

**UNIVERSITE DE NANTES**

---

**FACULTE DE MEDECINE**

---

Année 2012

N°173

**THESE**

pour le

**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE**

**Spécialité Anatomie et Cytologie Pathologiques**

par

Marie DENIS MUSQUER

née le 14/06/1982 à Angers (Maine et Loire)

---

Présentée et soutenue publiquement le 24 Octobre 2012

---

**ETUDE DES FACTEURS HISTOPATHOLOGIQUES ET MOLECULAIRES  
PRONOSTIQUES DE LONGUE SURVIE CHEZ DES PATIENTS ATTEINTS DE  
GLIOBLASTOME PRIMAIRE**

---

Président : Monsieur le Professeur C. Laboisse

Directeur de thèse : Madame le Docteur D. Loussouarn

# TABLE DES MATIERES

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	<b>5</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>6</b>
<b>GENERALITES</b> .....	<b>7</b>
1. RAPPEL SUR LES GLIOMES.....	7
1.1. <i>Définition, mode de développement</i> .....	7
1.2. <i>Classifications</i> .....	7
1.2.1. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).....	7
1.2.2. Selon l'hôpital Saint-Anne.....	8
1.3. <i>Place des glioblastomes au sein des gliomes</i> .....	9
2. EPIDEMIOLOGIE.....	11
2.1. <i>Incidence</i> .....	11
2.2. <i>Distribution</i> :.....	12
2.2.1. Selon l'âge et le sexe.....	12
2.2.2. Selon l'ethnie.....	12
2.3. <i>Survie</i> .....	12
2.3.1. Survie globale.....	12
2.3.2. Survie à 3 ans.....	12
3. LOCALISATION.....	13
4. FACTEURS DE RISQUES.....	13
4.1. <i>Facteurs de risque intrinsèques</i> .....	13
4.2. <i>Facteurs de risque extrinsèques</i> .....	13
5. PRESENTATION CLINIQUE ET RADIOLOGIQUE.....	14
5.1. <i>Clinique</i> .....	14
5.2. <i>Radiologique</i> .....	14
6. DIAGNOSTIC ANATOMO-PATHOLOGIQUE.....	15
6.1. <i>Aspect histologique classique des glioblastomes</i> .....	15
6.2. <i>Glioblastomes avec aspect architectural particulier</i> .....	17
6.2.1. Glioblastomes à petites cellules.....	17
6.2.2. Glioblastomes avec composante oligodendrogliale (GBMO).....	17
6.2.3. Glioblastomes avec cellules lipidisées.....	18
6.2.4. Glioblastomes avec structures épithéliales hétérologues.....	18
6.3. <i>Les deux sous-types histologiques de glioblastome</i> :.....	18
6.3.1. Gliosarcomes.....	18
6.3.2. Glioblastomes à cellules géantes.....	19
6.4. <i>Marqueurs immunohistochimiques utilisés en routine, d'intérêt diagnostique</i> .....	19

7.	LES PRINCIPALES ALTERATIONS GENETIQUES OBSERVEES DANS LES GLIOBLASTOMES .....	20
7.1.	<i>Les altérations de la voie EGFR/PI3K/PTEN/AKT .....</i>	20
7.2.	<i>Les altérations de la voie p16<sup>INK4A</sup> /RB1 /CDK4 .....</i>	21
7.3.	<i>Les altérations de la voie TP53/MDM2/p14<sup>ARF</sup> .....</i>	21
7.4.	<i>La perte d'hétérozygotie du chromosome 10 (LOH10) .....</i>	22
8.	FACTEURS PRONOSTIQUES.....	24
8.1.	<i>Facteurs pronostiques cliniques.....</i>	24
8.1.1.	Age.....	24
8.1.2.	Etat clinique et cognitif .....	24
8.1.3.	Traitement.....	24
8.2.	<i>Facteurs dépendants de la tumeur.....</i>	25
8.2.1.	Histologie .....	25
8.2.2.	Localisation .....	25
8.3.	<i>Facteurs pronostiques moléculaires.....</i>	25
8.3.1.	Mutation d'IDH 1 .....	25
8.3.2.	Méthylation du promoteur de la MGMT .....	27
8.3.3.	Altération d'EGFR .....	28
8.3.4.	Autres altérations moléculaires .....	28
9.	TRAITEMENT .....	29
9.1.	<i>Chirurgie .....</i>	29
9.2.	<i>Radio-chimiothérapie selon le protocole Stupp.....</i>	29
	<b>BUTS DE L'ETUDE .....</b>	<b>30</b>
	<b>MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>31</b>
1.	CONSTITUTION DES COHORTES : .....	31
1.	ETUDE HISTOLOGIQUE : .....	32
2.	ETUDE IMMUNOHISTOCHEMIE : .....	32
2.1.	<i>Protocole d'étude.....</i>	32
2.2.	<i>Evaluation du marquage immunohistochimique.....</i>	33
3.	RECHERCHE DE L'AMPLIFICATION D'EGFR PAR HYBRIDATION IN SITU (SISH/ « SILVER IN SITU HYBRIDIZATION ») .....	33
4.	RECHERCHE DE LA METHYLATION DU PROMOTEUR DE LA MGMT PAR PCR EN TEMPS REEL .....	34
4.1.	<i>Extraction et bisulfitation de l'ADN .....</i>	34
4.2.	<i>Methylation specific PCR (MS-PCR) en temps réel.....</i>	35
5.	RECHERCHE DES MUTATIONS IDH1 EN BIOLOGIE MOLECULAIRE .....	36
5.1.	<i>Extraction d'ADN .....</i>	36
5.2.	<i>PCR spécifique d'allèle en temps réel.....</i>	36
5.3.	<i>Séquençage.....</i>	38
6.	ANALYSE STATISTIQUE .....	39
	<b>RESULTATS .....</b>	<b>40</b>
1	ETUDE DE LA POPULATION TOTALE .....	40

1.1.	<i>Données cliniques (tableau 5)</i> .....	40
1.2.	<i>Etude de la survie globale (figure 11)</i> .....	41
1.3.	<i>Etude des facteurs pronostiques de longue survie</i> .....	42
1.3.1.	Analyse univariée (tableau 13 et figures 18 à 20 en annexe) .....	42
1.3.2.	Analyse multivariée (tableau 6).....	42
2.	ÉTUDE DES COHORTES « LONG-SURVIVANTS » ET « COURT-SURVIVANTS » .....	43
2.1.	<i>Données cliniques (tableau 7)</i> .....	43
2.2.	<i>Analyse du traitement adjuvant reçu</i> .....	44
2.3.	<i>Analyse histologique</i> .....	44
2.4.	<i>Analyse immunohistochimique et moléculaire</i> .....	45
2.4.1.	Surexpression de P53 en immunohistochimie (tableau 8 et figure 12) °.....	45
2.4.2.	Surexpression d'EGFR en immunohistochimie et amplification d'EGFR par SISH (tableau 8 et figure 13-14) .....	45
2.4.3.	Mutation d'IDH1 (tableau 8 et figure 15) .....	48
2.4.4.	Méthylation du promoteur de MGMT (tableau 8 et figure 16).....	49
3.	ÉTUDE DES FACTEURS PRONOSTIQUES DE LONGUE SURVIE.....	51
3.1.	<i>Analyse univariée (tableau 9)</i> .....	51
3.2.	<i>Analyse multivariée (tableau 10 et figure 17)</i> .....	52
3.3.	<i>Recherche de liaison entre les marqueurs pronostiques (tableaux 11-12)</i> .....	53
	<b>DISCUSSION</b> .....	<b>54</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>61</b>
	<b>ANNEXES</b> .....	<b>70</b>
	<b>INDEX DES TABLEAUX ET DES FIGURES</b> .....	<b>75</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique  
CBTRUS: Central Brain Tumor Registry of the United States  
CDK : Cycline Dépendante des Kinases  
CHU : Centre Hospitalier Universitaire  
Ct : *Cycle threshold* (Cycle seuil)  
E2F : E2 Transcription Factor  
EGF: Epidermal Growth Factor  
EGFR : Récepteur de l'EGF  
GBMO : Glioblastome Multiforme avec composante Oligodendrogliale  
GFAP : Protéine Acide Glio-Filamentaire  
2-HG: 2-hydroxyglutarate  
HES : Hémalun Eosine Safran  
HER : *Human EGF Receptor*  
HIF: Hypoxia-Inducible Factor 1  
IDH : Isocitrate deshydrogénase  
IHC : Immunohistochimie  
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique  
KPS : *Karnofsky Performance Score* (Score fonctionnel de Karnofsky)  
LOH: *Loss of heterozygosity* (perte d'hétérozygotie)  
MDM2 : *Murine Double Minute 2*  
MS-PCR : *Methylation Specific - PCR*  
NADP : Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate  
NADPH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrogen  
OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
PCR : *Polymerase Chain Reaction* (Réaction en chaîne par polymérase)  
PI3K: Phosphatidyl-Inositol-3Kinase  
PIP2: Phosphatidyl-Inositol-biPhosphate  
PIP3: Phosphatidyl-Inositol-triPhosphate  
PNET: Tumeur Primitive Neuro – Ectodermique  
RB1 : Rétinoblastome 1  
RTOG : *Radiation Therapy Oncology Group*  
SISH : *Silver In Situ Hybridization*  
SNC : Système Nerveux Central  
TMZ: Témzolomide

# INTRODUCTION

Le glioblastome est la plus fréquente et la plus agressive des tumeurs gliales du système nerveux central [1]. Même si les derniers progrès thérapeutiques ont permis d'améliorer la survie de quelques mois, le pronostic de ce cancer reste très sombre avec une médiane de survie d'environ 8 à 12 mois. Cependant, une faible proportion de patients (3 à 5%), avec le même diagnostic histologique de glioblastome, survivent plus de 3 ans [2]. Ces patients, appelés « long-survivants » dans la littérature, constituent une cohorte particulièrement intéressante pour l'investigation des facteurs pronostiques de longue survie. Si certains de ces facteurs comme l'âge sont indiscutablement reconnus, d'autres font l'objet de controverses. Malgré les progrès réalisés dans la compréhension des altérations génétiques des glioblastomes, les marqueurs moléculaires d'intérêt pronostique et utilisables en pratique courante sont rares.

Le but de notre étude est de déterminer les caractéristiques histologiques et les marqueurs immunohistochimiques et moléculaires pronostiques de longue survie (définie comme une survie supérieure ou égale à 3 ans) sur une population de patients atteints de glioblastome primaire.

Après avoir abordé les données actuelles sur le glioblastome sur le plan clinique, histologique, biologique et thérapeutique, nous présenterons les résultats de notre étude puis nous discuterons de leur pertinence en fonction des données de la littérature.

# GENERALITES

## 1. Rappel sur les gliomes

### 1.1. Définition, mode de développement

Les gliomes sont les tumeurs primitives les plus fréquentes du système nerveux central (SNC). Ils représentent près de 50% de ces tumeurs et leur incidence en France est d'environ 7 à 8/100 000 habitants et par an, soit environ 4000 nouveaux cas par an [3]. Ces tumeurs se développent aux dépens des cellules gliales qui constituent le tissu de soutien du SNC. Ces cellules sont de trois types (astrocytes, oligodendrocytes et épendymocytes). Les gliomes peuvent se développer dans tout le SNC bien que, en fonction du type histologique, certains territoires soient préférentiellement touchés.

Selon leur mode de développement, on oppose les gliomes circonscrits et les gliomes diffus (ou infiltrants). Les gliomes circonscrits sont représentés par l'astrocytome pilocytique survenant majoritairement chez l'enfant, et qui guérit après résection complète. Les gliomes diffus sont caractérisés, quelque soit leur sous-type histologique et leur grade, par leur propension à diffuser dans le tissu cérébral et à dégénérer inexorablement en forme plus maligne. Ces gliomes se développent majoritairement chez l'adulte.

### 1.2. Classifications

#### 1.2.1. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS)

La classification des gliomes reconnue par la communauté scientifique est celle de l'OMS. L'OMS classe les gliomes infiltrants en fonction de leur « origine cellulaire » présumée (astrocytaire, oligodendrogliale ou mixte) et de leur grade (II, III ou IV). Les critères du grading sont représentés par les atypies cyto-nucléaires, les mitoses, la prolifération microvasculaire et la nécrose [1]. Les gliomes de grade II présentent des atypies cyto-nucléaires modérées, de rares mitoses, une absence de prolifération microvasculaire et de nécrose. Les gliomes de grade III se caractérisent par des atypies plus marquées, un nombre plus élevé de mitoses, une possible prolifération microvasculaire et une absence de nécrose. Enfin, les glioblastomes, de grade IV, présentent en plus des atypies cytonucléaires et des mitoses, des signes de prolifération micro-vasculaire et des plages de nécrose.

Cependant, cette classification présente certaines insuffisances : elle utilise des critères morphologiques subjectifs, elle manque de reproductibilité inter et intra-observateur [4], elle ne fait pas de distinction entre cellules tumorales et parenchyme résiduel infiltré, et elle ne tient pas compte des données de l'imagerie [5].

### 1.2.2. Selon l'hôpital Saint-Anne

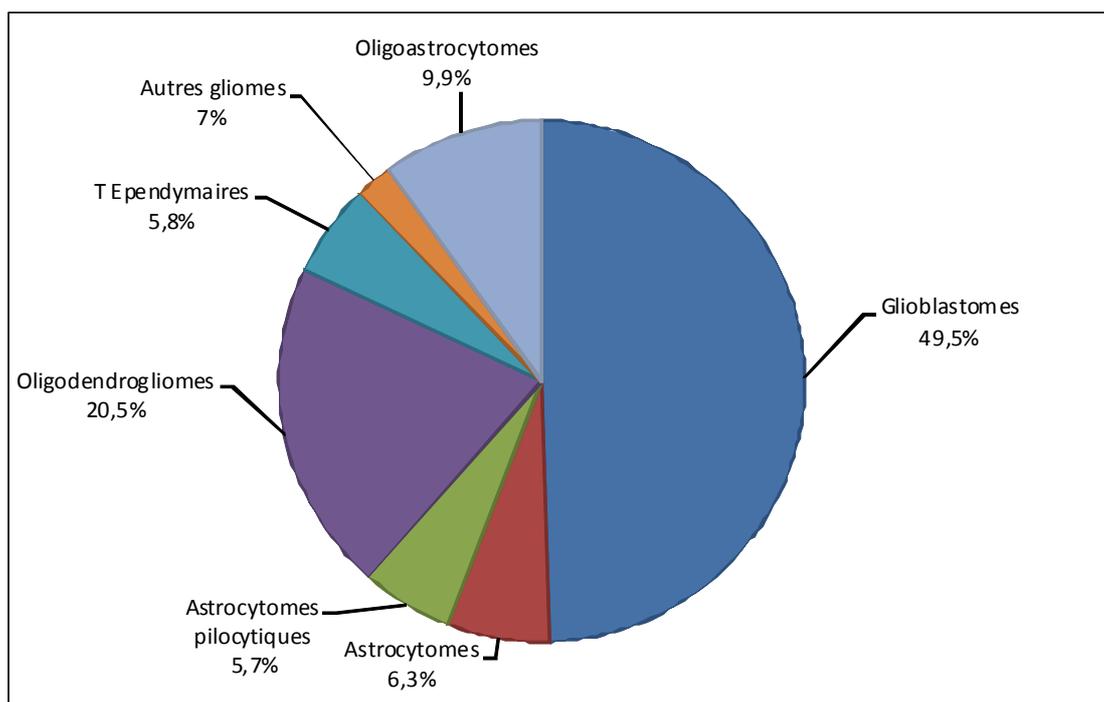
La classification des gliomes selon l'hôpital Sainte-Anne découle pour l'essentiel de l'étude de biopsies étagées stéréotaxiques corrélées à l'imagerie (Scanner ou IRM) [6]. Ces travaux ont notamment permis de définir la structure spatiale des gliomes. Deux composantes distinctes peuvent ainsi être observées dans les gliomes :

- Le tissu tumoral solide, formé uniquement de cellules tumorales. Cette composante s'accompagne d'une microangiogénèse, se traduisant par une prise de contraste à l'imagerie.
- Les cellules tumorales isolées, qui infiltrent le parenchyme adjacent morphologiquement et fonctionnellement intact. Du fait de l'absence de microangiogénèse associée, il n'y a pas de prise de contraste à l'imagerie dans ce territoire. En revanche, il existe souvent un œdème se traduisant en IRM par un hypersignal en séquence T2 et en Flair.

Ainsi, cette classification intègre les données de l'imagerie dans la démarche diagnostique et repose sur l'analyse de la structure histologique des gliomes (infiltrants purs, solides purs ou mixtes). Les astrocytomes pilocytiques sont composés uniquement de tissu tumoral solide, les glioblastomes de tissu tumoral solide et de cellules tumorales isolées, les oligodendrogliomes et oligoastrocytomes peuvent également présenter une structure mixte, mais sont le plus souvent, au début de leur évolution, composés de cellules tumorales isolées. Cette classification n'est pas reconnue par la communauté scientifique internationale et de plus, la correspondance avec le *grading* de l'OMS est parfois difficile [5].

### 1.3. Place des glioblastomes au sein des gliomes.

Les glioblastomes sont classés par l'OMS dans le sous-groupe des tumeurs astrocytaires et sont de grade IV. Ils représentent 16 à 25% de l'ensemble des tumeurs primitives du système nerveux central et 50 à 60% des gliomes [7–11]



**Figure 1 : Distribution des gliomes (n=12 605). Figure adaptée du registre français des tumeurs cérébrales [9].**

Le concept de glioblastomes primaires et de glioblastomes secondaires a été initialement introduit par Scherer en 1940 [12]. Les premiers représentent plus de 90% des glioblastomes, et apparaissent *de novo*, sans aucune preuve de lésion préexistante tandis que les seconds sont rares et résultent de la transformation anaplasique d'un gliome infiltrant de grade II ou III prouvé histologiquement ou par imagerie. Bien que l'on ne puisse pas distinguer ces deux types de glioblastomes sur le plan histologique, ils se caractérisent cependant par un profil d'anomalie moléculaire différent [13, 14].

La suite des généralités ne concernent que les glioblastomes primaires.

**Les tumeurs astrocytaires :**

- Astrocytome à cellules géantes sous-épendymaires Grade I
- Astrocytome pilocytique Grade I
  - Astrocytome pilocytique, variant pilomyxoïde Grade II
- Astrocytome diffus Grade II
  - Astrocytome fibrillaire
  - Astrocytome protoplasmique
  - Astrocytome gemistocytique
- Astrocytome anaplasique Grade III
- Xanthoastrocytoma pléiomorphe Grade II/III
- Glioblastome Grade IV
  - Glioblastome à cellules géantes
  - Gliosarcome
- Gliomatose cérébrale Grade III

**Les tumeurs oligodendrogiales :**

- Oligodendrogliome Grade II
- Oligodendrogliome anaplasique Grade III

**Les tumeurs mixtes oligo-astrocytaires :**

- Oligo-astrocytome Grade II
- Oligoastrocytome anaplasique Grade III

**Les tumeurs épendymaires:**

- Ependymome Grade II
- Ependymome anaplasique Grade III
- Ependymome myxopapillaire Grade I
- Subependymome Grade I

Figure 2 : Classification des gliomes selon l'OMS 2007 [1].

