*, 2010; Mellai M *et al.*, 2011; Lv S *et al.*, 2011; Leeper HE *et al.*, 2015; Eckel-Passow JE *et al.*, 2015; Cancer Genome Atlas Research Network *et al.*, 2015; Xia L *et al.*, 2015; Chen JR *et al.*, 2016).

Les mutations *IDH* avec d'autres altérations génétiques guident actuellement les décisions thérapeutiques pour les gliomes de grades II et III et ils permettraient probablement, dans un avenir proche, l'ajustement du traitement avec le profil moléculaire (Juratli T A *et al.*, 2015).

Ainsi, un inhibiteur de IDH1 (AGI-5198) a été développé et a démontré sa capacité à se lier à et à inhiber la protéine mutée IDH1. D'autres études ont tenté de cibler la fonction des protéines en amont ou en aval de la protéine mutée IDH1. Les résultats sont prometteurs et peuvent donner de nouvelles stratégies thérapeutiques (Davis M *et al.*, 2013; Rohle D *et al.*, 2013, Agnihotri S *et al.*, 2014).

Schumacher *et al.* (2014) ont récemment montré qu'un vaccin peptidique dirigé contre l'IDH1R132H est immunogène chez la souris. En outre, en utilisant des souris CMH-humanisés, ces chercheurs ont constaté que la vaccination avec un peptide contenant les acides aminés 123 à 142 de l'IDH1R132H induit une réponse antitumorale CMH classe II spécifique contre les sarcomes murins exprimant l'IDH1R132H. De plus, une autre étude a récemment démontré que l'immunisation avec un vaccin peptidique contre l'IDH1R132H a ralenti la croissance des tumeurs intracrâniennes (Pellegatta S *et al.*, 2015). Ces résultats sont encore prometteurs et suggèrent fortement que les immunothérapies ciblant la forme mutée de l'IDH peuvent induire des réponses immunitaires antitumorales puissantes (Waitkus MS *et al.*, 2016).

Les mutations *IDH* ont été significativement corrélées avec le grade de malignité des gliomes. Une fréquence importante (de 58% à 100%) de ces mutations a été décrite notamment dans les gliomes de grades II et III, ainsi que dans les glioblastomes secondaires (de 15,4% à 84,6%) (Mellai M *et al.*, 2011). Ces taux ont été confirmés par diverses études américaines (Christensen BC *et al.*, 2011; Patrick J Killela *et al.*, 2014), chinoises (Li S *et al.*, 2012;.. Chuan-Bao Zhang *et al.*, 2014), japonaises (Shibahara I *et al.*, 2011; Mukasa A *et al.*, 2012), Française (Sanson M *et al.*, 2009), Brésilienne (Pessôa IA *et al.*, 2015) et d'autres populations (Gravendeel LA *et al.*, 2009; Nobusawa S *et al.*, 2009; Wick W *et al.*, 2009; Bleeker FE 2010).

Au Maroc, une seule étude a été publiée en 2013 où les auteurs ont présenté les résultats de l'analyse moléculaire des gènes *IDH1/2* et *TP53* chez 34 patients marocains porteurs de glioblastomes primaires en rapportant leurs caractéristiques cliniques et épidémiologiques

(Hilmani S *et al.*, 2013). L'analyse de l'ensemble des 34 glioblastomes primaires a révélé l'absence des mutations *IDH1/2* et la présence des mutations *TP53* dans environ 9% de la population d'étude.

C'est dans cette perspective que notre étude vient en complément à cette première étude avec l'inclusion d'un effectif plus large de gliomes de différents grades histologiques. Ce travail donnera une idée plus précise sur la répartition de ces altérations dans la population marocaine. En effet, nous avons détecté 43 cas de mutations *IDH1* (R132H) dans notre série et un seul cas de mutation *IDH2* (R172K) a été identifié dans un oligodendrogliome de grade III. Les astrocytomes de grades II et III ont présenté des mutations *IDH* dans 63,2%. Notre travail confirme des études antérieures qui ont détecté les mêmes mutations dans 63% (M Sanson *et al.*, 2009), 78,4% (Patrick J Killela *et al.*, 2014) et 78,3% des cas (Christensen BC *et al.*, 2011). Les mutations *IDH* ont été détectées dans 73,3% des oligodendrogliomes de grades II et III. Ce résultat est comparable à 63% (M Sanson *et al.*, 2009) et 71% (Mukasa A *et al.*, 2012) trouvés respectivement dans des études antérieures (Zhang RQ *et al.*, 2016). De plus, dans notre étude, le pourcentage de mutations *IDH* observé dans le groupe des glioblastomes est de 12,9% en comparaison avec 16,8% et 10% identifiés dans d'autres publications (Mukasa A *et al.*, 2012; Patrick J Killela *et al.*, 2014). Cependant, pour les oligoastrocytomes de grades II et III, les mutations *IDH* ont été détectées avec des proportions plus basses (33,3%) que celles décrites dans la littérature 86,2% (Patrick J Killela *et al.*, 2014.), 75% (Shibahara I *et al.*, 2011) et 68% (M Sanson *et al.*, 2009). Cette disparité est principalement due au fait que le nombre de patients dans ce sous-groupe est assez faible (6 cas) et ne permet pas de tirer des conclusions pertinentes. L'inclusion d'un effectif plus élevé est nécessaire pour obtenir des résultats plus précis. De plus, les tumeurs appartenant à ce groupe histologique sont très ambiguës et peuvent facilement être classées en tant que tumeurs astrocytaires ou oligodendrogliales. C'est la raison pour laquelle, la nouvelle version de la classification de l'OMS version 2016 déconseille fortement le diagnostic d'oligoastrocytome et insiste sur la détermination du profil moléculaire qui va permettre de déterminer la nature astrocytaire ou oligodendrogliale pure de la tumeur.

De manière générale, les tumeurs gliales de grade III ont montré la plus haute fréquence de mutations *IDH* (53,49%; 23/43 cas). Ce résultat est concordant avec l'étude brésilienne qui a identifié cette mutation dans 66,7% des patients porteurs de gliomes de grade III (Pessôa I A *et al.*, 2015). Ce taux important de mutations *IDH* au niveau des tumeurs anaplasiques a été également rapporté dans de nombreuses autres études internationales et varie entre 46% et

100% (Hartmann C *et al.*, 2009 ; Ichimura K *et al.*, 2009 ; Sanson M *et al.*, 2009 ; Yan H *et al.*, 2009 ; Capper D *et al.*, 2010 ; Mellai M *et al.*, 2011 ; Jha P *et al.*, 2011).

Ainsi, nos résultats sont entièrement concordants avec les données de la littérature internationale avec une légère différence dans le groupe d'oligo-astrocytomes.

L'EGFR, un récepteur à tyrosine kinase de la famille erbB (ErbB1), est un promoteur fort de la prolifération cellulaire et de la survie par ses effets sur les voies de la MAPK et de la phosphoinositol 3-kinase. Il a été démontré qu'une partie importante (40% à 50%) des glioblastomes présentent une surexpression de l'EGFR invariablement due à l'amplification du gène *EGFR* (Wong AJ *et al.*, 1987). D'autres réarrangements du gène *EGFR* sont également décrits dans les glioblastomes et impliquent le plus souvent (20% -30%) le variant *EGFRvIII*, caractérisé par une délétion des exons 2-7 conduisant à un récepteur tronqué constitutivement activé (Nishikawa R *et al.*, 1994).

Ces altérations de l'*EGFR* suggèrent fortement le diagnostic de glioblastome, en particulier le glioblastome primaire généralement rencontré chez les patients âgés (Cancer Genome Atlas Research Network; 2008Ohgaki H *et al.*, 2009). En combinaison avec d'autres altérations moléculaires, les réarrangements du gène *EGFR* représentent un marqueur diagnostique utile permettant de distinguer les glioblastomes primaires des glioblastomes secondaires. En effet, l'amplification de l'*EGFR* est généralement mutuellement exclusive avec la codélétion 1p/19q et les mutations du gène *IDH* (Korshunov A *et al.*, 2004 ; Perry A *et al.*, 2004 ; Dehais C *et al.*, 2006).

L'association de l'amplification de l'*EGFR* avec d'autres marqueurs pronostiques crée des difficultés dans l'évaluation de son rôle pronostique indépendant. Néanmoins, certaines études ont suggéré un mauvais pronostic des glioblastomes ayant des altérations de l'*EGFR* (Shinojima N *et al.*, 2003), tandis que d'autres n'ont trouvé aucun rôle pronostique après ajustement avec les autres effets pronostiques négatifs (Kraus JA *et al.*, 2000 ; Houillier C *et al.*, 2006). Dans notre cas, nous avons noté une légère amélioration de la survie chez les patients porteurs de glioblastomes avec amplification de l'*EGFR*.

Malgré la reconnaissance précoce de l'*EGFR* en tant que cible thérapeutique, la plupart des études ont échoué à démontrer des avantages du traitement par les inhibiteurs de la tyrosine kinase à petites molécules (van den Bent MJ *et al.*, 2009). Cependant, certains essais de vaccins anti-EGFRvIII, ont rapporté des résultats prometteurs (Sampson JH *et al.*, 2010). Une étude récente a également démontré que les glioblastomes caractérisés par une amplification/surexpression de l'*EGFR* bénéficient fortement de thérapies à base de Témzolomide (Cominelli M *et al.*, 2015). Il est donc important de déterminer le statut du

gène *EGFR* pour une meilleure stratification des patients inclus dans les essais cliniques, mais aussi dans le cas des thérapies personnalisées (Faulkner C *et al.*, 2014).

Dans notre étude, 29,31% (17/58) des patients porteurs de glioblastomes ont montré une amplification du gène *EGFR*. Ce résultat est cohérent avec les études précédentes où la fréquence d'amplification du gène *EGFR* était respectivement de 24%, 38,3% et 44% (Franceschi S *et al.*, 2015; Ghasimi S *et al.*, 2016; Trabelsi S *et al.*, 2016).

En 2008, une duplication focale d'environ 2,5 Mb au niveau du chromosome 7q34 a été signalée comme étant une caractéristique commune des astrocytomes pilocytiques (Bar EE *et al.*, 2008 ; Pfister S *et al.*, 2008 ; Deshmukh H *et al.*, 2011). Peu de temps après, il a été montré qu'un gain dans cette région a abouti à une nouvelle fusion entre le gène *KIAA1549* et l'oncogène *BRAF*. En outre, l'étude menée par Jones *et al.* en 2008, a démontré que cette fusion a donné lieu à une activation constitutive de l'activité kinase de *BRAF*. Depuis lors, plusieurs autres études ont rapporté des résultats similaires, et ont contribué à l'expansion de notre compréhension de la fréquence et de la spécificité de cette altération (Yu J *et al.*, 2009 ; Korshunov A *et al.*, 2009 ; Schiffman JD *et al.*, 2010 ; Hasselblatt M *et al.*, 2011 ; Hawkins C *et al.*, 2011). Un total de cinq combinaisons différentes des exons des deux gènes ont été décrits. Dans tous les cas, la fusion conduit à la perte du domaine autorégulateur *BRAF* N-terminal et l'activation subséquente du domaine kinase.

La deuxième altération la plus fréquemment observée dans les astrocytomes pilocytiques implique également le gène *BRAF* et consiste en une mutation par substitution conduisant à un changement d'un seul acide aminé. Le plus souvent, c'est le changement de la valine en glutamate au niveau de la position 600 (V600E). D'abord identifiée en 2002, cette mutation a été par la suite rapportée dans un grand nombre d'autres types tumoraux (Davies H *et al.*, 2002 ; Wan PT *et al.*, 2004; Michaloglou C *et al.*, 2008).

De plus, une insertion de 3 nucléotides (TAC) codant pour un acide aminé supplémentaire (thréonine) et qui caractérise une région adjacente au codon V600 a été également rapportée dans quelques cas d'astrocytomes pilocytiques (Jones DT *et al.*, 2009). Cette altération, symbolisée *BRAFins598T* ou plus simplement *BRAFinsT*, induit une activité kinase constitutive à un niveau similaire de la mutation de V600E. Elle montre également une capacité de transformation in vitro.

Dans notre étude, aucune mutation V600E n'a été détectée sur l'ensemble des 20 astrocytomes pilocytiques traités. Ceci confirme la rareté de cette mutation qui n'est décrite en littérature que dans 6% des cas d'astrocytomes pilocytiques (Collins VP *et al.*, 2015).

Cependant, un seul cas s'est caractérisé par la présence de l'insertion *BRAFins598T* décrite précédemment (Jones DT *et al.*, 2009 ; Eisenhardt AE *et al.*, 2011 ; Schindler G *et al.*, 2011). De manière générale, la classification de l'OMS est restée, pendant des décennies, la classification de référence permettant d'établir le diagnostic des gliomes et guider le traitement post-opératoire, avec l'avantage de la facilité de son application dans les différents laboratoires de pathologie même dans les pays les moins développés. Néanmoins, la classification des gliomes basée uniquement sur les critères histologiques souffre d'un degré considérable de variabilité interobservateurs (van den Bent, 2010). De plus, les études moléculaires et translationnelles au cours de ces deux dernières décennies ont révélé une vaste variabilité clinique et biologique au sein d'une même entité morphologiquement définie de gliomes. Ce qui indique que ces facteurs génétiques pourraient servir de biomarqueurs cliniquement pertinents pour une stratification plus précise de ces tumeurs hétérogènes. Il est à noter également que les marqueurs génétiques peuvent dans certains cas classer de manière plus précise les gliomes histologiquement ambigus. Un exemple bien connu est le groupe controversé d'oligoastrocytomes qui peut être complètement éliminé par reclassement de ces éléments soit en astrocytomes ou en oligodendrogliomes. Ceci est réalisé à l'aide d'un ensemble de quatre marqueurs moléculaires, à savoir les mutations génétiques touchant l'isocitrate déshydrogénase 1 ou 2 (*IDH1* ou *IDH2*), les mutations des gènes *TP53* et *ATRX* et la co-délétion 1p/19q (Sahm *et al.*, 2014).

