



**Université Lille 2**  
**Droit et Santé**

UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE - LILLE 2  
**FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG**

**Année 2013**

**THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT  
DE DOCTEUR EN MEDECINE**

*La balance synthèse/dégradation de la Sphingosine-1-phosphate dans les gliomes.  
Intérêt pronostique de l'immunomarquage  
de l'enzyme oncogène Sphingosine kinase  
et de l'enzyme suppresseur de tumeur Sphingosine-1-phosphate lyase.*

**Présentée et soutenue publiquement le 11 avril 2013  
Par Marie-Pierre Jamet**

**Jury**

**Président :** Madame le Professeur Nicole PORCHET

**Assesseurs :** Monsieur le Professeur Sébastien AUBERT  
Monsieur le Docteur Marc BARONCINI  
Madame le Docteur Maryse DELEHEDDE

**Directeur de Thèse :** Monsieur le Professeur Claude-Alain MAURAGE

## TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS .....	1
LISTE DES ABREVIATIONS .....	4
<b>I. INTRODUCTION</b> .....	6
A. Epidémiologie.....	6
B. Classification de l’OMS des gliomes .....	6
C. Caractéristiques immunohistochimiques .....	9
D. Marqueurs moléculaires d’intérêt diagnostique et/ou pronostique.....	11
1. La codéletion 1p19q.....	11
2. Amplification du récepteur à l’EGFR.....	15
3. Gène IDH (Isocitrate deshydrogénase) .....	16
4. La méthylation de <i>MGMT</i> .....	17
5. Mutation TP53 et accumulation de P53.....	18
E. Classification histomoléculaire.....	19
1. Corrélations histomoléculaires.....	19
2. La gliomagénèse IDH-dépendante et IDH-indépendante .....	20
3. Epigénétique des gliomes .....	21
F. La voie sphingosine kinase 1/ sphingosine 1-phosphate.....	24
1. La sphingosine 1-phosphate.....	24
2. La sphingosine kinase (SPK) .....	26
3. La sphingosine-1-phospho lyase (SPL) .....	27
G. Endocan ou endothelial cell specific molecule-1 (ESM-1).....	29
H. Voies de traitement des gliomes .....	31
<b>II. BUT DE L’ETUDE</b> .....	32
<b>III. MATERIEL ET METHODES</b> .....	33
A. Patients.....	33
B. Recueil des données cliniques et paracliniques .....	33
C. Tissue multi array (TMA).....	34
D. Etude immunohistochimique .....	37
1. Technique.....	37
2. Interprétation des marquages immunohistochimiques.....	37
E. Etude par FISH .....	39
1. Technique.....	39

2.	Interprétation.....	41
F.	Analyses statistiques .....	43
1.	Recodage.....	43
2.	Analyses bivariées .....	44
3.	Test de corrélation statistique.....	44
4.	Analyse de la survie .....	44
5.	Analyse multivariée .....	44
<b>IV.</b>	<b>RESULTATS</b> .....	<b>45</b>
A.	Description de la population.....	45
1.	Paramètres clinico-pathologiques .....	45
2.	Données de survie en fonction du grade de l'OMS .....	46
3.	Paramètres moléculaires .....	46
B.	IDH1 .....	47
1.	Expression IHC de IDH1 .....	47
2.	Temps de survie en fonction de l'expression de IDH1 .....	47
C.	Sphingosine kinase-1 (SPK).....	49
1.	Intensité de l'expression IHC de la SPK.....	49
2.	Score global immunohistochimique de SPKinase 1 .....	51
3.	Test de corrélation statistique .....	53
4.	Temps de survie en fonction de l'expression de la SP Kinase .....	54
5.	Analyse multivariée .....	56
D.	Sphingosine-1-phospho Lyase.....	58
1.	Intensité de l'expression IHC de la SPL .....	58
2.	Score global immunohistochimique de SP Lyase.....	60
3.	Test de corrélation statistique .....	62
4.	Temps de survie en fonction de l'expression de la SPLyase .....	63
5.	Analyse multivariée .....	66
E.	Score mixte sphingosine kinase/lyase .....	66
F.	Endocan .....	67
1.	Expression en immunohistochimie .....	67
2.	Temps de survie .....	68
<b>V.</b>	<b>DISCUSSION</b> .....	<b>70</b>
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>79</b>
<b>VII.</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>80</b>

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

### FIGURES

Figure 1: Interactions protéiques et mutations impliquant les facteurs de transcription CIC et FUBP1.....	13
Figure 2: Réaction enzymatique de IDH sauvage et IDH muté.....	16
Figure 3: Hypothèse sur les principales voies de progression tumorale dans les gliomes.....	19
Figure 4: Graphique représentant les caractéristiques moléculaires, biologiques et cliniques des 6 sous-groupes de glioblastomes .....	23
Figure 5: Synthèse et dégradation de la sphingosine-1P.....	25
Figure 6: Métabolisme de la sphingosine 1-phosphate.....	25
Figure 7: Modèle de signalisation impliquant la sphingosine 1-phosphate au cours de l'hypoxie.....	25
Figure 8: Régulation épigénétique de l'expression de p21 et c-fos, par l'interaction de la S1P et de la Sphingosine kinase 2 avec l'histone H3 .....	26
Figure 9: Temps de survie globale et sans progression en fonction du grade de l'OMS .....	46
Figure 10: survie globale et sans récurrence des gliomes (tous grades) en fonction de l'expression de IDH1 .....	48
Figure 11: Graphique représentant la répartition des classes d'intensité IHC de la SPK en fonction du grade tumoral .....	49
Figure 12: Graphique représentant la répartition du score global de SPK en fonction du grade OMS .....	51
Figure 13: Graphique représentant les valeurs du score global de la SPK, en fonction des grades OMS.....	53
Figure 14: Graphique représentant les valeurs du score global de la SPK, en fonction de l'expression endothéliale d'Endocan .....	53
Figure 15: Temps de survie globale en fonction du % de cellules marquées par la SPK .....	54
Figure 16: Temps de survie globale en fonction du score global de la SPK.....	54
Figure 17: Temps de survie globale et sans récurrence en fonction de l'intensité de l'expression de SPK, et analyse par log-rank test.....	55
Figure 18: Temps de survie globale et sans progression en fonction de l'intensité de l'expression de SPK, en 2 groupes.....	55
Figure 19: Graphique représentant la répartition des classes d'intensité IHC de la SPL en fonction du grade.....	58
Figure 20: Graphique représentant la répartition de la classe du score global de SPL en fonction du grade tumoral.....	60

Figure 21: Graphique représentant les valeurs du score global de la SPL en fonction du grade OMS. Comparaison des moyennes par t test.....	62
Figure 22: Graphique représentant les valeurs du score global de la SPL en fonction de l'expression endothéliale d'Endocan. Comparaison des moyennes par t test. ....	62
Figure 23: Temps de survie globale et sans progression en fonction de l'intensité de l'expression de la SPL, et analyse par log-rank test. ....	64
Figure 24: Temps de survie globale en fonction du score global immunohistochimique de la SPL. ....	64
Figure 25: Survie globale et sans progression selon 2 sous-groupes du score global IHC de la SPL. ....	64
Figures 26: Temps de survies globale et sans progression en fonction du score mixte SPK/SPL.....	67
Figure 27: Expression endothéliale d'Endocan en fonction du grade OMS .....	68
Figure 28: Temps de survies globale et sans progression des gliomes en fonction de l'expression endothéliale d'Endocan.....	69
Figure 29: Temps de survies globale et sans progression des gliomes de grades III+IV en fonction de l'expression endothéliale d'Endocan.....	69

## TABLEAUX

Tableau 1. Caractéristiques et conditions d'utilisation des anticorps primaires pour l'étude immunohistochimique .....	37
Tableau 2: Caractéristiques cliniques et pathologiques des gliomes étudiés .....	45
Tableau 3: Temps de survie cumulé calculé par méthode de Kaplan-Meier dans la population étudiée. ....	46
Tableau 4: Résultats des recherches de codéletion 1p19q, par PCR et FISH .....	47
Tableau 5: Détection IHC de la mutation R132H de IDH1 dans les gliomes étudiés .....	47
Tableau 6: Temps de survie cumulé calculé par méthode de Kaplan-Meier et analysé par log-rank test en fonction de la présence ou non d'une détection IHC de la mutation du gène IDH1 .....	48
Tableau 7: Comparaison de l'intensité de l'expression de SPKinase, en fonction du type histologique, du grade OMS, des caractéristiques moléculaire et de l'expression d'endocan..	50
Tableau 8: Comparaison du score global de SPKinase, en fonction du type histologique, du grade OMS, des caractéristiques moléculaires, de la détection IHC et de l'expression endothéliale d'endocan. ....	52
Tableau 9 : Temps de survie cumulé calculé par méthode de Kaplan-Meier en fonction de l'intensité de l'expression de SPK. ....	55
Tableau 10 : Comparaison de l'intensité de l'expression de la SPL, en fonction du type histologique, du grade OMS, des caractéristiques moléculaires et de l'expression d'endocan. ....	59
Tableau 11: Comparaison du score global de SPL, en fonction du type histologique, du grade OMS, des caractéristiques moléculaires et de l'expression. ....	61
Tableau 12: temps de survie cumulé calculé par méthode de Kaplan-Meier et analysé par log-rank test, en fonction de l'expression endothéliale d'endocan. ....	69

## LISTE DES ABREVIATIONS

O: oligodendrogliome  
OA: oligoastrocytome  
GBM: glioblastome  
PEC: prolifération endothélio-capillaire  
S1P: Sphingosine-1 phosphate  
SPK: Sphingosine kinase  
SPL: Sphingosine-1-phospho lyase  
OMS: Organisation Mondiale de la Santé  
TMA: Tissue Multi Array  
Il: Interleukine  
FISH: Hybridation fluorescente in situ  
IHC: immunohistochimie  
FUBP1: Far UpStream Element [FUSE] Binding Protein 1  
MAPK: Mitogene Activated Protein Kinases  
ATXN: Ataxin  
CDKN2A: Cyclin Dependant Kinase Inhibitor 2A  
CNLOH: recurring Copy Neutral Losses Of Heterozygoty  
IN $\alpha$ : Internexine  $\alpha$   
EGFR: récepteur pour le facteur de croissance des épithéliums  
NADP: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate  
 $\alpha$ -KG:  $\alpha$ -Kétoglutarate  
2HG: 2-Hydroxyglutarate  
MGMT: O6-Méthylguanine-DNA Méthyl Transferase  
PTEN: Phosphatase and TENsin homolog  
IDH: Isocitrate deshydrogénase  
G-CIMP: Glioma-CpG Island Methylation Phentype  
RTK: Receptor Tyrosine Kinase  
HIF 1 $\alpha$ : Hypoxia Inducible Factor 1 $\alpha$

Q-PCR: PCR quantitative

INF $\gamma$ : interferon  $\gamma$

ICAM: Intercellular Adhésion Molécule

LFA: Lymphocyte Function-Associates Antigen 1

HGF/SF: Hépatocyte Growth Factor/Scatter Factor

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

PCR: Polymerase Chain Reaction

mTOR: mammalian Target Of Rapamycine



## I. INTRODUCTION

### A. Epidémiologie

Les gliomes sont les tumeurs primitives du système nerveux central les plus fréquentes chez l'adulte. Leur incidence en France est de 7 à 8 cas/100000 habitants, avec 4000 nouveaux cas par an, selon le registre de Montpellier des tumeurs du système nerveux central (1).

L'augmentation apparente de leur incidence dans les pays industrialisés pourrait résulter du vieillissement de la population mais aussi des progrès de l'imagerie en résonance magnétique (2,3). Le risque de survenue est plus élevé dans les rares syndromes de prédisposition familiale : syndrome de Li-Fraumeni, syndrome de Turcot, neurofibromatoses de type 1 et 2. Les radiations ionisantes à dose thérapeutique sont un facteur de risque extrinsèque reconnu (3,4).

### B. Classification de l'OMS des gliomes

Le mauvais pronostic des gliomes est en partie lié à leur réponse inégale au traitement, qui associe radiothérapie et chimiothérapie (Stupp). L'inégalité de réponse au traitement pourrait en partie tenir à des difficultés de diagnostic histopathologique. La décision thérapeutique repose grandement sur le type histopathologique de la tumeur. La classification des gliomes de l'OMS, mise à jour en 2007 associe le **type cellulaire** prédominant, c'est-à-dire le type de cellule normale dont la morphologie est la plus proche de celle des cellules tumorales et le degré d'atypies cytonucléaires associé à un **grade histopronostique** I (guérison habituelle si l'exérèse est complète) à IV (médiane de survie de 11 à 16 mois) (4,5,6). Les tumeurs associées au pire pronostic (glioblastome et gliome mixte avec nécrose) sont les plus fréquentes (65%).

Le **phénotype cellulaire** (oligodendrocyte, astrocyte, ou de type mixte) est défini selon des critères morphologiques. Une cellule de type oligodendrogial a un noyau rond et un halo clair péri nucléaire correspondant à un artefact de rétraction, donnant un aspect global en « nid d'abeille » à la tumeur. Une cellule de type astrocytaire a un cytoplasme plus abondant, fibrillaire ou gemistocytaire. L'organisation des vaisseaux contribue également à la classification, avec des vaisseaux typiquement arciformes dans les tumeurs oligodendrogiales, ainsi que la présence de microcalcifications fréquentes dans ces dernières.

Les critères du **grade histopronostique de l'OMS** combinent le nombre de mitoses pour 10 champs successifs au grossissement x40, les **atypies cytonucléaires**, la **nécrose**, et les signes de **prolifération endothelio-capillaire**.

La reproductibilité inter observateur est incomplète (7–9). Cette classification est basée sur une simple coloration HES, et il n'est pas toujours possible de distinguer les cellules tumorales des cellules du parenchyme infiltré, un gliome ne suscitant pas de stroma-réaction. Ces aspects morphologiques sont toujours à confronter aux données de l'imagerie, pour estimer la représentativité de l'échantillon prélevé, et ne pas sous évaluer le grade d'une tumeur, par exemple lors de prélèvements biopsiques n'analysant qu'une partie de la tumeur (6). Le diagnostic est porté bien souvent uniquement sur une biopsie stéréotaxique pas toujours représentative, le neurochirurgien étant limité dans son geste par le risque de séquelle neurologique (la morbidité de la biopsie cérébrale est particulièrement importante par rapport aux autres biopsies).

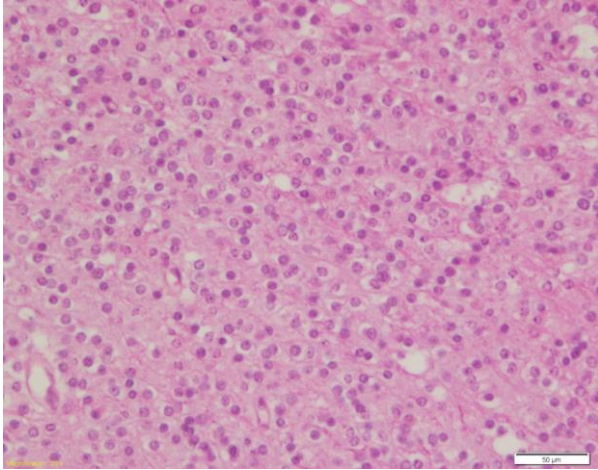


photo 2: Oligodendrogliome de grade II. Artefact de rétraction péri nucléaire.

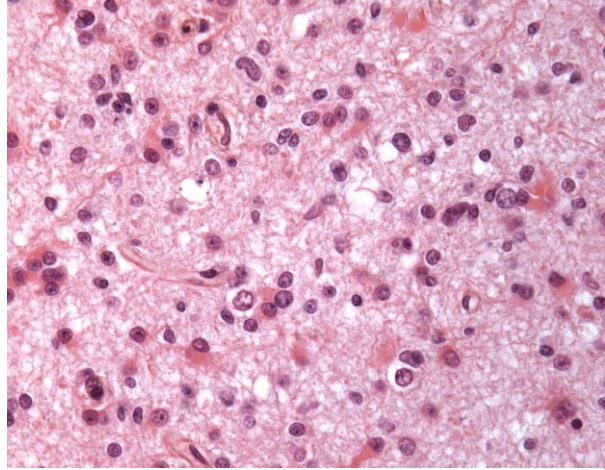


photo 1: Oligodendrogliome de grade II (OII). Mingemistocytes réactionnels.

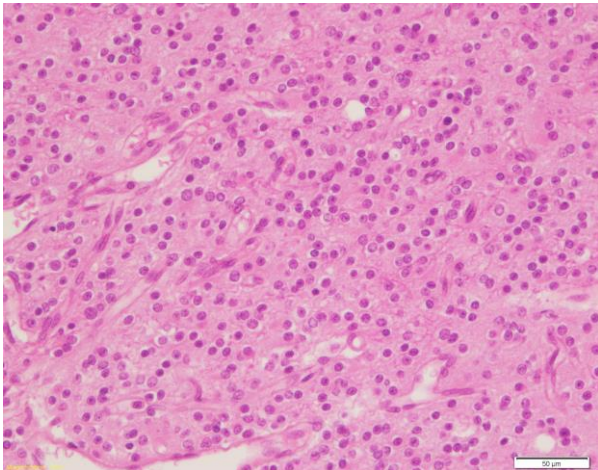


photo 3: O II. Vascularisation arciforme.

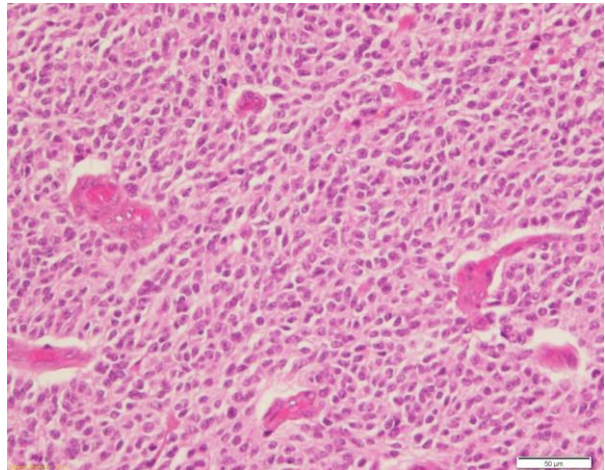


photo 4: Oligodendrogliome de grade III. Densité cellulaire élevée. Hypertrophie endothéliale.

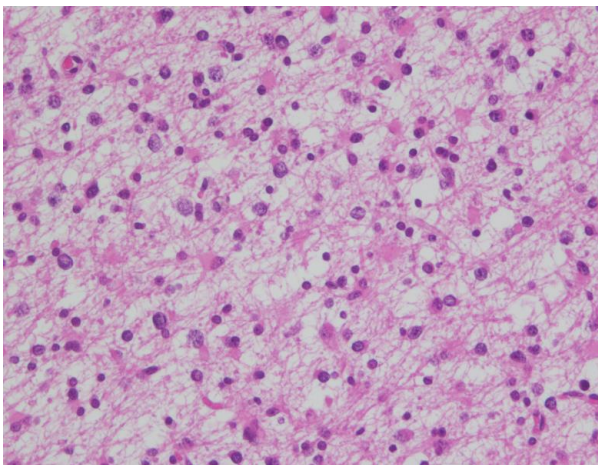


photo 6: Oligoastrocytome de grade II. Cellule au cytoplasme abondant, fibrillaire, gemistocytique.

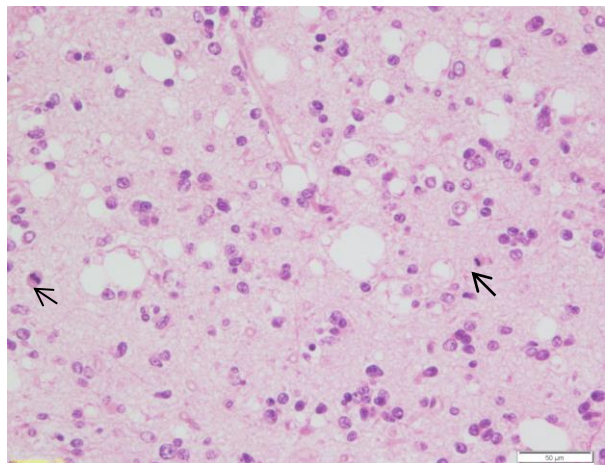


photo 5: Oligoastrocytome de grade III. Atypies cytonucléaires et mitoses (fléchées).

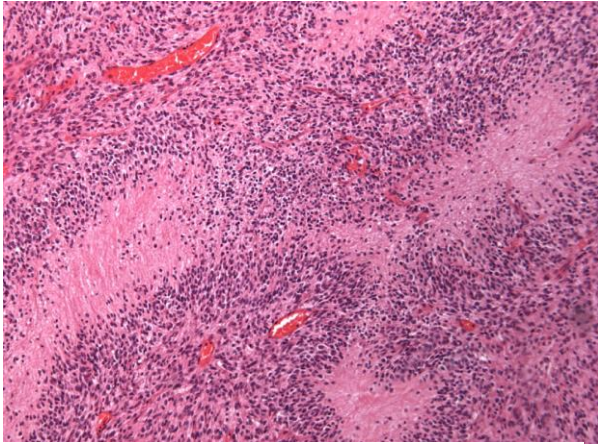


photo 8: Glioblastome (GBM). Nécrose palissadique.

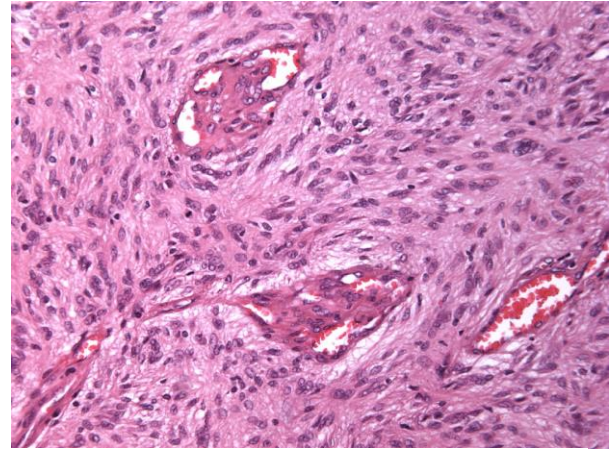


photo 7: GBM. Prolifération endothélio-capillaire.

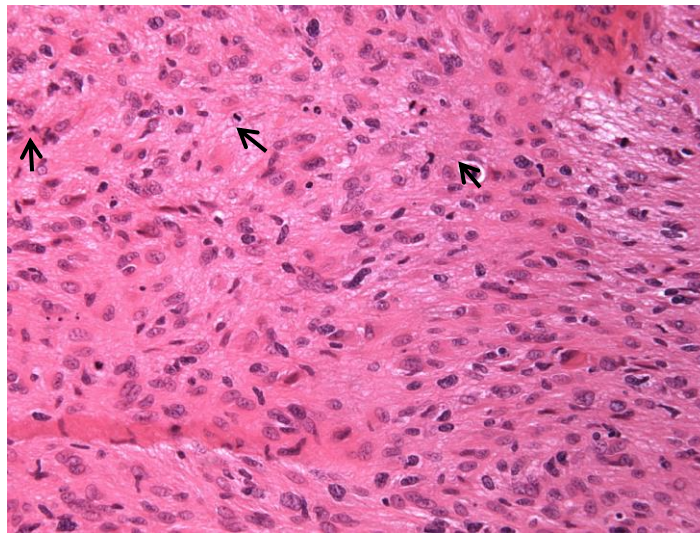


photo 9: GBM. Atypies et mitoses (fléchées)

### C. Caractéristiques immunohistochimiques

Afin de déterminer le type de cellule gliale tumorale prédominant, l'étude immunohistochimique est utile, sans être toujours discriminante (10).

- La **GFAP** (glial fibrillary acidic protein) est une protéine du cytosquelette exprimée par les cellules astrocytaires. Le marquage est cytoplasmique, sous forme d'un maillage dans les tumeurs astrocytaires. Le marquage plus focal, en mosaïque, dans les glioblastomes.

Cependant, dans les tumeurs oligodendrogiales, sont fréquemment marqués une faible

proportion d'oligodendrocytes et des minigemistocytes, qui sont probablement des astrocytes non tumoraux.

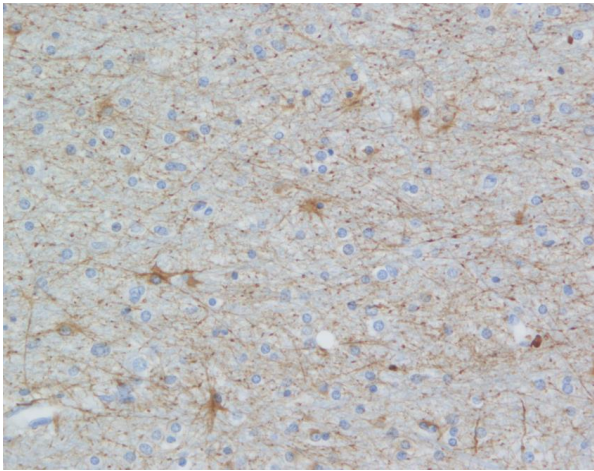


photo 10: GFAP. Oligodendrogliome de grade III

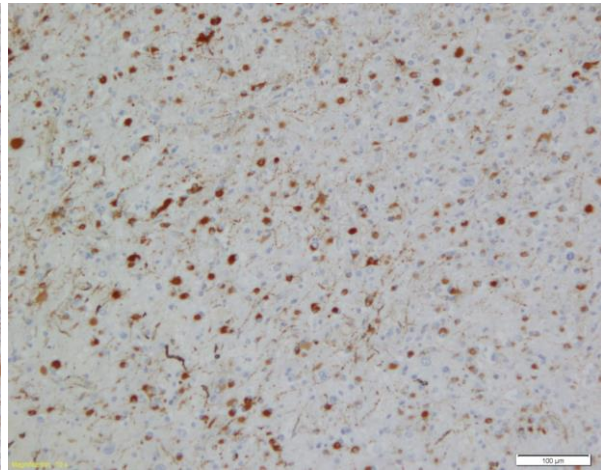


photo 11: GFAP. Oligoastrocytome de grade III

- **Olig 2** est un facteur de transcription détecté dans les cellules de souche gliale, tumorales ou non tumorales. En immunohistochimie, le marquage nucléaire est faible et inconstant sur les cellules oligodendrogiales normales, plus intense sur les cellules oligodendrogiales tumorales. Les oligodendrogliomes de grade II sont souvent moins marqués que les oligodendrogliomes de grade III.

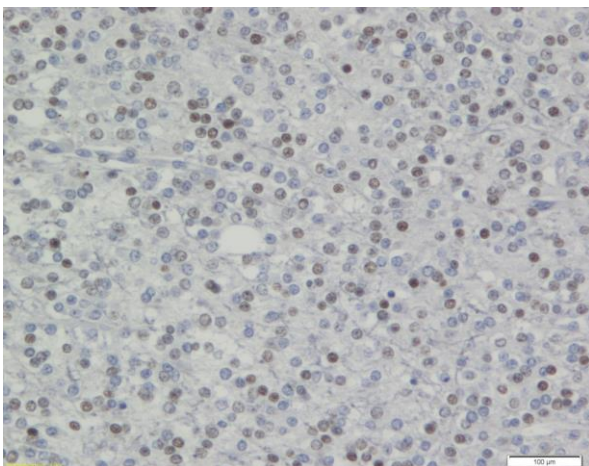


photo 12: Olig 2. Oligodendrogliome grade II

Les anticorps dirigés contre la GFAP et Olig 2 ne sont donc pas totalement discriminants pour différencier une tumeur oligodendrogliale d'une tumeur astrocytaire, mais sont en revanche indicatifs d'un lignage glial.

Les différences d'interprétation morphologique sont la base de la reproductibilité inter-observateur imparfaite. Les Biologistes Moléculaires apportent aux Neuro-oncologues de nouveaux marqueurs objectifs, reproductibles et moins empiriques, afin de proposer aux patients un traitement plus ciblé.

## **D. Marqueurs moléculaires d'intérêt diagnostique et/ou pronostique**

Un marqueur a une valeur **pronostique** si, recherchée au moment du diagnostic chirurgical, sa présence est corrélée à la survie, en l'absence de traitement adjuvant. Un marqueur est **prédicatif** si sa présence est associée à une réponse à un traitement adjuvant (11).

### **1. La codélétion 1p19q**

La codélétion 1p19q résulte d'une translocation déséquilibrée. Elle se distingue d'une perte partielle du 1p et/ou 19q. Les régions délétées se situent en 1p34-1p36 et 19q13.3.