## 2. Epidémiologie

### 2.1. Incidence

La majorité des données épidémiologiques provient de registres spécialisés dans les tumeurs cérébrales, comme en Amérique du Nord (Central Brain Tumor Registry of the United States – CBTRUS), ou en Autriche [10]. En France, un tel registre national existe depuis 2004 [8].

En Amérique du Nord et en Europe, l'incidence du glioblastome est de 3 à 4 nouveaux cas pour 100 000 habitants et par an [7, 15]. On peut cependant penser qu'elle est sous-évaluée : certains glioblastomes n'ont pas de diagnostic histologique, les transformations anaplasiques des autres gliomes ne sont pas colligées dans les registres et l'exhaustivité des enregistrements est difficile à atteindre [16].

Une augmentation de l'incidence a été observée dans la plupart des pays entre 1970 et 1990 [17]. Cette augmentation peut s'expliquer par le vieillissement de la population, avec un accroissement du nombre de cas, plus particulièrement au-delà de 70 ans, par l'amélioration de l'accès à l'imagerie et par les progrès des techniques neurochirurgicales [16].

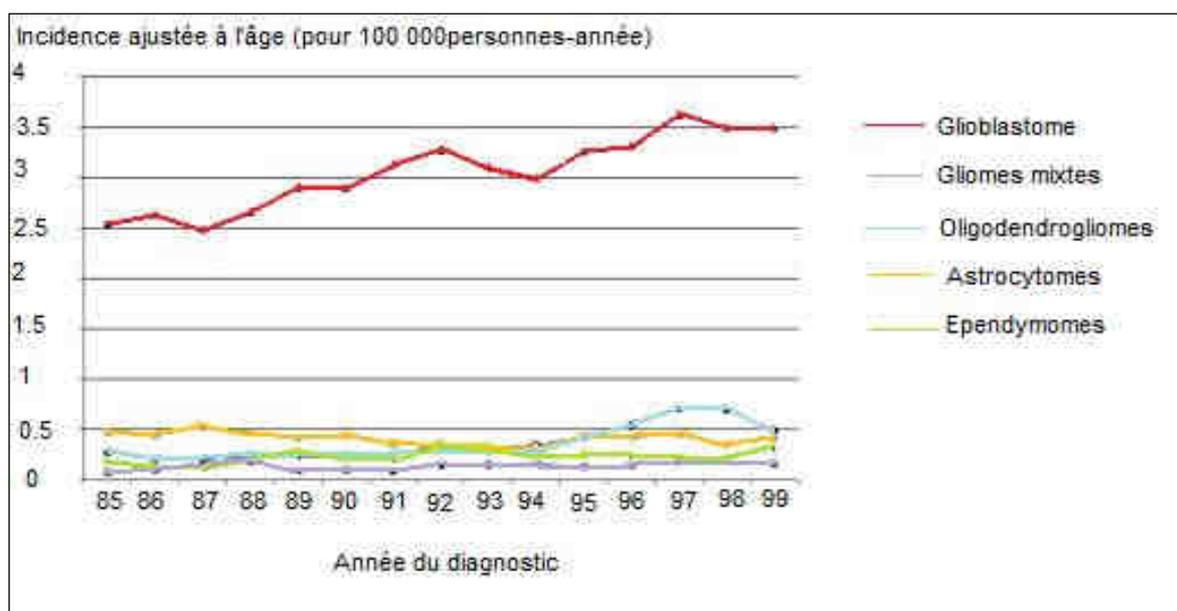


Figure 3 : Evolution de l'incidence des gliomes entre 1985 et 1999. Figure modifiée d'après les registres de six états d'Amérique [17].

## 2.2. Distribution :

### 2.2.1. Selon l'âge et le sexe

L'incidence des glioblastomes, très faible chez l'enfant, augmente de manière linéaire jusqu'à 75 ans pour diminuer ensuite. Le pic d'incidence se situe entre 45 et 70 ans, et l'âge médian au diagnostic est d'environ 62 ans [7, 16, 18].

Les glioblastomes prédominent légèrement chez l'homme dans un rapport de 1.3 à 1.8 selon les études [16].

### 2.2.2. Selon l'ethnie

Les données épidémiologiques Nord-Américaines permettent d'effectuer ces comparaisons, si l'on admet que l'accès aux soins est comparable en fonction de l'ethnie. L'incidence des glioblastomes est de 3,99 chez les blancs et de 1,91/100 000 chez les noirs [19].

## 2.3. Survie

### 2.3.1. Survie globale

La médiane de survie globale des glioblastomes, tout type de prise en charge confondu varie entre 4,9 et 9,4 mois selon les études [7], [13], [18]. Cependant, la médiane de survie rapportée dans les études cliniques est plus importante. En 2005, il a été rapporté dans l'étude de Stupp *et al.* une survie médiane de 12,1 mois pour les patients traités par radiothérapie et de 14,6 mois pour ceux traités par radiothérapie associée à une chimiothérapie concomitante [20].

### 2.3.2. Survie à 3 ans

Malgré le pronostic effroyable des glioblastomes, 3 à 5% des patients survivent plus de 3 ans [2]. Dans la littérature, ces patients sont appelés « long-survivants » [21–24].

### 3. Localisation

Les glioblastomes se développent au sein de la substance blanche sous-corticale des hémisphères cérébraux puis diffusent au cortex adjacent et à l'hémisphère controlatéral via le corps calleux [1]. Dans une série de 676 glioblastomes primaires issu de l'hôpital universitaire de Milan, le site le plus fréquemment affecté était le lobe temporal (24%), le lobe frontal (19.5%), puis les localisations pariéto-occipitales (11,6%). Enfin, plus de 42% des cas étaient multifocaux au moment du diagnostic [25]. Les localisations intraventriculaires, cérébelleuses et médullaires sont rares. Les glioblastomes du tronc cérébral ne sont pas exceptionnels et affectent plus particulièrement les enfants.

### 4. Facteurs de risques

#### 4.1. Facteurs de risque intrinsèques

Les seuls facteurs de risque intrinsèques reconnus sont certains syndromes de prédisposition génétique. Il est estimé que 1% des gliomes seraient liés à des maladies génétiques. Quatre de ces maladies sont connues pour être associées aux glioblastomes : la neurofibromatose de type 1, la sclérose tubéreuse de Bourneville, le syndrome de Turcot et le syndrome de Li-Fraumeni [26–28].

Par ailleurs, certaines familles sont concernées par plusieurs cas de gliomes sans qu'aucun des syndromes génétiques précédemment cités n'existent. Ces formes familiales représenteraient 5% des gliomes. Un vaste consortium international (Gliogene) a été créé en 2007 pour identifier le(s) gène(s) en cause dans ces gliomes familiaux [29]

#### 4.2. Facteurs de risque extrinsèques

Le seul facteur de risque environnemental prouvé est l'exposition à de hautes doses de radiations ionisantes. De nombreuses études ont ainsi montré une augmentation du risque de gliomes (tout type histologique confondu) chez les enfants qui avaient reçu une irradiation cérébrale prophylactique dans la cadre d'une leucémie aigüe lymphoblastique [30–32]

De très nombreux autres facteurs comme l'exposition à divers agents chimiques carcinogènes, le tabagisme, la consommation d'alcool, des régimes alimentaires particuliers, les antécédents de traumatisme crânien, ont été suggérés, mais aucun lien n'a pu être formellement établi par les différentes études réalisées [27, 30, 31, 33]. Plus récemment, avec la généralisation de l'utilisation des téléphones portables, plusieurs études ont essayé d'établir un lien entre l'exposition aux champs électromagnétiques émis par les appareils et le risque de développer une tumeur cérébrale. Ces études difficiles à conduire et comportant de nombreux biais n'ont pas permis de démontrer qu'il existait un tel lien [34, 35].

## 5. Présentation clinique et radiologique

### 5.1. Clinique

L'histoire clinique est généralement courte. Dans plus de 50% des cas, les premiers symptômes apparaissent moins de 3 mois avant le diagnostic histologique [1].

Les manifestations cliniques sont liées à l'effet de masse produit par la tumeur sur les structures adjacentes, à l'infiltration et à la destruction du parenchyme cérébral. Les symptômes secondaires à l'hypertension intra-crânienne (céphalées, nausées, vomissements, œdème papillaire) sont ainsi très fréquents. En fonction de la localisation de la tumeur, divers déficits neurologiques peuvent être observés. Environ un tiers des patients présente une épilepsie [36, 37].

### 5.2. Radiologique

Au scanner, les glioblastomes se présentent typiquement comme des lésions irrégulières de contours, comportant un centre nécrotique hypodense, et une zone périphérique se réhaussant après l'injection du produit de contraste.

L'IRM est la technique d'imagerie de référence pour le diagnostic, le bilan préthérapeutique et le suivi post-thérapeutique. Elle permet globalement de mettre en évidence un processus expansif de taille variable, en iso-hyposignal T1 et hypersignal T2 Flair, avec un œdème périlésionnel [38].

Récemment, de nouvelles techniques ont été mises en œuvre (séquences de diffusion, de perfusion et spectroscopie). Ces séquences, réalisées durant un même temps d'examen, permettent de mieux appréhender l'infiltration cellulaire tumorale, et par là même, délimiter le

plus précisément possible, la zone d'exérèse et le volume cible de la radiothérapie. Les séquences de diffusion, qui permettent d'évaluer le mouvement aléatoire des molécules d'eau dans les tissus, apprécient la cellularité lésionnelle. L'imagerie de perfusion fournit une cartographie du volume sanguin cérébral, et permet une évaluation de l'angiogénèse tumorale. La spectroscopie par résonance magnétique analyse certains métabolites cellulaires tumoraux et permet d'obtenir des informations « métaboliques » corrélées à l'agressivité de la tumeur [38].

## 6. Diagnostic anatomo-pathologique

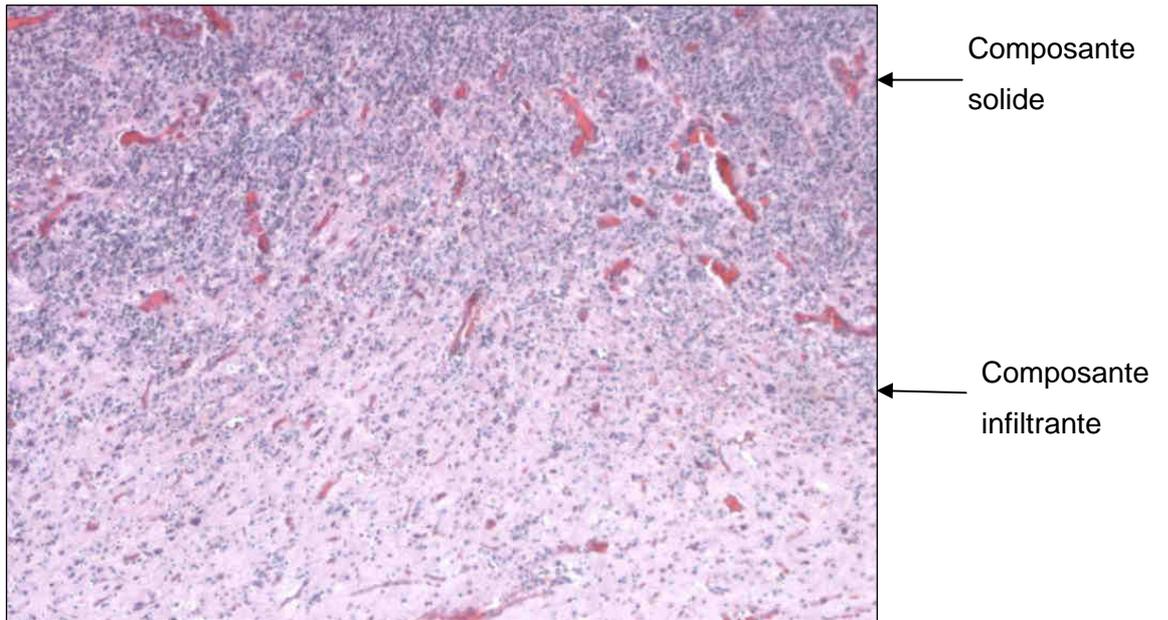
### 6.1. Aspect histologique classique des glioblastomes

Les glioblastomes présentent toujours une structure mixte solide et infiltrante.

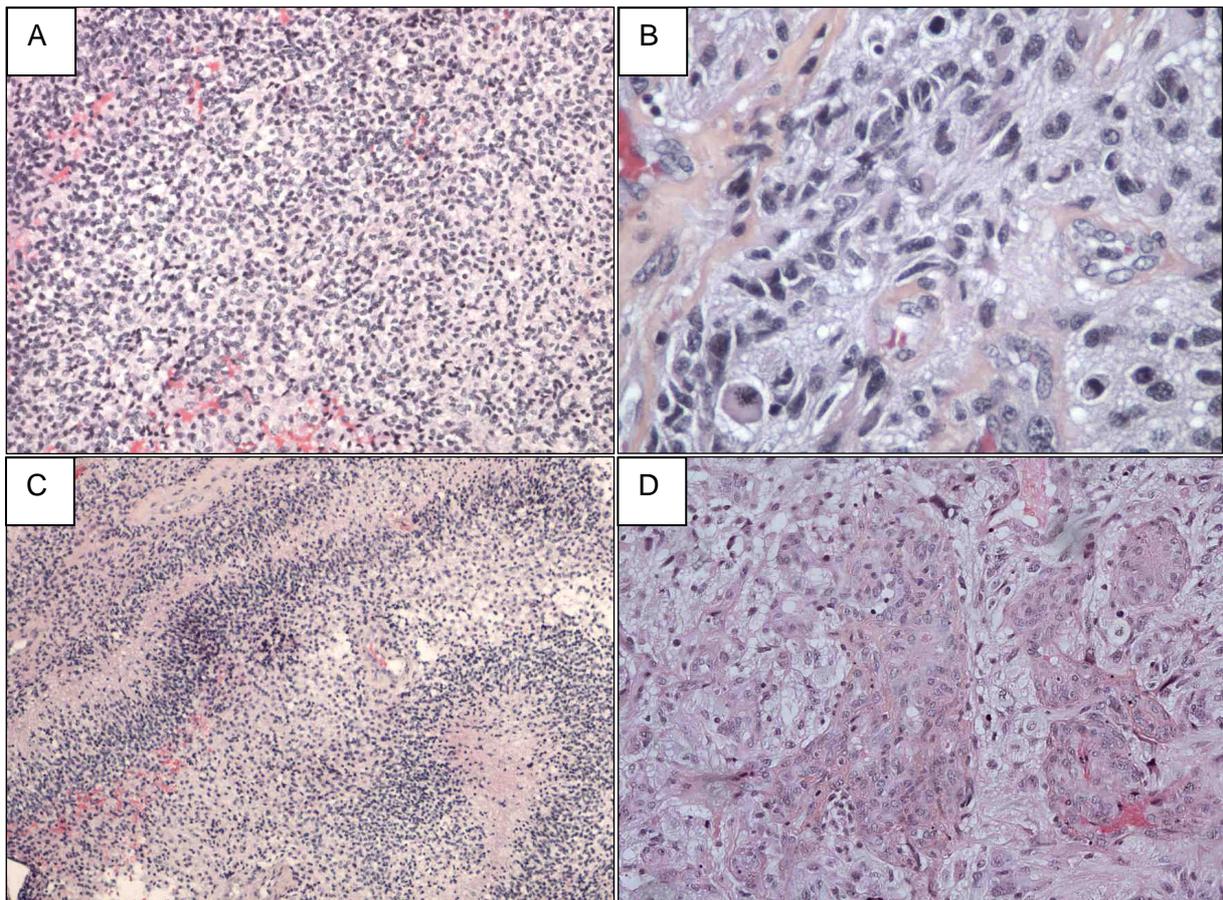
*La composante solide* se caractérise par une densité cellulaire élevée, un polymorphisme cellulaire, des atypies nucléaires marquées et de nombreuses mitoses parfois atypiques. Elle comporte des territoires de nécrose conduisant à l'aspect en cocarde caractéristique des glioblastomes à l'imagerie. Ces foyers de nécrose peuvent être très larges, secondaires à des phénomènes hypoxiques. Il peut également s'agir de micro-foyers de nécrose palissadique. Ceux-ci sont caractéristiques des glioblastomes et sont représentés par de petits foyers de nécrose limités en périphérie par une couronne multicellulaire de cellules ovoïdes d'allure indifférenciées dont certaines sont réduites à des noyaux apoptotiques. Ces foyers peuvent confluer conduisant à un aspect dit « en carte de géographie » [39].

Cette composante cellulaire s'accompagne d'une micro-angiogénèse se traduisant par une prise de contraste à l'imagerie. Cette prolifération micro-vasculaire (également appelée endothélio-capillaire) est définie par une double assise endothéliale sur l'ensemble de la section vasculaire. Il en résulte parfois un aspect dit « gloméruloïde » ainsi qu'une obstruction luminale.

*La composante infiltrante* est constituée de cellules tumorales isolées qui infiltrent le parenchyme adjacent [39].



**Figure 4 : Structure solide et infiltrante d'un glioblastome**



**Figure 5 : Aspects histologiques d'un glioblastome classique**

**A : prolifération tumorale de densité cellulaire élevée.**

**B : Atypies cyto-nucléaires marquées, index mitotique élevé avec mitoses atypiques**

**C : Territoires de nécrose palissadique**

**D : Prolifération endothélio-capillaire réalisant un aspect dit en « touffe gloméruloïde »**

## 6.2. Glioblastomes avec aspect architectural particulier

Ces glioblastomes dont le pronostic ne diffère pas des formes classiques peuvent parfois poser des problèmes de diagnostic différentiel.

### 6.2.1. Glioblastomes à petites cellules

Ces tumeurs se caractérisent par une prolifération monomorphe de petites cellules au rapport nucléocytoplasmique élevé et aux noyaux hyperchromatiques. La GFAP (Protéine Acide Glio-Filamentaire) est peu exprimée [40]. Ces tumeurs doivent être différenciées des oligodendrogliomes anaplasiques, qui présentent en général une expression diffuse et intense de Olig2, et également des tumeurs primitives neuro-ectodermiques (PNET), qui présentent le plus souvent une expression des marqueurs neuronaux [39].

### 6.2.2. Glioblastomes avec composante oligodendrogliale (GBMO)

Les GBMO décrits dans la dernière classification de l'OMS sont définis comme des oligo-astrocytomes (gliomes mixtes) avec nécrose [40].