Il est évident que de nouvelles découvertes dans la biologie et la génétique des gliomes continueront d'avoir un impact sur les stratégies diagnostiques et thérapeutiques. Un effort d'équipe multidisciplinaire est essentiel pour intégrer et optimiser ses nouvelles pratiques en vue d'améliorer la prise en charge des patients atteints de tumeurs cérébrales.

Conclusion générale et perspectives

Les gliomes sont les tumeurs cérébrales primitives les plus fréquentes. Malgré des progrès dans leur prise en charge, ces tumeurs restent incurables. La grande diversité et l'hétérogénéité de ces tumeurs rend leur classification et par conséquent leur prise en charge très difficile. Depuis quelques années, les avancées dans les domaines de la signalisation cellulaire et de la biologie moléculaire ont permis une bien meilleure compréhension de leur biologie. Grâce à ces progrès, on s'oriente actuellement vers une classification histomoléculaire plus précise des gliomes, qui réduit les discordances interobservateurs en se basant à la fois sur les données histologiques et moléculaires. C'est dans cette perspective que la nouvelle classification mondiale de la santé version 2016 a vu le jour suite à une collaboration internationale de 117 experts de 20 pays et des délibérations pendant une conférence consensus de trois jours incluant 35 neuropathologistes, neurooncologues et scientifiques de 10 pays différents. Cette classification définit des anomalies moléculaires impliquées dans l'oncogenèse de ces tumeurs qui caractérisent les grands groupes tumoraux et qui permettent de poser avec certitude le diagnostic anatomopathologique de ces gliomes. En effet, dans cette classification, il est recommandé de déterminer le statut des gènes *IDH* en premier lieu avant de confirmer soit la nature astrocytaire de la tumeur par détection des pertes *ATRX* et/ou des mutations *TP53*, soit préciser le caractère oligodendroglial de la tumeur par mise en évidence de la co-délétion 1p/19q.

A travers notre étude nous nous sommes intéressés à la détermination du profil histologique, immunohistochimique, radiologique et moléculaire des différents groupes de gliomes.

La relecture histologique de toutes les lames HE et l'analyse radiologique ont permis de déterminer les cas douteux présentant une discordance entre les différents spécialistes. Ces cas ont fait l'objet d'une étude immunohistochimique utilisant un ensemble d'anticorps spécifiques (GFAP, Ki67, P53, INA, Olig-2). Ce premier travail a permis d'exclure un cas de l'étude à cause des discordances interobservateurs et de reclasser 7 autres cas du groupe de glioblastomes vers le groupe d'oligodendrogliomes. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la détermination moléculaire des principales altérations touchant les différents groupes de gliomes. Cette étude a porté sur la détection des mutations des gènes *IDH 1/2* dans les gliomes diffus et anaplasiques et des mutations du gène *BRAF* dans les astrocytomes pilocytiques, ainsi que la détermination du statut d'amplification des gènes *EGFR* et *MDM2* dans les glioblastomes. La cytogénétique moléculaire, quant à elle, nous a permis de vérifier le statut d'amplification du gène *EGFR* et la présence de la co-délétion 1p/19q.

Cette confrontation interdisciplinaire a permis d'une part une meilleure classification de ces tumeurs qui était auparavant basée uniquement sur les critères histologiques. D'autre part, elle permettra, après détermination d'autres altérations moléculaires caractéristiques, une meilleure stratification des gliomes en groupes moléculaires et par conséquent une meilleure homogénéité pronostique (réponse aux traitements et survie). En effet, la détermination moléculaire de plusieurs autres altérations génétiques impliquées dans l'oncogenèse des tumeurs gliales est essentielle.

L'étude immunohistochimique de l'expression de P53 dans les glioblastomes doit être complétée par une étude des mutations touchant le gène *TP53*, spécialement les exons 5, 6, 7 et 8 (Hainaut P *et al.*, 2000 ; Okamoto Y *et al.*, 2004). Cette étude ne doit pas également se restreindre au groupe de glioblastomes mais doit être élargie aux astrocytomes diffus et anaplasiques ainsi qu'aux oligo-astrocytomes.

Récemment, des mutations affectant la région promotrice du gène *TERT* (the telomerase reverse transcriptase gene) ont été rapportées dans de nombreux cancers. Les gliomes et surtout les glioblastomes sont parmi les tumeurs les plus fréquemment touchées. La télomérase est une ribonucléoprotéine composée d'une sous-unité d'ARN et d'une sous-unité catalytique de la transcriptase inverse (TERT), qui ajoute des répétitions télomériques aux extrémités des chromosomes, et par conséquent, maintient la longueur des télomères. La télomérase est fortement activée dans la majorité des cancers, y compris les gliomes. Surmonter le raccourcissement des télomères lors de la réplication confère à la cellule cancéreuse des propriétés de croissance sans restriction en évitant l'induction de la sénescence. Plusieurs études ont montré que l'analyse du statut de mutation du gène *TERT*, en combinaison avec d'autres altérations moléculaires (*EGFR* et *IDH*) permet d'affiner la classification et le pronostic des gliomes (Labussière M *et al.*, 2014 ; Yuan Y *et al.*, 2016 ; Yang P *et al.*, 2016).

D'un autre côté, les patients porteurs de glioblastomes et possédant un promoteur du gène *MGMT* méthylé répondent mieux au traitement avec les agents alkylants comme le témozolomide (Hegi *et al.*, 2005) et la carmustine (Esteller *et al.*, 2000). Ils survivent plus longtemps lorsqu'ils sont traités par rapport aux patients ayant un promoteur du gène *MGMT* non méthylé. Ainsi, la méthylation du promoteur du gène *MGMT* est un marqueur pronostique important chez les patients atteints de glioblastome traités conformément à la procédure thérapeutique standard, à savoir, une radiothérapie combinée concomitante à une chimiothérapie adjuvante par le témozolomide (Wick *et al.*, 2014).

Nous projetons travailler, dans un avenir proche, sur la détection moléculaire de ces différentes altérations en déterminant leur prévalence dans notre population d'étude et également en établissant leurs apports diagnostiques et pronostiques. De plus, nous comptons élargir notre population d'étude en intégrant les patients des années 2015 et 2016 pour plus de fiabilité statistique.

Enfin, de manière générale, il convient de noter que la prise en charge des patients atteints de tumeurs cérébrales primaires doit toujours être entreprise dans le cadre de réunions multidisciplinaires impliquant les neurochirurgiens, les oncologues, les anatomopathologistes, les radiologues et les biologistes moléculaires.

Références bibliographiques

Adam C, Mokhtari K. **Tumeurs du système nerveux central. Classifications histologiques et topographiques, épidémiologie.** EMC 2011.

Agnihotri S, Aldape KD, Zadeh G. **Isocitrate dehydrogenase status and molecular subclasses of glioma and glioblastoma.** Neurosurg Focus. 2014 Dec;37(6):E13.

Ahlbom A, Feychting M, Green A, Kheifets L, Savitz DA, Swerdlow AJ; ICNIRP (International Commission for Non-Ionizing Radiation Protection) Standing Committee on Epidemiology. **Epidemiologic evidence on mobile phones and tumor risk: a review.** Epidemiology. 2009 Sep;20(5):639-52.

Almairac F, Frenay M, Paquis P. **Genetic diseases and glioblastomas.** Neurochirurgie. 2010 Dec; 56(6):455-8.

Andon A KC, Grill J, Vassal G, Couanet D, Hartmann O. **Les tumeurs du système nerveux central.** 2005.

Antonelli M, Buttarelli FR, Arcella A, Nobusawa S, Donofrio V, Oghaki H, Giangaspero F. **Prognostic significance of histological grading, p53 status, YKL-40 expression, and IDH1 mutations in pediatric high-grade gliomas.** J Neurooncol. 2010 Sep;99(2):209-15.

Arita H, Narita Y, Fukushima S, Tateishi K, Matsushita Y, Yoshida A, Miyakita Y, Ohno M, Collins VP, Kawahara N, Shibui S, Ichimura K. **Upregulating mutations in the TERT promoter commonly occur in adult malignant gliomas and are strongly associated with total 1p19q loss.** Acta Neuropathol. 2013 Aug;126(2):267-76.

Bailey P, Cushing H. **A classification of tumors of the glioma group on a histogenetic basis with a correlation study of prognosis.** Philadelphia: Lippincott; 1926.

Baldi I, Gruber A, Alioum A, Berteaud E, Lebailly P, Huchet A, Tourdias T, Kantor G, Maire JP, Vital A, Loiseau H; Gironde TSNC Registry Group. **Descriptive epidemiology of CNS tumors in France: results from the Gironde Registry for the period 2000-2007.** Neuro Oncol. 2011 Dec;13(12):1370-8.

Balss J, Meyer J, Mueller W, Korshunov A, Hartmann C, von Deimling A. **Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors.** Acta Neuropathol. 2008 Dec;116(6):597-602.

Bar EE, Lin A, Tihan T, Burger PC, Eberhart CG. **Frequent gains at chromosome 7q34 involving BRAF in pilocytic astrocytoma.** J Neuropathol Exp Neurol. 2008 Sep;67(9):878-87.

Baron M.-H., Bauchet L., Bernier V., Capelle L., Fontaine D., Gatignol P., Guyotat J., Leroy M., Mandonnet E., Pallud J., Peruzzi P., Rigau V., Taillandier L., Vandenbos F., Duffau H.. **Gliomes de grade II.** EMC 2008.

Bello MJ, Leone PE, Nebreda P, de Campos JM, Kusak ME, Vaquero J, Sarasa JL, García-Miguel P, Queizan A, Hernández-Moneo JL, et al. **Allelic status of chromosome 1 in neoplasms of the nervous system.** Cancer Genet Cytogenet. 1995 Sep;83(2):160-4.

Benito R, Gil-Benso R, Quilis V, Perez M, Gregori-Romero M, Roldan P, Gonzalez-Darder J, Cerdá-Nicolas M, Lopez-Gines C. **Primary glioblastomas with and without EGFR**

amplification : relationship to genetic alterations and clinicopathological features. Neuropathology. 2010 Aug;30(4):392-400.

Bettegowda C, Agrawal N, Jiao Y, Sausen M, Wood LD, Hruban RH, Rodriguez FJ, Cahill DP, McLendon R, Riggins G, Velculescu VE, Oba-Shinjo SM, Marie SK, Vogelstein B, Bigner D, Yan H, Papadopoulos N, Kinzler KW. **Mutations in CIC and FUBP1 contribute to human oligodendroglioma.** Science. 2011 Sep 9;333(6048):1453-5.

Bignami A, Eng LF, Dahl D, Uyeda CT. **Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence.** Brain Res. 1972 Aug 25;43(2):429-35.

Bleeker FE, Atai NA, Lamba S et al. **The prognostic IDH1 (R132) mutation is associated with reduced NADP+2dependent IDH activity in glioblastoma.** Acta Neuropathol (2010), 119, 487-94.

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

Bondy ML, Scheurer ME, Malmer B, Barnholtz-Sloan JS, Davis FG, Il'yasova D, Kruchko C, McCarthy BJ, Rajaraman P, Schwartzbaum JA, Sadetzki S, Schlehofer B, Tihan T, Wiemels JL, Wrensch M, Buffler PA; Brain Tumor Epidemiology Consortium. **Brain tumor epidemiology: consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium.** Cancer. 2008 Oct 1;113(7 Suppl):1953-68.

Brat DJ, Cagle PT, Dillon DA, Hattab EM, McLendon RE, Miller MA, Buckner JC; Members of the Cancer Biomarker Reporting Committee, College of American Pathologists. **Template for Reporting Results of Biomarker Testing of Specimens From Patients With Tumors of the Central Nervous System.** Arch Pathol Lab Med. 2015 Sep;139(9):1087-93.

Buckley PG, Alcock L, Heffernan J, Woods J, Brett F, Stallings RL, Farrell MA. **Loss of chromosome 1p/19q in oligodendroglial tumors: refinement of chromosomal critical regions and evaluation of internexin immunostaining as a surrogate marker.** J Neuropathol Exp Neurol. 2011 Mar;70(3):177-82.

Buckner JC, Brown PD, O'Neill BP, Meyer FB, Wetmore CJ, Uhm JH. **Central nervous system tumors.** Mayo Clin Proc. 2007 Oct;82(10):1271-86.

Cai J, Yang P, Zhang C, Zhang W, Liu Y, Bao Z, Liu X, Du W, Wang H, Jiang T, Jiang C. **ATRX mRNA expression combined with IDH1/2 mutational status and Ki-67 expression refines the molecular classification of astrocytic tumors: evidence from the whole transcriptome sequencing of 169 samples samples.** Oncotarget. 2014 May 15;5(9):2551-61.

Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, Lisle DK, Finkelstein DM, Hammond RR, et al. **Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas.** J Natl Cancer Inst 1998 ; 90 (19) : 1473-9.

Cairncross G, Wang M, Shaw E, Jenkins R, Brachman D, Buckner J, Fink K, Souhami L, Laperriere N, Curran W, Mehta M. **Phase III trial of chemoradiotherapy for anaplastic oligodendroglioma: long-term results of RTOG 9402.** J Clin Oncol. 2013 Jan 20;31(3):337-43.