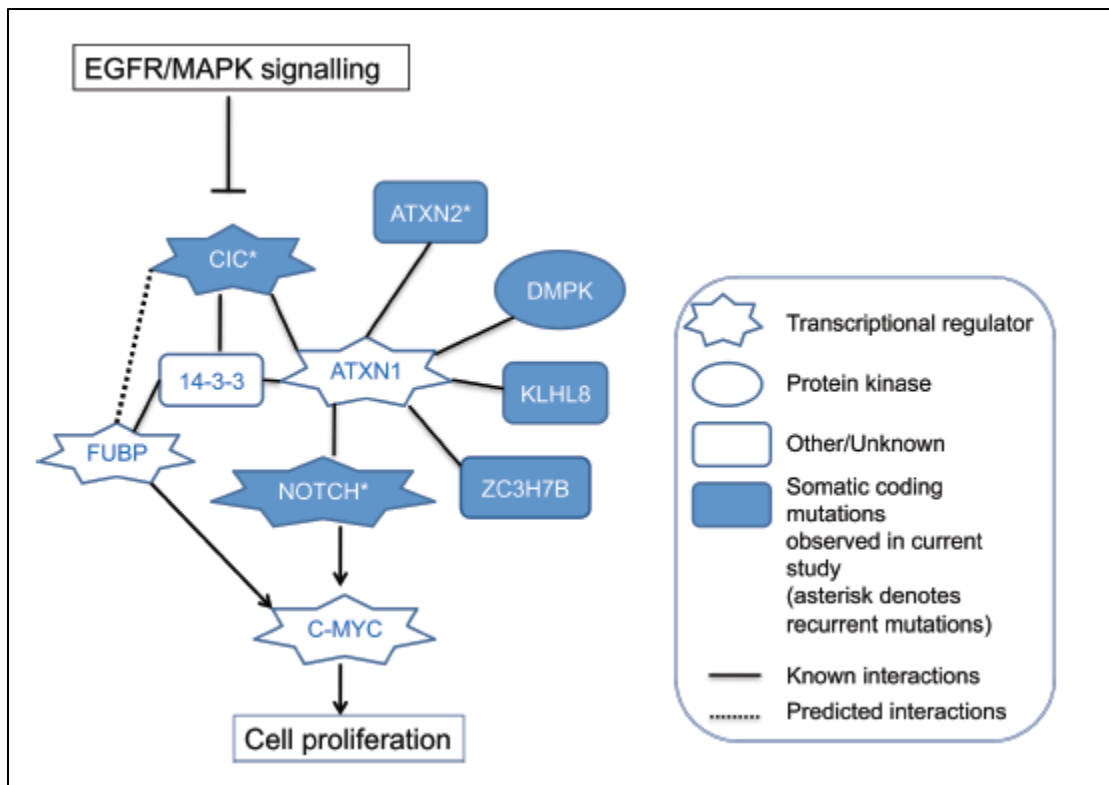
La codélétion 1p19q est un **marqueur diagnostique** des oligodendrogliomes, souvent décisif lorsqu'un doute existe du point de vue histopathologique. Elle concerne 60% des oligodendrogliomes de grade III, 80% des oligodendrogliomes de grade II, et 20 à 50% des oligoastrocytomes de grade II et III (12).

La codélétion de 1p19q est associée à un **meilleur pronostic** en valeur intrinsèque, indépendant du traitement, pour les oligodendrogliomes (13–15). Elle est un **marqueur indépendant prédictif de meilleure réponse à la chimiothérapie** par PCV (procarbazine-

lomustine-vincristine) ou temozolomide pour les oligodendrogliomes de grade III, rapporté dans des études rétrospective (11,13,14), et prospectives de phase II (5,6).

Les données concernant le rôle pronostique de la codélétion dans les gliomes de bas grade sont plus controversées. Des auteurs y associent un pronostic plus favorable et une meilleure réponse à la chimiothérapie (14,16,17), d'autres ne rapportent aucune différence pronostique chez des patients uniquement traités par chirurgie (18).

La codélétion résulte d'une translocation (1;19)(p10;q10), dont l'identification et la fonction des gènes touchés ne sont pas encore bien connus. Récemment, deux gènes ont été associés à la codélétion 1p19q : *CIC* (homologue du gène *capicua* de la drosophile), situé sur le 19q et *FUBP1*, codant la protéine de liaison à FUSE (Far UpStream Element [FUSE] Binding Protein 1), situé sur le 1p (19–22). *CIC* est impliqué dans l'embryogénèse chez la drosophile en réprimant la voie RAS/MAPK (RAS mitogene activated protein kinases). Chez l'Homme, *CIC* est exprimé dans le cervelet normal et à niveau élevé dans les médulloblastomes. Des mutations ou insertions/délétions toucheraient le gène de *CIC* situé en 19q13.2 dans les oligodendrogliomes. Des mutations de *FUBP-1* ont été rapportées dans les oligodendrogliomes et les oligoastrocytomes, associés à la mutation de *CIC* (21,22). La protéine traduite du gène *FUBP-1* muté est inactive, ce qui annulerait la régulation négative du proto-oncogène MYC. Les connaissances actuelles sur les interactions des protéines codées par *CIC* et *FUBP-1* sont représentées sur la figure 1.



Yip 2012

**Figure 1: Interactions protéiques impliquant les facteurs de transcription CIC et FUBP1, et mutations.** ATXN1=Ataxin-1 ATXN2=Ataxin-2 (dont le gène est muté dans certains gliomes) DMPK=dystrophia myotonica-protein kinase KLHL8= Kelch-like protéin 8 NOTCH=protéine impliquée dans le développement neuronal. CIC interagit avec ATXN1, qui régule la voie de signalisation impliquant NOTCH. ATXN1 est modulé par ATXN2. Interaction entre CIC et FUBP1 reste à préciser.

La codélétion de 1p19q est systématiquement recherchée devant toute tumeur à contingent oligodendrogial. La méthode de référence est l'analyse génomique. Elle se fait par PCR et analyse de marqueurs microsatellites et comparaison entre les profils de l'ADN tumoral (bloc de tissu tumoral inclus en paraffine) et de l'ADN constitutionnel (leucocytes du patient). La recherche de codélétion peut également être faite par technique d'hybridation fluorescente in situ (FISH), à partir de coupes de tissu tumoral inclus en paraffine. Des études ont montré une bonne corrélation des résultats entre ces 2 techniques (12). Elles sont complémentaires : la FISH permet d'explorer des prélèvements infiltrés d'une population tumorale de faible densité, alors que la recherche d'une perte d'hétérozygotie exige un contingent de cellules tumorales supérieur à 50% de l'ensemble des cellules dans la tumeur. L'hybridation génomique comparative (CGH array) se substitue à la recherche de perte d'hétérozygotie dans certaines équipes.



Les altérations 1p et 19q sont éventuellement indépendantes. Par exemple, la perte partielle de 1p, sans perte associée de 19q est associée à un mauvais pronostic pour les tumeurs astrocytaires et, pour certains auteurs, à un bon pronostic pour les oligodendrogliomes de grade III (23).

Des gènes situés en dehors des régions délétées en 1p et 19q sont potentiellement impliqués en cas de codélétion. Il existe une association inverse entre la codélétion de 1p19q et les anomalies génomiques des astrocytes : mutation P53 (situé en 17p13.1), délétion 10q et amplification EGFR (7p12.1). Les mutations de TP 53 et la codélétion de 1p19q représentent deux altérations moléculaires mutuellement exclusives dans les gliomes de grade II (24). Dans les études publiées, une mutation/substitution de IDH1 et IDH2 est toujours observée en cas de codélétion 1p19q (25).

Pour un autre gène-clef de la régulation cellulaire,  $p16^{\text{INK4A}}$  (ou *CDKN2A*, situé en 9p21), fréquemment délété dans le glioblastome, des anomalies sont mises en évidence dans les oligodendrogliomes anaplasiques codélétés 1p19q, conduisant dans 1/3 des cas à une répression du gène (recurring copy neutral losses of heterozygosity / CNLOH) (19).

La protéine Internexine alpha ( $\text{IN}\alpha$ ) est un filament intermédiaire exprimé dans les neurones, dont le gène est localisé en 10q24.33.  $\text{IN}\alpha$  est exprimé par un nombre varié de cellules tumorales, dans les oligodendrogliomes présentant une codélétion 1p19q. Sa détection en immunohistochimique est prédictive d'une codélétion 1p19q (10). L'expression n'est pas large, mais focale, dans des groupes de cellules isolés les uns des autres. La prédictivité de cette méthode est donc moins bonne lorsque le diagnostic est porté sur une biopsie et non une pièce d'exérèse.

L'analyse génomique reste la méthode de référence pour déterminer le statut 1p19q.

## 2. Amplification du récepteur à l'EGFR

Le récepteur pour le facteur de croissance des épithéliums (EGFR), également appelé ErbB1 fait partie de la famille des ErbB, qui comporte 4 membres (ErbB1, ErbB2, ErbB3 et ErbB4) ayant des caractéristiques communes : ce sont des récepteurs dont le domaine extracellulaire comporte deux régions riches en cystéine, et un domaine cytoplasmique comportant de multiples résidus Tyrosine, qui sont phosphorylés lorsqu'un ligand active le récepteur et entraîne la dimérisation de deux sous monomères ErB (26). Ceci entraîne une cascade de signalisation intracellulaire et la transcription de gènes participant à la division cellulaire, à la migration, à l'invasion, à la survie ou à l'apoptose. L'amplification du gène du récepteur à l'EGFR a une **valeur diagnostique** : l'amplification est fréquente dans les **glioblastomes de novo** (environ 40%), peu fréquente dans les gliomes mixtes anaplasiques et les oligodendrogliomes (26). Sa valeur pronostique serait péjorative dans les glioblastomes par rapport aux glioblastomes ne présentant pas l'amplification de EGFR, particulièrement chez les patients jeunes (27,28).

L'amplification du gène *EGFR* est associée à l'apparition de formes tronquées constitutivement actives entraînant une amplification génique lorsque le domaine intracellulaire conserve son activité tyrosine kinase (isoforme EGFR1 et mutant vIII).

**L'étude immunohistochimique**, avec un anticorps dirigé contre le domaine intracellulaire du récepteur permet de mettre en évidence une surexpression, prédictive de l'amplification (29,30). Avec l'utilisation d'un anticorps dirigé contre le domaine extracellulaire, c'est l'absence ou la faible expression qui est associée à une absence d'amplification du gène.

Les traitements ciblant l'EGFR sont les anticorps monoclonaux (cetuximab, Erbitux®), les inhibiteurs de tyrosine kinase (gefitinib), ou autres stratégies immunothérapeutiques comme le vaccin ciblant EGFR vIII, dont des études cliniques récentes ont montré des résultats

décevants. Le traitement par inhibiteur des tyrosines kinase, le gefitinib (Iressa®) et erlotinib (Tarceva®), est peu efficace. L'utilisation de cetuximab montre une réponse partielle qui n'est cependant pas corrélée à l'amplification de l'EGFR (26).

### 3. Gène IDH (Isocitrate deshydrogénase)

Le gène *IDH*, dont il existe deux isoformes, *IDH1* et *IDH2*, code pour une enzyme dépendante du NADP<sup>+</sup>, catalysant la décarboxylation de l'isocitrate en alpha-kétoglutarate, et source principale de NADPH, nécessaire à la régénération du glutathion réduit. Ces produits protègent la cellule contre le stress oxydant.

La mutation du gène *IDH1*, le plus souvent rencontrée dans les gliomes, est une substitution impliquant le codon 132. Celle touchant l'isoforme *IDH2* touche le codon R172. Ces mutations impliquent la portion du gène codant le site catalytique de l'enzyme, entraînant une accumulation d'un métabolite, le 2-hydroxyglutarate [figure 2]. Le codon R140 de *IDH2*, habituellement muté dans les leucémies myéloïde, ne l'est pas dans les gliomes (31).

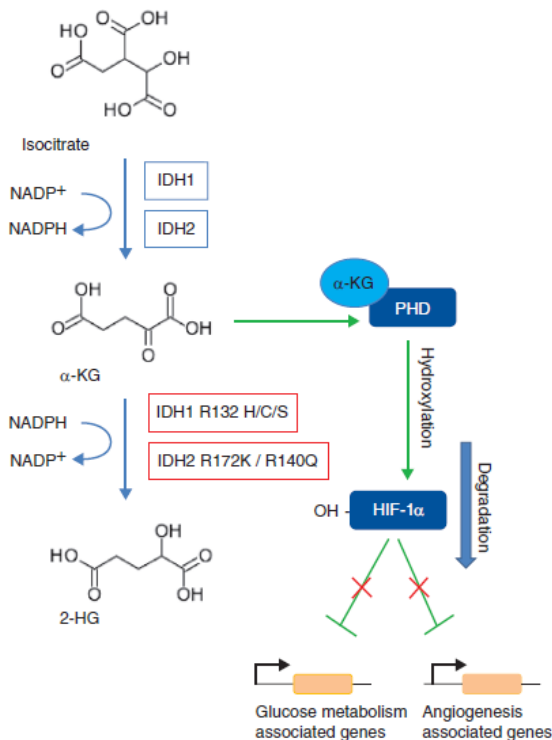


Figure 2: Réaction enzymatique de IDH sauvage et IDH muté (mutation R132 H de *IDH1* et R172 de *IDH2*). *Mardis, 2010*

$\alpha$ -Kétoglutarate ( $\alpha$ -KG) est le produit de la décarboxylation de l'isocitrate favorisée par IDH.

$\alpha$ -KG promeut la dégradation de HIF1- $\alpha$ .

2-hydroxyglutarate (2HG) est le produit de la dégradation de  $\alpha$ -KG par IDH muté.

Les mutations/substitutions des gènes *IDH* concernent les gliomes de grade II et III de tout type histologique (astrocytome, oligodendrogliome, oligoastrocytome), les glioblastomes secondaires, et les glioblastomes du sujet jeune, dont on ne sait pas toujours s'ils sont secondaires ou de novo (11). C'est un événement survenant précocement dans la gliomagenèse. Elle est inversement associée au grade (77% grade II, 55% grade III et 6% grade IV secondaire), elle est un **marqueur pronostique indépendant** en analyse multivariée après ajustement du grade, de l'âge, de la méthylation du promoteur du gène codant la O6-méthylguanine-DNA méthyl transférase (*MGMT*) et du traitement (24,32–34).

La mutation/substitution de *IDH* est étroitement associée à la codélétion de 1p19q, à une mutation de *P53* et à l'hyperméthylation de *MGMT* (32,34). Substitution de *IDH1* ou *IDH2* et amplification de *EGFR* et/ou délétion du chromosome 10 sont mutuellement exclusives (34).

Les patients chez qui aucune mutation *IDH1/IDH2* n'est mise en évidence ont un profil différent : patients plus âgés, tumeur touchant souvent l'insula, de plus grande taille, sans codélétion de 1p19q ni mutation de *P53* (32).

#### 4. La méthylation de *MGMT*

La *MGMT* (O6-méthylguanine-DNA méthyl transférase) est une enzyme impliquée dans la réparation de l'ADN après action des agents alkylants. La méthylation du promoteur est responsable d'une inactivation (*epigenetic silencing*) de l'enzyme et donc d'une augmentation de la sensibilité à la chimiothérapie par agents alkylants (temozolomide et/ou nitrosourée).

La méthylation du promoteur de *MGMT* est recherchée par techniques moléculaires, dont il existe plusieurs techniques : le pyroséquençage, la PCR méthylation spécifique, high – resolution melting (HRM), COBRA (bisulfite PCR followed by restriction analysis). Elle est retrouvée dans **40%** des **glioblastomes primaires** (11). La mise en évidence par

immunohistochimie de l'enzyme *MGMT* n'est pas validée comme moyen indirect de détection de l'expression du gène *MGMT* (35).

La méthylation de *MGMT* constitue un **marqueur prédictif** de réponse à la chimiothérapie : les patients atteints d'un glioblastome et présentant une méthylation de *MGMT* ont une survie plus longue sous radio et chimiothérapie versus radiothérapie seule (36,37). La méthylation de *MGMT* aurait également une valeur prédictive positive de réponse aux agents alkylants dans les gliomes de grade II (38). Concernant les oligodendrogliomes anaplasiques, elle aurait une valeur pronostique indépendante du traitement, et peut être aussi prédictive de réponse à la chimiothérapie (36,39,40).

## 5. Mutation TP53 et accumulation de P53

Le gène codant P53 est localisé en 17p13.1. La mutation du gène suppresseur de tumeur *TP53* la plus fréquente dans les gliomes (60% des mutations) est une transition G:C→A:T localisée sur les codons 248 et 273 du gène (41,42). Tandis que le facteur de transcription P53 normal a une durée de vie très courte, la protéine résultant d'une mutation de P53 est inactive, stable, et s'accumule dans le noyau. C'est cette accumulation intra-nucléaire qui est potentiellement détectée par immunohistochimie avec de bonnes sensibilité et spécificité. L'immunomarquage est considéré positif lorsqu'au moins 10% des cellules tumorales présentent un marquage nucléaire intense (10). Ce résultat est retrouvé dans environ 60% des astrocytomes de grade II et III, dans certains oligoastrocytomes, dans plus de 70% des glioblastomes secondaires, et 30% des glioblastomes de novo (11,43).

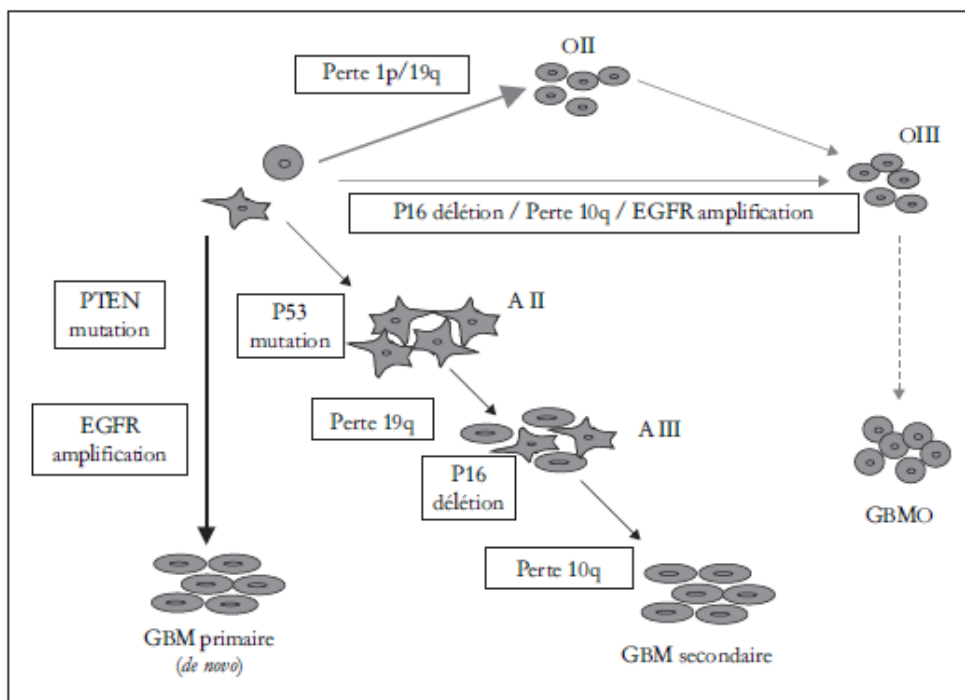
La mutation de *TP53* est une aide diagnostique pour différencier une tumeur oligodendrogliale d'une tumeur astrocytaire. La valeur pronostique de la mutation de *TP53* serait péjorative pour les gliomes de grade II, par rapport à ceux portant la codélétion 1p19q (44).

## E. Classification histomoléculaire

### 1. Corrélations histomoléculaires

Astrocytomes et glioblastomes: deux voies de tumorigénèse sont admises, l'une associant amplification d'*EGFR* au glioblastome de novo, l'autre associant mutation *p53* au glioblastome secondaire, provenant de la transformation anaplasique d'un astrocytome (45). La mutation de *PTEN* (Phosphatase and TENsin homolog) est fréquemment retrouvée dans le groupe des glioblastomes de novo [figure 3].

Oligodendrogliomes : trois voies de tumorigénèse distinctes sont admises : 1) une codélétion de 1p19q ; 2) l'association d'une amplification de *EGFR*, d'une perte du chromosome 10 et d'une délétion homozygote de *P16/CDKN2A* ; 3) l'association des deux (amplification *EGFR*, perte du chromosome 10, délétion *P16/CDKN2A* et délétion intéressant 1p et/ou 19q) en particulier dans les glioblastomes à composante oligodendrogliale [figure 3].



Hoang-Xuan. 2005

Figure 3: Hypothèse sur les principales voies de progression tumorale dans les gliomes. A=astrocytome. O=oligodendrogliomes. GBM=glioblastome. GBMO: glioblastome à composante oligodendrogliale. D'après Khé Hoang-Xuan, bull cancer vol.92

Tous ces éléments constituent aux voies de gliomagenèse « classique ». La description récente des mutations *IDH* a profondément changé la perception de la valeur pronostique de la classification de l’OMS et des modèles reconnus de gliomagenèse, un gliome de haut grade muté *IDH* s’avérant parfois de meilleur pronostic qu’un gliome de bas grade non muté *IDH* (24,32).

## 2. La gliomagenèse IDH-dépendante et IDH-indépendante

### *Gliomagenèse IDH-dépendante :*

90% des gliomes infiltrants de grade II présentent une mutation des gènes IDH. On distingue :

- Les gliomes *IDH* mutés, sans mutation *TP53* ni codélétion 1p19q (*IDH*+/*P53*-/1p19q-)
- Les gliomes *IDH* mutés associés à une expression de *P53* (*IDH*+ /*P53*+/1p19q-). Ils sont de phénotype astrocytaire.
- Les gliomes *IDH* mutés associés à une codélétion 1p19q (*IDH*+/*P53*-/1p19q+). Ils sont de phénotype oligodendrogial.

### *La gliomagenèse IDH-indépendante*

- Les gliomes de grade II « triples négatifs » (*IDH*-/*P53*-/1p19q-). Ils sont de pronostic plus péjoratif, atteignent des patients plus âgés (32).
- Les glioblastomes de novo. Ils proviendraient de cellules souches neurales, et présentent des altérations génétiques complexes : amplification de *EGFR*, délétion de *PTEN* et *CDKN2*, altérations de *NF1*, amplification *PDGFR alpha* et mutations *TP53* (46,47).
- Les gliomatoses primitives (grade III de l’OMS).

Or, les mutations d'*IDH1/IDH2* sont associées à des modifications épigénétiques en induisant un phénotype « méthylateur » (48).

### 3. Epigénétique des gliomes

La méthylation de l'ADN est un phénomène épigénétique fréquent dans les cancers. L'hyperméthylation d'îlots CpG des promoteurs de gènes entraîne une répression de la transcription du gène associé. Dans les glioblastomes secondaires, la fréquence de l'hyperméthylation des promoteurs de gènes est plus élevée que dans les glioblastomes *de novo*. Ce profil hyperméthylé est également retrouvé dans des gliomes de grades II et III : ce sont les glioma-CpG island methylation phenotype (G-CIMP). Ce sous-type de gliome est fréquemment associé à la présence d'une mutation *IDH1* (49).

Les histones sont des protéines constituant les nucléosomes, autour desquels s'enroulent les bruns d'ADN. Il en existe 4 types : H2A, H2B, H3, H4. Les histones sont le site de modifications post translationnelles, comme l'acétylation, la méthylation et la phosphorylation. L'acétylation des résidus lysine des histones entraîne une activation de la transcription des gènes. Selon le résidu méthylé, la transcription est soit activée, soit réprimée. La méthylation des résidus lysine est régulée par des enzymes : l'histone lysine méthyl transférase et l'histone lysine deméthylase.

Il existerait une association entre hyperméthylation de l'histone H3 et la mutation du gène *IDH1* dans les gliomes. L' $\alpha$ -kétoglutarate ( $\alpha$ KG), métabolite de la réaction catalysée par IDH1 non muté, et le 2-hydroxy glutarate (2HG), métabolite de la réaction catalysée par IDH1 muté, interviennent dans la régulation de la méthylation. Tandis que l' $\alpha$ KG est un cofacteur de la deméthylation, le 2HG l'inhibe (50). Les G-CIMP (gliomes présentant un grand nombre de loci hyperméthylés) sont étroitement associés à la présence de la mutation *IDH* et à une hyperméthylation des histones H3.



Inversement, dans les glioblastomes caractérisés par une amplification de *EGFR*, la pyruvate kinase M2 (PKM2) phosphoryle le résidu thréonine de l'histone H3, entraînant une acétylation de l'histone et la transcription des gènes de la cycline D1 et *c-Myc* (50).

Dans les astrocytomes de haut grade (incluant les glioblastomes) de l'enfant et de l'adulte jeune, ont récemment été identifiées 2 mutations somatiques du gène *H3F3A* codant pour l'histone H3.3 (K27M et G34R), survenant dans 35 % des tumeurs supratentorielles, et mutuellement exclusives avec la mutation du gène de *IDH* (51). La mutation *K27M* est plus particulièrement rapportée dans les gliomes du tronc cérébral (71%) et dans les glioblastomes thalamiques de l'enfant (80%). La mutation *G34V* est fréquemment retrouvée dans les gliomes de haut grade hémisphérique, chez l'adolescent et l'adulte jeune.

La mutation de *ATRX* est spécifique des tumeurs astrocytaires, et est plus fréquemment présente chez des enfants âgés présentant des gliomes thalamiques ou chez des adultes jeunes présentant des astrocytomes de grades II et III, associés à une mutation de *IDH* et de *TP53*.

A partir de ces données, six sous-groupes de glioblastomes ont récemment été identifiés en fonction des caractéristiques épigénétiques et génétiques (profil de méthylation, mutations, gain ou perte chromosomique), immunohistochimiques (olig2 et FOXG1, produit d'un gène du développement neuronal) épidémiologiques (âge), cliniques (localisation des tumeurs) et pronostiques (52). Cette classification intègre la dénomination de sous-groupes précédemment décrits parmi les glioblastomes (sous type proneuronal, mésoenchymateux, classique ou mixte) et se complète du profil des anomalies touchant les gènes *IDH1*, *PDGFRA*, *EGFR*, et *NF1* (53). Les 6 sous-groupes de glioblastomes sont [figure 4] :

- Les glioblastomes de l'adulte jeune associés à la mutation IDH1
- Les glioblastomes des jeunes enfants associés à la mutation K27 de l'histone H3F3A
- Les glioblastomes de l'adolescent associés à la mutation G34 de l'histone H3F3A

- Les glioblastomes de l'enfant et l'adulte, receptor tyrosine kinase I (RTK I) : cluster hyperméthylé associé à une amplification de PDGFRA
- Les glioblastomes de type mésenchymateux (peu de gain ou perte chromosomique, pas de mutation caractéristique, un cluster hyperméthylé, ressemblant au profil du tissu cérébral non tumoral)
- Les glioblastomes RTK II touchant les adultes + âgés (amplification de EGFR).