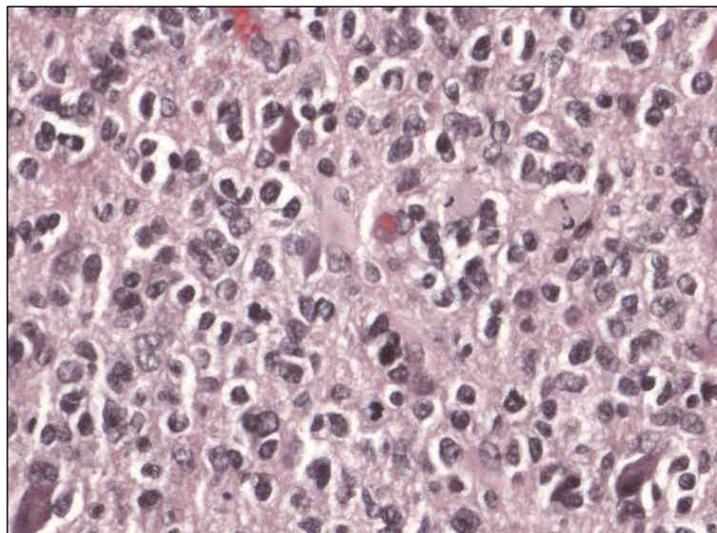


Figure 6 : Composante oligodendrogliale au sein d'un glioblastome.

### 6.2.3. Glioblastomes avec cellules lipidisées

Certains glioblastomes renferment un nombre important de cellules de grande taille parfois multinuclées avec des cytoplasmes surchargés en lipides [41]. Ces tumeurs doivent être distinguées des xanthoastrocytomes pléiomorphes. Ce diagnostic doit être évoqué si la tumeur est superficielle chez un adulte jeune, a fortiori s'il existe des remaniements inflammatoires, des corps granuleux et une trame réticulinique marquée.

### 6.2.4. Glioblastomes avec structures épithéliales hétérologues

Des structures épithéliales adénoïdes ou épidermoïdes, exprimant les kératines sont rarement observées dans les glioblastomes. Le diagnostic différentiel se pose alors avec une métastase d'un carcinome. La positivité, même focale, de la GFAP permet de faire le diagnostic [39].

## 6.3. Les deux sous-types histologiques de glioblastome :

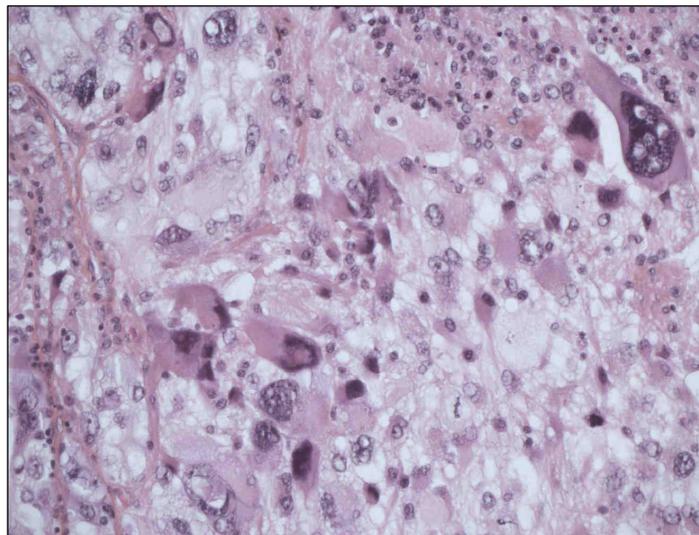
Deux sous-types de glioblastome ont été individualisés par l'OMS car ils sont associés à un comportement biologique et/ou évolutif différent des glioblastomes « classiques ».

### 6.3.1. Gliosarcomes

Ces tumeurs ont un aspect biphasique avec alternance de cellules souvent globuleuses à cytoplasme éosinophile et de cellules plus fusiformes d'aspect mésenchymateux. Les marqueurs gliaux sont souvent exprimés dans les cellules à cytoplasme éosinophiles alors que la vimentine est exprimée par toutes les cellules tumorales. La réticuline et l'alpha-actine musculaire lisse sont exprimées dans les territoires mésenchymateux. Les mitoses, fréquentes, sont observées dans les deux territoires. Les altérations géniques sont similaires dans le contingent glial et mésenchymateux. Malgré un aspect macroscopique trompeur simulant une bonne limitation, le pronostic des gliosarcomes ne diffère pas de celui des glioblastomes classiques. De ce fait, leur individualisation comme variant de glioblastome est discutable [1].

### 6.3.2. Glioblastomes à cellules géantes

Ces tumeurs, de topographie corticale, surviennent essentiellement chez des sujets jeunes. Elles se caractérisent par des cellules de grande taille, pléiomorphes, à noyaux atypiques souvent multiples. Les cytoplasmes présentent des remaniements xanthémateux. Il existe fréquemment une trame réticulinique, qui est sans doute le reflet de l'infiltration méningée. Ces glioblastomes sont classiquement de meilleur pronostic, peut-être du fait d'une exérèse chirurgicale complète plus souvent réalisable par rapport à un glioblastome classique [39].



**Figure 7 : Glioblastome à cellules géantes.**

### 6.4. Marqueurs immunohistochimiques utilisés en routine, d'intérêt diagnostique

Très peu de marqueurs sont utiles au diagnostic devant un aspect histologique classique de glioblastome. Pour confirmer l'origine astrocytaire de la lésion, il peut cependant être utile de réaliser une GFAP qui est constamment exprimée par les glioblastomes. L'expression de la GFAP est variable en intensité d'une cellule tumorale à l'autre avec parfois des aspects de « dégradés » caractéristiques [42].

## 7. Les principales altérations génétiques observées dans les glioblastomes

Les principales altérations génétiques observées dans les glioblastomes ont pour cible le cycle cellulaire et les voies de transmission du signal. Elles consistent essentiellement en la surexpression de facteurs de croissance, en des mutations « gain de fonction » des récepteurs à activité tyrosine kinase et en des mutations « perte de fonction » de gènes suppresseurs de tumeurs. Par ailleurs, plusieurs types de pertes chromosomiques sont rapportés dans les gliomes mais les gènes impliqués, probablement des gènes suppresseurs de tumeurs ne sont pas encore tous identifiés.

### 7.1. Les altérations de la voie EGFR/PI3K/PTEN/AKT

L'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) aussi appelé HER1 est l'un des quatre membres de la famille HER (Human EGF Receptor). Il appartient à la famille des récepteurs des facteurs de croissance à activité tyrosine kinase. Après fixation de son ligand, l'EGF (Epidermal Growth Factor), le récepteur se dimérise, ce qui conduit à la phosphorylation des résidus tyrosine et permet le recrutement de la phosphatidyl-inositol-3kinase (PI3K). La PI3K permet la phosphorylation du phosphatidyl-inositol-biphosphate (PIP2) en phosphatidylinositol-triphosphate (PIP3), avec pour conséquence l'activation de divers effecteurs dont AKT. AKT phosphoryle de nombreuses cibles pour transmettre des signaux de croissance, de prolifération et de survie [14, 43, 44]. Une de ces cibles est p27, une protéine régulatrice du cycle cellulaire qui inhibe la transition de la phase G1-S. L'activation d'AKT entraîne une diminution du niveau d'expression de p27 menant ainsi à une progression du cycle cellulaire [45].

La protéine PTEN (Phosphatase and tensin homology) possède une activité phosphatase pour le PIP3, pour générer du PIP2 bloquant ainsi directement la voie de signalisation de la PI3K [14].

Les diverses altérations génétiques qui touchent cette voie induisent une activation de la PI3K par différents mécanismes : mutation ou amplification d'*EGFR*, mutation de *PTEN*.

Environ 40% des glioblastomes primaires présentent une amplification du gène *EGFR* [43].

Tous les glioblastomes avec une amplification d'*EGFR* présentent une surexpression associée d'EGFR. Les amplicons d'*EGFR* sont souvent l'objet d'altérations structurales

aboutissant à des glioblastomes exprimant à la fois des EGFR sauvages et des EGFR mutés. Sept variants majeurs mutés de l'EGFR ont été identifiés mais le plus commun dans le glioblastome est le variant III (EGFRvIII). Ce variant est présent dans 20 à 50% des glioblastomes comportant une amplification d'*EGFR*. Il résulte de la délétion des exons 2 à 7 générant une protéine dont le domaine extra-cellulaire est tronqué. Bien qu'incapable de fixer l'EGF, il présente une activité tyrosine kinase constitutivement active [46].

Le gène *PTEN* localisé en 10q23 est muté dans environ 25% des glioblastomes primaires. Il s'agit de mutation faux-sens ou non-sens, de délétions ou d'insertions de codons stop menant à la traduction d'une protéine tronquée.

### 7.2. Les altérations de la voie p16<sup>INK4A</sup> /RB1 /CDK4

La protéine RB1 (Rétinoblastome 1) contrôle la progression de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire. Sa phosphorylation par le complexe CDK4/Cycline D1 libère le facteur de transcription E2F, permettant l'expression de gènes importants pour l'entrée en phase S.

La protéine p16<sup>INK4A</sup> dont le gène est situé sur le locus *CDKN2A* en 9p21, est une protéine inhibitrice des CDK. En se liant à CDK4, elle empêche la formation du complexe CDK4/Cycline D1, inhibant ainsi la progression G1→S.

Des altérations de la voie p16<sup>INK4A</sup> / RB1 /CDK4 ont été rapportées dans 78% des glioblastomes. Les plus fréquentes sont des délétions homozygotes ou des mutations du gène *p16<sup>INK4</sup>*. Les délétions homozygotes ou les mutations du gène *RB1* sont beaucoup plus rares. Cependant, *RB1* peut également être inactivé suite à une méthylation de son promoteur. Une méthylation du promoteur de *CDKN2A/P16<sup>INK4A</sup>* est également fréquente [14, 44].

### 7.3. Les altérations de la voie TP53/MDM2/p14<sup>ARF</sup>

Le gène *TP53* (localisé sur le chromosome 17p13.1) code pour une protéine de 53 kDa (P53) qui intervient dans divers processus cellulaires tels que la mort cellulaire, le contrôle du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et la différenciation cellulaire. Après un dommage de l'ADN, P53 induit la transcription de gènes comme *p21*, qui inhibe la transition de la phase G1 à la phase S. L'expression de P53 est contrôlée par le gène *MDM2* (*Murine Double Minute 2*) qui peut stimuler sa dégradation. Inversement, P53 peut induire la transcription de *MDM2*. Le gène *p14<sup>ARF</sup>* (également situé sur le locus *CDKN2A*) code une protéine qui se lie

à MDM2 et inhibe la dégradation de P53 médiée par MDM2. Inversement, l'expression de p14<sup>ARF</sup> est négativement régulée par P53. Ainsi, la perte de fonction de P53 peut résulter de l'altération de l'expression des gènes *TP53*, *MDM2* et *p14<sup>ARF</sup>* [14, 44] .

Moins de 30% des glioblastomes primaires présentent une mutation de *TP53*. La mutation induit la production d'une protéine P53 anormale, présentant une demi-vie allongée. L'accumulation anormale de la protéine P53 mutante dans le noyau devient alors détectable en immunohistochimie.

L'amplification de *MDM2* est observée dans moins de 10% des glioblastomes, et exclusivement dans les glioblastomes primaires sans mutation de *TP53*. La perte d'expression de p14<sup>ARF</sup> est fréquente dans les glioblastomes et est corrélée soit avec une délétion homozygote, soit avec une méthylation du promoteur du gène *p14<sup>ARF</sup>*.

#### 7.4. La perte d'hétérozygotie du chromosome 10 (LOH10)

La LOH10q est la plus fréquente des altérations génétiques survenant dans les glioblastomes primaires et secondaires avec une fréquence similaire (60 à 80% des cas), mais avec des profils de perte alléliques différents. La perte entière du chromosome 10 est typique du glioblastome primaire tandis que la LOH partielle au niveau 10q est caractéristique du glioblastome secondaire. Différentes études ont identifiées au moins trois loci fréquemment délétés suggérant la présence à ce niveau de gènes suppresseurs de tumeur. Il s'agit des régions 10p14-p15, 10q23-24 (PTEN) et 10q25-qter [14].

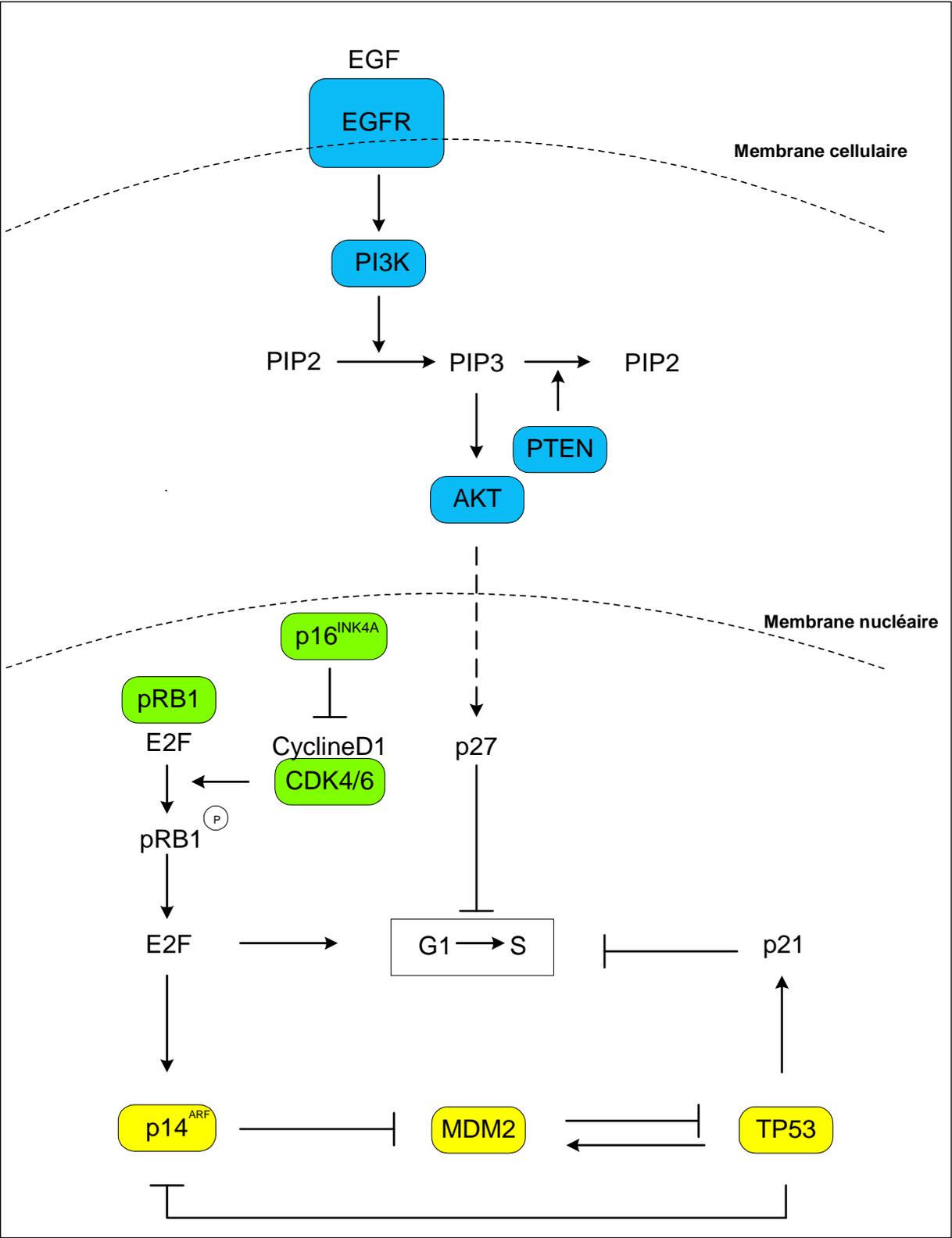


Figure 8 : Schéma simplifié des 3 principales voies moléculaires altérées dans les glioblastomes. En bleu, la voie EGFR/PI3K/PTEN/AKT, en vert la voie p16/RB1/CKK4, en jaune la voie TP53/MDM2/p14.

## 8. Facteurs pronostiques

### 8.1. Facteurs pronostiques cliniques

#### 8.1.1. Age

L'âge est le facteur pronostique le plus fréquemment cité dans la plupart des études concernant les gliomes de haut grade, quelque soit le sous-type histologique [13, 47, 48]. Il s'agit d'un facteur pronostic indépendant dans les analyses multivariées. Dans les glioblastomes, le seuil considéré comme péjoratif varie en fonction des études (le plus souvent 60 ans). Mais il semble bien que l'âge soit corrélé de manière linéaire au pronostic, qui est de plus en plus péjoratif au fur et à mesure que l'âge augmente [13].

#### 8.1.2. Etat clinique et cognitif

Tous les auteurs s'accordent pour considérer que l'existence d'un déficit neurologique est un facteur péjoratif. Un score fonctionnel de Karnofsky (KPS) supérieur à 70 ou 80 est corrélé à une survie plus longue dans les glioblastomes [13, 47, 48].

#### 8.1.3. Traitement

Plusieurs études rétrospectives ont montré que la survie était corrélée à l'étendue de la résection. Ainsi, dans leur revue rétrospective de 3 études consécutives du RTOG (Radiation Therapy Oncology Group), Simpson *et al.* ont montré que la médiane de survie des patients avec exérèse complète était plus longue (11,3 mois) comparé à celle des patients n'ayant eu qu'une biopsie (6,6 mois) [37, 49]. Par ailleurs, des études plus récentes semblent montrer que le gain de survie apporté par les traitements adjuvants est meilleur lorsque la résection chirurgicale est complète. Dans l'étude de Stupp *et al.* comparant radiothérapie seule versus radio-chimiothérapie concomitante puis chimiothérapie seule par Témazolomide, les analyses stratifiées des résultats ont montré que le gain de survie médian avec la radio-chimiothérapie versus radiothérapie seule était meilleur chez les patients avec une exérèse de leur lésion que ceux avec une biopsie [50, 51].

## 8.2. Facteurs dépendants de la tumeur

### 8.2.1. Histologie

Les glioblastomes à cellules géantes (environ 5% des glioblastomes) ont un pronostic semble-t-il meilleur que celui des autres glioblastomes. Les données sont cependant très limitées [52]. Enfin, certaines études ont suggéré que la présence d'un contingent oligodendrogial était associée à un meilleur pronostic, mais cela n'a pas été confirmé en analyse multivariée ajustée sur l'âge [53].

### 8.2.2. Localisation

La localisation tumorale influe sur l'état neurologique et fonctionnel, et sur la possibilité et la qualité de l'exérèse chirurgicale. Les patients qui ont un glioblastome frontal survivent plus longtemps que ceux qui ont une tumeur temporale ou pariétale (médiane de survie respectivement de 11,4 mois, 9,1 mois et 9,6 mois) [49]

## 8.3. Facteurs pronostiques moléculaires

### 8.3.1. Mutation d'*IDH 1*

En 2008, le séquençage génomique à haut débit de 22 glioblastomes a révélé pour la première fois l'existence de mutations somatiques du gène *IDH1* (*isocitrate deshydrogénase 1*), localisé sur le chromosome 2 [54]. Ces mutations étaient présentes dans 12% des glioblastomes et prédominaient dans les glioblastomes secondaires. Dans plus de 90% des cas, il s'agissait de mutations ponctuelles hétérozygotes de type substitution conduisant au changement d'un résidu arginine en histidine au niveau du codon 132, d'où l'appellation R132H. Ce gène code pour l'isocitrate deshydrogénase 1, une enzyme qui catalyse la décarboxylation oxydative de l'isocitrate en  $\alpha$ -cétoglutarate avec la réduction concomitante de NADP<sup>+</sup> en NADPH (figure 10). Cette enzyme est localisée dans le cytosol et le peroxyosome où elle représente la seule source de NADPH [55]. La production de NADPH est essentielle pour la régénération de glutathion réduit, un puissant antioxydant [56].