Callovini GM. **Is it appropriate to redefine the indication for stereotactic brain biopsy in the MRI Era? Correlation with final histological diagnosis in supratentorial gliomas.** Minim Invasive Neurosurg. 2008 Apr;51(2):109-13.

Camelo-Piragua S, Jansen M, Ganguly A et al. **Mutant IDH1-specific immunohistochemistry distinguishes diffuse astrocytoma from astrocytosis.** Acta Neuropathol (2010), 119,509-11.

Cancer Genome Atlas Research Network. **Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways.** Nature 2008; 455: 1061–8.

Cancer Genome Atlas Research Network, Brat DJ, Verhaak RG, Aldape KD et al. **Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower Grade-Gliomas.** N Engl J Med (2015), 372(26), 2481-98.

Capper D, Zentgraf H, Balss J, Hartmann C, von Deimling A. **Monoclonal antibody specific for IDH1 R132H mutation.** ActaNeuropathol(2009), 118, 599-01.

Capper D, Weissert S, Balss J et al. **Characterization of R132H mutation-specific IDH1 antibody binding in brain tumors.** Brain Pathol (2010), 20, 245-54.

Capper D, Reuss D, Schittenhelm J et al. **Mutation-specific IDH1 antibody differentiates oligodendrogliomas and oligoastrocytomas from other brain tumors with oligodendroglioma- like morphology.** ActaNeuropathol (2011) , 121,241-52.

Chanalet S, Lebrun-Frenay C, Frenay M, Lonjon M, Chatel M. **Symptomatologie clinique et diagnostic neuroradiologique des tumeurs intracrâniennes.** EMC - Neurologie. Volume 1, Issue 1, January 2004, Pages 91–122

Chang EF, Potts MB, Keles GE, Lamborn KR, Chang SM, Barbaro NM, et al. **Seizure characteristics and control following resection in 332 patients with low-grade gliomas.** J Neurosurg 2008 ; 108 : 227-35.

Chatel M, Lebrun C, Frenay M. **Chemotherapy and immunotherapy in adult malignant gliomas.** Curr Opin Oncol 1993; 5:464-73.

Chatel M., Frenay M., Lebrun C., Bourg V., Fauchon F. **Gliomes de haut grade : astrocytomes anaplasiques et glioblastomes.** EMC - Neurologie. Volume 2, Issue 3, August 2005, Pages 257–278

Chbani L, Hafid I, Berraho M, Mesbahi O, Nejjar C, Amarti A. **Epidemiological and pathological features of cancer in Fez Boulemane region, Morocco.** East Mediterr Health J. 2013 Mar;19(3):263-70.

Chen JR, Yao Y, Xu HZ, Qin ZY. **Isocitrate Dehydrogenase (IDH)1/2 Mutations as Prognostic Markers in Patients With Glioblastomas.** Medicine (Baltimore). 2016 Mar;95(9):e2583.

Chinot OL, Barrie M, Fuentes S, Eudes N, Lancelot S, Metellus P, et al. **Correlation between O6-methylguanine-DNA methyltransferase and survival in inoperable newly diagnosed glioblastoma patients treated with neoadjuvant temozolomide.** J Clin Oncol 2007;25:1470-5.

Christensen BC, Smith AA, Zheng S et al. **DNA methylation, isocitrate dehydrogenase mutation, and survival in glioma.** J Natl Cancer Inst (2011), 103, 143–53.

Chuan-Bao Zhang, Zhao-Shi Bao, Hong-Jun Wang et al. **Correlation of IDH1/2 mutation with clinicopathologic factors and prognosis in anaplastic gliomas: a report of 203 patients from China.** J Cancer Res ClinOncol (2014), 140, 45-51.

Clark O, Yen K, Mellinghoff IK. **Molecular Pathways: Isocitrate Dehydrogenase Mutations in Cancer.** Clin Cancer Res. 2016 Apr 15;22(8):1837-42.

Collins VP, Jones DT, Giannini C. **Pilocytic astrocytoma: pathology, molecular mechanisms and markers.** Acta Neuropathol. 2015 Jun;129(6):775-88.

Cominelli M, Grisanti S, Mazzoleni S, Branca C, Buttolo L, Furlan D, Liserre B, Bonetti MF, Medicina D, Pellegrini V, Buglione M, Liserre R, Pellegatta S, Finocchiaro G, Dalerba P, Facchetti F, Pizzi M, Galli R, Poliani PL. **EGFR amplified and overexpressing glioblastomas and association with better response to adjuvant metronomic temozolomide.** J Natl Cancer Inst. 2015 Mar 3;107(5).

Crespo I, Vital AL, Gonzalez-Tablas M, Patino Mdel C, Otero A, Lopes MC, de Oliveira C, Domingues P, Orfao A, Tabernero MD. **Molecular and Genomic Alterations in Glioblastoma Multiforme.** Am J Pathol. 2015 Jul;185(7):1820-33.

Crocetti E, Trama A, Stiller C, Caldarella A, Soffietti R, Jaal J, Weber DC, Ricardi U, Slowinski J, Brandes A; RARECARE working group. **Epidemiology of glial and non-glial brain tumours in Europe.** Eur J Cancer. 2012 Jul;48(10):1532-42.

Daumas-Duport C, Scheithauer BW, Kelly PJ. **A histologic and cytologic method for the spatial definition of gliomas.** Mayo Clin Proc 1987;62:435–49.

Daumas-Duport C, Tucker ML, Kolles H, Cervera P, Beuvon F, Varlet P, et al. **Oligodendrogliomas. Part II: A new grading system based on morphological and imaging criteria.** J Neurooncol. 1997 Aug;34(1):61-78.

Daumas-Duport C, Beuvon F, Varlet P, Fallet-Bianco C. **Gliomes: classifications de l'OMS et de l'Hôpital Sainte-Anne.** Ann Pathol. 2000 Oct; 20(5):413-28.

Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. **Mutations of the BRAF gene in human cancer.** Nature. 2002 Jun 27;417(6892):949-54.

Davis M, Pragani R, Popovici-Muller J, Gross S, Thorne N, Salituro F, Fantin V, Straley K, Su M, Dang L, Simeonov A, Shen M, Boxer MB. **ML309: A potent inhibitor of R132H mutant IDH1 capable of reducing 2-hydroxyglutarate production in U87 MG glioblastoma cells.** Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2010-2012 Apr 16. [updated 2013 May 8].

Dehais C, Laigle-Donadey F, Marie Y, Kujas M, Lejeune J, Benouaich-Amiel A, Pedretti M, Polivka M, Xuan KH, Thillet J, Delattre JY, Sanson M. **Prognostic stratification of patients with anaplastic gliomas according to genetic profile.** Cancer. 2006 Oct 15;107(8):1891-7.

Delattre JY, Fuks Z, Krol G, Rottenberg DA, Posner JB. **Cerebral necrosis following neutron radiation of an extracranial tumor.** J Neurooncol. 1988 Sep;6(2):113-7.

Denny BJ, Wheelhouse RT, Stevens MF, Tsang LL, Slack JA. **NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA.** Biochemistry. 1994 Aug 9;33(31):9045-51.

Deshmukh H, Yu J, Shaik J, MacDonald TJ, Perry A, Payton JE, Gutmann DH, Watson MA, Nagarajan R. **Identification of transcriptional regulatory networks specific to pilocytic astrocytoma.** BMC Med Genomics. 2011 Jul 11;4:57.

Ducray F, Crinière E, Idbaih A, Mokhtari K, Marie Y, Paris S, Navarro S, Laigle-Donadey F, Dehais C, Thillet J, Hoang-Xuan K, Delattre JY, Sanson M. **alpha-Internexin expression identifies 1p19q codeleted gliomas.** Neurology. 2009 Jan 13;72(2):156-61.

Ducray F, El Hallani S, Idbaih A. **Diagnostic and prognostic markers in gliomas.** Curr Opin Oncol. 2009;21(6):537–42.

Ducray F, Mokhtari K, Crinière E, Idbaih A, Marie Y, Dehais C, Paris S, Carpentier C, Dieme MJ, Adam C, Hoang-Xuan K, Duyckaerts C, Delattre JY, Sanson M. **Diagnostic and prognostic value of alpha internexin expression in a series of 409 gliomas.** Eur J Cancer. 2011 Mar;47(5):802-8.

Ducray F. **Prognostic and predictive biomarkers of gliomas in adults.** Pratique Neurologique – FMC 2011 ; 2 : 64-70.

Duffau H. **Lessons from brain mapping in surgery for lowgrade glioma: insights into associations between tumor and brain plasticity.** Lancet Neurol 2005; 4 : 476-86.

Duffau H. **The necessity of preserving brain functions in glioma surgery: the crucial role of intraoperative awake mapping.** World Neurosurg. 2011 Dec;76(6):525-7.

Dunbar E, Yachnis AT. **Glioma diagnosis: immunohistochemistry and beyond.** Adv Anat Pathol. 2010 May;17(3):187-201.

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; 23:619-28.

Durand KS, 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; 64:793-801.

Eckel-Passow JE, Lachance DH, Molinaro AM, Walsh KM, Decker PA, Sicotte H, Pekmezci M, Rice T, Kosel ML, Smirnov IV, Sarkar G, Caron AA, Kollmeyer TM, Praska CE, Chada AR, Halder C, Hansen HM, McCoy LS, Bracci PM, Marshall R, Zheng S, Reis GF, Pico AR, O'Neill BP, Buckner JC, Giannini C, Huse JT, Perry A, Tihan T, Berger MS, Chang SM, Prados MD, Wiemels J, Wiencke JK, Wrensch MR, Jenkins RB. **Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors.** N Engl J Med. 2015 Jun 25;372(26):2499-508.

Eigenbrod S, Roeber S, Thon N, Giese A, Krieger A, Grasbon-Frodl E, Egensperger R, Tonn JC, Kreth FW, Kretschmar HA. **α -Internexin in the diagnosis of oligodendroglial tumors and association with 1p/19q status.** J Neuropathol Exp Neurol. 2011 Nov;70(11):970-8.

Eisenhardt AE, Olbrich H, Röring M, Janzarik W, Anh TN, Cin H, Remke M, Witt H, Korshunov A, Pfister SM, Omran H, Brummer T. **Functional characterization of a BRAF insertion mutant associated with pilocytic astrocytoma.** Int J Cancer. 2011 Nov 1;129(9):2297-303.

Elaine N. Marieb, Katja Hoehn. **Anatomie et physiologie humaines.** Edition Pearson Education. 9e édition 2014.

Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG. **Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents.** N Engl J Med. 2000 Nov 9;343(19):1350-4.

Faulkner C, Palmer A, Williams H, Wragg C, Haynes HR, White P, DeSouza RM, Williams M, Hopkins K, Kurian KM. **EGFR and EGFRvIII analysis in glioblastoma as therapeutic biomarkers.** Br J Neurosurg. 2014 Aug 20:1-7.

Ferlay J et al. International Agency for Research on Cancer (IARC). **GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide.** Lyon, France: IARCPress; 2004.

Figarella-Branger D, Bouvier C. **Classification anatomopathologique des gliomes : faits et controverses.** Bull Cancer 2005; 92 (4): 301-09.

Forshew T, Tatevossian RG, Lawson AR, 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) 218:172–181.

Franceschi S, Mazzanti CM, Lessi F, Aretini P, Carbone FG, LA Ferla M, Scatena C, Ortenzi V, Vannozzi R, Fanelli G, Pasqualetti F, Bevilacqua G, Zavaglia K, Naccarato AG. **Investigating molecular alterations to profile short- and long-term recurrence-free survival in patients with primary glioblastoma.** Oncol Lett. 2015 Dec;10(6):3599-3606.

Geng P, Ou J, Li J, Liao Y, Wang N, Xie G, Sa R, Liu C, Xiang L, Liang H. **A Comprehensive Analysis of Influence ERCC Polymorphisms Confer on the Development of Brain Tumors.** Mol Neurobiol. 2015 Aug 13.

Ghasimi S, Wibom C, Dahlin AM, Brännström T, Golovleva I, Andersson U, Melin B. **Genetic risk variants in the CDKN2A/B, RTEL1 and EGFR genes are associated with somatic biomarkers in glioma.** J Neurooncol. 2016 May;127(3):483-92.

Giannini C, Di Paola F. **Brain tumors: update 6 years after the publication of the WHO blue book.** Pathologica. 1999 Dec;91(6):423-33.

Gravendeel LA, Kouwenhoven MC, Gevaert O et al. **Intrinsic gene expression profiles of gliomas are a better predictor of survival than histology.** Cancer Res (2009), 69, 9065-72.

Guilloton L, Cotton F, Cartalat-Carel S, Jouanneau E, Frappaz D, Honnorat J, et al. **Supervision of low-grade gliomas with multiparametric MR imaging: research of radiologic indicators of malignancy transformation.** Neurochirurgie 2008 ; 54 : 517-28.

Hainaut P, Hollstein M. **p53 and human cancer: the first ten thousand mutations.** Adv Cancer Res 2000; 77:81–137.

Hartmann C, Meyer J, Balss J, Capper D, Mueller W, Christians A, Felsberg J, Wolter M, Mawrin C, Wick W, Weller M, Herold-Mende C, Unterberg A, Jeuken JW, Wesseling P, Reifenberger G, von Deimling A. **Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas.** Acta Neuropathol. 2009 Oct;118(4):469-74.

Hasselblatt M, Riesmeier B, Lechtape B, Brentrup A, Stummer W, Albert FK, Sepehrnia A, Ebel H, Gerst J, Paulus W. **BRAF-KIAA1549 fusion transcripts are less frequent in pilocytic astrocytomas diagnosed in adults.** Neuropathol Appl Neurobiol. 2011 Dec;37(7):803-6.