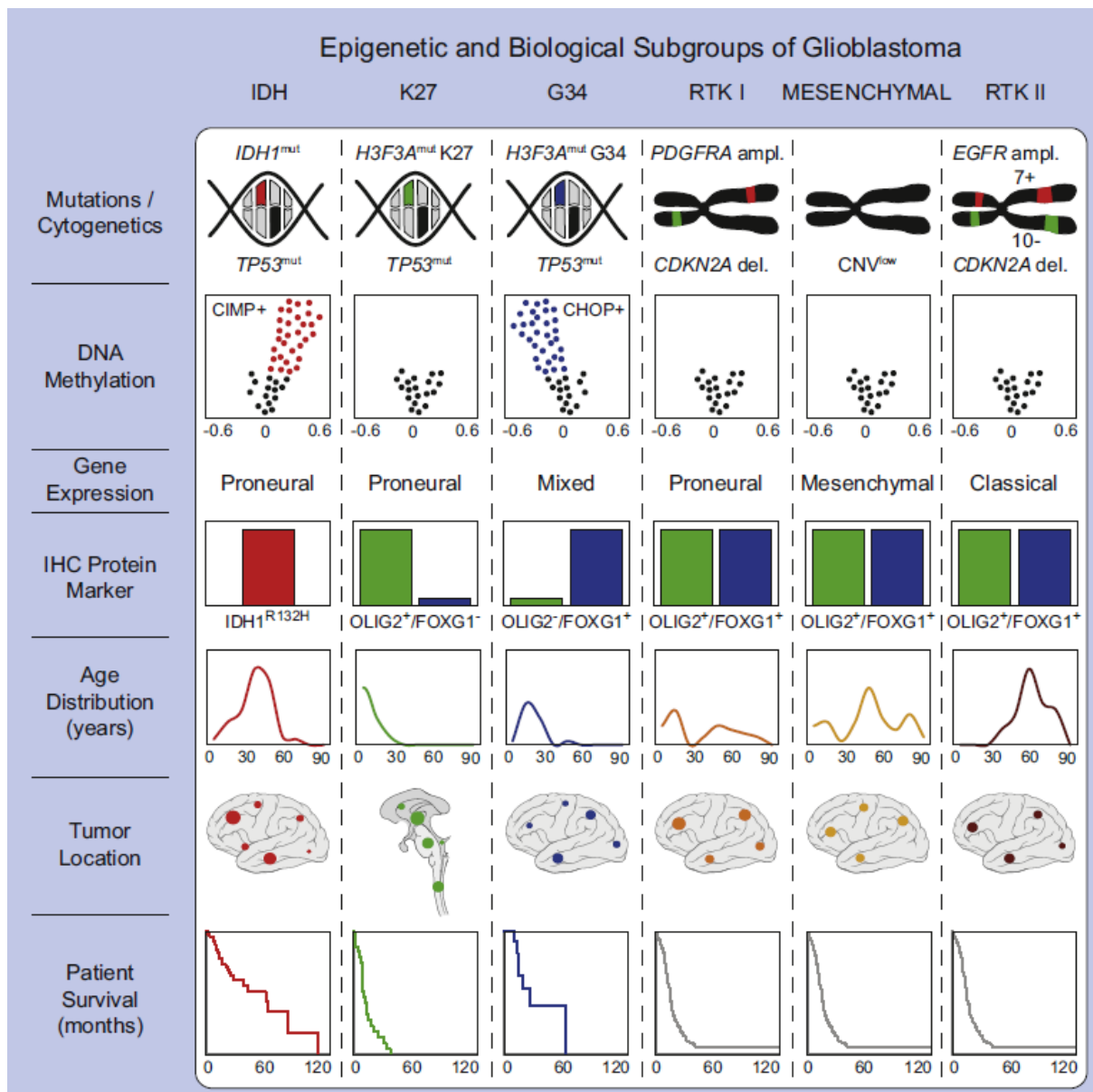


Figure 4: Graphique représentant les caractéristiques moléculaires, biologiques et cliniques des 6 sous-groupes de glioblastomes, Sturm et al. (52)

## F. La voie sphingosine kinase 1/ sphingosine 1-phosphate

### 1. La sphingosine 1-phosphate

**La Sphingosine 1-phosphate (S1P)** est un lipide bioactif, qui régule des fonctions biologiques telles que la prolifération, la survie, l'invasion et l'angiogénèse (54). Sa concentration sanguine et tissulaire est finement régulée, et ses variations sont associées à plusieurs maladies. Elle est un messager intracellulaire (croissance cellulaire et suppression de l'apoptose), et elle se lie à des récepteurs couplés aux protéines G, dont 5 variants ont été identifiés : S1P1 à S1P5. Ces récepteurs activent des voies de signalisation, incluant la voie des mitogen-activated protein kinases (MAPK), et de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), impliquées dans la prolifération cellulaire, l'invasion et la néoangiogénèse (55) [figure 6 et 7]. Elle aurait un effet paracrine sur les cellules endothéliales et un rôle pro-mitotique et prolifératif pour les cellules musculaires lisses, les fibroblastes et les cellules endothéliales (56,57). Elle serait pro-angiogénique : dans les cellules endothéliales, S1P serait un activateur de hypoxia inducible factor (HIF 1 alpha), facteur de transcription impliqué dans l'angiogénèse et principal facteur de réponse à l'hypoxie [figure 7] (58).

Les taux de sphingosine 1P sont régulés par 2 enzymes [figure 5]; la première synthétise ce lipide bioactif (la sphingosine kinase), et la deuxième le dégrade de façon définitive (sphingosine-1-phospho lyase).

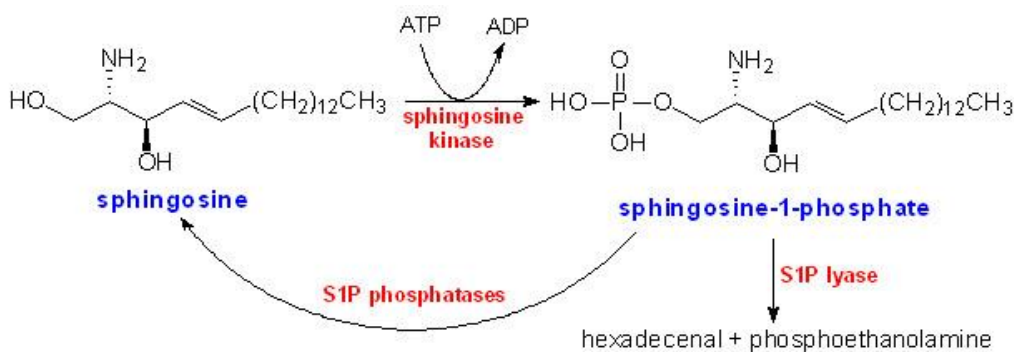


Figure 5: Synthèse et dégradation de la sphingosine-1P.

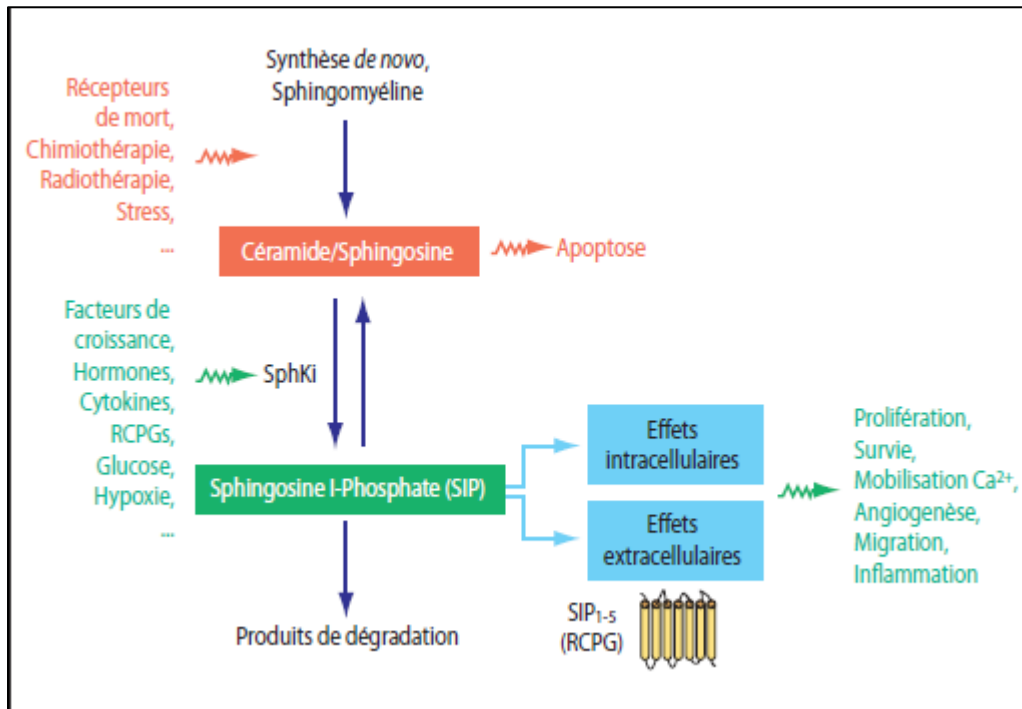


Figure 6: Métabolisme de la sphingosine 1-phosphate.

Cuvillier, 2012.

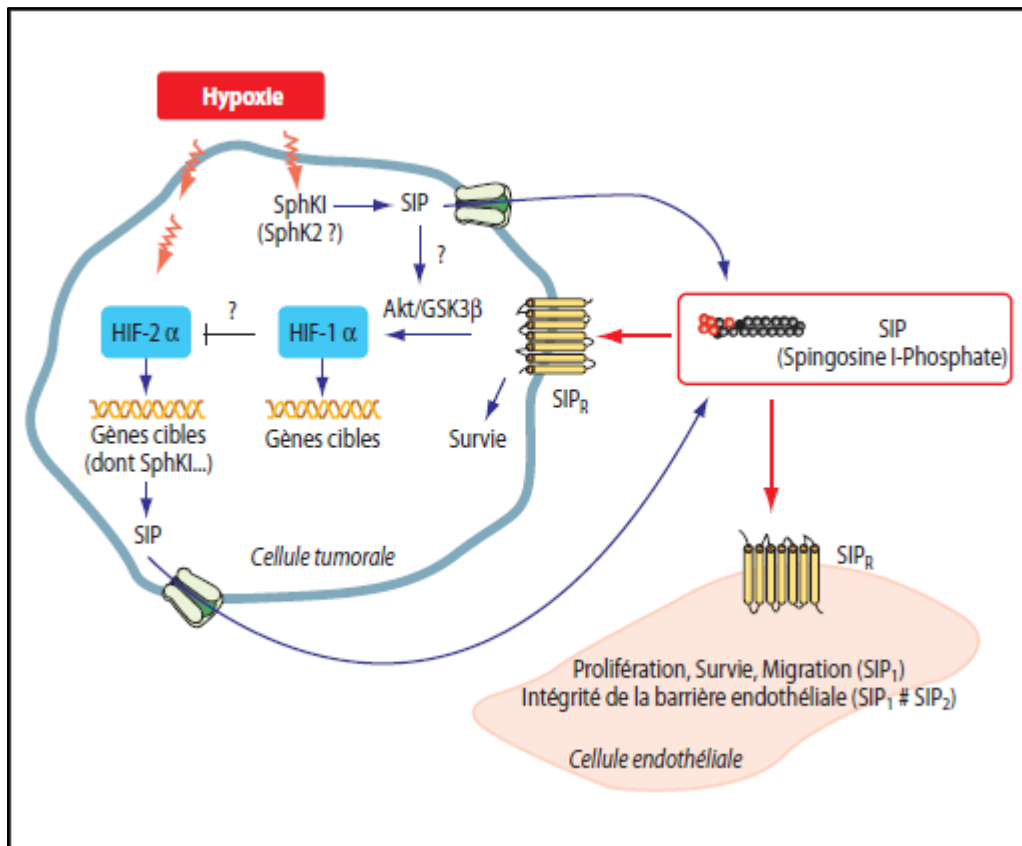


Figure 7: Modèle de signalisation impliquant la sphingosine 1-phosphate au cours de l'hypoxie. Cuvillier, 2012

La voie sphingosine 1 P est impliquée dans des mécanismes de régulation épigénétique (59). Une des fonctions intracellulaires de la S1P est de se lier à l'histone déacetylase et de l'inhiber. La sphingosine kinase 2 se lie au complexe répresseur de l'histone 3A, favorise l'acétylation de H3 pour permettre la transcription des gènes associés : les gènes codant la cyclin dépendant kinase inhibiteur p21 et le facteur de transcription c-fos [figure 8].

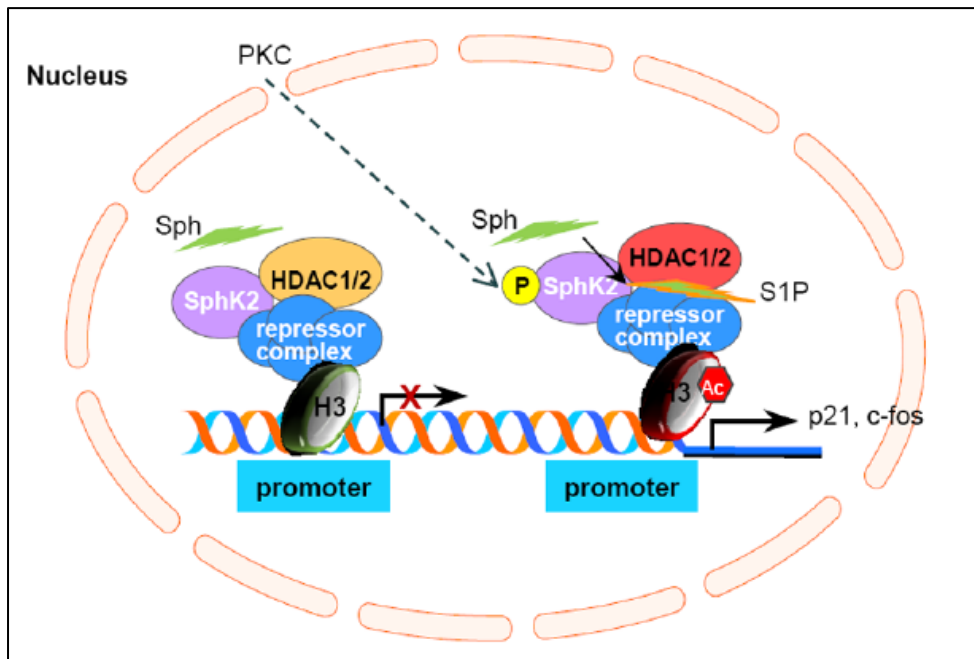


Figure 8: Régulation épigénétique de l'expression de p21 et c-fos, par l'interaction de la S1P et de la Sph kinase 2 avec l'histone H3. Patwardhan 2012 (60).

## 2. La sphingosine kinase (SPK)

L'expression sphingosine kinase est régulée par de nombreux agents, en particulier les facteurs de croissance ligands de Tyrosine kinase et le TNF alpha. La SPK est exprimée à l'état normal, et révélée en immunohistochimie, dans différents tissus humains (rein, cerveau), dans les cellules endothéliales et les plaquettes (61). Le gène codant pour la sphingosine kinase est situé sur le chromosome 17.

La SPK est une « **lipide kinase oncogénique** », impliquée dans la croissance tumorale, l'adaptation à l'hypoxie, et l'angiogénèse. Sa surexpression a été démontrée pour la première fois par RT-PCR dans des échantillons tissulaires provenant de cancers du sein, du colon, du

poumon, de l'ovaire, de l'estomac, de l'utérus, du rein et du rectum, comparé au tissu normal adjacent (62). De nombreux auteurs ont confirmé cette surexpression, par RT-PCR et/ou par technique immunohistochimique, dans des adénomes coliques, adénocarcinomes de la prostate, du colon, de l'ovaire, dans la leucémie erythroblastique et les gliomes (54,61,63–65). Elle serait associée à un mauvais pronostic dans les adénocarcinomes du sein et de l'estomac (54,66). Dans les adénocarcinomes prostatiques il existe une corrélation entre augmentation de l'activité enzymatique de la SPK, intensité du marquage immunohistochimique de la SPK et grade tumoral de Gleason (67).

Dans les glioblastomes humains, l'augmentation de l'expression de la SPK détectée par RT-PCR est associée à une survie plus courte des patients (63). Dans une gamme plus large de tumeurs astrocytaires de grade I à IV l'augmentation de l'expression de la SPK est associée au grade OMS tumoral et à une survie plus courte. En analyse multivariée, la surexpression de SPK est un **facteur indépendant de survie** (54).

### 3. La sphingosine-1-phospho lyase (SPL)

La S1P est dégradée de façon irréversible par la **Sphingosine-1-phospho lyase (SPL)**. Le gène codant pour cette enzyme est localisé sur le locus 10q22.1. La SPL est exprimée à l'état normal dans de nombreux tissus : intestin, colon, thymus, rate, foie, rein, poumons, estomac, testicule, et à un moindre niveau le cœur, le muscle squelettique et le cerveau (55). Elle est exprimée par les cellules inflammatoires, mais pas par les globules rouges ni les plaquettes (2). Son niveau d'expression est élevé dans les tissus ayant un taux de renouvellement cellulaire élevé. La SPL induit l'apoptose, en réponse à un stress ou une lésion de l'ADN, par des voies dépendantes de MAPK (p38 mitogene-activated protein kinases) et P53 (68). *In vitro*, dans un modèle utilisant des cellules humaines d'adénocarcinome prostatique, la répression du gène SPL induit une résistance à la radiothérapie ou chimiothérapie (69). La SPL serait donc impliquée dans la réponse cellulaire à une lésion de l'ADN, et aurait un rôle

« suppresseur de tumeur » (68).

Très peu d'auteurs se sont intéressés à l'expression immunohistochimique de la SPL dans les échantillons tumoraux humains. L'expression de la SPL a été étudiée dans un modèle murin de tumorigénèse intestinale (*Min* mouse), par immunohistochimie, western blot et enzymologie (68). Une forte expression cytoplasmique de la SPL est observée dans la muqueuse intestinale normale, mais pas dans les adénomes intestinaux induits par la mutation. L'activité enzymatique de la SPL est plus faible dans les adénomes intestinaux que dans le tissu intestinal normal. Sept adénocarcinomes coliques humains ont été étudiés : l'expression de la SPL était inférieure à celle observée dans les tissus normaux, en immunohistochimie et PCR quantitative (Q-PCR). Ces résultats suggèrent que la perte partielle ou totale de fonction de la SPL participerait à la carcinogénèse intestinale (68).

Dans des échantillons d'adénocarcinomes prostatiques humains (69), une perte d'expression de la SPL et une diminution de son activité enzymatique sont significativement associés à un grade tumoral élevé (score de Gleason  $\geq 4+3$ ). Le niveau d'expression de SPL, est inversement corrélé à celui de la SPK. Enfin, la perte d'expression de la SPL et la surexpression de SPK sont des facteurs prédictifs indépendants d'agressivité tumorale.

Des traitements ciblant la voie de la S1P sont en cours d'évaluation(62,70–74).

La L-Threo-Dihydrosphingosine (safingol), initialement décrite comme un inhibiteur de la protéine kinase C, serait un inhibiteur compétitif de la SPK (75). Le Safingol potentialiserait l'effet de la chimiothérapie. Sur un modèle in vitro de cellules de glioblastomes en culture, la présence d'un inhibiteur de la S1P bloquerait la prolifération des cellules tumorale en réponse à l'hypoxie (76), induirait leur apoptose et inhiberait leur migration et leur invasion (77).

Un anticorps anti-SIP a montré une efficacité chez les souris chez qui les implants tumoraux ont été greffés, provoquant l'apoptose des cellules tumorales et inhibant l'angiogenèse tumorale induite par la présence de VEGF et de FGF (72).

L'immunosupresseur FTY720 aurait également un effet inhibiteur de l'activité enzymatique de la SPK (73,74) et pourrait être utile dans le traitement du mélanome malin (71).

Une molécule stimulant l'expression de la SPL, combinée à un traitement inhibiteur de la SPK pourrait être une bonne stratégie pour diminuer les taux de Sphingosine 1-phosphate, et sensibiliser les cellules tumorales à l'association de radio et chimiothérapie (69).

### **G. Endocan ou endothelial cell specific molecule-1 (ESM-1)**

Endocan est un proteoglycane constitué d'un polypeptide de 165 acides aminés et d'une seule chaîne de glycosaminoglycane de type dermatan sulfate, lui permettant d'être soluble et d'être présent dans la circulation sanguine (78,79). L'expression de ESM-1 a été initialement isolé de cellules endothéliales (80). L'ARNm d'endocan a été détecté dans des cellules endothéliales en culture provenant de divers tissus non tumoraux (poumon, rein, tissu sous cutané et adipeux), mais pas dans celles provenant de tissu cérébral ou cardiaque (80–82).

#### *Régulation de l'expression d'Endocan.*

Sa synthèse par les cellules endothéliales est stimulée par des cytokines, des molécules pro-inflammatoires comme le tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), l'interleukine-1 (IL1), ou des molécules pro-angiogéniques comme le fibroblaste growth factor-2 (FGF-2), le vascular endothelial growth factor (VEGF), ou le transforming growth factor- $\beta$ 2 (TGF- $\beta$ 2) (78,80,81). L'induction de l'expression d'Endocan médiée par VEGF passerait par les voies de signalisation PKC/NFKB (protein kinase C- nuclear factor Kappa B) et PI3K/AKT/FKHRL1 (phosphatidylinositol 3-kinase-Ak-forkhead transcription factor foxo1).



### *Fonction d'Endocan :*

Les protéoglycanes sont habituellement présents en surface des cellules ou dans la matrice extracellulaire, où elles interagissent avec les composants de la matrice extracellulaire, des récepteurs membranaires, des facteurs de croissance ou des cytokines. Elles peuvent aussi être sécrétées sous forme soluble, pour intervenir dans des phénomènes inflammatoires, infectieux, ou dans la progression tumorale, comme c'est le cas pour Endocan (78,83).

La région N-terminale riche en résidus cystéine, compte un domaine EGF-like. L'unique chaîne dermatan sulfate d'endocan, est particulièrement courte et riche en disaccharides non sulfatés. Elle se lie à de nombreuses molécules et protéines de la matrice extracellulaire.

Endocan exerce un rôle durant l'inflammation, d'une part, par liaison de cytokines (TNF $\alpha$ , IL1, interféron  $\gamma$  (INF $\gamma$ )) à la chaîne dermatan sulfate, d'autre part par liaison d'ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molécule) et d'une intégrine (LFA-1, Lymphocyte Function Associated antigen 1) à la partie protéique d'Endocan. En inhibant l'adhésion de LFA-1 à ICAM 1, endocan empêche l'adhésion des leucocytes à l'endothélium et leur transmigration (78). Des taux élevés d'Endocan circulant ont été observés chez des patients atteints de sepsis sévère ou de cancer (84).

*In vitro*, la chaîne DS d'Endocan se lie à l'Hépatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF), produit par les fibroblastes et cellules musculaires des parois vasculaires, et potentialise son activité. HGF active le récepteur c-Met, jouant un rôle dans la progression tumorale (85,86). Endocan potentialise l'activité de VEGF(87).

### *Endocan et cancer.*

Endocan est exprimé à des niveaux élevés dans différents types de cancer *in vitro* et *in vivo* (carcinome du sein, du rein, de l'utérus, du rectum, du poumon, adénomes hypophysaires et

glioblastomes (81,84,88–94). Les mécanismes impliqués sont en cours de démantèlement et convergent vers l'angiogénèse, en particulier la voie de l'hypoxie et de VEGF (81,95). Dans les glioblastomes, Endocan est exprimé non seulement par les vaisseaux, mais également par les cellules tumorales elles-mêmes, dans les zones d'hypoxie où la sécrétion de HIF-1, de VEGF et d'IL-8 sont importantes (94,98).

En comparant les niveaux d'expression d'endocan dans des tumeurs issues de patients, il est apparu que survie et niveau d'expression d'endocan sont inversement corrélés (89,96,97). L'expression IHC d'Endocan au niveau de vaisseaux du front d'invasion tumoral dans les glioblastomes est un facteur pronostique péjoratif, par rapport aux tumeurs ne présentant pas ce marquage (94).

L'ensemble de ces données suggère qu'Endocan est non seulement un marqueur de néoangiogénèse, mais aussi d'agressivité tumorale. Des dosages sériques d'endocan ou une étude immunohistochimique, réalisables en routine, pourraient permettre de sélectionner des patients pouvant répondre à une thérapie ciblée, tel qu'un anticorps monoclonal ou des thérapeutiques anti-angiogéniques dirigées contre VEGF (91,98–105).

Des essais cliniques de traitement de glioblastomes avec l'anticorps anti-VEGF, le bevacizumab (Avastin®) sont en cours (en association avec le protocole Stupp par exemple). L'association du bevacizumab et de l'irinotécan (Campto®) montre des résultats encourageants pour certains malades.

## **H. Voies de traitement des gliomes**

Le traitement des patients atteints de gliomes est chirurgical, si l'état clinique, le volume et la localisation tumorale le permettent. Une exérèse est considérée subtotale lorsque le résidu tumoral postopératoire est inférieur à 1,5cm<sup>3</sup>. Un traitement complémentaire par

radiothérapie est recommandé pour les glioblastomes, et les gliomes anaplasiques. Une chimiothérapie par un agent alkylant, le témozolomide (Temodal®), est administrée de façon concomitante à la radiothérapie selon le protocole STUPP, suivi de 6 cures mensuelles pour le traitement des glioblastomes (37). Pour le traitement des gliomes de haut grade, une chimiothérapie adjuvante par PCV (procarbazine-lomustine CCNU-vincristine) ou témozolomide améliore la survie sans progression, mais pas la survie globale (37).

De nouvelles cibles thérapeutiques font l'objet d'essais cliniques (106).

## **II. BUT DE L'ETUDE**

Afin de contribuer à faire émerger de nouveaux biomarqueurs dans la prise en charge des patients atteints de gliome, nous nous sommes centrés sur la balance de régulation de synthèse de la SIP. Nous avons choisi d'étudier par immunohistochimie sur tissu multi array l'expression de l'enzyme « oncogène » (SPK), et de l'enzyme « suppresseur de tumeur » (SPL). Nous nous sommes donné pour but de rechercher une association significative entre l'expression de ces deux enzymes et l'évolution de patients atteints de gliome de grade II à IV, pour lesquels la survie était connue. La valeur pronostique de plusieurs outils étant déjà établie dans ce domaine, nous avons comparé l'expression immunohistochimique de la SPK et de la SPL à la présence, en fonction du grade et du type histopathologique, d'une codélétion 1p19q, d'une mutation IDH1 R132H, d'une hyperméthylation de MGMT et de l'expression d'Endocan.

### **III. MATERIEL ET METHODES**

#### **A. Patients**

Une première partie des patients ont préalablement été inclus dans le PHR « CD133 », coordonné par le Pr Blond et le Dr Baroncini, pour lequel le comité de protection des personnes a émis un avis favorable. Ces patients ont bénéficié d'une exérèse partielle ou complète d'un gliomes entre mars 2005 et octobre 2009, dans le pôle de neurochirurgie du CHRU de Lille. Ces 91 patients étaient atteints d'un oligodendrogliome de grade II (n=21), d'un oligodendrogliome de grade III (n=13), d'un oligoastrocytome de grade II (n=10), d'un oligoastrocytomes de grade III (n=17), ou d'un glioblastome (n=30).

Trente autres patients inclus dans notre étude ont été opérés d'un glioblastome entre octobre 2010 et juin 2011. L'identification de ces patients a été effectuée avec le logiciel DIAMIC® en utilisant la codification ADICAP (code organe NH sélectionnant les hémisphères cérébraux, code lésion N7X0 sélectionnant les glioblastomes), les glioblastomes secondaires étant exclus. Les échantillons de tous ces patients avaient été traités par la Tumorothèque régionale Nord Pas de Calais en accord avec la réglementation en vigueur (Charte des Tumorothèques, institut nationale du cancer, novembre 2006).

#### **B. Recueil des données cliniques et paracliniques**

Pour chacun des patients, nous avons recueilli les informations suivantes en consultant les dossiers médicaux en ligne (logiciel Sillage) et/ou en interrogeant les médecins traitants :

- âge au moment du diagnostic (date opératoire)
- qualité de l'exérèse

- type de traitement complémentaire (radiochimiothérapie de type Stupp, autre)
- date de récurrence ou de progression tumorale sur les IRM de surveillance
- date des dernières nouvelles ou de décès.

La plupart des tumeurs ont fait l'objet d'une étude moléculaire, réalisée à l'institut de biologie moléculaire (génétique des cancers, Pr PORCHET), au moment du diagnostic, dont les résultats ont été recueillis :

- présence ou non d'une codéletion 1p19q
- présence ou non d'une hyperméthylation du promoteur du gène MGMT

### **C. Tissue multi array (TMA)**

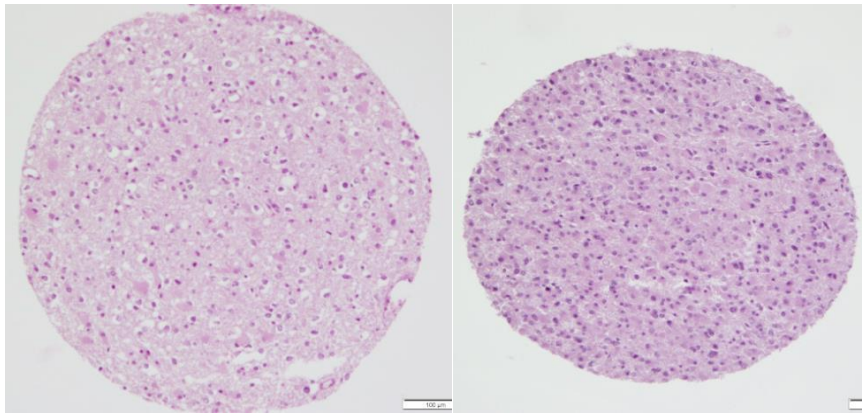
Le tissue multi array (TMA) est une technique consistant à regrouper sur le même bloc de paraffine, des échantillons de tissu provenant de différents blocs de paraffine (planche photo 13). Ainsi, il est possible de représenter sur un seul bloc de paraffine, des échantillons de plusieurs tumeurs correspondant à différents patients. Dans notre étude, pour chaque tumeur, 3 aires représentatives étaient sélectionnées à partir d'une coupe étalée sur lame et colorée par hématoxyline-érythroline-safran. Trois carottes de 0,6mm de diamètre étaient prélevées sur le bloc de paraffine correspondant par un « tissue arrayer » (Beecher instrument). Ces carottes étaient ensuite placées dans un bloc de paraffine vierge, dans lequel des cylindres de même volume avaient préalablement été évidés. Cette opération était répétée pour chaque tumeur, positionnant les carottes tumorales sur le bloc de TMA selon une disposition préétablie. Pour finir, des carottes issues d'échantillon de foie, de cœur et de rein, fortement colorées par de l'encre de chine rouge, verte, et jaune, étaient placées sur le bloc afin de l'orienter.