Par la suite, plusieurs études de séquençage incluant de larges cohortes de patients ont été réalisées [57–62]. Ces études ont montré (1) qu'il existait cinq autres mutations affectant le

codon 132 et conduisant au remplacement de l'arginine par un autre acide aminé, (2) le caractère exceptionnel des mutations d'*IDH1* dans les tumeurs non gliales (mutations notées dans moins de 10% des leucémies aigües myéloïdes) (3) que ces mutations étaient présentes dans 70 à 80% des gliomes de bas grade et des glioblastomes secondaires mais seulement dans 5% des glioblastomes primaires et (4) que les mutations étaient plus fréquentes chez les sujets jeunes.

Diverses études se sont intéressées aux conséquences biochimiques de ces mutations. Il a d'abord été suggéré qu'*IDH1* était un gène suppresseur de tumeur. La mutation résulterait en une inactivation de l'enzyme par un effet dominant négatif [55, 61, 63]. Cela entraîne une diminution du taux intra-cellulaire d' $\alpha$ -cétoglutarate qui est responsable de la dégradation de l'*Hypoxia- Inducible Factor1* (HIF-1) via une activité propylhydroxylase [55]. L'HIF est un facteur de transcription qui induit l'expression de divers gènes impliqués notamment dans l'angiogénèse et la croissance cellulaire. Dans un second temps, Dang *et al.* ont démontré que la mutation d'*IDH1* résultait en l'acquisition d'une nouvelle activité enzymatique transformant l' $\alpha$ -cétoglutarate en 2 hydroxyglutarate (2-HG) avec la production concomitante de NADP+ [64]. Le 2-HG, considéré comme un « oncométabolite », s'accumule dans la cellule mais son implication dans le processus de cancérogénèse n'est pas encore bien connu.

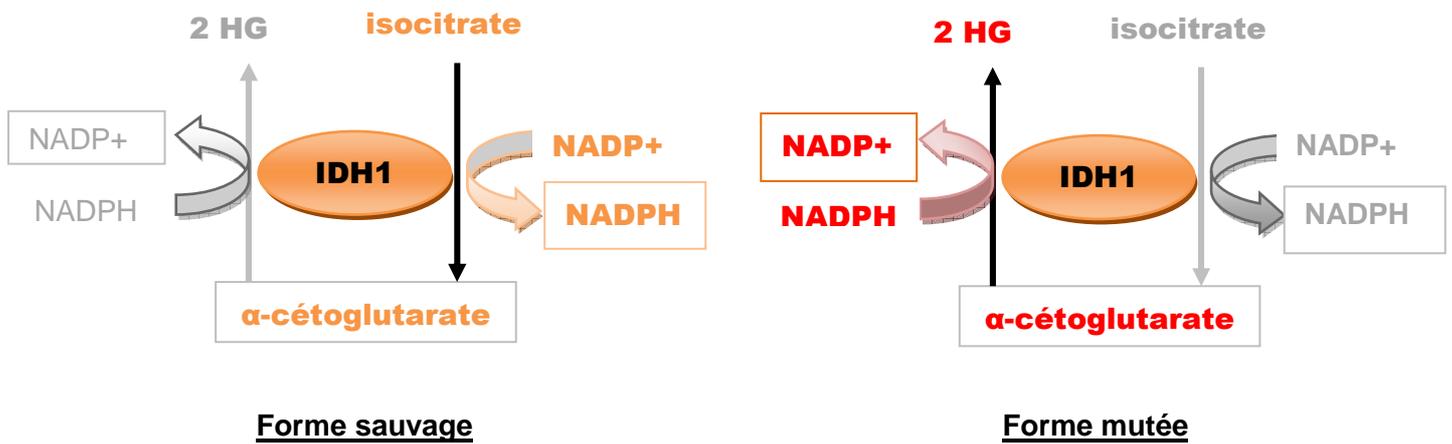


Figure 9 : La mutation d'*IDH1* résulte à la fois en une perte et un gain de fonction enzymatique (modifié d'après [56])

Par ailleurs, la présence de mutations d'*IDH1* est un facteur de bon pronostic, quel que soit le sous-type et le grade histologique. Dans les glioblastomes primaires, la survie médiane des glioblastomes mutés est de 27,4 à 31 mois contre 11.3 à 15 mois pour les glioblastomes non mutés dans les trois principales études rétrospectives actuellement disponibles [59, 61, 65]. Ces données sont confirmées par l'équipe de Weller *et al.* dans une étude prospective du German Glioma Network [47]. Il n'est encore cependant pas bien déterminé si la mutation d'*IDH1* est un marqueur pronostique ou prédictif de réponse au traitement par radiochimiothérapie. Une hypothèse serait que la déplétion en NADPH et donc en glutathion réduit rendrait les cellules tumorales plus sensibles aux effets du stress oxydatif produit par les différentes thérapies [66].

Différentes méthodes d'analyse du statut *IDH1* se sont développées parmi lesquelles le séquençage et la PCR spécifique d'allèle [67]. Un anticorps dirigé spécifiquement contre la mutation la plus fréquemment retrouvée (R132H) a également été mis au point, permettant sa détection par immunohistochimie sur paraffine [68].

### 8.3.2. Méthylation du promoteur de la *MGMT*

Le gène *O*<sup>6</sup>-*MGMT* (*methyl guanine-DNA methyl transferase*), localisé en 10q26, code pour une enzyme clé dans les mécanismes de réparation de l'ADN [69]. Les agents alkylants utilisés en chimiothérapie (comme le Témzolomide) provoquent l'ajout d'un résidu alkyl en position *O*<sup>6</sup> sur les bases guanine. Cet adduit va être à l'origine d'une erreur d'appariement lors de la réplication de l'ADN ainsi méthylé. Le système de réparation des mésappariements va être activé de manière répétitive, entraînant une mort cellulaire par apoptose. L'enzyme *MGMT* répare les lésions causées dans les cellules tumorales par les agents alkylants en transférant sur elle-même ce résidu alkyl. Il faut une molécule de *MGMT* pour retirer un adduit alkyl du brin d'ADN car il se forme une liaison covalente au cours de cette réaction. Cette enzyme est dite « suicide » car durant ce processus, elle subit une altération irréversible et est détruite. Une inhibition de *MGMT* empêche cette réparation et rend la tumeur chimiosensible. La mise sous silence épigénétique du gène par la méthylation d'îlots CpG au niveau de sa région promotrice est associée à une perte d'expression du gène et donc de la protéine *MGMT*. Cette méthylation de la région promotrice de *MGMT* est observée dans environ 45% des glioblastomes [47, 70].

Dans les gliomes de haut grade, la relation entre la méthylation de *MGMT* et la réponse aux agents alkylants a été clairement démontrée dans la littérature. Ainsi, dans une étude prospective randomisée étudiant radiothérapie plus Témzolomide versus radiothérapie seule, la réponse à la chimiothérapie a été étudiée en fonction de la méthylation de *MGMT*

dans 206 glioblastomes. La survie sans progression et la survie globale étaient significativement plus longue en cas de méthylation de *MGMT* [70].

Plusieurs techniques ont été utilisées dans les gliomes pour déterminer le statut de *MGMT* : détection de l'expression de la protéine en immunohistochimie, recherche de la méthylation de la région promotrice du gène par pyroséquençage, MS-PCR (Methylation specific PCR), MethylLight PCR... Chacune de ces techniques comporte des avantages et des inconvénients et bien que la MS-PCR soit actuellement la technique de référence, il n'existe pas encore de consensus sur la meilleure méthode à utiliser.

### 8.3.3. Altération d'*EGFR*

Le caractère pronostique de l'amplification d'*EGFR* ou de la surexpression de la protéine *EGFR* a fait l'objet de controverses, les diverses études montrant des résultats discordants. Récemment, plusieurs travaux ont montré que la valeur pronostique de l'amplification d'*EGFR* était différente en fonction de l'âge [71, 72], ce qui pourrait expliquer au moins partiellement les discordances entre ces travaux.

### 8.3.4. Autres altérations moléculaires

Actuellement, les analyses des autres altérations moléculaires fréquemment rencontrées dans les glioblastomes, incluant les altérations de *TP53*, les délétions de *INK4A/ARF*, les altérations de *PTEN* et la perte d'hétérozygotie du chromosome 10, n'ont pas encore permis d'identifier de marqueurs pronostiques pertinents utilisables en pratique courante [73, 74]

## 9. Traitement

Le traitement standard du glioblastome consiste en une exérèse suivie d'une radio-chimiothérapie concomitante selon le protocole Stupp.

### 9.1. Chirurgie

L'objectif principal de la chirurgie est la résection complète de la lésion. Cependant, celle-ci est impossible à obtenir du fait du caractère infiltratif et parfois de la localisation du glioblastome. La qualité de l'exérèse doit cependant être appréciée. L'exérèse est dite macroscopiquement « complète » lorsque le chirurgien a réséqué tout le tissu tumoral, ou si réalisable, lorsque l'IRM post-opératoire immédiate (dans les 48 heures) avec injection de Gadolinium montre une disparition de toutes les prises de contraste. Si une chirurgie complète est impossible, la réduction du volume tumoral permet une décompression des structures cérébrales et une diminution des symptômes liés à l'hypertension intracrânienne, améliorant ainsi la qualité de vie et prolongeant la survie [75]. Lorsque la chirurgie n'est pas réalisable, du fait de la localisation de la lésion ou de l'état clinique du patient, une biopsie de la lésion doit être réalisée pour confirmer le diagnostic [75].

### 9.2. Radio-chimiothérapie selon le protocole Stupp

Le Témazolomide (TMZ) est un agent alkylant de deuxième génération de la classe des imidotétrazines. L'efficacité du traitement concomitant par radiothérapie et TMZ a été évaluée lors d'un essai thérapeutique de phase III. L'objectif principal de cet essai était de comparer la survie des patients entre radiothérapie avec TMZ concomitant versus radiothérapie seule. Le bras de référence comportait une irradiation de 60 Gray en 30 séances et le bras expérimental recevait la même irradiation, associée à du TMZ 75 mg/m<sup>2</sup> par jour, quotidiennement durant tout le temps de l'irradiation suivi d'un traitement adjuvant après 4 semaines de repos, par 6 cures de TMZ (dose de 150 à 200 mg/m<sup>2</sup> par jour pendant 5 jours, tous les 28 jours). La durée médiane de survie a été de 12.1 mois dans le bras radiothérapie seule versus 14.6 mois dans la bras TMZ-radiothérapie, avec une probabilité globale de survie à 2 ans respectivement de 10.4 et 26.5%. Cet essai randomisé prospectif est le premier à avoir démontré une efficacité significative de la chimiothérapie avec un gain de survie de 2.5 mois en médiane de survie, sans toxicité majeure à court terme [20].

## BUTS DE L'ETUDE

Le glioblastome primaire est la tumeur gliale la plus fréquente et la plus agressive. Son pronostic est effroyable avec une médiane de survie d'environ 8 à 12 mois. Cependant, un faible pourcentage de patients survivent plus de 3 ans. Ces patients sont appelés « long-survivants ». Entre 1997 et 2007, 398 patients ont été traités pour un glioblastome primaire au CHU de Nantes. Le but de notre étude est d'identifier au sein de cette population, une cohorte de patients « long-survivants » afin de déterminer les facteurs histologiques et moléculaires pronostiques de longue survie. Nous avons étudié l'expression des protéines P53 et EGFR, l'amplification du gène *EGFR*, les mutations du gène *IDH1* et la méthylation du promoteur du gène *MGMT*. Nous montrons que cette cohorte particulière de glioblastome est associée à des caractéristiques cliniques et moléculaires spécifiques.

# MATERIEL ET METHODES

## 1. Constitution des cohortes :

Dans un premier temps, nous avons recensé tous les patients pour lesquels un diagnostic de glioblastome primaire avait été réalisé dans le service d'Anatomie Pathologique du CHU de Nantes, entre le 1er janvier 1997 et le 31 décembre 2007 par interrogation de la base de données Diamic selon la codification ADICAP. Nous avons ainsi obtenu une population totale de 398 patients, sur laquelle nous avons recueilli les données cliniques suivantes:

- L'âge au moment du diagnostic,
- Le sexe,
- La latéralité et la localisation de la tumeur (centrale, frontale, temporale, pariéto-occipitale ou multifocale),
- Le type de prise en charge chirurgicale (biopsie ou exérèse),
- L'évolution : date des dernières nouvelles, date du décès et durée totale de survie.

Ces informations ont été relevées dans les dossiers cliniques informatiques des patients. Les données concernant l'évolution des patients ont en partie été recueillies grâce à l'Association du Registre des Cancers de Loire-Atlantique (ARCLA).

Une première analyse statistique a été réalisée afin de déterminer les caractéristiques de cette population totale (1) en terme de survie globale, (2) en terme de facteurs pronostiques cliniques de longue survie. Ainsi, l'analyse multivariée sur la survie globale a mis en évidence le caractère pronostique indépendant de l'âge, du traitement chirurgical (exérèse ou biopsie) et de la localisation (unifocale ou multifocale).

Nous avons ensuite sélectionné au sein de la population totale (n=398) tous les patients dont la survie globale était supérieure ou égale à 36 mois. Nous avons ainsi constitué une cohorte de 25 patients dits « long-survivants ». Cette sous-population a été appariée en 1:1 avec une sous-population de patients « court-survivants » définie par une survie globale strictement inférieure à 36 mois. Les critères d'appariement étaient l'âge, la prise en charge chirurgicale et la localisation. Ce mode d'appariement permettait de s'affranchir des 3 facteurs pronostiques cliniques préalablement établis.

## 1. Etude histologique :

Les lames de ces 50 glioblastomes primaires ont été analysées par deux pathologistes. Une fiche de relecture était établie permettant de confirmer le diagnostic de glioblastome pour chacun de ces cas et d'en préciser le sous-type histologique selon la classification de l'OMS 2007 (cf. annexe 1).

## 2. Etude immunohistochimique :

### 2.1. Protocole d'étude

Pour chacune des 50 tumeurs, un bloc de paraffine représentatif a été sélectionné. L'immunohistochimie a été réalisée grâce à un automate (Dako, Autostainer immunotech a coulter company). Brièvement, des coupes de 4 µm étaient déparaffinées dans deux bains de toluène, puis réhydratées et rincées. Un démasquage antigénique par la chaleur était ensuite effectué dans une solution de tampon adapté. Les peroxydases endogènes étaient inhibées par une solution de peroxyde d'hydrogène. Les coupes étaient alors incubées avec l'anticorps primaire pendant 30 minutes puis rincées. Les anticorps primaires utilisés et leurs caractéristiques sont détaillés dans le tableau 1. La révélation et la détection de l'activité peroxydasique était effectuées grâce à l'aide du kit Dako (Dako Real Detection System, Peroxydase/Diaminobenzidène rabbit/mouse). La contre-coloration était faite avec l'hématoxyline durant deux minutes suivie d'un rinçage à l'eau courante. La déshydratation des lames était ensuite réalisée dans deux bains d'alcool pur puis dans deux bains de toluène. Après montage des lamelles, les lames étaient observées au microscope optique.

Anticorps	Fournisseur	Espèce	Pré-traitement	Dilution
GFAP	Dako	Polyclonal de lapin	Tampon TRS (Target Retrieval Solution+)	1/500 <sup>ème</sup>
P53	Dako	Monoclonal de souris	Tampon EDTA	1/30 <sup>ème</sup>
IDH1	Dianova	Monoclonal de souris	Tampon EDTA	1/40 <sup>ème</sup>
EGFR	Zymed-Invitrogen	Polyclonal de souris	Tampon TRS (Target Retrieval Solution+)	1/20 <sup>ème</sup>

**Tableau 1 : Anticorps primaires utilisés en immunohistochimie (IHC)**

## 2.2. Evaluation du marquage immunohistochimique

- Anticorps anti-GFAP : la GFAP est une protéine du cytosquelette exprimée par les tumeurs astrocytaires. Le marquage était interprété comme positif si les cellules tumorales présentaient un marquage cytoplasmique.

- Anticorps anti-P53 : la mutation du gène *TP53* s'accompagne d'une accumulation nucléaire de la protéine P53 mutée. Le marquage était interprété comme positif si plus de 10% des cellules tumorales présentaient un marquage nucléaire de forte intensité.

- Anticorps anti-IDH1 : cet anticorps reconnaît la mutation majoritaire R132H. Le marquage était interprété comme positif si les cellules tumorales présentaient un marquage cytoplasmique fort et diffus avec un renforcement nucléaire.

- Anticorps anti-EGFR : le marquage est membranaire avec un débordement cytoplasmique. Un score semi-quantitatif était réalisé : 0 : absence de marquage, 1 : marquage de faible intensité et/ou focal, 2 : marquage d'intensité modérée et/ou de moins de 50% de la surface tumorale, 3 : marquage de forte intensité et de plus de 50% de la surface tumorale

Les scores 0 et 1 étaient interprétés comme négatifs et les scores 2 et 3 interprétés comme positifs.

## 3. Recherche de l'amplification d'EGFR par hybridation in situ (SISH/ « *Silver in situ hybridization* »)

Les sondes spécifiques d'EGFR et du chromosome 7 utilisées sont commercialisées par le laboratoire Roche-Ventana. L'hybridation moléculaire et la détection du signal hybridé étaient effectuées sur des lames coupées à 3 µm selon le protocole fourni par le fabricant dans l'automate Ventana (Benchmark XT, Ventana Medical System Inc., Tucson, AZ). Le nombre de noyaux analysés étaient de 100. Une tumeur était dite amplifiée si le rapport EGFR/Chromosome 7 était supérieur ou égal à 2.

## 4. Recherche de la méthylation du promoteur de la *MGMT* par PCR en temps réel

La PCR en temps réel repose sur le même principe que la PCR classique, mis à part l'ajout d'un agent fluorescent intercalant de l'ADN (le SYBR Green), ce qui permet la visualisation de l'amplification par les appareils de PCR. La mesure de la fluorescence à chaque cycle permet la quantification pendant la phase exponentielle de l'amplification. Le résultat est exprimé en Ct (cycle threshold) qui correspond au cycle à partir duquel la fluorescence est significativement supérieure au bruit de fond.

### 4.1. Extraction et bisulfitation de l'ADN

Une lame colorée à l'HES jugée représentative de la tumeur était sélectionnée pour chaque cas. Sur le bloc de paraffine correspondant, deux coupes à 10 µm étaient réalisées et la zone d'intérêt entourée. Après déparaffinage des lames blanches, une solution adaptée (Pinpoint slide DNA isolation system, Zymo Research, CA, USA) était déposée sur la zone d'intérêt pour décoller le tissu puis le découper au scalpel. Le tissu récupéré était ensuite digéré par la protéinase K pendant 4 heures à 55°C. L'ADN extrait était ensuite purifié puis dosé par spectrophotométrie à 260 nm sur Nanodrop® (Thermo Fisher Scientific, Cergy Pontoise, France).

