

**MEMOIRE
POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE BIOLOGIE MEDICALE**

**Soutenu publiquement le Vendredi 06 Juin 2014
Par Melle DREMAUX Julie**

**Conformément aux dispositions du Décret du 10 septembre 1990
tient lieu de**

THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

LES ANOMALIES CYTOGENETIQUES DES GLIOMES

APPORT DU CARYOTYPE MOLECULAIRE

PAR ANALYSE COMPARATIVE SUR PUCE A ADN (ACPA)

AU DIAGNOSTIC

Membres du jury

Président : Monsieur le Professeur Thierry BROUSSEAU, PU-PH
Institut de Biochimie et biologie moléculaire, CHRU de Lille

Assesseurs : Madame le Professeur Nicole PORCHET, PU-PH
Institut de Biochimie et biologie moléculaire, CHRU de Lille

Monsieur le Professeur Claude-Alain MAURAGE, PU-PH
Institut de Pathologie, CHRU de Lille

Madame le Docteur Fabienne ESCANDE, PH
Institut de Biochimie et biologie moléculaire, CHRU de Lille

Directeur de thèse : Madame le Docteur Catherine ROCHE-LESTIENNE, MCU-PH
Institut de Génétique Médicale, CHRU Lille



**Faculté des Sciences Pharmaceutiques
et Biologiques de Lille**



**Université Lille 2
Droit et Santé**

Université Lille 2 – Droit et Santé

Président : Professeur Xavier VANDENDRIESSCHE
Vice- présidents : Professeur Alain DUROCHER
Professeur Régis BORDET
Professeur Patrick PELAYO
Professeur Frédéric LOBEZ
Professeur Monique CAPRON
Professeur Salem KACET
Madame Stéphanie DAMAREY
Monsieur Pierre RAVAUX
Monsieur Larbi AIT-HENNANI
Monsieur Edouard DANJOU

Directeur Général des Services : Monsieur Pierre-Marie ROBERT

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Doyen : Professeur Luc DUBREUIL
Vice-Doyen, 1^{er} assesseur : Professeur Damien CUNY
Assesseurs : Mme Nadine ROGER
Professeur Philippe CHAVATTE
Chef des services administratifs : Monsieur André GENY

Liste des Professeurs des Universités :

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BAILLEUL	François	Pharmacognosie
M.	BERTHELOT	Pascal	Chimie Thérapeutique 1
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	Chimie Thérapeutique 2
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie Générale
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie Générale
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mlle	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GESQUIERE	Jean-Claude	Chimie Organique
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
Mme	GRAS	Hélène	Chimie Thérapeutique 3

M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie thérapeutique 2
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY – MAILLOLS	Anne Catherine	Droit et déontologie pharmaceutique
Mlle	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire
M	TARTAR	André	Chimie Organique
M.	VACCHER	Claude	Chimie Analytique
M.	MILLET	Régis	Chimie Thérapeutique (ICPAL)

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	BRUNET	Claude	Pharmacologie
Mme	CAPRON	Monique	Immunologie
M.	DECAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DINE	Thierry	Pharmacie clinique
M.	DUBREUIL	Luc	Bactériologie
M.	DUTHILLEUL	Patrick	Hématologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
M.	DEPREUX	Patrick	Chimie Organique (ICPAL)

Liste des Maitres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique 2
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique
M.	BEGHYN	Terence	Chimie Thérapeutique 3
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
Mme	CACHERA	Claude	Biochimie
M.	CARATO	Pascal	Chimie Thérapeutique 2
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie cellulaire
Mlle	CHABÉ	Magali	Parasitologie
Mlle	CHARTON	Julie	Chimie Organique
M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie

Mlle	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
Melle	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
M.	FARCE	Amaury	Chimie Thérapeutique 2
Mlle	FLIPO	Marion	Chimie Organique
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie
M.	GELEZ	Philippe	Biomathématiques
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mlle	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique 1
Mlle	LEONHARD	Julie	Droit et déontologie pharmaceutique
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	LORIN-LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
M.	MOUTON	Nicolas	Physique
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NEUT	Christel	Bactériologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Melle	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
M.	SERGHERAERT	Eric	Droit et déontologie pharmaceutique
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
Mlle	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
Mme	THUILLIER	Pascale	Hématologie
Mme	VANHOUTTE	Geneviève	Biochimie
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique
M.	YOUS	Saïd	Chimie Thérapeutique 1
M.	FURMAN	Christophe	Pharmacobiochimie (ICPAL)
Mme	GOOSSENS	Laurence	Chimie Organique (ICPAL)

Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie

Professeurs Agrégés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	MAYES	Martine	Anglais
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et déontologie pharmaceutique

Professeurs Certifiés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mlle	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeurs Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ABADIE	Eric	Droit et déontologie pharmaceutique

Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BERTOUX	Elisabeth	Pharmacie Clinique - Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
M.	FIEVET	Pierre	Information Médicale
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	WATRELOS	Michel	Droit et déontologie pharmaceutique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique



Université Lille 2
Droit et Santé

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

**L'Université n'entend donner aucune approbation aux
opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à
leurs auteurs.**

REMERCIEMENTS

A mon président du jury,

Monsieur le Professeur Thierry BROUSSEAU,

Professeur des Universités et Praticien Hospitalier

Chef du service de Biochimie automatisée, Protéines et Biologie Prédictive de l'Institut de Biochimie-Biologie Moléculaire du CHRU de Lille

Professeur de Biochimie – Biologie moléculaire à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

Pour l'honneur que vous me faites de juger ce travail et de présider cette soutenance de thèse,

Merci également pour la qualité de vos enseignements tout au long du cursus des études pharmaceutiques,

Veillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

A ma directrice de thèse,

Madame le Docteur Catherine ROCHE-LESTIENNE,

Maître de Conférences Universitaires – Praticien Hospitalier

Responsable de l'UF Cytogénétique Oncologique de l'Institut de Génétique Médicale, Hôpital
Jeanne de Flandre - CHRU de Lille

Pour m'avoir fait l'honneur de diriger cette thèse,

J'ai beaucoup apprécié votre disponibilité, vos conseils et remarques pertinentes tout au long de ces travaux qui ont permis à l'aboutissement de ce projet.

Un grand merci également pour le temps que vous avez accordé pour les relectures de ce mémoire et toutes les remarques utiles à son élaboration,

Veillez trouver dans ce travail l'expression de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect,

Sincères remerciements.

A mes juges,

Madame le Professeur Nicole PORCHET,

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Chef de service du Laboratoire d' Hormonologie, Métabolisme, Nutrition et Oncologie de
l'Institut de Biochimie-Biologie Moléculaire du CHRU de Lille

Vous avez accepté de juger ce travail,

Je tiens à vous remercier pour le grand intérêt que vous portez à ce projet et tout ce que vous mettez en œuvre pour qu'il puisse se concrétiser.

Veillez trouver dans ce travail, l'expression de mon respect et de ma gratitude.

Monsieur le Professeur Claude-Alain MAURAGE,

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Institut de Pathologie du CHRU de Lille

Pour l'honneur que vous me faites de siéger parmi les membres du jury.

Je tenais à vous remercier pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail en sélectionnant les patients inclus dans les cohortes.

Soyez assuré de ma sincère reconnaissance.

Madame le Docteur Fabienne ESCANDE,

Praticien Hospitalier

Secteur d'Oncologie et Génétique Moléculaires de l'institut de Biochimie-Biologie moléculaire
du CHRU de Lille

Pour l'honneur que tu me fais de juger ce travail.

Merci beaucoup pour ta collaboration, tes conseils avisés, ta disponibilité et ton écoute.

Que ce travail soit l'occasion de t'exprimer ma sincère reconnaissance et ma profonde estime.

Mes remerciements s'adressent également à toutes les personnes ayant contribué à ce travail,

Stephen DUCOIN,

Technicien de laboratoire dans le secteur d'oncologie et génétique moléculaires de l'Institut de Biochimie-Biologie moléculaire du CHRU de Lille

Je te remercie d'avoir accepté de t'investir dans ce projet, de m'avoir secondé dans tous les essais de mise au point. Tout au long du projet, tu as fait preuve de bonne volonté et d'efficacité.

Caroline THUILLIER et Alexis LEURENT ainsi que toute l'équipe des biopuces,

Secteur des Biopuces, Institut de Génétique Médicale, Hôpital Jeanne de Flandre - CHRU de Lille

Un grand merci pour votre disponibilité, votre aide et votre patience et pour toute l'expertise que vous nous avez apportée ! Vous avez simplifié beaucoup de chose dans la mise en place du projet ! Un énorme merci à tous !

Céline VILLENET et toute l'équipe de la Plate-forme de Génomique Fonctionnelle et Structurale de l'IRCL,

Pour les conseils apportés grâce à votre expérience et savoir-faire.

Madame le Docteur Carole RAMIREZ,

Praticien Hospitalier, Service de neurochirurgie, Hôpital Roger Salengro, CHRU de Lille

Merci pour votre contribution dans la mise à jour des données cliniques et thérapeutiques.

Je remercie également,

Pour leur investissement et la qualité de la formation que j'ai pu avoir au cours de ces quatre années d'internat,

L'équipe du laboratoire d'oncologie et génétique moléculaires de l'Institut de Biochimie-Biologie moléculaire du CHRU de Lille,

Lors de mon passage en tant qu'externe dans votre équipe, vous m'avez fait découvrir et apprécier la biologie moléculaire des tumeurs solides. J'ai choisi d'orienter ma spécialisation en oncologie et de revenir un semestre parmi vous, merci à tous !

L'équipe de l'Institut de Génétique médicale, Hôpital Jeanne de Flandre du CHRU de Lille,

Merci pour votre accueil pendant ce stage, et la souplesse accordée pour me permettre de me consacrer à mon travail de thèse ! Ce semestre a été très enrichissant et très intéressant par la découverte de la cytogénétique onco-hématologique, qui complète bien ma formation. Merci à tous !

L'équipe du laboratoire d'oncobiologie moléculaire du CHU d'Amiens,

Après le Master 2 et mon premier semestre de spécialisation de niveau 2, vous m'avez donné envie de continuer. Merci de m'accueillir à nouveau ce semestre pour mon dernier stage d'internat. Merci à tous !

A mes parents,

Parce que sans vous, je ne serai pas arrivée là où je suis aujourd'hui. Vous m'avez toujours soutenue pour que je réussisse mon parcours.

Parce que vous êtes toujours présents quand j'ai besoin de vous.

Merci pour votre aide et votre soutien au quotidien.

A Florian,

Merci d'être toujours resté auprès de moi pendant ces longues années d'études !

Merci pour ta grande patience face à mon caractère changeant lors des révisions d'examens.

J'ai toujours pu compter sur toi, je t'en remercie car tu m'as aidé à aller jusqu'au bout !

A Guillaume et Julie, Pauline et Nicolas,

Depuis toute petite vous m'avez montré les choses à faire et à ne pas faire, je vous ai suivis et j'ai écouté vos conseils de grand-frère et grande-sœur. Merci pour tout !

A toute ma famille,

*Vous tous qui êtes venus en ce jour et pour tous ceux qui n'ont pas pu se déplacer.
Merci à tous.*

A tous mes amis, mes co-internes,

De l'école maternelle jusqu'à la fac puis pendant l'internat à Amiens et à Lille, j'ai rencontré beaucoup de personnes extraordinaires.

Je dédie ce travail à mes proches qui nous ont quittés, emportés par la maladie,

Papi Paul et mes oncles Patrick et Jean-Pierre.

TABLE DES MATIERES

Liste des abbréviations.....	
Première partie : Généralités.....	1
I. Les Gliomes	1
A. Définition, étiologie et épidémiologie des tumeurs cérébrales	1
B. Classification des gliomes	2
C. Clinique et diagnostic des gliomes	5
(1) Clinique.....	5
(2) Imagerie.....	5
(3) Diagnostic anatomopathologique	6
D. Pronostic des gliomes	6
(1) Facteurs pronostiques des gliomes de bas grade	7
(2) Facteurs pronostiques des gliomes anaplasiques	8
(3) Classification pronostique des glioblastomes	9
E. Prise en charge thérapeutique des gliomes.....	9
II. La Gliomagénèse	12
A. Dérégulation du cycle cellulaire.....	12
(1) Dérégulation de la voie P53	12
a. Mécanisme d'action et régulation de la voie P53	12
b. Implication de la voie P53 dans la gliomagénèse.....	15
(2) Dérégulation de la voie RB1.....	16
a. Mécanisme d'action et régulation de la voie RB1	16
b. Implication de la voie RB1 dans la gliomagénèse	16
B. Activation des voies de transduction du signal intracellulaire.....	17
(1) Mécanisme d'action des voies dépendantes des facteurs de croissance : exemple de l' EGFR.....	17
(2) Implication de la voie de l'EGFR dans la gliomagénèse	18
(3) Implication des autres voies de transduction dans la gliomagénèse.....	19
C. Codélétion 1p19q	20
(1) Découverte de la codélétion 1p19q	20
(2) Implication de la codélétion 1p19q dans la gliomagénèse	21
III. Anomalies génétiques des gliomes	22
A. Marqueurs moléculaires diagnostiques, pronostiques et prédictifs de chimiosensibilité : vers une classification histomoléculaire.....	22
B. Anomalies chromosomiques des gliomes.....	24
(1) Les astrocytomes.....	24
a. Astrocytomes de grade II	24
b. Astrocytomes de haut grade	24
c. Glioblastomes <i>de novo</i>	25

(2) Les oligodendrogliomes	26
(3) Les oligoastrocytomes	27
IV. Méthodes d'exploration des anomalies chromosomiques des gliomes	29
A. L'analyse moléculaire des anomalies chromosomiques	29
(1) Recherche de perte d'hétérozygotie.....	29
(2) La MLPA®	31
B. L'hybridation <i>in situ</i> : la FISH.....	32
(1) Principe.....	32
(2) Application dans les gliomes	32
C. La Cytogénétique conventionnelle.....	33
(1) Principe.....	33
(2) Application dans les gliomes	34
D. La cytogénétique moléculaire : l'ACPA.....	34
(1) Historique de l'ACPA.....	35
(2) Principe.....	35
(3) Application dans les gliomes	36
V. Objectifs	38
Deuxième partie: Matériels et méthodes	40
I. Patients inclus	40
II. Préparation du matériel biologique	43
A. Extraction d'ADN génomique, quantification et évaluation de la qualité.....	43
B. Amplification d'ADN génomique	43
C. Hybridation génomique comparative sur puce à ADN	44
(1) Digestion enzymatique.....	45
(2) Marquage à la cyanine	45
(3) Hybridation.....	46
(4) Image digitalisée de la puce à ADN	46
D. Analyses des données et interprétation.....	46
Troisième partie : Résultats.....	49
I. Qualité et Quantité d'ADN génomique.....	49
II. Résultats des caryotypes moléculaires par ACPA.....	51
A. Analyse des données	51
B. Qualité des résultats.....	52
III. Mise au point des protocoles.....	54
A. Comparaison des profils ACPA sur tissu congelé et tissu FFPE.....	54
B. Amplification d'ADN génomique	57
(1) Rendement de l'amplification	57
(2) Analyse ACPA des ADNs amplifiés.....	58
a. Contrôle d'amplification : ADN de référence H contre ADN de référence F	59
b. Essai d'amplification sur 2 échantillons FFPE : comparaison des kits	

GenomePlex® (Sigma) et REPLI-g® FFPE (Qiagen)	61
C. Evaluation du seuil de sensibilité	63
IV. Validation de la méthode	66
A. Série d'oligodendrogliomes caractérisés dans le cadre du protocole POLA	66
B. Comparaison de méthode : analyse des marqueurs microsatellitaires et ACPA	66
C. Comparaison de méthode : MLPA et ACPA	70
V. Anomalies cytogénétiques des gliomes en fonction du type histologique et du grade ..	72
A. Les Astrocytomes	72
B. Les Oligodendrogliomes	73
C. Les Oligoastrocytomes	77
VI. Résultat de la cohorte Sphingosine Kinase / Sphingosine Phosphate Lyase	80
Quatrième partie : Discussion	82
I. Qualité des résultats	82
II. Intérêt de l'ACPA	83
A. Anomalies spécifiques des gliomes	84
(1) Les oligodendrogliomes	84
(2) Les astrocytomes	85
(3) Les oligoastrocytomes	86
(4) Les glioblastomes	86
B. Anomalies additionnelles des gliomes	87
C. Cohorte Sphingosine Kinase / Sphingosine Phosphate Lyase	88
Conclusion et perspectives	89
Bibliographie	92

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

A	Astrocytome
A II	Astrocytome diffus de grade II
AA = A III	Astrocytome anaplasique (grade III)
ACPA	Analyse comparative sur puce à ADN
ADN	Acide désoxyribonucléique
ANOCEF	Association des Neuro-oncologues d'expression française
CDK4	Cyclin Dependant Kinase 4
CDKN2A	Cyclin Dependant Kinase Inhibitor 2A
CGH	Comparative Genomic Hybridization
DLRS	Derivative Log Ratio Spread
dNTP	deoxynucléotide
dUTP	deoxyuridine triphosphate
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
FFPE	tissu fixé au formol et inclus en paraffine
FISH	Fluorescent <i>in situ</i> hybridization
GBM	Glioblastome
GBMO	Glioblastome à composante oligodendrogliale
IARC	Institut international de recherche sur le cancer
IDH	Isocitrate deshydrogenase
InVS	Institut de veille sanitaire
INCa	Institut national du cancer
LOH	Loss of Heterozygoty
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
MDM2	Mouse Double minute 2 homolog
MGMT	O-6 Méthyl Guanine DNA Méthyl Transferase
OA	Oligoastrocytome
OA II	Oligoastrocytome diffus de grade II
OAA = OA III	Oligoastrocytome anaplasique (grade III)
OD	Oligodendrogliome
OD II	Oligodendrogliome diffuse de grade II
ODA = OD III	Oligodendrogliome anaplasique (grade III)
OMS	Organisation mondiale de la santé
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDGFR	Platelet Derived Growth Factor Receptor

PCR	Polymerase Chain Reaction
PCV	Procarbazine + Lomustine + Vincristine
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
RB1	Rétinoblastome 1
RT	Radiothérapie
RTOG	Radiation Therapy Oncology Group
SGPL1	Sphingosine-1-phosphate lyase 1 (gène)
SNC	Système nerveux central
SPK	Sphingosine Phosphate Kinase (protéine)
SPL	Sphingosine Phosphate Lyase (protéine)
SPHK1	Sphingosine-1-phosphate kinase 1 (gène)
TMZ	Temozolomide
TP53	Tumor protein p53

PREMIÈRE PARTIE : GÉNÉRALITÉS

I. LES GLIOMES

A. DÉFINITION, ÉTIOLOGIE ET ÉPIDÉMIOLOGIE DES TUMEURS CÉRÉBRALES

Les tumeurs primitives du système nerveux central (SNC) de l'adulte sont des tumeurs rares et ne représentent que 2% des tumeurs malignes de l'adulte mais sont classées parmi les tumeurs les plus agressives et de mauvais pronostic (1–4).

Au niveau mondial, selon les données de l'IARC 2010 concernant les tumeurs cérébrales primitives (tous types et sous-types histologiques confondus), 238 000 nouveaux cas par an (soit 3.5 cas/100 000 habitant par an) ont été diagnostiqués en 2008, avec 127 000 cas chez les hommes et 111 000 cas chez les femmes. Les données américaines et européennes rapportent une incidence dans les pays occidentaux d'environ 18 cas/100000 habitants par an. En France, selon l'InVS, le nombre de nouveaux cas diagnostiqués en 2011 s'élève à 4769 cas (2680 chez l'homme, 2089 chez la femme) (4).

Les tumeurs primitives du SNC constituent un groupe très hétérogène et complexe résultant de la prolifération incontrôlée de cellules cérébrales, pouvant toucher n'importe quelle partie du cerveau, de la moelle épinière et des nerfs (1,3,4). Elles sont majoritairement représentées par les gliomes qui se développent à partir des cellules astrocytaires ou oligodendrogiales (3,4).

Les astrocytes sont les cellules les plus abondantes et les plus volumineuses du SNC, jouant un rôle dans la formation de la barrière hémato-encéphalique (BHE), en contact avec les capillaires sanguins (type I) et les neurones (type II). Elles assurent aussi des fonctions métaboliques, pour l'apport en oxygène et en nutriment au niveau du SNC et interfèrent au niveau du métabolisme des neurotransmetteurs.

Les oligodendrocytes, cellules plus petites et avec moins de prolongement que les astrocytes, sont impliquées dans le réseau de soutien des neurones et participent à la myélinisation des axones.

Ces cellules sont constamment impliquées dans le fonctionnement normal du SNC, ce qui explique pourquoi les gliomes sont classés parmi les tumeurs les plus agressives en raison des conséquences lourdes des symptômes sur la qualité de vie des patients (1–4).

Les gliomes représentent les tumeurs cérébrales primitives les plus fréquentes chez l'adulte (42.4% (4), 48.9% (3)), avec une incidence d'environ 2000 à 3000 nouveaux cas par an en France, selon l'InVS. 75% des gliomes diagnostiqués sont de haut grade, formes les plus agressives (grade III et IV de la classification OMS). Les gliomes de bas grade représentent

20 à 25% des cas.

Ce sont des tumeurs qui touchent des sujets jeunes, mais plus l'âge de diagnostic est précoce, meilleur est le grade de la maladie.

Pour les tumeurs astrocytaires de grade I, II, III ou IV, l'âge médian au diagnostic est respectivement 13 ans, 45 ans (pic d'incidence entre 25 et 50 ans), 59 ans et 63 ans (pic d'incidence entre 45 et 70 ans) (2,4).

Pour les tumeurs oligodendrogiales, l'âge médian au diagnostic est 43 et 55 ans, respectivement pour le grade II et III (2,4).

Dans la majorité des cas, les tumeurs cérébrales surviennent de manière sporadique et les causes restent inconnues (1,2,5,6). En effet, il n'a pas été démontré de rôle majeur des facteurs environnementaux tels que les rayonnements électromagnétiques dans la survenue des gliomes. Les facteurs de risques décrits sont peu nombreux, comme l'irradiation cérébrale thérapeutique (1,2,6) ou exceptionnellement l'exposition à certains carcinogènes chimiques d'origine professionnelle tels que la nitrosoguanidine ou les nitrosourées. Certains facteurs génétiques peuvent prédisposer aux tumeurs cérébrales, 1 à 3% survenant dans un contexte héréditaire (2).

Compte tenu de ces caractéristiques, les possibilités de prévention et de dépistage n'existent pas.

Contrairement aux autres tumeurs solides, les tumeurs cérébrales primitives diffusent rarement vers d'autres organes pour développer des métastases à distance mais ont la capacité à infiltrer diffusément le parenchyme cérébral, les rendant très difficiles à traiter.

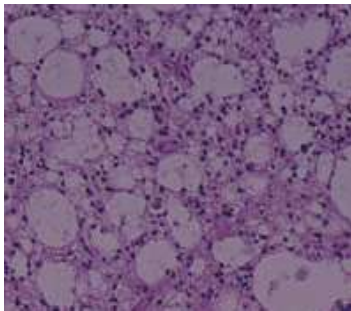
A l'inverse, les atteintes cérébrales secondaires (métastases cérébrales) sont beaucoup plus fréquentes que les atteintes primitives (1). Environ 10% des patients atteints d'un cancer sont susceptibles de développer des métastases cérébrales, dont les plus fréquents sont les cancers du sein (5-20%), les cancers du poumon (20%), les mélanomes (7%) et les cancers du rein (6.5%) (7). Les cellules des métastases cérébrales ont des caractéristiques très différentes des tumeurs cérébrales primitives et sont la plupart du temps facilement différenciables à l'examen histologique. Leur prise en charge thérapeutique est différente de celle des tumeurs primitives cérébrales.

B. CLASSIFICATION DES GLIOMES

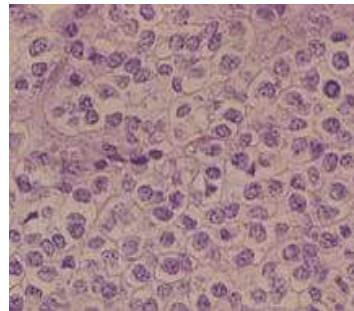
Le diagnostic de certitude repose sur l'examen histopathologique de la biopsie ou de l'exérèse cérébrale par le laboratoire d'anatomopathologie. Cette étude permet de caractériser le type histologique et le grade de la tumeur en fonction de critères histomorphologiques définis par la classification OMS de 2007 (8) (Tableau 1). Actuellement, la classification OMS de 2007 en vigueur est reconnue comme standard international, même si elle reste très subjective et pose des problèmes de reproductibilité (9).

Le type histologique de la tumeur est défini en fonction des cellules prédominantes dont dérive la tumeur : astrocytaires (cellule en forme d'étoile, avec un cytoplasme abondant et de nombreux prolongements cytoplasmiques, d'aspect fibrillaire, gémistocytique ou protoplasmique) ou oligodendrogiales (cellule à noyau rond entouré d'un halo clair cytoplasmique, avec un aspect en « nid d'abeille » et souvent la présence de vaisseaux capillaires et de microcalcifications). On parle alors d'astrocytomes, d'oligodendrogliomes ou d'oligoastrocytomes (gliomes mixtes) lorsque les deux types histologiques sont présents avec des proportions variables (Figure 1).

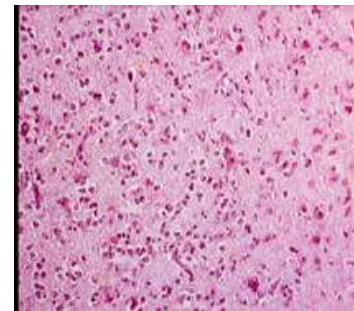
Ces trois types histologiques constituent la classification OMS 2007 des tumeurs gliales (Tableau 1).



a) Astrocytome (HE, 40x)
Trame fibrillaire et cytoplasmes parfois abondants. Tous les astrocytomes ont tendance, comme ici, à présenter un état microkystique



b) Oligodendrogliome (HE, 160x)
Image "en nids d'abeilles" du tissu tumoral, qui est irrigué par un réseau capillaire très visible.



c) Oligoastrocytome (HE, 40x)
Aspect typique de l'oligodendrogliome (à gauche) et de l'astrocytome fibrillaire (à droite).

Figure 1 : Aspect histologique des 3 principaux types de gliomes (source : ANOCEF)

Selon les bases de données françaises de recensement des tumeurs primitives cérébrales (3,4), environ 70% des tumeurs gliales sont des astrocytomes (dont 75% sont de haut grade), 20% sont des oligodendrogliomes et une faible proportion représente des tumeurs mixtes (< 10%). Mais il n'existe pas à l'heure actuelle de consensus sur la proportion minimale entre les deux contingents cellulaires pour définir le type histologique.

D'autres critères morphologiques sont indispensables pour établir le grade de malignité de la tumeur : 4 grades sont reconnus par la classification OMS 2007, du grade I, les moins agressives (bénignes) au grade IV, les plus agressives ou hautement malignes. Ces signes d'anaplasie sont la densité cellulaire, la présence de nécrose, la prolifération microvasculaire, l'index mitotique et les atypies nucléaires (8,10).

Gliomes	Grade	Présence de	Absence de
Astrocytome diffus	II	Atypies nucléaires 1 mitose	PEC, nécrose
Astrocytome anaplasique	III	≥ 2 mitoses	PEC, nécrose
Glioblastome	IV	Atypies nucléaires Mitoses PEC et/ou nécrose	—
Oligodendrogliome	II	Atypies nucléaires Rares mitoses (nombre non précisé)	PEC, nécrose
Oligoendrogliome anaplasique	III	Nombreuses mitoses et/ou PEC (nécrose possible)	—
Oligoastrocytome	II	Atypies nucléaires Rares mitoses	PEC, nécrose
Oligoastrocytome	III	Atypies nucléaires Mitoses nombreuses et/ou PEC	Nécrose
Oligoastrocytome	IV	Atypies nucléaires Mitoses, PEC, nécrose	—

PEC : prolifération endothéliocapillaire.

Tableau 1 : les différents types de gliomes infiltrant, avec leur caractéristiques histopathologiques selon la classification de l'OMS 2007 (d'après Figarella-Branger D, 2012)

Les gliomes bénins (grade I), surtout représentés par les astrocytomes pilocytiques (survenant principalement chez les enfants), ou les gliomes diffus de bas grade (grade II de la classification OMS) ne présentent pas ces signes de malignité. Ce sont des tumeurs avec une faible densité cellulaire, sans image de mitose, de nécrose ou de néo-vascularisation.

L'évolution naturelle de gliomes diffus de bas grade est la transformation en tumeur de plus haut grade, et ce dans un délai variable, non prévisible.

Les gliomes diffus malins de haut grade ou anaplasiques (grade III de la classification OMS) se caractérisent par la présence d'une activité mitotique importante, et par la synthèse de nouveaux microvaisseaux propres à la tumeur.

Les gliomes diffus hautement malins (grade IV de la classification OMS), couramment appelés glioblastomes (GBM) (Figure 2), se différencient par la présence de tissu nécrotique au sein de la tumeur, et d'une infiltration agressive du tissu cérébral sain. Les glioblastomes, forme la plus agressive des tumeurs cérébrales primitives, sont principalement des tumeurs de type astrocytaire et représentent 75% des astrocytomes au diagnostic (3,4), mais il existe des formes mixtes plus rares de glioblastomes à composante oligodendrocytaire (GBM-O), ou à cellules géantes (8).

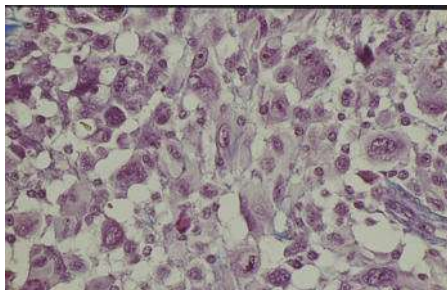


Figure 2 : Aspect histologique d'un gliome de grade IV ou Glioblastome (TM, 100x)
cellules géantes et noyaux monstrueux ou multiples, souvent munis d'un gros nucléole.

Ces glioblastomes peuvent être soit primitifs, c'est-à-dire que la tumeur est découverte *de novo* à un stade très agressif, ou secondaires, après progression tumorale à partir d'un stade de plus bas grade découvert quelques années auparavant.

C. CLINIQUE ET DIAGNOSTIC DES GLIOMES

Le diagnostic des gliomes repose sur des critères cliniques, radiologiques et anatomo-pathologiques (1).

Il est parfois difficile d'évoquer le diagnostic de tumeur cérébrale, ce qui peut expliquer un diagnostic tardif, parfois quelques mois après l'apparition des premiers signes cliniques.

De plus, dans de nombreux cas, les tumeurs gliales peuvent rester longtemps asymptomatiques.

L'évolution et les choix thérapeutiques étant différents selon le type et sous-type histologique, il est indispensable d'établir au mieux le diagnostic précis de la tumeur afin d'optimiser la prise en charge des patients en fonction du type tumoral.

(1) CLINIQUE

Les gliomes peuvent être révélés par l'apparition des signes cliniques non spécifiques d'origine neurologique, pouvant être brutaux ou d'aggravation lente et progressive (1,5,6,11), comme des crises d'épilepsie, des troubles du langage, des troubles visuels, des troubles de la personnalité. Ces manifestations cliniques variables sont étroitement liées à la localisation et à la taille de la lésion. Une hypertension intracrânienne (HTIC) peut être associée, caractérisée par des céphalées persistantes (6), des nausées matinales, vomissements (classiquement au réveil et soulageant les céphalées), des troubles de la vigilance et des étourdissements.

(2) IMAGERIE

Les techniques d'imagerie conventionnelle (IRM) sont très utiles pour établir un diagnostic différentiel entre les tissus sains et tumoraux par évaluation de la prise de contraste, pour localiser précisément la tumeur et évaluer sa taille, et pour détecter un éventuel œdème ou une hémorragie intra-cérébrale (5,6,11).

L'imagerie est systématique aux différentes étapes de la prise en charge : lors du bilan pré-thérapeutique pour guider les biopsies stéréotaxiques, dans les 72h qui suivent la chirurgie afin de différencier un résidu tumoral d'une prise de contraste résiduelle, et lors de la surveillance et du suivi thérapeutique.

L'apport des techniques d'imagerie fonctionnelle (PET-scan) permet d'améliorer le diagnostic initial avant toute prise en charge chirurgicale et/ou thérapeutique, en évaluant l'état de vascularisation de la tumeur, certains paramètres métaboliques ou dynamiques étant plus

spécifiques d'un type ou d'un grade tumoral (5).

(3) DIAGNOSTIC ANATOMOPATHOLOGIQUE

Afin d'éviter toute erreur de classification (souvent une sous-estimation du grade), le neuro-chirurgien doit prendre soin de prélever un ou plusieurs échantillons représentatifs de la lésion, soit par biopsie stéréotaxique, soit par exérèse de la tumeur (10). Le prélèvement doit ensuite permettre le diagnostic histopathologique (type et grade selon la classification OMS 2007) et si possible la réalisation d'études de cytogénétique et de biologie moléculaire.

Après observation macroscopique et microscopique, le pathologiste décrit la lésion en fonction des critères de la classification OMS 2007, précédemment détaillés.

Pour orienter et faciliter le diagnostic, une étude immunohistochimique peut être réalisée pour déterminer le type de cellules gliales prédominantes (5,12,13).

La GFAP (glial fibrillary acidic protein) est une protéine fibrillaire du cytosquelette exprimée par les cellules astrocytaires. Cependant, les tumeurs astrocytaires et oligodendrogiales ont fréquemment un marquage cytoplasmique de cette protéine GFAP.

Olig2 (oligodendrocyte lineage transcription factor) est un facteur de transcription détecté dans les cellules gliales, tumorales ou non tumorales ; le marquage en immunohistochimie étant plus intense dans les cellules tumorales, et l'intensité est corrélé au grade de la tumeur (13).

Ces anticorps permettent d'identifier une tumeur gliale, même s'ils ne sont pas toujours suffisamment discriminants pour différencier le sous-type histologique.

Les oligodendrogliomes purs marquent uniquement Olig2. Par contre, les astrocytomes et les oligoastrocytomes présentent deux populations tumorales distinctes, Olig2+/GFAP- et Olig2-/GFAP+. A l'inverse, l'immunomarquage Olig2 est négatif dans les glioblastomes, sauf les glioblastomes à composante oligodendrocytaire (GBM-O).

D'autres outils permettent par ailleurs d'évaluer le pronostic, comme par exemple l'index de prolifération Ki67 ou l'index mitotique, plus élevé dans les formes anaplasiques et les glioblastomes.

D. PRONOSTIC DES GLIOMES

Quelque soit le grade et le type, les gliomes sont des tumeurs de mauvais pronostic, avec un caractère évolutif plus ou moins rapide.

En raison de leur localisation et de leur caractère infiltrant, l'exérèse totale est souvent impossible.

Plus le grade de malignité de la tumeur au diagnostic est faible, meilleur est le pronostic (Figure 3). La survie moyenne est de 6 à 8 ans pour les gliomes de grade II (77 mois pour les astrocytomes, 85 mois pour les oligoastrocytomes et 106 mois pour les oligodendrogliomes), de 2 à 4 ans pour les gliomes anaplasiques (30 mois pour les

astrocytomes et oligoastrocytomes et 37 mois pour les oligodendrogliomes) et moins d'un an pour les glioblastomes (7 mois) (2,5,6,14). D'une manière générale, les tumeurs oligodendrocytaires ont un meilleur pronostic que les tumeurs astrocytaires (5) (Figure 3).

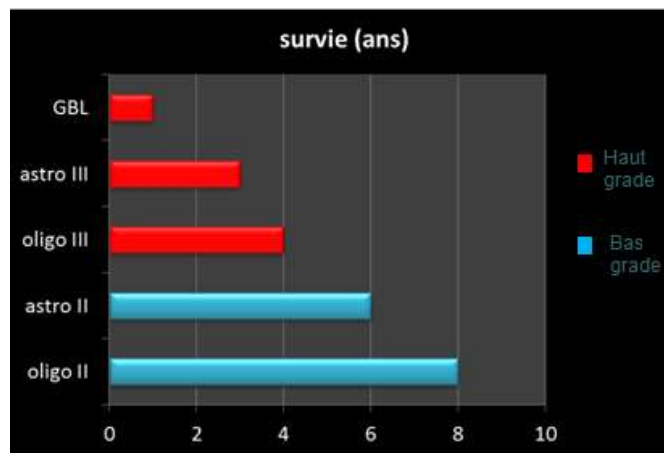


Figure 3 : Survie moyenne de chaque type de gliome en fonction du grade

(1) FACTEURS PRONOSTIQUES DES GLIOMES DE BAS GRADE

Dans les gliomes de bas grade, des facteurs pronostiques ont été démontrés (5,11,14) (Tableau 2).

- Le type histologique : les tumeurs oligodendrocytaires ont un meilleur pronostic que les tumeurs astrocytaires ; plus de la moitié des astrocytomes de bas grade évoluent vers une forme anaplasique. Les oligoastrocytomes ont un pronostic intermédiaire.
- L'âge : une meilleure survie est observée chez les sujets présentant une tumeur gliale diagnostiquée avant 40 ans.
- La taille de la lésion : les tumeurs de petit volume sont de meilleur pronostic.
- La localisation de la lésion : une tumeur unilatérale sera de meilleur pronostic qu'une tumeur qui touche les deux hémisphères cérébraux.
- L'état clinique du patient : les déficits neurologiques étant de mauvais pronostic.

Facteur pronostique	0	1
Âge	< 40 ans	> 40 ans
Diamètre de la lésion	< 6 cm	> 6 cm
Extension hémisphérique controlatérale	Non	Oui
Histologie	Oligodendrogliome/oligo-astrocytome	Astrocytome
Déficit neurologique	Non	Oui

Tableau 2 : Facteurs pronostiques des gliomes de bas grade (d'après Pignatti F, 2002)

Le nombre de facteurs pronostiques présents au diagnostic permet d'estimer la médiane de survie des gliomes de bas grade (Tableau 3).

Nombre de facteurs pronostiques	Médiane de survie
0	9,1 ans
1	8,6 ans
2	6,3 ans
3	4,4 ans
4	3 ans
5	2,4 ans

Tableau 3 : Evaluation de la médiane de survie des gliomes de bas grade en fonction des facteurs pronostiques (d'après Pignatti F, 2002)

(2) FACTEURS PRONOSTIQUES DES GLIOMES ANAPLASIQUES

De la même façon, les principaux facteurs pronostiques des gliomes anaplasiques sont l'âge inférieur à 50 ans, la résection chirurgicale totale, l'état général du patient (basé sur le score de l'index de performance OMS ou le score de Karnofsky (KPS)) et le phénotype oligodendrogial (15).

Par des recherches génétiques, certains biomarqueurs moléculaires, comme par exemple les mutations des gènes *IDH1* ou *IDH2* (16–19), la méthylation du promoteur du gène de la MGMT (20) et la perte concomitante du bras court du chromosome 1 et du bras long du chromosome 19 (codélétion 1p19q) (21–27), ont pu être identifiés comme marqueurs de bon pronostic dans les gliomes anaplasiques. L'identification de ces marqueurs a permis de mettre en évidence des sous-groupes génétiquement distincts au sein d'un même groupe histologique, impliquant des prises en charge différentes (28–33).