Au total, 45 carottes échantillonnant le tissu tumoral de 15 patients sont présentes sur les TMA n°6 à 10. 36 carottes échantillonnant le tissu tumoral de 12 patients sont présentes sur le TMA n°5.

Pour échantillonner les glioblastomes opérés en 2010 et 2011, nous avons choisi de sélectionner 3 aires sur différents secteurs tumoraux : des secteurs riches en cellules tumorales de phénotype astrocytaire, des secteurs riches en vaisseaux proliférant, et la périphérie de zones de nécrose tumorale. Soit un total de 9 carottes tumorales par patient, disposées sur des blocs de TMA comportant les échantillons de 6 patients (TMA n° 1, 2, 3, 4, 12).

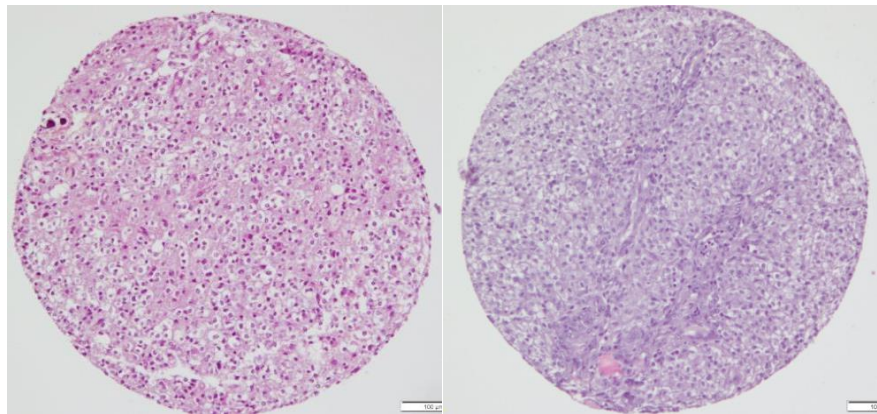
Ces blocs de TMA ont été préparés et coupés au laboratoire d'histologie de la faculté de médecine de Lille 2.

**Planche photo 13: Exemple de carottes tissulaires échantillonnées en TMA. Grossissement X5**



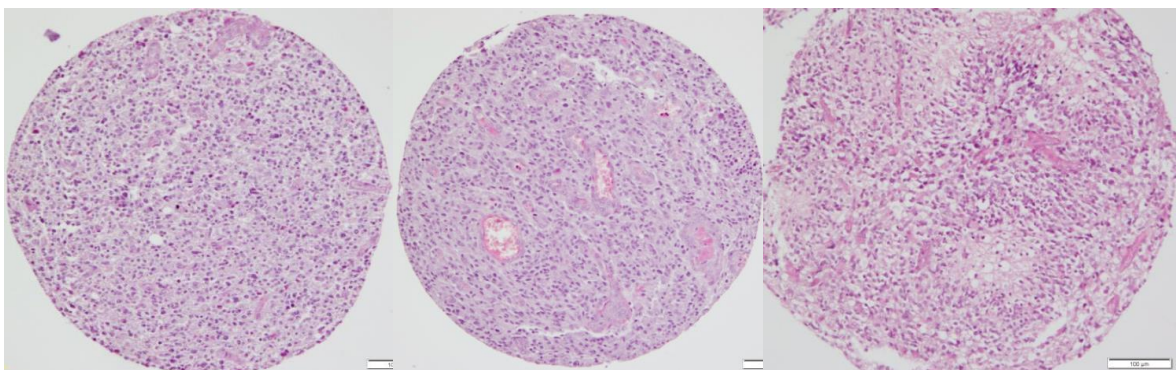
Oligoastrocytome grade II

Oligoastrocytome grade III



Oligodendrogliome grade II

Oligodendrogliome grade III



GBM

Prolifération endothelio-capillaire

Nécrose palissadique

## D. Etude immunohistochimique

### 1. Technique

Des coupes tissulaires de 4 µm étaient réalisées à partir des blocs de tissus inclus en paraffine. Elles étaient étalées sur lames préparées (DakoFlex) et séchées à l'étuve à 56°C pendant 24 heures. Les étapes de déparaffinage, de prétraitement, de blocage de l'activité peroxydase endogène, d'incubation, d'amplification et de révélation étaient automatisées pour IDH1 et endocan (VENTANA BENCHMARK XT), manuelles pour SPK et SPL.

Les étapes de démasquage antigénique (tampon EDTA légèrement basique : CC1, tampon citrate CC2, ou protéase) sont repris dans le tableau 1.

Spécificité	Laboratoire	Clonalité	Automate	Dilution	prétraitement	Incubation
<b>IDH1</b>	Dianova	H09	oui	1/40	CC1 standard	32'
<b>Endocan</b>	Endotis	MEP8.3	oui	1/500	CC1 standard	32'
<b>Sphingosine Kinase-1</b>		polyclonal	non	1/500	Tampon EDTA pH8, 3' à l'autocuiseur	12h à 4°C
<b>Sphingosine-1-phospho-lyase 1</b>	Sigma	polyclonal	non	1/500	Tampon Citrate pH6, 15' à l'autocuiseur	1h à température ambiante

**Tableau 1. Caractéristiques et conditions d'utilisation des anticorps primaires pour l'étude immunohistochimique**

### 2. Interprétation des marquages immunohistochimiques

Les lames ont été analysées par deux lecteurs (pathologiste et/ou scientifique).

Anticorps anti-IDH1 : cet anticorps étant utilisé en routine. L'analyse était qualitative, considérée comme positive lorsque les cellules tumorales présentent un marquage cytoplasmique nettement contrasté.



Anticorps anti-Endocan : l'analyse était qualitative, considérée comme positive lorsque les cellules endothéliales présentaient un marquage cytoplasmique.

Anticorps anti-Sphingosine kinase 1 (SPK) : Nous avons utilisé comme contrôle positif d'expression du tissu prostatique contenant des glandes normales et adénocarcinomeuses. Le marquage est plus intense sur les cellules adénocarcinomeuses que sur les cellules glandulaires normales (107). Une coupe de tissu cérébral non tumoral fixé dans les mêmes conditions (chirurgie d'épilepsie), était marquée dans chaque série. Afin de standardiser la technique immunohistochimique toutes les lames ont été réalisées dans un même temps.

Quatre catégories d'expression étaient distinguées en fonction du pourcentage de cellules tumorales marquées :

- 0 : absence de marquage
- 1 :  $\leq 10\%$  de cellules marquées
- 2 : 10-50% de cellules marquées
- 3 :  $\geq 50\%$  de cellules marquées.

Quatre grades d'intensité de marquage étaient également distingués :

- 0 : absence de marquage
- 1 : marquage d'intensité légère
- 2 : marquage d'intensité modérée
- 3 : marquage d'intensité forte

Enfin, un score global a été calculé en multipliant les 2 scores précédents, allant de 0 à 9.

Anticorps anti-Sphingosine-1P-lyase (SPL) : Nous avons utilisé comme contrôle positif du tissu provenant de l'exérèse d'un adénome intestinal, pour lesquels un marquage cytoplasmique des cellules glandulaires a été décrit (68). Une coupe de tissu cérébral non

tumoral a été marquée lors de chaque série. La même technique de semi quantification a été appliqué pour le marquage de la SPK et la SPL.

## **E. Etude par FISH**

La recherche de microdélétion de 1p et 19q a pour la majeure partie des patients été réalisée au moment du diagnostic, par analyse de marqueurs microsatellites de l'ADN tumoral et leucocytaire des patients. Ces données manquaient pour 27 patients, en partie en raison de la faible densité de cellules tumorales dans les échantillons. La recherche complémentaire de délétion de 1p et 19q était réalisée par technique FISH (hybridation fluorescente in situ).

### **1. Technique**

Une coupe tissulaire de 4 µm était réalisée à partir du bloc de TMA n°10, comprenant 11 oligodendrogliomes. Pour les autres tumeurs, ce sont les blocs de tissus inclus en paraffine originaux qui étaient coupés, après avoir sélectionné une zone tumorale représentative, dépourvue de nécrose.

Le tampon de lavage (WASH BUFFER dilué au 1/20 de l'Histology FISH accessory kit (DAKO®)) et la solution de prétraitement (prétraitement solution diluée au 1/20 de l'Histology FISH accessory kit (DAKO®)) étaient préparés au début de la technique.

#### **Préparation des tissus inclus en paraffine**

- Déparaffinage : les coupes étaient déparaffinées dans du xylène (3×10 minutes), réhydratées progressivement (éthanol absolu, 2×3 minutes ; éthanol à 95%, 3 minutes ; éthanol à 70%, 3 minutes) puis rincées dans le tampon de lavage (5 minutes).

- Prétraitement : les coupes étaient ensuite immergées dans la solution de prétraitement chauffée au bain-marie à une température de 95 à 99°C pendant 10 minutes puis laissées dans

cette même solution à température ambiante pendant 15 minutes. Elles étaient à nouveau rincées dans la solution de lavage (2×3 minutes).

- Traitement à la pepsine : il consistait en une digestion enzymatique par la pepsine prête à l'emploi contenue dans le kit. 100µl de pepsine froide était déposé sur chaque lame préalablement disposée dans l'Hybrite (SHANDON®) pendant 7 minutes à 37°C. Les coupes étaient à nouveau rincées dans le tampon de lavage (2×3 minutes).

- Déshydratation : les lames étaient immergées dans des bains successifs d'éthanol (éthanol à 70%, 2 minutes ; éthanol à 95%, 2 minutes puis éthanol à 100%, 2 minutes).

### **Préparation des sondes**

Les étapes suivantes s'effectuaient en semi obscurité.

L'hybridation était réalisée à l'aide des kits :

- Zytolight® SPEC 1p36/1q25 Dual Color Probe

- Zytolight® SPEC 19q13/19p13 Dual Color Probe

L'étape de préparation de la sonde consistait à déposer dans un tube eppendorf 1µl de sonde, 2µl d'eau stérile et 8µl de tampon d'hybridation (VYSIS).

La préparation était homogénéisée par aspirations/refoulements, déposée au centre du prélèvement puis recouverte d'une lamelle.

### **Co-dénaturation et hybridation**

Les lames étaient ensuite placées dans la colonne de dénaturation du Slidebooster d'ADVALYTIX® pour une durée de 5 minutes à 75°C puis déposées dans les chambres d'hybridation à 37°C (14-20 heures). Préalablement, 15µl d'Advason (BECKMAN COULTER®) avaient été déposés sur les puces d'agitation et 500µl d'AdvaHum (BECKMAN COULTER®) dans chaque réservoir d'humidification.

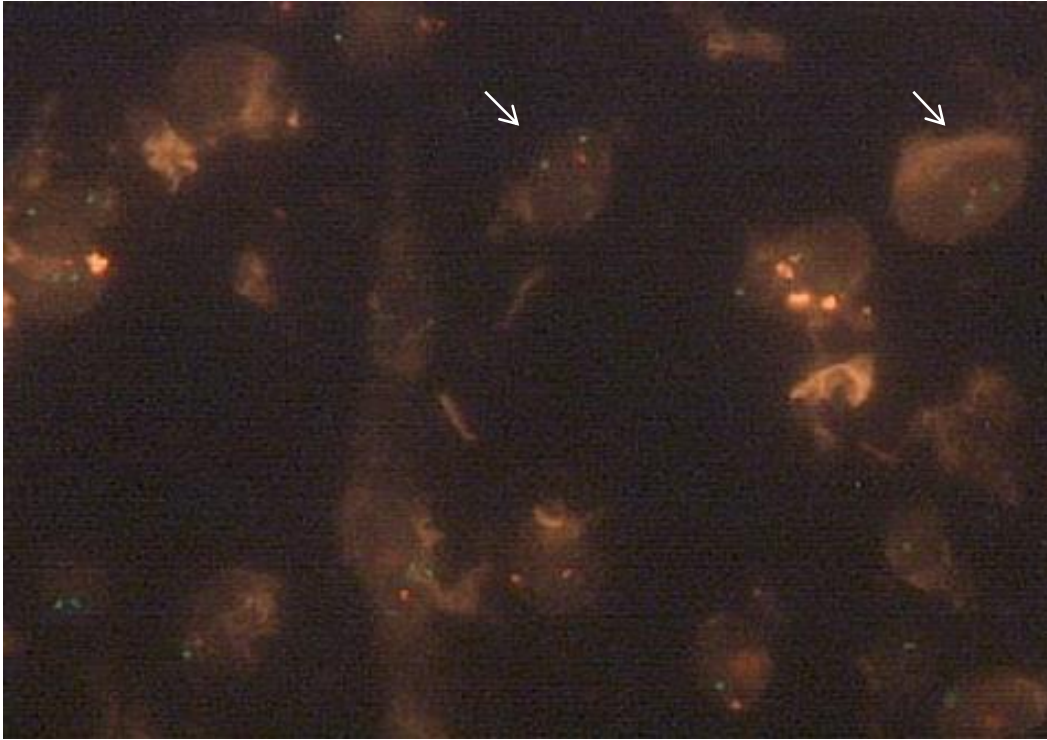
## **Lavage post-hybridation**

Le lendemain était réalisé le lavage post-hybridation. Les lamelles étaient retirées des lames qui étaient ensuite immergées dans une solution de lavage SCC 0.4X/NP40 (SIGMA®, 100 ml pour 6 lames) à 72-74°C pendant 1 minute renouvelée une fois après agitation. Elles étaient ensuite plongées dans une solution de lavage SCC2X/NP40 (SIGMA®, 100 ml pour 6 lames) à température ambiante pendant 1 minute après agitation. Puis, les coupes étaient déshydratées par bains successifs d'éthanol (éthanol 70%, 2 minutes ; éthanol 85%, 2 minutes puis éthanol 100%, 2 minutes). Elles étaient séchées à température ambiante pendant 15 minutes puis 10 à 15µl de DAPI (ABOTT®, dilution 1/3) étaient déposés sur la zone préalablement hybridée. La préparation était recouverte d'une lamelle scellée au vernis.

## **2. Interprétation**

La SPEC 1p36/1q25 Dual color Probe associe une sonde spécifique de la région 1p36 du bras court du chromosome 1 directement marqué par un fluorochrome rouge, et une sonde spécifique centromérique du chromosome 1 marquée au fluorochrome vert. La SPEC 19q13/19p13 Dual color Probe associe une sonde spécifique de la région 19q13 du bras long du chromosome 19 directement marqué au fluorochrome rouge et une sonde spécifique centromérique du chromosome 19 marquée au fluorochrome vert. Un noyau normal en interphase comporte 2 signaux rouges et 2 signaux verts centromériques. Un noyau comportant une délétion de la région 1p, ne présentera qu'un signal rouge et 2 signaux verts pour le contrôle centromérique. La lecture des lames s'effectuait en semi obscurité au microscope à épifluorescence. L'observation au microscope était d'abord effectuée au faible grossissement ( $\times 100$  et  $\times 400$ ) pour repérer les zones les plus adéquates puis au fort grossissement ( $\times 1000$ ). Un minimum de 200 cellules devait être analysable pour que la technique soit considérée interprétable. Une délétion était avérée lorsqu'au moins 30% des

cellules tumorales analysées ne présentaient qu'un seul spot rouge pour 2 spots verts de contrôle centromérique. N'étaient retenus pour notre étude que les résultats associant une délétion de 1p et une délétion de 19q.



**photo 14: FISH avec la sonde 1p. OA II avec délétion de 1p: 2 cellules présentent une délétion de 1p (un seul signal rouge pour 2 signaux verts par noyau).**

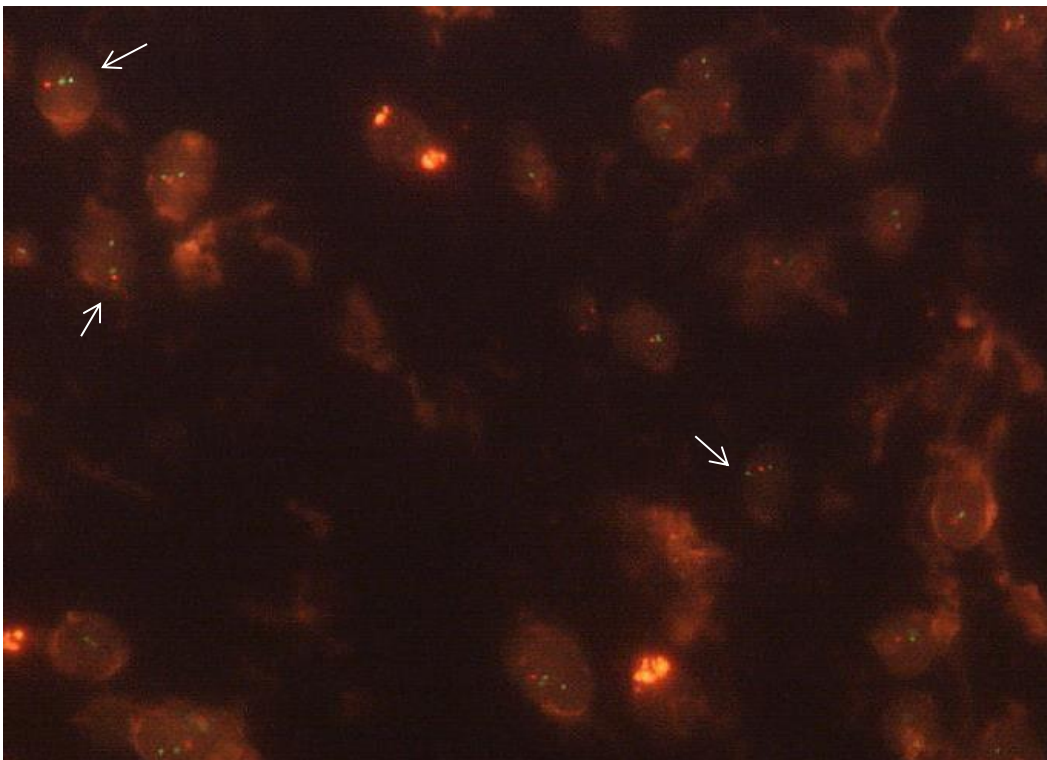


photo 15: FISH avec la sonde 19q. OA II avec délétion de 19q : 2 cellules présentent une délétion de 19q (un seul signal rouge pour 2 signaux verts bien visibles par noyau).

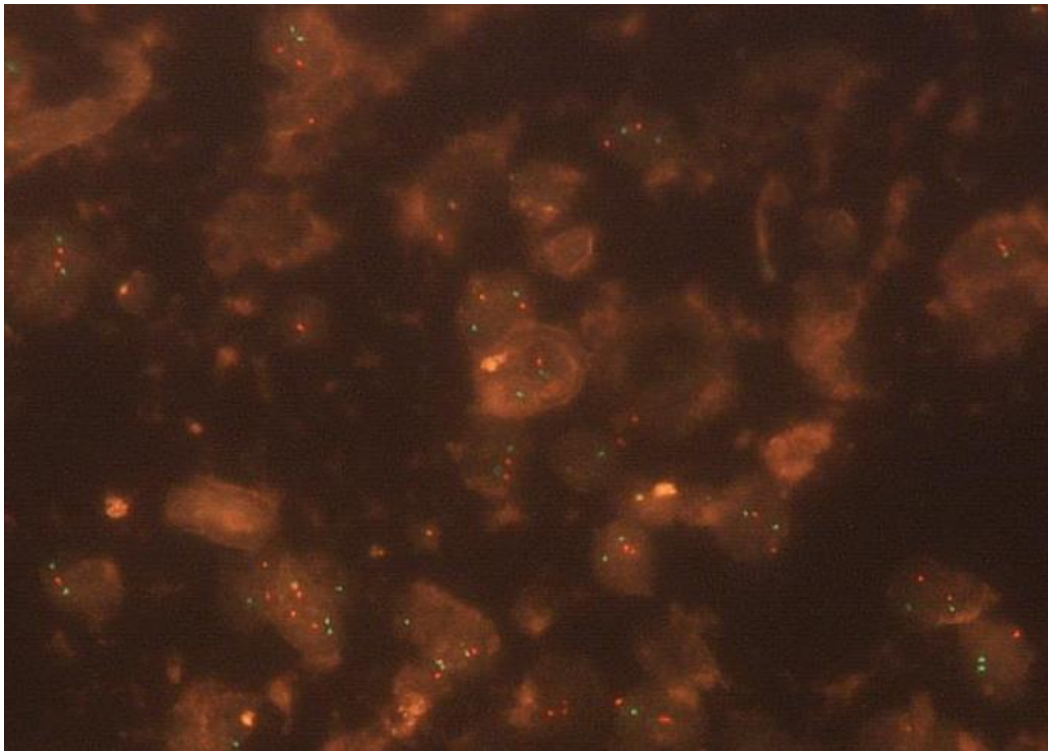


photo 16: FISH avec la sonde 19q. O II sans délétion 19q (2 signaux rouges et 2 signaux verts par cellule).

## F. Analyses statistiques

Dans un souci d'homogénéisation de la population étudiée, les 6 patients en récurrence au moment de l'inclusion de l'étude ont été exclus des analyses statistiques. Les analyses statistiques étaient réalisées à l'aide des logiciels SPSS et Graphpad Prism.

### 1. Recodage

Pour les anticorps IDH1 et anti-Endocan, les résultats étaient rendus de façon binaire : négatif ou positif. Pour les anticorps anti-SPKinase 1 et SPLyase, l'analyse était semi-qualitative et quantitative.

- Grade intensité de 0 à 3, recodé en variables binaires (intensité 0 à 1 *versus* 2 à 3)

- Score global (% x Intensité) de 0 à 9, recodé en variables binaires (0 à 4 *versus* 6 à 9).

## 2. **Analyses bivariées**

La comparaison des variables qualitatives entre les groupes a été réalisée par le test de Chi-deux ou le test exact de Fisher. La comparaison des variables numériques (score global) entre les groupes a été réalisée par le student t test.

Tous les résultats étaient considérés comme significatifs si la valeur du p était inférieure à 0,05.

## 3. **Test de corrélation statistique**

La distribution des valeurs étant dans la population étudiée non gaussienne, le test non paramétrique de corrélation des rangs de Spearman était utilisé. Le niveau de significativité était établi à  $p < 0,05$ .

## 4. **Analyse de la survie**

L'analyse des survies globales et sans récurrence a été estimée selon la méthode de Kaplan-Meier. La fonction de survie a été calculée à partir du diagnostic de gliome jusqu'à la date de décès, ou, le cas échéant, de dernière nouvelle. La fonction de récurrence a été calculée à partir de la date de diagnostic, jusqu'à la date de récurrence ou de progression tumorale sur les IRM de contrôle, ou, le cas échéant, la date des dernières nouvelles.

La comparaison des survies en fonction de paramètres qualitatifs (immunohistochimiques) étaient réalisées en analyse bivariée par le test de log-rank.

## 5. **Analyse multivariée**

Nous avons étudié la valeur pronostic de plusieurs variables simultanément, par un test de régression de cox.

## IV. RESULTATS

### A. Description de la population

#### 1. Paramètres clinico-pathologiques

121 patients ont été inclus dans l'étude, répartis en 31 gliomes de grade II, 30 gliomes de grade III, 60 glioblastomes. Celle-ci, ainsi que 6 tumeurs correspondant à des récurrences de tumeurs gliales précédemment traitées, ont été exclues des analyses statistiques. Les caractéristiques cliniques et pathologiques des patients, sont résumées dans le Tableau 2.

	Grade II OMS		Grade III OMS		GBM	
<b>Nombre</b>	<b>31</b>		<b>30</b>		<b>60</b>	<b>total : 121</b>
	<b>21 O II</b>	<b>10 OA II</b>	<b>13 O III</b>	<b>17 OA III</b>		
<b>Ratio homme/femme</b>	16/11		20/10		37/23	
<b>Age moyen au diagnostic, années</b>	43		50		59	
<b>Chirurgie : exérèse</b>	27/31		29/30		59/60	
<b>Exérèse totale ou subtotaie</b>	22/27		22/29		48/59	
<b>Radiothérapie</b>	24/31		28/30		50/60	
<b>Chimiothérapie (Temodal)</b>	9/31		19/30		51/60	
<b>Avastin</b>	1/31		2/30		19/60	
<b>Nb de cas récidive*</b>	1		4		1	
<b>Décès, nombre</b>	14		23		50	
<b>Récidive, nombre</b>	17		21		52	

\*6 patients en récurrence au moment de l'inclusion dans l'étude sont exclus des analyses statistiques

O=Oligodendrogliomes ; OA=Oligoastrocytome ; GBM=glioblastome

Tableau 2: Caractéristiques cliniques et pathologiques des gliomes étudiés



## 2. Données de survie en fonction du grade de l'OMS

Le Tableau 3 et la figure 9 indiquent les médianes et courbes de survies, déterminées par méthode de Kaplan et Meier, en fonction du grade.

	Survie globale médiane, mois	Intervalle de confiance à 95%	Survie sans progression médiane, mois	Intervalle de confiance à 95%
<b>Grade II</b>	53	44-62	38	34-41
<b>Grade III</b>	20	10-30	10	3-17
<b>Glioblastome</b>	16	12-20	8	6-10

Tableau 3: Temps de survie cumulé calculé par méthode de Kaplan-Meier dans la population étudiée.

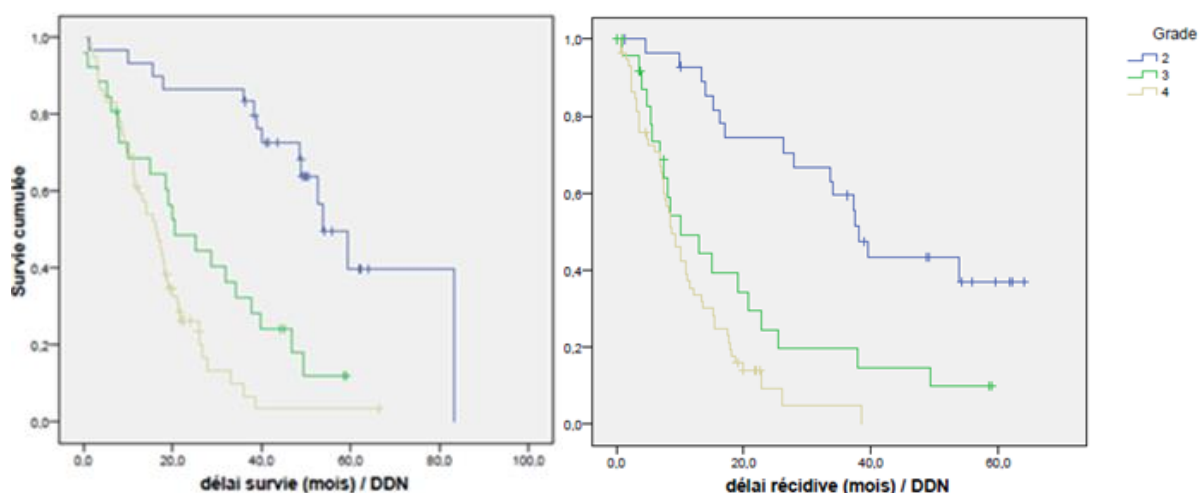


Figure 9: Temps de survie globale et sans progression en fonction du grade de l'OMS

## 3. Paramètres moléculaires

### - Statut MGMT

Une recherche de méthylation du promoteur du gène MGMT a été réalisée pour tous les glioblastomes : 29 présentaient une hyper méthylation (soit 52,7% des glioblastomes). 5 résultats étaient ininterprétables.

Parmi les gliomes anaplasiques, 3 ont été étudiés : un oligoastrocytome présentait une hyperméthylation, tandis que 2 oligodendrogliomes n'en présentaient pas.

- Codélétion 1p19q

Elle était effectuée par PCR et analyse de marqueurs microsatellites, et le cas échéant, par FISH. Les résultats sont synthétisés dans le Tableau 4.