Hawkins C, Walker E, Mohamed N, Zhang C, Jacob K, Shirinian M, Alon N, Kahn D, Fried I, Scheinemann K, Tsangaris E, Dirks P, Tressler R, Bouffet E, Jabado N, Tabori U. **BRAF-KIAA1549 fusion predicts better clinical outcome in pediatric low-grade astrocytoma.** Clin Cancer Res. 2011 Jul 15;17(14):4790-8.

Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R. **MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma.** N Engl J Med. 2005 Mar 10;352(10):997-1003.

Hilmani S, Abidi O, Benrahma H et al. **Clinicopathological features and molecular analysis of primary glioblastomas in Moroccan patients.** MolNeurosci (2013), 49(3), 567-73.

Hoffman WF, Levin VA, Wilson CB. **Evaluation of malignant glioma patients during the postirradiation period.** J Neurosurg. 1979 May;50(5):624-8.

Horbinski C. **Something old and something new about molecular diagnostics in gliomas.** Surg Pathol Clin. 2012 Dec 1;5(4):919-939.

Hottinger A.F., Stupp R. **Therapeutic strategies for the management of gliomas.** Revue neurologique 164 (2008) 523-530.

Houillier C, Lejeune J, Benouaich-Amiel A, Laigle-Donadey F, Criniere E, Mokhtari K, Thillet J, Delattre JY, Hoang-Xuan K, Sanson M. **Prognostic impact of molecular markers in a series of 220 primary glioblastomas.** Cancer. 2006 May 15;106(10):2218-23.

Houillier C, Wang X, Kaloshi G et al. **IDH1 or IDH2 mutations predict longer survival and response to temozolomide in low-grade gliomas.** Neurology (2010), 75, 1560-66.

Huang L, Jiang T, Yuan F, Li GL, Cui Y, Liu EZ, Wang ZC. **Correlation of chromosomes 1p and 19q status and expressions of O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT), p53 and Ki-67 in diffuse gliomas of World Health Organization (WHO) grades II and III: a clinicopathological study.** Neuropathol Appl Neurobiol. 2009 Aug;35(4):367-79.

Hurt MR, Moossy J, Donovan-Peluso M, Locker J. **Amplification of epidermal growth factor receptor gene in gliomas: histopathology and prognosis.** J Neuropathol Exp Neurol (1992) 51:84–90.

Ichimura K, Pearson DM, Kocialkowski S, Bäcklund LM, Chan R, Jones DT, Collins VP. **IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas.** Neuro Oncol. 2009 Aug;11(4):341-7.

Jeuken JW, Wesseling P. **MAPK pathway activation through BRAF gene fusion in pilocytic astrocytomas; a novel oncogenic fusion gene with diagnostic, prognostic, and therapeutic potential.** J Pathol. 2010 Dec;222(4):324-8.

Jha P, Suri V, Sharma V, Singh G, Sharma MC, Pathak P, Chosdol K, Jha P, Suri A, Mahapatra AK, Kale SS, Sarkar C. **IDH1 mutations in gliomas: first series from a tertiary care centre in India with comprehensive review of literature.** Exp Mol Pathol. 2011 Aug;91(1):385-93.

Jiao Y, Killela PJ, Reitman ZJ, Rasheed AB, Heaphy CM, de Wilde RF, Rodriguez FJ, Rosenberg S, Oba-Shinjo SM, Nagahashi Marie SK, Bettgowda C, Agrawal N, Lipp E, Pirozzi C, Lopez G, He Y, Friedman H, Friedman AH, Riggins GJ, Holdhoff M, Burger P, McLendon R, Bigner DD, Vogelstein B, Meeker AK, Kinzler KW, Papadopoulos N, Diaz LA, Yan H. **Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas.** Oncotarget. 2012 Jul;3(7):709-22.

Jin Y, Xiao W, Song T, Feng G, Dai Z. **Expression and Prognostic Significance of p53 in Glioma Patients: A Meta-analysis.** Neurochem Res. 2016 Jul;41(7):1723-31.

Johannessen AL, Torp SH. **The clinical value of Ki-67/MIB-1 labeling index in human astrocytomas.** Pathol Oncol Res. 2006;12(3):143-7.

Jones DT, Kocialkowski S, Liu L, Pearson DM, Bäcklund LM, Ichimura K, Collins VP. **Tandem duplication producing a novel oncogenic BRAF fusion gene defines the majority of pilocytic astrocytomas.** Cancer Res. 2008 Nov 1;68(21):8673-7.

Jones DT, Kocialkowski S, Liu L, Pearson DM, Ichimura K, Collins VP. **Oncogenic RAF1 rearrangement and a novel BRAF mutation as alternatives to KIAA1549:BRAF fusion**

in activating the MAPK pathway in pilocytic astrocytoma. *Oncogene*. 2009 May 21;28(20):2119-23.

Juratli TA, Cahill DP, McCutcheon IE. **Determining optimal treatment strategy for diffuse glioma: the emerging role of IDH mutations.** *Expert Rev Anticancer Ther* (2015), 15(6), 603-6.

Kannan K, Inagaki A, Silber J, Gorovets D, Zhang J, Kastenhuber ER, Heguy A, Petrini JH, Chan TA, Huse JT. **Whole-exome sequencing identifies ATRX mutation as a key molecular determinant in lower-grade glioma.** *Oncotarget*. 2012 Oct;3(10):1194-203.

Karim AB, Afra D, Cornu P, Bleehan N, Schraub S, De Witte O, et al. **Randomised trial on the efficacy of radiotherapy for cerebral low-grade glioma in the adult: European Organization for Research and Treatment of Cancer Study 22845 with the Medical Research Council study BRO4: an interim analysis.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002 ; 52 : 316-24.

Kernohan JW, Mabon RF, Svien HJ, Adson AW. **A simplified classification of gliomas.** *Proc Staff Meet Mayo Clin* 1949;24:71–5.

Killela PJ, Pirozzi CJ, Healy P, Reitman ZJ, Lipp E, Rasheed BA, Yang R, Diplas BH, Wang Z, Greer PK, Zhu H, Wang CY, Carpenter AB, Friedman H, Friedman AH, Keir ST, He J, He Y, McLendon RE, Herndon JE 2nd, Yan H, Bigner DD. **Mutations in IDH1, IDH2, and in the TERT promoter define clinically distinct subgroups of adult malignant gliomas.** *Oncotarget*. 2014 Mar 30;5(6):1515-25.

Kim YS, Kim SH, Cho J, Kim JW, Chang JH, Kim DS, et al. **MGMT Gene Promoter Methylation as a Potent Prognostic Factor in Glioblastoma Treated with Temozolomide-Based Chemoradiotherapy: A Single-Institution Study.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2012 Mar 11.

Kita D, Yonekawa Y, Weller M, Ohgaki H. **PI3KCA alterations in primary (de novo) and secondary glioblastomas.** *Acta Neuropathol* 2007; 113: 295–302.

Kleihues P CW. **World Health Organization classification of tumors of the central nervous system pathology and genetics of tumors of the nervous system.** Lyon: IARC Press; 2000.

Knudsen ES, Wang JY. **Targeting the RB-pathway in cancer therapy.** *Clin Cancer Res* 2010, 16:1094-1099.

Korshunov A, Sycheva R, Golanov A. **Molecular stratification of diagnostically challenging high-grade gliomas composed of small cells: the utility of fluorescence in situ hybridization.** *Clin Cancer Res*. 2004 Dec 1;10(23):7820-6.

Korshunov A, Meyer J, Capper D, Christians A, Remke M, Witt H, Pfister S, von Deimling A, Hartmann C. **Combined molecular analysis of BRAF and IDH1 distinguishes pilocytic astrocytoma from diffuse astrocytoma.** *Acta Neuropathol*. 2009 Sep;118(3):401-5.

Kraus JA, Glesmann N, Beck M, Krex D, Klockgether T, Schackert G, Schlegel U. **Molecular analysis of the PTEN, TP53 and CDKN2A tumor suppressor genes in long-term survivors of glioblastoma multiforme.** J Neurooncol. 2000 Jun;48(2):89-94.

Kraus JA, Koopmann J, Kaskel P, Maintz D, Brandner S, Schramm J, Louis DN, Wiestler OD, von Deimling A. **Shared allelic losses on chromosomes 1p and 19q suggest a common origin of oligodendroglioma and oligoastrocytoma.** J Neuropathol Exp Neurol. 1995 Jan;54(1):91-5.

Krell D, Mulholland P, Frampton AE, Krell J, Stebbing J, Bardella C. **IDH mutations in tumorigenesis and their potential role as novel therapeutic targets.** Future Oncol. 2013 Dec;9(12):1923-35.

Labussière M, Idbaih A, Wang XW, Marie Y, Boisselier B, Falet C, Paris S, Laffaire J, Carpentier C, Crinière E, Ducray F, El Hallani S, Mokhtari K, Hoang-Xuan K, Delattre JY, Sanson M. **All the 1p19q codeleted gliomas are mutated on IDH1 or IDH2.** Neurology. 2010 Jun 8;74(23):1886-90.

Labussière M, Boisselier B, Mokhtari K, Di Stefano AL, Rahimian A, Rossetto M, Ciccarino P, Saulnier O, Pattera R, Marie Y, Finocchiaro G, Sanson M. **Combined analysis of TERT, EGFR, and IDH status defines distinct prognostic glioblastoma classes.** Neurology. 2014 Sep 23;83(13):1200-6.

Labussière M, Di Stefano AL, Gleize V, Boisselier B, Giry M, Mangesius S, Bruno A, Pattera R, Marie Y, Rahimian A, Finocchiaro G, Houlston RS, Hoang-Xuan K, Idbaih A, Delattre JY, Mokhtari K, Sanson M. **TERT promoter mutations in gliomas, genetic associations and clinico-pathological correlations.** Br J Cancer. 2014 Nov 11;111(10):2024-32.

Lechapt-Zalcman E, Levallet G, Dugue AE, Vital A, Diebold MD, Menei P, et al. **O(6) -methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation and low MGMT-encoded protein expression as prognostic markers in glioblastoma patients treated with biodegradable carmustine wafer implants after initial surgery followed by radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide.** Cancer. 2012 Feb 22.

Lee MJ, Stephenson DA. **Recent developments in neurofibromatosis type 1.** Curr Opin Neurol 2007; 20: 135–41.

Leeper HE, Caron AA, Decker PA et al. **IDH mutation, 1p19q codeletion and ATRX loss in WHO grade II gliomas.** Oncotarget(2015), 6(30), 30295-305.

Leu S, von Felten S, Frank S, Boulay JL, Mariani L. **IDH mutation is associated with higher risk of malignant transformation in low-grade glioma.** J Neurooncol. 2016 Apr;127(2):363-72.

Li S, Yan C, Huang L et al. **Molecular prognostic factors of anaplastic oligodendroglial tumors and its relationship: a single institutional review of 77 patients from China.** Neuro Oncol (2012), 14, 109-16.

Ligon KL, Alberta JA, Kho AT, Weiss J, Kwaan MR, Nutt CL, Louis DN, Stiles CD, Rowitch DH. **The oligodendroglial lineage marker OLIG2 is universally expressed in diffuse gliomas.** J Neuropathol Exp Neurol. 2004 May;63(5):499-509.

Liu XY, Gerges N, Korshunov A, Sabha N, Khuong-Quang DA, Fontebasso AM, Fleming A, Hadjadj D, Schwartzentruber J, Majewski J, Dong Z, Siegel P, Albrecht S, Croul S, Jones DT, Kool M, Tonjes M, Reifenberger G, Faury D, Zadeh G, Pfister S, Jabado N. **Frequent ATRX mutations and loss of expression in adult diffuse astrocytic tumors carrying IDH1/IDH2 and TP53 mutations.** Acta Neuropathol. 2012 Nov;124(5):615-25.

Loiseau H, Huchet A, Rué M, Cowppli-Bony A, Bladi I. **Epidémiologie des tumeurs cérébrales primitives.** Rev Neurol 2009; 165 :650-70.

Louis DN OH, Wiestler OD, Cavenee WK. **WHO Classification of tumours of the central nervous system.** Lyon: IARC Press; 2007.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. **The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system.** Acta Neuropathol. 2007 Aug;114(2):97-109.

Louis DN, Perry A, Burger P, Ellison DW, Reifenberger G, von Deimling A, Aldape K, Brat D, Collins VP, Eberhart C, Figarella-Branger D, Fuller GN, Giangaspero F, Giannini C, Hawkins C, Kleihues P, Korshunov A, Kros JM, Beatriz Lopes M, Ng HK, Ohgaki H, Paulus W, Pietsch T, Rosenblum M, Rushing E, Soylemezoglu F, Wiestler O, Wesseling P; International Society Of Neuropathology--Haarlem. **International Society Of Neuropathology--Haarlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading.** Brain Pathol. 2014 Sep;24(5):429-35.

Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. **The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary.** Acta Neuropathol. 2016 Jun;131(6):803-20.

Lv S, Teugels E, Sadones J et al. **Correlation between IDH1 gene mutation status and survival of patients treated for recurrent glioma.** Anticancer Res(2011), 31, 4457-63.

Mabray MC, Barajas RF Jr, Cha S. **Modern brain tumor imaging.** Brain Tumor Res Treat. 2015 Apr;3(1):8-23.

Malmer B, Adatto P, Armstrong G, Barnholtz-Sloan J, Bernstein JL, Claus E, Davis F, Houlston R, Il'yasova D, Jenkins R, Johansen C, Lai R, Lau C, McCarthy B, Nielsen H, Olson SH, Sadetzki S, Shete S, Wiklund F, Wrensch M, Yang P, Bondy M. **GLIOGENE an International Consortium to Understand Familial Glioma.** Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2007 Sep;16(9):1730-4.