La codélétion 1p19q est spécifique des oligodendrogliomes, retrouvée dans 60 à 80 % des cas, et dans 20 à 30% des gliomes mixtes (oligoastrocytomes). Dans ce sous-groupe de gliomes 1p19q codélétés, le pronostic est meilleur (26,27), avec une survie plus longue pour les oligodendrogliomes de grade II et III (Figure 4). Dans les glioblastomes à composante oligodendrogiale, la présence de la codélétion 1p19q n'apporte pas d'avantage pronostique (28).

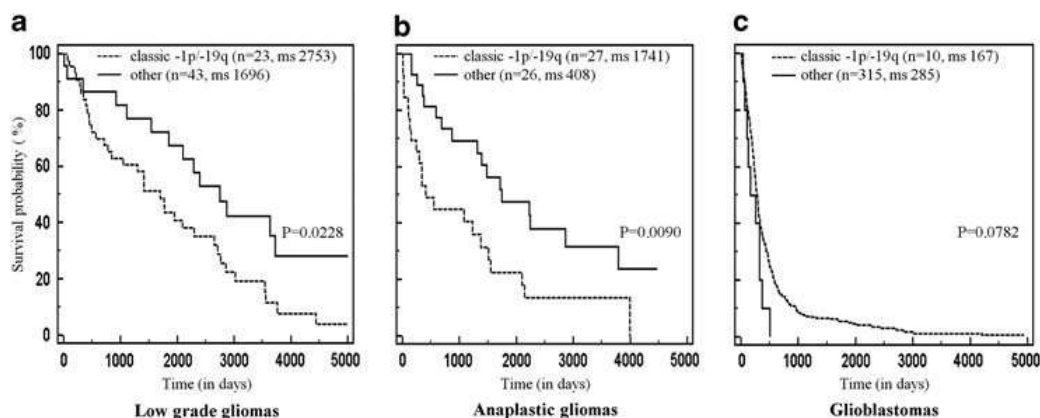


Figure 4 : Courbe de survie Kaplan-Meier des gliomes diffus en fonction de la présence ou non d'une codélétion 1p19q dans (a) les gliomes de bas grade, (b) gliomes anaplasiques et (c) les glioblastomes. D'après Boots-Sprenger et al, 2013

Les mutations des gènes *IDH* sont intéressantes à rechercher dans les gliomes anaplasiques : alors qu'une mutation est constamment retrouvée en présence de la codélétion 1p19q, conférant un pronostic favorable, les formes non mutées *IDH* et non codélétées sont de pronostic plus réservé, tandis que les formes avec une mutation *IDH* isolée sont de pronostic intermédiaire.

(3) CLASSIFICATION PRONOSTIQUE DES GLIOBLASTOMES

Selon une classification définie par le groupe RTOG (Radiation Therapy Oncology Group), 4 paramètres sont à prendre en compte pour classer les glioblastomes (GBM) en 3 groupes (bon, intermédiaire ou mauvais pronostic) (Figure 5) : l'âge (<50 vs > 50 ans), le score KPS (Karnofsky Performance Score <70, entre 70-90 ou >90), l'étendue de l'exérèse (partielle ou totale vs biopsie) et les capacités neurologiques du patient (marche vs ne marche pas) (34–36).

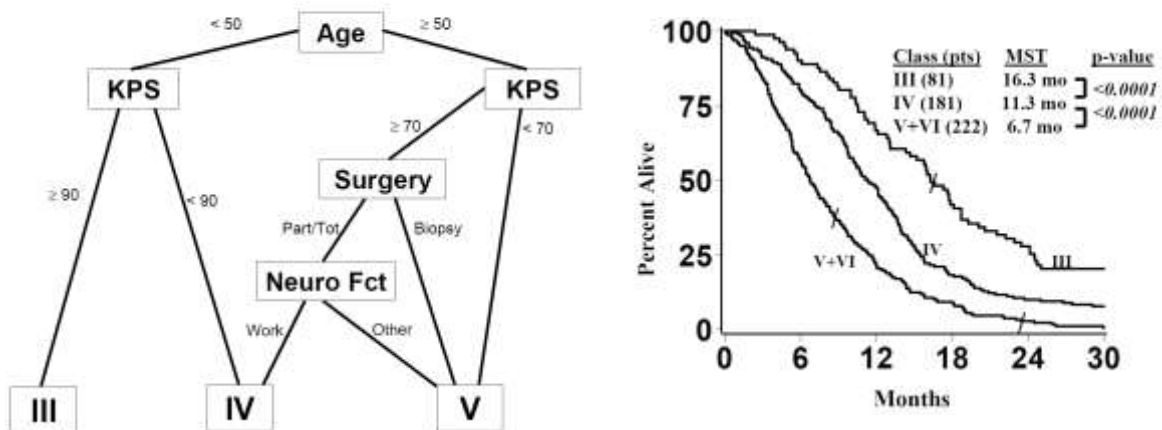


Figure 5 : classification pronostique des GBM, selon les critères retenus par le groupe RTOG, d'après Li et al. 2011.

E. PRISE EN CHARGE THÉRAPEUTIQUE DES GLIOMES

La chirurgie d'exérèse est le traitement initial de première intention, quelque soit le grade et le type de tumeur. Bien que l'exérèse totale ne soit pas toujours possible en fonction de la taille, de la localisation et du caractère diffus de la tumeur, le geste chirurgical reste toutefois indispensable et nécessaire pour bénéficier d'un prélèvement tissulaire, dans le but d'identifier le sous-type et le grade tumoral, et d'étudier le statut moléculaire.

L'exérèse totale est donc le plus souvent impossible (seuls 36% des patients en bénéficient dans les gliomes de bas grade), nécessitant des traitements adjuvants (radio et/ou chimiothérapie) (5,11).

Les protocoles standardisés de chimiothérapie restent assez restreints. Les principales molécules utilisées sont des agents alkylants tels que le Témzolomide (TMZ) Temodal®, et

les nitrosourées utilisées en monothérapie, comme la carmustine (utilisée sous forme d'implants intracérébraux (Gliadel®) dans les formes de haut grade (III et IV)), ou en polychimiothérapie PCV (Procarbazine+Lomustine+Vincristine).

Selon le référentiel de l'ANOCEF, des recommandations nationales ont été établies, mais de nombreux essais cliniques sont en cours. L'inclusion des patients dans ces essais cliniques va permettre de prouver l'efficacité de la chimiothérapie concomitante ou adjuvante à la radiothérapie dans le traitement des gliomes de bas grade, anaplasiques et les glioblastomes.

Dans les gliomes de bas grade, la conduite à tenir repose sur une surveillance si la tumeur est asymptomatique, non évolutive et de bon pronostic. La plupart du temps, une chirurgie d'exérèse est réalisée en première intention mais ne peut être totale que dans 36% des cas. Chez les sujets jeunes, sans déficit fonctionnel et pour les tumeurs oligodendrogiales (bon pronostic), l'évolution peut être favorable après chirurgie, sous surveillance clinique régulière (5,37).

Dans plus de la moitié des cas, une rechute est observée dans les 5 années suivant la chirurgie. Des études cliniques ont montré l'intérêt de la radiothérapie à faible dose (moins toxique) comme traitement adjuvant (45-50Gy en fraction de 1.8Gy) étant le traitement de référence (38,39). Pour les patients avec des facteurs de risque défavorable (âge élevé, déficit neurologique, formes non résécables ou rapidement progressives) ou en cas de récidives post-chirurgie, une chimiothérapie par TMZ ou PCV peut être proposée en association à la radiothérapie, diminuant ainsi la neurotoxicité de la radiothérapie (40,41).

Pour les gliomes anaplasiques, le traitement initial repose sur un traitement par radiothérapie (60 Gy en 30 fractions) après exérèse chirurgicale (6,11,37). En fonction de la présence ou non de la codélétion 1p19q, les suites de prise en charge sont différentes.

En effet, les oligodendrogliomes, de meilleur pronostic que les astrocytomes ou les formes mixtes, présentent des survies sans progression plus longues (3 à 6 ans dans les oligodendrogliomes *versus* 2 à 3 ans dans les astrocytomes), indépendamment du type de traitement (42,43). Les oligoastrocytomes sont traités comme des oligodendrogliomes en présence de la codélétion 1p19q, ou comme des astrocytomes en l'absence de ce marqueur.

Pour les patients présentant un gliome de grade III sans codélétion 1p19q, il n'y a pas de standard établi. La radiothérapie est classiquement considérée comme le traitement de référence et le bénéfice de la chimiothérapie concomitante-adjuvante reste à démontrer. Des études ont été faites sur la chimiothérapie (PCV ou TMZ) adjuvante à la radiothérapie mais n'ont pas démontré d'amélioration de la survie globale (11,44). Les recommandations du réseau POLA sont la radio-chimiothérapie concomitante et adjuvante selon le protocole de Stupp (radiothérapie + TMZ) ou l'inclusion dans l'essai prospectif EORTC-CATNON. Chez les sujets de plus de 70 ans, une radiothérapie seule hypofractionnée ou une chimiothérapie seule par TMZ peut être proposée (Référentiel des Gliomes de grade III, ANOCEF).

A l'inverse, pour les patients présentant un gliome de grade III avec une codélétion 1p19q (oligodendrogliomes et oligoastrocytomes anaplasiques), les données récentes indiquent

que la combinaison radiothérapie-PCV devient le traitement standard. Des questions persistent sur les modalités optimales d'administration de la chimiothérapie (néo-adjuvante ou adjuvante) et sur la dose de radiothérapie (42,43).

Dans les glioblastomes, l'exérèse doit être la plus large possible, améliorant la survie des patients (6,11). Les protocoles de radio-chimiothérapie concomitante (TMZ à la dose de 75 mg/m²/jr pendant les 6 semaines de radiothérapie) puis adjuvante (TMZ à la dose de 150-200 mg/m² pendant 5 jours consécutifs par mois, 6 cycles) ont montré leur efficacité dans les essais cliniques randomisés et sont désormais le traitement de référence des glioblastomes chez les patients de moins de 70 ans (6,11,45,46). La sélection des patients présentant une hyperméthylation du promoteur de la MGMT (20,31,47) semblerait intéressante (meilleure efficacité du TMZ), notamment chez les sujets âgés de plus de 70 ans (6,48) mais n'est actuellement pas de pratique courante.

Des essais sont actuellement en cours dans les glioblastomes pour évaluer l'intérêt du Bevacizumab (AVASTIN®), anticorps monoclonal anti-angiogénique dirigé contre le VEGF, en association à la radiochimiothérapie en première ligne de traitement (49). Le Bevacizumab peut être utilisé dans les formes récidivantes bien qu'il n'ait pas l'autorisation de mise sur le marché pour cette indication (50). En cas de récurrence, aucun traitement standardisé n'est établi. Les chimiothérapies de dernière intention sont basées sur le Bevacizumab, le TMZ, ou d'autres agents alkylants, les nitrosourées tels la carmustine ou la lomustine et la carboplatine (6).

II. LA GLIOMAGÉNESE

La compréhension de la tumorigénèse des gliomes est une question qui a nécessité de nombreuses recherches depuis les années 1980, notamment sur les glioblastomes, formes les plus fréquentes. Après la découverte de l'amplification du gène *EGFR* dans les glioblastomes primaires dans les années 1980, de nombreuses avancées ont été faites et ont permis d'identifier plusieurs mécanismes permettant d'expliquer la survenue des différents types de gliomes.

Deux grandes voies de régulation de l'homéostasie cellulaire sont altérées dans les gliomes : la première touchant le cycle cellulaire via les voies P53 et RB1, conduisant à un potentiel réplcatif illimité des cellules, et la seconde concernant les voies de signalisation intracellulaire dépendantes des facteurs de croissance (comme EGF ou PDGF), favorisant la prolifération et la survie cellulaire.

A. DÉRÉGULATION DU CYCLE CELLULAIRE

Le cycle cellulaire, divisé en 4 phases (G1, S, G2 et M) est régulé à différents points de contrôle par l'activation de complexes Cycline/CDK (kinase dépendante des cyclines). L'activation des voies P53 et RB1, ayant un contrôle négatif sur le cycle cellulaire, contribue à bloquer le cycle entre la phase G1 et l'entrée en phase S. Ces deux voies peuvent être altérées dans les gliomes.

(1) DÉRÉGULATION DE LA VOIE P53

La voie P53 est mise en jeu lorsque l'ADN est endommagé pour bloquer la transition G1-S.

a. Mécanisme d'action et régulation de la voie P53

Le gène *TP53* se situe sur le bras court du chromosome 17 au locus 17q13.1. Il code pour une phosphoprotéine de 393 acides aminés (53 kDa), la protéine P53, impliquée dans la régulation négative du cycle cellulaire.

La protéine P53 est un facteur de transcription, localisée dans le noyau des cellules, dont le rôle est de bloquer le cycle cellulaire entre la phase G1 et la phase S, et d'induire la réparation de l'ADN ou la mort cellulaire par un phénomène d'apoptose pour limiter la prolifération cellulaire (Figure 6).

En condition normale, la voie P53 est constamment régulée négativement par le complexe formé entre la protéine P53 et la protéine MDM2. Sous cette forme inactive, P53 est instable et rapidement dégradée par le protéasome.

Cependant, lorsque la cellule subit un stress cellulaire (lésion de l'ADN, hypoxie, choc thermique), il existe des mécanismes contribuant à la stabilisation et à

l'augmentation de l'expression de P53 (Figure 6). Par exemple, l'expression de la protéine CDKN2A interagit avec MDM2 pour inhiber l'interaction MDM2/P53 et libérer P53 sous sa forme active. Une fois active, P53 est acétylée par CBP pour favoriser la liaison à l'ADN cible, le promoteur du gène *p21*, afin d'activer l'expression de la protéine p21. Celle-ci inhibe tous les complexes cyclines/cdk en se fixant sur le complexe formé. Ainsi p21 bloque le cycle cellulaire entre la phase G1 et S de façon transitoire afin de permettre aux différents systèmes de réparation de restaurer l'ADN et de poursuivre le cycle cellulaire.

Lorsque la réparation de l'ADN n'est pas possible, la protéine P53 dirige la cellule vers un processus de mort cellulaire (apoptose) (Figure 6). Pour cela, la protéine P53 se fixe sur le promoteur du gène *Bax*, ce qui entraîne l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax. Celle-ci se fixe sur la membrane de la mitochondrie et permet alors la sortie du cytochrome C, entraînant l'apoptose des cellules.

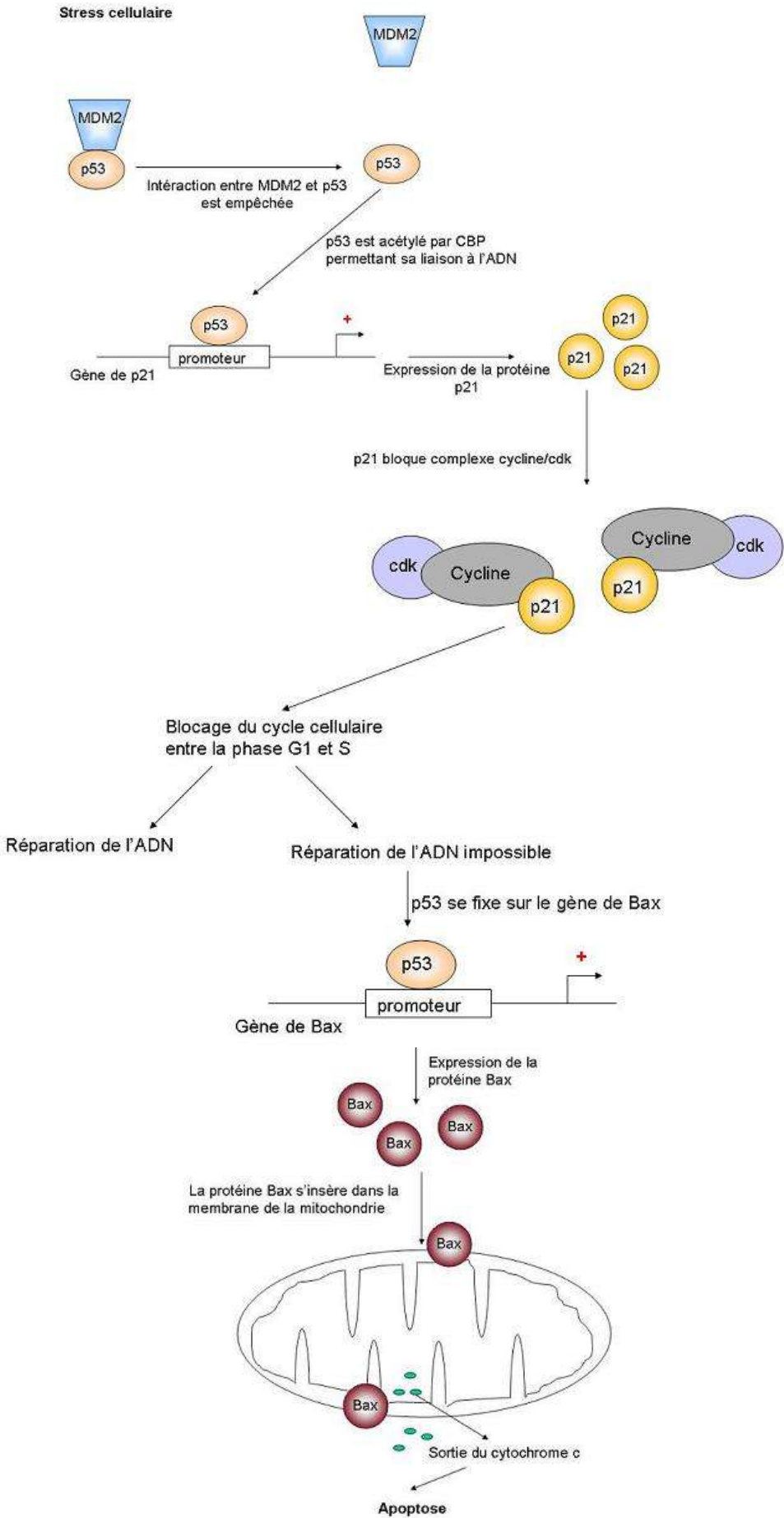


Figure 6 : Schéma récapitulatif du mécanisme d'action de la protéine P53 après activation par un stress cellulaire

b. Implication de la voie P53 dans la gliomagénèse

Le gène *TP53* est un gène suppresseur de tumeur ; lorsqu'il est inactivé, la protéine P53 n'est plus synthétisée et ne peut plus donc plus exercer son inhibition du cycle cellulaire au niveau de la transition G1/S et réparer l'ADN. La cellule se réplique alors avec une lésion au niveau de l'ADN, ce qui favorise les instabilités génétiques que l'on retrouve dans les cellules cancéreuses.

La majorité des glioblastomes (90%) présentent une anomalie de la voie P53, conduisant toujours à une perte d'expression de la protéine P53.

Les mécanismes de régulation négative de la voie P53 décrits dans les gliomes peuvent impliquer directement le gène *TP53*, principalement par mutation ponctuelle du gène, ou plus rarement par délétion homozygote.

Plusieurs autres mécanismes d'altération de cette voie ont par ailleurs été décrits (51) (Figure 7), impliquant les gènes de régulation en amont, par délétion homozygote du gène *CDKN2A* (situé sur le chromosome 9 en 9p21.3) et/ou une amplification du gène *MDM2* (situé sur le chromosome 12 en 12q15) ou *MDM4* (situé sur le chromosome 1 en 1q32.1).

Dans les tumeurs cérébrales, les mutations du gène *TP53* sont caractéristiques des tumeurs gliales de phénotype astrocytaire, quelque soit le grade II, III ou dans les glioblastomes secondaires (51–53). C'est un évènement précoce de la gliomagénèse astrocytaire, pouvant être exclusif des autres mécanismes (51,54,55). A l'inverse, les altérations chromosomiques des gènes *CDKN2A* et *MDM2* peuvent être retrouvées dans les autres types de gliomes, glioblastomes *de novo*, oligodendrogliomes ou oligoastrocytomes.

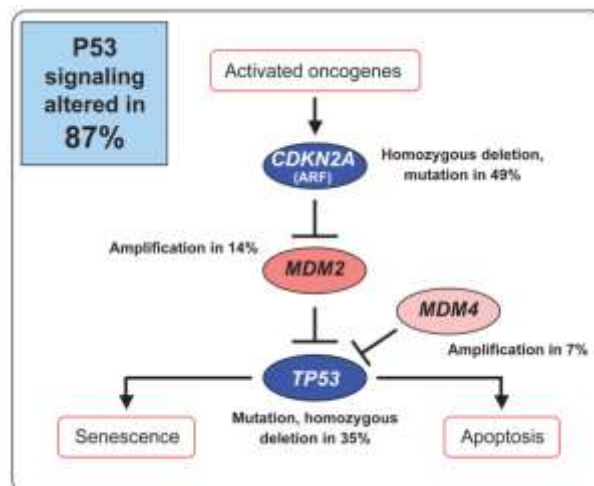


Figure 7 : Principales altérations génétiques impliquant la voie de signalisation P53 dans les glioblastomes (d'après TCGA Network, Nature. 2008) : en rouge sont indiquées les altérations génétiques activatrices, les plus fréquentes en rouge vif et les moins fréquentes en rouge clair. A l'inverse, les altérations inactivatrices sont indiquées en bleu.

(2) DÉRÉGULATION DE LA VOIE RB1a. Mécanisme d'action et régulation de la voie RB1

La protéine du Rétinoblastome (pRB) est codée par le gène *RB1*, situé sur le chromosome 13 en 13q14.2 et joue un rôle dans la régulation négative du cycle cellulaire.

Lorsque la cellule est en division active, le complexe cycline D/CDK4 inactive la protéine pRB par phosphorylation, responsable de la libération du facteur de transcription E2F. Une fois libéré, E2F se fixe sur l'ADN, activant l'expression de gènes codant pour des protéines nécessaires au déroulement de la phase S (Figure 8).

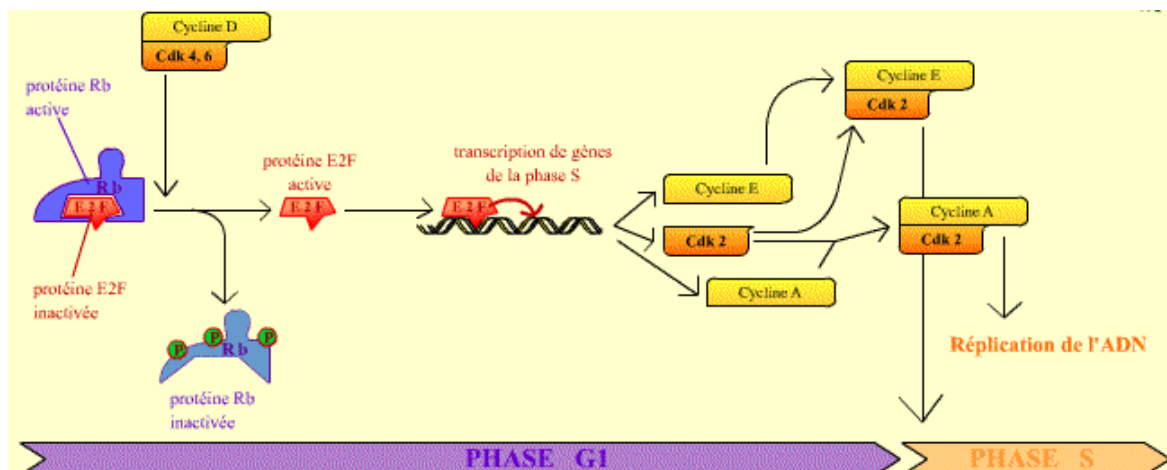


Figure 8 : Mécanisme de régulation de l'entrée du cycle cellulaire en phase S par activation de la voie RB1. L'activation du facteur de transcription E2F, grâce à la phosphorylation de la protéine Rb, permet la synthèse de gènes de la phase S. (Source : www.snv.jussieu.fr)

Par expression du gène *CDKN2A*, le complexe Cycline D/CDK4 est inhibé, favorisant la forme non phosphorylée de la protéine pRB. Sous cette forme active, pRB bloque le cycle cellulaire en fin de phase G1, par séquestration du facteur de transcription E2F.

b. Implication de la voie RB1 dans la gliomagénèse

Par inhibition du cycle cellulaire, la voie RB1 a un mécanisme suppresseur de tumeur qui peut être altéré dans les gliomes, ce qui entraîne une activation constitutive du facteur de transcription E2F et l'entrée dans la phase S du cycle cellulaire en l'absence de signaux mitotiques.

Les anomalies les plus fréquemment retrouvées impliquent les gènes *CDKN2A* et *CDKN2B* (situés sur le chromosome 9 en 9p21.3) par délétion homozygote, et le gène *CDK4* (situé sur le chromosome 12 en 12q14.1) par amplification. Le gène *RB1* peut être également directement impliqué, par mutation et/ou par délétion en 13q14.2 (Figure 9).

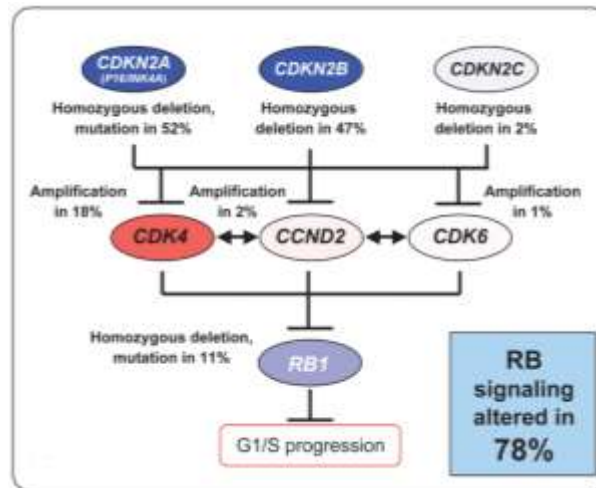


Figure 9 : Principales altérations génétiques impliquant la voie de signalisation RB1 dans les glioblastomes (d'après TCGA Network, Nature. 2008) : en rouge sont indiquées les altérations génétiques activatrices, les plus fréquentes en rouge vif et les moins fréquentes en rouge clair. A l'inverse, les altérations inactivatrices sont indiquées en bleu.

Les altérations de la voie RB1 sont fréquentes dans les gliomes, et particulièrement dans les formes évolutives (anaplasiques ou glioblastomes secondaires) où environ 75% des glioblastomes secondaires sont concernés (51,53). Ces anomalies peuvent être retrouvées dans les glioblastomes primaires avec une fréquence plus faible mais elles ne sont généralement pas présentes dans les gliomes diffus de bas grade.

Les altérations des voies P53 et RB1 ne sont pas mutuellement exclusives. La première signe l'initiation et le développement tumoral ; tandis que la seconde marque une évolution tumorale de haut grade.

B. ACTIVATION DES VOIES DE TRANSDUCTION DU SIGNAL INTRACELLULAIRE

Plusieurs facteurs de croissance comme par exemple EGF et PDGF, agissent sur les cellules par activation de leur récepteur à activité tyrosine-kinase, pour leur donner un signal de prolifération et de survie.

(1) MÉCANISME D'ACTION DES VOIES DÉPENDANTES DES FACTEURS DE CROISSANCE : EXEMPLE DE L' EGFR

L'EGFR, récepteur du facteur de croissance épidermique, appartient à la famille des récepteurs HER. Cette glycoprotéine transmembranaire de 170 kDa, codée par le gène *ErbB1* ou *EGFR* situé sur le chromosome 7 au locus 7p12.3-p12.1, est exprimée à la surface des cellules épithéliales sous forme monomérique inactive. Lors de la fixation d'un ligand, une cascade d'activation par dimérisation et phosphorylation conduit à l'activation des cascades de signalisations intracellulaires des voies MAPKinase (RAS-RAF-MEK-ERK) et

PI3K-AKT(56,57) (Figure 10).

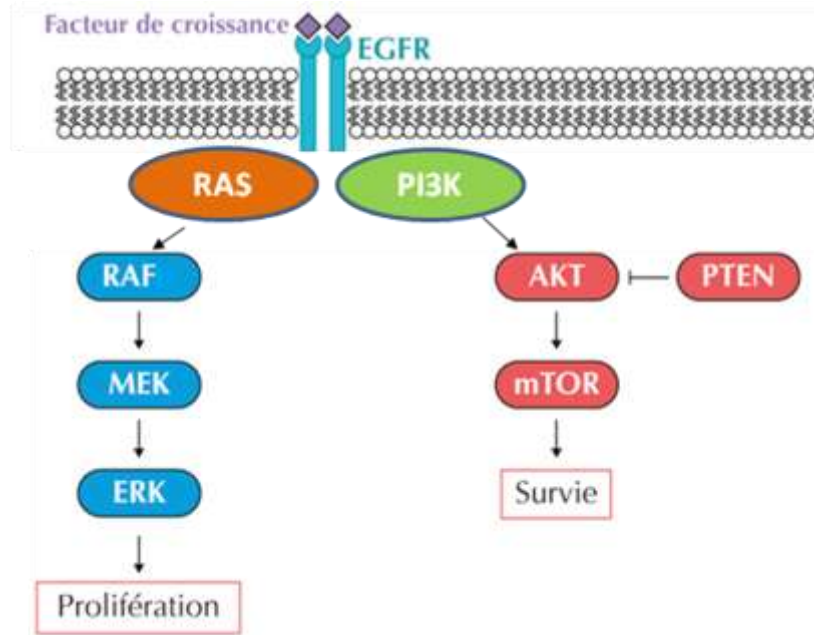


Figure 10 : Activation des voies de signalisation intracellulaire dépendantes de l'EGFR, d'après S.Francoz, Bull Cancer, 99-11 :1017-1027

L'EGFR joue un rôle important dans la régulation de la prolifération et la survie cellulaire durant des processus physiologiques. Son hyper-activation confère un potentiel prolifératif et malin à la cellule (56).

(2) IMPLICATION DE LA VOIE DE L'EGFR DANS LA GLIOMAGÉNÈSE

L'EGFR est l'un des premiers proto-oncogènes cellulaires humains identifié et le premier proto-oncogène membranaire (35). Son rôle dans la gliomagénèse a été découvert en 1985, par l'identification d'une amplification génique en 7p12 dans les glioblastomes *de novo* (58,59). Cette anomalie, retrouvée dans environ 35% des glioblastomes *de novo* (54,60), conduit à l'activation constitutive du récepteur de l'EGF non muté à la surface des cellules et à la transduction du signal mitotique intracellulaire (Figure 11) (51–53).

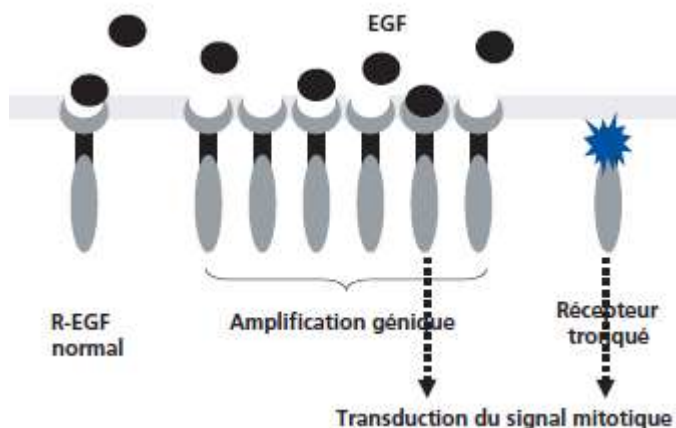


Figure 11 : Mécanismes d'activation de la voie EGF impliqués dans la gliomagénèse, soit par amplification génique aboutissant à une surproduction de récepteurs normaux, soit par production d'un récepteur anormal, tronqué et actif de façon constitutionnelle et non régulable (d'après S. Tallibert, 2004.)

D'autre part, des mutations touchant la partie extracellulaire du récepteur ont été identifiées, entraînant la synthèse d'un récepteur muté tronqué constitutivement actif tel que l'EGFRvIII (délétion entre les exons 2 et 7, Figure 12) à la surface des cellules (53,61,62). Cette anomalie est également impliquée dans la tumorigénèse des glioblastomes, et n'est pas exclusive de l'amplification du gène *EGFR*.

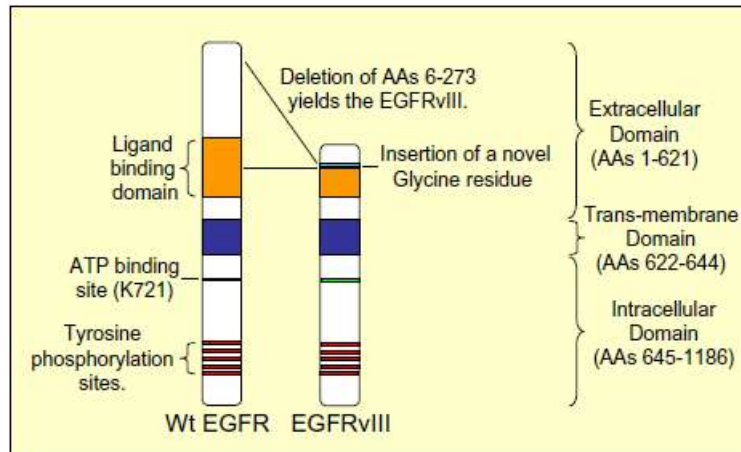


Figure 12 : Représentation schématique de la forme variante du récepteur de l'EGFR dans les glioblastomes (EGFRvIII) (d'après GanHK et al, 2009)

Ces deux mécanismes sont retrouvés dans environ 40 à 60% des glioblastomes *de novo* (51–53), sans être mutuellement exclusifs. Ce sont des événements précoces dans la gliomagénèse (51,62), exclusifs des mutations du gène *TP53* retrouvées dans les astrocytomes. Les glioblastomes primaires et les astrocytomes suivent donc des mécanismes de gliomagénèse bien distincts.

(3) IMPLICATION DES AUTRES VOIES DE TRANSDUCTION DANS LA GLIOMAGÉNÈSE

D'autres anomalies conduisant à une activation des voies de transduction de signal intracellulaire peuvent être retrouvées dans près de 90% des glioblastomes *de novo*, plus souvent chez des sujets jeunes (51,53) (Figure 13).

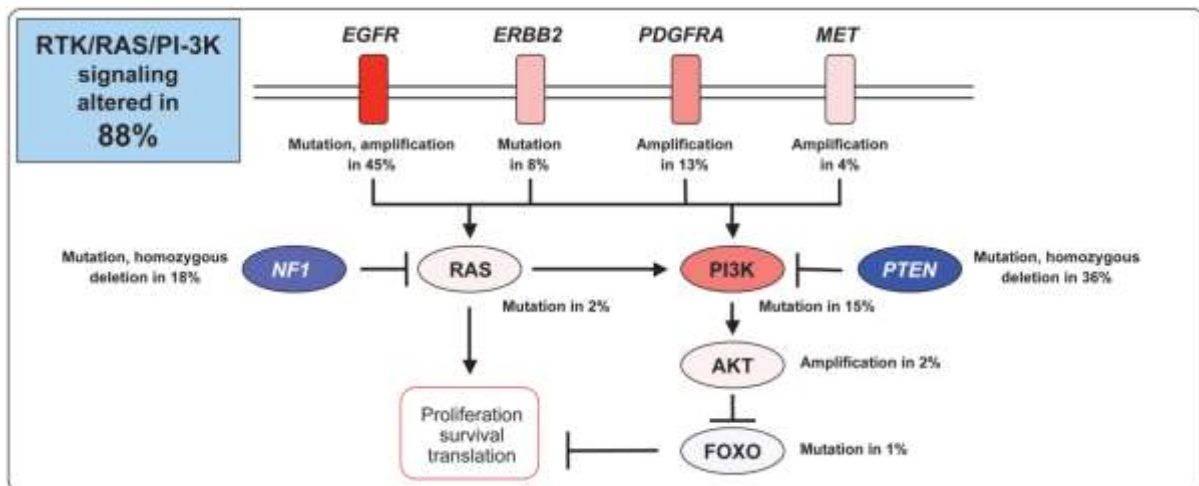


Figure 13 : Principales altérations génétiques des glioblastomes impliquant les voies de signalisations intracellulaires (d'après TCGA Network, Nature, 2008) : en rouge sont indiquées les altérations génétiques activatrices, les plus fréquentes en rouge vif et les moins fréquentes en rouge clair. À l'inverse, les altérations inactivatrices sont indiquées en bleu.

Ces anomalies impliquent par exemple le gène *PTEN*, souvent par délétion hétérozygote en 10q23 ou le gène *PDGFRA* par amplification en 4q12, ou plus rarement d'autres gènes comme *AKT* (en 14q32.33) ou *MET* (en 7q31.2) (51,53). Ces anomalies sont secondaires, non exclusives des anomalies des gènes *EGFR* ou *TP53*.

Ces mécanismes ne permettent pas d'expliquer la survenue de tous les gliomes car ces anomalies précédemment décrites ne sont pas toujours retrouvées initialement comme facteur déclenchant de la gliomagénèse, mais survenant plus tardivement, après évolution tumorale.

C. CODÉLÉTION 1P19Q

Les oligodendrogliomes représentent un sous-groupe très différent des astrocytomes. Ce sont des tumeurs moins agressives, de meilleur pronostic et répondant mieux aux chimiothérapies que les astrocytomes. Les anomalies décrites précédemment ne sont pas retrouvées comme facteur déclenchant de la gliomagénèse dans ces tumeurs.

(1) DÉCOUVERTE DE LA CODÉLÉTION 1P19Q

C'est dans les années 1990 qu'a été découverte une anomalie bien caractéristique des oligodendrogliomes : la perte concomitante du bras court du chromosome 1 (1p) et du bras long du chromosome 19 (19q) (63), qui n'a été identifiée qu'en 2006 comme une translocation $t(1;19)(q10;p10)$ déséquilibrée entre le bras court du chromosome 1 (1q) et le bras long du chromosome 19 (19p) avec des points de cassures centromériques et une perte du chromosome complémentaire associé (Figure 14) (21,22). Au niveau chromosomique, cela conduit à la codélétion 1p19q (22,25).

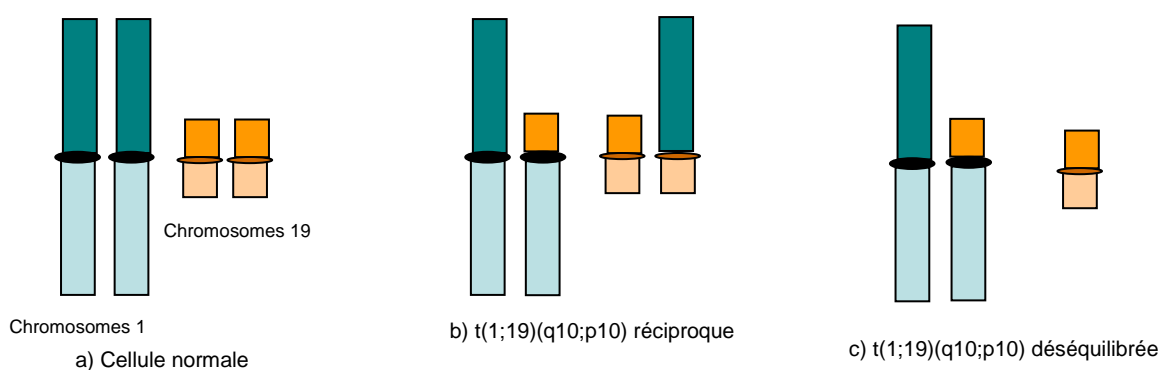


Figure 14 : Représentation schématique des chromosomes 1 (en bleu) et 19 (en orange)

a) cellule normale b) Résultat d'une translocation réciproque $t(1;19)(q10;p10)$ avec un chromosome 1 normal (en bleu à gauche) et le dérivé du chromosome 1 dont le bras court est remplacé par le bras court du chromosome 19 et un chromosome 19 normal (en orange, à droite) et le dérivé du chromosome 19 dont le bras court est remplacé par le bras court du chromosome 1, c) Résultat d'une translocation déséquilibrée $t(1;19)(q10;p10)$ avec perte du chromosome 19 remanié composé du bras court du chromosome 1 et du bras long du chromosome 19. On parle de codélétion 1p19q.