La bisulfitation était réalisée sur 100 ng d'ADN purifié grâce au kit EZ DNA Methylation-GOLD kit (Zymo research, CA, USA). Après conversion, l'ADN était élué dans 15 µl d'eau. La bisulfitation, permet d'obtenir une séquence d'ADN où toutes les cytosines non méthylées sont transformées en uracile, les cytosines méthylées restant inchangées.

Un contrôle positif de méthylation (Abcys S.A., Paris) et un contrôle négatif (ADN de lymphocytes) étaient inclus lors de la bisulfitation puis de la PCR.

#### 4.2. Methylation specific PCR (MS-PCR) en temps réel

Les PCR ont été réalisées sur l'automate MX 3005P (Agilent-Stratagene, Californie, USA). Pour chaque échantillon, 3 PCR étaient réalisées :

- une PCR avec des amorces permettant l'amplification sélective de l'ADN méthylé, reconnaissant ainsi des séquences où les cytosines méthylées situées dans les dinucléotides CG étaient inchangées par rapport à la séquence native.
- une PCR avec des amorces permettant au contraire l'amplification de l'ADN non méthylé, où toutes les cytosines avaient été transformées en uracile.
- une PCR de contrôle avec des amorces permettant d'amplifier une séquence d'actine indépendante de la méthylation.

Type d'amorce	Sens	Séquence (5' à 3')
<i>MGMT</i> non méthylé	Sens	TTTGTGTTTTGATGTTTGTAGGTTTTTGT
	Antisens	AACTCCACACTCTTCCAAAAACAAAACA
<i>MGMT</i> méthylé	Sens	TTTCGACGTTTCGTAGGTTTTTCGC
	Antisens	GCACTCTTCCGAAAACGAAACG
Actine	Sens	TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT
	Antisens	AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA

**Tableau 2 : Amorces utilisées pour la recherche de la méthylation du promoteur de *MGMT* et pour l'amplification d'une séquence d'actine par MS- PCR en temps réel (Sigma aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France).**

Les milieux réactionnels contenaient chacun : 12.5 µl de Master Mix SYBR Green kit Brilliant II (Agilent-Stratagene, Californie, USA), 0.11 µM de chaque amorce de *MGMT* ou 0.2 µM de chaque amorce d'actine, 30nM de ROX, 2 µl d'ADN bisulfite et de l'eau en quantité suffisante pour obtenir un total de 25 µl.

Les conditions de la PCR étaient les suivantes : activation de l'ADN polymérase pendant 10 minutes à 95°C puis 50 cycles d'amplification comportant une étape de dénaturation à 95°C (30 secondes) puis une étape d'hybridation à 63°C (30 secondes) et une étape d'élongation à 72 °C (30 secondes). Pour la PCR actine, 45 cycles étaient suffisants avec une étape d'hybridation à 60°C.

La séquence du promoteur de *MGMT* était considérée comme méthylée si l'amplification survenait avec un Ct inférieur à 50 et que la séquence d'*actine* était amplifiée avec un Ct inférieur à 40.

La spécificité des amorces utilisées en PCR était vérifiée en réalisant à la fin de chaque PCR, des courbes de dissociations sur les amplicons. Lors de la mise au point des PCR, une électrophorèse des produits de PCR sur gel d'agarose avait été faite pour vérifier la taille des amplicons.

## 5. Recherche des mutations IDH1 en biologie moléculaire

Pour chaque cas, la mutation d'*IDH1* a été recherchée en biologie moléculaire par deux techniques : PCR spécifique d'allèle et séquençage. La technique de PCR spécifique d'allèle en temps réel permet la recherche de la mutation R132H majoritaire, et de comparer les résultats avec la technique immunohistochimique réalisée en parallèle. Le séquençage permet de dépister toutes les mutations du gène *IDH1*.

### 5.1. Extraction d'ADN

Une lame colorée à l'HES jugée représentative de la tumeur était sélectionnée pour chaque cas. Sur le bloc de paraffine correspondant, deux coupes à 10 µm étaient réalisées et la zone d'intérêt entourée. Après déparaffinage des lames blanches, 200 µl d'un tampon de lyse était déposé sur les lames puis la zone d'intérêt était découpée au scalpel. Le tissu récupéré était ensuite digéré par la protéinase K pendant toute une nuit à 56°C. L'extraction de l'ADN était réalisée sur l'automate iPrep2 (Invitrogen, Life Technologies SAS, Villebon sur Yvette, France). Enfin l'ADN extrait était dosé par spectrophotométrie à 260 nm sur Nanodrop® (Thermo Fisher Scientific, Cergy Pointoise, France).

### 5.2. PCR spécifique d'allèle en temps réel

Les PCR ont été réalisées sur l'appareil Rotorgene 2000 (Qiagen, Courtaboeuf, France). Dans le cadre d'une PCR classique, les amorces de PCR sont totalement appariées à la séquence d'intérêt à amplifier. Le principe de la PCR spécifique d'allèle est basé sur le fait qu'un mésappariement à l'extrémité 3' d'une amorce de PCR réduit d'environ 100 fois le rendement de la PCR. Ainsi, si l'on modifie le nucléotide terminal de l'amorce de PCR, l'élongation n'a pas lieu (Figure 10).

Pour chaque échantillon, 2 PCR ont été réalisées utilisant toujours la même amorce 3' (antisens), et avec dans chaque réaction une amorce 5' (sens) spécifique d'un nucléotide particulier :

- une PCR avec l'amorce 5' (sens) IDH1 R132 (sauvage) et avec l'amorce 3' (antisens) IDH1 AS servant de contrôle positif d'amplification pour la recherche de la mutation R132H.
- une PCR avec l'amorce 5' (sens) IDH1 R132H (muté) et avec l'amorce 3' (antisens) IDH1 AS permettant de rechercher la mutation sur la deuxième base du codon 132 (R132H).

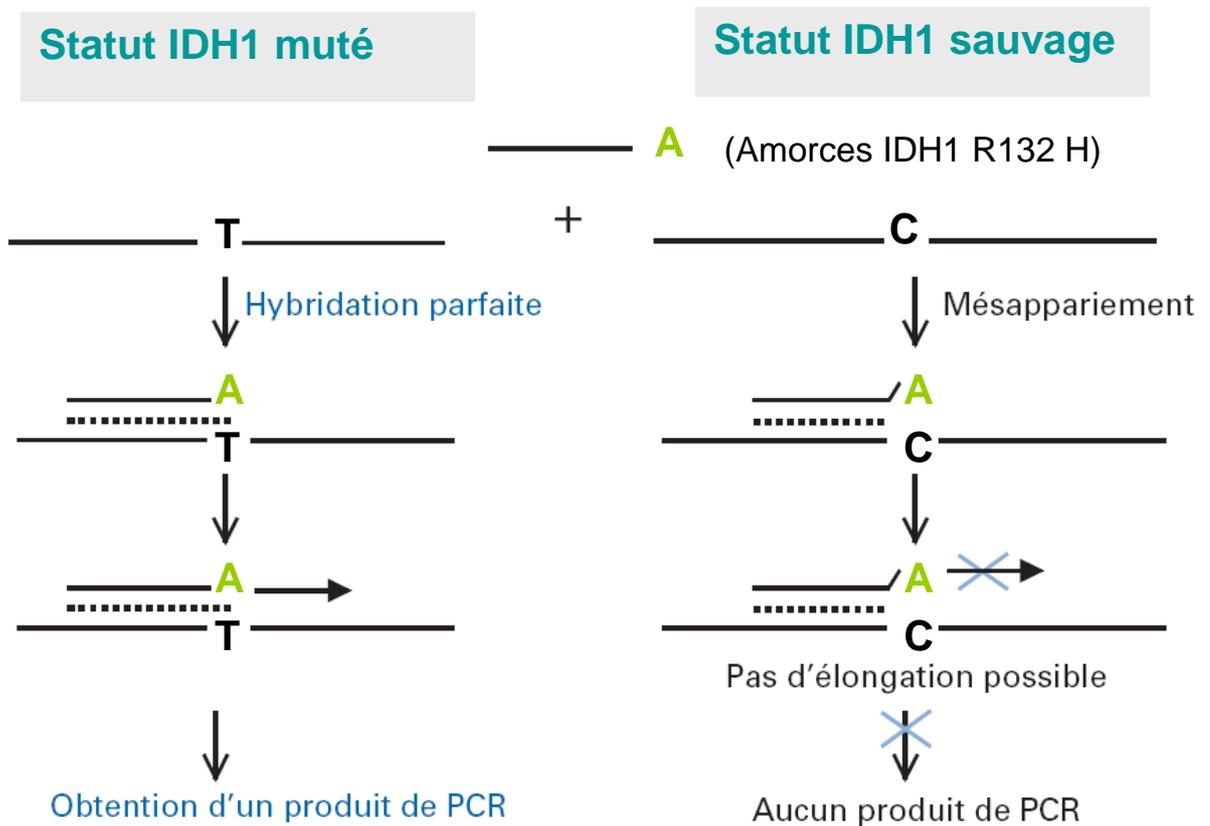


Figure 10 : Principe de la PCR spécifique d'allèle

Amorce	Sens	Séquence (5' à 3')	Mutation spécifique
IDH1 R132	sens	GGTAAAACCTATCATCATAGGTCG	Sauvage
IDH1 R132H	Sens	GGTAAAACCTATCATCATAGGTCA	R132 H
IDH1 AS	Antisens	CACATACAAGTTGGAAATTTCTGG	

**Tableau 3 : Amorces utilisées pour la mise en évidence de la mutation R132H sur le gène IDH1 par PCR spécifique d'allèle en temps réel (Sigma aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France)**

Le milieu réactionnel contenait 10 µl de Mix SYBR Green LC480 (Roche Diagnostics, Meylan, France), 0.5 µl de chaque amorce (10 µM) et 9 µl d'ADN. Les conditions de la PCR étaient les suivantes : activation de l'ADN polymérase pendant 10 minutes à 95°C puis 45 cycles d'amplification comportant une étape de dénaturation à 95°C (10 secondes) puis une étape d'hybridation à 63°C (15 secondes) et une étape d'élongation à 72 °C (20 secondes).

### 5.3. Séquençage

Le principe du séquençage est de réaliser, à partir d'un point fixe (l'amorce), des copies incomplètes d'une molécule d'ADN (la matrice), interrompues au hasard. L'interruption est provoquée par l'incorporation aléatoire lors de la copie, d'un didésoxyribonucléotide couplé à un marqueur fluorescent, qui bloque la réaction de PCR. Comme on travaille sur un très grand nombre de molécule de matrice, on obtient toutes les copies partielles possibles. Les différents fragments sont ensuite séparés selon leur taille par électrophorèse capillaire. Le marqueur fluorescent étant différent selon la base, on peut alors identifier le nucléotide au niveau duquel la copie s'est interrompue et reconstituer la succession des nucléotides tout au long de la copie.

Pour notre étude, un fragment de l'exon 4 (de 122 paires de bases) contenant la séquence codant pour le domaine catalytique d'*IDH1*, dont le codon 132 était amplifié grâce à des amorces spécifiques (tableau 4). Le milieu réactionnel et les conditions d'amplification étaient les mêmes que celles précédemment décrites. Les produits de PCR étaient ensuite séquencés selon les conditions standard d'utilisation (Beckman Coulter Genomics, Takeley, UK).

Type d'amorce	Séquence (5' à 3')
Amorce sens	CGGTCTTCAGAGAAGCCATT
Amorce antisens	CACATTATTGCCAACATGAC

**Tableau 4 : Amorces utilisées pour la recherche des mutations du gène IDH1 par séquençage (Sigma aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France)**

## 6. Analyse statistique

Les variables continues ont été décrites par la moyenne, l'écart-type, la médiane et les extrêmes, les variables qualitatives par la fréquence de leurs modalités respectives.

Les groupes d'intérêt ont été comparés :

- par le test de Student (ou de Mann-Whitney si nécessaire) pour les moyennes des variables continues,
- par le test de Chi<sup>2</sup> (ou de Fisher si nécessaire) pour les fréquences des modalités des variables qualitatives.

La survie globale a été définie comme la durée entre la date du premier prélèvement chirurgical (biopsie ou exérèse) et la date du décès, ou si le patient était en vie, la date de fin de suivi fixée au 11/04/2011.

Les courbes de survie ont été calculées selon par la méthode de Kaplan-Meier et comparées grâce au test de logrank ou si nécessaire de Breslow (pour petits effectifs) à l'étape univariée. Les facteurs qui étaient associés avec la survie globale avec un degré de significativité inférieur à 0,15 étaient introduits dans le modèle de régression semi-paramétrique de Cox pour une analyse multivariée.

L'ensemble des tests a été fait selon une formulation bilatérale, avec un degré de significativité fixé à 5%. Les calculs ont été faits grâce au logiciel Stata Special Edition version 10.1 (StataCorp, College Station, Texas 77845 USA).

# RESULTATS

## 1 Etude de la population totale

### 1.1. Données cliniques (tableau 5)

Entre le 1er janvier 1997 et le 31 décembre 2007, 398 patients ont été pris en charge au CHU de Nantes pour un glioblastome primaire. L'âge médian au diagnostic était de 65 ans avec des âges compris entre 20 et 81 ans. Il y avait une légère prédominance masculine avec un *sex ratio* de 1,4 hommes pour 1 femme. La tumeur était multifocale dans 5% des cas. Les localisations lobaires étaient prépondérantes (84%). Les lobes les plus atteints étaient les lobes frontaux et temporaux. Une biopsie était réalisée pour 44% des patients ; l'exérèse de la lésion avait pu être effectuée dans 56% des cas.

Description des données	Population totale (n = 398)
<b>Age au diagnostic (ans)</b>	
Médiane	65
[Min ; Max]	[20; 81]
<b>Sexe – Effectif (%)</b>	
Homme	234 (59%)
Femme	164 (41%)
<b>Latéralité – Effectif (%)</b>	
	(n = 373)
Gauche	196 (53%)
Droite	177 (47%)
<b>Localisation – Effectif (%)</b>	
Multifocal	19 (5%)
Centrale	43 (11%)
Frontale	146 (37%)
Temporale	120 (30%)
Pariétale	61 (15%)
Occipitale	9 (2%)
	336 (84%)
<b>Prise en charge chirurgicale – Effectif (%)</b>	
Biopsie	177 (44%)
Exérèse	221 (56%)

Tableau 5 : Données cliniques de la population totale

## 1.2. Etude de la survie globale (figure 11)

La médiane de survie était de 9 mois (survie comprise entre 0 et 164 mois). Dans notre population, 25 patients (6%) avaient une survie de plus de 36 mois.

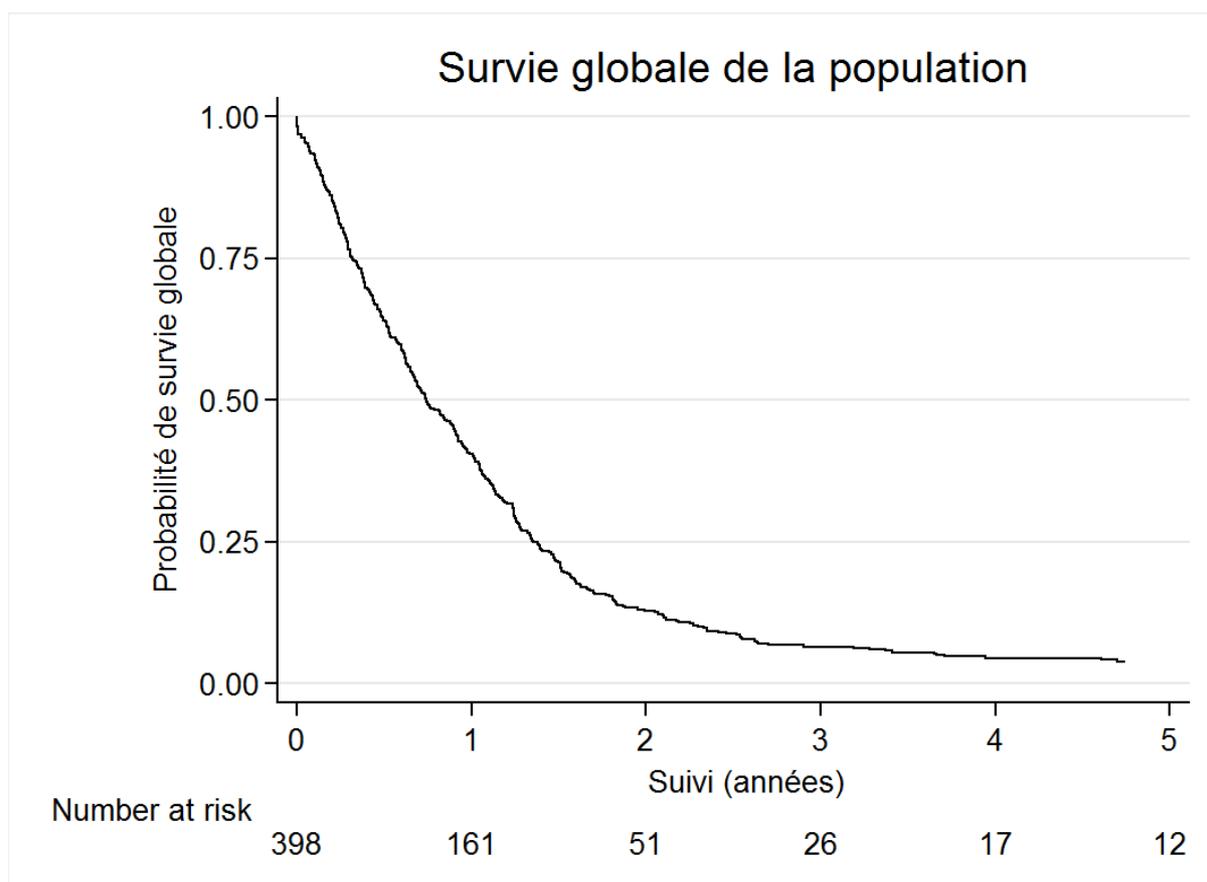


Figure 11 : Courbe de survie globale de la population totale (n = 398)

### 1.3. Etude des facteurs pronostiques de longue survie

#### 1.3.1. Analyse univariée (tableau 13 et figures 18 à 20 en annexe)

Trois paramètres étaient associés à une amélioration de la survie à 36 mois en analyse univariée : l'âge, la localisation lobaire de la lésion et l'exérèse chirurgicale ( $p < 10^{-4}$ ). Il n'existait pas de différence statistiquement significative en terme de survie concernant : le sexe ( $p = 0.506$ ), la latéralité de la lésion ( $p = 0.313$ ) et la localisation frontale de la lésion ( $p = 0.518$ ).

#### 1.3.2. Analyse multivariée (tableau 6)

Du fait de liaisons statistiquement significatives entre ces trois variables (âge, localisation et type de chirurgie), une analyse multivariée a été réalisée. Elle montre que ces trois paramètres sont des facteurs pronostiques indépendants de meilleure survie.