Martha L. Simmons, Kathleen R. Lamborn, Michelle Takahashi, Pengchin Chen, Mark A. Israel, Mitchel S. Berger, Tony Godfrey, Janice Nigro, Michael Prados, Susan Chang, Fred G. Barker II, and Ken Aldape. **Analysis of Complex Relationships between Age, p53, Epidermal Growth Factor Receptor, and Survival in Glioblastoma Patients.** CANCER RESEARCH 61, 1122–1128, February 1, 2001.

Martin-Duverneuil N, Guillemin R, Chiras J. **Imaging of gliomas.** Cancer Radiother. 2008 Nov; 12(6-7):669-75.

McDonald JM, See SJ, Tremont IW, Colman H, Gilbert MR, Groves M, Burger PC, Louis DN, Giannini C, Fuller G, Passe S, Blair H, Jenkins RB, Yang H, Ledoux A, Aaron J, Tipnis U, Zhang W, Hess K, Aldape K. **The prognostic impact of histology and 1p/19q status in anaplastic oligodendroglial tumors.** Cancer. 2005 Oct 1;104(7):1468-77.

McGirt MJ, Chaichana KL, Attenello FJ, Weingart JD, Than K, Burger PC, et al. **Extent of surgical resection is independently associated with survival in patients with hemispheric infiltrating lowgrade gliomas.** Neurosurgery 2008 ; 63 : 700-7 (author reply 707-8).

Meletis K, Wirta V, Hede SM, Nister M, Lundeborg J, Frisen J. **p53 Suppresses the self-renewal of adult neural stem cells.** Development 2006, 133:363-369.

Mellai M, Piazzzi A, Caldera V et al. **IDH1 and IDH2 mutations, immunohistochemistry and associations in a series of brain tumors.** J Neurooncol (2011), 105, 345-57.

Mellai M, Caldera V, Annovazzi L and Schiffer D. **The Distribution and Significance of IDH Mutations in Gliomas.** INTECH 2013. Chapter 10.

Michaloglou C, Vredevelde LC, Mooi WJ, Peeper DS. **BRAF(E600) in benign and malignant human tumours.** Oncogene. 2008 Feb 7;27(7):877-95.

Mirimanoff RO, Gorlia T, Mason W, Van den Bent MJ, Kortmann RD, Fisher B, Reni M, Brandes AA, Curschmann J, Villa S, Cairncross G, Allgeier A, Lacombe D, Stupp R. **Radiotherapy and temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: recursive partitioning analysis of the EORTC 26981/22981-NCIC CE3 phase III randomized trial.** J Clin Oncol. 2006 Jun 1;24(16):2563-9.

Mokhtari K, Paris S, Aguirre-Cruz L, Privat N, Crinière E, Marie Y, Hauw JJ, Kujas M, Rowitch D, Hoang-Xuan K, Delattre JY, Sanson M. **Olig2 expression, GFAP, p53 and 1p loss analysis contribute to glioma subclassification.** Neuropathol Appl Neurobiol. 2005 Feb;31(1):62-9.

Mukasa A, Takayanagi S, Saito K et al. **Significance of IDH mutations varies with tumor histology, grade, and genetics in Japanese glioma patients.** Cancer Sci (2012), 103, 587-92.

Nagaishi M, Suzuki A, Nobusawa S, Yokoo H, Nakazato Y. **Alpha-internexin and altered CIC expression as a supportive diagnostic marker for oligodendroglial tumors with the 1p/19q co-deletion.** Brain Tumor Pathol. 2014 Oct;31(4):257-64.

Neglia JP, Robison LL, Stovall M, Liu Y, Packer RJ, Hammond S, Yasui Y, Kasper CE, Mertens AC, Donaldson SS, Meadows AT, Inskip PD. **New primary neoplasms of the central nervous system in survivors of childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study.** J Natl Cancer Inst. 2006 Nov 1;98(21):1528-37.

Newlands ES, Blackledge GR, Slack JA, Rustin GJ, Smith DB, Stuart NS, et al. **Phase I trial of temozolomide** (CCRG 81045: M&B 39831: NSC 362856). Br J Cancer. 1992 Feb;65(2):287-91.

Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, Lazar CS, Gill GN, Cavenee WK, Huang HJ. **A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Aug 2;91(16):7727-31.

Nobusawa S, Watanabe T, Kleihues P and Ohgaki H. **IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas.** Clin Cancer Res. 2009 Oct 1;15(19):6002-7.

Ohgaki H. **Epidemiology of brain tumors.** Methods Mol Biol. 2009; 472:323-42.

Ohgaki H, Kleihues P. **Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas.** Cancer Sci. 2009 Dec;100(12):2235-41.

Ohgaki H, Kleihues P. **The definition of primary and secondary glioblastoma.** Clin Cancer Res. 2013 Feb 15;19(4):764-72.

Okamoto Y, Di Patre PL, Burkhard C, et al. **Population- based study on incidence, survival rates, and genetic alterations of low-grade diffuse astrocytomes and oligodendrogliomas.** Acta Neuropathol 2004;108:49–56.

Olar A, Wani KM, Alfaro-Munoz KD, Heathcock LE, van Thuijl HF, Gilbert MR, Armstrong TS, Sulman EP, Cahill DP, Vera-Bolanos E, Yuan Y, Reijneveld JC, Ylstra B, Wesseling P, Aldape KD. **IDH mutation status and role of WHO grade and mitotic index in overall survival in grade II-III diffuse gliomas.** Acta Neuropathol. 2015 Apr;129(4):585-96.

Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Rouse C, Chen Y, Dowling J, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan J. **CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011.** Neuro Oncol. 2014 Oct;16 Suppl 4:iv1-63.

Parsons DW, Jones S, Zhang X et al. **An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme.** Science 2008 Sep 26;321(5897):1807-12.

Patrick J Killela, Christopher J Pirozzi, Patrick Healy et al. **Mutations in IDH1, IDH2, and in the TERT promoter define clinically distinct subgroups of adult malignant gliomas.** Oncotarget (2014), 5(6), 1515-25.

Pekmezci M, Perry A. **Practical molecular pathologic diagnosis of infiltrating gliomas.** Surg Pathol Clin. 2015 Mar;8(1):49-61.

Pellegatta S, Valletta L, Corbetta C, Patanè M, Zucca I, Riccardi Sirtori F, Bruzzone MG, Fogliatto G, Isacchi A, Pollo B, Finocchiaro G. **Effective immuno-targeting of the IDH1 mutation R132H in a murine model of intracranial glioma.** Acta Neuropathol Commun. 2015 Jan 21;3:4.

Pelloski CE, Lin E, Zhang L, et al. **Prognostic associations of activated mitogen-activated Protein kinase and Akt pathways in glioblastoma.** Clin Cancer Res 2006;12:3935–41.

Perry A, Aldape KD, George DH, Burger PC. **Small cell astrocytoma: an aggressive variant that is clinicopathologically and genetically distinct from anaplastic oligodendroglioma.** Cancer. 2004 Nov 15;101(10):2318-26.

Pessôa IA, Sagica FE, Anselmo NP, Brito JR, de Oliveira EH. **IDH1 and IDH2 mutations in different histologic subtypes and WHO grading gliomas in a sample from Northern Brazil.** Genet Mol Res (2015), 14(2), 6533-42.

Pfister S, Janzarik WG, Remke M, Ernst A, Werft W, Becker N, Toedt G, Wittmann A, Kratz C, Olbrich H, Ahmadi R, Thieme B, Joos S, Radlwimmer B, Kulozik A, Pietsch T, Herold-Mende C, Gnekow A, Reifenberger G, Korshunov A, Scheurlen W, Omran H, Lichter P. **BRAF gene duplication constitutes a mechanism of MAPK pathway activation in low-grade astrocytomas.** J Clin Invest. 2008 May;118(5):1739-49.

Pope WB, Djoukhardar I, Jackson A. **Neuroimaging.** Handb Clin Neurol. 2016;134:27-50.

Preusser M, Budka H, Rössler K, Hainfellner JA. **OLIG2 is a useful immunohistochemical marker in differential diagnosis of clear cell primary CNS neoplasms.** Histopathology. 2007 Feb;50(3):365-70.

Quillien V, Lavenu A, karayan-Tapon L, Carpentier C, Labussière M, Lesimple T, et al. **Comparative assessment of 5 methods (methylation-specific polymerase chain reaction, methylight, pyrosequencing, methylation-sensitive high-resolution melting, and immunohistochemistry) to analyze O6-methylguanine-DNA-methyltransferase in a series of 100 glioblastoma patients.** Cancer 2012:31.

Reifenberger J, Reifenberger G, Liu L, James CD, Wechsler W, Collins VP. **Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p.** Am J Pathol. 1994 Nov;145(5):1175-90.

Reuss DE, Sahm F, Schrimpf D, Wiestler B, Capper D, Koelsche C, Schweizer L, Korshunov A, Jones DT, Hovestadt V, Mittelbronn M, Schittenhelm J, Herold-Mende C, Unterberg A, Platten M, Weller M, Wick W, Pfister SM, von Deimling A. **ATRX and IDH1-R132H immunohistochemistry with subsequent copy number analysis and IDH sequencing as a basis for an "integrated" diagnostic approach for adult astrocytoma, oligodendroglioma and glioblastoma.** Acta Neuropathol. 2015 Jan;129(1):133-46.

Rigau V, Zouaoui S, Mathieu-Daudé H, Darlix A, Maran A, Trétarre B, Bessaoud F, Bauchet F, Attaoua R, Fabbro-Peray P, Fabbro M, Kerr C, Taillandier L, Duffau H, Figarella-Branger D, Costes V, Bauchet L; Société Française de Neuropathologie (SFNP), Société Française de Neurochirurgie (SFNC); Club de Neuro-Oncologie of the Société Française de Neurochirurgie (CNO-SFNC); Association des Neuro-Oncologues d'Expression Française (ANOCEF). **French brain tumor database: 5-year histological results on 25 756 cases.** Brain Pathol. 2011 Nov;21(6):633-44.

Ringertz N. **Grading of gliomas.** Acta Pathol Microbiol Scand. 1950; 27(1):51-64.

Robert J. **Signalisation cellulaire et cancer.** Edition Springer 2010.

Rohle D, Popovici-Muller J, Palaskas N, Turcan S, Grommes C, Campos C, Tsoi J, Clark O, Oldrini B, Komisopoulou E, Kunii K, Pedraza A, Schalm S, Silverman L, Miller A, Wang F, Yang H, Chen Y, Kernytsky A, Rosenblum MK, Liu W, Biller SA, Su SM, Brennan CW, Chan TA, Graeber TG, Yen KE, Mellinghoff IK. **An inhibitor of mutant IDH1 delays growth and promotes differentiation of glioma cells.** Science. 2013 May 3;340(6132):626-30.

Sacko A, Hou MM, Temgoua M, Alkhafaji A, Marantidou A, Belin C, Mandonnet E, Ursu R, Doridam J, Coman I, Levy-Piedbois C, Carpentier AF. **Evolution of the Karnosky Performance Status throughout life in glioblastoma patients.** J Neurooncol. 2015 May;122(3):567-73.

Sahm F, Reuss D, Koelsche C, Capper D, Schittenhelm J, Heim S, Jones DT, Pfister SM, Herold-Mende C, Wick W, Mueller W, Hartmann C, Paulus W, von Deimling A. **Farewell to oligoastrocytoma: in situ molecular genetics favor classification as either oligodendroglioma or astrocytoma.** Acta Neuropathol. 2014 Oct;128(4):551-9.

Sampson JH, Aldape KD, Archer GE, Coan A, Desjardins A, Friedman AH, Friedman HS, Gilbert MR, Herndon JE, McLendon RE, Mitchell DA, Reardon DA, Sawaya R, Schmittling R, Shi W, Vredenburgh JJ, Bigner DD, Heimberger AB. **Greater chemotherapy-induced lymphopenia enhances tumor-specific immune responses that eliminate EGFRvIII-expressing tumor cells in patients with glioblastoma.** Neuro Oncol. 2011 Mar;13(3):324-33.

Sanson M, Marie Y, Paris S, Idhah A, Laffaire J, Ducray F, El Hallani S, Boisselier B, Mokhtari K, Hoang-Xuan K and Delattre JY. **Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas.** Clin Oncol. 2009 Sep 1;27(25):4150-4.

Sasaki M, Knobbe CB, Itsumi M, Elia AJ, Harris IS, Chio II, Cairns RA, McCracken S, Wakeham A, Haight J, Ten AY, Snow B, Ueda T, Inoue S, Yamamoto K, Ko M, Rao A, Yen KE, Su SM, Mak TW. **D-2-hydroxyglutarate produced by mutant IDH1 perturbs collagen maturation and basement membrane function.** Genes Dev. 2012 Sep 15;26(18):2038-49.

Schiffman JD, Hodgson JG, VandenBerg SR, Flaherty P, Polley MY, Yu M, Fisher PG, Rowitch DH, Ford JM, Berger MS, Ji H, Gutmann DH, James CD. **Oncogenic BRAF mutation with CDKN2A inactivation is characteristic of a subset of pediatric malignant astrocytomas.** Cancer Res. 2010 Jan 15;70(2):512-9.

Schindler G, Capper D, Meyer J, Janzarik W, Omran H, Herold-Mende C, Schmieder K, Wesseling P, Mawrin C, Hasselblatt M, Louis DN, Korshunov A, Pfister S, Hartmann C, Paulus W, Reifenberger G, von Deimling A. **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 Mar;121(3):397-405.