Cette anomalie est retrouvée dans la plupart des oligodendrogliomes diffus de bas grade et anaplasiques. Elle peut être suggérée comme évènement très précoce de la tumorigénèse et peut également être retrouvée dans un faible pourcentage d'astrocytomes et d'oligoastrocytomes (64–66).

(2) IMPLICATION DE LA CODÉLÉTION 1P19Q DANS LA GLIOMAGÉNÈSE

Caractéristique des oligodendrogliomes, la codélétion 1p19q joue probablement un rôle dans l'initiation tumorale. Cependant, le(s) oncogène(s) ou gène(s) suppresseur(s) de tumeur possiblement impliqué(s) n'ont pas été identifié(s).

Par ailleurs, il a été décrit des mutations des gènes *CIC*, situé sur le chromosome 19 en 19q13.2, et *FUBP1*, situé sur le chromosome 1 en 1p31.1, associées à la codélétion 1p19q dans respectivement 65% et 15% des cas (67,68).

III. ANOMALIES GENETIQUES DES GLIOMES

A. MARQUEURS MOLÉCULAIRES DIAGNOSTIQUES, PRONOSTIQUES ET PRÉDICTIFS DE CHIMIOSENSIBILITÉ : VERS UNE CLASSIFICATION HISTOMOLÉCULAIRE

Devant l'hétérogénéité histologique des tumeurs cérébrales, la classification OMS 2007 des tumeurs cérébrales primitives conduit à une standardisation internationale des critères de diagnostic mais ne prend pas en compte l'hétérogénéité génétique de ces tumeurs et ne permet pas d'en évaluer le pronostic ni de prédire la réponse au traitement.

De nombreux essais cliniques sur les gliomes ont été mis en place ces dernières années pour évaluer l'impact des marqueurs moléculaires dans la prise en charge et la survie des patients. Ces essais se sont avérés très prometteurs et l'Institut National du Cancer (INCa) a émis des recommandations nationales sur la recherche de biomarqueurs moléculaires ayant un intérêt diagnostique, pronostique et prédictif de la réponse au traitement (29,30,37,69) (Tableau 4).

Ces différents marqueurs sont :

- Les mutations ponctuelles du gène codant pour IDH1 ou IDH2, qui présentent un intérêt pronostique quelque soit le grade et le type histologique de la tumeur (16,19,28,70).
- La méthylation du promoteur du gène de la MGMT, qui permet de prédire la chimiosensibilité aux agents alkylants dans les glioblastomes, et est également un marqueur de bon pronostic dans les gliomes anaplasiques (20,28,47).
- La codélétion 1p19q qui est une aide au diagnostic car spécifique des oligodendrogliomes et est également un marqueur de bon pronostic (22,24–26,29,71).

	<i>IDH1/2</i> mutation	1p and 19q codeletion	<i>MGMT</i> promoter methylation	<i>EGFRvIII</i> rearrangement
Biological consequence	Increased concentrations of 2-hydroxyglutarate, association with G-CIMP phenotype	Unclear, candidate genes <i>CIC</i> and <i>FUBP1</i> under investigation	Reduced DNA repair, association with G-CIMP phenotype in <i>IDH1/2</i> -mutant tumours	Ligand-independent pathway activation
Methods of assessment	Immunohistochemistry for <i>IDH1</i> R132H, (pyro) sequencing	FISH, microsatellite analysis for loss of heterozygosity	MSP or bisulfite (pyro) sequencing	rtPCR, immunohistochemistry, MLPA
Frequency				
Pilocytic astrocytoma	0%	0%	<10%	0%
Pleomorphic xanthoastrocytoma	0%	0%	10–20%	0%
Diffuse astrocytoma	70–80%	15%	40–50%	0%
Oligodendroglioma/ oligoastrocytoma	70–80%	30–60%	60–80%	0%
Anaplastic astrocytoma	50–70%	15%	50%	0%
Anaplastic oligodendroglioma/ oligoastrocytoma	50–80%	50–80%	70%	0%
Glioblastoma	5–10%	<5%	35%	25–30%
Diagnostic role	Important, differential diagnosis between diffuse glioma and gliosis	Strong association with oligodendroglial morphology, differential diagnosis of brain tumours with clear cells	None	Strong association with glioblastoma
Prognostic role	Positive across histologies	Favourable for oligodendroglial tumours treated with radiotherapy or alkylating agent chemotherapy or both	Prognostic for anaplastic glioma patients (possibly with <i>IDH</i> mutations) treated with radiotherapy or alkylating drugs.	Negative prognostic factor, reduced long-term survival
Predictive role	Absence of mutation suggests predictive role for <i>MGMT</i> promoter methylation	Patients with 1p/19q-codeleted (anaplastic) oligodendrogliomas should not be treated with radiotherapy alone, but alkylating drugs with or without radiotherapy	Predictive for glioblastoma (possibly without <i>IDH</i> mutations) treated with alkylating agents, should be tested in elderly patients with glioblastoma	Possible biomarker for vaccination

FISH=fluorescence in-situ hybridisation. MSP=methylation-specific PCR. rtPCR=real-time PCR. MLPA=multiplex ligation-dependent probe amplification.

Tableau 4 : Marqueurs moléculaires des gliomes (d'après Weller et al, 2013)

Cependant, ces trois marqueurs moléculaires ne sont pas complètement spécifiques et indépendants les uns des autres. Par exemple, les tumeurs *IDH*-mutées présentent souvent un statut méthylé pour la *MGMT* (72) et les tumeurs codélétées 1p19q sont typiquement mutées *IDH* (73).

De plus, bien qu'ils soient individuellement associés à un meilleur pronostic, l'association de ces marqueurs n'est pas forcément associée à un meilleur pronostic. Par exemple, les glioblastomes présentant une codélétion 1p19q et une mutation du gène *IDH* n'ont pas une survie plus longue que les glioblastomes non codélétés 1p19q. De même, chez les sujets de plus de 50 ans, la présence d'une mutation *IDH* n'améliore pas le pronostic des glioblastomes (28).

L'interprétation de ces marqueurs moléculaires doit donc être associée aux caractéristiques histologiques de la tumeur (type histologique et grade) ainsi qu'à l'âge du patient.

Néanmoins, la prise en charge des gliomes basée sur cette classification histomoléculaire ne prend pas en compte la plupart des anomalies chromosomiques et ne permet pas d'explorer les gliomes ne présentant aucun de ces marqueurs moléculaires au diagnostic ou à la rechute.

B. ANOMALIES CHROMOSOMIQUES DES GLIOMES

De manière générale, plus le grade est élevé, plus le nombre d'anomalies chromosomiques retrouvées augmente (51,53–55,65,69,74–76).

(1) LES ASTROCYTOMES

Dans les astrocytomes, les anomalies décrites conduisant à un avantage prolifératif des cellules sont les anomalies touchant les gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, par altération des voies P53 et/ou RB1.

a. Astrocytomes de grade II

Les astrocytomes diffus de grade II (A II) présentent la plupart du temps des anomalies isolées de la voie P53, survenant de façon précoce dans l'initiation et le développement tumoral.

Dans plus de 60% des A II, une perte d'hétérozygotie du bras court du chromosome 17 (17p), conduisant à la perte d'une copie du gène *TP53*, est souvent retrouvée.

Par ailleurs, les A II peuvent être divisés en 4 sous-groupes en fonction des autres anomalies chromosomiques identifiées (65) :

- Le premier groupe présente une trisomie du chromosome 7 ou le gain du bras long (7q)

Cette anomalie chromosomique est la plus fréquente des A II (environ 50%) (54,55,69). Des pertes chromosomiques en 22q, 13q, 10p, 19q et 6, et des gains en 5p, 9 et 19p ont également été retrouvées associées, mais dans des proportions plus faibles.

- Le second groupe présente la codéletion 1p19q, toujours exclusive du gain sur le chromosome 7. Cette anomalie, caractéristique des oligodendrogliomes, peut être atypiquement retrouvées dans une faible proportion d'A II (20%).
- Le troisième groupe présente d'autres anomalies chromosomiques atypiques (20%).
- Le quatrième sous-groupe ne présente aucune anomalie chromosomique (15%).

b. Astrocytomes de haut grade

Les astrocytomes anaplasiques (AA ou A III) ou les glioblastomes (GBM) secondaires sont des formes évoluées d'A II, les anomalies retrouvées sont donc les mêmes. Les anomalies les plus fréquemment retrouvées sont la perte du bras long du chromosome 10 (10q), un gain sur le chromosome 7 total ou partiel (7q ou 7p). Les gains en 7p (locus 7p12-p13) surviennent toujours de façon concomitante avec la perte en 10q (74,76).

Des anomalies additionnelles, signature d'une évolution clonale, sont par ailleurs plus fréquentes, comme par exemple des délétions en 9p, ciblant le gène *CDKN2A* en 9p21.3

(délétion homozygote ou hétérozygote), ou des amplifications de la région 12q13-q15 impliquant les gènes *CDK4* (en 12q14.1) préférentiellement et *MDM2* (en 12q15) (10% des AA). La région 1q32.1 peut également être le siège d'une amplification en l'absence de mutation du gène *TP53* et d'amplification du gène *MDM2*. En effet, dans cette région a été identifié un oncogène homologue de *MDM2*, le gène *MDM4* situé en 1q32.1. De la même façon, le gène *RB1* en 13q14 peut également être délété de façon homozygote ou hétérozygote, retrouvé de préférence dans les glioblastomes secondaires (13%). Ces anomalies entraînent une altération de la voie RB1 et signent le passage d'une forme de bas grade vers une forme de haut grade, bien qu'elles ne soient pas systématiques.

De plus, une amplification du gène *PDGFRA* situé en 4q15 peut être retrouvée, de préférence dans les GBM secondaires (53,60).

De nombreuses autres anomalies chromosomiques récurrentes (principalement des pertes) ont été décrites, comme par exemple des pertes sur les chromosomes 6q, 11p, 13q, 14q, 19q et 22q ou des gains en 8q, 17q, 19 et 20 (Figure 15 et Figure 16), sans pour autant qu'un gène cible ait été identifié, les principales anomalies étant celles décrites précédemment (60,69,74).

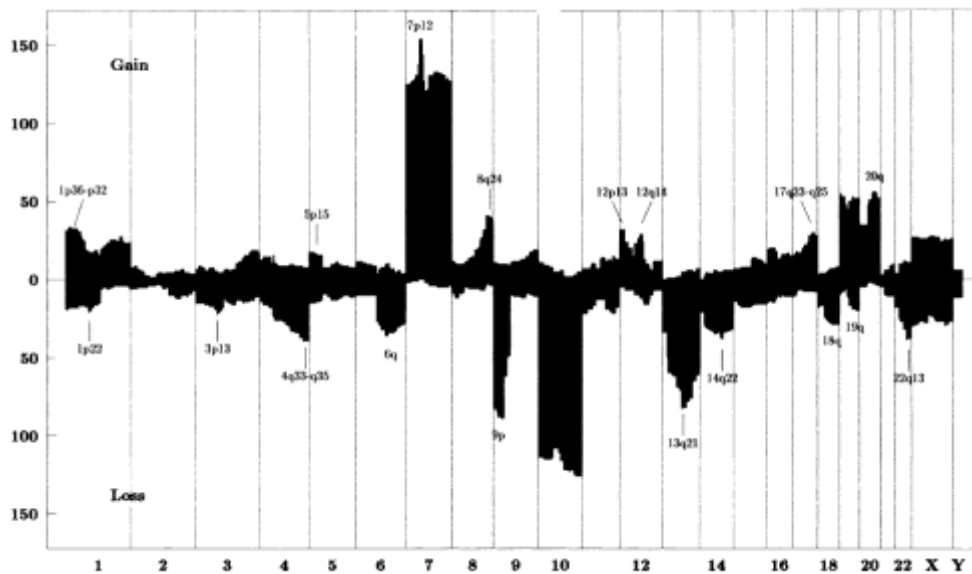


Figure 15 : Principales anomalies chromosomiques retrouvées dans une série de 334 astrocytomes. Les chromosomes sont classés en abscisse (chromosome 1 à 22, X et Y) avec la fréquence absolue de pertes (en bas) ou de gains (en haut) de chaque région chromosomique. D'après Koschny, 2002.

Dans le sous-groupe présentant la codélétion 1p19q, les formes anaplasiques présentent souvent une perte en 17p comme anomalie additionnelle (74).

c. Glioblastomes *de novo*

Les glioblastomes *de novo* surviennent chez les sujets âgés sans histoire antérieure d'évolution depuis une lésion de plus bas grade. Les anomalies sont donc différentes de

celles des A II, AA et GBM secondaires et sont de mauvais pronostic.

La première anomalie identifiée dans les GBM *de novo* est l'amplification du gène *EGFR* en 7p12, retrouvée dans 35% des cas.

Dans près de 90% des cas, une monosomie du chromosome 10 est également retrouvée, associée dans la moitié des cas à une mutation du gène *PTEN* (10q23). La perte 10p (non retrouvée dans les astrocytomes) est caractéristique des GBM *de novo*. Une trisomie du chromosome 7 est présente dans 60% des cas, associée ou non à l'amplification du gène *EGFR* en 7p12 (53–55,60,69,74). Par ailleurs, les autres anomalies les plus fréquentes sont les gains des chromosomes 19 et 20, les délétions homozygotes du gène *CDKN2A* en 9p21.3, et les amplifications des gènes *CDK4* et/ou *MDM2* en 12q13-15.

Ainsi, le profil chromosomique caractéristique des glioblastomes *de novo* montre une amplification du gène *EGFR* en 7p12 et/ou une trisomie du chromosome 7, une monosomie du chromosome 10 (perte hétérozygote du gène *PTEN* en 10q23) et une délétion homozygote du gène *CDKN2A/CDKN2B* en 9p21.3 (Figure 16) (53,60).

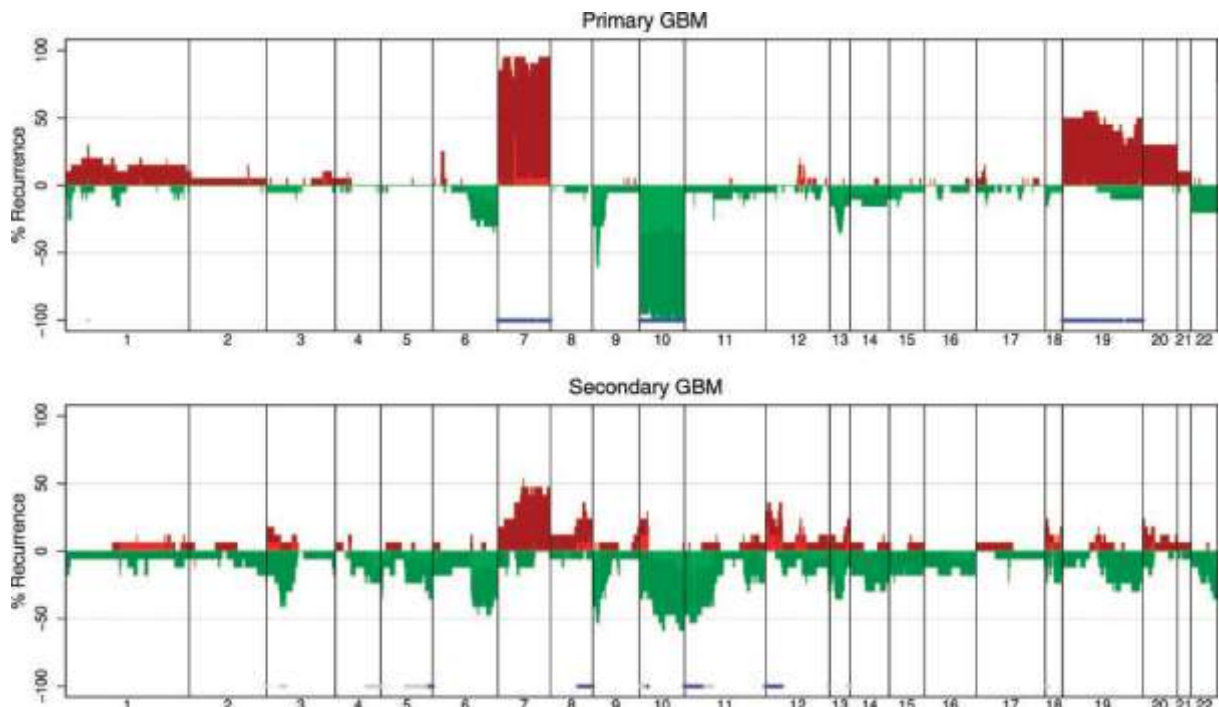


Figure 16 : Comparaison des anomalies chromosomiques les plus fréquentes dans les GBM *de novo* (en haut) et secondaires (en bas). Les chromosomes sont classés en abscisse (chromosome 1 à 22, X et Y) avec la fréquence de pertes (en vert) ou de gains (en rouge) de chaque région chromosomique. D'après Maher,2006.

(2) LES OLIGODENDROGLIOMES

Les oligodendrogliomes (OD) constituent un groupe plus homogène que les astrocytomes, avec des anomalies très caractéristiques. La principale anomalie recherchée est la codélétion 1p19q, retrouvée dans environ 2/3 des cas (69). Les anomalies cytogénétiques sont moins fréquentes que les anomalies génétiques ou épigénétiques. Dans les formes de bas grade, les anomalies chromosomiques additionnelles sont plus rares que dans les

formes anaplasiques (<10% des ODII, >20% des ODA) (77).

3 sous-groupes d'OD ont été identifiés selon la présence ou non d'anomalies sur les chromosomes 1, 7, 10 et 19 (71,77) : ceux qui présentent la codélétion 1p19q, ceux qui présentent un gain du chromosome 7 et une perte du chromosome 10, et le dernier groupe ayant un profil intermédiaire.

Comme pour les astrocytomes, les OD anaplasiques montrent une incidence croissante des pertes en 9p avec délétion du gène *CDKN2A* (en 9p21.3) dans 1/3 des cas, des pertes en 10q, et gain du chromosome 7 (avec amplification de l'*EGFR* en 7p12), par rapport aux formes de bas grade.

A l'inverse des astrocytomes, les OD ne montrent pas de perte en 17p dans le sous-groupe de la codélétion 1p19q (71).

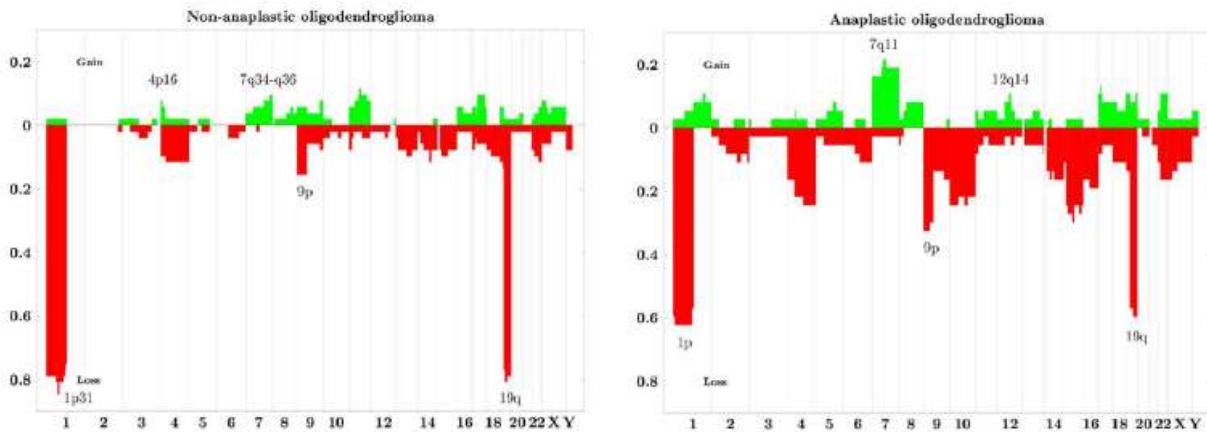


Figure 17 : Principales anomalies chromosomiques retrouvées dans une série de 85 oligodendrogliomes, de bas grade (à gauche) et anaplasiques (à droite), Les chromosomes sont classés en abscisse (chromosome 1 à 22, X et Y avec la fréquence de pertes (en bas) ou de gains (en haut) de chaque région chromosomique. d'après Koschny, 2006.

D'autres anomalies chromosomiques récurrentes dans les OD sont des pertes sur les chromosomes 4, 6, 9p, 10,11, 13q, 14q, 15q, 18 et 22q et des gains sur les chromosomes 7, 8q, 1q, 12q, 15 et 20 (Figure 17) (76–79).

Ces anomalies additionnelles jouent donc un rôle dans les mécanismes de progression tumorale, impliquant, entres autres, une altération des voies P53 et RB1. Celles-ci sont principalement retrouvées dans les OD anaplasiques ne présentant pas la codélétion 1p19q pour lesquels une délétion du gène *CDKN2A* (en 9p21.3), une amplification du gène *EGFR* en 7p12 ou une perte en 10q sont décrites dans respectivement plus de 30%, 20-30% et 20% des cas, leur conférant un mauvais pronostic, proche des glioblastomes (79).

(3) LES OLIGOASTROCYTOMES

Les oligoastrocytomes (OA) sont dans la plupart des études associés aux oligodendrogliomes, alors que seuls 20% présentent la codélétion 1p19q. Les autres

anomalies les plus fréquentes sont la trisomie du chromosome 7 associée à une monosomie du chromosome 10, plus caractéristiques du phénotype astrocytaire et exclusives de la codélétion 1p19q (64,66,78).

Des anomalies additionnelles impliquant les voies P53, RB1 et EGFR (délétions en 9p, 13q, amplification en 7p) ainsi que d'autres anomalies atypiques sont également observées dans certaines formes anaplasiques.

Notons cependant qu'aucune anomalie n'a été identifiée pour les différencier des oligodendrogliomes d'une part, et des astrocytomes d'autre part, bien que des pertes en 4q, 13q et un gain en 10p aient été retrouvés préférentiellement dans les oligoastrocytomes (64).

IV. METHODES D'EXPLORATION DES ANOMALIES CHROMOSOMIQUES DES GLIOMES

Les principales anomalies chromosomiques des gliomes peuvent être appréhendées selon quatre approches : l'analyse moléculaire et l'hybridation *in situ* pour les recherches ciblées, ainsi que la cytogénétique conventionnelle et la cytogénétique moléculaire pour les recherches pangénomiques.

A. L'ANALYSE MOLÉCULAIRE DES ANOMALIES CHROMOSOMIQUES

Deux techniques sont utilisées pour l'étude ciblée d'anomalies chromosomiques (gain, amplification ou perte de région chromosomique connue) dans les gliomes : l'étude des marqueurs microsatellitaires et la MLPA. Cependant, elles ne permettent pas de voir les anomalies clonales additionnelles qui peuvent marquer une évolution tumorale.

(1) RECHERCHE DE PERTE D'HÉTÉROZYGOTIE

La recherche de perte d'hétérozygotie, ou LOH pour Loss of Heterozygoty, repose sur la recherche de marqueurs microsatellitaires par amplification par PCR puis analyse de fragments sur électrophorèse capillaire, en comparant l'ADN tumoral et l'ADN constitutionnel, extrait à partir des leucocytes sanguins. Lorsque l'un des deux allèles présents dans l'ADN constitutionnel n'est pas présent dans l'ADN tumoral (Figure 18), cela signifie que cet allèle a été perdu par délétion ; on parle alors de perte d'hétérozygotie.

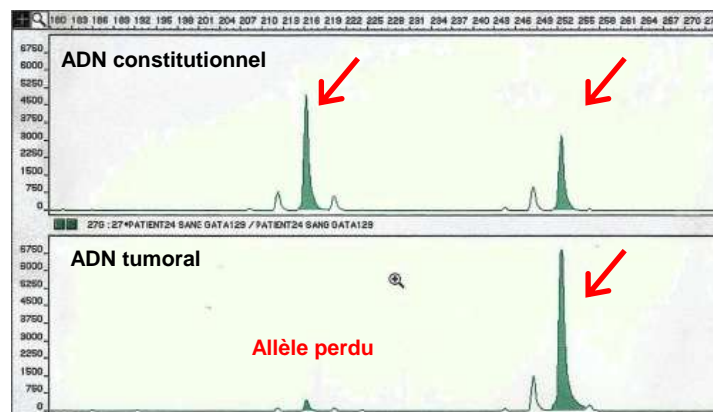


Figure 18 : Profil d'électrophorèse capillaire obtenu pour un microsatellite présentant une perte d'hétérozygotie (LOH)

Cette méthode nécessite que les marqueurs microsatellitaires étudiés soient à l'état hétérozygote de façon constitutionnelle chez le patient. En effet, pour les marqueurs microsatellitaires à l'état homozygote, l'analyse ne sera pas informative car la perte d'un des allèles par délétion au niveau de la tumeur ne pourra alors pas être détectée. Par ailleurs, la limite de sensibilité de cette technique nécessite 70–80 % de cellules tumorales

présentant une perte d'hétérozygotie pour être détectable.

Pour la recherche d'une codélétion 1p19q, 20 marqueurs situés sur le chromosome 1 (dont 5 réalisés en première intention) et 11 marqueurs situés sur le chromosome 19 (dont 7 réalisés systématiquement) sont étudiés (Figure 19).

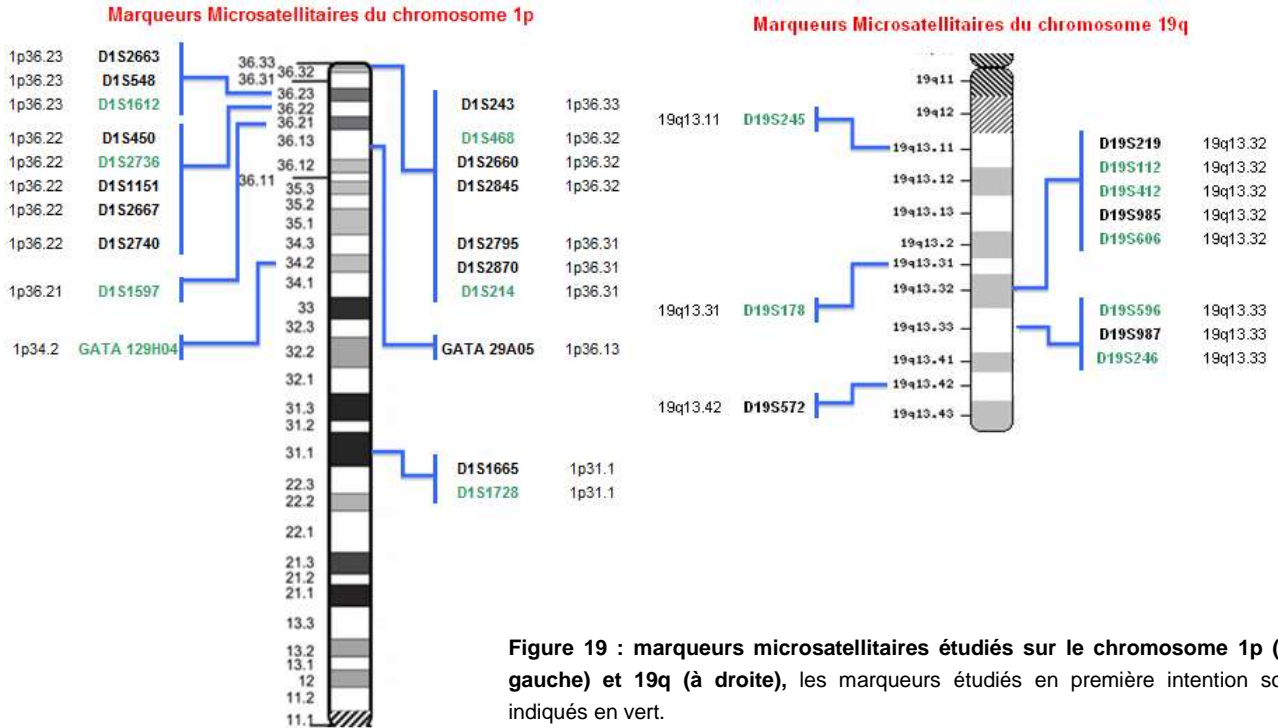


Figure 19 : marqueurs microsatellitaires étudiés sur le chromosome 1p (à gauche) et 19q (à droite), les marqueurs étudiés en première intention sont indiqués en vert.

A la demande du clinicien, une recherche de perte d'hétérozygotie en 10q peut être réalisée, avec 12 marqueurs microsatellitaires étudiés (Figure 20).

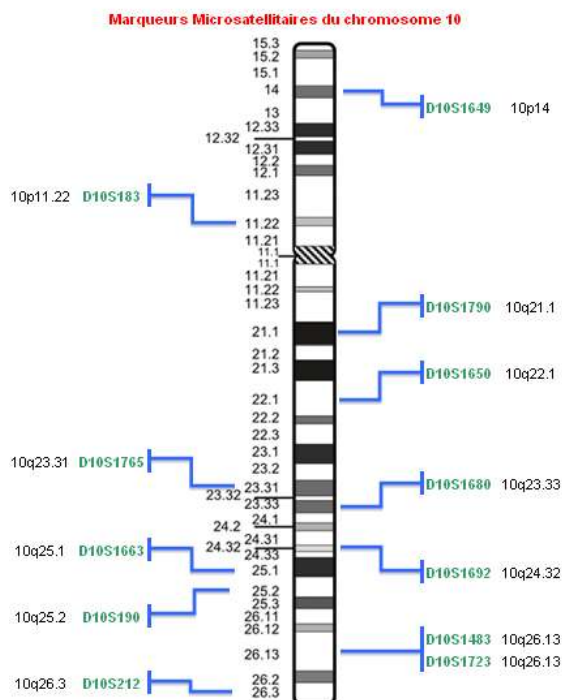


Figure 20 : marqueurs microsatellitaires étudiés sur le chromosome 10, les marqueurs étudiés en première intention sont indiqués en vert.

(2) LA MLPA®

La MLPA® (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) est une technique qui repose sur le principe de ligation et d'amplification d'amorces initialement hybridées de part et d'autre d'une cible (Figure 21). En l'absence de la cible, les amorces ne peuvent pas s'hybrider et ne peuvent donc pas se lier et s'amplifier. Une analyse de fragments sur électrophorèse microcapillaire permet ensuite de visualiser les fragments amplifiés.

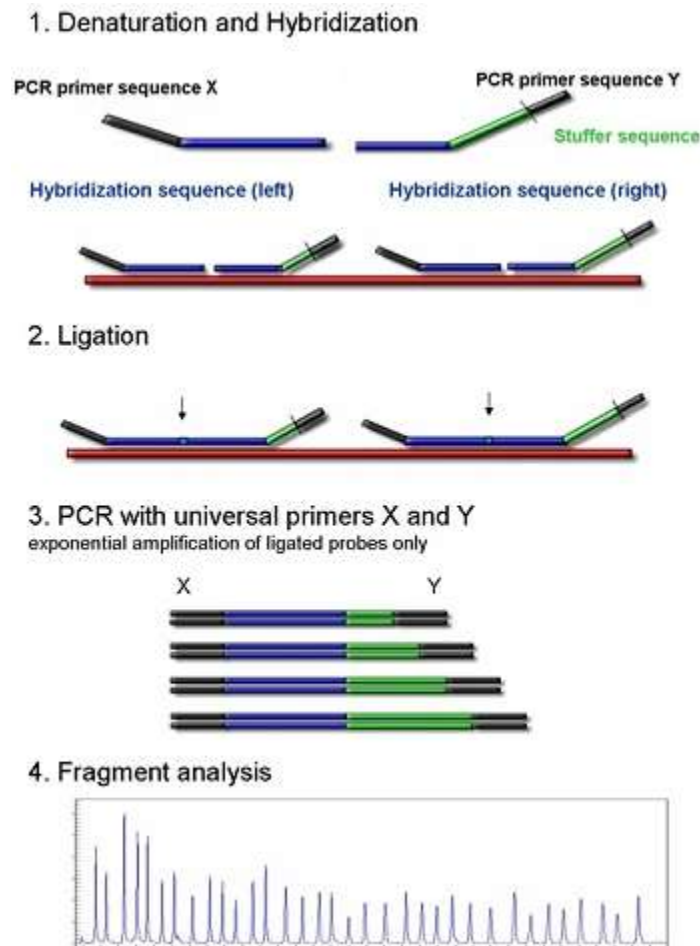


Figure 21 : Schéma explicatif du principe de la MLPA

Deux kits MLPA® sont commercialisés pour le diagnostic des gliomes, l'un pour la recherche de la codélétion 1p19q (SALSA® MLPA® KIT P088, MRC Holland), avec 15 sondes ciblant des gènes sur le chromosome 1p et 8 sondes sur le chromosome 19q, le second (SALSA® MLPA® KIT P105, MRC Holland), ciblant les gènes *TP53*, *PTEN*, *CDKN2A/CDKN2B*, *EGFR* et *ERBB2*.

Cette technique dont l'interprétation est complexe n'est pas applicable sur tissus fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE) et nécessite du tissu congelé. Elle n'est que très rarement réalisée.

B. L'HYBRIDATION *IN SITU* : LA FISH

(1) PRINCIPE

La technique d'hybridation *in situ* fluorescente, le plus souvent appelée FISH (fluorescent *in situ* hybridization), repose sur la capacité de l'ADN à s'apparier en double brin sur une séquence complémentaire. Les sondes utilisées sont des oligonucléotides marqués complémentaires de la séquence d'un gène ou d'une partie du gène cible recherchée. Par l'utilisation de différentes sondes, chacune spécifique d'un gène ou d'un locus, et marquées par un fluorophore différent, il est possible de déterminer la position relative de ces fragments d'ADN ciblés dans le génome ou d'en définir le nombre de copies. Cette technique permet de mettre facilement en évidence des remaniements de l'ordre de 50 à 250 kb (selon la taille des sondes), cryptiques en cytogénétique conventionnelle.

L'avantage de cette technique est qu'elle peut être appliquée sur des cellules en métaphase obtenues par culture cellulaire, comme pour le caryotype conventionnel, ou sur des noyaux interphasiques, sans culture cellulaire préalable. La FISH interphasique est intéressante dans l'étude des tumeurs solides car elle peut être appliquée sur des tissus fixés.

(2) APPLICATION DANS LES GLIOMES

Dans les gliomes, la recherche de la codéletion 1p19q peut être réalisée par technique FISH interphasique en utilisant les kits ZytoLight® SPEC 1p36/1q25 Dual Color Probe et ZytoLight® SPEC 19q13/19p13 Dual Color Probe (Zytovision, CliniSciences) (Figure 22).

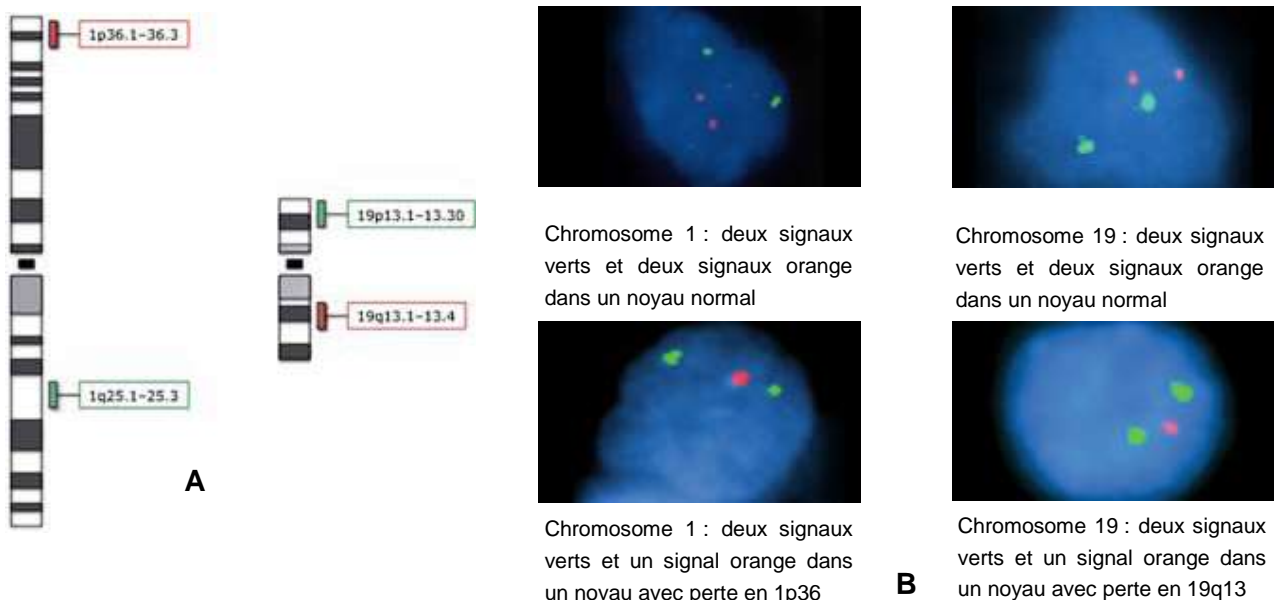


Figure 22 : A) Sondes FISH utilisées pour la détection d'une codéletion 1p19q : deux sondes sur le chromosome 1 (sonde 1p36 (orange) et sonde 1q25 (vert)) et deux sondes sur le chromosome 19 (sonde 19q13 (orange) et 19p13 (vert)). Les sondes marquées par le fluorochrome vert sont les témoins internes d'hybridation (ZytoLight® SPEC Dual Color Probe kit de chez Zytovision (CliniSciences)). **B) Images de marquage FISH obtenues pour les chromosomes 1 (au centre) et 19 (à droite) pour une cellule normale (en haut) et une cellule présentant une codéletion 1p19q (en bas)**

Comparativement à la technique de recherche de perte d'hétérozygotie, cette technique a un seuil de détection plus faible, avec une limite de sensibilité pouvant aller jusqu'à 20-30% de cellules tumorales dans l'échantillon et ne nécessite pas d'ADN constitutionnel. Au-delà de la codélétion 1p19q, elle permet également de mettre en évidence des polyploïdies (plus de deux signaux pour chacune des sondes). Les résultats s'avèrent cependant difficiles à interpréter car il faut prendre en compte la polyploïdie et les délétions segmentaires dans le calcul du seuil de négativité (faux négatifs), et les artefacts de coupe dans le calcul du seuil de positivité (faux positif).

C. LA CYTOGÉNÉTIQUE CONVENTIONNELLE

(1) PRINCIPE

La cytogénétique conventionnelle permet d'étudier l'ensemble des chromosomes à partir des cellules en métaphase et de rechercher des anomalies chromosomiques de nombre et/ou de structure, avec une résolution de l'ordre de 10 à 15 Mb, par réalisation du caryotype (Figure 23).

Après mise en culture de tissus tumoraux, les cellules sont bloquées au stade de la métaphase du cycle cellulaire par un dérivé de la colchicine. Les chromosomes métaphasiques sont libérés après choc hypotonique de la membrane cellulaire puis fixés, étalés et dénaturés avant d'être colorés. Après analyse par microscopie optique, les anomalies chromosomiques sont décrites selon la nomenclature internationale ISCN.