Variable	Hazard Ratio (Intervalle de confiance à 95%)	p
<b>Age</b>	1.02 (1.01-1.029)	$<10^{-4}$
<b>Localisation</b>		
centrale vs lobaire	0.95 (0.67-1.34)	0.786
multifocale vs lobaire	2.34 (1.44-3.81)	0.001
<b>Prise en charge chirurgicale</b>		
exérèse vs biopsie	0.47 (0.37-0.59)	$<10^{-4}$

**Tableau 6 : Analyse des facteurs pronostiques de longue survie par la méthode multivariée du modèle de Cox dans la population totale (n=398).**

## 2. Etude des cohortes « long-survivants » et « court-survivants »

### 2.1. Données cliniques (tableau 7)

La cohorte des 25 patients « long-survivants » était constituée de 10 hommes et 15 femmes (sex ratio de 0.66 homme pour 1 femme). L'âge médian au diagnostic était de 56.7 ans avec des âges compris entre 23.7 et 73 ans. La médiane de survie était de 4.7 ans (survie comprise entre 3.2 et 13.7 ans). Toutes les tumeurs étaient de siège lobaire. Le lobe frontal était atteint dans plus de la moitié des cas (52%). Il n'existait pas de tumeur multifocale. L'exérèse de la lésion avait pu être réalisée dans 80% des cas.

Etant donné les critères d'appariement préalablement établis, il n'existait pas de différence statistiquement significative entre les 2 cohortes en terme d'âge au diagnostic, de localisation et de prise en charge chirurgicale.

Variable	Long-survivants (n = 25)	Court-survivants (n = 25)	p
<b>Survie globale (ans)</b>			
Médiane [min ;max]	4.7 [3.2;13.7]	0.7 [0.1;2.1]	<10 <sup>-4</sup>
<b>Age au diagnostic (ans)</b>			
Moyenne	52.8 +/- 15.1	53.4 +/- 14.2	0.88
Médiane [min ;max]	56.7 [23.7 ; 73]	51.5 [26.8 ; 73]	
<b>Année du diagnostic</b>	2004.1	2004.1	0.95
<b>Sexe</b>			
Homme	10 (40%)	9 (36%)	
Femme	15 (60%)	16 (64%)	1.00
<b>Localisation</b>			
Multifocal	0 (0%)	0 (0%)	
Centrale	0 (0%)	0 (0%)	
Frontale	13 (52%)	13 (52%)	
Temporale	6 (24%)	6 (24%)	
Pariétale	5 (20%)	5 (20%)	
Occipitale	1 (4%)	1 (4%)	1.00
<b>Prise en charge chirurgicale</b>			
Biopsie	5 (20%)	5 (20%)	
Exérèse	20 (80%)	20 (80%)	1.00
Exérèse complète	13 (65%)	16 (80%)	
Exérèse incomplète	7 (35%)	4 (20%)	1.00

**Tableau 7 : Comparaison des données cliniques entre la cohorte « long-survivants » et la cohorte « court-survivants ».**

## 2.2. Analyse du traitement adjuvant reçu

Tous les patients « long-survivants » ont reçu une radiothérapie post-opératoire. Vingt-deux patients (88%) ont également reçu une chimiothérapie. Il s'agissait de Témzolomide selon le protocole Stupp pour 19 d'entre eux, et de Fotémustine pour les 3 autres.

Dans la cohorte « court-survivants », 2 patients n'ont pas reçu de traitement adjuvant. Vingt et un patients (84%) ont été traités par radiothérapie. Parmi ceux-ci, 11 ont reçu du Témzolomide selon le protocole Stupp et 4 patients de la Fotémustine. Deux patients ont été traités par Témzolomide seul, sans radiothérapie.

Le type de traitement adjuvant reçu (traitement standard selon le protocole Stupp versus tout autre type de traitement) différait de façon significative entre les deux cohortes ( $p = 0.03$ ).

## 2.3. Analyse histologique

Parmi les 25 patients « long-survivants », il existait un glioblastome à cellules géantes. Trois glioblastomes comportaient une composante oligodendrogiale significative, associée à des territoires typiques de glioblastome. Tous les autres cas correspondaient à des formes classiques de glioblastome.

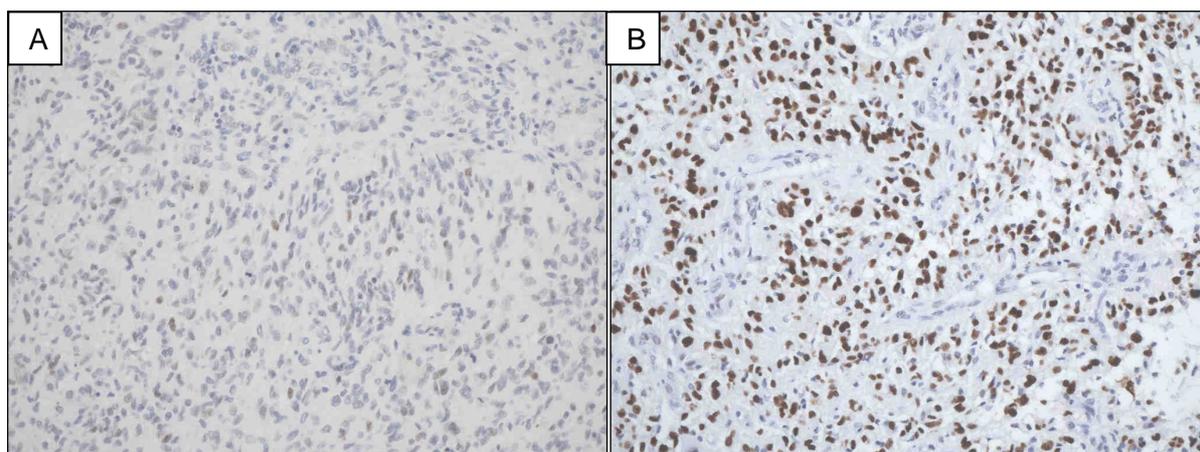
Parmi les patients « court-survivants », il existait 2 glioblastomes à cellules géantes ; tous les autres cas correspondaient à des glioblastomes classiques.

Il n'existait pas de différence statistiquement significative entre les deux cohortes concernant le type histologique. ( $p = 0.414$ ).

## 2.4. Analyse immunohistochimique et moléculaire

### 2.4.1. Surexpression de P53 en immunohistochimie (tableau 8 et figure 12) °

Une surexpression de P53 était observée chez 17 (68%) patients « long-survivants » et chez 14 (56%) patients « court-survivants ». Cette différence était statistiquement non significative ( $p=0.561$ ).



**Figure 12 : Immunomarquage anti-P53 : A : absence de surexpression de P53, B : forte surexpression de P53**

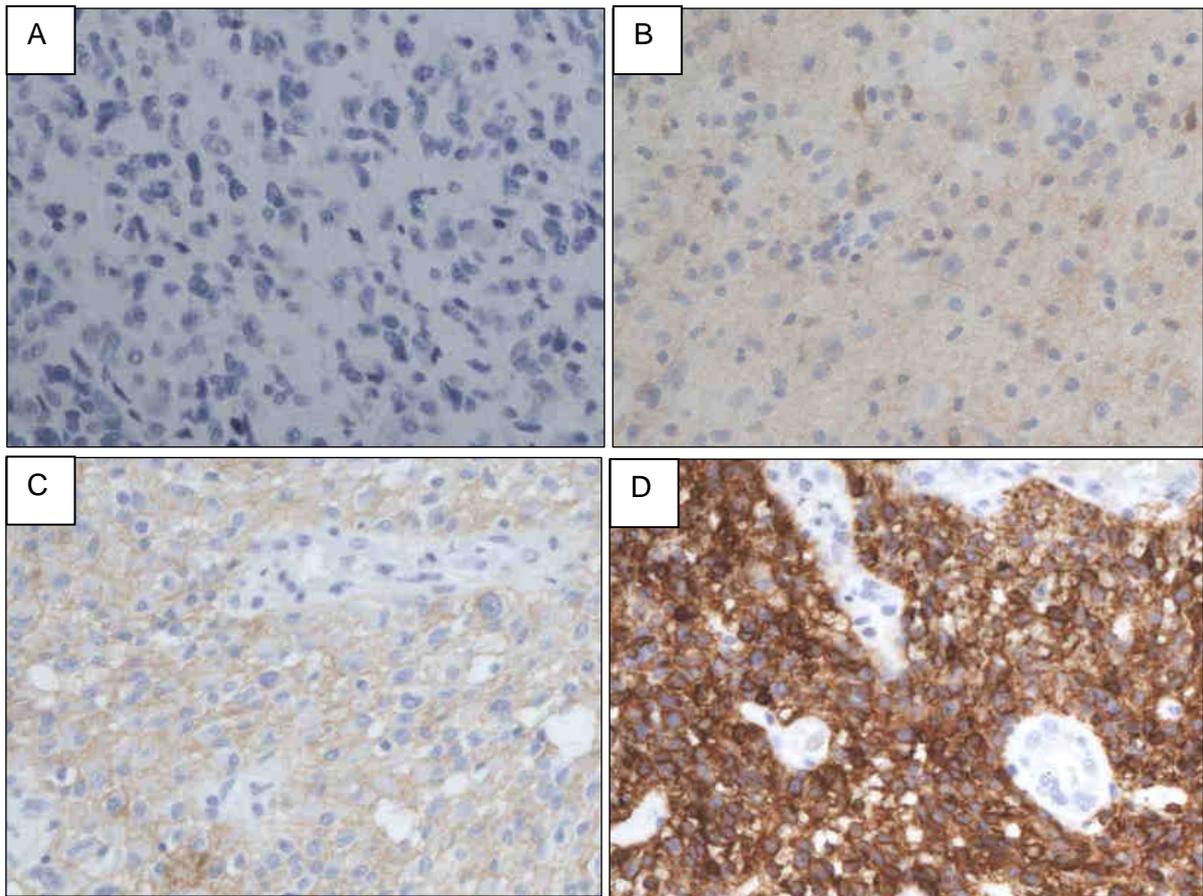
### 2.4.2. Surexpression d'EGFR en immunohistochimie et amplification d'EGFR par SISH (tableau 8 et figure 13-14)

Dans la cohorte des patients « long-survivants » la surexpression d'EGFR en immunohistochimie a pu être réalisée dans 24 des 25 cas et était positive (score 2+ ou 3+) dans 14 de ces cas (58%). Un cas n'a pu être testé en raison de l'épuisement du matériel. Parmi les 25 cas de la cohorte « court-survivants », 17 patients (68%) présentaient un immunomarquage positif.

Par la technique SISH, une amplification du gène *EGFR* était observée chez 32% (8/25) des patients « long-survivants » et chez 37% (9/24) des patients « court-survivants ». Un cas de la cohorte « court-survivants » n'a pu être testé en raison de l'épuisement du matériel.

Il n'existait pas de différence statistiquement significative entre les deux cohortes que ce soit en immunohistochimie ou en SISH.

Les tableaux 14 et 15 (en annexe) montrent qu'il existait une parfaite corrélation entre l'absence de surexpression d'EGFR en immunohistochimie (score 0 et 1) et l'absence d'amplification du gène en SISH. Tous les cas avec une surexpression d'EGFR cotée 3+ présentaient une amplification du gène en SISH, à l'exception d'un cas qui correspondait à une polysomie du chromosome 7. En revanche, sur les 17 cas considérés comme positif en IHC avec un score 2+, seuls 4 présentaient une amplification du gène en SISH.



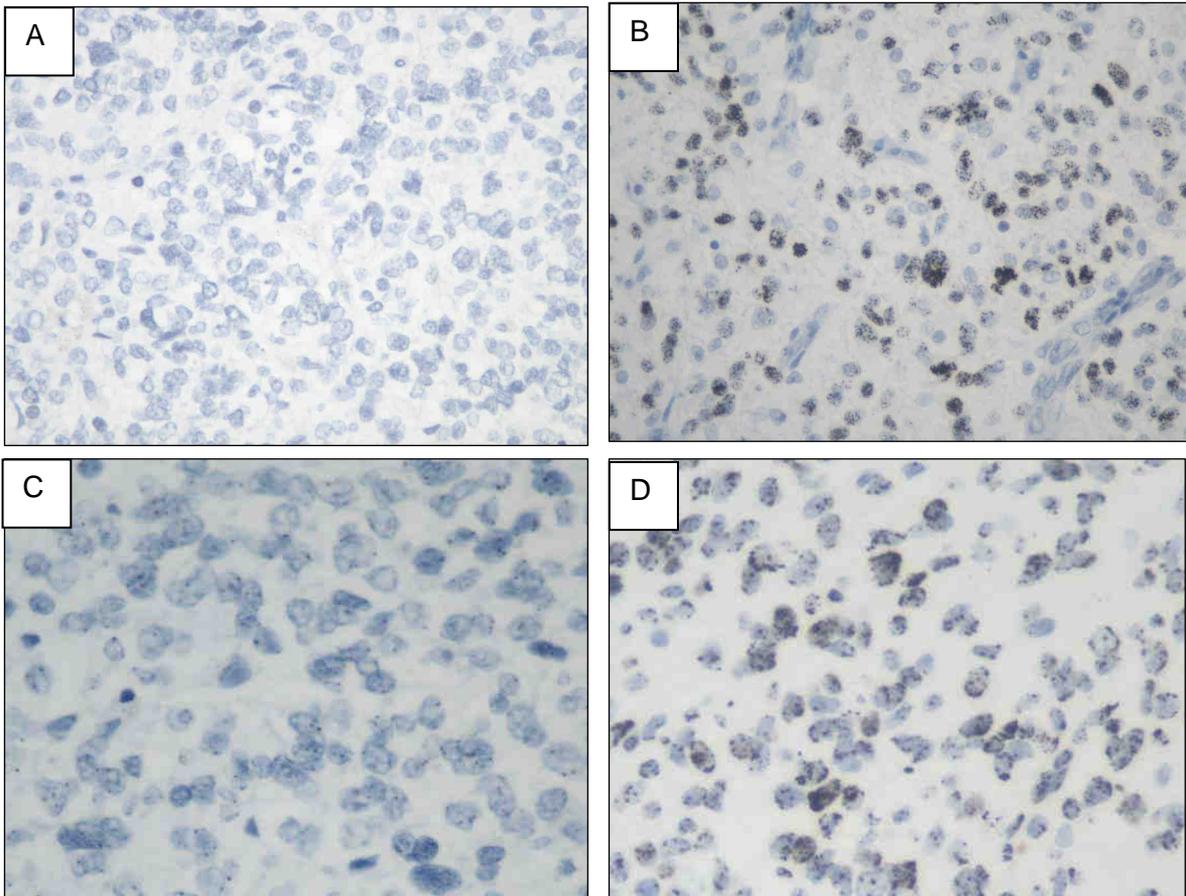
**Figure 13 : Immunomarquage anti-EGFR :**

**A : score 0 (absence de marquage),**

**B : score 1 (marquage de faible intensité),**

**C : score 2 (marquage d'intensité modérée et/ou de moins de 50% de la surface tumorale),**

**D : score 3 (marquage de forte intensité et de plus de 50% de la surface tumorale)**



**Figure 14 : Recherche de l'amplification d'EGFR par technique SISH :**  
**A : absence d'amplification, B : amplification du gène EGFR**  
**C : absence de polysomie du chromosome 7, D : polysomie du chromosome 7.**

### 2.4.3. Mutation d'IDH1 (tableau 8 et figure 15)

Un statut *IDH1* muté était observé chez 7 patients (28%) « long-survivants » et chez 2 patients (8%) « court-survivants ». Cette différence n'était pas statistiquement significative ( $p= 0.138$ ). Les patients présentant une mutation d'*IDH1* étaient en moyenne âgés de 38.7 ans contre 56.2 ans pour les patients non mutés. Toutes les mutations étaient de type R132H. Une parfaite corrélation dans les résultats était notée entre l'immunohistochimie, la PCR spécifique d'allèle et le séquençage (tableaux 14 et 15 en annexe).