	OD grade II	OA grade II	OD grade III	OA grade III
<b>Nombre cas analysés</b>	21	10	12	16
<b>PCR nb cas +/-total</b>	4/11	1/7	2/5	0/9
<b>FISH nb cas +/-total</b>	2/10 (2 NI)	0/3	3/7	1/7
<b>Total 1p19q+ (%)</b>	6 (28%)	1 (10%)	5 (41%)	1 (6%)

NI=non interprétable

Tableau 4: Résultats des recherches de codélétion 1p19q, par PCR et FISH

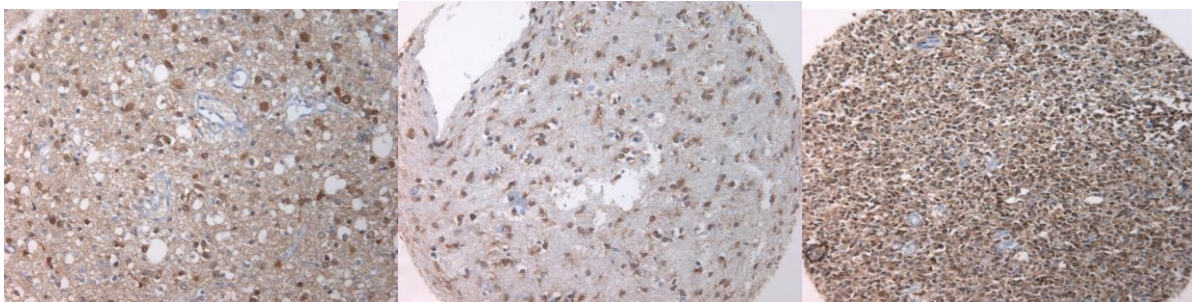
## B. IDH1

### 1. Expression IHC de IDH1

L'expression immunohistochimique de IDH1 (détectant la mutation R132H de *IDH1*) était cytoplasmique, retrouvée plus fréquemment dans les gliomes de bas grade (64% des cas), que ceux de haut grade (43% des cas) [tableau 5].

	Grades II			Grades III			Grades IV (GBM)
		OD	OA		OD	OA	
<b>Nb cas</b>	31	21	10	30	13	17	60
<b>Nb cas IDH1+ (%)</b>	20 <b>(64%)</b>	12 (57%)	8 (80%)	13 <b>(43%)</b>	6 (46%)	5 (29%)	1 (1,6%)

Tableau 5: Détection IHC de la mutation R132H de *IDH1* dans les gliomes étudiés



photos 17: Détection IHC de la mutation de IDH1. OAI, OII et GBM (de gauche à droite).

### 2. Temps de survie en fonction de l'expression de IDH1

L'analyse de la survie globale et sans récurrence en fonction de la détection immunohistochimique, d'une mutation de IDH1 montrait une valeur pronostique significative

dans les gliomes (médiane de survie globale de 49 mois versus 18 mois), et dans le sous-groupe des gliomes de grade III (médiane de survie globale de 40 mois versus 20 mois). Il n'y avait pas de différence pronostique pour le sous-groupe des gliomes de grade II [tableau 6 et figure 10].

	Médiane (erreur standard) survie globale IDH1-	IC à 95%	Médiane (erreur standard) survie globale IDH1+	IC à 95%	Comparaison globale (Log Rank)
<b>Tous</b>	17,9 (1,19)	15,6-20,3	49,4 (2,24)	45,0-53,8	<b>p&lt;0,001</b>
<b>Grade II</b>	83,2 (0,00)	44,6-66,7	52,6 (4,10)	44,7-62,8	p=0,424
<b>Grade III</b>	19,2 (3,15)	13,0-25,4	39,9 (12,3)	15,4-64,1	<b>p=0,013</b>
<b>Grades II+III</b>	31,84(9,08)	14,0-49,6	49,40(2,82)	35,8-57,6	p=0,065
	Médiane survie sans récurrence IDH1-	IC à 95%	Médiane survie sans récurrence IDH1+	IC à 95%	Comparaison globale (Log Rank)
<b>tous</b>	10,0 (1,30)	7,4-12,5	37,5 (6,24)	25,2-49,7	<b>p&lt;0,001</b>
<b>Grades II</b>	53,8 (25,0)	4,6-102,9	37,5 (0,70)	36,1-38,8	p=0,781
<b>Grade III</b>	8,06 (1,67)	4,7-11,3	22,76 (5,42)	11,9-33,5	<b>p=0,023</b>
<b>Grades II+III</b>	14,9 (3,87)	7,3-22,5	37,5 (3,17)	31,3-43,7	p=0,062

Tableau 6: Temps de survie cumulé calculé par méthode de Kaplan-Meier et analysé par log-rank test en fonction de la présence ou non d'une détection IHC de la mutation du gène IDH1

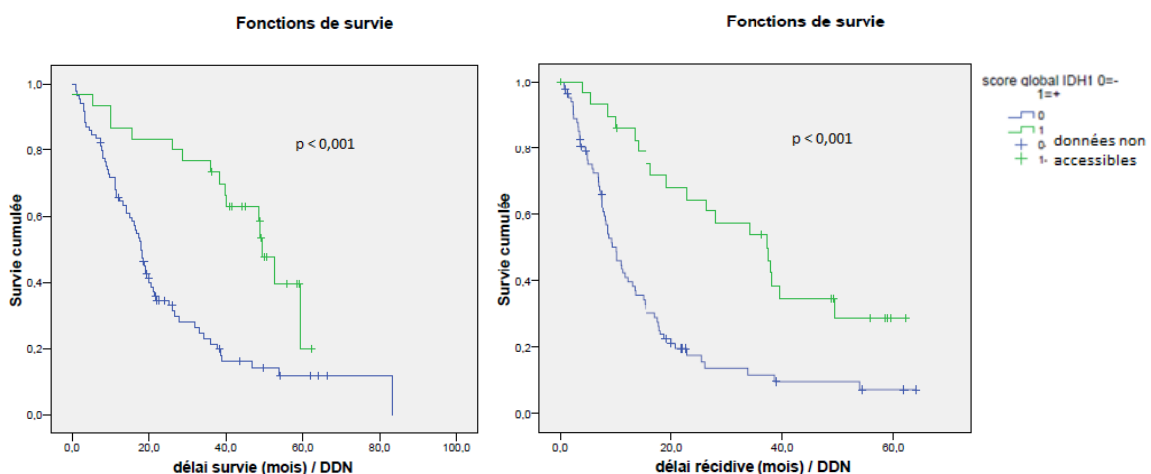


Figure 10: survie globale et sans récurrence des gliomes (tous grades) en fonction de l'expression de IDH1

## C. Sphingosine kinase-1 (SPK)

Le marquage immunohistochimique était cytoplasmique, plus ou moins associé à un marquage nucléaire d'intensité équivalente, au niveau des cellules tumorales. Un marquage endothélial et lymphocytaire était souvent observé. Sur le cas témoin de tissu cérébral non tumoral, les cellules gliales étaient faiblement marquées, et un marquage plus intense de neurones et des cellules endothéliales était observé. Sur le cas témoin de tissu prostatique, on observait un marquage cytoplasmique plus intense au niveau des glandes adénocarcinomeuses que des glandes normales. On notait, comme dans le tissu cérébral, un marquage leucocytaire.

### 1. Intensité de l'expression IHC de la SPK

L'intensité de l'expression IHC de la SPK, gradée de 0 à 3, était recodée en 2 groupes : classe 1 (grade intensité 0 et 1) et 2 (grade intensité 2 et 3), dont la répartition en fonction du grade est représentée sur la figure 11.

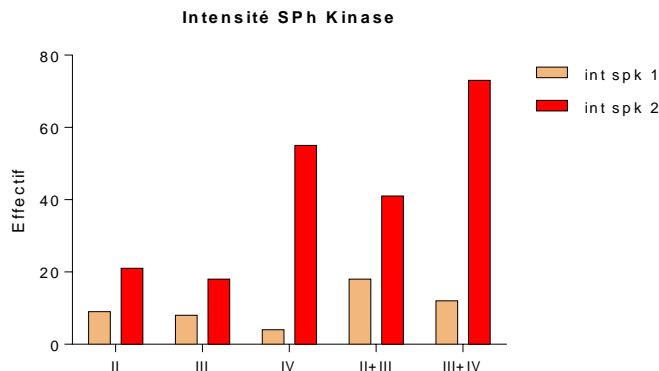


Figure 11: Graphique représentant la répartition des classes d'intensité IHC de la SPK en fonction du grade tumoral

Nous avons comparé en analyse univariée, différents groupes de tumeurs, en fonction du grade OMS, de la détection IHC de la mutation d'*IDH1*, de la présence ou non d'une codélétion 1p19q, du statut MGMT, et de l'expression endothéliale d'Endocan. Les résultats sont synthétisés dans le Tableau 7. Les glioblastomes présentaient plus fréquemment une expression d'intensité élevée de la sphingosine kinase ( $p < 0,001$ ). Ils avaient également une

expression plus fréquemment intense comparés aux gliomes de grades II+III (p=0,016), et comparés aux oligoastrocytomes de grade III (p=0,0139). Il n'y avait pas de différence significative entre les autres groupes de gliomes étudiés, notamment lorsque l'on regroupait les gliomes de grade II et III en fonction de leur statut 1p19q et de l'expression de IDH1. Les gliomes présentant une expression endothéliale d'Endocan avaient une intensité de l'expression de SPK significativement plus élevée (p=0,027).

	<b>Classe 1 intensité SPK (intensité 0-1)</b>	<b>Classe 2 intensité SPK (intensité 2-3)</b>	<b>total</b>	<b>Test de Fisher<sup>†</sup> ou chi 2<sup>†</sup></b>
<b>Grade II</b>	9	21	30	<b>p=0,028<sup>†</sup></b>
<b>Grade III</b>	8	18	26	<b>p=0,50<sup>†</sup></b>
<b>Grade IV</b>	4	55	59	<b>p&lt;0,001<sup>†</sup></b>
<b>Grade II+III</b>	18	41	59	<b>p=0,016<sup>†</sup></b>
<b>Grade IV</b>	4	55	59	
<b>Grades II</b>	9	21	30	p=0,059 <sup>†</sup>
<b>Grades III+IV</b>	12	73	85	
<b>OA grade III</b>	5	10	15	<b>p= 0,0139<sup>†</sup></b>
<b>GBM</b>	4	55	59	
<b>OD grade II</b>	7	13	20	p=1,00 <sup>†</sup>
<b>OD grade III</b>	3	8	11	
<b>Grades II+III 1p19q+</b>	2	9	11	p=0,476 <sup>†</sup>
<b>Grades II+III 1p19q-</b>	13	28	41	
<b>Grades II+III IDH1+</b>	8	21	29	p=0,773 <sup>†</sup>
<b>Grades II+III IDH1-</b>	9	18	27	
<b>GBM MGMT+</b>	1	27	28	p=0,342 <sup>†</sup>
<b>GBM MGMT-</b>	3	23	26	
<b>GBM endocan +</b>	3	52	55	p=0,250 <sup>†</sup>
<b>GBM endocan -</b>	1	3	4	
<b>Tous IDH1+</b>	8	22	30	p=0,178 <sup>†</sup>
<b>Tous IDH1-</b>	13	72	85	
<b>Tous Endocan+</b>	6	62	68	<b>p=0,0027<sup>†</sup></b>
<b>Tous Endocan-</b>	15	32	47	

Tableau 7: Comparaison de l'intensité de l'expression de SPK inase, en fonction du type histologique, du grade OMS, des caractéristiques moléculaire et de l'expression d'Endocan

## 2. Score global immunohistochimique de SPKinase 1

Le score global était obtenu en multipliant le score du pourcentage de cellules marquées par le score intensité de marquage. Les tumeurs étaient ensuite séparées en 2 groupes : **classe 1** (score 0 à 4) et **classe 2** (score 6 à 9). La répartition des classes IHC en fonction des grades tumoraux est représentée sur la figure 12.

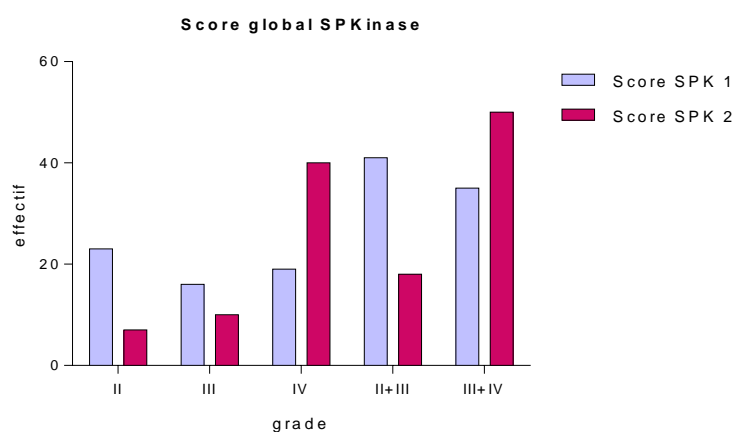


Figure 12: Graphique représentant la répartition du score global de SPK en fonction du grade OMS. classe 1=score global 0 à 4 classe 2=score global 6 à 9

### a) Comparaison des 2 classes du score global de la SPK

Les sous-groupes de tumeurs décrits sur le tableau 7 étaient étudiés en analyse univariée [tableau 8]. Le score global d'expression de SPK était plus élevé dans les gliomes de grade IV comparés aux gliomes de grades II+III ( $p < 0,001$ ) et aux oligoastrocytomes de grade III ( $p = 0,0196$ ). Les gliomes exprimant Endocan avaient un score d'expression de SPK plus élevé que ceux n'exprimant pas Endocan ( $p = 0,0283$ ). Les autres sous-groupes de tumeurs comparés n'étaient pas liés statistiquement au degré d'expression de SPK.

	Classe 1 score global SPK (score 0 à 4)	Classe 2 score global SPK (score 6 à 9)	total	p (Test de Fisher)
Grade II	23	7	30	
Grade III	16	10	26	
Grade IV	19	40	59	
Grade II+III	41	18	59	<b>p&lt;0,0001</b>
Grade IV	19	40	59	
Grades II	23	7	30	<b>p=0,0012</b>
Grades III+IV	35	50	85	
OA grade III	10	5	15	<b>p= 0,0195</b>
GBM	19	40	59	
OD grade II	16	4	20	p=0,217
OD grade III	6	5	11	
Grades II+III 1p19q+	8	3	11	p=1,00
Grades II+III 1p19q-	27	14	41	
Grades II+III IDH1+	19	10	29	p=1,00
Grades II+III IDH1-	27	14	27	
GBM MGMT+	11	17	28	p=0,395
GBM MGMT-	7	19	26	
GBM endocan +	18	37	55	p=1,00
GBM endocan -	1	3	4	
Tous IDH1+	19	11	30	p=0,137
Tous IDH1-	39	46	85	
Tous Endocan+	60	8	68	<b>p=0,0283</b>
Tous Endocan-	33	14	47	

Tableau 8: Comparaison du score global de SPKinase, en fonction du type histologique, du grade OMS, des caractéristiques moléculaires et de l'expression d'Endocan.

*b) Comparaison des moyennes du score global de marquage de la SPK*

Les valeurs moyennes du score global étaient de 3,94 pour les gliomes de grade II, de 4,00 pour les gliomes de grade III, et de 6,20 pour les gliomes de grade IV.

En analyse univariée, la comparaison des moyennes du score global de SPK montrait une expression significativement plus forte dans les tumeurs de grade IV, comparées aux tumeurs de grade III, de grade II, ou de grade II +III ( $p < 0,001$ ) [figure 13].

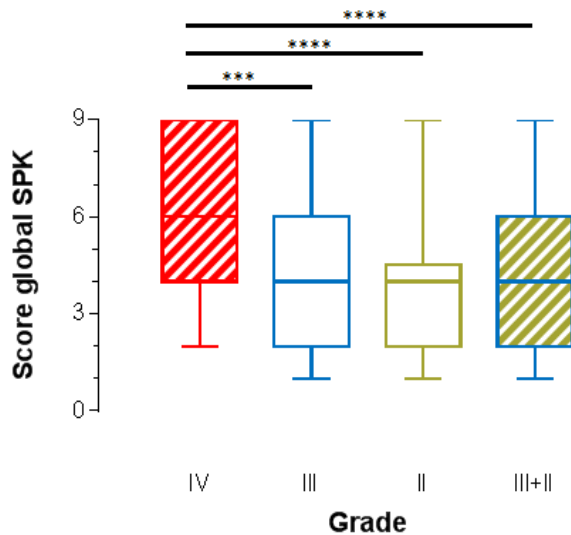


Figure 13: Graphique représentant la répartition des valeurs du score global de la SPK, en fonction des grades OMS. Les « boîtes à moustache » représentent la médiane, les extrêmes, et les quartiles. Les analyses univariées ont été réalisées par student t test. \*\*\* =  $p < 0,001$  \*\*\*\*= $p < 0,0001$

L'expression endothéliale d'endocan était de façon significative associée à un score global de la SPK élevé ( $p < 0,0001$ ) [figure 14].

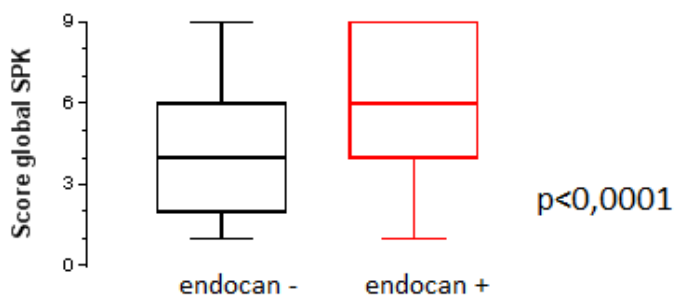


Figure 14: score global de SPK, en fonction de l'expression endothéliale d'Endocan

### 3. Test de corrélation statistique

La distribution des valeurs étant dans la population étudiée non gaussienne, nous avons utilisé le test non paramétrique de corrélation des rangs de Spearman. Nous avons analysé les variables du score intensité, ainsi que du score global, avec le grade OMS.



Il existait une **forte corrélation statistique entre le grade tumoral et l'intensité du marquage de SPK** (coefficient de corrélation  $r=0,436$  ;  $p<0,001$ ), **entre le grade tumoral et le score global IHC de SPK** (coefficient de corrélation  $r=0,424$  ;  $p<0,001$ ).

#### 4. Temps de survie en fonction de l'expression de la SP Kinase

Les temps de survie en fonction de l'expression de SPK, en % de cellules marquées, et en fonction du score global n'étaient pas interprétables [figures 15 et 16].

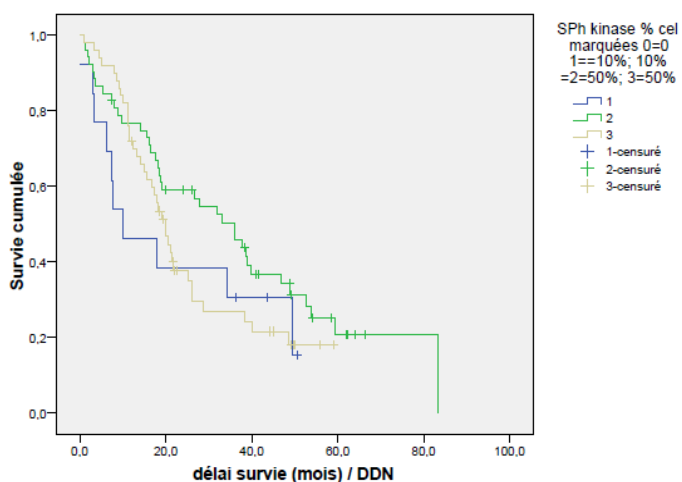


Figure 15: temps de survie globale en fonction du % de cellules marquées par la SPK

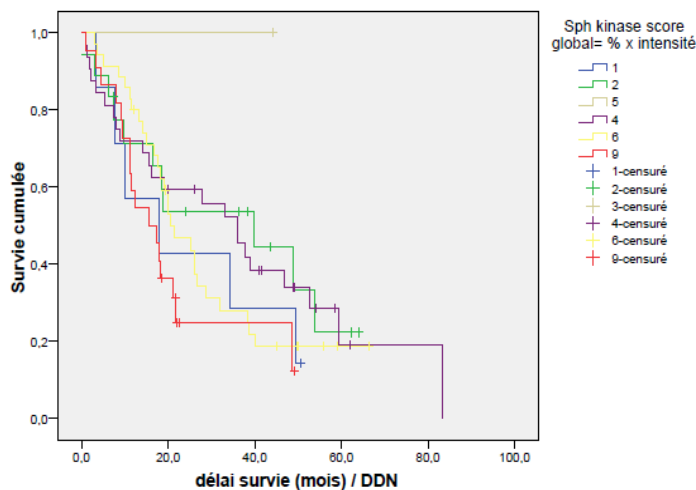


Figure 16: temps de survie globale en fonction du score global de la SPK

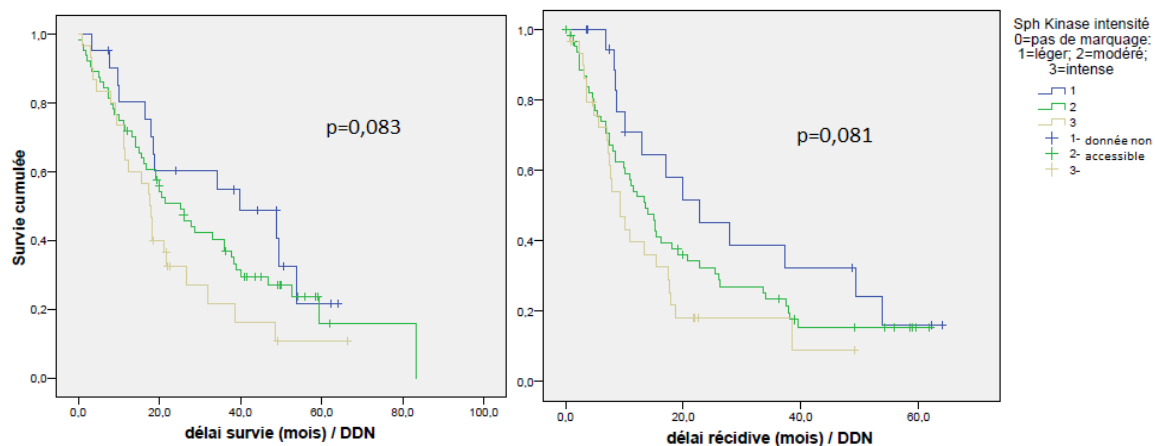
Les temps de survie globale et sans progression en fonction de l'intensité de l'immunomarquage sont représentées sur la figure 17 et le tableau 9. Les médianes de survie globale étaient de 39 mois pour une intensité=1, 25 mois pour une intensité=2 et de 17 mois

pour une intensité=3. La comparaison globale par log rank test ne montrait pas de valeur pronostique significative ( $p=0,083$ ). Il en était de même pour les survies sans récurrence.

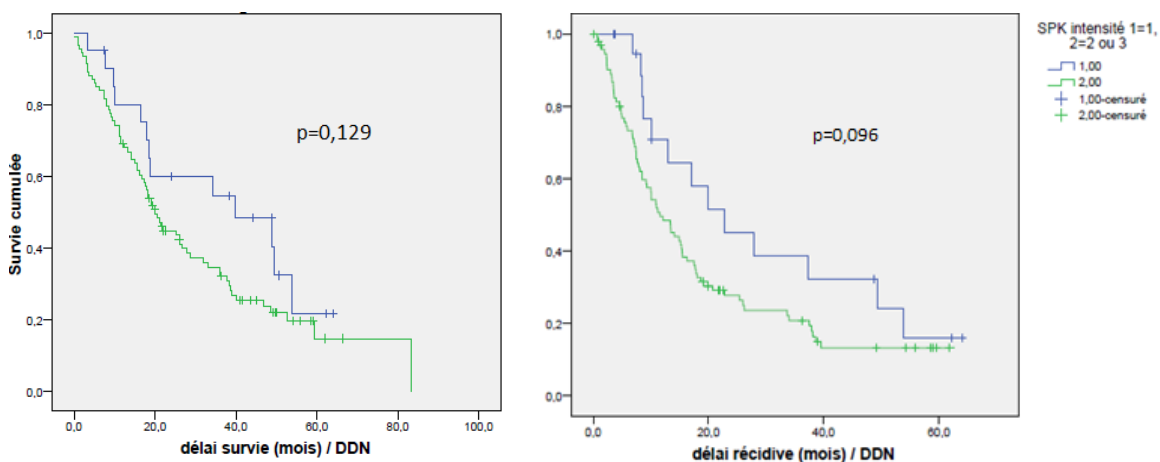
Les patients étaient ensuite séparés en 2 groupes (intensité 1 et intensité 2+3) : l'analyse et la comparaison des temps de survie globale et sans progression ne montrait pas non plus de valeur pronostique significative ( $p=0,129$  et  $0,096$ ) [figure 18 et tableau 9].

Intensité de SPK	Médiane mois (erreur standard) survie globale	IC à 95%	Médiane mois (erreur standard) survie sans récurrence	IC à 95%
1 (faible)	39 (17)	5,5-74	22 (7)	9-36
2 (modérée)	25 (4)	17-33	13 (2)	9,17
3 (intense)	17 (1,7)	14,4-21,11	9 (1,5)	6-12
Intensité 2+3	20 (2)	16-24	11 (2)	7-15

**Tableau 9 : Temps de survie cumulé calculé par méthode de Kaplan-Meier en fonction de l'intensité de l'expression de SPK.**



**Figure 17: Temps de survie globale et sans récurrence en fonction de l'intensité de l'expression de SPK, et analyse par log-rank test.**

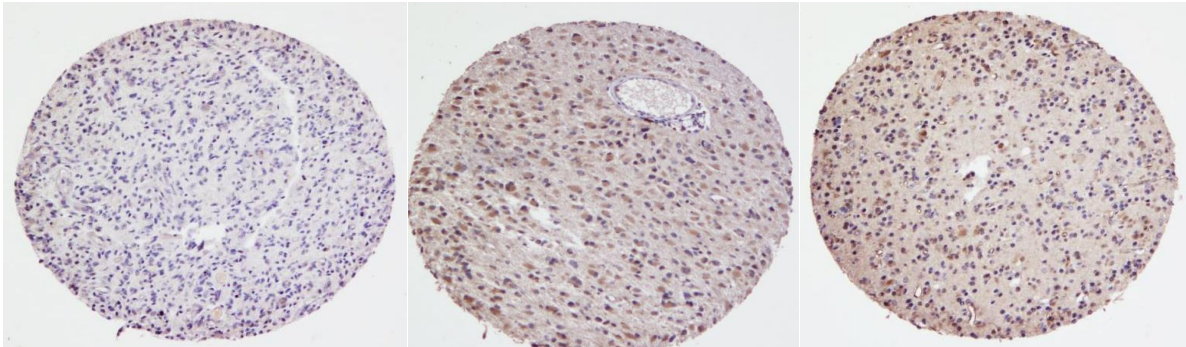


**Figure 18: Temps de survie globale et sans progression en fonction de l'intensité de l'expression de SPK, en 2 groupes. Groupe 1=intensité 1 et groupe 2=intensité 2-3. Analyse par log-rank test.**

## 5. Analyse multivariée

Le test de régression de cox, permettant d'examiner simultanément plusieurs variables (expression de SPK, d'endocan, grade tumoral, statut IDH1 et 1p19q) ne montrait pas de valeur pronostique significative de chacun de ces facteurs, hormis du grade tumoral ( $p=0,864$ , intervalle de confiance 0,431-1,733 pour le facteur intensité de SPK).