Schlehofer B, Blettner M, Preston-Martin S, Niehoff D, Wahrendorf J, Arslan A, Ahlbom A, Choi WN, Giles GG, Howe GR, Little J, Ménégos F, Ryan P. **Role of medical history in brain tumour development. Results from the international adult brain tumour study.** Int J Cancer. 1999 Jul 19;82(2):155-60.

Schmiegelow K1, Levinsen MF, Attarbaschi A, Baruchel A, Devidas M, Escherich G, Gibson B, Heydrich C, Horibe K, Ishida Y, Liang DC, Locatelli F, Michel G, Pieters R, Piette C, Pui CH, Raimondi S, Silverman L, Stanulla M, Stark B, Winick N, Valsecchi MG. **Second malignant neoplasms after treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia.** J Clin Oncol. 2013 Jul 1;31(19):2469-76.

Schumacher T, Bunse L, Pusch S et al. **A vaccine targeting mutant IDH1 induces antitumour immunity.** Nature(2014), 512(7514), 324-7.

Schumacher T, Bunse L, Wick W, Platten M. **Mutant IDH1: An immunotherapeutic target in tumors.** Oncoimmunology. 2015 Jan 7;3(12):e974392. eCollection 2014 Dec.

Shangary S, Wang S. **Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction to reactivate p53 function: a novel approach for cancer therapy.** Annu Rev Pharmacol Toxicol 2009, 49: 223-241.

Shaw E, Arusell R, Scheithauer B, O'Fallon J, O'Neill B, Dinapoli R, et al. **Prospective randomized trial of low- versus highdose radiation therapy in adults with supratentorial low-grade glioma: initial report of a North Central Cancer Treatment Group/ Radiation Therapy Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group study.** J Clin Oncol 2002; 20 : 2267-76.

Shete S, Lau CC, Houlston RS, Claus EB, Barnholtz-Sloan J, Lai R, Il'yasova D, Schildkraut J, Sadetzki S, Johansen C, Bernstein JL, Olson SH, Jenkins RB, Yang P, Vick NA, Wrensch M, Davis FG, McCarthy BJ, Leung EH, Davis C, Cheng R, Hosking FJ, Armstrong GN, Liu Y, Yu RK, Henriksson R; GliogeneConsortium, Melin BS, Bondy ML. **Genome-wide high-density SNP linkage search for glioma susceptibility loci: results from the Gliogene Consortium.** Cancer Res. 2011 Dec 15;71(24):7568-75.

Shibahara I, Sonoda Y, Kanamori M et al. **IDH1/2 gene status defines the prognosis and molecular profiles in patients with grade III gliomas.** Int J ClinOncol (2012), 17(6), 551-61.

Shinojima N, Tada K, Shiraishi S, et al. **Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme.** Cancer Res 2003;63:6962–70.

Skjulsvik AJ, Mørk JN, Torp MO, Torp SH. **Ki-67/MIB-1 immunostaining in a cohort of human gliomas.** Int J Clin Exp Pathol. 2014 Dec 1;7(12):8905-10.

Skogen K, Schulz A, Dormagen JB, Ganeshan B, Helseth E, Server A. **Diagnostic performance of texture analysis on MRI in grading cerebral gliomas.** Eur J Radiol. 2016 Apr;85(4):824-9.

Smith JS, Tachibana I, Passe SM, et al. **PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme.** J Natl Cancer Inst 2001;93:1246–56

Smith JS, Chang EF, Lamborn KR, Chang SM, Prados MD, Cha S, et al. **Role of extent of resection in the long-term outcome of low-grade hemispheric gliomas.** J Clin Oncol 2008 ; 26 : 1338-45.

Stupp R, Pavlidis N, Jelic S; ESMO Guidelines Task Force. **ESMO Minimum Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up of malignant glioma.** Ann Oncol. 2005;16 Suppl 1:i64-5.

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. **Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma.** N Engl J Med. 2005 Mar 10;352(10):987-96.

Suzuki H, Aoki K, Chiba K, Sato Y, Shiozawa Y, Shiraishi Y, Shimamura T, Niida A, Motomura K, Ohka F, Yamamoto T, Tanahashi K, Ranjit M, Wakabayashi T, Yoshizato T, Kataoka K, Yoshida K, Nagata Y, Sato-Otsubo A, Tanaka H, Sanada M, Kondo Y, Nakamura H, Mizoguchi M, Abe T, Muragaki Y, Watanabe R, Ito I, Miyano S, Natsume A, Ogawa S. **Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas.** Nat Genet. 2015 May;47(5):458-68.

Swerdlow AJ, Feychting M, Green AC, Leeka Kheifets LK, Savitz DA; International Commission for Non-Ionizing Radiation Protection Standing Committee on Epidemiology. **Mobile phones, brain tumors, and the interphone study: where are we now?** Environ Health Perspect. 2011 Nov;119(11):1534-8.

Thorne AH, Zanca C, Furnari F. **Epidermal growth factor receptor targeting and challenges in glioblastoma.** Neuro Oncol. 2016 Jul;18(7):914-8.

Trabelsi S, Chabchoub I, Ksira I, Karmeni N, Mama N, Kanoun S, Burford A, Jury A, Mackay A, Popov S, Bouaouina N, Ben Ahmed S, Mokni M, Tlili K, Krifa H, Yacoubi MT, Jones C, Saad A, H'mida Ben Brahim D. **Molecular Diagnostic and Prognostic Subtyping of Gliomas in Tunisian Population.** Mol Neurobiol. 2016 Mar 9.

Van den Bent MJ, Afra D, de Witte O, Ben Hassel M, Schraub S, Hoang-Xuan K, et al. **Long-term efficacy of early versus delayed radiotherapy for low-grade astrocytoma and oligodendroglioma in adults: the EORTC 22845 randomised trial.** Lancet 2005 ; 366 : 985-90.

Van den Bent MJ, Carpentier AF, Brandes AA, Sanson M, Taphoorn MJ, Bernsen HJ, Frenay M, Tijssen CC, Grisold W, Sipsos L, Haaxma-Reiche H, Kros JM, van Kouwenhoven MC, Vecht CJ, Allgeier A, Lacombe D, Gorlia T. **Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine improves progression-free survival but not overall survival in newly diagnosed anaplastic oligodendrogliomas and oligoastrocytomas: a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer phase III trial.** J Clin Oncol. 2006 Jun 20;24(18):2715-22.

Van den Bent MJ. **Interobserver variation of the histopathological diagnosis in clinical trials on glioma: a clinician's perspective.** Acta Neuropathol 2010;120:297-304.

Van den Bent M J, Dubbink H J, Marie Y et al. **IDH1 and IDH2 mutations are prognostic but not predictive for outcome in anaplastic oligodendroglial tumors: a report of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Group.** Clin Cancer Res (2010), 16, 1597-604.

van den Bent MJ, Brandes AA, Taphoorn MJ, Kros JM, Kouwenhoven MC, Delattre JY, Bernsen HJ, Frenay M, Tijssen CC, Grisold W, Sipsos L, Enting RH, French PJ, Dinjens WN, Vecht CJ, Allgeier A, Lacombe D, Gorlia T, Hoang-Xuan K. **Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy in newly diagnosed anaplastic**

oligodendroglioma: long-term follow-up of EORTC brain tumor group study 26951. J Clin Oncol. 2013 Jan 20;31(3):344-50.

Van Meir EG, Hadjipanayis CG, Norden AD, Shu HK, Wen PY, Olson JJ. **Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma.** CA Cancer J Clin 2010, 60:166-193.

Von Deimling A, Korshunov A, Hartmann C. **The next generation of glioma biomarkers: MGMT methylation. BRAF fusions and IDH1 mutations.** Brain Pathol 2011;21:74-87

Waitkus MS, Diplas BH, Yan H. **Isocitrate dehydrogenase mutations in gliomas.** Neuro Oncol. 2016 Jan;18(1):16-26.

Wakimoto H, Aoyagi M, Nakayama T, Nagashima G, Yamamoto S, Tamaki M, Hirakawa K. **Prognostic significance of Ki-67 labeling indices obtained using MIB-1 monoclonal antibody in patients with supratentorial astrocytomas.** Cancer. 1996 Jan 15;77(2):373-80.

Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, Jones CM, Marshall CJ, Springer CJ, Barford D, Marais R; Cancer Genome Project. **Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF.** Cell. 2004 Mar 19;116(6):855-67.

Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P and Ohgaki H. **IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas.** Am J Pathol. 2009 Apr;174(4):1149-53.

Weller M, Felsberg J, Hartmann C et al. **Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective translational study of the German Glioma Network.** J ClinOncol (2009), 27, 5743-50.

Weller M, Stupp R, Reifenberger G, Brandes AA, Van den Bent MJ, Wick W, Hegi ME. **MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine?** Nature Rev Neurol. 2010;6:39–51.

Weller M, Stupp R, Hegi ME, van den Bent M, Tonn JC, Sanson M, Wick W, Reifenberger G. **Personalized care in neuro-oncology coming of age: why we need MGMT and 1p/19q testing for malignant glioma patients in clinical practice.** Neuro Oncol. 2012 Sep;14 Suppl 4:iv100-8.

Weller M, van den Bent M, Hopkins K, Tonn JC, Stupp R, Falini A, Cohen-Jonathan-Moyal E, Frappaz D, Henriksson R, Balana C, Chinot O, Ram Z, Reifenberger G, Soffietti R, Wick W; European Association for Neuro-Oncology (EANO) Task Force on Malignant Glioma. **EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma.** Lancet Oncol. 2014 Aug;15(9):e395-403.

Weller M, Weber RG, Willscher E, Riehmer V, Hentschel B, Kreuz M, Felsberg J, Beyer U, Löffler-Wirth H, Kaulich K, Steinbach JP, Hartmann C, Gramatzki D, Schramm J, Westphal M, Schackert G, Simon M, Martens T, Boström J, Hagel C, Sabel M, Krex D, Tonn JC, Wick W, Noell S, Schlegel U, Radlwimmer B, Pietsch T, Loeffler M, von Deimling A, Binder H, Reifenberger G. **Molecular classification of diffuse cerebral WHO grade II/III gliomas using genome- and transcriptome-wide profiling improves stratification of prognostically distinct patient groups.** Acta Neuropathol. 2015 May;129(5):679-93.

Wesseling P, van den Bent M, Perry A. **Oligodendroglioma : pathology, molecular mechanisms and markers.** Acta Neuropathol. 2015 Jun;129(6):809-27.

Wick W, Hartmann C, Engel C et al. **NOA-04 randomized phase III trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with procarbazine, lomustine, and vincristine or temozolomide.** J ClinOncol (2009), 27, 5874-80.

Wick W, Weller M, van Den Bent M et al. **MGMT testing—the challenges for biomarker-based glioma treatment.** Nat Rev Neurol (2014) .10: 372–385.

Wong AJ, Bigner SH, Bigner DD, Kinzler KW, Hamilton SR, Vogelstein B. **Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Oct;84(19):6899-903.

Wrensch M, Lee M, Miike R, Newman B, Barger G, Davis R, Wiencke J, Neuhaus J. **Familial and personal medical history of cancer and nervous system conditions among adults with glioma and controls.** Am J Epidemiol. 1997 Apr 1;145(7):581-93.

Xia L, Wu B, Fu Z, Feng F, Qiao E, Li Q, Sun C, Ge M. **Prognostic role of IDH mutations in gliomas: a meta-analysis of 55 observational studies.** Oncotarget. 2015 Jul 10;6(19):17354-65.

Xu C, Chen P, Liu W, Gu AH, Wang XR. **Association between the XRCC1 Arg194Trp polymorphism and glioma risk: an updated meta-analysis.** Asian Pac J Cancer Prev. 2014;15(17):7419-24.

Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batninc-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, Friedman H, Friedman A, Reardon D, Herndon J, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B, Bigner DD. **IDH1 and IDH2 mutations in gliomas.** N Engl J Med. 2009 Feb 19;360(8):765-73.

Yan W, Zhang W, You G, Bao Z, Wang Y, Liu Y, Kang C, You Y, Wang L, Jiang T. **Correlation of IDH1 mutation with clinicopathologic factors and prognosis in primary glioblastoma: a report of 118 patients from China.** PLoS One. 2012;7(1):e30339.

Yang P, Cai J, Yan W, Zhang W, Wang Y, Chen B, Li G, Li S, Wu C, Yao K, Li W, Peng X, You Y, Chen L, Jiang C, Qiu X, Jiang T; CGGA project. **Classification based on mutations of TERT promoter and IDH characterizes subtypes in grade II/III gliomas.** Neuro Oncol. 2016 Mar 7.

Young GS. **Advanced MRI of adult brain tumors.** Neurol Clin 2007 ; 25 : 947-73 (viii.).

Yu J, Deshmukh H, Gutmann RJ, Emnett RJ, Rodriguez FJ, Watson MA, Nagarajan R, Gutmann DH. **Alterations of BRAF and HIPK2 loci predominate in sporadic pilocytic astrocytoma.** Neurology. 2009 Nov 10;73(19):1526-31.

Yuan Y, Qi C, Maling G, Xiang W, Yanhui L, Ruofei L, Yunhe M, Jiewen L, Qing M. **TERT mutation in glioma: Frequency, prognosis and risk.** J Clin Neurosci. 2016 Apr;26:57-62.

Zawlik I, Kita D, Vaccarella S, Mittelbronn M, Franceschi S, Ohgaki H. **Common polymorphisms in the MDM2 and TP53 genes and the relationship between TP53 mutations and patient outcomes in glioblastomas.** Brain Pathol 2009, 19:188-194.

Zeng A, Hu Q, Liu Y, Wang Z, Cui X, Li R, Yan W, You Y. **IDH1/2 mutation status combined with Ki-67 labeling index defines distinct prognostic groups in glioma.** Oncotarget. 2015 Oct 6;6(30):30232-8.