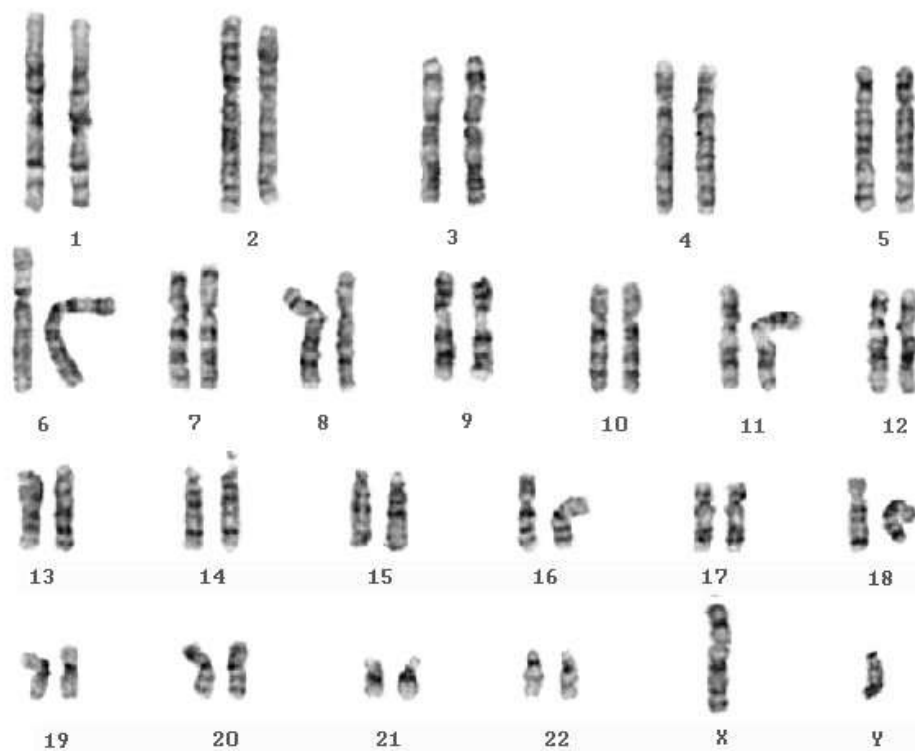


Figure 23 : Exemple de caryotype sans anomalie, obtenu à partir d'une cellule en métaphase après coloration au Giemsa (en bande G)

(2) APPLICATION DANS LES GLIOMES

Malgré leur nombre important, peu de tumeurs solides sont étudiées par cytogénétique conventionnelle. Cette discipline reste essentiellement utilisée pour les tumeurs hématopoïétiques.

En effet, la mise en œuvre d'un caryotype conventionnel de tumeur solide est sujette à des contraintes pratiques et techniques liées au prélèvement, souvent de mauvaise qualité (préalablement fixé au formol et inclus en paraffine au laboratoire d'anatomie et pathologie cytologiques), de taille limitée (biopsie), et peu représentatif de la tumeur (nécrose, absence de prolifération tumorale *in vitro*, présence de cellules non tumorales). A cela s'ajoute les difficultés d'interprétation devant la complexité des caryotypes. De plus, le manque de sensibilité de la technique rend parfois le caryotype tumoral non informatif.

Dans les gliomes, la cytogénétique conventionnelle a néanmoins permis de mettre en évidence le dérivé du chromosome 1 issu de la translocation déséquilibrée entre le bras court du chromosome 1 et le bras long du chromosome 19, conduisant à la codélétion 1p19q (Figure 24).

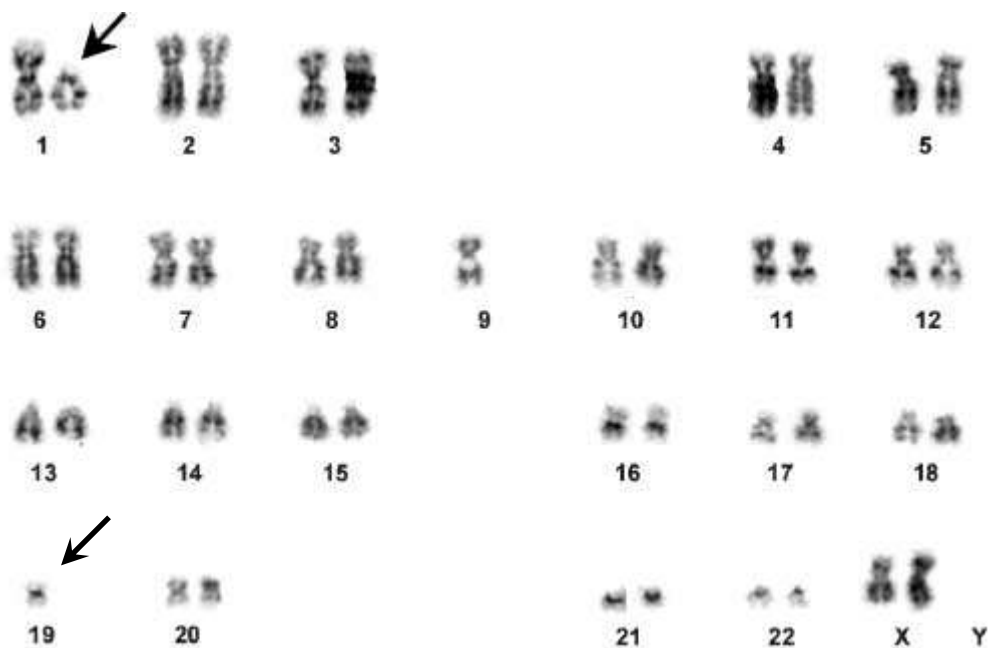


Figure 24 : caryotype en bande G d'un oligodendrogliome : le dérivé du chromosome 1 est formé par le bras court du chromosome 19 et le bras long du chromosome 1, le dérivé du chromosome 19 étant perdu. d'après Griffin et al.2006

D. LA CYTOGÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE : L'ACPA

Depuis une dizaine d'années, l'analyse comparative sur puce à ADN (ACPA) (plus couramment appelée CGH-array pour sa dénomination anglo-saxonne : Comparative Genomic Hybridization array) permet de réaliser une analyse pangénomique des altérations

quantitatives du génome beaucoup plus sensible que le caryotype conventionnel (80–82).

(1) HISTORIQUE DE L'ACPA

D'abord réalisée sur des chromosomes en métaphase d'un sujet normal (83) (avec une résolution de 5-10 Mb), l'ACPA a rapidement évolué à la fin des années 1990 vers l'utilisation de fragments d'ADN séquencés (chromosomes artificiels bactériens ou BACs, de taille comprise entre 100 et 200 kb) dont la position sur le génome était connue avec précision, avec une résolution de 1 Mb (84). En 2004, la première puce pangénomique (32 433 BAC) a été réalisée, avec une résolution de 30 kb (85). Depuis, l'ACPA connaît un essor, comme outil diagnostic et de recherche translationnelle dans de nombreux domaines. Pour encore en améliorer la résolution et l'optimisation technique, les puces utilisées actuellement sont des puces recouvertes de plusieurs centaines de milliers de sondes oligonucléotidiques (de taille comprise entre 20 et 70 nucléotides) avec une résolution pouvant descendre jusque 1 kb sur la totalité du génome. Plus il y a de sondes sur la puce, meilleure sera la résolution, correspondant à l'espace non couvert entre deux sondes successives.

(2) PRINCIPE

Le principe de l'ACPA repose sur l'hybridation par complémentarité de séquences entre l'ADN à analyser et des sondes oligonucléotidiques préalablement fixées sur une puce (support solide, lame de verre)

L'ADN génomique du patient, fragmenté et marqué par un fluorophore, est ainsi mis en compétition pour l'hybridation sur une puce à oligonucléotides, avec un ADN de référence, en quantité égale et lui aussi couplé à un fluorophore mais de couleur différente. L'hybridation sur les sondes va donc se faire de façon préférentielle pour l'ADN présent en quantité la plus importante (Figure 25).

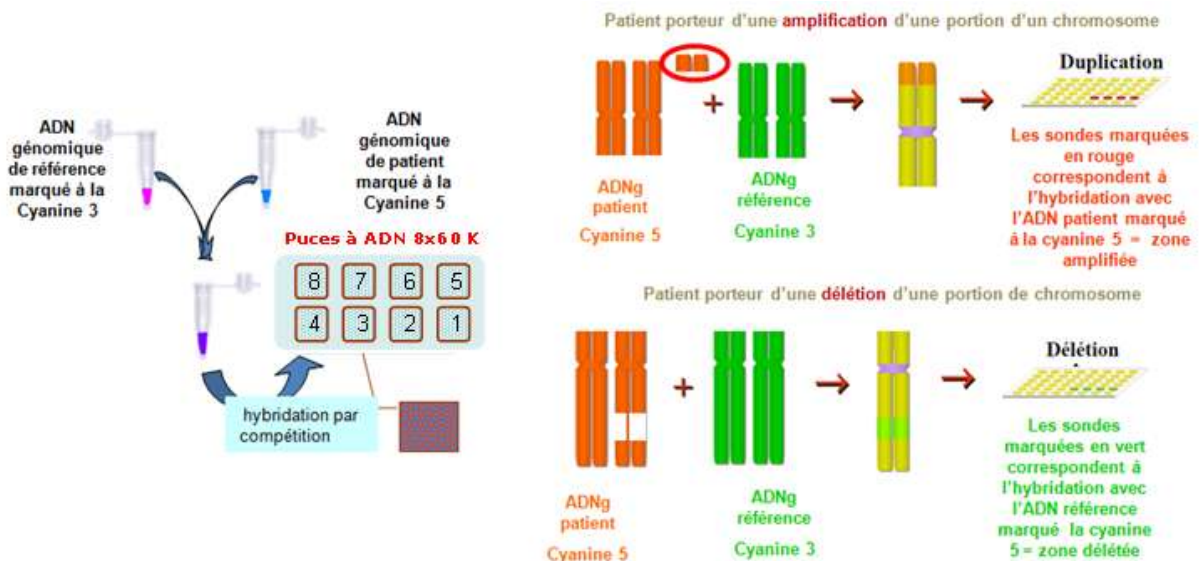


Figure 25 : Principe de la technique d'hybridation génomique comparative sur puce à ADN

Une différence dans le nombre de copies d'ADN entre l'ADN du patient et l'ADN de référence, pour un locus donné, modifiera donc le rapport d'intensité des deux fluorochromes. Les log ratios de fluorescence alors calculés permettront de déterminer la quantité relative de matériel génomique de chaque région (Figure 25) (81).

Sur les profils d'ACPA, dans une cellule normale, les ratios de fluorescence entre l'ADN testé et l'ADN de référence sont proches de 1, la ligne de base du log ratio est proche de 0. Par contre, dans les cellules présentant une perte d'une région chromosomique, le ratio de fluorescence est décalé en faveur de l'ADN de référence donc le log ratio est plus proche de -1. A l'inverse, pour un gain, le log ratio est proche de 1.

La technique d'ACPA permet donc une approche globale pangénomique et hautement résolutive de détection d'anomalies chromosomiques quantitatives, de type amplification ou délétion. La résolution varie de 1 Mb à quelques kilobases, selon les puces utilisées, en fonction du nombre de sondes (80).

Cette technique ne nécessite pas de mise en culture des cellules tumorales, principale contrainte à la réalisation du caryotype conventionnel. De ce fait, elle constitue un outil de choix pour l'étude pangénomique de l'ADN tumoral (82). En revanche, les translocations, sauf si elles sont déséquilibrées, ne peuvent être détectées (86).

(3) APPLICATION DANS LES GLIOMES

Le premier intérêt de l'ACPA est la recherche de la codélétion 1p19q dans les oligodendrogliomes. En regardant les profils des chromosomes 1 (à gauche) et 19 (à droite) sur la Figure 26, obtenus pour un patient présentant un oligodendrogliome et un patient sain, on observe bien un déséquilibre au niveau du bras court du chromosome 1 et du bras long du chromosome 19 signant la codélétion 1p19q chez le patient souffrant de l'OD.

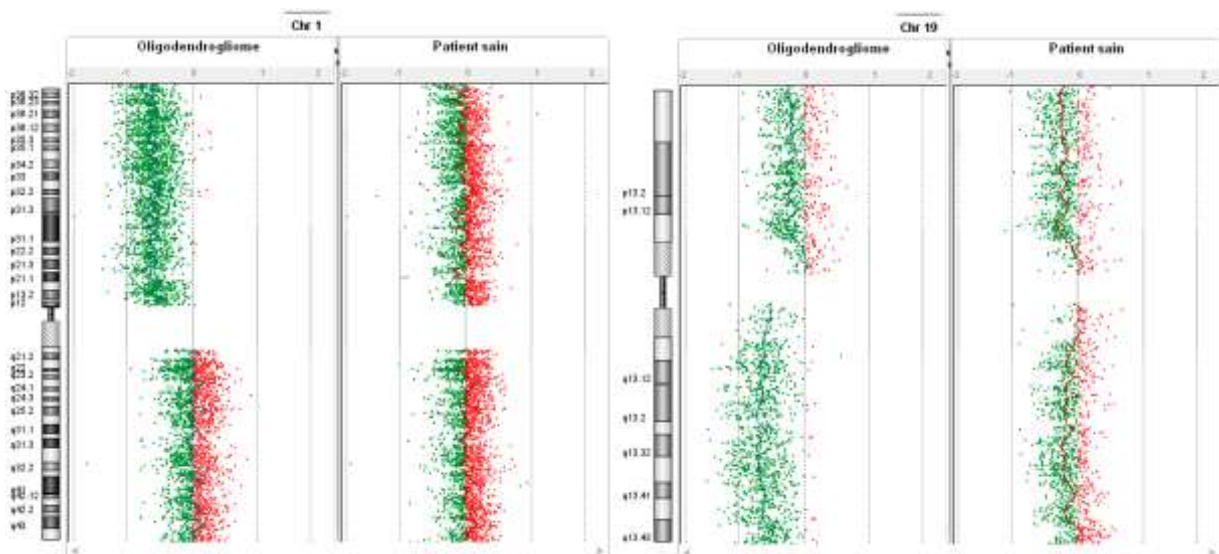


Figure 26 : Exemple de profil ACPA obtenu pour un oligodendrogliome présentant une codélétion 1p19q et un patient sain (chromosome 1 à gauche, chromosome 19 à droite) : en rouge, l'ADN testé, en vert, l'ADN de référence. La moyenne des log ratio de fluorescence rouge / vert calculé est représenté par la ligne de base. Un log ratio >0 signifie un gain, un log ratio <0 signifie une perte.

Le principal avantage de l'ACPA pour la recherche d'une codélétion 1p19q est de permettre d'identifier de manière plus exhaustive les délétions partielles, non détectées en analyse des marqueurs microsatellitaires, ou par FISH si les marqueurs ou sondes utilisés ne correspondent pas aux loci délétés. Ce point est important à considérer car la signification pronostique des délétions complètes et celle des délétions partielles sont différentes (87).

De plus, l'analyse ACPA donne une vue globale pangénomique des autres anomalies récurrentes, notamment la trisomie du chromosome 7, la monosomie du chromosome 10 ou les amplifications/délétions géniques décrites précédemment.

V. OBJECTIFS

Au laboratoire d'oncologie et génétique moléculaire des tumeurs solides, les gliomes sont explorés par plusieurs analyses :

- la recherche de mutation des gènes *IDH1* ou *IDH2* par technique de séquençage direct selon la méthode de Sanger, en cas de dépistage immunohistochimique IDH1 R132H négatif au laboratoire d'anatomie cytologie pathologique.
- la recherche de méthylation du promoteur du gène de la *MGMT* par technique de pyroséquençage.
- la recherche de perte d'hétérozygotie en 1p,19q et 10q par analyse des marqueurs microsatellites.

Ainsi, seules quelques une des anomalies (codélétion 1p19q, amplification EGFR, perte 10q) sont actuellement recherchées au diagnostic en pratique courante par des techniques ciblées. Or, les potentielles anomalies additionnelles non explorées peuvent orienter le diagnostic et/ou impacter le pronostic.

L'objectif majeur de ce travail est de mettre en place la technique d'ACPA dans les tumeurs solides sur tissus fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE), et d'en évaluer l'intérêt au diagnostic des gliomes.

Dans un premier temps, la mise en place de la technique d'ACPA sur tumeurs solides s'est faite en parallèle sur tissu congelé et tissu FFPE. Des essais d'amplifications de l'ADN génomique ont également été réalisés pour pallier à de faible quantité d'ADN. Pour valider la technique, des comparaisons de méthode ont été faites avec l'analyse des marqueurs microsatellites pour la codélétion 1p19q ainsi qu'avec des profils de caryotypes moléculaires réalisés dans un autre centre. Enfin, des essais de dilution d'un ADN tumoral dans un ADN de tissu sain (jusqu'à 10%) ont été effectués pour évaluer la sensibilité de la technique.

Dans un second temps, les profils ACPA de 38 gliomes, parmi lesquels 15 oligodendrogliomes (grade II et III), 13 oligoastrocytomes (grade II et III) et 10 astrocytomes (grade III et IV) ont été interprétés et comparés aux données publiées.

Enfin, la sphingosine-1-phosphate, régulée par une balance synthèse/dégradation dépendante des enzymes sphingosine-kinase (SPK) (synthèse) et sphingosine-phosphate lyase (SPL) (dégradation) joue un rôle dans les mécanismes d'angiogénèse tumorale impliqués dans la gliomagenèse (88). La SPK semble jouer un rôle oncogénique dans cette voie métabolique (89–91). L'inhibition de la synthèse de la S1P, par inhibition de la SPK est une cible potentielle de thérapie anti-angiogénique anti-tumorale (92,93). Dans une étude réalisée en interne au CHRU de Lille sur la balance « synthèse et dégradation de la

Sphingosine-1-phosphate » dans les gliomes, l'expression de la sphingosine kinase (SPK) et de la sphingosine-phosphate lyase (SPL) a été évaluée par technique immunohistochimique sur une série de 122 gliomes. Un score a été calculé pour chacun des deux paramètres testés, prenant en compte l'intensité du marquage et le pourcentage de cellules marquées (score compris entre 1 et 9). Les résultats ont montré qu'il existait une corrélation entre le grade tumoral et l'expression de la SPK et une corrélation inverse pour l'expression de la SPL. De plus, la surexpression de la SPK était associée à un moins bon pronostic. Pour poursuivre cette étude, 8 gliomes de grade II et III ont été sélectionnés parmi ceux corrélés à un moins bon pronostic, afin de tenter corréler la présence d'anomalie chromosomique au niveau des loci des gènes *SPHK1* (17q25.2) et *SGPL1* (10q22.1) à cette observation.

DEUXIÈME PARTIE: MATÉRIELS ET MÉTHODES

La mise au point de la technique d'ACPA dans le secteur d'oncologie et génétique moléculaires au sein de l'Institut de Biochimie-Biologie Moléculaire du CHRU de Lille a été réalisée en collaboration avec le secteur de cytogénétique onco-hématologique de l'Institut de Génétique Médicale de l'Hôpital Jeanne de Flandres, et avec l'aimable contribution du secteur des biopuces.

I. PATIENTS INCLUS

Tous les prélèvements testés ont été sélectionnés à partir de la tumorothèque de l'Institut de Pathologie du CHRU de Lille, grâce à la participation du Professeur Claude-Alain Maurage. La sélection des prélèvements s'est faite en trois étapes. Au total, 41 prélèvements de gliomes ont été analysés par ACPA (Tableau 5).

Dans un premier temps, 5 prélèvements ont été choisis parmi les patients inclus récemment dans le réseau POLA (réseau national dédié à la prise en charge des tumeurs oligodendrogiales de haut grade) et pour lesquels un génotypage par ACPA a déjà été réalisé auparavant par le laboratoire du centre de recherche de l'institut du cerveau et de la moelle épinière (CRICM) de l'hôpital Pitié-Salpêtrière à Paris, centre de référence clinique pour les inclusions dans le réseau POLA. Pour ces cinq prélèvements, des fragments tissulaires congelés et inclus en paraffine étaient disponibles. Cette première série a permis de valider le protocole en comparant les résultats obtenus pour les différents types de tissus et de valider les anomalies détectées avec les résultats déjà établis par le laboratoire extérieur.

Ensuite, 10 prélèvements ont été choisis parmi ceux analysés au laboratoire de biologie moléculaire pour la recherche de perte d'hétérozygotie 1p19q par technique d'analyse des marqueurs microsatellites ou étude MLPA.

Cette comparaison de méthode a permis de valider la robustesse, et de voir si l'analyse ACPA apporte des résultats intéressants pour les prélèvements difficiles.

Pendant une période de quelques mois, pour valider la technique ACPA, la recherche de la codélétion 1p19q a été réalisée en parallèle par analyse des marqueurs microsatellites (technique de référence au laboratoire de biologie moléculaire des tumeurs solides, lorsque c'était possible, c'est-à-dire lorsqu'un échantillon de sang du patient était disponible) et par ACPA. Depuis début janvier 2014, 18 tumeurs ont ainsi été reçues au laboratoire pour effectuer une recherche de la codélétion 1p19q, toutes ont bénéficié de l'analyse par

ACPA, seules 4 ont été faite en parallèle par analyse des marqueurs microsatellitaires.

Enfin, une quatrième cohorte a été réalisée à partir de l'étude interne sur la balance « synthèse/dégradation de la sphingosine-1-phosphate » dans les gliomes. 8 gliomes de grade II et III ont été retenus parmi ceux qui expriment fortement la sphingosine kinase (SPK) (score > 5) et faiblement la sphingosine lyase (SPL) (score <3), dans le but de voir si des anomalies dans les régions chromosomiques des locus des gènes *SPHK1* (17q25.2) et *SGPL1* (10q22.1) pouvaient être corrélées à ces expressions anormales.

Echantillon	Type gliome	% Cellules tumorales	ACPA			essai amplification	LOH	MLPA	POLA
			Tissu Congelé		Tissu FFPE				
			Non digéré	Digéré					
Cohorte POLA / mise au point de la technique									
1	LEBD	OD III	75%			x		x	x
2	DEPR	OA III	90%	x	x	x		x	x
3	AMEC	OD III	90%	x		x			x
4	ROHV	OD III	80%	x		x	x	x	x
5	BECS	OD III	90%	x	x				x
Cohorte comparaison de méthode LOH									
6	LEMA	OA II	85%			x		x	
7	PICF	OA III	90%			x		x	
8	NOUL	OA II	70%			x		x	
9	LEPA	OA II	70%			x		x	
10	WACP	OA II	80%			x		x	
11	DUBA	OA III	85%			x		x	x
12	DAUE	A III	30%			x		x	
13	GELS	OD II	faible			x		x	
Cohorte comparaison de méthode MLPA									
14	LUZV	GBM	90%			x	x		x
15	POCB	OA III	70%			x			x
Cohorte nouveau diagnostic									
16	GUIB	OD II	65%			x			
17	AZAL	OD II	65%			x			
18	KALH	GBM	90%			x			
19	BOTW	GBM	80%			x			
20	VANX	gliome	40%			x		x	
21	THEF	OA II	70%			x		x	
22	BISJ	A III/IV	65%			x		x	
23	DEVP	OA III	75%			x		x	
24	LOUA	A III	80%			x			
25	BEAB	GBM	90%			x			
26	GERD	GBM	90			x			
27	GLUH	OA III	90			x			
28	VANS	OD II	90%			x			
29	FLAM	A III	95%			x			
30	KOWD	OA II/III	70%			x			
31	DELJ	OD II	80%			x			
32	BATM	GBM II?	90%			x			
33	BRAA	GBM	100%			x			
Cohorte SPK-SPL									
34	DELA	OD II	70%			x		x	
35	GOUF	OD III	90%			x		x	
36	DEBS	OAII	90%			x		x	
37	NAMM	OAIII	95%			x		x	
38	BOUN	OD III	60%			x			
39	GUYS	OD III	90%			x			
40	CAPP	OD III	90%			x		x	
41	SALA	OD III	90%			x		x	

Tableau 5 : Patients inclus dans le travail, types d'échantillons et caractéristiques d'analyse (les cases grisées correspondent aux échantillons ayant permis de valider la méthode)

II. PREPARATION DU MATERIEL BIOLOGIQUE

La richesse tumorale de chaque prélèvement a été préalablement évaluée par un contrôle morphologique réalisé par un anatomo-pathologiste.

A. EXTRACTION D'ADN GÉNOMIQUE, QUANTIFICATION ET ÉVALUATION DE LA QUALITÉ

L'étape d'extraction d'ADN diffère pour les tissus congelés et pour les tissus FFPE. Les techniques utilisées en routine au laboratoire d'oncologie moléculaire ont été conservées.

Pour les tissus FFPE, l'extraction est manuelle, sur des colonnes de silice. Une étape préalable de déparaffinage au xylène est indispensable pour éliminer la paraffine et ne récupérer que le tissu tumoral. Pour cela, les copeaux sont incubés dans 1 mL de xylène, éliminé ensuite après centrifugation par du méthanol. Le culot de tissu tumoral est récupéré après centrifugation et élimination du surnageant, puis incubé pendant 3h à 56°C dans un tampon de lyse avec une protéinase K, enzyme qui dégrade les tissus et protéines de l'échantillon. L'ADN génomique est ensuite isolé et purifié sur colonne en silice avec le coffret QiaAmp® FFPE tissue Kit (Qiagen), selon les recommandations du fournisseur. Le volume d'élution final est de 30 µL.

Pour les tissus congelés, l'extraction est en partie automatisée. Une première étape de broyage du tissu avec un tampon de lyse et digestion par la protéinase K est nécessaire avant d'isoler l'ADN génomique sur l'automate BioRobot™ EZ1 (Qiagen), en utilisant le coffret EZ1 tissue kit (Qiagen).

La concentration d'ADN est ensuite déterminée précisément, par dosage fluorimétrique au Xenius® (SAFAS Monaco), avec le coffret Quant-iT™ PicoGreen® ds-DNA Assay Kit (Life Technologies), selon les recommandations du fournisseur. La qualité de l'ADN extrait est contrôlée par spectrophotométrie à microvolume (Nanodrop™) en évaluant le spectre d'absorbance sur une plage de longueurs d'onde définie entre 220 et 320 nm, et en calculant les ratios A260/A280 et A260/A230.

La quantité d'ADN utilisée doit être comprise entre 200 et 500 ng. Dans certains cas, la quantité minimale de matériel biologique n'était pas obtenue, des essais d'amplification d'ADN génomique ont été réalisés avant de faire la technique d'ACPA.

B. AMPLIFICATION D'ADN GÉNOMIQUE

Deux kits ont été testés en parallèle sur deux échantillons ayant un état de dégradation

différent.

Le premier kit, GenomePlex® Complete WGA kit (Sigma), a été testé pour une quantité initiale de 100 ng d'ADN (préconisé par le fournisseur pour les échantillons extraits de tissu FFPE) sur deux échantillons et sur les ADNs de référence.

L'amplification GenomePlex® (Sigma) a été réalisée en suivant le protocole du fournisseur, comme décrit ci-après. Brièvement, 100 ng d'ADN extrait de tissu FFPE (dosé au Nanodrop™) sont incubés dans le tampon de fragmentation 10X pendant exactement 4 minutes à 95°C puis remis dans la glace (4°C). Les échantillons sont ensuite incubés avec le tampon de préparation de la librairie (Library Preparation Buffer) et la solution de stabilisation de la librairie (Library Stabilization Solution) pendant 2 minutes à 95°C puis remis dans la glace. L'enzyme de préparation de la librairie (Library Preparation Enzyme) est ensuite ajoutée et le mélange est incubé 3 x 20 minutes successivement à 16°C, 24°C et 37°C puis 5 minutes à 72°C. Une fois la librairie prête, l'échantillon peut être amplifié avec la WGA DNA Polymerase dans un thermocycleur programmé comme suit : après une dénaturation initiale de 3 minutes à 95°C, le cycle d'amplification comprend deux étapes : à 95°C pendant 15 secondes (dénaturation) puis à 65°C pendant 5 minutes (élongation), et est répété 14 fois. L'ADN obtenu est ensuite purifié avec des filtres QIAquick® PCR Purification (Qiagen).

Le second kit, REPLI-g® FFPE kit (Qiagen), a été testé pour les deux mêmes échantillons. Le fournisseur préconise entre 100 et 300 ng d'ADN initial, ces deux quantités ont été testées pour chacun des deux échantillons. L'amplification REPLI-g® FFPE (Qiagen) a été réalisée en suivant le protocole du fournisseur, comme décrit ci-après. L'ADN à amplifier est ajouté aux 10 µL de FFPE Master Mix puis incubé à 24°C pendant 30 minutes. 5 minutes à 95°C sont nécessaires pour stopper la réaction. L'ADN est prêt à être amplifié par le RepliG Master Mix incubé à 30°C entre 2h et 8h selon le rendement souhaité. La réaction d'amplification est stoppée par chauffage à 95°C pendant 10 minutes. L'ADN obtenu est ensuite purifié avec des filtres QIAquick® PCR Purification (Qiagen).

L'ADN génomique amplifié est ensuite quantifié par spectrophotométrie (Nanodrop™).

Pour la suite du protocole d'ACPA, 2000 ng d'ADNs amplifiés (ADN testé et ADN de référence) (au Nanodrop™) sont utilisés pour le marquage et l'hybridation.

C. HYBRIDATION GÉNOMIQUE COMPARATIVE SUR PUCE À ADN

L'ensemble du protocole a été réalisé à partir du protocole Agilent Oligonucleotide Array-based CGH for genomic DNA Analysis (version 7.2, Juillet 2012), et le protocole adapté utilisé en routine au laboratoire de Génétique Médicale. Le coffret de marquage utilisé est le coffret Complete Genomic SureTag DNA Enzymatic Labeling kit (Agilent Technologies, référence 5190-3399).

Chaque ADN de patient testé est comparé à un ADN de référence de donneur anonyme de

sexe masculin (référence H de formule chromosomique 46, XY) ou féminin (référence F de formule chromosomique 46, XX) (inclus dans le kit SureTAg). Ces ADNs de référence doivent être traités de la même façon que les ADNs de patient, et avec la même quantité.

(1) DIGESTION ENZYMATIQUE

Une étape de digestion enzymatique préalable au marquage est préconisée dans le protocole du fournisseur pour augmenter la qualité des résultats, en travaillant avec des fragments d'ADN génomique de faibles poids moléculaires (200-500 pb). En travaillant avec des ADNs extraits de tissus FFPE de qualité médiocre, parfois déjà très dégradés, cette étape de digestion enzymatique n'est pas réalisée. Par contre, les ADNs génomiques extraits de tissus congelés sont de bonne qualité, et nécessitent donc cette étape de digestion enzymatique préalable par les enzymes de restriction Rsa I et Alu I pendant 2 heures à 37°C, suivie d'une étape d'inactivation à 65°C pendant 20 minutes. Le protocole par la suite reste identique.

Lorsqu'une amplification a été nécessaire, les ADNs amplifiés obtenus sont fragmentés et ne nécessitent donc pas de digestion enzymatique. Ils sont traités de la même façon que les ADNs extraits de tissus FFPE pour la suite du protocole.

(2) MARQUAGE À LA CYANINE

L'analyse des puces à ADN se fait par analyse comparative de la mesure de l'intensité de fluorescence entre un ADN génomique de patient marqué à la cyanine 5 (qui émet dans le rouge) et un ADN de référence marqué à la cyanine 3 (qui émet dans le vert).

Pour le marquage par ces fluorochromes, l'ADN génomique digéré (tissu congelé) ou fragmenté (tissu FFPE) est préalablement dénaturé par chauffage à 95°C pendant 5 minutes ; cette étape est plus longue pour les ADNs de référence (10 minutes) afin de provoquer une fragmentation et une dégradation de l'ADN de référence dans le but d'obtenir une qualité qui se rapproche le plus possible de l'ADN extrait de tissu FFPE. Ensuite, les deux ADNs sont marqués séparément, par incorporation de nucléotides dUTP marqués à la cyanine 5 ou 3, grâce à l'enzyme Exo (-) Klenow pendant 2 heures à 37°C, suivie d'une étape d'inactivation de l'enzyme à 65°C pendant 10 minutes.

Pour éliminer tout excédent d'enzyme, de cyanines et de dNTPs susceptibles d'interférer avec l'hybridation, l'ADN est ensuite purifié sur les colonnes Amicon 30 kDa (incluses dans le kit SureTag).

Pour évaluer l'efficacité du marquage, l'incorporation des cyanines est mesurée par spectrophotométrie à micro volume (Nanodrop™, méthode MicroArray), afin de calculer l'activité spécifique (en pmol de cyanine / µg d'ADN) et le rendement (en ng). Les concentrations de cyanine 3 et 5 sont mesurées respectivement à 550 nm et 647 nm.

(3) HYBRIDATION

Les deux échantillons (ADN du patient et ADN de référence H/F) sont traités de la même façon avant d'être mélangés puis déposés sur la puce à ADN pour l'hybridation. Ainsi, l'ADN de référence (marqué à la cyanine 3) et l'ADN du patient (marqué à la cyanine 5) sont mélangés avec le tampon d'hybridation (Oligo aCGH Hybridization Kit, Agilent), dénaturés à 95°C pendant 3 minutes puis traités par le CGH Blocking et le Cot-1 Human DNA (Agilent) pendant 30 minutes à 37°C afin de bloquer toutes les séquences répétitives et éviter l'hybridation non spécifique. Le mélange est ensuite déposé sur la puce et l'hybridation est réalisée dans un four à hybridation thermostaté à 65°C pendant 40 heures. Ce temps d'hybridation est normalement de 24h pour les tissus frais ou le sang. Pour les tissus plus difficiles comme les tissus FFPE, il est recommandé d'hybrider sur une période plus longue.

Les puces à ADN utilisées sont des puces SurePrint G3 Human CGH 8x60 K Microarray commercialisées par Agilent Technologies, permettant d'étudier huit patients à la fois. Elles possèdent environ 60 000 sondes simple brin de 60 paires de bases, recouvrant l'ensemble du génome humain avec une résolution de 50 Kb.

(4) IMAGE DIGITALISÉE DE LA PUCE À ADN

Après l'hybridation, deux lavages successifs (5 minutes dans un tampon W1 à température ambiante puis 1 minute dans le tampon W2 à 37°C) sont nécessaires avant de scanner la lame pour limiter la fluorescence non spécifique responsable du bruit de fond.

Le logiciel Scan Control permet de paramétrer la lecture avec une résolution de 3 µm, sur une surface de 61 X 21,6 mm (surface utile de la lame) pour obtenir une image digitalisée.

Lors de la lecture par le scanner Agilent®, chaque spot (correspondant au dépôt de la sonde sur la lame) est excité par un laser; l'intensité de fluorescence est mesurée pour chacune des longueurs d'ondes d'excitation : 550 (cyanine 3) et 647 nm (cyanine 5).

D. ANALYSES DES DONNÉES ET INTERPRÉTATION

Le logiciel Cytogenomics version 2.7 est une compilation de deux logiciels : le premier Feature Extraction permet l'extraction des données brutes à partir de l'image (format TIF) obtenue par le scanner.

L'image obtenue présente des spots allant du rouge (fixation de l'ADN testé) au vert (fixation de l'ADN de référence) en passant par des niveaux de jaune (fixation des deux ADNs), d'intensité variable. L'image est convertie en ratio de fluorescence rouge / fluorescence verte.

La qualité de la puce est basée sur l'évaluation des intensités de fluorescence (log ratio), la répartition homogène des spots sur toute la surface de la puce, le bruit de fond correspondant à chacun des fluorochromes et la reproductibilité (même sonde déposée plusieurs fois sur la lame).

Lors de l'extraction, chaque spot est attribué à un locus précis du génome, en fonction de la position de la sonde correspondante sur la puce et du design de la puce paramétré dans le logiciel.

Sur chaque puce, des contrôles négatifs (« DarkCorner », ne générant pas de fluorescence) et positifs (« GE_BrightCorner », correspondant à des zones d'hybridation non spécifiques générant une fluorescence) sont positionnés à chaque coin de la puce, pour permettre le positionnement de la grille. D'autres sondes (séquences synthétiques adenvirales (polyA) (+)E1A_r60_n11) servent de contrôle positif pour estimer la qualité des puces (marquage, lavage...), qui ne sont pas prises en compte pour la normalisation ou la correction des données et ne vont donc pas influencer les données biologiques.

Le second logiciel permet une représentation graphique des log ratios pour faciliter l'analyse approfondie des résultats en associant la position des sondes dans le génome (selon les références standardisées du génome hg19), la taille de l'anomalie chromosomique détectée (amplification ou délétion, gènes touchés) et la signification statistique (p-value).

En supposant que la quantité d'ADN fluorescent fixée est proportionnelle à la quantité d'ADN présent dans l'échantillon de départ, le ratio fluorescence rouge / fluorescence verte est calculé pour chaque sonde hybridée. Chaque sonde spécifique d'un locus donné étant présente plusieurs fois sur la puce, l'hybridation s'équilibre entre l'ADN de référence (vert) et l'ADN testé (rouge). Le ratio est donc proche de 1, soit un log ratio proche de 0. Si ce ratio est supérieur à 1 (log ratio >0), la cible est en quantité plus importante dans l'ADN testé par rapport à l'ADN de référence, correspondant à un gain de cette cible chez le patient. A l'inverse, si ce ratio est inférieur à 1 (log ratio <0), la cible est en quantité moins importante dans l'ADN testé par rapport à l'ADN de référence, correspondant à une perte de la cible chez le patient.

Les paramètres appliqués lors de l'analyse sont : l'algorithme ADM-2, un seuil de fluorescence basé à 6.0 et la fonction Fuzzy zero non activée.

Les seuils des paramètres d'analyse ont été modifiés pour l'étude des tumeurs solides sur tissus FFPE (analyse tumeur1) : la résolution étant fixée à 1000 kb, les anomalies de taille inférieure ne sont pas détectées. Une région est considérée amplifiée si le log ratio est supérieur à 0.25 ou délétée si le log ratio inférieur à -0.25. En théorie, avec ces seuils, l'analyse peut détecter un gain dans 40% de cellules tumorales et une perte dans 30% de cellules tumorales. Pour des échantillons dont la richesse en cellules tumorales est inférieure à 50% de la totalité de l'échantillon, une seconde méthode d'analyse a été paramétrée (Analyse tumeur2) avec des log ratio à +/- 0.1, permettant de détecter un gain ou une perte dans 15% de cellules tumorales.

Pour chaque échantillon, les anomalies sont définies par le nombre de sondes anormales, le log ratio de fluorescence Rouge/Vert (proportionnel au pourcentage de cellules tumorales présentes dans l'échantillon), la taille et la position chromosomique (bande chromosomique et position nucléotidique par rapport à l'extrémité distale du bras court du chromosome concerné) ainsi que les gènes concernés dans la région.

TROISIÈME PARTIE : RÉSULTATS

I. QUALITE ET QUANTITE D'ADN GENOMIQUE

Suite à l'extraction d'ADN, la qualité et la concentration des éluions sont évaluées respectivement par spectrométrie et par fluorimétrie. L'électrophorèse sur gel d'agarose permet d'évaluer le degré de dégradation des ADNs.

En travaillant sur des échantillons de biopsies stéréotaxiques, la quantité d'ADN extraite des tissus paraffinés est souvent un point limitant à la réalisation de l'analyse par ACPA. Le fait de diminuer le volume d'éluion finale à 30 μ L (au lieu de 100 μ L utilisé en routine au laboratoire) a permis de concentrer les échantillons mais reste insuffisant dans certains cas pour obtenir une quantité suffisante d'ADN génomique dans un volume maximal de 13 μ L. Pour ces échantillons, une étape préalable d'amplification d'ADN génomique est requise.