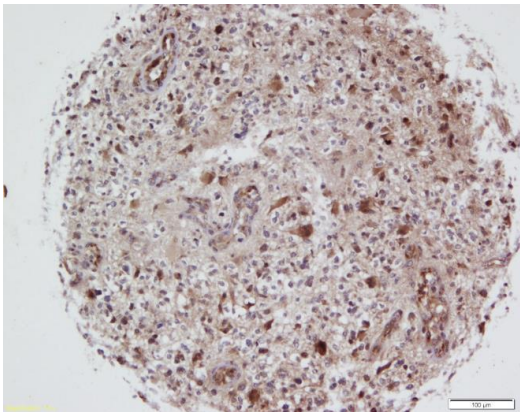
### Planche photo 18: expression immunohistochimique de la Sphingosine kinase



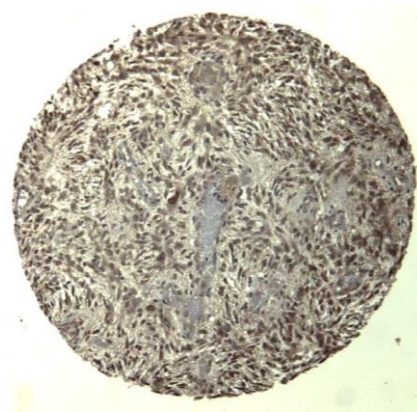
OII : grade intensité 1-score global 1

OAIII : grade intensité 2-score global 6

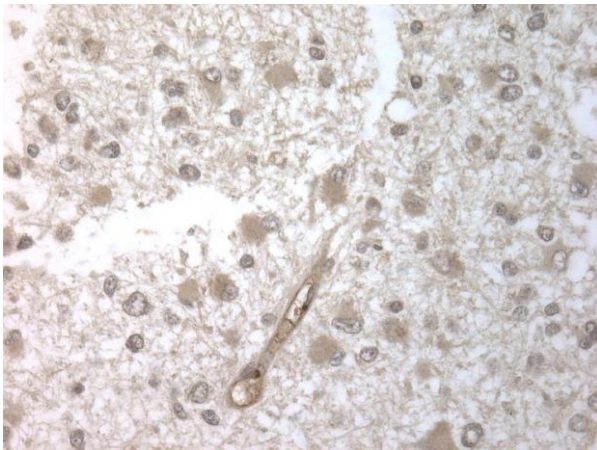
O III : grade intensité 3-score global 6



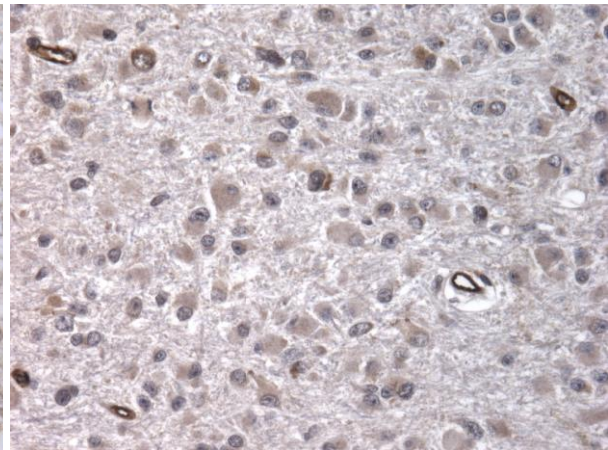
GBM : grade intensité 3-score global 6



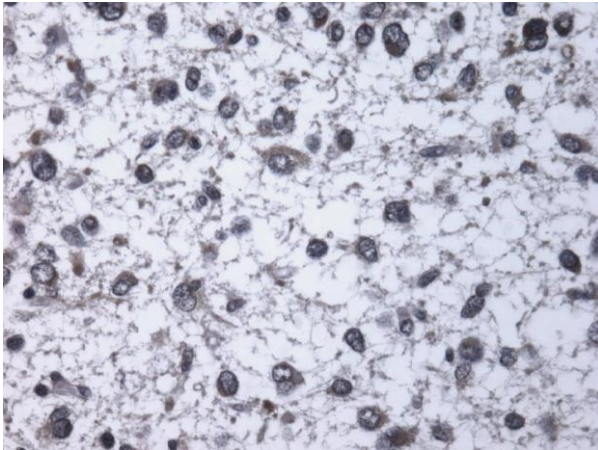
GBM : grade intensité 3-score global 9



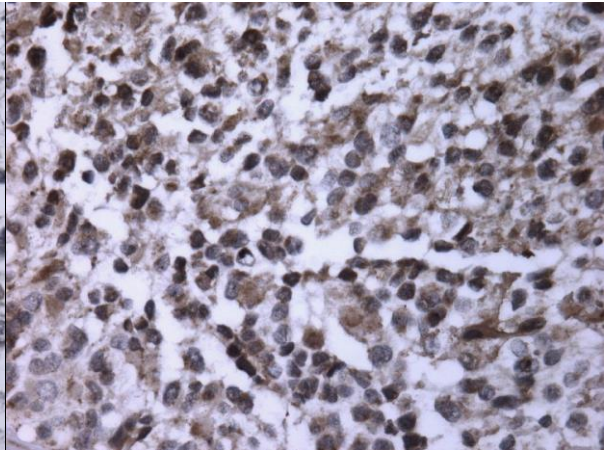
OA II : grade intensité 1- score global 2



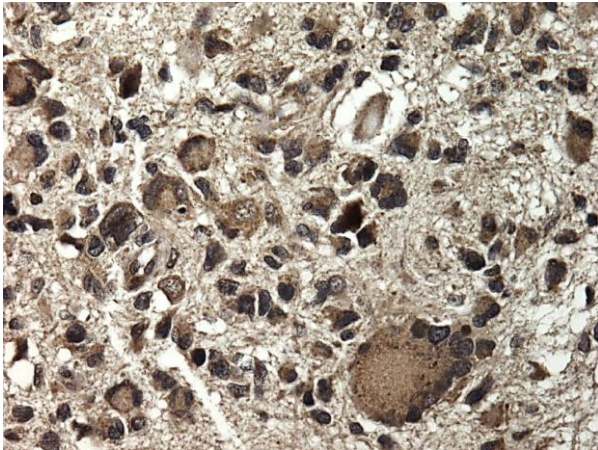
OA II : grade intensité 2-score global 4



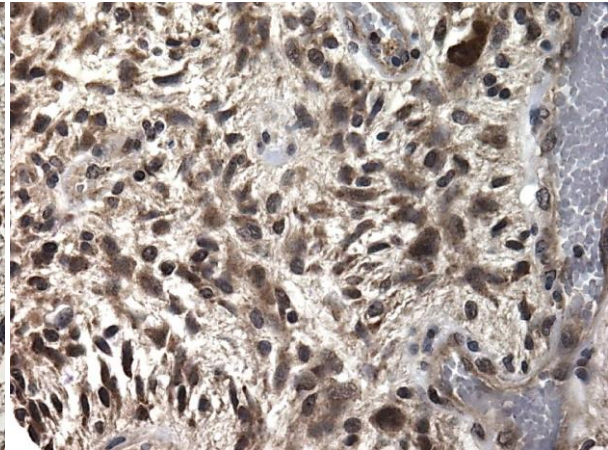
O II : grade intensité 2-score global 4



GBM : grade intensité 3-score global 6



GBM à cellules géantes : grade intensité 3- score-global 9



GBM : grade intensité 3-score global 9

## D. Sphingosine-1-phospho Lyase

Nous avons observé un marquage cytoplasmique d'intensité globalement faible sur l'ensemble des tumeurs, alors que le marquage était intense sur la muqueuse digestive témoin. Un marquage neuronal d'intensité modérée et plus faible sur une partie des cellules gliales était observé sur le tissu cérébral sain témoin.

### 1. Intensité de l'expression IHC de la SPL

Comme nous l'avons fait pour la SPKinase, l'intensité de l'expression de la SPL, gradée de 0 à 3, était recodée en 2 groupes : classe 1 (0 et 1) et 2 (2 et 3), dont voici la répartition en fonction des grades de gliomes [figure 19].

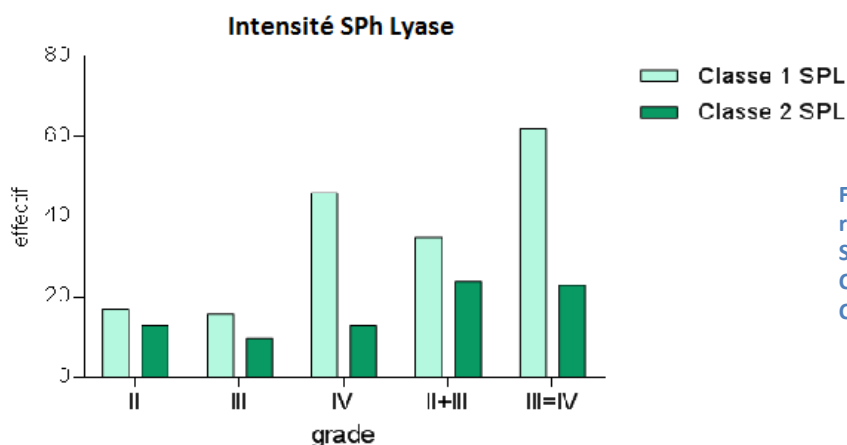


Figure 19: Graphique représentant la répartition des classes d'intensité IHC de la SPL en fonction du grade. Classe1= grade intensité 0-1 Classe 2=grade intensité 2-3

Ces valeurs étaient comparées en analyse univariée, entre les mêmes groupes de tumeurs que précédemment [tableau 10]. Les glioblastomes ont plus fréquemment une classe d'intensité IHC de la SPL basse ( $p < 0,001$ ). Ils présentent également plus fréquemment une faible intensité de l'expression de la SPL, comparé aux gliomes de grade II ( $p = 0,049$ ), aux gliomes de grade II et III ( $p = 0,046$ ) ou aux oligoastrocytomes de grade III ( $p = 0,009$ ). Les autres groupes de tumeurs étudiés, ne présentent pas de différence significative d'intensité de l'immunomarquage.

	<b>Classe 1 intensité SPL</b> (grade intensité 0 et 1)	<b>Classe 2 intensité SPL</b> (grade intensité 2 et 3)	<b>total</b>	<b>Test de Fisher<sup>†</sup> ou chi 2<sup>‡</sup></b>
<b>Grade II</b>	17	13	30	p=0,465 <sup>‡</sup>
<b>Grade III</b>	16	10	26	p=0,239 <sup>‡</sup>
<b>Grade IV</b>	46	13	59	<b>p&lt;0,001<sup>‡</sup></b>
<b>Grade IV</b>	46	13	59	<b>P=0,049<sup>†</sup></b>
<b>Grade II</b>	17	13	30	
<b>Grade II+III</b>	35	24	59	<b>P=0,046<sup>†</sup></b>
<b>Grade IV</b>	46	13	59	
<b>Grades II</b>	17	13	30	p=0,112 <sup>†</sup>
<b>Grades III+IV</b>	62	23	85	
<b>OA grade III</b>	6	9	15	<b>p= 0,009<sup>†</sup></b>
<b>GBM</b>	46	13	59	
<b>OD grade II</b>	13	7	17	p=0,202 <sup>†</sup>
<b>OD grade III</b>	10	1	11	
<b>Grades II+III 1p19q+</b>	8	3	11	p=0,308 <sup>†</sup>
<b>Grades II+III 1p19q-</b>	21	20	41	
<b>Grades II+III IDH1+</b>	17	12	29	p=1,00 <sup>†</sup>
<b>Grades II+III IDH1-</b>	16	11	27	
<b>GBM MGMT+</b>	22	6	28	p=1,00 <sup>†</sup>
<b>GBM MGMT-</b>	21	5	26	
<b>GBM endocan +</b>	42	13	55	P=0,566 <sup>†</sup>
<b>GBM endocan -</b>	4	0	4	
<b>Tous IDH1+</b>	18	12	30	p=0,257 <sup>†</sup>
<b>Tous IDH1-</b>	61	24	85	
<b>Tous Endocan +</b>	51	17	68	p=0,10 <sup>†</sup>
<b>Tous Endocan -</b>	28	19	47	

Tableau 10 : Comparaison de l'intensité de l'expression de la SPL, en fonction du type histologique, du grade OMS, des caractéristiques moléculaires et de l'expression d'Endocan.

## 2. Score global immunohistochimique de SP Lyase

Les valeurs du score global (% x intensité) étaient séparées en 2 groupes : classe 1 (score global 0 à 4) et classe 2 (score global 6 à 9). La répartition des classes IHC en fonction des grades tumoraux est représentée sur la figure 20.

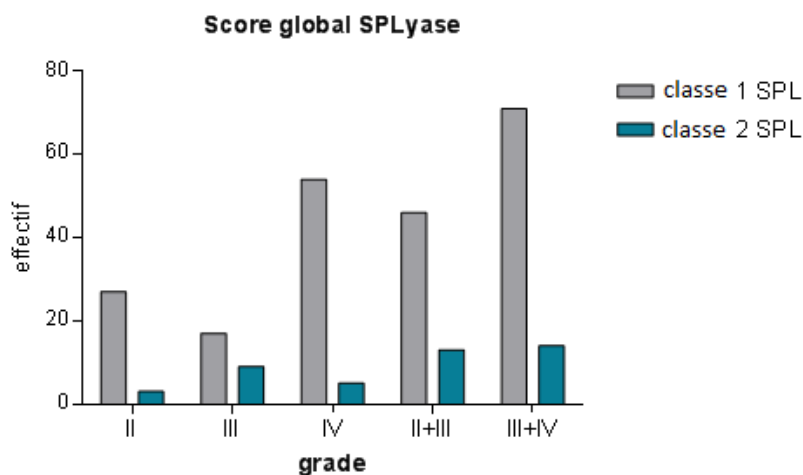


Figure 20: Graphique représentant la répartition de la classe du score global de SPL en fonction du grade tumoral. Classe 1=score global 0 à 4  
Classe 2=score global 6 à 9

### a) Comparaison des 2 classes du score global de l'expression de la SPL

L'expression de la SPL était plus fréquemment basse (classe 1) dans les glioblastomes que dans les oligoastrocytomes de grade III ( $p=0,0003$ ), mais pas lorsqu'on les comparait aux gliomes de grade II ( $p=1,0$ ), ou II et III regroupés ( $p=0,533$ ). Il n'y avait pas de différence significative des degrés d'expression de la SPL entre les autres groupes de tumeur analysés [tableau 11].

	Classe 1 score global SPL (score 0 à 4)	Classe 2 score global SPL (score 6 à 9)	total	Test de Fisher <sup>†</sup> ou Chi-2 <sup>‡</sup>
Grade II	27	3	30	p=0,465 <sup>‡</sup>
Grade III	17	9	26	p=0,239 <sup>‡</sup>
Grade IV	54	5	59	
Grade IV	54	5	59	p=1,00 <sup>†</sup>
Grade II	27	3	30	
Grade II+III	46	13	59	p=0,071 <sup>†</sup>
Grade IV	54	5	59	
Grades II	27	3	30	
Grades III+IV	71	14	85	p=0,553 <sup>†</sup>
OA grade III	7	8	15	<b>p= 0,0003<sup>†</sup></b>
GBM	54	5	59	
OD grade II	17	3	17	p=1,00 <sup>†</sup>
OD grade III	10	1	11	
Grades II+III 1p19q+	10	1	11	p=0,421 <sup>†</sup>
Grades II+III 1p19q-	30	11	41	
Grades II+III IDH1+	25	4	29	p=0,198 <sup>†</sup>
Grades II+III IDH1-	19	8	27	
GBM MGMT+	26	2	28	p=1,00 <sup>†</sup>
GBM MGMT-	25	1	26	
GBM endocan +	50	5	55	p=1,00 <sup>†</sup>
GBM endocan -	4	0	4	
Tous IDH1+	8	22	30	p=0,178 <sup>†</sup>
Tous IDH1-	13	72	85	
Tous Endocan+	60	8	68	p=0,296 <sup>†</sup>
Tous Endocan-	38	9	47	

Tableau 11: Comparaison du score global de SPL, en fonction du type histologique, du grade OMS, des caractéristiques moléculaires et de l'expression d'Endocan.



### b) Comparaison des moyennes du score global de la SPL

En analyse univariée, les glioblastomes avaient un score global IHC de la SPLyase significativement plus faible comparé au score global des gliomes de grade II ( $p=0,0468$ ), ou de grade II+III regroupés ( $p=0,0191$ ), mais de façon non significative aux gliomes de grade III ( $p=0,0567$ ) [figure 21]. L'expression de SPL était plus faible dans les tumeurs exprimant endocan que dans celles ne l'exprimant pas ( $p=0,0387$  par t test) [figure 22].

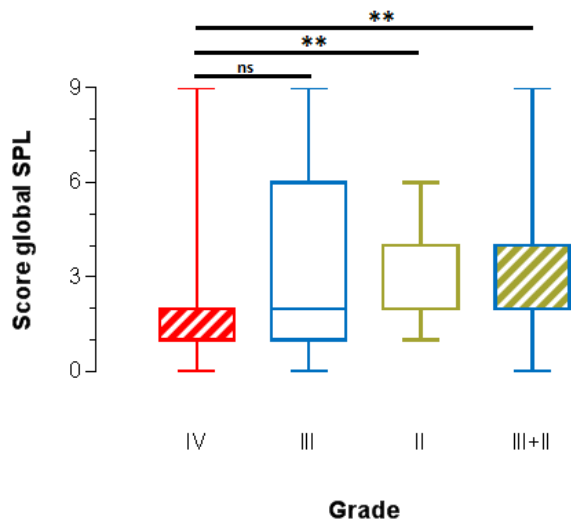


Figure 21: Graphique représentant les valeurs du score global de la SPL en fonction du grade OMS. Comparaison des moyennes par t test. \*\* =  $p < 0,05$

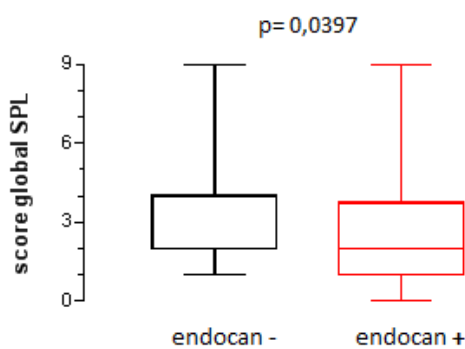


Figure 22: Graphique représentant les valeurs du score global de la SPL en fonction de l'expression endothéliale d'Endocan. Comparaison des moyennes par t test.

### 3. Test de corrélation statistique

Le test de corrélation statistique non paramétrique de Spearman montrait une corrélation inverse entre grade tumoral et intensité de l'expression de SPL ( $r=-0,222$ ,  $p=0,017$ ), et entre

grade tumoral et score global IHC de SPL ( $r=-0,266$ ,  $p=0,004$ ). Il n'existait pas de corrélation significative entre expression de la SPK et de la SPL, positive ou inverse.

#### 4. Temps de survie en fonction de l'expression de la SPLyase

L'analyse des temps de **survie globale et sans progression en fonction de l'intensité de l'expression IHC de la SPL**, représentée sur la figure 23, ne montrait pas de valeur pronostique significative ( $p=0,248$  pour la survie globale et  $p=0,705$  pour les survies sans progression).

L'analyse de la survie globale en fonction du score global de la sphingosine lyase (% x intensité) est représentée sur la figure 24. Etant donné le faible effectif de patients représentés par score, surtout dans les scores élevés, nous avons assemblé les scores 0 et 1 et les scores 3 à 9 ensemble afin d'augmenter la représentativité de l'analyse. La médiane de survie était moins élevée dans le groupe 1 (médiane de survie globale de 36 mois (IC 5-67)) que dans le groupe 2 (48 mois (IC 34-62)), sans valeur pronostique significative ( $p=0,123$  pour la survie globale et  $p=0,528$  pour la survie sans récurrence) [figure 25].

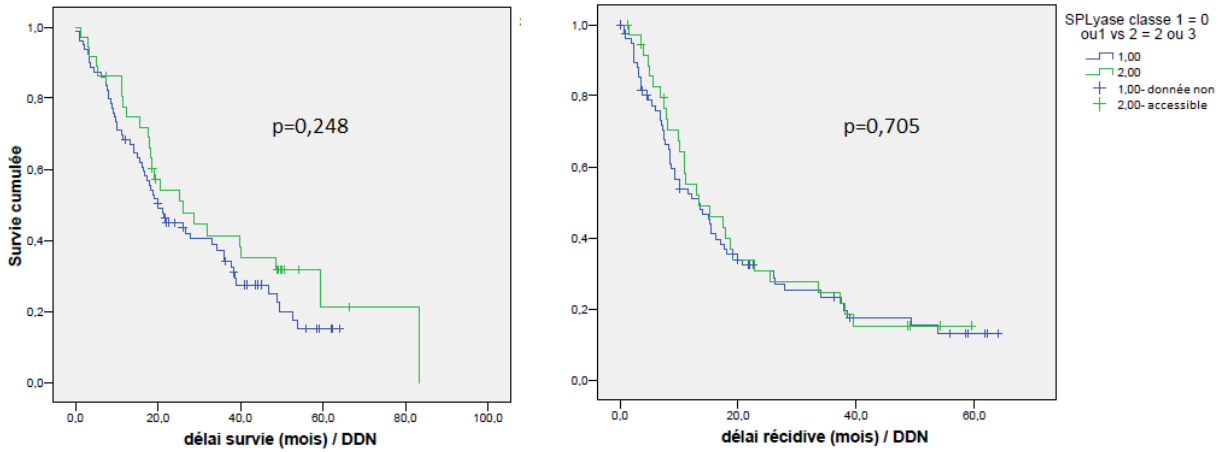


Figure 23: Temps de survie globale et sans progression en fonction de l'intensité de l'expression de la SPL, et analyse par log-rank test.

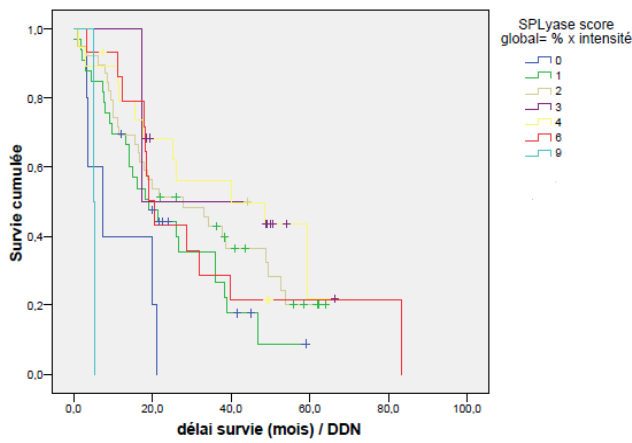


Figure 24: Temps de survie globale en fonction du score global immunohistochimique de la SPL.

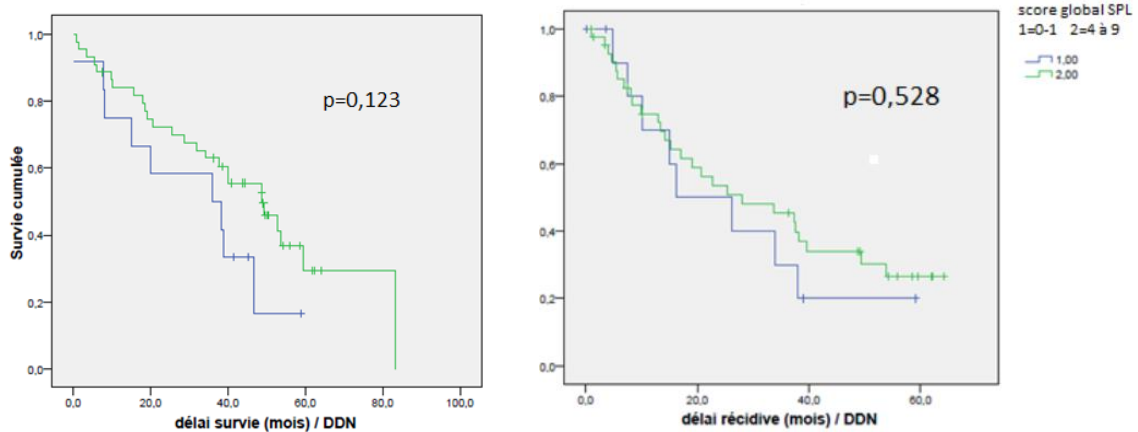
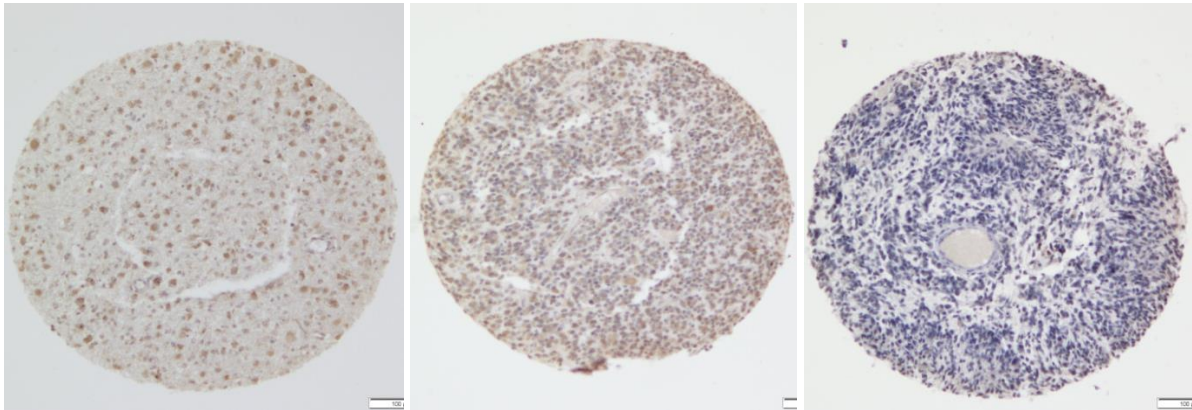
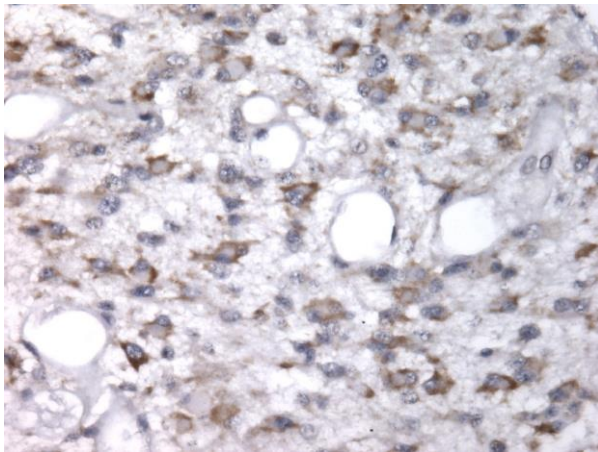


Figure 25: Survie globale et sans progression selon 2 sous-groupes du score global IHC de la SPL.

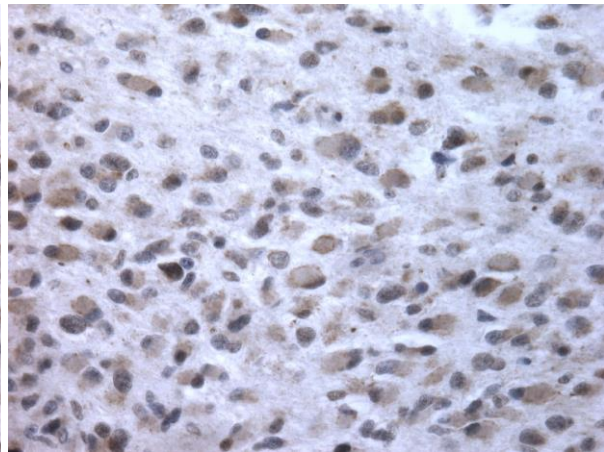
**Planche photo 19: expression immunohistochimique de la Sphingosine-1-phosphate lyase.**



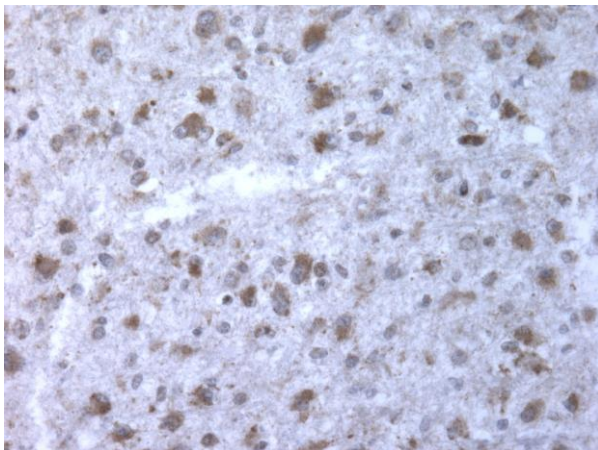
**OA II: grade intensité 3- score global 6    O III: grade intensité 2-score global 4    GBM: grade intensité 1-score global 1**



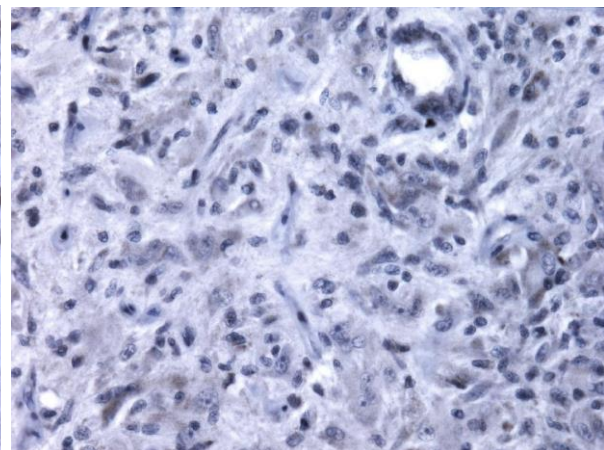
**OA III: grade intensité SPL2-score global 6**



**OA III: grade intensité SPL2-score global 6**



**OA III: grade intensité SPL3-score global 9**



**GBM: grade intensité SPL 1-score global 1**

## 5. Analyse multivariée

Le test de régression de cox, permettant d'examiner simultanément plusieurs variables (expression de SPL, d'endocan, grade tumoral, statut IDH1 et 1p19q) ne montrait pas de valeur pronostique significative de chacun de ces facteurs, hormis le grade tumoral ( $p=0,631$ , intervalle de confiance 0,583-1,386 pour le facteur intensité de l'expression de SPL)

### E. Score mixte spingosine kinase/lyase

Les résultats précédents montrent des modifications de l'expression IHC des sphingosines kinase et lyase, corrélées aux grades des tumeurs gliales : une baisse de l'expression de SPL et une surexpression de SPK, étaient associés à un grade élevé. Nous avons analysé ces 2 facteurs en même temps, en créant un « score mixte », qui combine les scores intensité de la SPK et de la SPL (- pour les grades d'intensité faible 0-1 et + pour les grades d'intensité modéré et forte 2-3) :

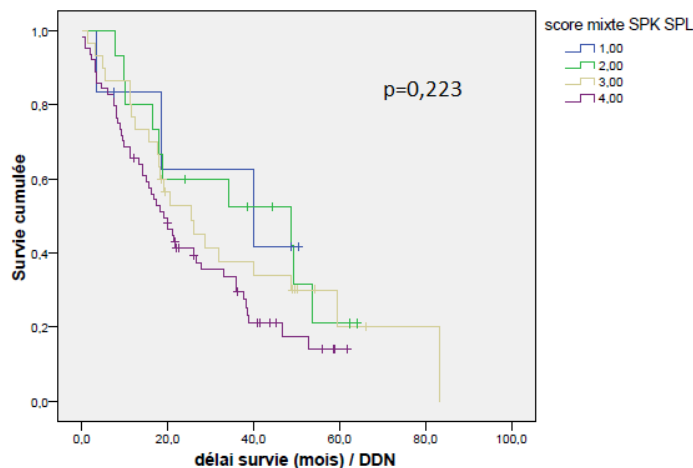
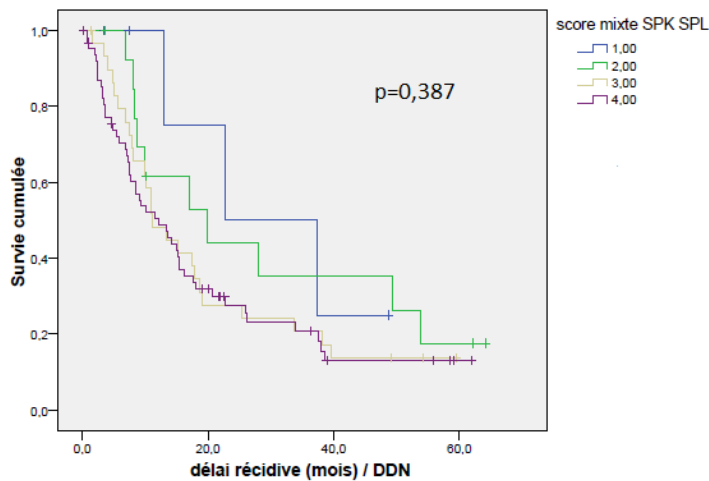
Score mixte 1: SPL + / SPK –

Score mixte 2: SPL - / SPK-

Score mixte 3: SPL + / SPK+

Score mixte 4: SPL - / SPK +

Nous avons analysé les temps de survie globale et sans progression des patients représentés par ce score mixte ; les médianes de survie variaient en sens inverse du score mixte, sans différence significative au log rank test ( $p=0,307$ ) [figure 25].