Zhang RQ, Shi Z, Chen H et al. **Biomarker-based prognostic stratification of young adult glioblastoma.** Oncotarget (2016), 7(4):5030-41.

Znati K, Bennis S, Abbass F, Akasbi Y, Chbani L, Elfatemi H, Harmouch T, Amarti A. **Breast cancer in young patient in Morocco.** Gynecol Obstet Fertil. 2014 Mar;42(3):149-54.

Zou P, Xu H, Chen P, Yan Q, Zhao L, Zhao P, Gu A. **IDH1/IDH2 mutations define the prognosis and molecular profiles of patients with gliomas: a meta-analysis.** PLoS One. 2013 Jul 22;8(7):e68782.

Zouaoui S, Rigau V, Mathieu-Daudé H, Darlix A, Bessaoud F, Fabbro-Peray P, Bauchet F, Kerr C, Fabbro M, Figarella-Branger D, Taillandier L, Duffau H, Trétarre B, Bauchet L; Société française de neurochirurgie (SFNC) et le Club de neuro-oncologie de la SFNC; Société française de neuropathologie (SFNP); Association des neuro-oncologues d'expression française (ANOCEF). **Recensement national histologique des tumeurs primitives du système nerveux central : résultats généraux sur 40 000 cas, principales applications actuelles et perspectives.** Neurochirurgie. 2012 Feb;58(1):4-13.

Table des matières

Introduction générale.....	1
Chapitre I : Etude bibliographique	5
1. Anatomie et physiologie des cellules gliales.....	6
2. Epidémiologie et facteurs de risques des gliomes.....	8
2.1. Epidémiologie descriptive.....	8
2.2. Facteurs de risque	10
3. Aspects cliniques et radiologiques des gliomes	12
3.1. Présentation clinique	12
3.2. Présentation radiologique.....	13
4. Classifications des gliomes et difficultés diagnostiques	18
4.1. Historique.....	18
4.2. Classification de l'OMS 2007 des gliomes et ses limites	18
4.3. Classification de l'hôpital Sainte-Anne des gliomes et ses limites.....	25
4.4. Consensus de la société internationale de neuropathologie 2014 (ISN-Haarleem)27	
4.5. Classification de l'OMS 2016 des gliomes.....	28
5. Principales voies d'oncogénèse.....	31
5.1. Voie EGFR/ RAS / NF1 /PTEN / PI3K.....	31
5.2. Voie TP53/MDM2/MDM4/p14 ^{ARF}	33
5.3. Voie p16 ^{INK4a} / CDK4 / RB1	35
6. Principales altérations génétiques et épigénétiques.....	35
6.1. Mutations <i>IDH 1 et 2</i>	35
6.2. Codélétion 1p / 19q.....	38
6.3. Altérations de l' <i>EGFR</i>	40
6.4. Méthylation du promoteur du gène <i>MGMT</i>	41
6.5. Fusion <i>BRAF</i> et mutations	42
7. Prise en charge thérapeutique des gliomes.....	43
7.1. Chirurgie	44
7.2. Radiothérapie	45
7.3. Chimiothérapie.....	45
Chapitre II : Matériel et méthodes.....	47

1. Description de la population d'étude :	48
2. Etude histologique des tumeurs gliales	49
2.1. Examen histologique extemporané	49
2.2. Fixation du tissu	49
2.3. Etude macroscopique	50
2.4. Imprégnation et inclusion	50
2.5. Coupes et coloration	50
3. Etude immunohistochimique des tumeurs gliales	52
3.1. Protocole d'étude	52
3.2. Evaluation du marquage immunohistochimique	52
4. Etude moléculaire des tumeurs gliales	55
4.1. Extraction d'ADN génomique pour analyses moléculaires	55
4.2. Recherche des mutations <i>IDH</i>	57
4.3. Recherche de la mutation V600E du gène <i>BRAF</i>	62
4.4. Recherche de l'amplification des gènes <i>EGFR</i> et <i>MDM2</i> par qPCR	63
5. Cytogénétique moléculaire : recherche de l'amplification de l' <i>EGFR</i> et de la co-délétion 1p/19q par hybridation in situ fluorescente	68
5.1. Principe général et caractéristiques des sondes utilisées	68
5.2. Protocole standard de FISH	71
5.3. Mise au point de la technique FISH sur tumeurs cérébrales	73
5.4. Analyse des résultats FISH	75
Chapitre III : Résultats	76
1. Epidémiologie descriptive des gliomes :	77
1.1 Répartition des patients selon le sexe :	77
1.2 Répartition des patients selon l'âge :	77
1.3 Répartition des tumeurs selon le grade histologique :	78
1.4 Répartition des tumeurs en fonction du type histologique prédominant :	78
1.5 Répartition des tumeurs selon le siège :	79
1.6 Répartition des patients en fonction des tranches d'âge et du grade :	79
2. Epidémiologie descriptive des glioblastomes :	80
2.1 Répartition des glioblastomes en fonction du sexe :	80
2.2 Répartition des glioblastomes selon l'âge :	81
3. Etude histologique et immunohistochimique	85

3.1	Détermination de l'expression de l'interneurine α et de l'Olig-2 dans les oligodendrogliomes et les oligoastrocytomes :	85
3.2	Détermination de l'expression de P53 dans les glioblastomes :	87
3.3	Détermination de l'expression de Ki67 dans les glioblastomes :	88
4.	Etude moléculaire.....	89
4.1	Identification de la mutation V600E du gène <i>BRAF</i>	89
4.2	Détection des mutations du gène <i>IDH</i> :	90
4.3	Détection de l'amplification du gène <i>EGFR</i> dans les glioblastomes par qPCR : ..	92
4.4	Détection de l'amplification du gène <i>MDM2</i> :	93
5.	Cytogénétique moléculaire :	94
5.1	Détection de la co-délétion 1p/19q	94
5.2	Détection de l'amplification du gène <i>EGFR</i> par FISH.....	95
6.	Survie globale des patients porteurs de glioblastomes.....	95
6.1	Corrélation entre le statut du gène <i>IDH1</i> et la survie globale :	96
6.2	Corrélation entre le statut du gène <i>EGFR</i> et la survie globale :	97
6.3	Corrélation entre le statut du gène <i>MDM2</i> et la survie globale :	97
6.4	Corrélation entre l'expression de la protéine Ki67 et la survie globale :	98
6.5	Distribution des glioblastomes en groupes moléculaires.....	100
Chapitre IV : Discussion		101
Conclusion générale et perspectives.....		118
Références bibliographiques		122

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification histologique des tumeurs gliales diffuses selon l’OMS 2007. <i>Louis DN et al., 2007</i>	20
Tableau 2 : Types et fréquences des mutations IDH1et IDH2 dans les gliomes. <i>Mellai M et al., 2013</i>	37
Tableau 3 : Caractéristiques des différents anticorps utilisés dans notre étude immunohistochimique.....	54
Tableau 4 : Amorces utilisées pour la mise en évidence des mutations des gènes <i>IDH 1 et 2</i>	57
Tableau 5 : Composition du milieu réactionnel pour la détection des mutations des gènes <i>IDH 1 et 2</i>	58
Tableau 6 : Programme PCR de l’exon 4 des gènes <i>IDH1</i> et <i>IDH2</i>	58
Tableau 7 : Spectre d’émission des dichloroRhodamines spécifiques de chaque type de ddNTP.	60
Tableau 8 : Composition du mix de PCR de séquence.	60
Tableau 9 : Programmation de la PCR de séquence.	61
Tableau 10 : Amorces utilisées pour la mise en évidence de la mutation V600E du gène <i>BRAF</i>	62
Tableau 11 : Composition du milieu réactionnel pour l’amplification de l’exon 15 du gène <i>BRAF</i>	62
Tableau 12 : Programme PCR de l’exon 15 du gène <i>BRAF</i>	63
Tableau 13 : Amorces utilisées pour la mise en évidence de l’amplification des gènes <i>EGFR</i> et <i>MDM2</i>	65
Tableau 14 : Sondes Taqman spécifiques des gènes <i>EGFR</i> et <i>MDM2</i>	65
Tableau 15 : Composition du milieu réactionnel avec L’ADN du gène cible pour la détection de l’amplification des gènes <i>EGFR</i> et <i>MDM2</i>	65
Tableau 16 : Composition du milieu réactionnel avec le contrôle endogène RNasaP pour la détection de l’amplification des gènes <i>EGFR</i> et <i>MDM2</i>	66
Tableau 17 : Programme PCR pour la détection de l’amplification des gènes <i>EGFR</i> et <i>MDM2</i>	66
Tableau 18 : Programme Thermobrite de dénaturation / hybridation des sondes.....	72
Tableau 19 : Distribution des glioblastomes selon les tranches d’âge.....	77

Tableau 20 : Distribution des gliomes en fonction du siège tumoral.....	79
Tableau 21 : Distribution des glioblastomes en fonction du sexe.....	80
Tableau 22 : Distribution des glioblastomes en fonction de l'âge.....	81
Tableau 23 : Evaluation de l'indice KPS des patients porteurs de glioblastomes.	82
Tableau 24 : Expression de l'internexine α et de l'Olig-2 dans les oligodendrogliomes et les tumeurs mixtes.	86
Tableau 25 : Fréquence de l'expression de la protéine P53 dans le groupe de glioblastome. .	87
Tableau 26 : Statut de l'indice de prolifération cellulaire Ki67 dans les glioblastomes.	88
Tableau 27 : Répartition de la mutation R132H du gène IDH1 dans les gliomes de grades II, III et IV.....	91
Tableau 28 : Détermination du statut d'amplification du gène <i>EGFR</i> pour les 17 cas de glioblastomes <i>EGFR</i> amplifié.	93
Tableau 29 : Distribution des glioblastomes en groupes moléculaires.	100

Liste des figures

Figure 1 : Schéma de l'organisation cellulaire du SNC par examen au microscope optique. ...	7
Figure 2 : Répartition de l'ensemble des tumeurs primaires du système nerveux central par regroupement histologique.	10
Figure 3 : Signes cliniques des tumeurs cérébrales selon la topographie.	13
Figure 4 : Coupes HES mettant en évidence une prolifération tumorale à faible densité cellulaire, faite de cellules monomorphes de petite taille reposant sur un fond fibrillaire..	21
Figure 5 : Coupe histologique d'un astrocytome diffus.....	22
Figure 6 : Aspect histologique caractéristique d'un glioblastome.....	23
Figure 7 : Aspect histologique d'un oligodendrogliome de grade II.	24
Figure 8 : Aspect histologique d'un oligo-astrocytome de grade II	25
Figure 9 : Un algorithme simplifié pour la classification des gliomes sur la base des caractéristiques histologiques et génétiques de la classification de l'OMS 2016.	29
Figure 10 : Schéma récapitulatif de la voie de la PI3 kinase après activation par un récepteur tyrosine kinase (RTK).	32
Figure 11 : Les points de contrôle du cycle cellulaire et le contrôle de l'état de l'ADN.	34
Figure 12 : L'activité enzymatique des protéines IDH1/2 de type sauvage et mutée.	36
Figure 13 : Mécanisme de la fluorescence par la technique du transfert d'énergie par résonance.....	60
Figure 14 : Hydrolyse de sondes Taqman.	64
Figure 15 : Localisation des sondes LSI EGFR/CEP 7 sur le chromosome 7.	70
Figure 16 : Cartes géniques des sondes 1q25/ 1p36 et 19q13/19p13.....	70
Figure 17 : Localisation des sondes 1q25/1p36 et 19q13/19p13 sur les chromosomes 1 et 19.	71
Figure 18 : Résultat de la technique FISH d'un cas de tissu fixé avec le liquide de Bouin (A) et d'un cas de tissu fixé avec le formol tamponné à 10% pendant une durée de 6h (B).	73
Figure 19 : Effet de l'épaisseur sur la qualité de la FISH.	74
Figure 20 : Effet de la durée de digestion enzymatique sur la qualité des résultats FISH.	75
Figure 21 : Distribution des gliomes en fonction du type histologique.	78
Figure 22 : Distribution des gliomes selon les tranches d'âge et le grade.	80
Figure 23: Répartition des glioblastomes en fonction du siège tumoral.	81

Figure 24 : Prise en charge chirurgicale des glioblastomes.	83
Figure 25 : IRM cérébrale	84
Figure 26 : Marquages immunohistochimiques positifs de l'INA et l'OLIG-2 dans un cas d'oligodendrogliome anaplasique.	86
Figure 27 : Marquage nucléaire de la protéine P53 dans un cas de glioblastome.....	87
Figure 28 : Marquage nucléaire de la protéine Ki67 dans un cas de glioblastome.	88
Figure 29 : Electrophorégramme d'un patient porteur d'un astrocytome pilocytique et présentant une insertion TAC au niveau du gène BRAF.	90
Figure 30 : Electrophorégramme d'un patient porteur d'un glioblastome et présentant la mutation majoritaire R132H au niveau du gène IDH1.	91
Figure 31 : Marquage cytoplasmique de l'anticorps anti-IDH1R132H.	92
Figure 32 : Electrophorégramme d'un patient porteur d'un glioblastome et présentant la mutation majoritaire R172H au niveau du gène IDH2.	92
Figure 33 : Résultats FISH d'un cas d'oligodendrogliome anaplasique présentant une co-délétion 1p/19q.....	94
Figure 34 : Résultats FISH d'un cas d'oligodendrogliome anaplasique présentant une amplification au niveau du gène <i>EGFR</i>	95
Figure 35 : Probabilité de survie globale des patients porteurs de glioblastomes en fonction du statut IDH1	96
Figure 36 : Probabilité de survie globale des patients porteurs de glioblastomes en fonction du statut d'amplification <i>EGFR</i>	97
Figure 37 : Probabilité de survie globale des patients porteurs de glioblastomes en fonction du statut d'amplification du gène <i>MDM2</i>	98
Figure 38 : Probabilité de survie globale des patients porteurs de glioblastomes en fonction du statut de l'indice de prolifération cellulaire Ki67.....	99