La qualité d'ADN génomique extrait est reflétée par le dosage spectrophotométrique au Nanodrop™ : les éluions d'ADN sont de bonne qualité lorsqu'elles ne présentent pas de contamination protéique (ratios d'absorbance A260/A280 compris entre 1,8 et 2) ou par des composés organiques (ratios d'absorbance A260/A230 supérieurs à 1). D'autre part, l'aspect en forme de « cloche » du spectre d'absorbance (Figure 27), reflète également l'absence de contaminants dans la solution d'ADN extrait.

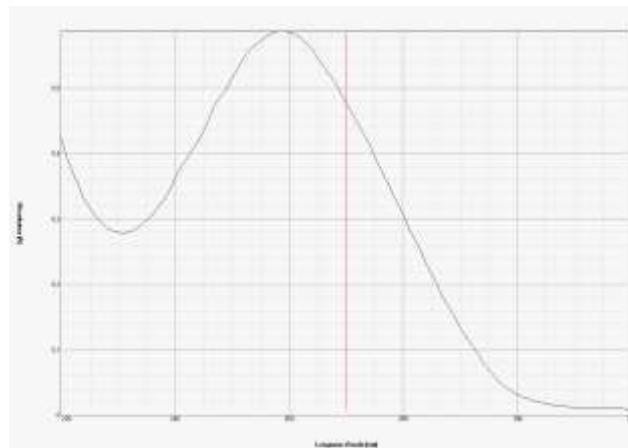


Figure 27: Spectre d'absorbance $DO=F(\lambda)$ obtenu après extraction d'ADN génomique à partir de tissu FFPE

Les ADNs extraits de tissus FFPE sont potentiellement dégradés par les prétraitements subis lors de la fixation au formol et l'inclusion en paraffine. La migration électrophorétique des ADNs sur gel d'agarose à 2% permet d'apprécier leur état de dégradation, très variable d'un prélèvement à un autre (Figure 28).

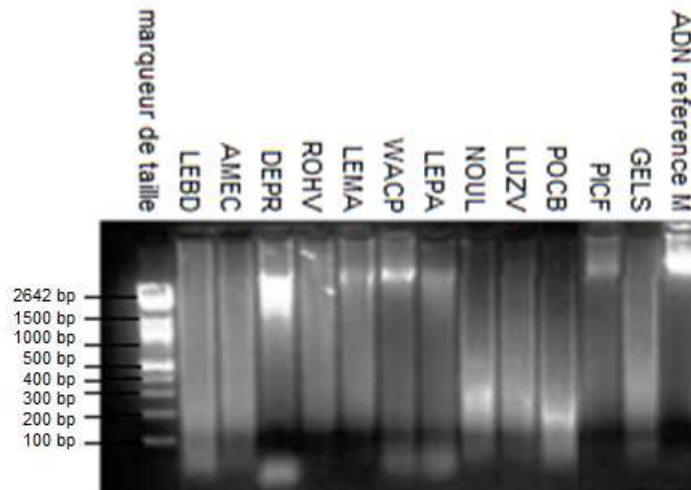


Figure 28 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose à 2% d'ADN de tissus FFPE. Le premier puit contient le marqueur de taille avec des bandes de 100, 200, 300, 400, 500, 1000, 1500 et 2642 bp. Le dernier puit contient l'ADN de référence masculin commercialisé.

Par exemple, l'échantillon LEBD est dégradé avec des fragments de taille très variable (entre 1000 et <100 bp), l'échantillon DEPR est peu fragmenté, avec un profil proche de celui de l'ADN de référence ; l'échantillon NOUL est très fragmenté, de petites tailles <400bp.

II. RESULTATS DES CARYOTYPES MOLECULAIRES PAR ACPA

A. ANALYSE DES DONNÉES

Après l'hybridation et lavage de la puce à ADN, la lecture par le scanner génère une image (Figure 29).



Figure 29 : exemple d'image obtenue sous format .TIF pour un patient après lecture de la puce à ADN par le scanner. Chaque petit point (spot) correspond à une sonde hybridée avec un fragment d'ADN.

L'inspection de l'image montre une puce hybridée de façon homogène, avec des points fluorescents équitablement répartis, sans trace de poussière ou autre artefact qui gêneraient la lecture, et sans bruit de fond apparent.

Pour chaque spot, la fluorescence obtenue est soit verte, c'est-à-dire que seul l'ADN de référence s'est fixé et est donc présent en quantité plus importante ; soit rouge, seul l'ADN du patient s'est fixé ; soit jaune, lorsque les ADNs des deux conditions se sont fixés en quantité égale.

Cette image est ensuite analysée par le logiciel CytoGenomics version 2.7.22.

Pour chaque puce analysée, le logiciel génère un rapport de qualité (QC Report). Ce dernier permet de valider techniquement les résultats sur plusieurs paramètres.

Des paramètres permettent de s'assurer que les sondes sont correctement attribuées par rapport au design de la puce et que la fluorescence de chaque spot est homogène, validant l'efficacité d'hybridation des ADNs sur les sondes et l'absence de poussière pouvant gêner l'hybridation.

Les autres paramètres tels que la fluorescence des contrôles positifs et négatifs, l'intensité du signal, le bruit de fond et la reproductibilité des sondes répétées pour chaque canal (signal vert et signal rouge) indiquent la qualité du marquage et permettent de valider la technique (marquage, hybridation et lavage).

B. QUALITÉ DES RÉSULTATS

La Derivative Log Ratio Spread (DLRS) calculée mesure l'étendue de la dérivée des log ratio.

La valeur de la DLRS permet d'évaluer la qualité globale de la puce. Plus la DLRS s'éloigne de 0, plus le profil est dispersé autour de la ligne de base et plus les résultats sont difficiles à interpréter (Figure 30).

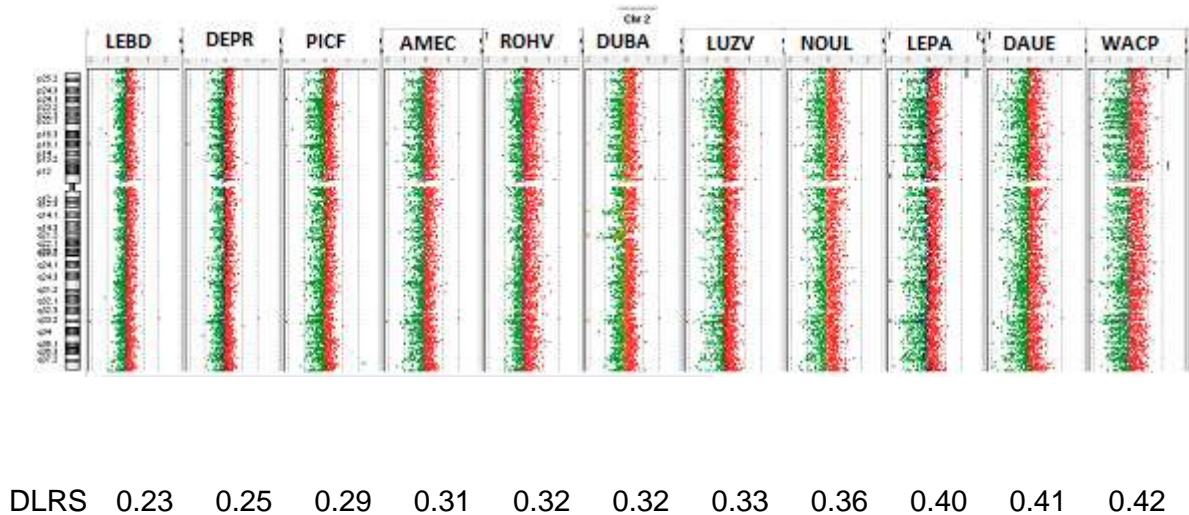


Figure 30 : Profil chromosomique (chromosome 2) obtenu pour différents échantillons FFPE en fonction de la valeur de la DLRS

Selon le fournisseur, jusqu'au seuil fixé à 0,2, l'image est de très bonne qualité ; au-delà de 0,3, la qualité est médiocre.

Sur les premiers essais, on constate que les DLRS sont meilleures sur les tissus congelés, quelque soit le protocole appliqué (avec ou sans digestion), que sur les tissus FFPE (Figure 31), excepté pour l'échantillon LEBD pour lequel le tissu congelé étant très nécrosé, l'ADN était de mauvaise qualité.

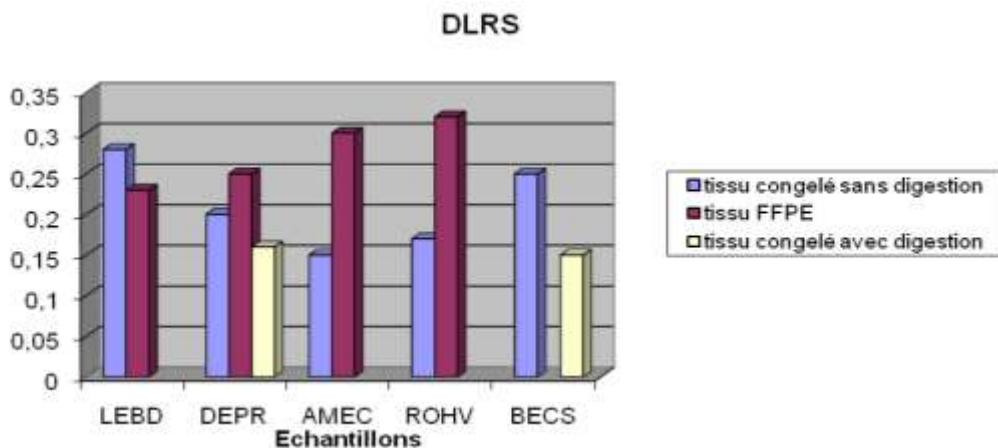


Figure 31 : Valeur de la DLRS pour les 5 échantillons de la première cohorte en fonction du type de tissu (FFPE ou congelé)

Par la suite, sur des cohortes plus larges, les valeurs de DLRS pour des tissus congelés répondent au seuil du fournisseur. Pour la plupart des profils obtenus à partir d'ADN extrait de tissu FFPE, les valeurs de DLRS sont supérieures à 0.3, avec des profils interprétables jusqu'au seuil de 0.4.

La DLRS est définie comme le paramètre le plus pertinent pour évaluer la qualité de l'image obtenue après hybridation, et reflète la qualité de l'ADN initial, sans pour autant être corrélé à l'état de dégradation de l'ADN testé. En effet, les profils électrophorétiques des ADNs peuvent être très différents pour des DLRS très proches (exemple des échantillons GOUF et AZAL) et à l'inverse, pour des DLRS très différentes, les profils électrophorétiques peuvent être superposables (exemple des échantillons LEBD et GELS) (Figure 32).









ADN	SALA	BOTW	LEBD	GOUF	AZAL	GELS	NAMM	GUIB
Qualité ADN	Non dégradé	Faiblement dégradé	+/- dégradé	Fortement dégradé	Faiblement dégradé	+/- dégradé	Fortement dégradé	Faiblement dégradé
Profil électrophorétique sur gel agarose								
DLRS	0.19	0.21	0.23	0.31	0.32	0.41	0.41	0.49

Figure 32 : Comparaison de l'état de dégradation des ADNs et des DLRS

III. MISE AU POINT DES PROTOCOLES

A. COMPARAISON DES PROFILS ACPA SUR TISSU CONGELÉ ET TISSU FFPE

Ces essais ont été réalisés sur la première cohorte de 5 échantillons pour lesquels nous disposons de tissu congelé et de tissu fixé et inclus en paraffine FFPE (Tableau 5). Pour chaque type de tissu (congelé ou paraffiné), différents protocoles ont été testés, notamment avec ou sans l'étape de digestion qui précède le marquage par les cyanines.

Les résultats de caryotype moléculaire réalisé par le laboratoire de la Pitié-Salpêtrière dans le cadre des inclusions des gliomes anaplasiques dans le protocole POLA ont permis de valider les résultats.

Au total, cinq échantillons ont été comparés, parmi lesquels 4 sur tissus congelés et tissus FFPE sans digestion, et 2 sur tissus congelés avec et sans digestion.

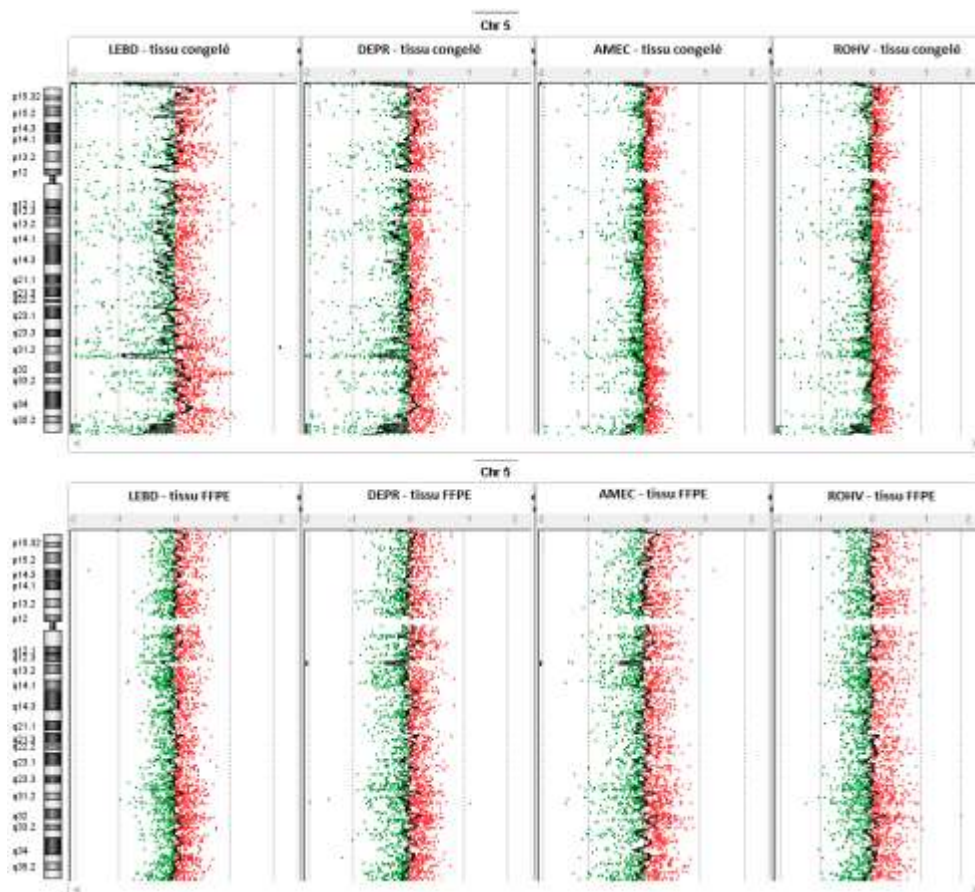


Figure 33 : comparaison des profils du chromosome 5 sur tissu congelé(en haut) et tissu FFPE (en bas) pour 4 échantillons. Les DLRS respectives sont 0.28, 0.2, 0.15 et 0.17 pour les tissus congelés et 0.23, 0.25, 0.31 et 0.32 pour les tissus FFPE.

Dans un premier temps, les 4 échantillons testés (tissu congelé et tissu FFPE) ont été traités de la même façon, avec le même protocole sans digestion enzymatique préalable. Les résultats ci-dessus (Figure 33) montrent la comparaison entre tissu congelé non digéré (en haut) *versus* tissu FFPE (en bas).

Pour les tissus FFPE, même si la DLRS est plus élevée, le profil est plus homogène. Pour les tissus congelés sans digestion, bien que la qualité soit correcte (DLRS < 0.2), les profils sont beaucoup plus dispersés et beaucoup d'anomalies non spécifiques sont détectées.

Ces anomalies non spécifiques concernent principalement des régions à proximité des centromères ou des télomères (non codantes) (Figure 34 zone 1), ou parfois, lorsque les profils sont trop hétérogènes autour de la ligne de base (fluctuation des log ratio autour de 0), des petites régions sont considérées anormales (gain ou perte) (Figure 34 zone 2).

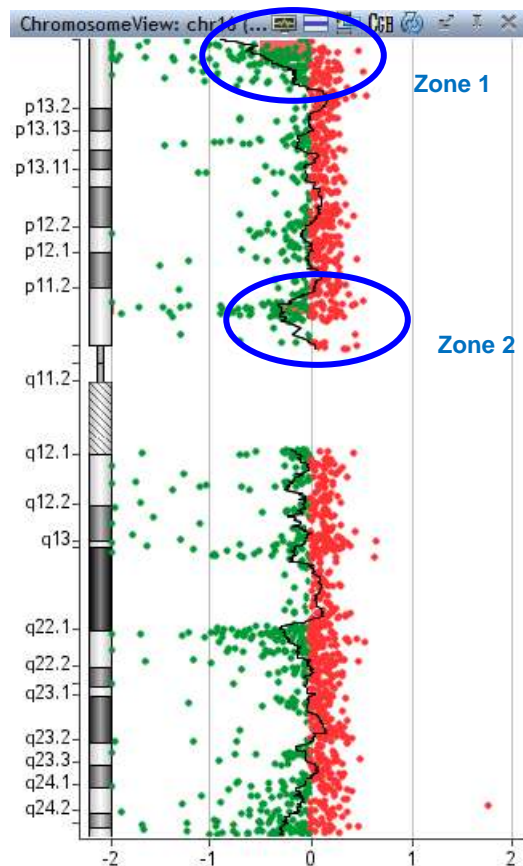


Figure 34 : Profil du chromosome 16 sur tissu congelé sans digestion avec des anomalies non spécifiques (AMEC) les zones entourées en bleu sont des régions considérées comme anormales mais sont non spécifiques. Zone 1 : region télomérique ; Zone 2 : profil fluctuant autour de la ligne de base.

Par la suite, pour améliorer les profils sur tissus congelés, deux essais de digestion enzymatique ont été fait sur tissu congelé pour les échantillons DEPR et BECS. Les résultats obtenus sont améliorés, avec une DLRS plus faible. Sur la Figure 35, on remarque que le

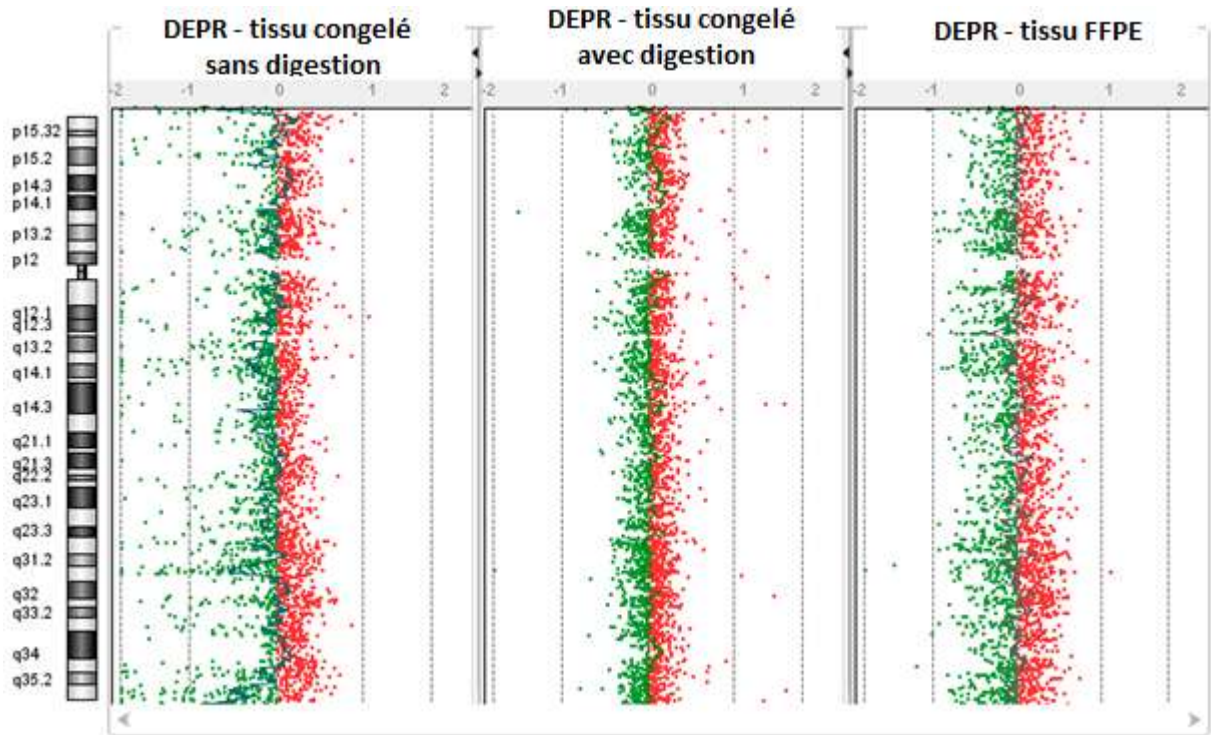


Figure 35 : Profil du chromosome 5 pour l'échantillon DEPR testé sur tissu congelé non digéré (à gauche), tissu congelé avec digestion (au centre) et sur tissu FFPE (à droite). Les DLRS respectives sont 0.2, 0.16 et 0.27. en rouge : l'ADN testé, en vert : l'ADN de référence. Sur l'axe des abscisses : log ratio rouge/vert

De plus, la digestion enzymatique améliore fortement la qualité des résultats en éliminant la plupart des anomalies non spécifiques retrouvées sur tissus congelés sans digestion (Figure 36).

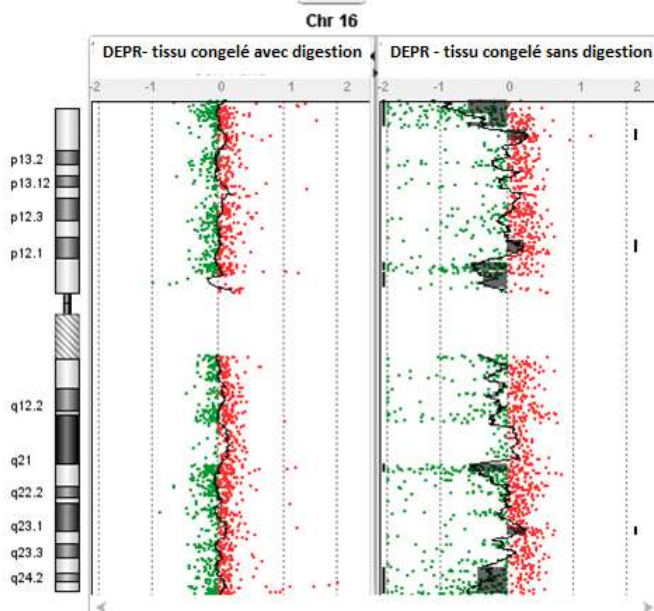


Figure 36 : Profil du chromosome 16 avec et sans digestion. Les anomalies non spécifiques (surlignées en gris à droite) ne sont pas retrouvées après digestion.

Quelques anomalies non spécifiques peuvent également être détectées sur tissu FFPE mais sont beaucoup moins fréquentes (Figure 37).

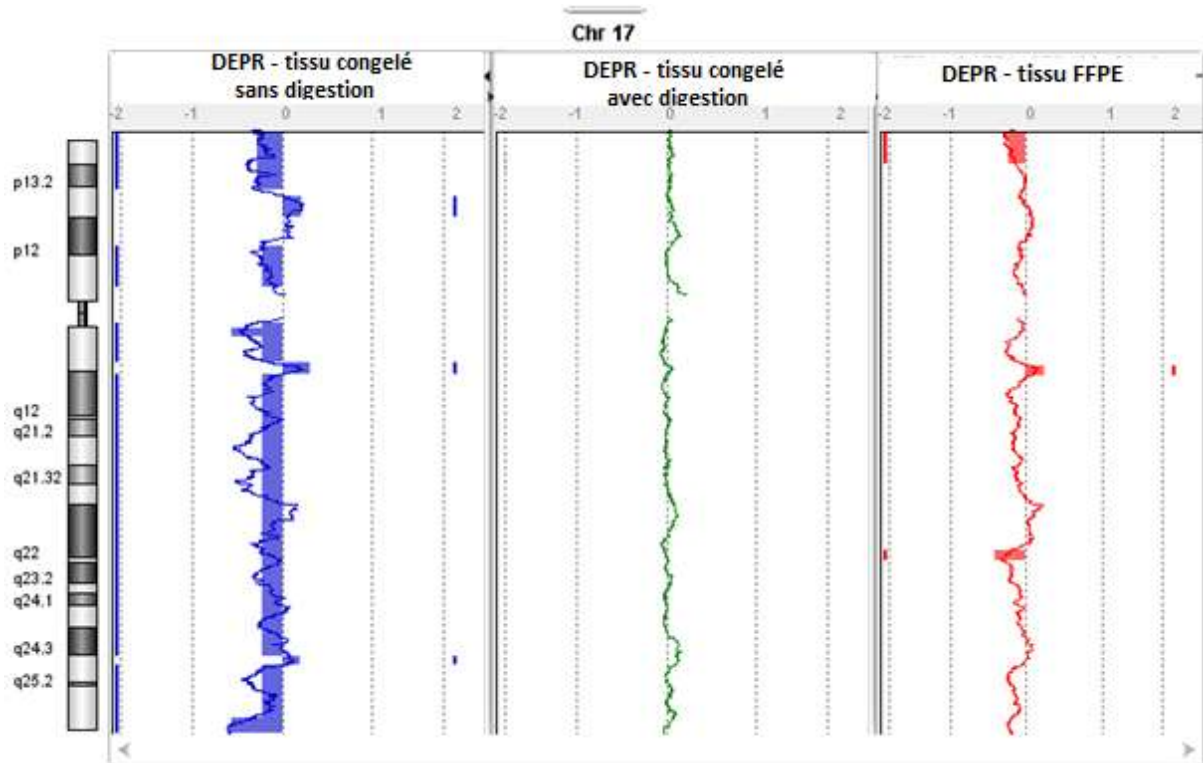


Figure 37 : Profil du chromosome 17 pour l'échantillon DEPR testé sur tissu congelé non digéré (à gauche), tissu congelé avec digestion (au centre) et sur tissu FFPE (à droite). Les DLRS respectives sont 0.2, 0.16 et 0.27. la ligne représente la moyenne des log ratio sur la région concernée. Perte du chromosome 17 sur le tissu congelés non digéré, cette anomalie non spécifique n'est pas retrouvée sur les tissus FFPE ou congelé digéré, ni sur le profil POLA, est donc liée à un mauvais traitement de l'ADN.

Des essais sur tissus FFPE avec le protocole avec digestion ont été réalisés sur des prélèvements de tumeurs autres que des gliomes (résultats non présentés), et ont montré que l'étape de digestion ne modifie pas le nombre d'anomalies détectées, mais par contre diminue fortement la qualité des résultats.

B. AMPLIFICATION D'ADN GÉNOMIQUE

(1) RENDEMENT DE L'AMPLIFICATION

Les essais d'amplification d'ADN génomique de deux échantillons (échantillon LUZV et ROHV) et des ADNs de référence sont présentés dans le Tableau 6.

Les deux échantillons ont été testés après dilution des solutions d'ADNs extraits, respectivement au 1/8 et au 1/5 et des ADNs de référence F et M respectivement au 1/4 et au 1/3, pour obtenir des concentrations proches de 40 ng/μL au Nanodrop™. Les quantités

initiales d'ADN utilisées pour les amplifications étaient 100 ou 300 ng selon les protocoles, calculées à partir des concentrations données par le Nanodrop™.

kit d'amplification		quantité initiale d'ADN (en ng)	avant amplification		après amplification		Rendement	
			concentration NanoDrop (ng/μL)	concentration SAFAS (ng/μL)	concentration NanoDrop (ng/μL) (après purification)	concentration SAFAS (ng/μL) (après purification)		quantité finale d'ADN (en ng) (éluat 20μL)
Echantillon LUZV	REPLI-g FFPE	100	41,1	6,8	2379,7	122,6	47600	476
	REPLI-g FFPE	300			2428,7	126,0	48560	162
	WGA	100			374,2	113,8	7480	75
Echantillon ROHV	REPLI-g FFPE	100	43,9	10,3	3448,2	119,3	68964	690
	REPLI-g FFPE	300			3882,2	139,6	77644	259
	WGA	100			445,6	115,1	8912	89
ADN ref F	REPLI-g FFPE	100	44,6	35,9	1092,6	123,4	21852	219
	REPLI-g FFPE	300			1731,4	113,9	34628	115
	WGA	100			1130,9	96,1	22618	226
ADN ref M	WGA	100	41	38,6	860,1		17202	172

Tableau 6 : rendement d'amplification d'ADN génomique par RepliG FFPE et GenomePlex

WGA = amplification par le kit GenomePlex®

Les deux échantillons testés présentent des profils électrophorétiques sur gel d'agarose différents : l'échantillon LUZV était fortement dégradé, l'échantillon ROHV partiellement dégradé.

L'amplification a été efficace pour les deux kits testés, avec des rendements plus élevés pour le kit REPLI-g® FFPE (Qiagen).

L'amplification REPLI-g® FFPE (Qiagen) semble saturer à 100 ng d'ADN initial car les rendements sont plus faibles avec 300 ng d'ADN initial qu'avec 100 ng. Le kit REPLI-g® FFPE (Qiagen) est spécifiquement dédié aux ADNs extraits de tissus FFPE, l'amplification des ADNs de référence (ADNs commerciaux de bonne qualité) ont un rendement plus faible que les ADNs FFPE.

L'amplification GenomePlex® (Sigma) peut être réalisée sur tout type d'ADN, les rendements sont meilleurs pour les ADNs de référence que pour les ADNs FFPE.

(2) ANALYSE ACPA DES ADNS AMPLIFIÉS

Après l'amplification, ces ADNs ont été analysés par ACPA. Pour chaque échantillon, 3 ADNs amplifiés et un ADN non amplifié ont été testés contre l'ADN de référence correspondant (non amplifié ou amplifié avec le même kit et la même quantité d'ADN initial), avec 2000 ng d'ADN amplifié ou 500 ng d'ADN non amplifié. Des contrôles référence H (ADN masculin)/référence F (ADN féminin) non amplifié et amplifié en GenomePlex® (Sigma) permettent de valider l'essai.

La qualité du marquage et des images obtenues après hybridation sont résumées dans le Tableau 7.

kit d'amplification	quantité d'ADN (en ng)	Qualité du marquage			Qualité image						DLRS	
		concentration NanoDrop après marquage (nM)	incorporation Cya3 (ADN ref)	incorporation Cya5 (ADN testé)	canal vert (Cya3 ADN de référence F)			canal rouge (Cya5 ADN testé)				
					g-Signal	g-Bruit de fond	g-Signal/Bruit	r-Signal	r-Bruit de fond	r-Signal/Bruit		
Echantillon LUZV	non amplifié	500	378,3	53,93	32,25	1994	23	87	3102	31	100	0,33
	REPLI-g FFPE 100	2000	243,5	60	41,9	1507	48	31	1300	104	13	1,03
	REPLI-g FFPE 300	2000	243,8	64	44,3	1468	29	51	1434	60	24	0,83
	WGA	2000	375	69,3	36,3	1597	25	64	1558	34	46	0,59
Echantillon ROHV	non amplifié	500	302,3	60,9	21,2	1831	20	92	1434	24	60	0,32
	REPLI-g FFPE 100	2000	292,9	63,5	45,1	1716	63	27	705	83	8	1,23
	REPLI-g FFPE 300	2000	348,7	66,5	47,60	2127	51	42	1381	99	14	0,97
	WGA	2000	399,3	70,6	44,1	2132	24	89	2033	35	58	0,51
ADN ref M	non amplifié	500	273,8	72,3	51,9	1540	19	81	1806	25	72	0,1
	WGA	2000	364,7	41,7	52,1	1057	17	62	2267	38	60	0,32

Tableau 7 : Contrôle qualité du marquage et de l'hybridation des ADNs amplifiés

WGA = amplification par le kit GenomePlex®

Après amplification par le kit REPLI-g® FFPE (Qiagen), l'incorporation des cyanines a été efficace, sans différence notable entre 100 ou 300 ng d'ADN initial. Les données de qualité de marquage et d'hybridation des images obtenues montrent des DLRS très élevées, proches de 1 (seuil défini pour les ADNs FFPE à 0.4) et des intensités de fluorescence acceptables (seuil >100) dans les deux canaux (rouge et vert), mais associées à un bruit de fond très important (seuil <20). Les ratios signal/bruit sont très faibles et insuffisants car les valeurs sont inférieures au seuil établi par le fournisseur (>30) pour le canal rouge.

Après amplification par le kit GenomePlex® (Sigma), l'incorporation des cyanines a été efficace, les intensités de fluorescence et le bruit de fond sont acceptables. Seules les DLRS sont plus élevées qu'en l'absence d'amplification.

a. Contrôle d'amplification : ADN de référence H contre ADN de référence F

Le contrôle d'amplification sur les ADNs de référence a été réalisé uniquement avec le kit GenomePlex® (Sigma).

La comparaison de l'ADN de référence de sexe masculin (XY) avec un ADN de référence de sexe féminin (XX) montre des différences au niveau des chromosomes sexuels avec une perte d'un chromosome X et un gain du chromosome Y chez l'homme (Figure 38).

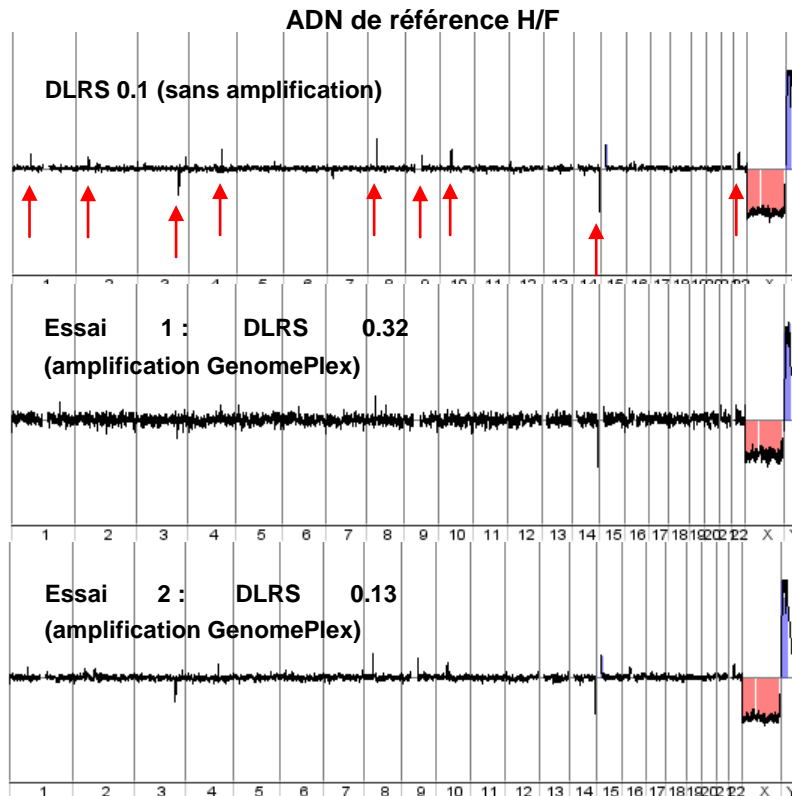


Figure 38 : Profil génomique d'ACPA obtenu après hybridation des ADN de référence H/F non amplifié (en haut) et amplifiés par GenomePlex (en bas) pour les essais 1 et 2. Perte du chromosome X (en rouge), Gain du chromosome Y (en bleu). Les autres anomalies visibles (flèches rouges) sont des polymorphismes qui signent les variabilités génétiques d'un individu à un autre.

Les résultats des profils d'ACPA obtenus lors du premier essai montrent un profil superposable avec et sans amplification mais l'amplification entraîne une perte de qualité, avec une DLRS augmentée à 0.32 et un profil beaucoup plus dispersé (Figure 39 essai 1). Un nouvel essai a été réalisé, en suivant le même protocole d'amplification mais en utilisant un thermocycleur à la place de bain marie et plaque chauffante. Les résultats de l'essai 2 sont très satisfaisants, avec une DLRS à 0.13 (Figure 39).

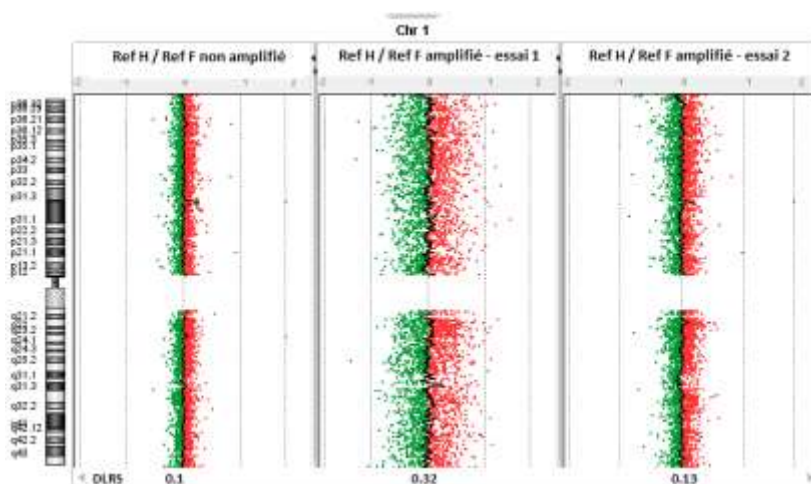


Figure 39 : Profil du chromosome 1 ADN de référence H/F, de gauche à droite : sans amplification et avec amplification (essai 1 et essai 2) GenomePlex.

Les DLRS respectives sont: 0.1, 0.32 et 0.13.

b. Essai d'amplification sur 2 échantillons FFPE : comparaison des kits GenomePlex® (Sigma) et REPLI-g® FFPE (Qiagen)

Pour les deux échantillons amplifiés, les profils sont comparés entre le kit REPLI-g® FFPE (Qiagen) et le kit GenomePlex® (Sigma) (Figure 40 et Figure 41). Bien que les rendements soient meilleurs pour le kit REPLI-g® FFPE (Qiagen), les profils obtenus sont beaucoup trop dispersés et ininterprétables. L'amplification avec le kit GenomePlex® (Sigma) donne des profils qui se rapprochent le plus de ceux sans amplification, même si la qualité est encore médiocre (DLRS trop élevée).

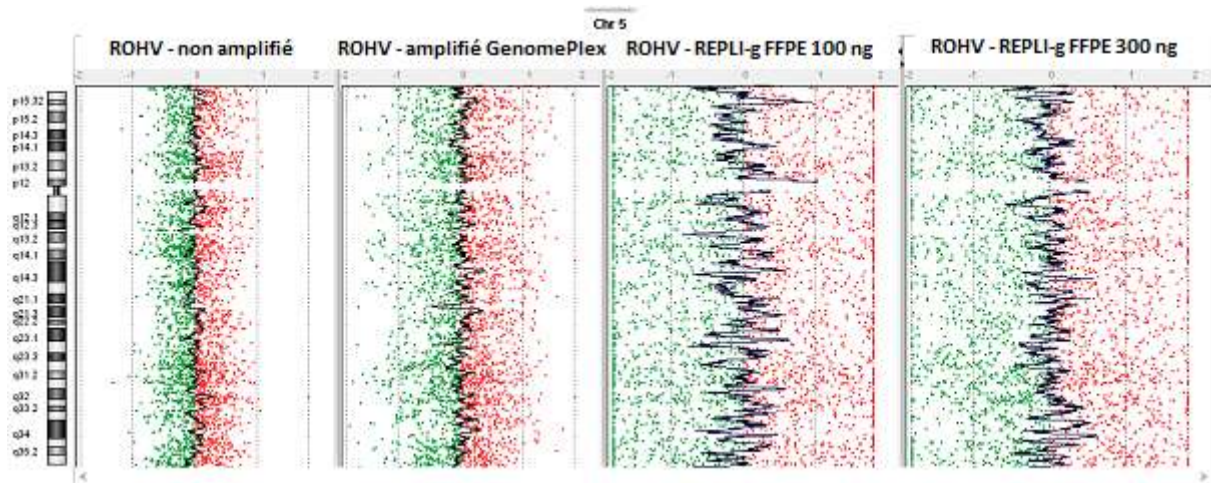


Figure 40 : Profil d'ACPA du chromosome 5 pour l'échantillon ROHV de gauche à droite: sans amplification, amplification avec le kit GenomePlex, RepliG FFPE à 100 ng et RepliG FFPE à 300 ng DLRS respectives : 0.32 , 0.51, 1.23 et 0.97

Les anomalies sont retrouvées avec GenomePlex® (Sigma) mais pas avec REPLI-g® FFPE (Qiagen). Sur la Figure 41, une perte partielle sur le chromosome 1p détectée sur l'ADN non amplifié (à gauche), est également retrouvée après amplification GenomePlex® (Sigma) mais partiellement pour le kit REPLI-g® FFPE (Qiagen).