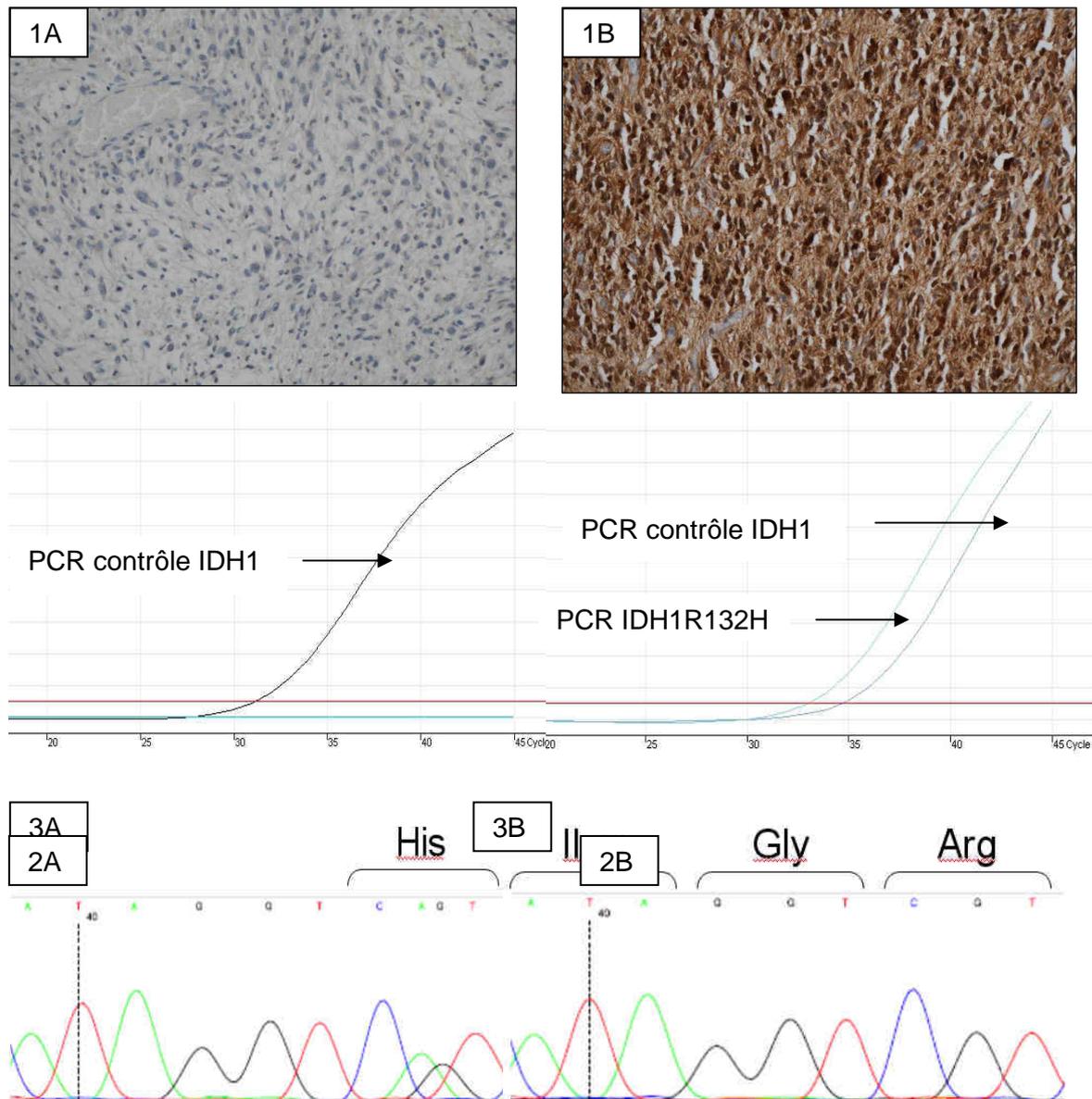


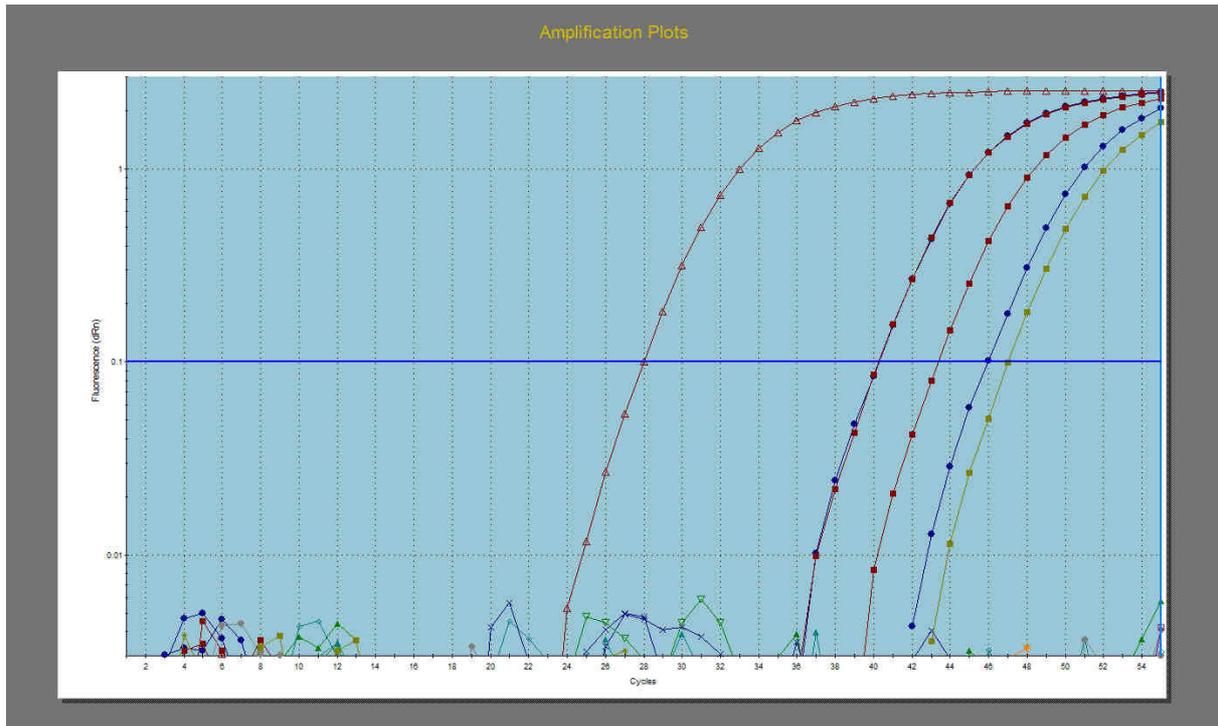
Figure 15 : Recherche de la mutation d'IDH1 selon 3 méthodes :

- 1 par immunohistochimie : A absence d'expression de la protéine mutée, B expression de la protéine IDH1 R132H mutée
- 2 par PCR spécifique d'allèle : A absence de mutation sur le gène *IDH1*, B : mutation R132H sur le gène *IDH1*
- 3 par séquençage : A absence de mutation sur le gène *IDH1*, B : mutation R132H sur le gène *IDH1*

#### 2.4.4. Méthylation du promoteur de *MGMT* (tableau 8 et figure 16)

La méthylation du promoteur de *MGMT* était détectée chez 19 patients (86%) « long-survivants » et chez 6 patients (27%) « court-survivants ». Cette différence était statistiquement significative ( $p < 0.001$ ).

La recherche de la méthylation du promoteur de *MGMT* n'a pas pu être réalisée pour 6 cas, soit en raison de l'épuisement du matériel (2 cas), soit par échec de la technique (4 cas).



**Figure 16 : Exemple de courbes d'amplification (fluorescence en fonction du nombre de cycle). Chaque courbe correspond à un échantillon différent.**

Variable	Long-survivants (n = 25)	Court-survivants (n = 25)	p
<b>Surexpression de P53</b>			
Oui	17 (68%)	14 (56%)	0.561
Non	8 (32%)	11 (44 %)	
<b>Surexpression d'EGFR</b>	(n = 24)		
Oui	14 (58%)	17 (68%)	0.299
Non	10 (42%)	8 (32%)	
<b>Amplification d'EGFR</b>		(n = 24)	
Oui	8 (32%)	9 (37%)	0.686
Non	17 (68%)	15 (63%)	
<b>Mutation d'IDH1</b>			
Oui	7 (28%)	2 (8%)	0.138
Non	18 (72%)	23 (92%)	
<b>Méthylation de MGMT</b>	(n = 22)	(n = 22)	
Oui	19 (86%)	6 (27%)	<0.001
non	3 (14%)	16 (73%)	

Tableau 8 : Comparaison des données moléculaires entre la cohorte "long-survivants" et la cohorte "court-survivants".

### 3. Etude des facteurs pronostiques de longue survie

#### 3.1. Analyse univariée (tableau 9)

En analyse univariée, le traitement selon le protocole Stupp, la mutation d'*IDH1* et la méthylation du promoteur de *MGMT* étaient des facteurs pronostiques significativement associés à une longue survie.

Variable	Hazard Ratio (Intervalle de confiance à 95%)	p
Age	1.02 (0.99-1.04)	0.07
Traitement Stupp	0.45 (0.23-0.87)	0.017
Histologie		
GBMO vs GBM	0.63 (1.49-2.62)	0.521
GBMCG vs GBM	1.69 (0.51-5.55)	0.387
Surexpression de P53	0.59 (0.31-1.15)	0.124
Surexpression d'EGFR	1.45 (0.71-2.98)	0.299
Amplification d'EGFR	1.28 (0.65-2.51)	0.468
Mutation d' <i>IDH1</i>	0.31 (0.11-0.88)	0.028
Méthylation de <i>MGMT</i>	0.33 (0.16-0.66)	0.002

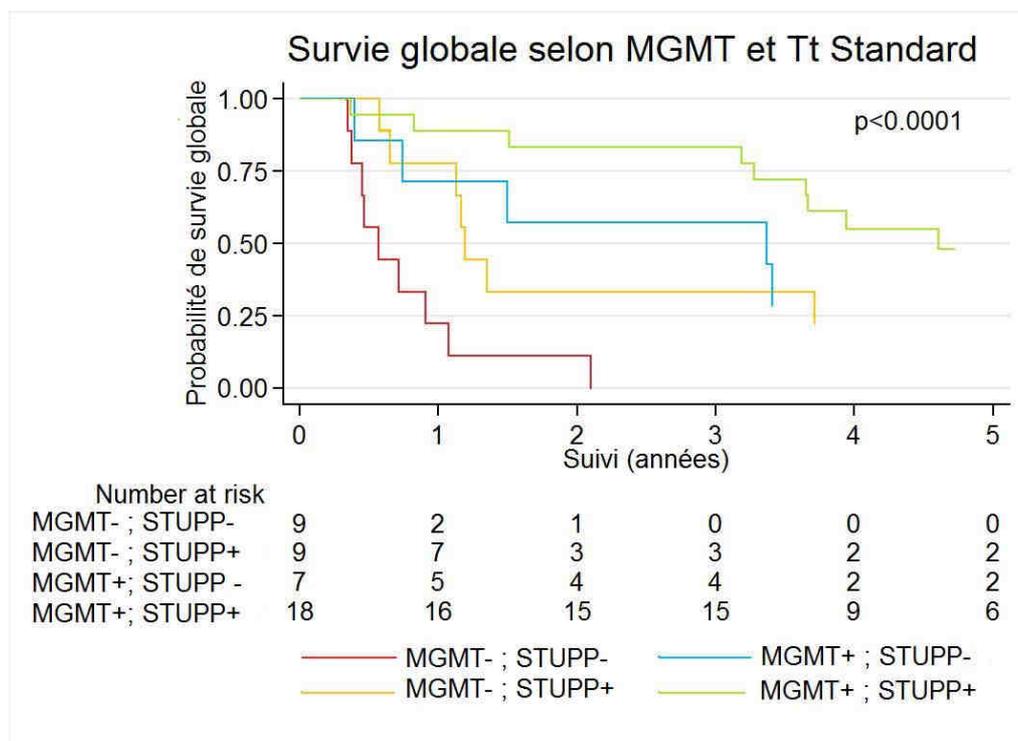
**Tableau 9 : Analyse des facteurs pronostiques de longue survie par la méthode univariée de Kaplan-Meier (n = 50).**

### 3.2. Analyse multivariée (tableau 10 et figure 17)

En analyse multivariée, seuls le traitement selon le protocole Stupp et la méthylation du promoteur de *MGMT* restaient des facteurs pronostiques de meilleure survie significatifs et indépendants.

Variable	Hazard ratio (intervalle de confiance à 95%)	p
Age	1.03 (0.99-1.06)	0.140
Traitement Stupp	0.32 (0.15-0.71)	0.005
Surexpression de P53	0.90 (0.40-2.00)	0.791
Surexpression d'EGFR	1.04 (0.74-1.48)	0.806
Mutation d' <i>IDH1</i>	1.06 (0.21-5.32)	0.944
Méthylation de <i>MGMT</i>	0.27 (0.11-0.65)	0.004

**Tableau 10 : Analyse des facteurs pronostiques de longue survie par la méthode multivariée du modèle de Cox (n = 50).**



**Figure 17 : Survie globale selon le statut de méthylation du promoteur de *MGMT* et le traitement selon protocole Stupp.**

### 3.3. Recherche de liaison entre les marqueurs pronostiques (tableaux 11-12)

L'analyse statistique montrait qu'il existait une liaison significative entre la mutation d'*IDH1* et le caractère méthylé du promoteur de *MGMT*.

Variable	Méthylation de <i>MGMT</i>		Total
	OUI	NON	
<b>Mutation d'<i>IDH1</i></b>	OUI	6	6
	NON	19	38
Total	25	19	44

p = 0.029 (Test de Fisher)

**Tableau 11 : Liaison entre la mutation d'*IDH1* et la méthylation du promoteur de *MGMT*.**

Variable	Traitement Stupp		Total
	OUI	NON	
<b>Mutation d'<i>IDH1</i></b>	OUI	5	9
	NON	25	40
Total	30	19	49

p = 0.720 (Test de Fisher)

**Tableau 12 : Absence de liaison entre la mutation d'*IDH1* et le traitement selon le protocole Stupp.**

## DISCUSSION

Notre étude confirme les principales caractéristiques cliniques des patients atteints de glioblastome primaire. Il s'agit de patients âgés d'environ 65 ans, avec une légère prédominance masculine dont la tumeur est le plus souvent unique et de siège frontal ou temporal. Ces résultats sont tout à fait concordants avec les données issues des registres de surveillance, d'études de population ou d'études institutionnelles [7, 13, 25, 76] La médiane de survie globale de notre population totale, était de 9 mois. D'autres études institutionnelles ont rapporté des médianes de survie, tout type de prise en charge confondu, similaires (9.9 mois dans l'étude de Helseth *et al.*[76], 10.6 mois pour Lacroix *et al.*[77]).

Ce travail confirme également que, bien que rare, une longue survie supérieure à 3 ans, est possible. Parmi les 398 patients recensés entre 1997 et 2007, 25 (6.3%) ont survécu plus de 36 mois. Le taux de survie à 3 ans varie selon les auteurs et le type d'étude. Les études de population rapportent des taux entre 1.2 et 2.2% [13, 24]. Ces études sont anciennes, antérieures aux standards thérapeutiques actuels, ce qui explique vraisemblablement ces taux de survie à 3 ans. A contrario, les études institutionnelles comme la nôtre, rapportent des taux beaucoup plus élevés, entre 7 et 14.6% [25], [78–80]. Cependant, certaines de ces études comportent un biais de sélection à l'origine de ces taux élevés de « long-survivants » [78].

Après l'étude de Krex *et al.* (55 patients) et celle de Burton *et al.* (41 patients), notre étude est la plus grande série de patients « long-survivants » pour laquelle une étude moléculaire a été réalisée [2, 23].

L'analyse statistique a permis d'identifier 4 facteurs pronostiques cliniques indépendants de longue survie : l'âge, la localisation lobaire de la lésion, l'exérèse chirurgicale et le traitement adjuvant selon le protocole Stupp.

Un « âge jeune » est le facteur pronostique de longue survie le plus fréquemment cité dans la plupart des études portant sur les glioblastomes [76, 81, 82]. La définition de cet « âge jeune » est cependant variable d'une étude à l'autre, la limite la plus fréquemment citée étant 50 ou 60 ans. De fait, l'âge médian de notre cohorte de patients « long-survivants » (56.7 ans) était significativement plus bas que l'âge médian de la population totale (65 ans). En 2007, Krex *et al.*, ont effectué une revue de tous les cas de patients « long-survivants » parus dans la littérature depuis 1950 et ont montré que l'âge médian des 281 patients publiés était de 36.9 ans, soit près de 20 ans de moins que l'âge médian de notre cohorte

[2]. Ces résultats concernent cependant des études souvent très anciennes ayant très probablement inclus des tumeurs de l'adulte jeune comme le xanthoastrocytome pléiomorphe qui peuvent être confondues avec le glioblastome.

Par ailleurs, 5 patients de notre cohorte « long-survivants » étaient âgés de plus de 65 ans, ce qui suggère qu'un âge supérieur à 65 ans n'exclut pas la possibilité d'une longue survie.

Dans notre étude, le caractère unique de la tumeur était un facteur pronostique de longue survie comparée aux localisations multifocales. Cette donnée est concordante avec les résultats de Pope *et al.* Cette étude a montré que les patients avec des lésions multifocales ou des petites lésions satellites d'un glioblastome avaient une médiane de survie 4.3 fois plus courte que les patients avec une lésion unique [83]. Il existe évidemment un lien entre la possibilité d'une exérèse chirurgicale complète et le caractère unique de la lésion tumorale. Cependant, il faut noter que, dans notre étude, ces deux paramètres étaient des facteurs pronostiques indépendants en analyse multivariée.

Par ailleurs, certains auteurs ont suggéré que la localisation frontale de la tumeur était associée à un meilleur pronostic, sans doute du fait de la possibilité d'une exérèse chirurgicale plus large [49, 84]. Nous n'avons pas mis en évidence une différence de survie statistiquement significative entre la localisation lobaire frontale et les autres localisations lobaires.

Comme dans la plupart des études [25, 48, 85], notre travail montre que les patients ayant eu une résection tumorale (quelle que soit son étendue) ont une survie significativement prolongée par rapport à ceux ayant eu une biopsie de leur lésion. Cependant, il est intéressant de noter que, parmi nos 25 patients « long-survivants », 5 ont eu une biopsie de leur lésion suivie d'un traitement par radio-chimiothérapie. Ceci suggère qu'en l'absence d'une exérèse chirurgicale, une longue survie n'est pas exclue si la biopsie est néanmoins suivie d'un traitement adjuvant. D'autres études ont également rapporté des cas de survie supérieure à 3 ans après biopsie suivie d'un traitement adjuvant comportant de la radiothérapie et/ou de la chimiothérapie à base d'agents alkylants [79, 80, 86].

Le traitement standard consiste en une radiothérapie postopératoire associée à une chimiothérapie par Témzolomide concomitante et adjuvante, selon le protocole Stupp [20]. Dans notre étude, tous les patients « long-survivants » ont eu une radiothérapie adjuvante et tous ceux ayant été traités à partir de 2005 ont reçu le traitement standard selon le protocole Stupp. L'analyse statistique confirme que ce traitement est un facteur pronostique indépendant de longue survie.

Notre étude est originale de part sa méthodologie. En effet, le mode d'appariement de nos deux cohortes permet de s'affranchir des principaux facteurs pronostiques cliniques préalablement établis. Aucune autre étude de patients « long-survivants » portant sur les marqueurs pronostiques moléculaires n'a utilisé cette méthodologie. Certaines études sont purement descriptives, n'étudiant qu'une cohorte de patients « long-survivants » sans possibilité d'établir un lien statistique entre les marqueurs moléculaires et la survie [80, 88]. L'étude de Krex *et al.* portant sur 55 patients « long-survivants » a comparé les caractéristiques de la cohorte à celles d'une population non sélectionnée et non appariée de glioblastome (n = 141) [2]. Seules deux études ont comme la nôtre comparé la cohorte des patients « long-survivants » à une cohorte de patients « court-survivants ». Les critères d'appariement étaient cependant incomplets puisque effectués pour l'une sur l'âge [23], et pour l'autre sur le traitement [78]. Ces deux dernières études ne permettent donc pas de conclure de façon formelle sur la valeur pronostique des biomarqueurs étudiés.

Sur le plan histologique, certaines études ont suggéré que les sous-types de glioblastome à cellules géantes et de glioblastome à composante oligodendrogliale (GBMO) étaient de meilleur pronostic [52, 53]. Dans notre travail, nous n'avons pas montré de lien statistiquement significatif entre sous-type histologique et pronostic. Ceci peut être expliqué par les faibles effectifs de glioblastome à cellules géantes (n=3) et de glioblastome avec composante oligodendrogliale (n=3). La mise en évidence d'une valeur pronostique du sous-type histologique nécessite de plus larges cohortes. Par ailleurs, étant donné la difficulté diagnostique du GBMO, ces cas devraient faire l'objet d'une relecture centralisée.

La surexpression de la protéine P53, détectée par immunohistochimie, témoigne d'une accumulation nucléaire anormale liée à la mutation du gène suppresseur de tumeur *TP53*. Bien que la concordance entre l'expression immunohistochimique de P53 et les mutations de *TP53* soit imparfaite [88], l'anticorps anti-P53 est utilisé en pratique diagnostique courante pour mettre en évidence des mutations du gène *TP53*. Dans notre étude, la surexpression de P53 était plus fréquente dans la cohorte « long-survivants » (68% contre 56% dans la cohorte « court-survivants) mais cette différence n'était pas statistiquement significative. Nos résultats sont concordants avec les données de la littérature. La majorité des études portant sur la survie des glioblastomes en fonction du statut de P53 (mutation du gène ou surexpression de la protéine) n'a pas montré de corrélation significative avec la survie globale [2, 47, 72, 78, 89–91]. Le statut de P53 ne semble donc pas être un facteur pronostic pertinent dans les glioblastomes.