Figures 26: Temps de survies globale et sans progression en fonction du score mixte SPK/SPL.

## F. Endocan

### 1. Expression en immunohistochimie

Un marquage endothélial cytoplasmique était observé essentiellement sur les foyers de prolifération endothelio capillaire des gliomes haut grade [figure 27]. 93% des glioblastomes et 46% des gliomes de grade III (en proportion équivalente d'oligodendrogliomes et d'oligoastrocytomes) présentaient un marquage endothélial avec l'Ac anti-endocan. Un seul gliome de grade II présentait un marquage vasculaire d'Endocan : il s'agissait d'un oligodendrogliome ayant récidivé précocement, 4 mois après la chirurgie. L'expression endothéliale d'Endocan était significativement plus fréquente dans les gliomes de grade IV, que dans les gliomes de grade III ( $p<0,001$ , test de Fisher) et de grades II+III ( $p<0,001$ , test de Fisher).

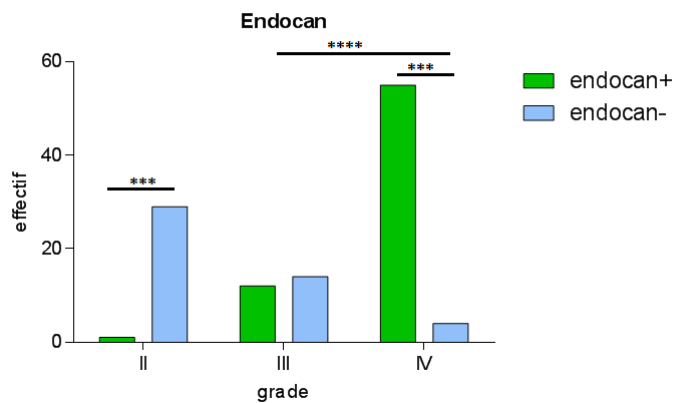


Figure 27: Expression endothéliale d'Endocan en fonction du grade OMS. \*\*\*= $p < 0,001$  \*\*\*\*= $p > 0,0001$ .

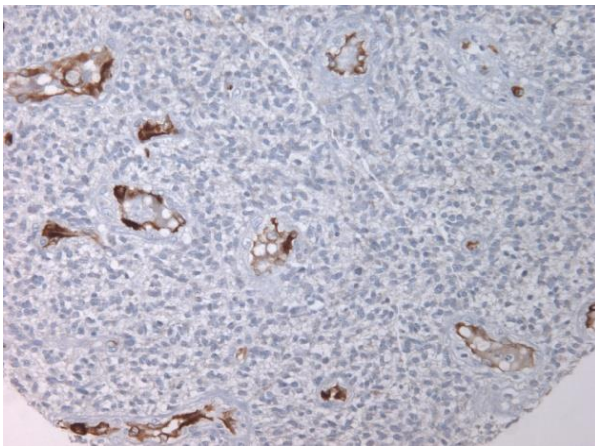


photo 21: GBM. Expression endothéliale d'endocan

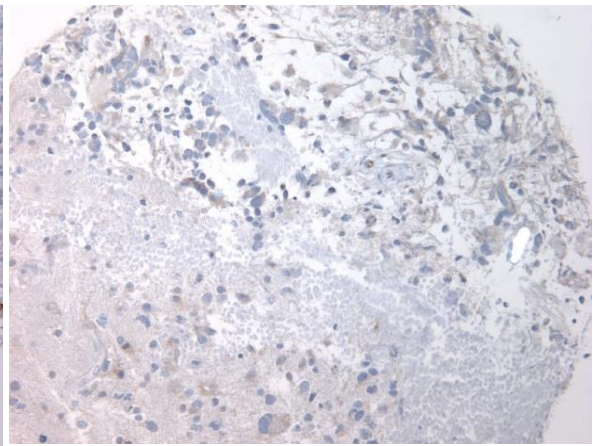


photo 20: marquage de cellules endothéliales dans les zones de nécrose palissadique d'un GBM

## 2. Temps de survie

Les médianes de survies globale et sans récurrence étaient significativement plus basses dans les gliomes présentant une expression endothéliale d'Endocan, que dans ceux n'en présentant pas ( $p < 0,001$ ). La valeur pronostique de l'expression d'Endocan était également retrouvée dans le sous-groupe des gliomes de grade II+III, pour la survie globale uniquement, mais pas dans le sous-groupe des gliomes de grade IV [tableau 12 et figures 28-29].

	Médiane survie globale endocan-	IC 95%	Médiane survie globale endocan +	IC 95%	Comparaison globale
<b>Tous cas</b>	48,84 (6,30)	36,4-61,2	16,54 (1,87)	12,8-20,2	<b>P&lt;0,001</b>
<b>Grades IV</b>	9,77 (4,91)	0,13-19,40	16,54 (1,94)	12,7-19,4	P=0,545
<b>Grades III+IV</b>	25,98 (6,35)	13,52-38,44	16,54 (2,01)	12,5-20,49	<b>P=0,049</b>

	Survie sans récurrence endocan -	IC à 95%	Survie sans récurrence endocan +	IC à 95%	Comparaison globale
<b>Tous cas</b>	33,65 (9,26)	15,4-51,8	8,48 (1,25)	6,02-10,9	P<0,001
<b>Grades IV</b>	8,65 (3,50)	1,78-15,5	8,48 (1,40)	5,73-11,2	P=0,912
<b>Grades III+IV</b>	15,46 (6,83)	2,0-28,8	9,20 (1,13)	6,62-11,7	P=0,191

Tableau 12: temps de survie cumulé calculé par méthode de Kaplan-Meier et analysé par log-rank test, en fonction de l'expression endothéliale d'Endocan.

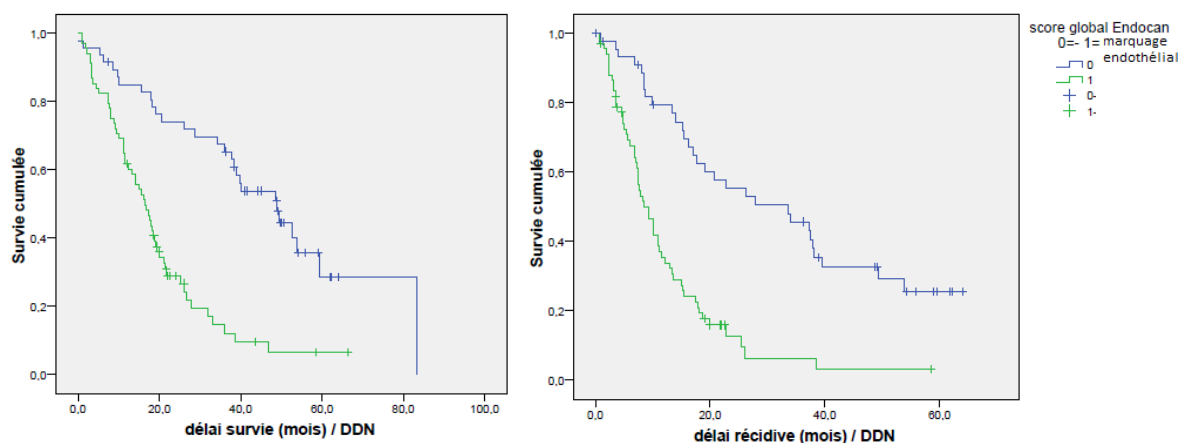


Figure 28: Temps de survies globale (gauche) et sans progression (droite) des gliomes en fonction de l'expression endothéliale d'Endocan.

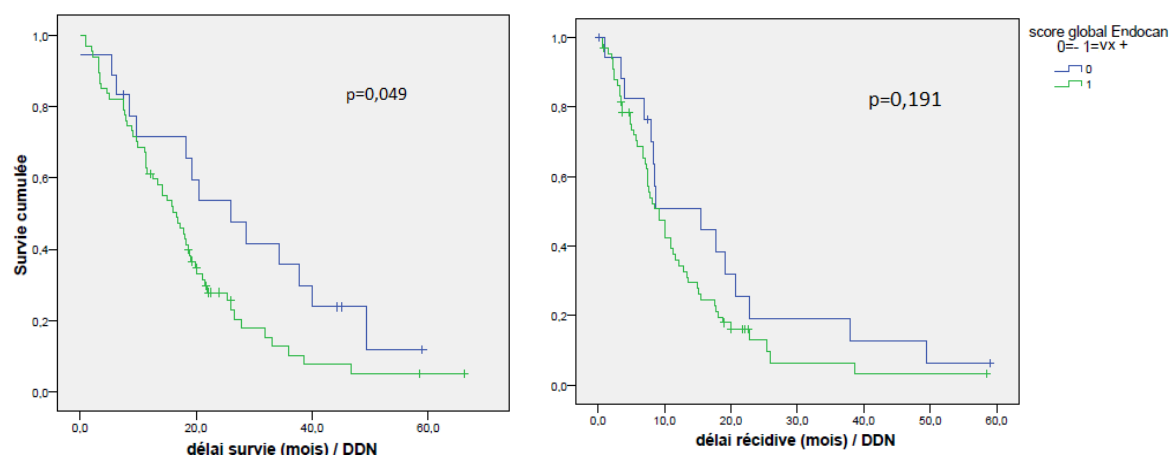


Figure 29: Temps de survies globale (gauche) et sans progression (droite) des gliomes de grades III+IV en fonction de l'expression endothéliale d'Endocan.



## V. DISCUSSION

Nous avons étudié par immunohistochimie les deux acteurs de la balance de régulation de la sphingosine-1Phosphate: l'enzyme oncogène sphingosine kinase et l'enzyme suppresseur de tumeur sphingosine-1Phosphate lyase. Nous avons en partie confirmé notre hypothèse de départ : il existe une variation inverse du niveau d'expression des 2 enzymes, le sens de la synthèse étant favorisé dans les gliomes de haut grade et celui de la dégradation dans les gliomes de bas grade.

### *Représentativité de la population*

La description de la population étudiée est en accord avec les données de la littérature, en termes de survie globale et sans progression (médiane de survie globale de 16 mois pour les glioblastomes, de 20 mois pour les gliomes de grade III, et de 53 mois pour les gliomes de grade II) (4–6). Pour ces derniers, il existe une discordance, sans doute à cause des patients perdus de vue.

Nous disposons également pour l'ensemble des patients des données moléculaires dont la recherche est recommandée par les référentiels en Neurooncologie. Dans notre étude, 52,7% des glioblastomes présentaient une hyperméthylation de MGMT, ce qui est proche de la fréquence de 40% des glioblastomes primaires retrouvée dans la littérature, ceci pouvant être relié au seuil de positivité et à la sensibilité élevée du pyroséquençage (11).

En revanche, la proportion de patients ayant une codélétion 1p19q est inférieure à celle décrite dans la littérature américaine (12). Dans notre étude, la codélétion 1p19q est présente dans 41% des oligodendrogliomes de grade III, 28% des oligodendrogliomes de grade II et 7 % des oligoastrocytomes de grade II et III. Le fait que 2 techniques de détection aient été appliquées

n'est à notre avis pas à mettre en cause : des études ont montré une bonne corrélation des résultats entre ces 2 techniques (12). Ceci pourrait être dû aux faibles effectifs.

Nous avons fait le choix d'une technique d'immunomarquage à haut débit : le TMA.

Regroupant un grand nombre d'échantillons sur un même bloc d'inclusion en paraffine, elle permet d'homogénéiser les conditions expérimentales, au détriment de la représentativité. Les tumeurs les plus hétérogènes, les glioblastomes, ont été suréchantillonnées par rapport aux autres tumeurs (9 carottes par cas).

Nous avons également combiné technique de TMA et FISH pour la détection de la codélétion 1p 19q. La faisabilité de la technique FISH sur TMA a déjà été publiée pour la recherche de la codélétion 1p19q (108–110). Bien qu'interprétable (sauf pour 2 cas), l'interprétation des lames était néanmoins difficile, en raison de la difficulté à naviguer sur la lame en épifluorescence et d'une atténuation inhabituellement marquée du signal (« *fading* ») du fait de l'allongement du temps d'observation par lame. Enfin, la petite taille des échantillons tissulaires ne permettait pas toujours d'avoir le nombre minimal de 200 cellules analysables requis.

La mutation du gène de l'isocitrate deshydrogénase 1 (IDH1) la plus fréquente est la mutation R132H (93%), dont le produit est détecté par immunohistochimie. Dans la littérature, la mutation R132H de IDH1 est retrouvée dans plus de 2/3 des gliomes de grade II, III (77% des gliomes de bas grade et 55% des gliomes de haut grade) et dans 55% des glioblastomes secondaires (34). Dans notre étude, nous retrouvons des valeurs proches. 64% des gliomes de grade II, 43% des gliomes de grade III, et 1,6% des glioblastomes présentaient une mutation R132H de IDH1 détectée par immunohistochimie. Le taux faible de mutation IDH1 détectée dans les glioblastomes s'explique car nous avons inclus principalement des glioblastomes *de novo*.

La mutation du gène IDH 1 est un marqueur pronostique indépendant des gliomes, quel que soit le grade (24,32,34). Dans notre étude, nous avons confirmé la valeur pronostique en analyse univariée de la mutation de IDH1 détectée par IHC, avec une médiane de survie globale de 49 mois pour les gliomes présentant une mutation R132H, contre une médiane de 17 mois pour les gliomes non mutés ( $p < 0,001$  par Log rank test). Cette valeur pronostique est retrouvée dans le sous-groupe des gliomes de grade III, mais pas dans le sous-groupe des gliomes de grade II ( $p = 0,424$ ). En analyse multivariée (analyse simultanée du grade, codélétion 1p19q, endocan), la mutation de IDH1 détectée par immunohistochimie n'a pas de valeur pronostique dans notre série en comparaison de la littérature (24,32,34). Ceci peut s'expliquer par le faible nombre de gliomes de bas grade étudiés, et par le fait que nous n'avons pas recherché les mutations minoritaires de *IDH* par séquençage.

Au total, nous considérons que notre population était malgré tout représentative et que les techniques réalisées sont adéquates.

#### *Association du score SPK et du grade histopronostique*

Nous avons analysé le marquage IHC de façon qualitative (intensité du marquage), et semi quantitative (% de cellules marquées) et appliqué un score inspiré de la littérature (54). Dans notre étude, nous avons une **importante significativité entre le degré d'expression de la SPK, et le grade tumoral des gliomes**, quel que soit le mode de comparaison : comparaison de l'intensité du marquage ou du score global IHC. L'expression de SPK est plus forte dans les glioblastomes comparée à l'expression dans les gliomes de grade II, de grade III, de grade II+III ou dans les OA III ( $p < 0,001$  à  $p = 0,019$ , selon la méthode de comparaison statistique). Le test de corrélation de Spearman montre également **une nette corrélation statistique entre**

**grade tumoral et expression IHC de la SPK** (intensité IHC comme score global IHC,  $p < 0,001$ ).

Des auteurs ont déjà montré dans différents cancers une surexpression de la SPK, conduisant à une augmentation des taux de shingosine-1-phosphate, lipide bioactif impliqué dans la division cellulaire, la survie et l'angiogenèse. La surexpression de SPK est corrélée au grade ou à la différenciation tumorale dans le cancer de prostate (67,69), les adénomes et adénocarcinomes colorectaux (68).

Dans les gliomes, un seul auteur s'est intéressé à l'expression en immunohistochimie de la SPK (54). Li et al. a comparé l'expression de la SPK dans des astrocytomes de grade I à IV. Aucun travail portant sur l'expression en immunohistochimie de la SPL dans les gliomes n'a été publié.

Ces résultats vont dans le sens de l'étude de Li et al. Cependant, les auteurs ont analysé l'expression de SPK dans des astrocytomes de grade III+IV, comparés aux astrocytomes de grade I+II. On peut se poser la question de la pertinence de la comparaison de ces groupes de tumeurs, puisque les astrocytomes pilocytiques (grade I) sont caractérisés par des altérations moléculaires différentes des autres gliomes (gain de chromosomes, altération de l'expression de gènes impliqués dans la neurogénèse) et sont souvent associés à une neurofibromatose de type 1 (111). Dans notre étude, nous avons comparé des groupes de tumeurs plus homogènes ayant des caractéristiques moléculaires communes. Comparer les glioblastomes, aux gliomes de grade II et III nous semblait pertinent, puisque ces derniers sont le plus souvent caractérisés par la présence d'une mutation de IDH et/ou d'une codélétion de 1p19q, et les glioblastomes *de novo* par la présence d'une amplification de EGFR, et d'une mutation de TP53. Dans cette même démarche, nous avons comparé des groupes de tumeurs plus restreints : oligodendrogliomes de grade II *versus* III, GBM *versus*

OA III, gliomes des grades II+III 1p19q+ *versus* 1p19q-, gliomes de grades II+III IDH1+ *versus* IDH1-, GBM MGMT+ *versus* MGMT-, et gliomes IDH1+ *versus* IDH1-. Cependant les analyses statistiques ne montraient pas de différence significative du degré d'expression de la SPL, hormis pour le groupe des GBM *versus* OAIII.

### *Association inverse du score SPL et du grade histopronostique*

Le test de corrélation statistique de Spearman montre une **corrélation inverse significative entre l'intensité de l'expression de la SPL et le grade tumoral. C'est la première fois que l'implication potentielle de la SPL est montrée dans les gliomes.**

Cependant, les résultats statistiques diffèrent selon le type d'analyse comparative effectuée. En analysant l'intensité du marquage, nous avons plus fréquemment une expression faible de la SPL dans les glioblastomes que dans les gliomes de grade II ( $p=0,049$ ), les gliomes grade II+III ( $p=0,046$ ), et les OA III ( $p=0,009$ ). En analysant le score global (classe 1=0 à 4 *versus* classe 2=6 à 9), nous n'obtenons de différence significative d'expression de la SPL qu'en comparant les GBM aux OAIII ( $p=0,0003$ ). Néanmoins, en comparant les moyennes du score global par student t test, les glioblastomes ont un score global de la SPL significativement plus faible, comparé au score global des gliomes de grade II ( $p=0,0468$ ) ou de grade II+III ( $p=0,0191$ ). Le mode binaire pour comparer les valeurs du score global n'est donc pas un test discriminant, pour la raison suivante : l'expression de SPL observé était globalement faible, peu de cas étant caractérisés par un score global supérieur à 4.

L'évaluation de l'expression IHC de la SPL la plus discriminante (et a priori la plus reproductible) est l'analyse de l'intensité du marquage. Cette évaluation a été utilisée par *Brizuela et al* pour l'analyse d'adénocarcinomes prostatiques, seule pathologie pour laquelle

une expression immunohistochimique de SPL a été rapportée (10). En effet il s'est avéré plus difficile d'évaluer le pourcentage de cellules marquées pour la lyase que pour la kinase : le marquage était souvent très faible en comparaison du tissu témoin digestif et le seuil de positivité était très difficile à déterminer pour l'observateur.

Ces résultats nous permettent d'appliquer aux tumeurs gliales de l'adulte un mécanisme moléculaire de cancérogénèse proposé sur des tumeurs épithéliales. La perte partielle ou totale de fonction de la SPL serait impliquée dans la cancérogénèse, suggérant que cette enzyme aurait un rôle suppresseur de tumeur.

#### *Analyse des temps de survie : absence de valeur pronostique des scores SPK et SPL*

Dans notre étude, **il n'a pas été mis en évidence de valeur pronostique péjorative de la surexpression de SPK dans les gliomes.**

Les données de survie, en fonction du score global de SPK, ne permettent pas d'être interprétées. Nous obtenons des temps de survie qui diminuent avec l'augmentation du score global SPK, mais uniquement pour les scores les plus élevés (4,6 et 9). Ceci peut en partie s'expliquer par le faible effectif des patients caractérisés par un score IHC faible. Les données de survie en fonction de l'intensité du marquage, montrent quant à elles, **une diminution de la survie, parallèle à l'augmentation de l'intensité de SPK, sans valeur pronostique significative** ( $p=0,083$  et  $0,081$  pour la comparaison des survies globales et sans progression, respectivement), peut être en raison du faible effectif de patients représentés par un score bas. Il n'est pas étonnant que l'analyse multivariée ne montre pas non plus de valeur pronostique à l'intensité de l'expression de SPK. Dans l'étude de *Li and al* (54), l'intensité de l'expression

de SPK était inversement corrélée à la survie, aussi bien en analyse univariée (comparaison des survies par log rank test), que multivariée (analyse de l'intensité du marquage, de l'âge et du grade histologique). Cependant ce travail associait de façon surprenante des astrocytomes pilocytiques et des glioblastomes et ne s'applique raisonnablement pas à notre étude plus cohérente du point de vue de la population.

Bien qu'une corrélation (inverse) ait été établie entre grade tumoral et expression de SPL dans notre étude, **nous ne montrons pas de valeur pronostique de ce marqueur immunohistochimique**, par analyse et comparaison des temps de survie. Aucune étude n'a cependant montré la valeur pronostique de ce marqueur dans les cancers.

#### *Expression différentielle du couple SPK/SPL*

Nous nous sommes intéressé à l'expression conjointe de ces deux enzymes, en établissant quatre catégories simplifiées : SPL+/SPK-, SPL-/SPK-, SPL+/SPK+ et SPL-/SPK+. Les temps de survie sont bien corrélés au profil de co-expression SPK/SPL, suivant la tendance attendue : plus courts pour les profils SPK haut/ SPL bas que pour les profils SPK bas/SPL haut, mais sans valeur pronostique.

Nos résultats concordent avec d'autres obtenus pour les cancers de la prostate : l'association d'une expression élevée de SPK et d'une expression basse de SPL (SPL-/SPK+) est corrélée à un score de Gleason élevé, et le profil inverse (SPL+/SPK-) à un score de Gleason faible (69). Des analyses de temps de survie n'avaient cependant pas été réalisées suivant ce modèle.

#### *Endocan et voie de la sphingosine-1P*

Nous confirmons dans cette étude la présence d'un **marquage endothélial dans les tumeurs gliales de haut grade**, en particulier dans les foyers de prolifération endothélio-capillaire.

Dans notre étude, **Endocan est un marqueur pronostique pour les gliomes de tous grades** en analyse univariée. Cela confirme la valeur pronostique défavorable de l'expression endothéliale d'Endocan déjà montrée dans de nombreuses tumeurs : cancers du sein, du poumon, du rein, de l'hypophyse, et du foie (92,93,96,97).

L'expression endothéliale d'Endocan n'est pas un bon marqueur pronostique pour le sous-groupe des glioblastomes ( $p=0,545$ ), possiblement parce que les tumeurs ne présentant pas de marquage vasculaire sont peu nombreuses. La présence d'un marquage endothélial d'Endocan est la traduction de la synthèse et de la sécrétion d'Endocan par les cellules endothéliales, en réponse à la présence de molécules pro-angiogéniques comme le VEGF ou HGF (80) sécrétées par les cellules tumorales de la plupart des glioblastomes.

En revanche, lorsqu'on regroupe les gliomes de haut grade, Endocan a une valeur pronostique en termes de survie globale ( $p=0,049$ ), mais pas de survie sans récurrence ( $p=0,191$ ).

Dans notre étude, l'expression de la **SPK est de façon significative plus élevée dans les tumeurs présentant un marquage endothélial d'Endocan** que dans celles n'en présentant pas ( $p<0,001$  à  $p=0,0027$  selon les analyses statistiques). La relation est inverse en ce qui concerne l'expression de SPL : **l'expression de SPL est plus faible dans les tumeurs présentant un marquage endothélial d'Endocan** que dans celles n'en présentant pas ( $p=0,0387$  par t test).

Cette association pourrait s'expliquer par le fait que la voie de la sphingosine-1P et la sécrétion d'Endocan sont régulées par des mécanismes communs : la voie sphingosine-1P est impliquée dans l'angiogénèse, tandis que la sécrétion d'endocan est stimulée par des molécules pro-angiogéniques comme le fibroblaste growth factor (FGF) ou le vascular endothelial growth factor (VEGF), dont les voies de signalisation sont mal connues.

L'induction de l'expression d'Endocan médiée par VEGF passerait par les voies de



signalisation PKC/NFKB et PI3K/AKT/FKHRL1. Cependant, aucun lien de causalité ne peut à l'heure actuelle être discuté. Leur mode d'action est différent.

La SPK est présente au niveau cytoplasmique, pour permettre la synthèse de S1P. La S1P peut agir soit en se liant à des récepteurs membranaires (S1P de type RCPG) et induire une cascade de signalisation paracrine et autocrine, soit en intracellulaire. Une de ses actions serait d'activer HIF1  $\alpha$  (58).

Enfin, aucune association significative n'a été mise en évidence dans notre étude entre degré d'expression de la SPK ou de la SPL, et les facteurs pronostiques reconnus des gliomes : détection IHC de la mutation *IDH1*, co-délétion et hyperméthylation de *MGMT*.

## VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans notre étude, nous avons étudié la pertinence de l'immunomarquage du couple sphingosine kinase 1/ sphingosine-1-phosphate lyase dans les gliomes infiltrants de l'adulte.

Nous montrons que l'expression immunohistochimique de la sphingosine kinase-1 est fortement corrélée au grade OMS des gliomes et validons un mode d'analyse du marquage immunohistochimique. L'expression de la sphingosine-1-P lyase est en revanche inversement corrélée au grade tumoral de l'OMS.

La balance SPK/SPL et l'expression d'Endocan sont associées dans les gliomes, les liens les unissant pourraient être l'angiogénèse tumorale et la réponse à l'hypoxie intra-tumorale.