Les profils obtenus ne sont pas satisfaisants pour les amplifications avec le kit REPLI-g® FFPE (Qiagen) (Figure 42), quelque soit la quantité initiale d'ADN utilisée, et les principales anomalies sont plus difficilement détectées et beaucoup moins significatives. A partir de 300 ng d'ADN génomique, bien que l'amplification soit de moins bon rendement, les résultats d'ACPA sont légèrement mieux qu'à partir de 100 ng mais restent insuffisants pour pouvoir utiliser ce kit d'amplification.

Les résultats obtenus avec le kit GenomePlex® (Sigma) sont par ailleurs satisfaisants (Figure 42), bien que la DLRS soit supérieure au seuil fixé (0.4). Les anomalies détectées sur ADNs extraits de FFPE sont retrouvées après amplification, avec des log ratios de

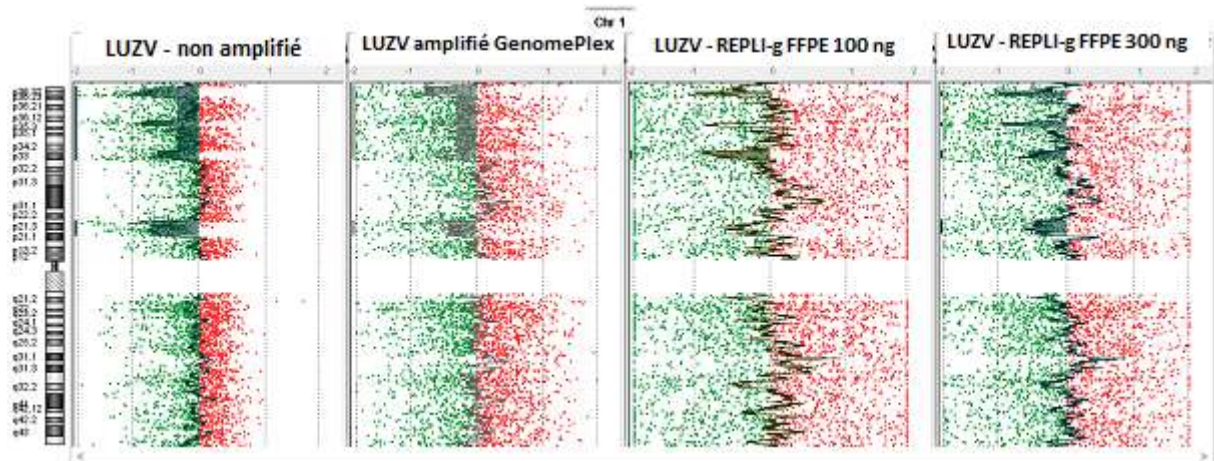


Figure 41 : Profil d'ACPA du chromosome 1 pour l'échantillon LUZV de gauche à droite: sans amplification, amplification avec le kit GenomePlex, RepliG FFPE à 100 ng et RepliG FFPE à 300 ng
DLRS respectives : 0.33 , 0.59, 1.04 et 0.83

fluorescence très proches et des p-values très significatives. Les régions anormales sont sensiblement identiques, impliquant approximativement les mêmes sondes.

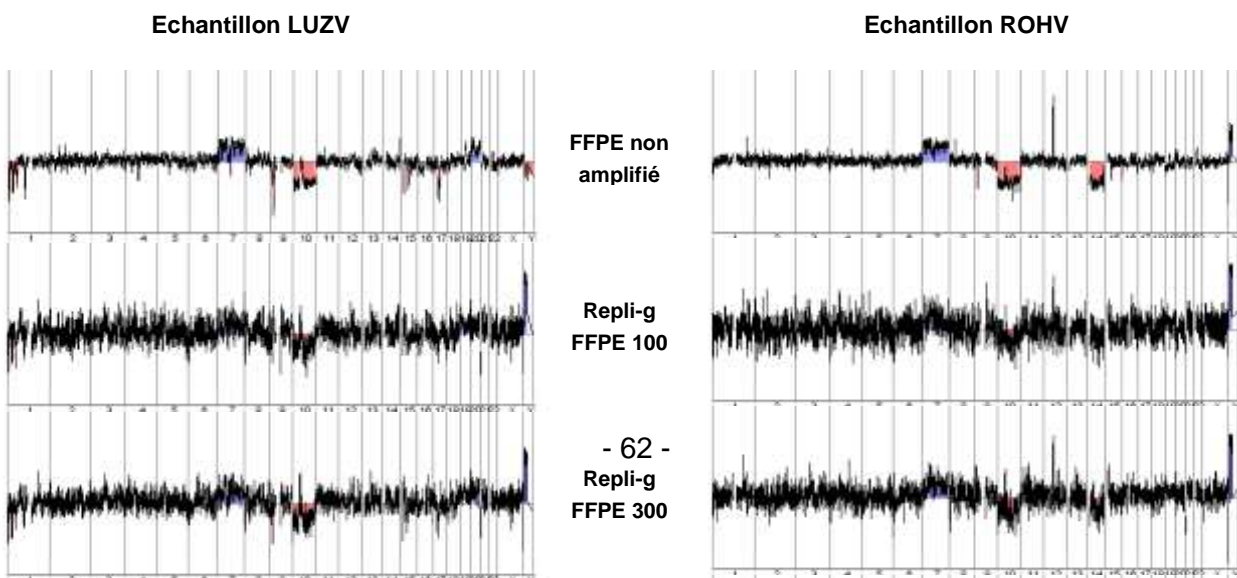


Figure 42 : Profil génomique obtenu pour chaque condition d'amplification testée pour les échantillons LUZV (à gauche) et ROHV (à droite)

Comme pour les ADNs de référence, un deuxième essai d'amplification avec le kit GenomePlex® (Sigma) a été fait en suivant le même protocole que pour le premier essai mais en utilisant le thermocycleur. Les résultats obtenus ne sont pas du tout améliorés par rapport au premier essai, contrairement à ce qui avait été obtenu avec les ADNs de référence. Les DLRS restent toujours élevées (0.60 pour l'échantillon LUZV et 0.53 pour l'échantillon ROHV) et les profils superposables à l'essai 1 (Figure 42).

C. EVALUATION DU SEUIL DE SENSIBILITE

Le deuxième point limitant dans l'analyse de profil ACPA est la richesse de l'échantillon en cellules tumorales. Deux méthodes d'analyse ont été définies permettant dans un premier temps de détecter les anomalies ayant un log ratio supérieur à 0.25 en valeur absolue. Ceci permet donc de voir un gain ou une perte présent dans environ 40% des cellules. En théorie, le second paramétrage permet de descendre jusqu'à 15% de cellules tumorales.

Pour avoir une idée de la limite de détection des anomalies, des essais de dilution d'un ADN tumoral dans un ADN de tissu sain ont été réalisés.

A partir d'un ADN tumoral (BOTW) dont la richesse du prélèvement a été estimée à 80% de cellules tumorales par l'anatomopathologiste, la valeur des log ratio des anomalies détectées permet d'estimer leur présence dans environ 70% des cellules de l'échantillon. En se basant sur ce calcul, une gamme de dilution a été faite avec un ADN de tissu sain (de sexe féminin) pour obtenir des solutions respectives à environ 30%, 20% et 10% de cellules tumorales.

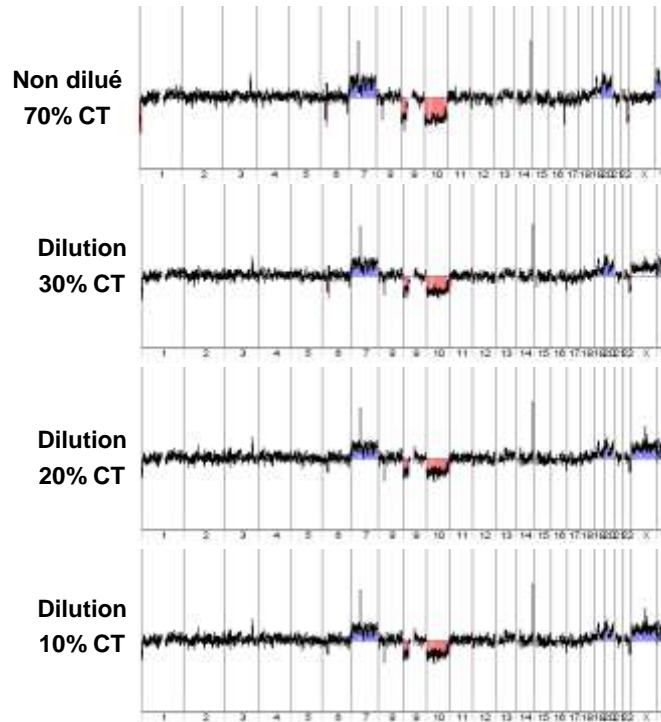


Figure 43 : Profil génomique ACPA d'une gamme de dilution d'un ADN tumoral (70%,30%, 20% et 10% de cellules tumorales)

Pour les trois dilutions testées, les anomalies sont toujours détectées, en utilisant les paramètres de l'analyse « tumeurV2 » pour la dernière dilution (seuil des log ratio fixé à +/- 0.1 pour détecter une anomalie) (Figure 43).

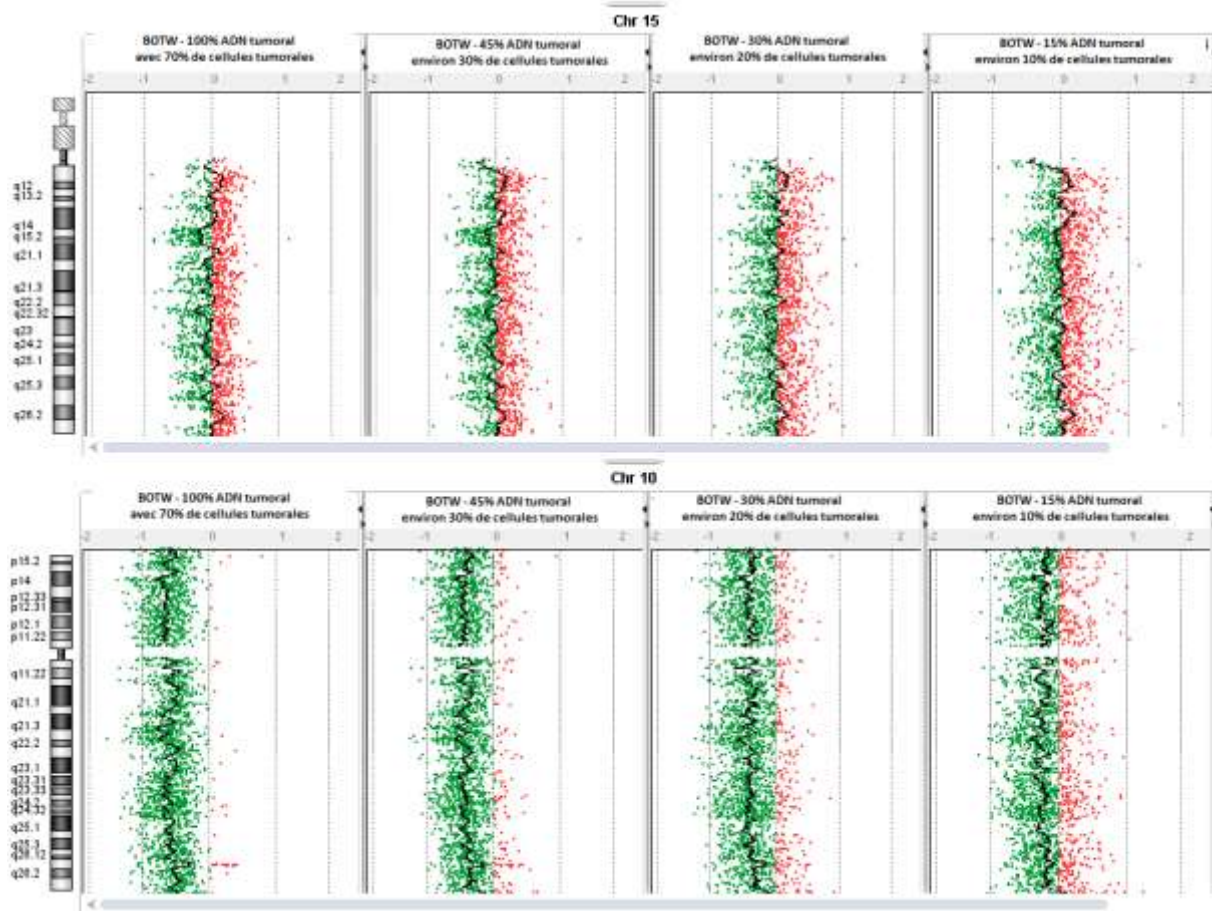


Figure 44 : Profil des chromosomes 15 (en haut, sans anomalie) et 10 (en bas, avec perte totale) dans l'échantillon no n dilué et dilué à 30, 20 et 10% respectivement de gauche à droite. En vert : l'ADN de référence. EN rouge : l'ADN testé (mélange de tissu tumoral et de tissu sain dans les dilutions)

Les profils chromosomiques (Figure 44) restent identiques en l'absence d'anomalie. A l'inverse, la quantité croissante en ADN de tissu sain vient parasiter l'interprétation et rend la lecture des anomalies plus difficile. Dans cet exemple, les anomalies sont toujours détectables dans la dilution à 10% de cellules tumorales (Figure 43).

IV. VALIDATION DE LA METHODE

A. SÉRIE D'OLIGODENDROGLIOMES CARACTÉRISÉS DANS LE CADRE DU PROTOCOLE POLA

Les cinq premiers échantillons testés par ACPA ont été comparés sur tissu congelé et tissu FFPE. Toutes les anomalies ont été retrouvées dans les deux types de tissus et étaient concordantes avec les résultats POLA (Figure 45). Sur la figure ci-dessous, sont présentés pour chaque échantillon, les résultats d'ACPA du protocole POLA (profil en bleu) et les résultats d'ACPA obtenu sur tissu FFPE (profil en noir). Les 22 chromosomes et les chromosomes sexuels sont alignés horizontalement, avec en ordonnée, l'échelle des log ratio. Un gain est visualisé par une ligne de base plus haute et une perte par une ligne de base plus basse. Sur nos profils, les gains sont visualisés en bleu et les pertes en rouge.

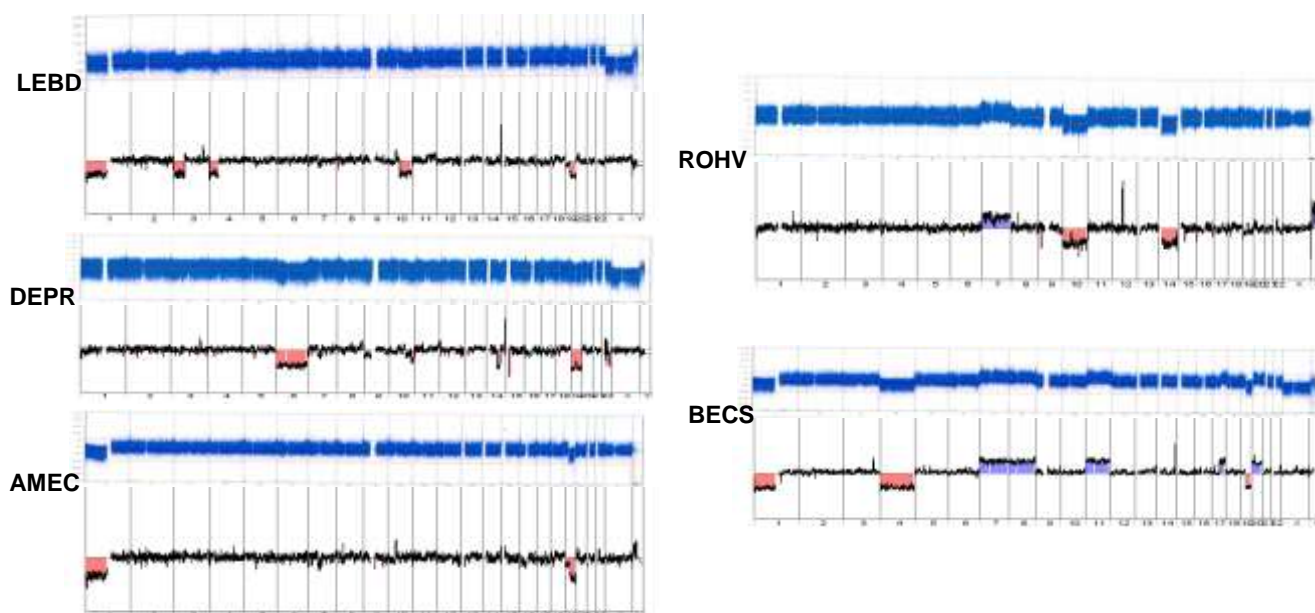


Figure 45 : Comparaison des profils d'ACPA du protocole POLA (profil en bleu) et les résultats d'ACPA obtenu sur tissu FFPE (protocole sans digestion).

Échantillon LEBD : codélétion 1p19q, pertes partielles en 3p, 4p et 10q ; Échantillon DEPR : perte totale des chromosomes 6 et 19, perte partielle des chromosomes 10q et 14q ; échantillon AMEC : codélétion 1p19q isolée ; échantillon ROHV : gain du chromosome 7, délétion homozygote en 9p21.3 (gène *CDKN2A*), perte totale des chromosomes 10 et 14, amplification gène *CDK4* (12q14), perte partielle du chromosome 15q ; échantillon BECS : codélétion 1p19q, monosomie du chromosome 4, gain des chromosomes 7, 8, 11, 17a et 20.

B. COMPARAISON DE MÉTHODE : ANALYSE DES MARQUEURS MICROSATELLITAIRES ET ACPA

Pour tester la robustesse de la technique par ACPA, 10 échantillons au total (échantillons LEBD, DEPR, ROHV de la première cohorte et 7 autres échantillons de la deuxième cohorte

Résultats : Anomalies cytogénétiques des gliomes

LEMA, PICF, NOUL, WACP, DUBA, DAUE, GELS) reçus au laboratoire pour la recherche de perte d'hétérozygotie des chromosomes 1p et 19q ont été analysés en parallèle par ACPA. Parmi ces 10 échantillons, 4 présentaient des profils douteux, rendus non interprétables par la technique d'analyse des marqueurs microsatellitaires par PCR puis analyse de fragments.

Les tableaux ci-après montrent les résultats obtenus d'une part par l'analyse des marqueurs microsatellitaires et les résultats d'ACPA pour le chromosome 1p (Tableau 8), 19q (Tableau 9) et 10 (Tableau 10) pour chacun des 10 échantillons comparés.

Chromosome 1										
Cohorte comparaison de méthode LOH versus ACPA										
	LEBD	WACP	ROHV	DUBA	DAUE	GELS	LEMA	PICF	NOUL	DEPR
Analyse des marqueurs microsatellitaires du chromosome 1p										
	D1S243						+	?	+	
	D1S468	-	NI	+	+	+	+	?	+	+
	D1S2660				NI	+			+	+
	D1S2870				NI		NI		+	
	D1S214	-	-	+	+	+	-	?	NI	+
	D1S2663				+	NI	-		+	+
	D1S548							NI	+	NI
	D1S1612	-	NI	+	+	+	-	?	NI	NI
	D1S450					+		+	+	+
	D1S2736	-	NI	NI	+	NI	NI	-	NI	NI
	D1S1151					NI		?	+	+
	D1S2740				+			+	NI	+
	D1S1597	NI	NI	NI	NI	+	+	+	?	NI
GATA 129H04	-	-	+	NI	+	+	+	?	+	+
D1S1728	-	-	+	NI	NI	+	+	+	NI	NI
conclusion	LOH 1p		absence de LOH en 1p			LOH partiel		LOH partiel		absence de LOH en 1p
Cohorte comparaison de méthode LOH versus ACPA										
	LEBD	WACP	ROHV	DUBA	DAUE	GELS	LEMA	PICF	NOUL	DEPR
profil du chromosome 1p par ACPA										
conclusion	perte du bras court du chromosome 1p36.33-p11.2		absence d'anomalie sur le chromosome 1			Perte partielle 1p36.33-p36.22, p36.12 et p22.1		Perte partielle 1p36.33-p34.2, p34.1 et p22.1		absence d'anomalie sur le chromosome 1

Tableau 8 : résultat de l'analyse des marqueurs microsatellitaires du chromosome 1p et de l'analyse ACPA des 10 échantillons de la cohorte (pour l'analyse des marqueurs microsatellitaires : case grisée (-) = marqueur homozygote, (+) = marqueur hétérozygote, NI = non interprétable, ? = douteux, vide = non réalisé, pour l'analyse ACPA : zone rouge = délétée)

Pour l'analyse des marqueurs microsatellitaires, au minimum 2 marqueurs présentant une perte d'hétérozygotie (c'est-à-dire présent à l'état homozygote au niveau tumoral, case grisée «-» dans le tableau) sont nécessaires pour affirmer une perte. A l'inverse, lorsque les marqueurs sont à l'état hétérozygote au niveau tumoral, il n'y a pas de perte d'hétérozygotie.

Résultats : Anomalies cytogénétiques des gliomes

Par ailleurs, lorsqu'un marqueur est constitutionnellement homozygote (au niveau sanguin), l'analyse est alors non interprétable (NI) car elle ne permet pas de déterminer si un allèle est perdu au niveau tumoral. Par analyse ACPA, les zones surlignées en rouge correspondent à des délétions.

La comparaison des résultats par analyse des marqueurs microsatellites et ACPA est concordante, retrouvant toujours soit la codélétion 1p19q pour les deux premiers échantillons, soit l'absence de codélétion 1p19q pour les 4 suivants.

		Chromosome 19									
		Cohorte comparaison de méthode LOH versus ACPA									
Analyse des marqueurs microsatellites sur le chromosome 19q		LEBD	WACP	ROHV	DUBA	DAUE	GELS	LEMA	PICF	NOUL	DEPR
		D19S245	19q13.11	-	-	+	NI	+	+	+	NI
D19S178	19q13.31	NI	NI	NI	NI	+	NI	+	+	+	NI
D19S112	19q13.32	-	-	+	NI	NI	NI	+	+	+	-
D19S412	19q13.32	NI	-	NI	NI	+	+	NI	+	+	NI
D19S606	19q13.32	-	NI	+	+	+	+	NI	+	NI	-
D19S596	19q13.33	NI	-	+	NI	NI	+	+	NI	NI	-
D19S246	19q13.33	-	-	+	+	NI	+	+	+	-	NI
conclusion		LOH 19q		absence de LOH en 19q			absence de LOH en 19q		NI	LOH 19q	
Profil du chromosome 19q par ACPA											
		ACPA	perte du bras long du chromosome 19q12-q13.43			absence d'anomalie sur le chromosome 19			absence d'anomalie sur le chromosome 19		perte partielle 19q13.3-2-q13.41

Tableau 9 : résultat de l'analyse des marqueurs microsatellites du chromosome 19q et de l'analyse ACPA des 10 échantillons de la cohorte (pour l'analyse des marqueurs microsatellites : case grisée (-) = marqueur homozygote, (+) = marqueur hétérozygote, NI = non interprétable, ? = douteux, vide = non réalisé, pour l'analyse ACPA : zone rouge = délétée)

Les 4 derniers échantillons LEMA, PICF, NOUL et DEPR, dont l'analyse des marqueurs microsatellites a posé problème et rendue non interprétable pour certains chromosomes, ont été testé par ACPA.

Les échantillons LEMA et PICF présentent une perte d'hétérozygotie partielle sur le chromosome 1p par l'analyse des marqueurs microsatellites. En superposant ces résultats avec les profils obtenus par ACPA, une perte de la région distale 1p36.33-p36.22 et 1p36.33-p34.2 est respectivement retrouvée, correspondant aux marqueurs microsatellites perdus. D'autres régions sont retrouvées perdues par ACPA, non couvertes par les marqueurs microsatellites étudiés.

Résultats : Anomalies cytogénétiques des gliomes

L'échantillon PICF présente également une perte d'hétérozygotie partielle du chromosome 10q. Sur le chromosome 10, l'analyse ACPA montre un gain sur le bras court du chromosome 10 concernant la région 10p15.2-p11.21 coupé en 10p14-p13 par une zone délétée. Le bras long du chromosome 10 est partiellement délété en 10q23.2-q23.31, en 10q23.32-q26.2 et en 10q26.3. Chacune de ces régions est couverte par des marqueurs microsatellitaires avec perte d'hétérozygotie.

Pour l'échantillon NOUL, l'analyse est non interprétable car seuls 2 marqueurs sur le chromosome 10 et 1 sur le chromosome 19 montrent une perte d'hétérozygotie. Par analyse ACPA, on retrouve une perte totale d'un chromosome 10 et des pertes partielles sur le chromosome 19 en 19q13.2-q13.31, en q13.32-q13.41 et en 19q13.41-q13.42.

L'analyse de fragment réalisée pour l'échantillon DEPR ne montre pas de perte d'hétérozygotie sur le chromosome 1, une perte d'hétérozygotie en 19q et un profil non interprétable sur le chromosome 10. Le profil ACPA obtenu pour ces trois chromosomes montre un chromosome 1 sans anomalie, une perte distale du chromosome 10q touchant les régions 10q25.3-q26.3 et une perte totale du chromosome 19.

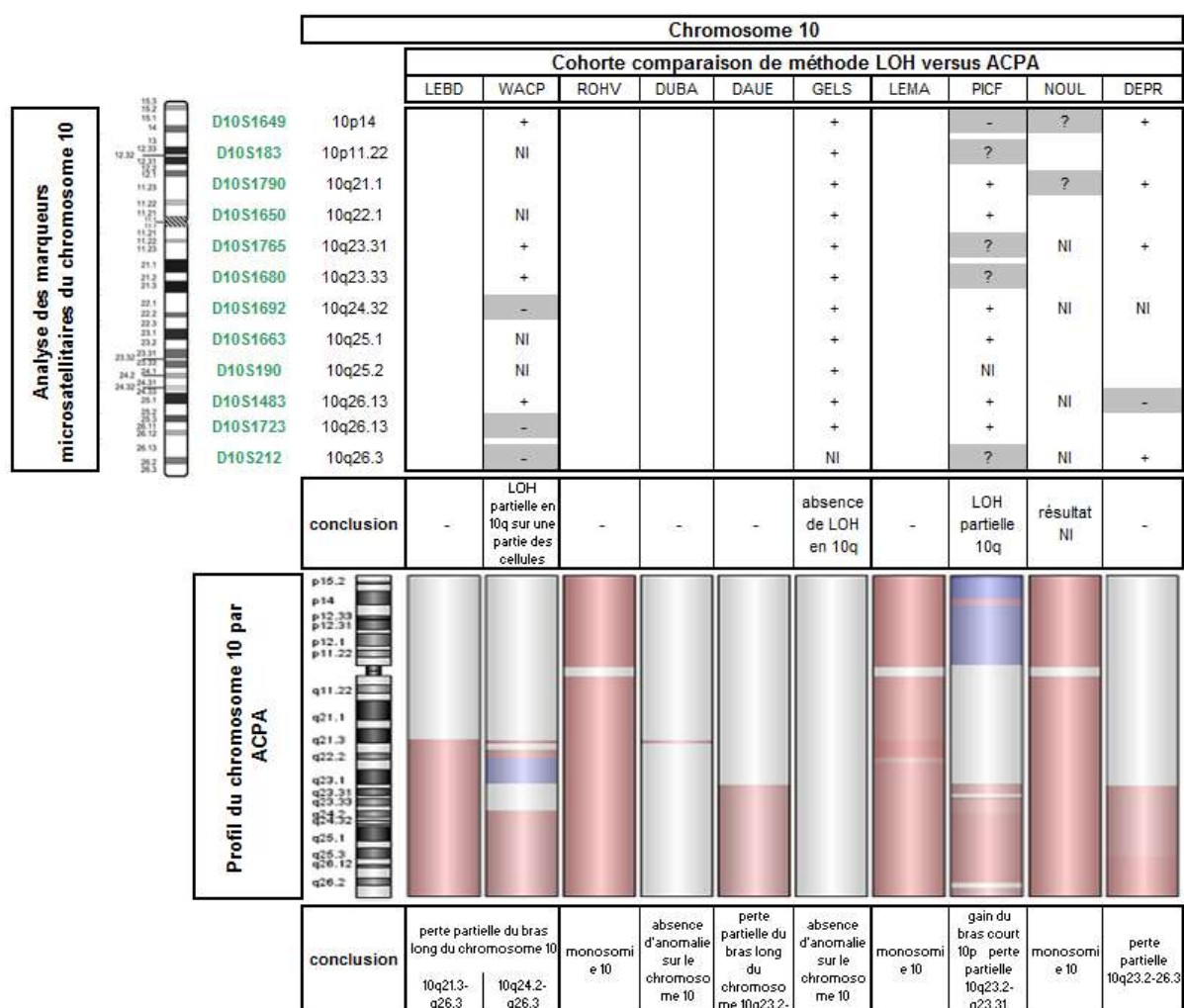


Tableau 10 : résultat de l'analyse des marqueurs microsatellitaires du chromosome 10 et de l'analyse ACPA des 10 échantillons de la cohorte (pour l'analyse des marqueurs microsatellitaires : case grisée (-) = marqueur homozygote, (+) = marqueur hétérozygote, NI = non interprétable, ? = douteux, vide = non réalisé, pour l'analyse ACPA : zone rouge = délétée, zone bleue = gain)

C. COMPARAISON DE MÉTHODE : MLPA ET ACPA

De la même façon, une analyse ACPA a été réalisée sur 2 échantillons LUZV et POCB testés au laboratoire par technique MLPA au diagnostic.

Pour l'échantillon LUZV, l'analyse MLPA montre une perte hétérozygote du gène *PTEN* (en 10q23), une délétion homozygote du gène *CDKN2A* (en 9p21.3) avec des ratios respectivement à 0.58 et 0.12. Ces deux anomalies ont été retrouvées sur le profil ACPA (Figure 46), montrant une monosomie du chromosome 10 (log ratio -0.6) et une délétion partielle en 9p (log ratio -0.4) englobant le locus du gène *CDKN2A* (log ratio à -1.5), dont les deux allèles sont perdus. Les autres régions étudiées par MLPA ne montrent pas d'anomalies des gènes *EGFR* en 7q12 ($r=1.4$), *TP53* en 17p13 ($r=1$) et *ERBB2* en 17q12 (ratio =1 pour l'exon 7 et 0.6 pour l'exon 29). Le profil ACPA confirme l'absence d'anomalie sauf pour l'*EGFR*, où une trisomie du chromosome 7 (log ratio 0.4) est détectée sans amplification du gène *EGFR* (7p12).

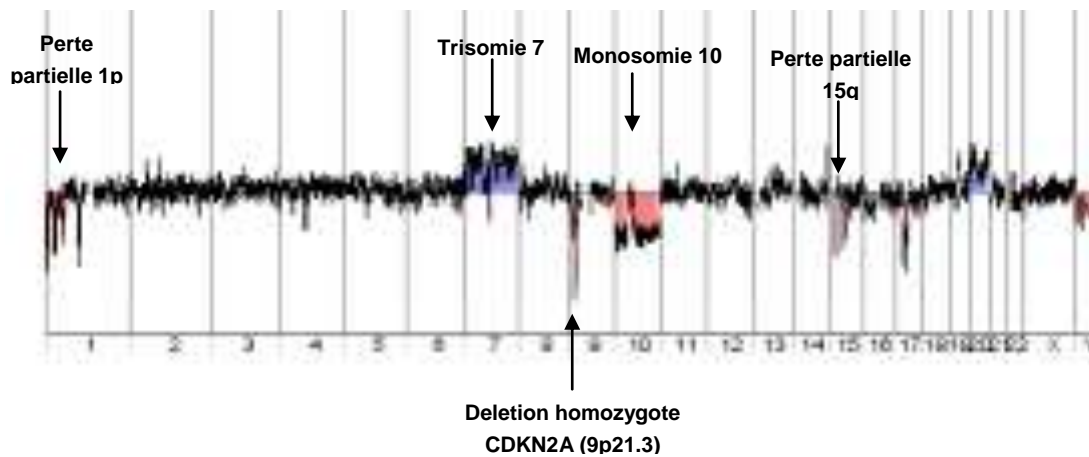


Figure 46 : Profil génomique de l'échantillon LUZV obtenu par ACPA

Résultats : Anomalies cytogénétiques des gliomes

Par ailleurs, une perte partielle en 1p (4 fragments sur 14 analysés, Figure 47) est observée mais non interprétable dans la mesure où tous les marqueurs ne sont pas concernés par la perte. La comparaison des profils ACPA/MLPA montre que les anomalies se superposent.

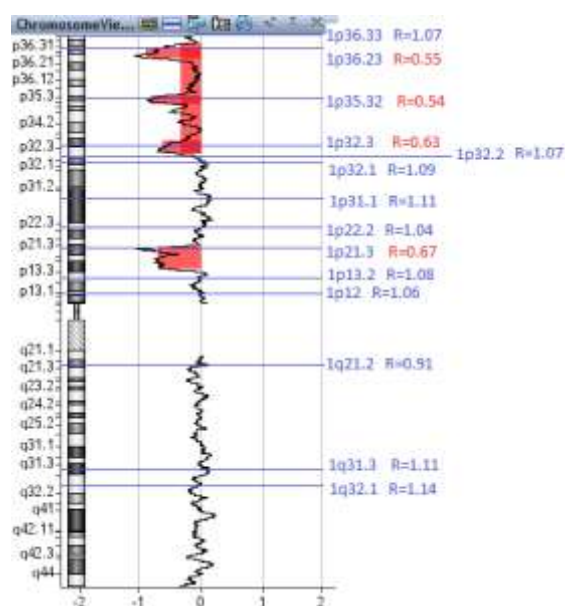


Figure 47 : Profil ACPA du chromosome 1 avec le positionnement des fragments étudiés par MLPA de l'échantillon LUZV.

L'analyse MLPA pour l'échantillon POCB montre une amplification du gène *EGFR* en 7q12 avec un ratio proche de 2 pour l'ensemble des fragments correspondants. Cette anomalie est confirmée sur le profil ACPA par une trisomie du chromosome 7 (Figure 48). Les autres gènes étudiés (*CDKN2A*, *PTEN*, *ERBB2* et *TP53*) présentent des ratios proches de 1 en MLPA donc sans anomalie quantitative. Le profil ACPA ne présente pas d'anomalie en 9p (gène *CDKN2A*) tandis qu'il révèle une perte du chromosome 10 (gène *PTEN*) et une perte du chromosome 17 (gènes *ERBB2* et *TP53*) (Figure 48). En regardant les résultats obtenus par MLPA, la moyenne des ratios des 11 fragments concernant le gène *PTEN* (en 10q) est à 0.88 et 0.91 pour le gène *TP53* (8 fragments).

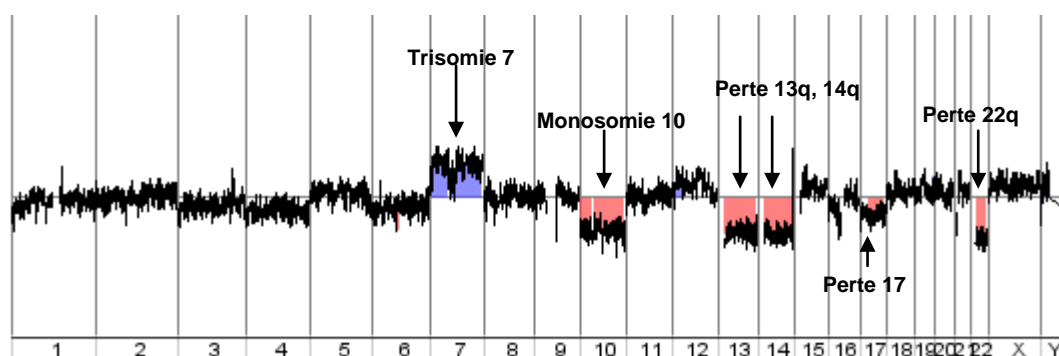


Figure 48 : Profil génomique de l'échantillon POCB obtenu par ACPA

V. ANOMALIES CYTOGENETIQUES DES GLIOMES EN FONCTION DU TYPE HISTOLOGIQUE ET DU GRADE

A. LES ASTROCYTOMES

10 astrocytomes ont été analysés par ACPA, 3 formes anaplasiques et 7 glioblastomes (Tableau 11). Au total, 5 présentent une trisomie du chromosome 7 associée à une monosomie du chromosome 10.

Parmi eux, 2 cas présentent une amplification du gène *EGFR* (7p12), 4 cas une délétion homozygote du gène *CDKN2A* (9p21.3). 1 autre cas présente une amplification du gène *CDK4* sur le chromosome 12q13 et deux une amplification du gène *PDGFRA* en 4q12.

Anomalies des Astrocytomes de grade III/IV			
A III	profil N		<p>GBM</p> <p>Perte partielle en 3p11.2-p11.1 Perte partielle en 4q12-q13.1 amplification du gène <i>PDGFRA</i> (4q12) trisomie 7 perte partielle 8q11.21-q11.23 -9p21.3-p21.2 avec délétion homozygote <i>CDKN2A</i> monosomie 10</p>
A III	perte 5q21.2-q35.3 perte 10q23.2-q26.3 perte 11p15.5-p11.12 gain 11q11-q25		<p>GBM</p> <p>Délétion partielle 6p21.33-21.2 trisomie 7 avec amplification du gène <i>EGFR</i> (7p12) Délétion 9p24.3-13.3 avec délétion du gène <i>CDKN2A</i> monosomie 10 trisomie 20</p>
A III	trisomie 7 délétion du gène <i>CDKN2A</i> (9p21) monosomie 10 perte 17q11.2-q12 perte 17q23.1-q24.2 trisomie 20		<p>GBM II?</p> <p>perte partielle 1p36.33-p34.2 perte partielle 5p15.33-p13.2 trisomie 7 monosomie 10 amplification du gène <i>CDK4</i> (12q15) perte partielle 13q13.1-q33.1 perte partielle 15q12-q23 monosomie 18</p>
GBM	Pertes partielles 1p Amplification du gène <i>EGFR</i> (7p12) del 9p21.3 - p13.3 avec délétion homozygote <i>CDKN2A</i> Monosomie 10		<p>GBM</p> <p>trisomie 4 avec amplification du gène <i>PDGFRA</i> (4q12) monosomie 5 perte partielle 8p perte partielle 10p15.1-p11.1 perte partielle 10q11.21-q21.1 monosomie 11 perte partielle 13q12.11-q34 perte partielle 14q13.1-q32.33 monosomie 21</p>
GBM	Pertes partielles 1p Perte partielle 4q Trisomie 7 Perte partielle 9p avec délétion homozygote <i>CDKN2A</i> Monosomie 10 Perte partielle 15q trisomie 20		<p>GBM</p> <p>trisomie 3 trisomie 8 trisomie 9 avec délétion homozygote du gène <i>CDKN2A</i> (9p21)</p>

Tableau 11 : Résumé des anomalies chromosomiques observées dans les 10 astrocytomes de grade III et IV et profils génomiques obtenus par ACPA

B. LES OLIGODENDROGLIOMES

15 oligodendrogliomes (9 grade III et 6 grade II) ont été testés en ACPA : 9 présentent une codélétion 1p19q (5 grade III et 4 grade II), 1 présente une perte partielle terminale du bras long du chromosome 1 (1q) et un gain du bras court du chromosome 19 (19p), 1 présente une perte du bras court du chromosome 19 (19p) et 4 ne présentent aucune anomalie sur les chromosomes 1 et 19 (Figure 49).