Liste alphabétique des abréviations

ADC	Coefficient de diffusion apparente
ADN	Acide désoxyribonucléique
AEC	Amino-Ethyl-Carbazole
AKT	nom d'un oncogène viral
ALA	Acide 5-aminolavulinique
Arg	Arginine
BCNU	Carmustine
BDT	Big Dye Terminator
BRAF	V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
CBTRUS	Registre des tumeurs cérébrales des Etats Unies (Cerebral Brain Tumor Registry of the United-States)
CCND2	Cycline D2
CCNU	Lomustine
CCNU	Lomustine
CDC25	Cycle de division cellulaire 25
CDKN2A	CDK inhibiteur 2A
CEP	Sonde témoin centromérique
Cho	Choline
CHU	Centre hospitalier universitaire
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
COBRA	Analyse combinée de Restriction Bisulfite
Cr	Créatine
Ct	Cycle seuil (Cycle Treshold)s
Cy3	Cyanine 3
D2HG	D-2-hydroxyglutarate
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
ddNTP	didésoxyribonucléotide
dNTP	désoxyribonucléotide
EGFR	Récepteur du facteur de croissance épidermique (Epidermal growth factor receptor)
EORTC	Organisation Européenne pour la recherché et le traitement du cancer (European Organization for Research and Treatment of Cancer)
FFPE	Tissus fixés au Formaline, inclus en paraffine
FISH	Hybridation in situ fluorescente
FITC	Fluoresceine isothiocyanate
FRET	Transfert d'énergie par résonance
GBM	Glioblastome
GTP	Guanosine triphosphate
Gy	Gray
HE	Hématoxyline-éosine
HES	Hématoxyline éosine safran
His	Histidine
HRM	Fusion à haute résolution (High Resolution Melt)
IRM	Imagerie par résonance magnétique
ISN	Société Internationale de Neuropathologie
KPS	Score de Performance Karnofsky
LCR	Liquide céphalorachidien

LOH	Perte d'hétérozygotie
LSI	Sonde locus spécifique
MDM	Murine double-minute
MGMT	O6-méthylguanine ADN méthyltransférase
MS-PCR	PCR à méthylation-spécifique
MTIC	5-(3-méthyl)-1-triazén-1-yl-imidazole-4-carboxamide
NAA	N-Acétyl-Aspartate
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NF1	Neurofibromatose
NOS	Non spécifié (Not otherwise specified)
Olig2	facteur de transcription d'Oligodendrocytes
OMS	Organisation mondiale de la santé
OS	Survie globale (overall survival)
PBS	Solution saline tamponnée au phosphate (Phosphate Buffered Saline)
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PCV	Procarbazine
PDGFRA	Récepteur alpha du facteur de croissance dérivé de plaquettes (Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha)
PDK1	Phosphoinositide- kinase dépendant 1
PFS	Survie sans progression (Progression Free Survival)
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-diphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PTEN	Phosphatase tensine homologue
qPCR	Réaction en chaîne par polymérase quantitative
RAS	Virus du sarcome de rat (Rat sarcoma virus)
RB	protéine Retinoblastome
RPA	Analyse récursive par répartition
RT	Radiothérapie
RTK	Récepteur à activité tyrosine kinase
SNC	Système nerveux central
SNP	Système nerveux périphérique
SSC	Saline-sodium citrate
TDM	Tomodensitométrie
TERT	Telomérase Reverse Transcriptase
TMZ	Témozolomide
TP53	protéine tumorale 53
UV	Ultra-violets
λ_{exc}	Onde d'excitation

Publications réalisées au cours de la thèse

- Nadia SENHAJI, Sara LOUATI, Laila CHBANI, Nawal HAMAS, Karima MIKOU, Mustapha MAAROUFI, Mohammed BENZAGMOUT, Said BOUJRAF, Sanae EL BARDAI, Marine GIRY, Yannick MARIE, Mohammed CHAOUI EL FAIZ, Karima MOKHTARI, Ahmed IDBAIH, Afaf AMARTI, Sanae BENNIS. **EGFR amplification and IDH mutations in glioblastoma's patients of the north east of Morocco.** (Article soumis).
- Senhaji N, Louati S, Chbani L, Bardai SE, Mikou K, Maaroufi M, Benzagmout M, Faiz MC, Marie Y, Mokhtari K, Idbah A, Amarti A, Bennis S. **Prevalence of IDH1/2 Mutations in Different Subtypes of Glioma in the North-East Population of Morocco.** Asian Pac J Cancer Prev. 2016; 17(5):2649-53.
- N Senhaji, S Louati, S El Bardai, K Mikou, S Bennis. **Principaux marqueurs histologiques et moléculaires des tumeurs gliales.** Annales de Pathologie. October 2015; 35 (5):469-470.
- Nadia SENHAJI, Kawthar MOUMNA, Sanae ELBARDAI, Karima MIKOU, Afaf AMARTI, Sanae BENNIS. **Marqueurs moléculaires et diagnostic des tumeurs gliales.** Journal de biologie médicale. Edition Avril-Juin 2015. JBM-RS-09-2014.
- SENHAJI N, LOUATI S, EL BARDAI S, MIKOU K, AMARTI A, BENNIS S. **Biomarqueurs émergents des gliomes malins.** Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique. May 2015; 63 (2):S80.
- S. Louati, L. Chban, N. Senhaji, J.K. Amran, S. Bennis. **Aspects pathologiques et moléculaires des sarcomes des tissus mous : à propos de 80 cas. Expérience du CHU Hassan II de Fès, Maroc.** Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique, Volume 63, Supplement 2, May 2015, Page S80.

Dédicaces

Tant de personnes ont rendu possible la concrétisation et l'achèvement de ce travail de thèse, qu'il m'est aujourd'hui difficile de n'en oublier aucune. Par conséquent, je m'excuse d'avance des oublis éventuels. Afin d'être reconnaissante envers ceux qui m'ont appuyé et encouragé à effectuer ce travail de recherche, je dédie ce mémoire :

A mes très chers parents M. Abderrahmane SENHAJI et Mme Meftaha BENKIRANE. Vous n'avez pas cessé de me soutenir et de m'encourager tout au long de ces années. Votre amour, vos sacrifices incessants, votre générosité incroyable et votre présence constante m'ont permis d'aller jusqu'au bout de ce travail et ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Merci d'avoir cru en moi même quand je n'y croyais plus. Vos prières ont été pour moi d'un grand soutien moral. J'espère que vous trouverez ici le témoignage de mon profond amour, ma gratitude, mon affection et mon grand respect. Puisse Dieu tout puissant vous protéger du mal et vous procurer une longue vie pleine de santé et de bonheur.

Je voudrais rendre hommage à la mémoire de feu mon beau-père M. Abderrazak BOUCHAALA. Je sais qu'il se serait réjoui de voir ce jour arriver. Vous avez été tout le temps fier de moi et de mes réalisations. Merci pour votre amour et pour votre tendresse. Que Dieu, le miséricordieux, puisse vous accorder la paix et vous accueillir dans son éternel paradis.

A la plus douce et la plus merveilleuse de toutes les belles-mères, Mme Samira ALAMI. Merci de m'avoir comblée de ton attention et de tes prières.

A mon très cher mari M. Mehdi BOUCHAALA. Aucune dédicace, aussi expressive qu'elle soit, ne saurait exprimer la profondeur des sentiments et l'estime que j'ai pour toi. Tu m'as toujours soutenu, compris et réconforté. J'ai trouvé en toi l'homme de ma vie, mon âme sœur et la lumière de mon chemin. Ta patience, ton soutien moral et matériel, ta gentillesse sans égale, ton profond attachement m'ont permis de réussir mes études. Que dieu réunisse nos chemins pour un long commun serein et que ce travail soit le témoignage de ma reconnaissance et de mon amour sincère et fidèle.

A mes deux petites joyaux Mohammed-Amine et Ayoub. Vous êtes la source de mon bonheur et de ma satisfaction. Merci d'avoir supporté les absences répétées de votre maman tout au long de ces années. Je vous aime énormément. Un grand merci également à notre adorable

nounou Fatima d'avoir su combler mon absence par son amour et sa grande affection envers les enfants.

A mon adorable nièce Maha. Ta joie de vivre et ton sourire ont été pour moi une source de réconfort et de bonheur. Que Dieu te garde et te protège.

A mes chers frères et sœurs : Asmae, Adil, Najwa, Siham, Lamiyae, Ghita, Kenza, Mohammed et la princesse Chaymae. Vous êtes mes anges gardiens et mes fidèles compagnons dans les moments les plus délicats. Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

A mon beau-frère M. Ahmed BOUCHAALA. Je t'exprime à travers ce travail mes sentiments de fraternité et je te souhaite un avenir plein de joie, de réussite et de sérénité.

A tous les membres de ma famille, petits et grands. Veuillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection.

A ma très chère Sara LOUATI. Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour t'exprimer l'affection et le respect que je te porte. Tu es devenue pour moi une sœur et une amie que j'ai gagnée et sur qui je peux continuellement compter. En témoignage de l'amitié qui nous uni et des souvenirs de tous les moments que nous avons passé ensemble, je te dédie ce travail et je te souhaite une vie pleine de succès et de bonheur. Tu le mérites très chère amie.

A tous les amis de l'unité de génétique médicale : Hanane, Fatima Zahra, Leila 1 et 2, Ihssane 1 et 2, Hasna, Imane 1 et 2, Meriem, Hajar, Said, Oussama et Mohammed. J'ai passé avec vous des moments inoubliables. Merci pour l'amour et la joie que vous m'avez fait ressentir.

Une pensée particulière au corps administratif et au corps enseignant du lycée qualifiant ATTOULOUI à El Hajeb et du lycée qualifiant 11 Janvier à AIN TAOUJTAT. Merci pour votre intérêt et vos encouragements.

Remerciements

A l'issue de la rédaction de cette thèse, je suis convaincue que ce travail doctoral n'aurait jamais pu être mené à terme sans le soutien et la bienveillance d'un grand nombre de personnes. Qu'ils trouvent ici, mes sentiments de gratitude et mes remerciements les plus sincères.

En premier lieu, je tiens à remercier grandement mon encadrante de thèse Pr. Sanae BENNIS, professeur à la faculté de médecine et de pharmacie de Fès, qui m'a accompagnée tout au long de ma formation. Sa grande disponibilité et sa certitude sans failles de la réussite et de l'aboutissement de ce travail ont été pour moi d'un grand secours, surtout durant les moments les plus difficiles. Aussi, j'ai été extrêmement sensible à ses qualités humaines d'écoute et de compréhension. Enfin, sa relecture méticuleuse de chacun des chapitres rédigés et ses différents conseils et corrections ont largement contribué à la valorisation de ce travail de thèse.

J'adresse de chaleureux remerciements à ma directrice de thèse Pr. Karima MIKOU, professeur à la faculté des sciences et techniques de Fès, pour m'avoir offert la possibilité d'effectuer cette thèse sous sa direction.

Mes remerciements vont également aux professeurs rapporteurs et examinateurs de cette thèse de m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury.

Je tiens à exprimer ma gratitude et mes profonds remerciements au Pr. Afaf AMARTI RIFFI, du grand intérêt qu'elle a porté à ce travail, de son aide incessante et de son soutien tout au long de ces années. Qu'elle trouve ici l'expression de ma reconnaissance la plus sincère.

J'adresse mes sincères remerciements au Pr. Laila CHBANI et au Pr. Nawal HAMMAS, professeurs à la faculté de médecine et de pharmacie de Fès et anatomopathologistes au CHU Hassan II de Fès, d'avoir consacré du temps pour la relecture des lames HE et l'étude immunohistochimique. Je vous remercie pour vos conseils et vos encouragements.

Un grand merci au Pr. Mustapha MAAROUFI, professeur à la faculté de médecine et de pharmacie de Fès et chef du service de radiologie au CHU Hassan II de Fès, pour sa collaboration et le temps consacré à l'analyse de l'ensemble des IRM incluses dans l'étude.

Je remercie également l'équipe de l'institut du cerveau et de la moelle (ICM) et l'équipe de l'hôpital Pitié-Salpêtrière de Paris de m'avoir accueilli à bras ouverts au sein de leurs établissements et de m'avoir permis de suivre le déroulement du travail dans la plateforme de biologie moléculaire à l'ICM et dans le service de neuropathologie à l'hôpital Pitié-Salpêtrière. Ce stage m'a été d'une grande aide dans mon parcours doctoral. Je tiens à remercier spécialement le Pr. Ahmed IDBAIH et le Pr. Karima MOKHTARI pour la bienveillance qu'ils ont manifestée à mon égard durant ce stage. Un grand merci également à M. Yannick MARIE qui m'a fait bénéficier de ses conseils et de son expérience et qui n'a pas hésité à répondre rapidement à tous nos mails et nos questions.

Je remercie chaleureusement et spécialement le personnel et les étudiants de l'unité de génétique médicale au CHU Hassan II de Fès sous la direction du Pr. Karim OULDIM, pour leur sympathie, leur amitié et leurs conseils. J'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec eux. Le cadre de travail était idéal.

Je remercie également le personnel du service d'anatomo-pathologie pour leur aide et l'accueil qu'ils m'ont réservé durant ce stage.

Enfin, mes remerciements s'adressent à toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin à arriver à ce jour mémorable.