Nos résultats suggèrent donc que le modèle de la balance de régulation SPK/SPL proposé pour les carcinomes pourrait s'appliquer à la gliomagénèse, à la lumière des récentes avancées de l'épigénétique et de l'implication des histones.

Les perspectives thérapeutiques ciblant la voie de la SIP actuellement en cours d'évaluation chez l'animal sur des lignées carcinomateuses, pourraient l'être sur des modèles expérimentaux de gliomes.

## VII. BIBLIOGRAPHIE

1. Rigau V, Zouaoui S, Mathieu-Daudé H, Darlix A, Maran A, Trétarre B, et al. French Brain Tumor DataBase: 5-Year Histological Results on 25 756 Cases. *Brain Pathology*. 2011;21(6):633-44.
2. Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2005–2009. *Neuro Oncol*. 11 janv 2012;14(suppl 5):v1-v49.
3. Ohgaki H, Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol*. 1 janv 2005;109(1):93-108.
4. 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*. août 2007;114(2):97-109.
5. Cairncross G, Berkey B, Shaw E, Jenkins R, Scheithauer B, Brachman D, et al. Phase III trial of chemotherapy plus radiotherapy compared with radiotherapy alone for pure and mixed anaplastic oligodendroglioma: Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402. *J. Clin. Oncol*. 20 juin 2006;24(18):2707-2714.
6. Van den Bent MJ, Carpentier AF, Brandes AA, Sanson M, Taphoorn MJB, Bernsen HJJA, et al. 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*. 20 juin 2006;24(18):2715-2722.
7. Van den Bent MJ. Interobserver variation of the histopathological diagnosis in clinical trials on glioma: a clinician's perspective. *Acta Neuropathol*. sept 2010;120(3):297-304.
8. Kros JM, Gorlia T, Kouwenhoven MC, Zheng P-P, Collins VP, Figarella-Branger D, et al. Panel review of anaplastic oligodendroglioma from European Organization For Research and Treatment of Cancer Trial 26951: assessment of consensus in diagnosis, influence of 1p/19q loss, and correlations with outcome. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*. juin 2007;66(6):545-551.
9. Figarella-Branger D, Bouvier C. [Histological classification of human gliomas: state of art and controversies]. *Bull Cancer*. avr 2005;92(4):301-309.
10. Figarella-Branger, Mokhtari, Capron. *Neuropathologie tumorale*. 2011.
11. Riemenschneider MJ, Reifenberger G. Molecular neuropathology of gliomas. *Int J Mol Sci*. janv 2009;10(1):184-212.
12. Broholm H, Born PW, Guterbaum D, Dyrbye H, Laursen H. Detecting chromosomal alterations at 1p and 19q by FISH and DNA fragment analysis--a comparative study in human gliomas. *Clin. Neuropathol*. déc 2008;27(6):378-387.

13. 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.* 7 oct 1998;90(19):1473-1479.
14. Smith JS, Perry A, Borell TJ, Lee HK, O'Fallon J, Hosek SM, et al. Alterations of chromosome arms 1p and 19q as predictors of survival in oligodendrogliomas, astrocytomas, and mixed oligoastrocytomas. *J. Clin. Oncol.* févr 2000;18(3):636-645.
15. Ino Y, Betensky RA, Zlatescu MC, Sasaki H, Macdonald DR, Stemmer-Rachamimov AO, et al. Molecular subtypes of anaplastic oligodendroglioma: implications for patient management at diagnosis. *Clin. Cancer Res.* avr 2001;7(4):839-845.
16. Felsberg J, Erkwow A, Sabel MC, Kirsch L, Fimmers R, Blaschke B, et al. Oligodendroglial tumors: refinement of candidate regions on chromosome arm 1p and correlation of 1p/19q status with survival. *Brain Pathol.* avr 2004;14(2):121-130.
17. Fontaine D, Vandebos F, Lebrun C, Paquis V, Frenay M. [Diagnostic and prognostic values of 1p and 19q deletions in adult gliomas: critical review of the literature and implications in daily clinical practice]. *Rev. Neurol. (Paris).* juill 2008;164(6-7):595-604.
18. Weller M, Berger H, Hartmann C, Schramm J, Westphal M, Simon M, et al. Combined 1p/19q loss in oligodendroglial tumors: predictive or prognostic biomarker? *Clin. Cancer Res.* 1 déc 2007;13(23):6933-6937.
19. Idbaih A, Ducray F, Dehais C, Courdy C, Carpentier C, De Bernard S, et al. SNP array analysis reveals novel genomic abnormalities including copy neutral loss of heterozygosity in anaplastic oligodendrogliomas. *PLoS ONE.* 2012;7(10):e45950.
20. Yip S, Butterfield YS, Morozova O, Chittaranjan S, Blough MD, An J, et al. Concurrent CIC mutations, IDH mutations, and 1p/19q loss distinguish oligodendrogliomas from other cancers. *J. Pathol.* janv 2012;226(1):7-16.
21. Sahm F, Koelsche C, Meyer J, Pusch S, Lindenberg K, Mueller W, et al. CIC and FUBP1 mutations in oligodendrogliomas, oligoastrocytomas and astrocytomas. *Acta Neuropathol.* juin 2012;123(6):853-860.
22. Bettgowda C, Agrawal N, Jiao Y, Sausen M, Wood LD, Hruban RH, et al. Mutations in CIC and FUBP1 contribute to human oligodendroglioma. *Science.* 9 sept 2011;333(6048):1453-1455.
23. Idbaih A, Marie Y, Pierron G, Brennetot C, Hoang-Xuan K, Kujas M, et al. Two types of chromosome 1p losses with opposite significance in gliomas. *Ann. Neurol.* sept 2005;58(3):483-487.
24. Kim Y-H, Nobusawa S, Mittelbronn M, Paulus W, Brokinkel B, Keyvani K, et al. Molecular Classification of Low-Grade Diffuse Gliomas. *Am J Pathol.* déc 2010;177(6):2708-2714.

25. Labussière M, Idbaih A, Wang X-W, Marie Y, Boisselier B, Falet C, et al. All the 1p19q codeleted gliomas are mutated on IDH1 or IDH2. *Neurology*. 8 juin 2010;74(23):1886-1890.
26. Gan HK, Kaye AH, Luwor RB. The EGFRvIII variant in glioblastoma multiforme. *Journal of Clinical Neuroscience*. juin 2009;16(6):748-754.
27. Huncharek M, Kupelnick B. Epidermal growth factor receptor gene amplification as a prognostic marker in glioblastoma multiforme: results of a meta-analysis. *Oncol. Res*. 2000;12(2):107-112.
28. Viana-Pereira M, Lopes JM, Little S, Milanezi F, Basto D, Pardal F, et al. Analysis of EGFR overexpression, EGFR gene amplification and the EGFRvIII mutation in Portuguese high-grade gliomas. *Anticancer Res*. avr 2008;28(2A):913-920.
29. Coulibaly B, Nanni I, Quilichini B, Gaudart J, Metellus P, Fina F, et al. Epidermal growth factor receptor in glioblastomas: correlation between gene copy number and protein expression. *Hum. Pathol*. juin 2010;41(6):815-823.
30. Guillaudeau A, Durand K, Rabinovitch-Chable H, Pommepuy I, Mesturoux L, Robert S, et al. Adult diffuse gliomas produce mRNA transcripts encoding EGFR isoforms lacking a tyrosine kinase domain. *Int. J. Oncol*. avr 2012;40(4):1142-1152.
31. Raynaud S, Carbuccia N, Colin C, Adélaïde J, Mozziconacci M-J, Metellus P, et al. Absence of R140Q mutation of isocitrate dehydrogenase 2 in gliomas and breast cancers. *Oncol Lett*. sept 2010;1(5):883-884.
32. Metellus P, Coulibaly B, Colin C, De Paula AM, Vasiljevic A, Taieb D, et al. Absence of IDH mutation identifies a novel radiologic and molecular subtype of WHO grade II gliomas with dismal prognosis. *Acta Neuropathol*. déc 2010;120(6):719-729.
33. Bent MJ van den, Dubbink HJ, Marie Y, Brandes AA, Taphoorn MJB, Wesseling P, 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*. 3 janv 2010;16(5):1597-1604.
34. Sanson M, Marie Y, Paris S, Idbaih A, Laffaire J, Ducray F, et al. Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J. Clin. Oncol*. 1 sept 2009;27(25):4150-4154.
35. Brat D, Prayson R, Ryken T, Olson J. Diagnosis of malignant glioma: role of neuropathology. *Journal of Neuro-Oncology*. 2008;89(3):287-311.
36. Van den Bent MJ, Dubbink HJ, Sanson M, Van der Lee-Haarloo CR, Hegi M, Jeuken JWM, et al. MGMT promoter methylation is prognostic but not predictive for outcome to adjuvant PCV chemotherapy in anaplastic oligodendroglial tumors: a report from EORTC Brain Tumor Group Study 26951. *J. Clin. Oncol*. 10 déc 2009;27(35):5881-5886.

37. Stupp R, Hegi ME, Van den Bent MJ, Mason WP, Weller M, Mirimanoff RO, et al. Changing paradigms--an update on the multidisciplinary management of malignant glioma. *Oncologist*. févr 2006;11(2):165-180.
38. Everhard S, Kaloshi G, Crinière E, Benouaich-Amiel A, Lejeune J, Marie Y, et al. MGMT methylation: A marker of response to temozolomide in low-grade gliomas. *Annals of Neurology*. 2006;60(6):740-3.
39. DeAngelis LM. Anaplastic Glioma: How to Prognosticate Outcome and Choose a Treatment Strategy. *JCO*. 12 oct 2009;27(35):5861-5862.
40. Wick W, Hartmann C, Engel C, Stoffels M, Felsberg J, Stockhammer F, et al. NOA-04 randomized phase III trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with procarbazine, lomustine, and vincristine or temozolomide. *J. Clin. Oncol*. 10 déc 2009;27(35):5874-5880.
41. Louis DN, Von Deimling A, Chung RY, Rubio MP, Whaley JM, Eibl RH, et al. Comparative study of p53 gene and protein alterations in human astrocytic tumors. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*. janv 1993;52(1):31-38.
42. Peraud A, Kreth FW, Wiestler OD, Kleihues P, Reulen H-J. Prognostic impact of TP53 mutations and P53 protein overexpression in supratentorial WHO grade II astrocytomas and oligoastrocytomas. *Clin. Cancer Res*. mai 2002;8(5):1117-1124.
43. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Patre P-LD, et al. Genetic Pathways to Glioblastoma A Population-Based Study. *Cancer Res*. 10 janv 2004;64(19):6892-6899.
44. Peraud A, Kreth FW, Wiestler OD, Kleihues P, Reulen H-J. Prognostic Impact of TP53 Mutations and P53 Protein Overexpression in Supratentorial WHO Grade II Astrocytomas and Oligoastrocytomas. *Clin Cancer Res*. 5 janv 2002;8(5):1117-1124.
45. Hoang-Xuan K, Idbaih A, Mokhtari K, Sanson M. [Towards a molecular classification of gliomas]. *Bull Cancer*. avr 2005;92(4):310-316.
46. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, et al. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell*. mars 2006;9(3):157-173.
47. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, et al. Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. janv 2010;17(1):98-110.
48. Turcan S, Rohle D, Goenka A, Walsh LA, Fang F, Yilmaz E, et al. IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature*. 15 févr 2012;483(7390):479-483.

49. Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, Phillips HS, Pujara K, Berman BP, et al. Identification of a CpG Island Methylator Phenotype that Defines a Distinct Subgroup of Glioma. *Cancer Cell*. 18 mai 2010;17(5):510-522.
50. Venneti S, Thompson CB. Metabolic modulation of epigenetics in gliomas. *Brain Pathol.* mars 2013;23(2):217-221.
51. Fontebasso AM, Liu X-Y, Sturm D, Jabado N. Chromatin remodeling defects in pediatric and young adult glioblastoma: a tale of a variant histone 3 tail. *Brain Pathol.* mars 2013;23(2):210-216.
52. Sturm D, Witt H, Hovestadt V, Khuong-Quang D-A, Jones DTW, Konermann C, et al. Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer Cell*. 16 oct 2012;22(4):425-437.
53. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, et al. An integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR and NF1. *Cancer Cell*. 19 janv 2010;17(1):98.
54. Li J, Guan H-Y, Gong L-Y, Song L-B, Zhang N, Wu J, et al. Clinical Significance of Sphingosine Kinase-1 Expression in Human Astrocytomas Progression and Overall Patient Survival. *Clin Cancer Res*. 11 janv 2008;14(21):6996-7003.
55. Kumar A, Saba JD. Lyase to live by: sphingosine phosphate lyase as a therapeutic target. *Expert Opin. Ther. Targets*. août 2009;13(8):1013-1025.
56. Young N, Van Brocklyn JR. Roles of Sphingosine-1-Phosphate (S1P) Receptors in Malignant Behavior of Glioma Cells. Differential Effects of S1P2 on Cell Migration and Invasiveness. *Exp Cell Res*. 1 mai 2007;313(8):1615-1627.
57. Hla T. Physiological and pathological actions of sphingosine 1-phosphate. *Semin. Cell Dev. Biol*. oct 2004;15(5):513-520.
58. Cuvillier O. la voie sphingosine kinase-1/sphingosine 1-phosphate dans l'hypoxie tumorale. *VEGF actu*. mars 2012;
59. Hait NC, Allegood J, Maceyka M, Strub GM, Harikumar KB, Singh SK, et al. Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate. *Science*. 4 sept 2009;325(5945):1254-1257.
60. Patwardhan GA, Liu Y-Y. Sphingolipids and expression regulation of genes in cancer. *Prog Lipid Res*. janv 2011;50(1):104-114.
61. Johnson KR, Johnson KY, Crellin HG, Ogretmen B, Boylan AM, Harley RA, et al. Immunohistochemical distribution of sphingosine kinase 1 in normal and tumor lung tissue. *J. Histochem. Cytochem*. sept 2005;53(9):1159-1166.

62. French KJ, Schrecengost RS, Lee BD, Zhuang Y, Smith SN, Eberly JL, et al. Discovery and evaluation of inhibitors of human sphingosine kinase. *Cancer Res.* 15 sept 2003;63(18):5962-5969.
63. Van Brocklyn JR, Jackson CA, Pearl DK, Kotur MS, Snyder PJ, Prior TW. Sphingosine kinase-1 expression correlates with poor survival of patients with glioblastoma multiforme: roles of sphingosine kinase isoforms in growth of glioblastoma cell lines. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* août 2005;64(8):695-705.
64. Sutphen R, Xu Y, Wilbanks GD, Fiorica J, Grendys EC Jr, LaPolla JP, et al. Lysophospholipids are potential biomarkers of ovarian cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* juill 2004;13(7):1185-1191.
65. Le Scolan E, Pchejetski D, Banno Y, Denis N, Mayeux P, Vainchenker W, et al. Overexpression of sphingosine kinase 1 is an oncogenic event in erythroleukemic progression. *Blood.* 1 sept 2005;106(5):1808-1816.
66. Van Brocklyn JR, Jackson CA, Pearl DK, Kotur MS, Snyder PJ, Prior TW. Sphingosine kinase-1 expression correlates with poor survival of patients with glioblastoma multiforme: roles of sphingosine kinase isoforms in growth of glioblastoma cell lines. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* août 2005;64(8):695-705.
67. Malavaud B, Pchejetski D, Mazerolles C, De Paiva GR, Calvet C, Doumerc N, et al. Sphingosine kinase-1 activity and expression in human prostate cancer resection specimens. *Eur. J. Cancer.* déc 2010;46(18):3417-3424.
68. Oskouian B, Sooriyakumaran P, Borowsky AD, Crans A, Dillard-Telm L, Tam YY, et al. Sphingosine-1-phosphate lyase potentiates apoptosis via p53- and p38-dependent pathways and is down-regulated in colon cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 14 nov 2006;103(46):17384-17389.
69. Brizuela L, Ader I, Mazerolles C, Bocquet M, Malavaud B, Cuvillier O. First evidence of sphingosine 1-phosphate lyase protein expression and activity downregulation in human neoplasm: implication for resistance to therapeutics in prostate cancer. *Mol. Cancer Ther.* sept 2012;11(9):1841-1851.
70. French KJ, Upson JJ, Keller SN, Zhuang Y, Yun JK, Smith CD. Antitumor activity of sphingosine kinase inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* août 2006;318(2):596-603.
71. Chae S-S, Paik J-H, Furneaux H, Hla T. Requirement for sphingosine 1-phosphate receptor-1 in tumor angiogenesis demonstrated by in vivo RNA interference. *J. Clin. Invest.* oct 2004;114(8):1082-1089.
72. Visentin B, Vekich JA, Sibbald BJ, Cavalli AL, Moreno KM, Matteo RG, et al. Validation of an anti-sphingosine-1-phosphate antibody as a potential therapeutic in reducing growth, invasion, and angiogenesis in multiple tumor lineages. *Cancer Cell.* mars 2006;9(3):225-238.



73. Brinkmann V, Lynch KR. FTY720: targeting G-protein-coupled receptors for sphingosine 1-phosphate in transplantation and autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* oct 2002;14(5):569-575.
74. Vessey DA, Kelley M, Zhang J, Li L, Tao R, Karliner JS. Dimethylsphingosine and FTY720 inhibit the SK1 form but activate the SK2 form of sphingosine kinase from rat heart. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 2007;21(5):273-279.
75. Gault CR, Obeid LM. Still benched on its way to the bedside: sphingosine kinase 1 as an emerging target in cancer chemotherapy. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* août 2011;46(4):342-351.
76. Zhang H, Li W, Sun S, Yu S, Zhang M, Zou F. Inhibition of sphingosine kinase 1 suppresses proliferation of glioma cells under hypoxia by attenuating activity of extracellular signal-regulated kinase. *Cell Prolif.* avr 2012;45(2):167-175.
77. Kapitonov D, Allegood JC, Mitchell C, Hait NC, Almenara JA, Adams JK, et al. Targeting sphingosine Kinase 1 inhibits AKT signaling, induces apoptosis and suppresses growth of human glioblastoma cells and xenografts. *Cancer Res.* 1 sept 2009;69(17):6915-6923.
78. Sarrazin S, Adam E, Lyon M, Depontieu F, Motte V, Landolfi C, et al. Endocan or endothelial cell specific molecule-1 (ESM-1): a potential novel endothelial cell marker and a new target for cancer therapy. *Biochim. Biophys. Acta.* janv 2006;1765(1):25-37.
79. Bécharde D, Gentina T, Delehedde M, Scherpereel A, Lyon M, Aumercier M, et al. Endocan Is a Novel Chondroitin Sulfate/Dermatan Sulfate Proteoglycan That Promotes Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor Mitogenic Activity. *J. Biol. Chem.* 21 déc 2001;276(51):48341-48349.
80. Lassalle P, Molet S, Janin A, Heyden JV der, Tavernier J, Fiers W, et al. ESM-1 Is a Novel Human Endothelial Cell-specific Molecule Expressed in Lung and Regulated by Cytokines. *J. Biol. Chem.* 23 août 1996;271(34):20458-20464.
81. Aitkenhead M, Wang S-J, Nakatsu MN, Mestas J, Heard C, Hughes CCW. Identification of endothelial cell genes expressed in an in vitro model of angiogenesis: induction of ESM-1, (beta)ig-h3, and NrCAM. *Microvasc. Res.* mars 2002;63(2):159-171.
82. Abid MR, Yi X, Yano K, Shih S-C, Aird WC. Vascular endocan is preferentially expressed in tumor endothelium. *Microvasc. Res.* nov 2006;72(3):136-145.
83. Delehedde M, Devenyns L, Maurage C-A, Vivès RR. Endocan in cancers: a lesson from a circulating dermatan sulfate proteoglycan. Hindawi publishing corporation. in press.
84. Gerritsen ME, Tomlinson JE, Zlot C, Ziman M, Hwang S. Using gene expression profiling to identify the molecular basis of the synergistic actions of hepatocyte growth factor and vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *British Journal of Pharmacology.* oct 2003;140(4):595-610.

85. Cecchi F, Rabe DC, Bottaro DP. Targeting the HGF/Met signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin. Ther. Targets.* juin 2012;16(6):553-572.
86. Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM. MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* déc 2010;11(12):834-848.
87. Shin JW, Huggenberger R, Detmar M. Transcriptional profiling of VEGF-A and VEGF-C target genes in lymphatic endothelium reveals endothelial-specific molecule-1 as a novel mediator of lymphangiogenesis. *Blood.* 15 sept 2008;112(6):2318-2326.
88. Grigoriu BD, Depontieu F, Scherpereel A, Gourcerol D, Devos P, Ouatas T, et al. Endocan Expression and Relationship with Survival in Human Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res.* 8 janv 2006;12(15):4575-4582.
89. Veer LJ van 't, Bernards R. Enabling personalized cancer medicine through analysis of gene-expression patterns. *Nature.* 4 févr 2008;452(7187):564-570.
90. Lenburg ME, Liou LS, Gerry NP, Frampton GM, Cohen HT, Christman MF. Previously unidentified changes in renal cell carcinoma gene expression identified by parametric analysis of microarray data. *BMC Cancer.* 27 nov 2003;3:31.
91. Harris M. Monoclonal antibodies as therapeutic agents for cancer. *The Lancet Oncology.* mai 2004;5(5):292-302.
92. Leroy X, Aubert S, Zini L, Franquet H, Kervoaze G, Villers A, et al. Vascular endocan (ESM-1) is markedly overexpressed in clear cell renal cell carcinoma. *Histopathology.* janv 2010;56(2):180-187.
93. Cornelius A, Cortet-Rudelli C, Assaker R, Kerdraon O, Gevaert M-H, Prévot V, et al. Endothelial Expression of Endocan Is Strongly Associated with Tumor Progression in Pituitary Adenoma. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* [Internet]. 21 févr 2012 [cité 26 sept 2012]; Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22353248>
94. Maurage C-A, Adam E, Minéo J-F, Sarrazin S, Debunne M, Siminski R-M, et al. Endocan expression and localization in human glioblastomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* juin 2009;68(6):633-641.
95. Amatschek S, Koenig U, Auer H, Steinlein P, Pacher M, Gruenfelder A, et al. Tissue-wide expression profiling using cDNA subtraction and microarrays to identify tumor-specific genes. *Cancer Res.* 1 févr 2004;64(3):844-856.
96. Borczuk AC, Shah L, Pearson GDN, Walter KL, Wang L, Austin JHM, et al. Molecular Signatures in Biopsy Specimens of Lung Cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 15 juill 2004;170(2):167-174.
97. Huang G-W, Tao Y-M, Ding X. Endocan Expression Correlated with Poor Survival in Human Hepatocellular Carcinoma. *Dig Dis Sci.* 1 févr 2009;54(2):389-394.

98. Sathornsumetee S, Rich JN. Antiangiogenic therapy in malignant glioma: promise and challenge. *Curr. Pharm. Des.* 2007;13(35):3545-3558.
99. Rubenstein JL, Kim J, Ozawa T, Zhang M, Westphal M, Deen DF, et al. Anti-VEGF Antibody Treatment of Glioblastoma Prolongs Survival But Results in Increased Vascular Cooption. *Neoplasia (New York, N.Y.)*. juill 2000;2(4):306.
100. Miletic H, Niclou SP, Johansson M, Bjerkvig R. Anti-VEGF therapies for malignant glioma: treatment effects and escape mechanisms. *Expert Opin. Ther. Targets.* avr 2009;13(4):455-468.
101. Kunkel P, Ulbricht U, Bohlen P, Brockmann MA, Fillbrandt R, Stavrou D, et al. Inhibition of Glioma Angiogenesis and Growth in Vivo by Systemic Treatment with a Monoclonal Antibody against Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2. *Cancer Res.* 15 sept 2001;61(18):6624-6628.
102. Wen PY. New therapies for recurrent glioblastomas. *F1000 Med Rep [Internet]*. 9 déc 2009 [cité 27 févr 2013];1. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2948331/>
103. Norden AD, Drappatz J, Wen PY. Novel anti-angiogenic therapies for malignant gliomas. *Lancet Neurol.* déc 2008;7(12):1152-1160.
104. Goldbrunner RH, Bendszus M, Wood J, Kiderlen M, Sasaki M, Tonn J-C. PTK787/ZK222584, an inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases, decreases glioma growth and vascularization. *Neurosurgery.* août 2004;55(2):426-432; discussion 432.
105. Adamson C. The future role of personalized medicine in the treatment of glioblastoma multiforme. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine.* août 2010;111.
106. Perry J, Okamoto M, Guiou M, Shirai K, Errett A, Chakravarti A. Novel Therapies in Glioblastoma. *Neurology Research International.* 2012;2012:1-14.
107. Malavaud B, Pchejetski D, Mazerolles C, De Paiva GR, Calvet C, Doumerc N, et al. Sphingosine kinase-1 activity and expression in human prostate cancer resection specimens. *Eur. J. Cancer.* déc 2010;46(18):3417-3424.
108. Fuller CE, Wang H, Zhang W, Fuller GN, Perry A. High-throughput molecular profiling of high-grade astrocytomas: the utility of fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays (TMA-FISH). *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* déc 2002;61(12):1078-1084.
109. Brat DJ, Seiferheld WF, Perry A, Hammond EH, Murray KJ, Schulsinger AR, et al. Analysis of 1p, 19q, 9p, and 10q as prognostic markers for high-grade astrocytomas using fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays from Radiation Therapy Oncology Group trials. *Neuro-oncol.* avr 2004;6(2):96-103.

110. Yip S, Iafrate AJ, Louis DN. Molecular diagnostic testing in malignant gliomas: a practical update on predictive markers. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* janv 2008;67(1):1-15.
111. Scheithauer BW, Hawkins C, Tihan T, Vandenberg S, Burger PC. WHO 2007.

**AUTEUR : Nom : JAMET**

**Prénom : Marie-Pierre**

**Date de Soutenance : 11 avril 2013**

**Titre de la Thèse :** La balance synthèse/dégradation de la Sphingosine-1-phosphate dans les gliomes. Intérêt pronostique de l'immunomarquage de l'enzyme oncogène Sphingosine kinase et de l'enzyme suppresseur de tumeur Sphingosine-1-phosphate lyase.

**Thèse - Médecine - Lille 2013**

**Cadre de classement :** DES Anatomie et Cytologie pathologiques

**Mots-clés :** Gliomes. Sphingosine-1-phosphate. Sphingosine Kinase. Sphingosine-1-phosphate lyase.

**Résumé : contexte :** les gliomes sont classés selon les critères de la classification de l'OMS, dont la reproductibilité interobservateur est imparfaite. Des outils moléculaires diagnostiques, pronostiques et prédictifs validés font partie de la démarche diagnostique et thérapeutique. L'apparition récente de nouvelles altérations moléculaires bouleverse la perception de la valeur pronostique de l'OMS et des modèles reconnus de gliomagénèse. La sphingosine-1-phosphate (S1P) est un lipide bioactif dont le taux est régulé par deux enzymes : la sphingosine-kinase 1 SPK (synthèse) et la sphingosine-1-phospho lyase SPL (dégradation). La SPK, lipide kinase oncogénique, est surexprimée et la SPL, enzyme suppresseur de tumeur est réprimée dans les carcinomes. La valeur pronostique de SPK a été suggérée dans les gliomes.

**Méthode :** nous avons étudié l'expression en immunohistochimie (IHC) de la SPK et de la SPL sur 121 gliomes de l'adulte échantillonnés sur tissu multi array (TMA), et celle de marqueurs pronostiques déjà établis (mutation IDH1, codélétion 1p19q, méthylation de MGMT et endocan).

**Résultats :** l'expression immunohistochimique de la SPK est fortement corrélée au grade OMS des gliomes ( $p < 0,001$ ). La corrélation entre intensité de l'expression de la Sphingosine-1-P lyase et le grade tumoral est inverse ( $p = 0,017$ ). Nous ne montrons pas de valeur pronostique de l'expression de la SPK et la SPL dans les gliomes, ni aucune association avec la codélétion 1p19q, la méthylation de MGMT ou la mutation IDH1. En revanche, une association significative avec Endocan attire l'attention sur le rôle pro-angiogénique de S1P. Ces résultats nous permettent d'appliquer aux tumeurs gliales de l'adulte un modèle de cancérogénèse suggéré dans les carcinomes. De nouveaux traitements ciblant la voie de la Sphingosine-1-phosphate pourraient être proposés aux patients atteints de gliomes.

**Composition du Jury :**

**Président : Madame le Professeur Nicole PORCHET**

**Assesseurs : Monsieur le Professeur Claude-Alain MAURAGE (DT)**

**Monsieur le Professeur Sébastien AUBERT**

**Monsieur le Docteur Marc BARONCINI**

**Madame le Docteur Maryse DELEHEDDE**