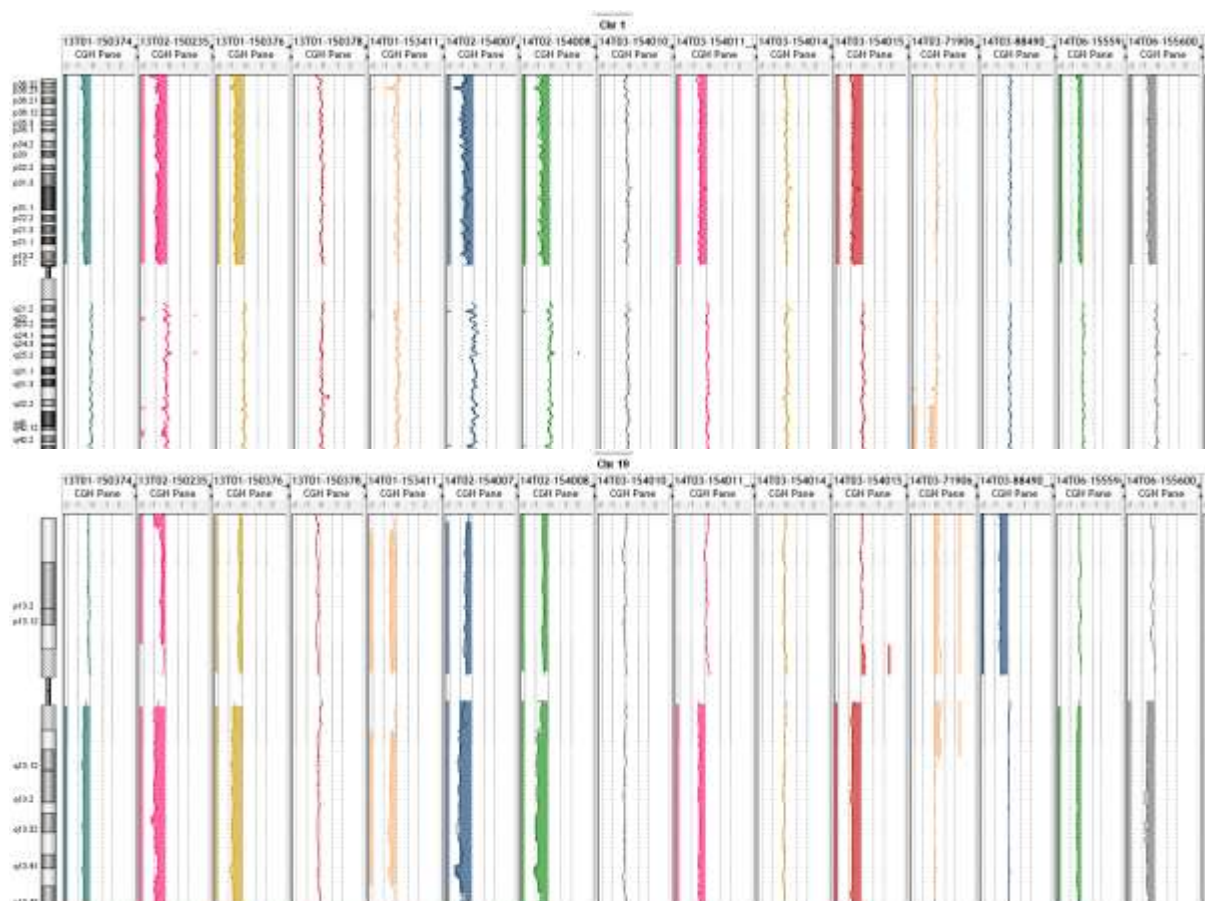


Figure 49 : Profil des chromosomes 1 (en haut) et 19 (en bas) obtenus pour les 15 oligodendrogliomes testés en ACPA. La ligne de base est proche de 0 en l'absence d'anomalie, proche de -1 (décalage vers la gauche) pour une délétion, proche de 1 pour un gain (décalage vers la droite).

Parmi les oligodendrogliomes codélétés 1p19q, des anomalies additionnelles sont détectées dans 4 formes anaplasiques sur 5 (Tableau 12) ; 1 seul bas grade sur 4 présente une perte du chromosome 15q en plus de la codélétion 1p19q. Parmi les anomalies additionnelles observées, l'anomalie du chromosome 4 (monosomie totale ou perte partielle en 4p) est retrouvée dans 3 cas sur 4, et un gain en 17q dans 2 cas sur 4. Les autres anomalies ne sont pas récurrentes (perte en 3p, 9p, 10q, 13, 14, et gain 7, 8, 11, 20).

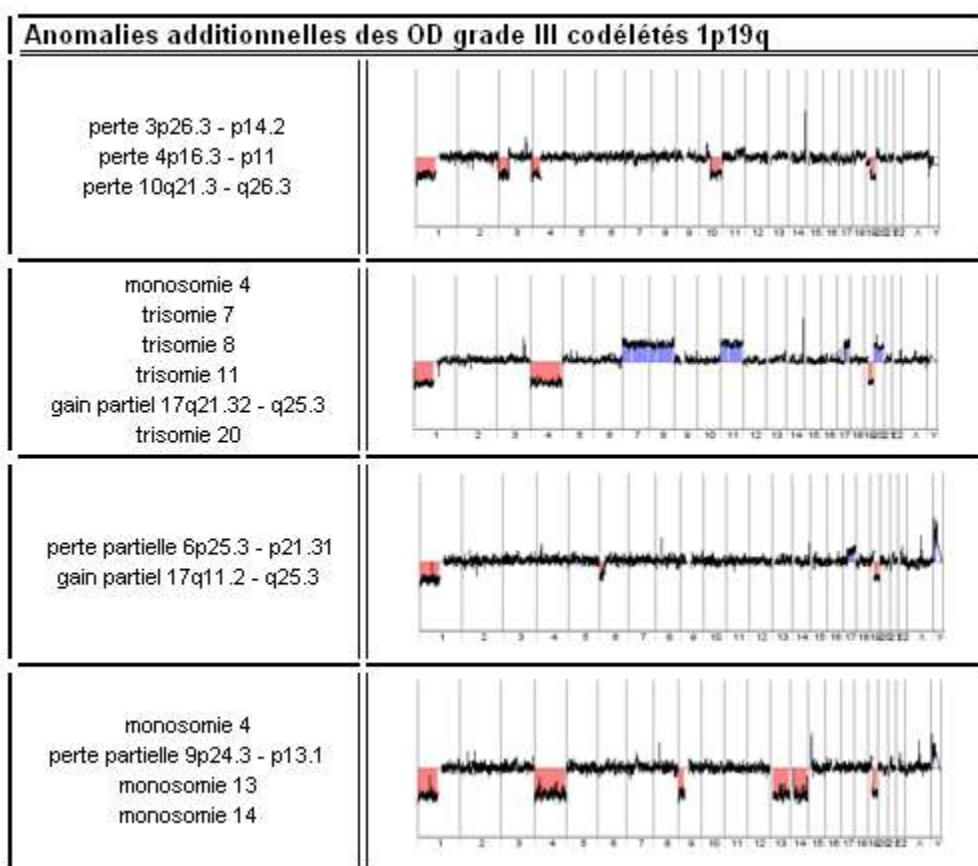


Tableau 12 : Résumé des anomalies additionnelles observées dans 4 oligodendrogliomes de grade III codélétés 1p19q et profils génomiques obtenus par ACPA

Parmi les 6 oligodendrogliomes non codélétés 1p19q, 5 présentent d'autres anomalies résumées dans le Tableau 13. Un seul prélèvement ne présente aucune anomalie.

Dans 2 formes de haut grade sur 3, on retrouve une amplification du gène *EGFR* (Figure 51) (7p12.1) ou une trisomie du chromosome 7 associé à une amplification du gène *CDK4* (12q14.1), *MDM2* (12q14.3-q15) (Figure 50) et/ou à une délétion homozygote du gène *CDKN2A* (9p21.3) (Figure 52). La trisomie du chromosome 7 ou l'amplification du gène *EGFR* est associée à une monosomie du chromosome 10, incluant la perte du gène *PTEN* en 10q23.3.

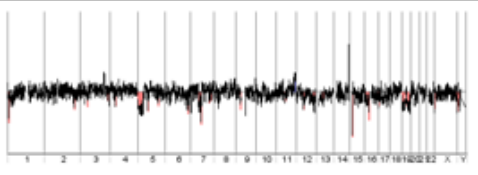
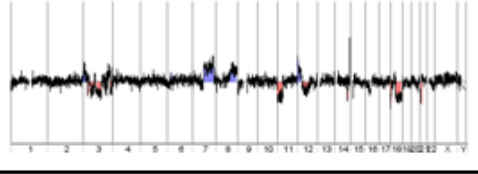
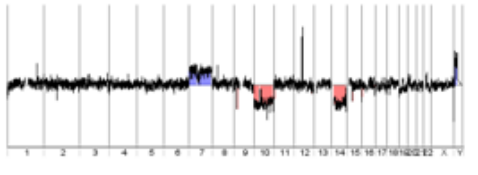
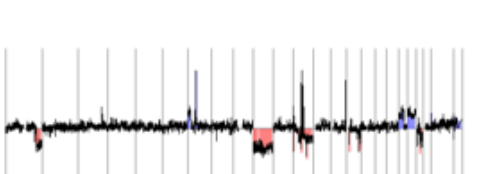
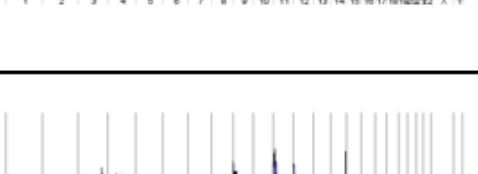
Anomalies des OD non codélétés 1p19q		
grade II	perte partielle 5p15.33 - p13.2	
grade II	gain partiel 7q11.23 - q36.1 gain partiel 8q22.1 - q24.3 perte partielle 11p15.5 - p12	
grade III	gain 1q32.1 (gène <i>MDM4</i>) trisomie 7 perte partielle 9p21.3 (gène <i>CDKN2A</i>) monosomie 10 amplification gène <i>CDK4</i> (12q13) monosomie 14q perte partielle 15q14	
grade III	perte partielle 1q32.2 - q44 gain partiel 7p12.1 - p11.2 avec amplification <i>EGFR</i> monosomie 10 amplification des gènes <i>CDK4</i> (12q13) et <i>MDM2</i> (12q14-q15) perte partielle 15q gain 19p trisomie 20	
grade III	perte partielle 4p16.3 - p11 gain partiel 4q11 - q32.2 perte partielle 5q31.2 - q35.3 monosomie 8 gain partiel 9p perte 14q perte 15q perte 19p	

Tableau 13 : Résumé des anomalies chromosomiques observées dans 5 oligodendrogliomes non codélétés 1p19q et profils génomiques obtenus par ACPA

Résultats : Anomalies cytogénétiques des gliomes

Figure 50 : Profil génomique en 12q13-q15 avec amplification des gènes MDM2 et CDK4

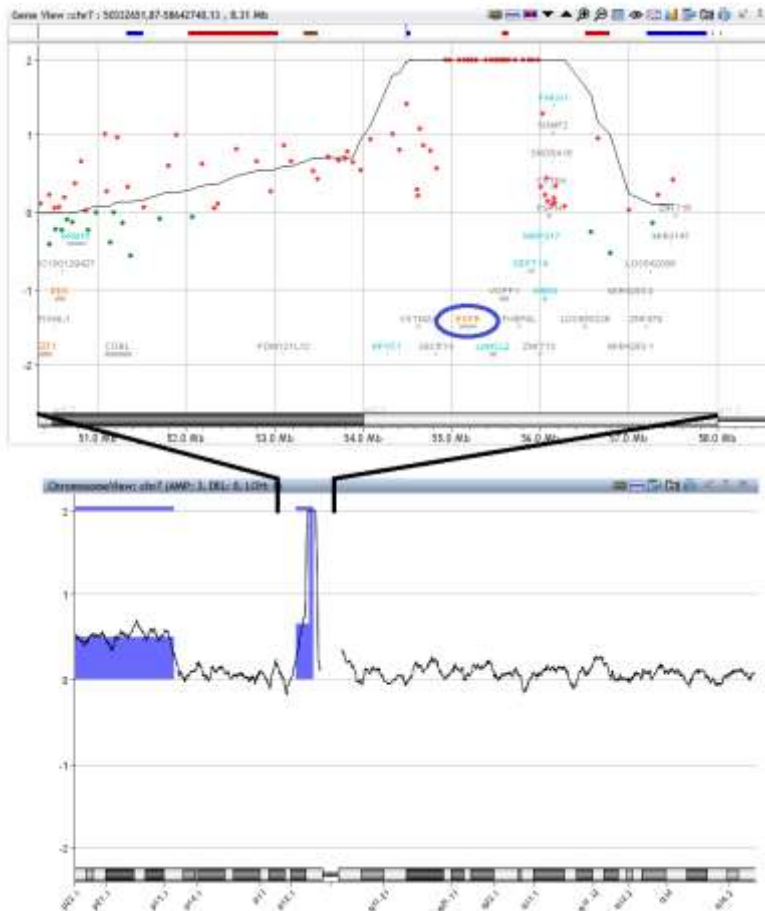
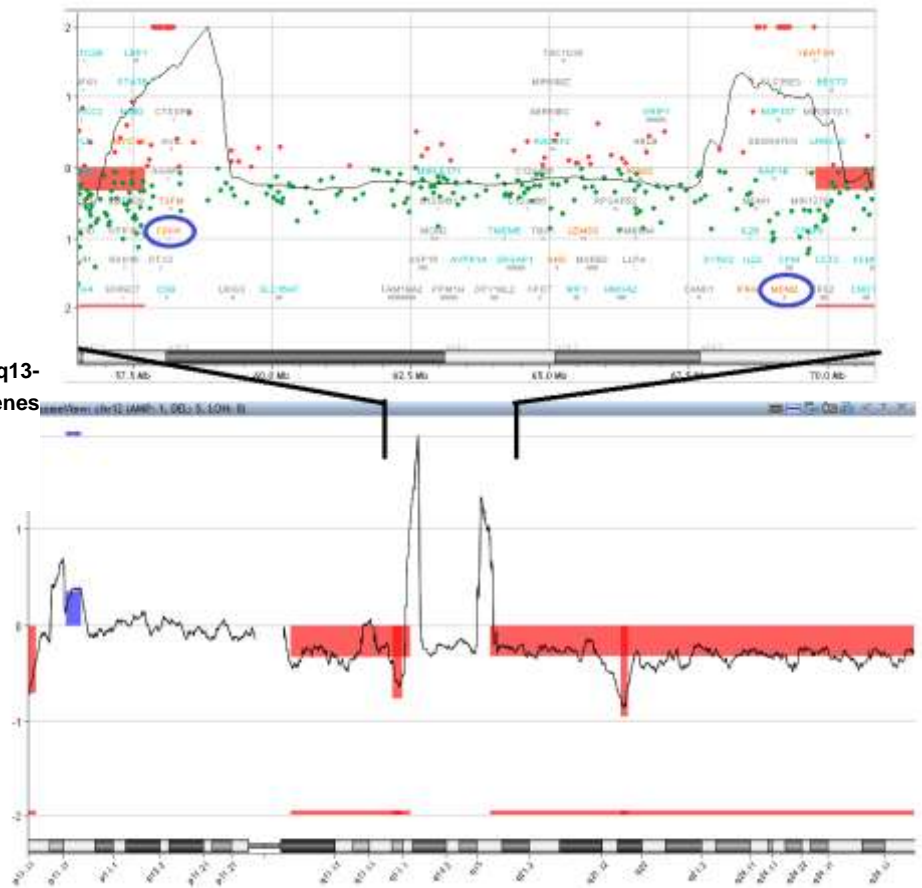


Figure 51 : Profil génomique en 7p12 montrant une amplification du gène EGFR

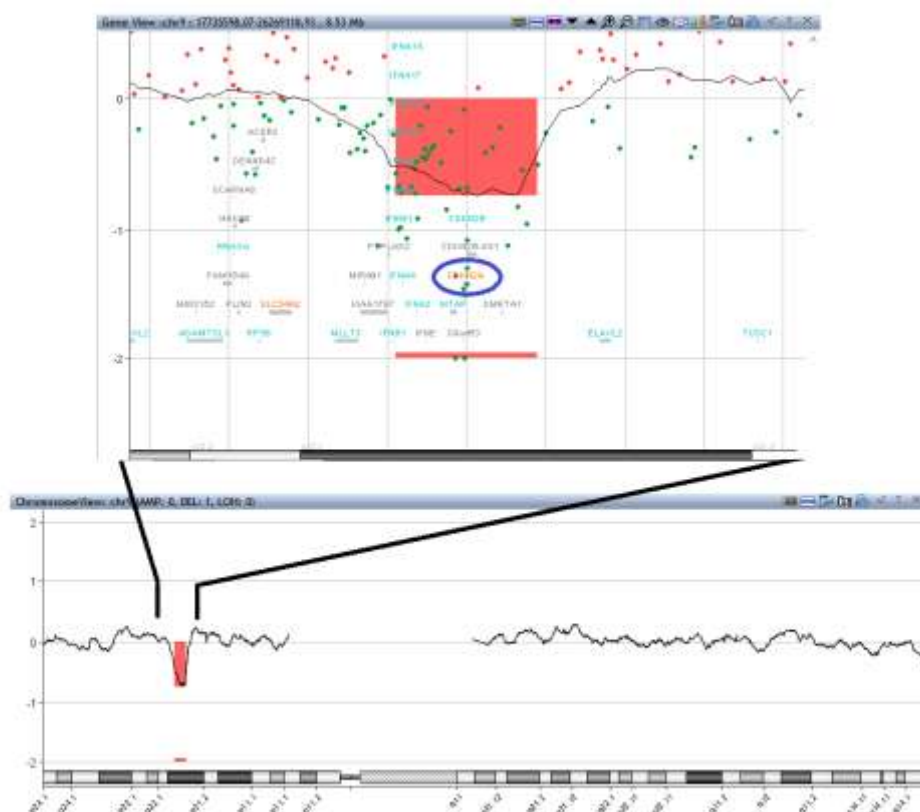


Figure 52 : Profil génomique en 9p21.3 avec délétion homozygote du gène *CDKN2A*

C. LES OLIGOASTROCYTOMES

Parmi les 13 oligoastrocytomes étudiés, 6 sont de bas grade (Tableau 14) et 7 sont anaplasiques (Tableau 15).

1 seul oligoastrocytome présente la codélétion 1p19q, associée à une perte partielle du chromosome 10q.

Parmi les 12 autres, 6 présentent une trisomie du chromosome 7 (2 de grade II et 4 de grade III) dont 2 sont associées à une amplification du gène *EGFR* en 7p12 (1 grade II et 1 grade III). Ces derniers possèdent tous une monosomie du chromosome 10 associée. 2 autres présentent une trisomie partielle en 7q, et pour lesquels il n'y a pas d'anomalie du chromosome 10 associée.

Une délétion du gène *CDKN2A* (9p21.3) est retrouvée dans 4 oligoastrocytomes dont 3 de grade III, avec perte homozygote dans un seul cas. 2 sont associés au profil « +7/-10 » et 2 à une perte partielle en 10q.

Un cas montre une amplification du gène *MDM2*, associé au profil +7/-10.

2 OA III montrent une amplification du gène *CD34* en 1p32.1.

Anomalies des Oligoastrocytomes de grade II (n=6)

Profil +7/-10 (n=2)	
<p>Trisomie 7 Monosomie 10 Monosomie 14q Perte partielle 19q13.32-q13.41 gain 20p13-p11.21 monosomie 22q</p>	
<p>perte partielle 1p36.33-p36.22 perte partielle 6q11.4-14.1 trisomie 7 + amplification gène <i>EGFR</i> (7p12) perte 9p23-p22.3 avec délétion homozygote du gène <i>CDKN2A</i> (9p21) monosomie 10 trisomie 20 perte partielle 22q12.2-q13.31</p>	
Profil -1p19q (n=1)	
<p>perte 1p36.33-p11.2 perte partielle 10q24.2-q26.3 gain 11q13.3 - q25 perte 19q12 - q13.43</p>	
Autres (n=3)	
<p>Gain partiel 7q11.23 - q36.3 Perte partielle Xp22.33 - p11.21</p>	
<p>perte 14q11.2 - q32.12 Perte 16p13.3 - p11.2</p>	
<p>gain partiel 6p25.3-p22.3 perte partielle 9p21.3 perte partielle 10q25.2-q26.3 gain partiel 11q23.3-q25 perte partielle 13q14.12-q33.3</p>	

Tableau 14 : Résumé des anomalies chromosomiques observées dans les 6 oligoastrocytomes de grade II et profils génomiques obtenus par ACPA

Les autres anomalies additionnelles au profil +7/-10 les plus retrouvées sont : pertes en 13q (3 cas/6), en 14q (2 cas/6), en 22q (2 cas/6) et trisomie 20 (2 cas/6).

Anomalies des Oligoastrocytomes de grade III (n=7)

Profil +7/-10 (n=4)	
trisomie 7 monosomie 10 monosomie 13q monosomie 14q monosomie 22	
trisomie 7 avec amplification du gène <i>EGFR</i> (7p12) monosomie 10 avec délétion homozygote en 10p12.31 trisomie 19 trisomie 20	
gain partiel 1q21.1-q32.2 avec amplification du gène <i>CD34</i> (1q32.1) perte partielle 6q12-q27 trisomie 7 monosomie 10 amplification du gène <i>MDM2</i> (12q15) perte partielle 13q14.11-q33.1 monosomie 14q	
perte partielle 1q24.3-q43 amplification du gène <i>CD34</i> (1q32.1) trisomie 7 perte 9p21.3 (gène <i>CDKN2A</i>) monosomie 10 perte partielle 13 q12.3-q32.3 monosomie 15 amplification 22q11.1-q11.22	
Autre (n=3)	
monosomie 6 perte partielle 9p24.3 - p13.1 (gène <i>CDKN2A</i>) Perte partielle 10q25.3-26.3 perte partielle 14q23.2 - q24.3 monosomie 19 perte partielle 22q13.31 - q13.33	
perte partielle 9p24.3 - p21.2 (gène <i>CDKN2A</i>) monosomie 13q monosomie 21 perte partielle 22q12.3-q13.33	
perte partielle 1p perte partielle 4q31.1-q35.2 gain partiel 7q21.11 - q36.3 gain partiel 8q21.3 - q24.3 gain partiel 9q21.11 - q34.3	

Tableau 15 : Résumé des anomalies chromosomiques observées dans les 7 oligoastrocytomes de grade III et profils génomiques obtenus par ACPA

VI. RESULTAT DE LA COHORTE SPHINGOSINE KINASE / SPHINGOSINE PHOSPHATE LYASE

Une étude interne concernant l'expression de la sphingosine kinase et de la sphingosine lyase dans les gliomes avait montré une corrélation entre le grade de la tumeur et la surexpression de la SPK et une corrélation inverse pour la SPL. De plus, la surexpression de la SPK apparaissait dans cette étude être un marqueur de mauvais pronostic. Nous avons posé l'hypothèse soumise qu'il y a peut-être dans ces tumeurs une amplification du gène codant la Sphingosine Kinase (*SPHK1*) et/ou une délétion du gène codant la Sphingosine Phosphate Lyase (*SGPL1*). Les 8 patients sélectionnés étaient tous des gliomes de grade II ou III avec une forte expression de la SPK associée à une faible expression de la SPL (Tableau 16).

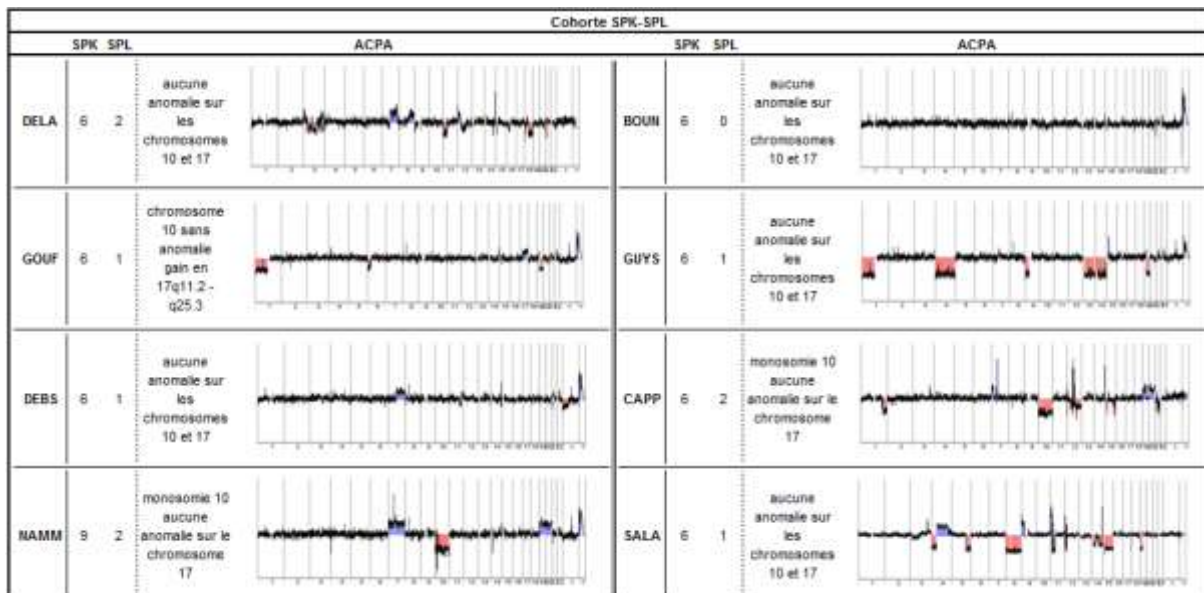


Tableau 16 : Résultat du niveau d'expression de la SPK et SPL par immuno-histochimie et profil génomique par ACPA pour les 8 patients de la cohorte

Dans les régions intéressées, c'est-à-dire en 17q25.2 (locus du gène *SPHK1*) et en 10q22.1 (locus du gène *SGPL1*), sur les 8 patients, l'analyse ACPA montre un seul gain en 17q11.2-q25.3 englobant la région 17q25.2 contenant *SPHK1* (Figure 54) et deux autres présentent une monosomie du chromosome 10 contenant *SGPL1* (Figure 53).

Résultats : Anomalies cytogénétiques des gliomes

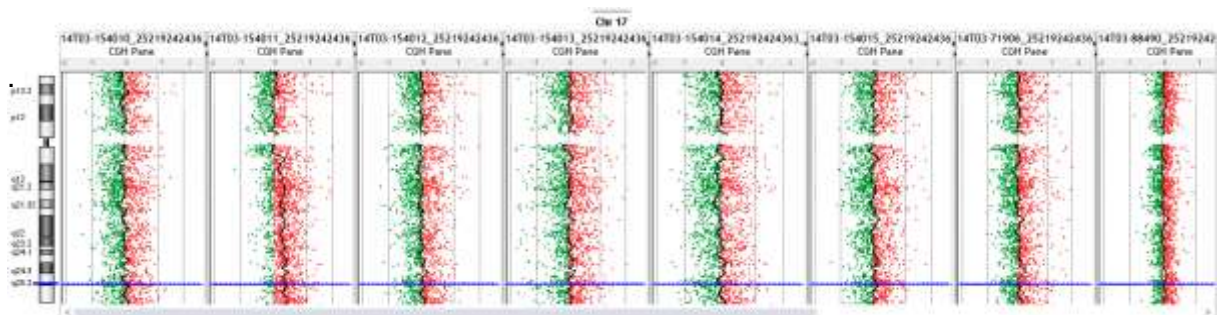


Figure 54 : *SPHK1* en 17q25.2 indiqué par la ligne bleue. Le deuxième échantillon présente un gain en 17q englobant le gène *SPHK1*. Les autres ne présentent aucune anomalie du chromosome 17.

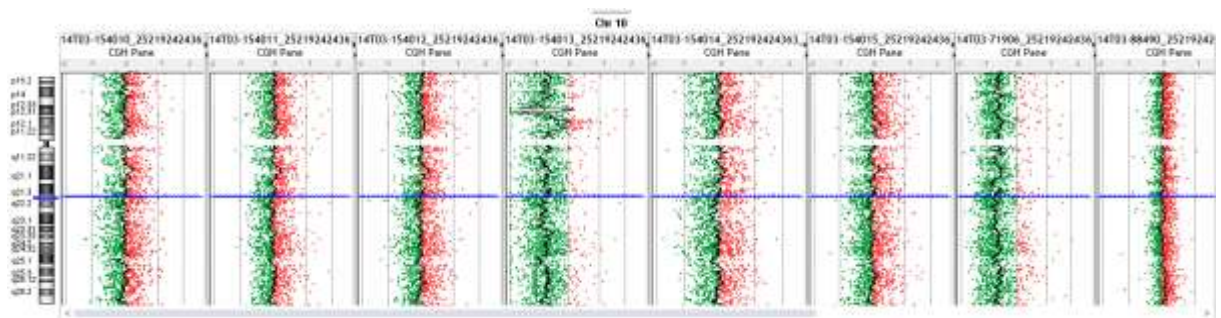


Figure 53 : *SGPL1* en 10q22.1 indiqué par la ligne bleue. Le quatrième et le septième échantillons présentent une monosomie du chromosome 10, emportant le gène *SGPL1*. Les autres ne présentent aucune anomalie du chromosome 10.

QUATRIÈME PARTIE : DISCUSSION

I. QUALITE DES RESULTATS

La qualité globale des résultats est estimée par la valeur de la DLRS dont le seuil maximal est fixé à 0.3 par le fournisseur. Pour les tissus FFPE, la DLRS est très variable d'un échantillon à l'autre ; les résultats restent souvent interprétables avec une DLRS jusqu'à 0.4. La DLRS reflète la qualité de l'ADN, bien que l'état de dégradation des ADNs évalués par électrophorèse sur gel d'agarose ne soit pas corrélé pour tous les échantillons.

Cela sous-entend qu'il y a donc d'autres paramètres que l'état de dégradation qui influencent sur la qualité des résultats. Par exemple, au cours de la phase préanalytique, la fixation par le formol et l'inclusion en paraffine favorisent la formation d'adduits (par interaction entre les protéines et les nucléotides) ou des ponts intra / inter chaînes d'ADN. Ces modifications de l'ADN entraînent de grande variabilité sur l'attitude des ADNs dans les réactions moléculaires.

Depuis le changement de la méthode d'extraction des tissus FFPE au laboratoire d'oncologie moléculaire, en remplaçant le xylène par une solution de déparaffinage (Qiagen), les résultats d'ACPA semblent meilleurs et les DLRS sont plus souvent dans les seuils fixés par le fournisseur (DLRS < 0.3). En effet sur les 10 derniers échantillons FFPE, les DLRS étaient inférieures à 0.3 pour 7 échantillons, et même en dessous de 0.2 pour 2 d'entre eux, ce qui était difficile à obtenir auparavant.

La comparaison des profils ACPA des 5 échantillons de la première cohorte entre tissus congelés et tissus FFPE ne donne pas de différence d'interprétation, et la comparaison avec les profils du protocole POLA a retrouvé les mêmes anomalies. Ceci a permis de valider la technique.

L'avantage de travailler sur tissu FFPE plutôt que sur tissu congelé repose sur la disponibilité immédiate et la facilité d'acheminement des tissus FFPE au laboratoire, et également sur la possibilité de contrôler la qualité du prélèvement à chaque nouvelle coupe (contrôle morphologique pour évaluer la richesse en tissu tumoral). De plus, au laboratoire d'oncologie et génétique moléculaires des tumeurs solides, la très grande majorité des analyses sont réalisées sur tissus FFPE, l'extraction d'ADN à partir de tissus FFPE fait partie des pratiques courantes.

Cependant, pour les biopsies de petite taille, l'extraction d'ADN génomique à partir de tissu FFPE peut être limitante et insuffisante pour réaliser l'analyse ACPA. En effet, la quantité minimale d'ADN nécessaire pour faire une analyse ACPA est 500 ng dans un volume maximal de 13 µL. Des essais ont été faits avec des quantités initiales d'ADN plus faibles (entre 500 et 200 ng, résultats non présentés), mais la qualité n'est pas suffisante en dessous de 250 ng pour les ADNs extraits de tissus FFPE. L'amplification d'ADN génomique

par le kit GenomePlex® (Sigma) peut être une bonne alternative pour augmenter la quantité initiale d'ADN génomique. L'amplification semble être homogène sur l'ensemble du génome sans apporter de biais dans l'interprétation des résultats d'ACPA. Dans les essais effectués, toutes les anomalies attendues sont retrouvées, sans générer d'anomalie non spécifique, mais la qualité des profils est médiocre. De nouveaux essais sont donc nécessaires.

Le deuxième point limitant dans l'analyse de profil ACPA est la richesse de l'échantillon en cellules tumorales. Par les essais de dilution d'un ADN tumoral avec un ADN de tissu sain, les anomalies peuvent être détectées au moins jusqu'à 10% de cellules tumorales. Ceci sera intéressant pour les échantillons de tumeurs infiltrantes pour lesquelles les cellules tumorales sont dispersées dans le parenchyme rendant impossible une macrodissection pour enrichir le prélèvement en cellules tumorales. Par ailleurs, les tumeurs évolutives peuvent acquérir des anomalies additionnelles sous-clonales retrouvées dans un contingent minoritaire de cellules tumorales ; celles-ci peuvent également être détectées par analyse ACPA jusqu'au seuil de 10%.

II. INTERET DE L'ACPA

Sur les 10 échantillons pour lesquels une comparaison entre les résultats d'ACPA et les résultats de l'analyse des marqueurs microsatellites en 1p, 19q et 10q a été faite, aucune discordance n'a été retrouvée. Les deux méthodes permettent d'évaluer approximativement le pourcentage de cellules tumorales qui présentent la codélétion 1p19q, le plus souvent confirmé par le contrôle morphologique donné par l'anatomopathologiste.

D'un point de vue technique, les deux méthodes sont à peu près équivalentes en temps (plus rapide en ACPA mais avec un temps d'hybridation long). Par contre, d'un point de vue analytique, grâce à une interprétation totalement automatisée et informatisée des résultats d'ACPA, les résultats sont informatifs sur chacune des 22 paires de chromosomes. Avec l'analyse des marqueurs microsatellites, l'analyse des régions 1p, 19q et 10q nécessite déjà 26 réactions d'amplification par PCR et 26 analyses de chaque marqueur individuellement pour chaque patient, l'analyse des données ACPA est donc beaucoup plus allégée et simplifiée, tandis que les résultats sont beaucoup plus informatifs car pangénomiques.

De plus, l'interprétation des profils LOH est difficile lorsque peu de marqueurs présentent une perte d'hétérozygotie : une perte d'hétérozygotie ne peut être rendue qu'à partir du moment où plus de 2 marqueurs montrent une perte d'hétérozygotie. Lorsque ce n'est pas le cas, des marqueurs additionnels peuvent alors être demandés pour confirmer la perte, mais cela nécessite une nouvelle analyse. De même, lorsque les marqueurs sont à l'état homozygote, l'analyse n'est pas interprétable. Par ACPA, ces limites ne sont pas observées puisqu'il y a une quantité très importante de sondes dans les régions couvertes par les

marqueurs microsatellites utilisés pour la recherche de perte d'hétérozygotie.

Notons par ailleurs que l'analyse ACPA n'est pas une technique ciblée ni spécifique des gliomes : elle peut donc s'appliquer à tous les types de tumeurs solides. Des échantillons de tumeurs rénales et de sarcomes ont d'ailleurs déjà été testés. Cela permet donc d'élargir le panel de tumeurs solides explorées en cytogénétique, ce qui ne peut être fait en cytogénétique conventionnelle en raison de l'impossibilité de mise en culture des tissus FFPE.

A. ANOMALIES SPÉCIFIQUES DES GLIOMES

(1) LES OLIGODENDROGLIOMES

Sur les 38 gliomes ayant un profil ACPA interprétable, une codélétion 1p19q est retrouvée dans 4 OD II (n=6), 5 OD III (n=9) soit 60% des OD, et 1 OA II (n=6) mais dans aucun A III (n=3) ou GBM (n=7). Ceci confirme que la codélétion 1p19q est spécifique des oligodendrogliomes, retrouvée dans 60-80% des cas et plus rarement dans les oligoastrocytomes et les astrocytomes (21,64,66,71,94).

Dans notre cohorte, parmi les 9 OD présentant la codélétion 1p19q, 5 présentent au moins une anomalie additionnelle, 1 OD II (1 anomalie additionnelle) et 4 OD III (4 anomalies additionnelles en moyenne). Dans les OD de bas grade, la codélétion est typiquement isolée, montrant que cet évènement survient précocément dans l'initiation tumorale, contrairement aux formes anaplasiques pour lesquelles des anomalies additionnelles sont observées, marquant l'évolution tumorale.

Dans les gliomes de grade II et III, la présence de la codélétion 1p19q apporte un avantage pronostic très intéressant avec une moyenne de survie augmentée et une amélioration du taux de survie à 5 ans d'environ 50% (26). Ces tumeurs présentent également une plus grande chimiosensibilité et une croissance tumorale plus lente. Les essais cliniques EORTC 26951 (42) et RTOG 9402 (43) montrent l'intérêt de la polychimiothérapie adjuvante ou néo-adjuvante par PCV en association à la radiothérapie en traitement de première ligne dans les oligodendrogliomes et oligoastrocytomes anaplasiques. La codélétion 1p19q est un facteur de bon pronostic dans les deux groupes de traitement, avec des médianes de survies globales augmentées de 12 ans dans le groupe PCV+RT et de 4.5 ans dans le groupe RT seule (RTOG 9402). Il est donc intéressant de connaître le statut 1p19q des tumeurs oligodendrogliales pour évaluer et prédire la réponse thérapeutique. Cependant, en l'absence de la codélétion 1p19q, les réponses au traitement sont très variables et il existe également des gliomes répondeurs à la chimiothérapie et ayant des survies longues en dépit de marqueurs génétiques identifiés. L'analyse ACPA de ces tumeurs peut être intéressante pour mettre en évidence d'autres marqueurs chromosomiques d'intérêt potentiellement pronostique.

Bien que la codélétion 1p19q soit associée à un meilleur pronostic, celle-ci ne peut pas être généralisée à tous les grades. En effet, il existe de rares cas de glioblastomes à composante

oligodendrogliale (GBM-O) pour lesquels le diagnostic histologique retenu est celui d'un glioblastome, et qui présente la codélétion 1p19q. Dans ce sous-type, il a été démontré que l'avantage pronostique de la codélétion 1p19q était perdu, et le faible taux de survie serait probablement lié à une instabilité génétique (28). Ces GBM-O étant certainement des tumeurs secondaires et évolutives, des anomalies additionnelles peuvent être identifiées par analyse ACPA, et expliquer le mauvais pronostic.

(2) LES ASTROCYTOMES

Les astrocytomes sont typiquement caractérisés par une perte d'hétérozygotie en 17p associée à une mutation du gène *TP53* (54,55). Ces anomalies confèrent un mauvais pronostic à ce groupe de gliomes. Sur les 10 astrocytomes de grade III/IV analysés, aucun ne présentait de perte en 17p. Cependant, une perte fonctionnelle de P53 par disomie uniparentale (perte d'un allèle et duplication de l'autre allèle muté), est un autre mécanisme possible, or il ne peut être détecté par le type de puce utilisée ici (95).

Dans les 10 astrocytomes de notre cohorte, les anomalies chromosomiques les plus fréquentes concernent les chromosomes 10 (dans 8 cas) et 7 (dans 6 cas). Ces anomalies sont également retrouvées sur l'ensemble de la cohorte. Au total, 20 cas présentent une anomalie du chromosome 10 : monosomie totale (1/3 A III, 5/7 GBM, 2/9 OD III, 2/6 OA II et 4/7 OA III) ou perte partielle du bras long 10q (1/3 A III, 1/7 GBM, 1/9 OA III, 2 OA II et 1 OA III). Lorsqu'une monosomie totale du chromosome 10 est présente, une anomalie du chromosome 7 est toujours associée : trisomie du chromosome 7 (9 cas), amplification du gène *EGFR* en 7p12 (2 cas), ou les deux (3 cas). Le profil « +7 / -10 » est retrouvé dans 4/7 GBM, 1/3 A III, 4/7 OA III, 2/6 OA II et 1/9 OD III (non codéléte 1p19q), montrant que ces anomalies sont spécifiques des tumeurs astrocytaires, également retrouvées dans les oligodendrogliomes en l'absence de la codélétion 1p19q (77,94).

Dans notre série, aucun astrocytome de grade II n'a été analysé par ACPA, ne permettant pas d'identifier les anomalies les plus précoces mais il semblerait que les astrocytomes de bas grade ne présentent qu'un gain du bras long du chromosome 7 comme évènement précoce (7q), tandis que les formes anaplasiques acquièrent plus tardivement un gain du bras court du chromosome 7 (7p) et une perte du chromosome 10 associée (65,74,75).

Dans les OD, une anomalie du chromosome 7 non associée à une anomalie du chromosome 10 est trouvée dans 3 cas d'OD : ce sont des gains partiels du chromosome 7 (7p ou 7q), en l'absence de codélétion 1p19q, ou une trisomie du chromosome 7 associée à la codélétion 1p19q.

Les études réalisées par ACPA sur des cohortes plus larges ont démontré que les gains du chromosome 7/7q sont mutuellement exclusifs de la codélétion 1p19q dans les oligodendrogliomes de bas grade, mais seraient une anomalie commune qui signe la progression tumorale dans les formes anaplasiques (76,94). De plus, bien que la codélétion 1p19q soit de bon pronostic, les patients présentant une trisomie 7 associée à la codélétion 1p19q ont une survie sans progression plus courte qu'en l'absence de la trisomie 7 (94).

(3) LES OLIGOASTROCYTOMES

Actuellement, aucune anomalie spécifique des OA n'a été mise en évidence pour permettre de les différencier sur le plan génétique des astrocytomes ni des oligodendrogliomes. L'analyse ACPA de 7 OA retrouve 3 groupes d'anomalies décrits dans les études publiées, avec un génotype pouvant être soit astrocytaire avec un profil « +7 / -10 » (6 cas, soit 46%), soit oligodendrogliial avec la codélétion 1p19q (1 seul cas, soit 8%), soit présentant d'autres anomalies non spécifiques (6 cas, soit 46%). Ces observations conduisent à supposer une origine tumorale à partir d'un clone cellulaire unique pour le développement des oligoastrocytomes, sans pouvoir expliquer la présence phénotypique des deux types cellulaires. Cependant, les OA sont génétiquement plus hétérogènes car le sous-groupe « autre » semble se développer par d'autres mécanismes que ceux actuellement décrits (64).

Pour le groupe des OA, l'ACPA est donc un outil intéressant puissant pour compléter le diagnostic histologique et ainsi améliorer la prise en charge thérapeutique optimale en fonction du pronostic établi par les anomalies détectées. Comme pour les A ou les OD, le profil « +7 / -10 » est associé à une survie plus courte tandis que la « codélétion 1p19q » conduit à une survie plus longue et une meilleure réponse à la chimiothérapie.

Parmi les anomalies additionnelles identifiées dans notre cohorte, deux sont retrouvées uniquement dans les OA : l'amplification du gène *CD34* en 1p34 retrouvée dans 2 OA III présentant le profil « +7 / -10 » associée à une perte partielle en 13q. Cette anomalie n'a jamais été identifiée auparavant dans d'autres études(64,66). Une perte partielle du bras long ou totale du chromosome 6 est retrouvée dans 3 cas (1 OA II et 2 OA III) mais cette anomalie a déjà été décrite dans des cohortes plus larges d'oligodendrogliomes et d'astrocytomes (66,76). Cependant, peu d'études par ACPA sont réalisées sur les tumeurs mixtes en raison de leur faible incidence.

(4) LES GLIOBLASTOMES

Le nombre d'anomalies chromosomiques est plus élevé dans les glioblastomes, avec notamment une augmentation de la fréquence des régions amplifiées (94). Dans les glioblastomes *de novo*, l'anomalie caractéristique est l'amplification du gène *EGFR* (en 7p12), retrouvée dans 2/7 GBM de notre cohorte, soit 28%, ce qui correspond à la fréquence publiée (51,52,54). Par ailleurs, sur notre cohorte de GBM, 2 cas présentent une amplification du gène *PDGFRA* en 4q12, impliquant les mêmes voies de signalisation intracellulaire que l'EGFR. Cette anomalie est plus fréquente dans les GBM secondaires que les GBM *de novo* (53,69).

D'après Ohgaki et al., 60 à 80% des glioblastomes présentent une perte du bras long d'un chromosome 10 (10q), qu'il soit *de novo* ou secondaires (52,53). Dans les glioblastomes

secondaires, cette anomalie marque la transition entre un gliome de bas grade ou anaplasique vers un glioblastome. Une perte du bras court du chromosome 10 (10p) est exclusivement observée dans les glioblastomes *de novo* (53).

Dans notre étude, les pertes partielles 10q sont retrouvées dans 6 cas, préférentiellement dans les formes anaplasiques (1/3 A III, 1/7 GBM, 1/9 OD III, 2/6 OA II et 1/7 OA III) tandis qu'une monosomie du chromosome 10 est retrouvée dans 14 cas (1/3 A III, 5/7 GBM, 2/9 OD III, 2/6 OA II et 4/7 OA III), toujours associée soit à la trisomie du chromosome 7 soit à l'amplification du gène *EGFR* avec une fréquence plus élevée dans les GBM (71%) et les OA III (57%). Aucune anomalie isolée en 10p n'a été observée. Sur notre cohorte, les anomalies du chromosome 10 ne sont pas spécifiques des glioblastomes, bien que leur fréquence soit plus élevée dans ce groupe. De plus, la monosomie du chromosome 10 semble plutôt être associée au profil « +7/-10 » caractéristique des astrocytomes tandis que les pertes partielles du bras long du chromosome 10 (10q) semblent être des anomalies additionnelles évolutives.

B. ANOMALIES ADDITIONNELLES DES GLIOMES

Bien que les anomalies génétiques impliquées dans l'initiation tumorale soient différentes pour chaque type histologique, les mécanismes de progression tumorale des astrocytomes, des oligodendrogliomes et des glioblastomes *de novo* empruntent des voies communes, impliquant des anomalies additionnelles souvent confondues entre les différents types histologiques.

Dans les études réalisées par ACPA sur des cohortes plus larges, il a été démontré que le nombre d'anomalies est corrélé au grade de la tumeur (51,53–55,65,69,74–76).

Dans notre étude, 12 gliomes sur les 38 analysés sont des tumeurs de grade II (6 OD II et 6 OA II), dont les profils ACPA mettent en évidence en moyenne 2.2 anomalies pour les OD II et 4.3 anomalies pour les OA II. Pour les 19 gliomes de grade III (3 A III, 9 OD III et 7 OA III), on retrouve respectivement 5, 6 et 5.4 anomalies en moyenne. Pour les 7 GBM, le nombre moyen d'anomalies détectées est 5.8. Nous retrouvons donc bien un nombre d'anomalies plus faible dans les tumeurs de bas grade (grade II) que dans les tumeurs de haut grade (grade III et IV).

Certaines anomalies additionnelles sont récurrentes, comme la délétion du gène *CDKN2A* en 9p21.3 (la plus fréquente), l'amplification du gène *EGFR* en 7p12, ou l'amplification du gène *CDK4/MDM2* en 12q13-q15, préférentiellement retrouvées dans les formes évoluées. En effet, sur notre cohorte, ces anomalies ont été détectées dans 10 formes de haut grade (dont 5 GBM, 1 A III, 1 OD III et 3 OA III) et 1 seul OA de bas grade pour la délétion du gène *CDKN2A*, dans 4 formes de haut grade (dont 2 GBM, 1 OD III et 1 OA III) et 1 seul OA de bas grade pour l'amplification du gène *EGFR*, et dans 3 formes de haut grade (1 GBM, 1 OD III et 1 OA III) pour l'amplification du gène *CDK4* ou *MDM2*. Chacune de ces anomalies a été

décrite comme étant de pronostic défavorable, quelque soit le type histologique (66,78,79,96).

Il est à noter que l'amplification du gène *CDK4* sur le chromosome 12q13 est le plus souvent retrouvée en l'absence de délétion du gène *CDKN2A* (55,69). 1 GBM et 2 OD III présentent une amplification du gène *CDK4*, sans perte du gène *CDKN2A* dans 2 cas sur les 3.

Dans les GBM *de novo*, la délétion du gène *CDKN2A* en 9p21.3 est plus fréquente à l'état homozygote, corrélée à la perte en 10q (54,69). En effet, parmi les délétions détectées en 9p21.3 dans notre cohorte, 6 sont à l'état homozygote (4 GBM, 1 OD III (sans codélétion 1p19) et 1 OA II), associées au profil « +7/-10 », tandis que les délétions hétérozygotes sont plutôt retrouvées dans des formes évoluées anaplasiques, associées à une perte en 10q (dans 1 OA III et 1 OA II) ou au profil « +7/-10 » (dans 1 A III et 1 OA III).

Dans les oligodendrogliomes, hormis la délétion du gène *CDKN2A* retrouvée dans 1/3 des cas, les amplifications des gènes *EGFR*, *CDK4*, *MDM2* sont plus rares (<10%) et préférentiellement associées aux oligodendrogliomes non codélétés 1p19q (97). En effet, parmi les 4 OD III codélétés 1p19q, aucun ne présente ces anomalies. A l'inverse, sur les 5 OD non codélétés 1p19q, 2 présentent plusieurs anomalies associées (*MDM4*, *CDKN2A* et *CDK4* / *EGFR*, *CDK4* et *MDM2*).

Cependant, dans les OD III codélétés 1p19q, l'anomalie la plus fréquente retrouvée dans 3 cas sur 6 est une délétion sur le chromosome 4. Les pertes partielles ou totales du chromosome 4 ont déjà été décrites comme étant plus fréquemment associée à la codélétion 1p19q dans les oligodendrogliomes mais dont la significativité n'est pas connue (78).

D'autres anomalies non spécifiques, comme par exemple des pertes partielles en 13q, 14q et 15q sont retrouvées dans chaque type histologique (4 OD, 3 GBM et 6 OA). Hormis la présence du gène *RB1* en 13q14 dont les mutations et délétions sont fréquentes dans les gliomes, ces anomalies ne sont pas décrites comme anomalies récurrentes impliquées dans la gliomagénèse. De même, un gain du chromosome 20 est mis en évidence dans 3 OA, 2 OD, 1 A III et 2 GBM, sans significativité démontrée.

C. COHORTE SPHINGOSINE KINASE / SPHINGOSINE PHOSPHATE LYASE

Sur les 8 patients testés présentant une surexpression de la SPK et une sous-expression de la SPL, aucun lien direct n'a pu être établi entre l'expression protéique et le nombre de copies des gènes concernés. La surexpression de la sphingosine kinase ne semble pas être liée à une amplification du gène *SPHK1* en 17q25.2. De même, la faible expression de la protéine Sphingosine-phosphate lyase ne semble pas être liée à une délétion du gène *SGPL1* en 10q22.1. Cependant, sur une faible cohorte de 8 gliomes, les résultats ne sont pas suffisamment significatifs, d'autant plus que les niveaux d'expressions protéiques sont semi-quantitatifs car évalués par immunomarquage.

D'autre part, notons que d'autres mécanismes, possiblement mutationnels ou épigénétiques, peuvent intervenir dans ces modifications d'expression protéique.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Suite à ce travail de mise au point, l'ACPA fait désormais partie du panel des analyses utilisées pour l'exploration des tumeurs solides, sur tissu fixé au formol et inclus en paraffine.

Appliquée aux gliomes, l'ACPA est un outil puissant pour identifier les anomalies chromosomiques caractéristiques du type histologique et/ou du grade des tumeurs gliales, comme la codélétion 1p19q caractéristique des oligodendrogliomes, les anomalies des chromosomes 7 et 10 associées aux anomalies du gène *TP53* (17p13) dans les astrocytomes ou encore, l'amplification du gène *EGFR* (7p12) retrouvée dans les glioblastomes *de novo*. Ces anomalies ne sont pas spécifiques à 100%, c'est pourquoi l'ACPA reste un examen complémentaire au diagnostic histologique de première intention.

Par comparaison avec les techniques ciblées de biologie moléculaire, comme par exemple la recherche de perte d'hétérozygotie par analyse des marqueurs microsatellitaires pour la recherche d'une codélétion 1p19q, l'ACPA a l'avantage d'être exhaustive sur l'ensemble des 46 chromosomes du génome humain, avec une interprétation facilitée grâce à l'intégration automatisée des données par le logiciel CytoGenomics®. Tout comme l'étude des marqueurs microsatellitaires, l'ACPA est réalisable sur tissu FFPE, avec des résultats robustes et sensibles jusqu'au moins 10% de cellules tumorales dans l'échantillon, sans nécessiter d'échantillon de tissu sain du patient. L'ACPA ne remplace cependant pas les techniques de biologie moléculaire utilisées pour déterminer le statut mutationnel des gènes *IDH* et de méthylation du promoteur du gène de la *MGMT*, intégrées dans le panel des analyses utiles au clinicien pour caractériser les tumeurs gliales.

Par la détection des anomalies pangénomiques, l'ACPA permet d'améliorer la classification des gliomes, notamment pour les tumeurs ne répondant pas aux critères habituels de la classification OMS 2007 ni aux critères de classification histomoléculaire. En effet, certaines anomalies additionnelles peuvent être spécifiques d'un grade histologique et dans certains cas orienter la valeur pronostique, comme par exemple les délétions du bras long du chromosome 10 (10q comprenant le gène *PTEN*), les délétions des gènes *CDKN2A* (en 9p21), *RB1* (en 13q14), et d'autres amplifications géniques telles que *PDGFRA* (4q13), *MDM2-CDK4* (12q13-q15), *c-MYC* (8q24). La recherche translationnelle basée sur l'étude des profils génomiques des gliomes peut être intéressante pour identifier de nouvelles anomalies permettant ainsi de faire évoluer la classification en y intégrant de nouveaux sous-types en fonction des anomalies et de leur valeur pronostique impliquée. L'objectif d'une telle classification pronostique serait de servir de support aux cliniciens dans leurs décisions thérapeutiques, comme c'est déjà le cas dans la prise en charge des hémopathies malignes. De la même façon, l'identification de cible moléculaire potentiellement utilisable comme cible thérapeutique pourrait être une avancée majeure pour faire évoluer l'arsenal thérapeutique des gliomes, et ainsi adapter la prise en charge optimale et personnalisée de ces patients.

Par ailleurs, les mécanismes de progression tumorale sont actuellement encore difficiles à expliquer car peu explorés. L'accès à l'ensemble des données pangénomiques peut également améliorer leur compréhension. En effet, la comparaison de profil génomique tumoral au diagnostic et à la rechute ou à la progression peut faire l'objet d'une analyse retrospective longitudinale, bien que sa mise en place soit difficile, étant donné que le profil ACPA ne soit pas réalisé de façon systématique pour tous les gliomes nouvellement diagnostiqués. A ma connaissance, les études publiées sur les anomalies additionnelles des gliomes détectées par ACPA sont faites par comparaison de cohorte de gliomes de bas et haut grade, et non entre le diagnostic et la rechute.

Pour conclure, en plein essor depuis ces dernières années, l'ACPA fait partie, avec le séquençage de nouvelle génération à haut débit, du panel des nouvelles technologies permettant l'exploration de l'ensemble du génome. Grâce à leur implémentation en pratique hospitalière, l'adaptation des protocoles sur les tissus tumoraux va permettre d'obtenir une carte d'identité génétique des tumeurs et de définir ainsi de nouveaux marqueurs moléculaires et chromosomiques, indispensables pour optimiser la prise en charge du patient, et évoluer vers une médecine personnalisée.

BIBLIOGRAPHIE

1. DeAngelis LM. Brain Tumors. *N Engl J Med*. 2001;344(2):114- 123.
2. Ohgaki H, Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1 févr 2005;109(1):93- 108.
3. 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: FBTDB of Histological Results 2004-2008. *Brain Pathol*. nov 2011;21(6):633- 644.
4. Zouaoui S, Rigau V, Mathieu-Daudé H, Darlix A, Bessaoud F, Fabbro-Peray P, et al. Recensement national histologique des tumeurs primitives du système nerveux central: résultats généraux sur 40 000 cas, principales applications actuelles et perspectives. *Neurochirurgie*. févr 2012;58(1):4- 13.
5. Soffiatti R, Baumert BG, Bello L, Von Deimling A, Duffau H, Frénay M, et al. Guidelines on management of low-grade gliomas: report of an EFNS-EANO* Task Force: Low-grade gliomas. *Eur J Neurol*. sept 2010;17(9):1124- 1133.
6. Omuro A. Glioblastoma and Other Malignant Gliomas: A Clinical Review. *JAMA*. 6 nov 2013;310(17):1842.
7. Tabouret E, Bauchet L, Carpentier AF. [Brain metastases epidemiology and biology]. *Bull Cancer (Paris)*. 1 janv 2013;100(1):57- 62.
8. 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 (Berl)*. 6 juill 2007;114(2):97- 109.
9. Bent MJ. Interobserver variation of the histopathological diagnosis in clinical trials on glioma: a clinician's perspective. *Acta Neuropathol (Berl)*. 20 juill 2010;120(3):297- 304.
10. Figarella-Branger D, Labrousse F, Mohktari K. Référentiel gliomes diffus de l'adulte de grade OMS II, III et IV: anatomie pathologique et biologie. *Ann Pathol*. oct 2012;32(5):318- 327.
11. Stupp R, Tonn J-C, Brada M, Pentheroudakis G, On behalf of the ESMO Guidelines Working Group. High-grade malignant glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 16 juin 2010;21(Supplement 5):v190- v193.
12. Figarella-Branger D, Maues de Paula A, Colin C, Bouvier C. Histomolecular classification of adult diffuse gliomas: The diagnostic value of immunohistochemical markers. *Rev Neurol (Paris)*. oct 2011;167(10):683- 690.
13. Mokhtari K, Paris S, Aguirre-Cruz L, Privat N, Criniere E, Marie Y, et al. Olig2

expression, GFAP, p53 and 1p loss analysis contribute to glioma subclassification. *Neuropathol Appl Neurobiol.* févr 2005;31(1):62- 69.

14. Pignatti F. Prognostic Factors for Survival in Adult Patients With Cerebral Low-Grade Glioma. *J Clin Oncol.* 15 avr 2002;20(8):2076- 2084.

15. Park C-K, Lee S-H, Han JH, Kim C-Y, Kim D-W, Paek SH, et al. Recursive partitioning analysis of prognostic factors in WHO grade III glioma patients treated with radiotherapy or radiotherapy plus chemotherapy. *BMC Cancer.* 18 déc 2009;9:450.

16. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med.* 2009;360(8):765- 73.

17. Sanson M, Marie Y, Paris S, Idhah A, Laffaire J, Ducray F, et al. Isocitrate Dehydrogenase 1 Codon 132 Mutation Is an Important Prognostic Biomarker in Gliomas. *J Clin Oncol.* 27 juill 2009;27(25):4150- 4154.

18. Rossetto M, Ciccarino P, Boisselier B, Labussiere M, Sanson M. Metabolism of glioma and IDH1/IDH2 mutations. *Rev Neurol (Paris).* oct 2011;167(10):699- 703.

19. Van den Bent MJ, 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.* 16 févr 2010;16(5):1597- 1604.

20. Paus C, Murat A, Stupp R, Regli L, Hegi M. Rôle de la MGMT et implications cliniques dans les tumeurs cérébrales. *Bull Cancer (Paris).* 2007;94(9):769- 73.

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

22. Jenkins RB, Blair H, Ballman KV, Giannini C, Arusell RM, Law M, et al. A t(1;19)(q10;p10) Mediates the Combined Deletions of 1p and 19q and Predicts a Better Prognosis of Patients with Oligodendroglioma. *Cancer Res.* 15 oct 2006;66(20):9852- 9861.

23. Smith JS, Perry A, Borell TJ, Lee HK, O'Fallon J, Hosek SM, et al. Alterations of chromosome arms 1p and 19q as predictors of survival in oligodendrogliomas, astrocytomas, and mixed oligoastrocytomas. *J Clin Oncol.* 2000;18(3):636- 636.

24. Kujas M, Lejeune J, Benouaich-Amiel A, Crinière E, Laigle-Donadey F, Marie Y, et al. Chromosome 1p loss: A favorable prognostic factor in low-grade gliomas. *Ann Neurol.* 2005;58(2):322- 6.

25. 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. 12 janv 2007;13(23):6933- 6937.

26. Fontaine D, Vandebos F, Lebrun C, Paquis V, Frenay M. Valeurs diagnostique et pronostique des délétions 1p et 19q dans les gliomes de l'adulte. Revue critique de la littérature et implications en pratique clinique. Rev Neurol (Paris). juin 2008;164(6-7):595- 604.
27. Ramirez C, Bowman C, Maurage C-A, Dubois F, Blond S, Porchet N, et al. Loss of 1p, 19q, and 10q heterozygosity prospectively predicts prognosis of oligodendroglial tumors--towards individualized tumor treatment? Neuro-Oncol. mai 2010;12(5):490- 499.
28. Boots-Sprenger SHE, Sijben A, Rijntjes J, Tops BBJ, Idema AJ, Rivera AL, et al. Significance of complete 1p/19q co-deletion, IDH1 mutation and MGMT promoter methylation in gliomas: use with caution. Mod Pathol. 7 janv 2013;26(7):922- 929.
29. Weller M, Pfister SM, Wick W, Hegi ME, Reifenberger G, Stupp R. Molecular neuro-oncology in clinical practice: a new horizon. Lancet Oncol. 2013;14(9):e370- e379.
30. Berghoff AS, Stefanits H, Woehrer A, Heinzl H, Preusser M, Hainfellner JA, et al. Clinical neuropathology practice guide 3-2013: levels of evidence and clinical utility of prognostic and predictive candidate brain tumor biomarkers. Clin Neuropathol. juin 2013;32(3):148- 158.
31. Kaloshi G, Everhard S, Laigle-Donadey F, Marie Y, Navarro S, Mokhtari K, et al. Genetic markers predictive of chemosensitivity and outcome in gliomatosis cerebri. Neurology. 2008;70(8):590- 5.
32. Figarella-Branger D, Chappe C, Padovani L, Mercurio S, Colin C, Forest F, et al. [Glial and glioneuronal tumors in adults and children: main genetic alterations and towards a histomolecular classification]. Bull Cancer (Paris). août 2013;100(7-8):715- 726.
33. Ducray F. Biomarqueurs pronostiques et facteurs prédictifs de la réponse au traitement dans les gliomes de l'adulte. Prat Neurol - FMC. avr 2011;2(2):64- 70.
34. Curran WJ Jr, Scott CB, Horton J, Nelson JS, Weinstein AS, Fischbach AJ, et al. Recursive partitioning analysis of prognostic factors in three Radiation Therapy Oncology Group malignant glioma trials. J Natl Cancer Inst. 5 mai 1993;85(9):704- 710.
35. Li J, Wang M, Won M, Shaw EG, Coughlin C, Curran WJ, et al. Validation and Simplification of the Radiation Therapy Oncology Group Recursive Partitioning Analysis Classification for Glioblastoma. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1 nov 2011;81(3):623- 630.
36. Lamborn KR, Chang SM, Prados MD. Prognostic factors for survival of patients with glioblastoma: Recursive partitioning analysis. Neuro-Oncol. juill 2004;6(3):227- 235.
37. Tabatabai G, Stupp R, Bent MJ van den, Hegi ME, Tonn JC, Wick W, et al. Molecular diagnostics of gliomas: the clinical perspective. Acta Neuropathol (Berl). 1 nov

2010;120(5):585- 592.

38. Van den Bent MJ, Afra D, De Witte O, Hassel MB, Schraub S, Hoang-Xuan K, et al. Long-term efficacy of early versus delayed radiotherapy for low-grade astrocytoma and oligodendroglioma in adults: the EORTC 22845 randomised trial. *The Lancet*. 2005;366(9490):985- 90.

39. Shaw E. Prospective Randomized Trial of Low- Versus High-Dose Radiation Therapy in Adults With Supratentorial Low-Grade Glioma: Initial Report of a North Central Cancer Treatment Group/Radiation Therapy Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *J Clin Oncol*. 1 mai 2002;20(9):2267- 2276.

40. Shaw EG, Wang M, Coons SW, Brachman DG, Buckner JC, Stelzer KJ, et al. Randomized Trial of Radiation Therapy Plus Procarbazine, Lomustine, and Vincristine Chemotherapy for Supratentorial Adult Low-Grade Glioma: Initial Results of RTOG 9802. *J Clin Oncol*. 30 juill 2012;30(25):3065- 3070.

41. Brada M. Phase II study of primary temozolomide chemotherapy in patients with WHO grade II gliomas. *Ann Oncol*. 1 déc 2003;14(12):1715- 1721.

42. Van den Bent MJ, Brandes AA, Taphoorn MJB, Kros JM, Kouwenhoven MCM, Delattre J-Y, et al. Adjuvant Procarbazine, Lomustine, and Vincristine Chemotherapy in Newly Diagnosed Anaplastic Oligodendroglioma: Long-Term Follow-Up of EORTC Brain Tumor Group Study 26951. *J Clin Oncol*. 15 oct 2012;31(3):344- 350.

43. Cairncross G, Wang M, Shaw E, Jenkins R, Brachman D, Buckner J, et al. Phase III Trial of Chemoradiotherapy for Anaplastic Oligodendroglioma: Long-Term Results of RTOG 9402. *J Clin Oncol*. 15 oct 2012;31(3):337- 343.

44. 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 Off J Am Soc Clin Oncol*. 10 déc 2009;27(35):5874- 5880.

45. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol*. mai 2009;10(5):459- 466.

46. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352(10):987- 996.

47. Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, Hamou M-F, de Tribolet N, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352(10):997- 1003.

48. Malmström A, Grønberg BH, Marosi C, Stupp R, Frappaz D, Schultz H, et al. Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012;13:916-26.
49. Chinot OL, Wick W, Mason W, Henriksson R, Saran F, Nishikawa R, et al. Bevacizumab plus Radiotherapy–Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma. *N Engl J Med*. 2014;370(8):709- 722.
50. Kreisl TN, Kim L, Moore K, Duic P, Royce C, Stroud I, et al. Phase II Trial of Single-Agent Bevacizumab Followed by Bevacizumab Plus Irinotecan at Tumor Progression in Recurrent Glioblastoma. *J Clin Oncol*. 29 déc 2008;27(5):740- 745.
51. McLendon R, Friedman A, Bigner D, Van Meir EG, Brat DJ, M. Mastrogiannis G, et al. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. 4 sept 2008;455(7216):1061 - 1068.
52. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre P-L, et al. Genetic Pathways to Glioblastoma A Population-Based Study. *Cancer Res*. 2004;64(19):6892- 9.
53. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic Pathways to Primary and Secondary Glioblastoma. *Am J Pathol*. mai 2007;170(5):1445- 1453.
54. Ichimura K, Ohgaki H, Kleihues P, Collins VP. Molecular pathogenesis of astrocytic tumours. *J Neurooncol*. nov 2004;70(2):137- 160.
55. Reifenberger G, Collins VP. Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. *J Mol Med*. 14 août 2004;82(10):656- 670.
56. Bourhis J, Tao YG, Zhang P, Deutsch E. [Epidermal growth factor receptor (EGF) in head-and-neck cancers]. *Bull Cancer (Paris)*. 2007;94(7 Suppl):F189- 191.
57. Arteaga CL. Epidermal Growth Factor Receptor Dependence in Human Tumors: More Than Just Expression? *The Oncologist*. 15 août 2002;7(90004):31- 39.
58. Libermann TA, Nusbaum HR, Razon N, Kris R, Lax I, Soreq H, et al. Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin. *Nature*. 10 janv 1985;313(5998):144- 147.
59. Ekstrand AJ, Sugawa N, James CD, Collins VP. Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15 mai 1992;89(10):4309- 4313.
60. Mohapatra G, Bollen AW, Kim DH, Lamborn K, Moore DH, Prados MD, et al. Genetic analysis of glioblastoma multiforme provides evidence for subgroups within the grade. *Genes*

Chromosomes Cancer. mars 1998;21(3):195- 206.

61. Gan HK, Kaye AH, Luwor RB. The EGFRvIII variant in glioblastoma multiforme. J Clin Neurosci. juin 2009;16(6):748- 754.

62. Del Vecchio CA, Giacomini CP, Vogel H, Jensen KC, Florio T, Merlo A, et al. EGFRvIII gene rearrangement is an early event in glioblastoma tumorigenesis and expression defines a hierarchy modulated by epigenetic mechanisms. Oncogene. 2013;32(21):2670- 81.

63. Reifenberger J, Reifenberger G, Liu L, James CD, Wechsler W, Collins VP. Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p. Am J Pathol. nov 1994;145(5):1175- 1190.

64. Jeuken JW, Sprenger SH, Boerman RH, von Deimling A, Teepen HL, van Overbeeke JJ, et al. Subtyping of oligo-astrocytic tumours by comparative genomic hybridization. J Pathol. 2001;194(1):81- 7.

65. Hirose Y, Aldape KD, Chang S, Lamborn K, Berger MS, Feuerstein BG. Grade II astrocytomas are subgrouped by chromosome aberrations. Cancer Genet Cytogenet. 2003;142(1):1- 7.

66. Kitange G, Misra A, Law M, Passe S, Kollmeyer TM, Maurer M, et al. Chromosomal imbalances detected by array comparative genomic hybridization in human oligodendrogliomas and mixed oligoastrocytomas. Genes Chromosomes Cancer. janv 2005;42(1):68- 77.

67. Bettegowda 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.

68. 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.

69. Riemenschneider MJ, Reifenberger G. Molecular Neuropathology of Gliomas. Int J Mol Sci. 7 janv 2009;10(1):184- 212.

70. Woehrer AA, Marosi CA, Widhalm GA, Oberndorfer SA, Pichler JA, Hainfellner JAA. Clinical neuropathology practice guide 1-2013: Molecular subtyping of glioblastoma: ready for clinical use? Clin Neuropathol. 2013;32(1):5- 8.

71. Jeuken JWM, von Deimling A, Wesseling P. Molecular pathogenesis of oligodendroglial tumors. J Neurooncol. nov 2004;70(2):161- 181.

72. 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.

73. 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.

74. Arslantas A, Artan S, Öner Ü, Müslümanoğlu MH, Özdemir M, Durmaz R, et al. Genomic alterations in low-grade, anaplastic astrocytomas and glioblastomas. *Pathol Oncol Res*. 2007;13(1):39- 46.

75. Nishizaki T, Ozaki S, Harada K, Ito H, Arai H, Beppu T, et al. Investigation of genetic alterations associated with the grade of astrocytic tumor by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*. 1998;21(4):340- 6.

76. Koschny R, Koschny T, Froster UG, Krupp W, Zuber MA. Comparative genomic hybridization in glioma: a meta-analysis of 509 cases. *Cancer Genet Cytogenet*. 2002;135(2):147- 59.

77. Koschny R, Holland H, Koschny T, Vitzthum H-E. Comparative genomic hybridization pattern of non-anaplastic and anaplastic oligodendrogliomas – A meta-analysis. *Pathol - Res Pract*. 12 janv 2006;202(1):23- 30.

78. Trost D, Ehrler M, Fimmers R, Felsberg J, Sabel MC, Kirsch L, et al. Identification of genomic aberrations associated with shorter overall survival in patients with oligodendroglial tumors. *Int J Cancer*. 2007;120(11):2368- 76.

79. Talagas M, Marcorelles P, Uguen A, Redon S, Quintin-Roué I, Costa S, et al. Identification of a novel population in high-grade oligodendroglial tumors not deleted on 1p/19q using array CGH. *J Neurooncol*. 24 juill 2012;109(2):405- 413.

80. Malan V, Lapierre J-M, Vekemans M, Romana SP. La CGH array : un bouleversement de la pratique hospitalière en cytogénétique. *IRBM*. nov 2007;28(5–6):245- 251.

81. Kallioniemi A. CGH microarrays and cancer. *Curr Opin Biotechnol*. févr 2008;19(1):36- 40.

82. Costa JL, Meijer G, Ylstra B, Caldas C. Array Comparative Genomic Hybridization Copy Number Profiling: A New Tool for Translational Research in Solid Malignancies. *Semin Radiat Oncol*. avr 2008;18(2):98- 104.

83. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*. 30 oct 1992;258(5083):818- 821.

84. Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet*. 1998;20(2):207- 11.

85. Ishkanian AS, Malloff CA, Watson SK, deLeeuw RJ, Chi B, Coe BP, et al. A tiling resolution DNA microarray with complete coverage of the human genome. *Nat Genet.* mars 2004;36(3):299- 303.
86. Bernheim A, Huret J-L, Guillaud-Bataille M, Brison O, Couturier J. De la cytogénétique à la cytogénomique des tumeurs: le point en 2004. *Bull Cancer (Paris).* 2004;91(1):29- 43.
87. 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.* 2005;58(3):483- 7.
88. Abuhusain HJ, Matin A, Qiao Q, Shen H, Kain N, Day BW, et al. A metabolic shift favoring sphingosine 1-phosphate at the expense of ceramide controls glioblastoma angiogenesis. *J Biol Chem.* 27 déc 2013;288(52):37355- 37364.
89. Xia P, Gamble JR, Wang L, Pitson SM, Moretti PA, Wattenberg BW, et al. An oncogenic role of sphingosine kinase. *Curr Biol CB.* 30 nov 2000;10(23):1527- 1530.
90. Vadas M, Xia P, McCaughan G, Gamble J. The role of sphingosine kinase 1 in cancer: Oncogene or non-oncogene addiction? *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids.* sept 2008;1781(9):442- 447.
91. 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.
92. Plano D, Amin S, Sharma AK. Importance of Sphingosine Kinase (SphK) as a Target in Developing Cancer Therapeutics and Recent Developments in the Synthesis of Novel SphK Inhibitors. *J Med Chem.* 11 févr 2014;
93. 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.
94. Hirose Y, Sasaki H, Abe M, Hattori N, Adachi K, Nishiyama Y, et al. Subgrouping of gliomas on the basis of genetic profiles. *Brain Tumor Pathol.* 1- 6.
95. Yin D, Ogawa S, Kawamata N, Tunici P, Finocchiaro G, Eoli M, et al. High-Resolution Genomic Copy Number Profiling of Glioblastoma Multiforme by Single Nucleotide Polymorphism DNA Microarray. *Mol Cancer Res.* 5 janv 2009;7(5):665- 677.
96. Dehais C, Laigle-Donadey F, Marie Y, Kujas M, Lejeune J, Benouaich-Amiel A, et al. Prognostic stratification of patients with anaplastic gliomas according to genetic profile. *Cancer.* 15 oct 2006;107(8):1891- 1897.
97. Ueki K, Nishikawa R, Nakazato Y, Hirose T, Hirato J, Funada N, et al. Correlation of histology and molecular genetic analysis of 1p, 19q, 10q, TP53, EGFR, CDK4, and CDKN2A

in 91 astrocytic and oligodendroglial tumors. Clin Cancer Res. 2002;8(1):196- 201.

Université de Lille 2
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES DE LILLE
MEMOIRE de DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
(tenant lieu de Thèse en vue du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie)
Année Universitaire 2013/2014

Nom : DREMAUX

Prénom : Julie

Titre de la thèse : Anomalies cytogénétiques des gliomes : Apport du caryotype moléculaire par analyse comparative sur puce à ADN (ACPA) au diagnostic

Mots-clés : Cytogénétique, ACPA, tissu fixé et inclus en paraffine (FFPE), gliomes

Résumé : Les gliomes, tumeurs cérébrales les plus fréquentes chez l'adulte, sont des tumeurs rares, très agressives, difficiles à traiter et de pronostic réservé. Leur diagnostic de certitude repose sur une étude histologique et la classification OMS 2007. Plus récemment, l'identification de marqueurs moléculaires et génétiques signe leur appartenance à un sous-type histologique et donne une valeur pronostique. Actuellement, la recherche de la codélation 1p19q, des mutations des gènes *IDH* et le statut de méthylation du promoteur du gène de la *MGMT* font désormais partie de la prise en charge thérapeutique. Mais cette classification histomoléculaire ne permet pas de caractériser tous les gliomes.

L'analyse comparative sur puce à ADN (ACPA) est une technique de cytogénétique moléculaire pangénomique permettant d'identifier les déséquilibres chromosomiques sur l'ensemble du génome tumoral.

L'objectif de ce travail repose donc sur la mise en place de la technique ACPA pour l'étude des gliomes. Après mise au point et validation de la technique ACPA adaptée sur tissu FFPE, l'étude d'une cohorte de 38 gliomes permet d'identifier les anomalies spécifiques des gliomes, comme par exemple la codélation 1p19q dans les oligodendrogliomes ou l'amplification du gène *EGFR* dans les glioblastomes, ou d'autres anomalies additionnelles, dont certaines sont connues pour leur valeur pronostique (trisomie 7, monosomie 10, délétion du gène *CDKN2A*,...). Par la suite, avec plus de recul, l'accès au profil génomique de ces tumeurs permettra d'identifier des anomalies additionnelles ayant un intérêt diagnostique, pronostique ou prédictif de réponse à une chimiothérapie. Leur recherche devient en effet indispensable pour établir la « carte d'identité génétique » des tumeurs, et ainsi améliorer la prise en charge initiale des patients.

Membres du jury :

Président : **Monsieur le Professeur Thierry BROUSSEAU**, PU-PH
Institut de Biochimie et biologie moléculaire, CHRU de Lille

Assesseurs : **Madame le Professeur Nicole PORCHET**, PU-PH
Institut de Biochimie et biologie moléculaire, CHRU de Lille

Monsieur le Professeur Claude-Alain MAURAGE, PU-PH
Institut de Pathologie, CHRU de Lille

Madame le Docteur Fabienne ESCANDE, PH
Institut de Biochimie et biologie moléculaire, CHRU de Lille

Directeur de thèse : **Madame le Docteur Catherine ROCHE-LESTIENNE**, MCU-PH
Institut de Génétique Médicale, CHRU Lille