Nous avons étudié la surexpression du récepteur à l'EGF par immunohistochimie. Le taux de surexpression était de 58% dans la cohorte « long-survivants » et de 68% dans la cohorte « court-survivants ». Cette différence était statistiquement non significative. Il n'existait pas non plus de différence statistiquement significative en ce qui concerne le taux d'amplification du gène *EGFR* en SISH entre les 2 cohortes (32% des « long-survivants » et 37% des « court-survivants »). En accord avec la littérature, nous avons trouvé qu'il existait une bonne corrélation entre l'amplification du gène et la surexpression de la protéine [71, 92–94]. Nous n'avons pas mis en évidence de valeur pronostique en ce qui concerne la surexpression ou l'amplification d'*EGFR*. Dans la littérature, le caractère pronostique de la surexpression ou de l'amplification d'*EGFR* fait l'objet de controverses. Dans les premières études portant sur des petites séries de tumeurs astrocytaires de tout grade, l'amplification d'*EGFR* et/ou sa surexpression apparaissaient comme un facteur de mauvais pronostic [95, 96]. Les études suivantes n'intéressant que les glioblastomes et portant sur des effectifs plus importants ou rassemblées en méta-analyse, n'ont pas permis de confirmer cette relation [2, 97, 98]. D'autres travaux ont montré que la valeur pronostique de l'amplification d'*EGFR* ou de sa surexpression était différente en fonction de l'âge : chez les patients jeunes, l'amplification d'*EGFR* ou sa surexpression serait de mauvais pronostic ; inversement, chez les patients âgés de plus de 60 ans, l'amplification d'*EGFR* ou sa surexpression serait de bon pronostic [71, 72, 99, 100]. Ainsi, l'amplification du récepteur à l'EGF n'aurait pas de valeur pronostique en dehors de quelques sous-populations de patients. L'amplification d'*EGFR* est souvent associée à des réarrangements chromosomiques à l'origine de formes tronquées dont la plus fréquente est le variant VIII. Ce variant est délété pour les exons 2 et 7 du domaine extracellulaire, conduisant à une forme constitutivement active sans ligand. L'anticorps que nous avons utilisé reconnaissait les formes sauvage et mutée d'*EGFR* ; nous n'avons donc pas pu rechercher la valeur pronostique de cette forme mutée.

Dans notre étude, un statut méthylé du promoteur de *MGMT* était observé chez 27% des patients « court-survivants » et chez 86% des patients « long-survivants ». Des valeurs proches ont été rapportées dans les autres études de « long-survivants » (78.5% dans l'étude de Baur *et al.* [80], 74% dans l'étude de Krex *et al.* [2], 77.8% dans l'étude de Martinez *et al.* [101], et 83.3% dans l'étude de Das *et al.* [87]). Notre travail montre que la méthylation du promoteur de *MGMT* est un facteur pronostique de longue survie et ce indépendamment du traitement reçu. Diverses études ont rapporté que les patients présentant une méthylation du promoteur de *MGMT* présentaient une meilleure réponse à la chimiothérapie à base d'agents alkylants [70], mais aussi à la radiothérapie [102], et une meilleure survie globale [70, 103]. Nos résultats corroborent donc la valeur pronostique de la

méthylation du promoteur de *MGMT*. Etant donné le caractère rétrospectif de notre étude, le statut méthylé ou non du promoteur de *MGMT* ne permettait pas de prédire la réponse au Témzolomide. Cependant, la méthylation du promoteur de *MGMT* entraînant une réduction des capacités de réparations des dommages de l'ADN induits par les agents alkylants, il était normal de noter que la meilleure survie était observée chez les patients combinant une méthylation du promoteur de *MGMT* et un traitement selon le protocole Stupp.

Nous avons recherché la méthylation du promoteur de *MGMT* par MS-PCR en temps réel. Les résultats étaient interprétables dans 92% des cas. Diverses techniques sur tissu inclus en paraffine sont réalisables pour évaluer ce statut (MS-PCR, pyroséquençage, MethylLight,...). Parmi ces techniques, la MS-PCR reste la technique de référence même si dernièrement, une étude comparant quatre techniques de biologie moléculaire et l'immunohistochimie a montré que le pyroséquençage était la meilleure technique pour prédire la survie globale et la survie sans récurrence dans une population de patients traités selon le protocole Stupp [104]. La recherche d'une perte d'expression de la protéine *MGMT* en immunohistochimie pourrait constituer une alternative rapide et peu coûteuse à ces techniques de biologie moléculaire. Cependant, de nombreux auteurs s'accordent sur l'absence de corrélation entre l'expression de *MGMT* et la méthylation du promoteur. L'immunohistochimie n'est donc pas recommandée actuellement pour évaluer le statut de *MGMT* [104–106]. La recherche du statut de *MGMT* est actuellement utilisée pour stratifier les patients lors de certains essais thérapeutiques. Cependant, étant donné les résultats de notre étude, il nous semble important de réaliser en pratique courante et pour tous les patients atteints de glioblastome, la recherche de la méthylation du promoteur de *MGMT*.

Notre travail est le premier à étudier l'impact pronostique des mutations d'*IDH1* sur une cohorte de patients « long-survivants » atteints de glioblastome primaire. La mutation d'*IDH1* R132H était observée chez 28% des patients « long-survivants » et chez seulement 8% (2 cas) des patients « court-survivants ». Il faut cependant souligner que ces deux patients figuraient parmi les patients les plus jeunes de la cohorte (26.8 et 33.5 ans) et avaient survécu 18 mois. Ces deux patients présentaient donc une survie globale deux fois supérieure à la médiane de survie de la population globale. La mutation d'*IDH1* apparaissait comme un facteur pronostique de longue survie mais uniquement en analyse univariée. Dans le travail prospectif de Weller *et al.* analysant les marqueurs moléculaires pronostiques de survie globale et survie sans progression sur une cohorte de 301 glioblastomes primaires, le taux de mutation d'*IDH1* était de 5.6% et représentait un marqueur de bon pronostic également uniquement en analyse univariée [73]. Hartmann *et al.* ont montré dans leur étude

prospective que les patients avec un astrocytome anaplasique de grade III sans mutation d'*IDH1* présentaient une survie inférieure aux patients atteints d'un glioblastome primaire avec un statut *IDH1* muté. La valeur pronostique de la mutation d'*IDH1* apparaîtrait donc comme supérieure au grade histologique [107]. Comme d'autres études [54, 61] nous avons remarqué que les patients présentant une mutation d'*IDH1* était particulièrement jeune (38.7 ans en moyenne) comparé à ceux ne présentant pas de mutation (56.2 ans en moyenne). Bien qu'exceptionnelle dans les glioblastomes primaires, la mutation d'*IDH1* semble en définir un sous-groupe particulier. De part sa signification pronostique, Il est donc nécessaire de déterminer le statut d'*IDH1* en pratique courante. Nous avons étudié les mutations d'*IDH1* par immunohistochimie, PCR spécifique d'allèle et séquençage. Il a été montré que ces deux premières techniques sont très sensibles pour mettre en évidence la mutation majoritaire R132H [67] En cas de résultat négatif, le séquençage permet de dépister les autres mutations.

Notre étude montre également que la mutation d'*IDH1* R132H est associée statistiquement à la méthylation du promoteur de *MGMT*. Sanson *et al.* ont également noté cette association [59]. En 2010, Noushmehr *et al.* ont montré qu'il existait parmi les gliomes, un sous-ensemble de tumeurs caractérisées par une hyperméthylation d'un grand nombre d'îlots CpG définissant un phénotype hyperméthylé ou G-CIMP (*glioma-CpG-island methylator phenotype*) [108]. Ce type de tumeur était observé chez des patients jeunes, était associé à statut *IDH1* muté et à une survie significativement meilleure. Van den Bent *et al.* ont de plus démontré que la méthylation du promoteur de *MGMT* était associée à ce phénotype hyperméthylé [109]. Le bon pronostic de certains glioblastomes pourrait donc s'expliquer non pas par la mutation d'*IDH1* ou par la méthylation de *MGMT*, mais par l'existence de ce phénotype CIMP.

Plus récemment, des travaux ont démontré que la mutation d'*IDH1* était à l'origine de ce phénotype hyperméthylé [110]. L'hypothèse émise serait que l'accumulation de 2-Hydroxyglutarate secondaire à la mutation d'*IDH1* inhiberait une famille d'enzymes (les dioxygénases alpha-cétoglutarate dépendantes) impliquées dans les processus de méthylation de l'ADN et des histones [111]. La mutation d'*IDH1* pourrait donc être responsable d'une dérégulation de l'expression génique.

En conclusion, notre étude confirme que, bien que le pronostic des glioblastomes soit extrêmement sombre, une longue survie supérieure à 3 ans est possible. Il est essentiel de pouvoir identifier des facteurs pronostiques permettant d'estimer l'espérance de vie d'un

patient atteint de glioblastome. L'estimation de ce pronostic a un impact majeur non seulement sur le projet thérapeutique mais également sur le projet de vie du patient. Parmi les différents biomarqueurs étudiés, la mutation d'*IDH1* et la méthylation du promoteur de *MGMT* sont les plus pertinents. Ces paramètres doivent donc, en complément de l'étude histologique, être déterminés en pratique courante afin de mieux appréhender le pronostic individuel des patients.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] D. N. LOUIS, H. OHGAKI, O. D. WIESTLER, *et al.*, *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC), 2007.
- [2] D. KREX, B. KLINK, C. HARTMANN, *et al.*, Long-term survival with glioblastoma multiforme, *Brain*, vol. 130, n<sup>o</sup>. 10, p. 2596-2606, oct. 2007.
- [3] V. RIGAU, S. ZOUAOUI, H. MATHIEU-DAUDÉ, *et al.*, French Brain Tumor DataBase: 5-Year Histological Results on 25 756 Cases, *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, vol. 21, n<sup>o</sup>. 6, p. 633-644, nov. 2011.
- [4] M. A. MITTLER, B. C. WALTERS, et E. G. STOPA, Observer reliability in histological grading of astrocytoma stereotactic biopsies, *J. Neurosurg.*, vol. 85, n<sup>o</sup>. 6, p. 1091-1094, déc. 1996.
- [5] D. FIGARELLA-BRANGER et C. BOUVIER, Histological classification of human gliomas: state of art and controversies, *Bull Cancer*, vol. 92, n<sup>o</sup>. 4, p. 301-309, avr. 2005.
- [6] P. J. KELLY, C. DAUMAS-DUPOURT, B. W. SCHEITHAUER, *et al.*, Stereotactic histologic correlations of computed tomography- and magnetic resonance imaging-defined abnormalities in patients with glial neoplasms, *Mayo Clin. Proc.*, vol. 62, n<sup>o</sup>. 6, p. 450-459, juin 1987.
- [7] CBTRUS, Statistical report: primary brain tumors in the United States, 2000-2004. Central Brain Tumor Registry of the United States, 2008.
- [8] L. BAUCHET, V. RIGAU, H. MATHIEU-DAUDÉ, *et al.*, French brain tumor data bank: methodology and first results on 10,000 cases, *J. Neurooncol*, vol. 84, n<sup>o</sup>. 2, p. 189-199, sept. 2007.
- [9] V. RIGAU, S. ZOUAOUI, H. MATHIEU-DAUDÉ, *et al.*, French Brain Tumor DataBase: 5-Year Histological Results on 25 756 Cases, *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, vol. 21, n<sup>o</sup>. 6, p. 633-644, nov. 2011.
- [10] A. WÖHRER, T. WALDHÖR, H. HEINZL, *et al.*, The Austrian Brain Tumour Registry: a cooperative way to establish a population-based brain tumour registry, *J. Neurooncol*, vol. 95, n<sup>o</sup>. 3, p. 401-411, déc. 2009.
- [11] S. ELIA-PASQUET, D. PROVOST, A. JAFFRÉ, *et al.*, Incidence of central nervous system tumors in Gironde, France, *Neuroepidemiology*, vol. 23, n<sup>o</sup>. 3, p. 110-117, juin 2004.
- [12] H. J. SCHERER, A critical review□: the pathology of cerebral glioma, *J Neurol Psychiatry*, vol. 3, n<sup>o</sup>. 2, p. 147-177, avr. 1940.

- [13] H. OHGAKI, P. DESSEN, B. JOURDE, *et al.*, Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study, *Cancer Res*, vol. 64, n<sup>o</sup>. 19, p. 6892-6899, oct. 2004.
- [14] H. OHGAKI et P. KLEIHUES, Genetic Pathways to Primary and Secondary Glioblastoma, *Am J Pathol*, vol. 170, n<sup>o</sup>. 5, p. 1445-1453, mai 2007.
- [15] H. OHGAKI et P. KLEIHUES, Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas, *J. Neuropathol. Exp. Neurol*, vol. 64, n<sup>o</sup>. 6, p. 479-489, juin 2005.
- [16] I. BALDI, A. HUCHET, L. BAUCHET, *et al.*, Epidemiology of glioblastoma, *Neurochirurgie*, vol. 56, n<sup>o</sup>. 6, p. 433-440, déc. 2010.
- [17] S. HOFFMAN, J. M. PROPP, et B. J. MCCARTHY, Temporal trends in incidence of primary brain tumors in the United States, 1985–1999, *Neuro-oncol*, vol. 8, n<sup>o</sup>. 1, p. 27-37, janv. 2006.
- [18] L. BAUCHET, H. MATHIEU-DAUDÉ, P. FABBRO-PERAY, *et al.*, Oncological patterns of care and outcome for 952 patients with newly diagnosed glioblastoma in 2004, *Neuro-oncology*, avr. 2010.
- [19] M. BROWN, R. SCHROT, K. BAUER, *et al.*, Incidence of first primary central nervous system tumors in California, 2001–2005, *J Neurooncol*, vol. 94, n<sup>o</sup>. 2, p. 249-261, sept. 2009.
- [20] R. STUPP, W. P. MASON, M. J. VAN DEN BENT, *et al.*, Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma, *N. Engl. J. Med*, vol. 352, n<sup>o</sup>. 10, p. 987-996, mars 2005.
- [21] M. MORITA, M. K. ROSENBLUM, M. H. BILSKY, *et al.*, Long-term survivors of glioblastoma multiforme: clinical and molecular characteristics, *J. Neurooncol*, vol. 27, n<sup>o</sup>. 3, p. 259-266, mars 1996.
- [22] M. SALVATI, L. CERVONI, M. ARTICO, *et al.*, Long-term survival in patients with supratentorial glioblastoma, *J. Neurooncol.*, vol. 36, n<sup>o</sup>. 1, p. 61-64, janv. 1998.
- [23] E. C. BURTON, K. R. LAMBORN, P. FORSYTH, *et al.*, Aberrant p53, mdm2, and Proliferation Differ in Glioblastomas from Long-Term Compared with Typical Survivors1, *Clinical Cancer Research*, vol. 8, n<sup>o</sup>. 1, p. 180-187, janv. 2002.
- [24] J. N. SCOTT, N. B. REWCASTLE, P. M. BRASHER, *et al.*, Which glioblastoma multiforme patient will become a long-term survivor? A population-based study, *Ann. Neurol*, vol. 46, n<sup>o</sup>. 2, p. 183-188, août 1999.
- [25] G. FILIPPINI, C. FALCONE, A. BOIARDI, *et al.*, Prognostic factors for survival in 676 consecutive patients with newly diagnosed primary glioblastoma, *Neuro Oncol*, vol. 10, n<sup>o</sup>. 1, p. 79-87, janv. 2008.

- [26] M. WRENSCH, M. LEE, R. MIIKE, *et al.*, Familial and personal medical history of cancer and nervous system conditions among adults with glioma and controls, *Am. J. Epidemiol.*, vol. 145, n<sup>o</sup>. 7, p. 581-593, avr. 1997.
- [27] M. L. BONDY, M. E. SCHEURER, B. MALMER, *et al.*, Brain tumor epidemiology: consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium, *Cancer*, vol. 113, n<sup>o</sup>. 7 Suppl, p. 1953-1968, oct. 2008.
- [28] F. ALMAIRAC, M. FRENAY, et P. PAQUIS, Genetic diseases and glioblastomas, *Neurochirurgie*, vol. 56, n<sup>o</sup>. 6, p. 455-458, déc. 2010.
- [29] B. MALMER, P. ADATTO, G. ARMSTRONG, *et al.*, GLIOGENE an International Consortium to Understand Familial Glioma, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 16, n<sup>o</sup>. 9, p. 1730-1734, sept. 2007.
- [30] H. OHGAKI et P. KLEIHUES, Epidemiology and etiology of gliomas, *Acta Neuropathol*, vol. 109, n<sup>o</sup>. 1, p. 93-108, janv. 2005.
- [31] C. ADAMSON, O. O. KANU, A. I. MEHTA, *et al.*, Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going, *Expert Opin Investig Drugs*, vol. 18, n<sup>o</sup>. 8, p. 1061-1083, août 2009.
- [32] J. P. NEGLIA, A. T. MEADOWS, L. L. ROBISON, *et al.*, Second neoplasms after acute lymphoblastic leukemia in childhood, *N. Engl. J. Med*, vol. 325, n<sup>o</sup>. 19, p. 1330-1336, nov. 1991.
- [33] M. WRENSCH, Y. MINN, T. CHEW, *et al.*, Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature., *Neuro Oncol*, vol. 4, n<sup>o</sup>. 4, p. 278-299, oct. 2002.
- [34] A. AHLBOM, M. FEYCHTING, A. GREEN, *et al.*, Epidemiologic evidence on mobile phones and tumor risk: a review, *Epidemiology*, vol. 20, n<sup>o</sup>. 5, p. 639-652, sept. 2009.
- [35] A. J. SWERDLOW, M. FEYCHTING, A. C. GREEN, *et al.*, Mobile Phones, Brain Tumors, and the Interphone Study: Where Are We Now?, *Environ Health Perspect*, vol. 119, n<sup>o</sup>. 11, p. 1534-1538, nov. 2011.
- [36] J. C. BUCKNER, P. D. BROWN, B. P. O'NEILL, *et al.*, Central nervous system tumors, *Mayo Clin. Proc*, vol. 82, n<sup>o</sup>. 10, p. 1271-1286, oct. 2007.
- [37] A. A. BRANDES, A. TOSONI, E. FRANCESCHI, *et al.*, Glioblastoma in adults, *Crit. Rev. Oncol. Hematol*, vol. 67, n<sup>o</sup>. 2, p. 139-152, août 2008.
- [38] N. MARTIN-DUVERNEUIL, R. GUILLEVIN, et J. CHIRAS, Imaging of gliomas, *Cancer Radiother*, vol. 12, n<sup>o</sup>. 6-7, p. 669-675, nov. 2008.
- [39] D. FIGARELLA-BRANGER, C. BOUVIER, J. MOROCH, *et al.*, Morphological classification of glioblastomas, *Neurochirurgie*, vol. 56, n<sup>o</sup>. 6, p. 459-463, déc. 2010.

- [40] D. N. LOUIS, H. OHGAKI, O. D. WIESTLER, *et al.*, The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System, *Acta Neuropathol*, vol. 114, n<sup>o</sup>. 2, p. 97-109, août 2007.
- [41] J. J. KEPES et L. J. RUBINSTEIN, Malignant gliomas with heavily lipidized (foamy) tumor cells: a report of three cases with immunoperoxidase study, *Cancer*, vol. 47, n<sup>o</sup>. 10, p. 2451-2459, mai 1981.
- [42] C. COLIN, I. VIRARD, N. BAEZA, *et al.*, Relevance of combinatorial profiles of intermediate filaments and transcription factors for glioma histogenesis, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, vol. 33, n<sup>o</sup>. 4, p. 431-439, août 2007.
- [43] H. OHGAKI, Genetic pathways to glioblastomas, *Neuropathology*, vol. 25, n<sup>o</sup>. 1, p. 1-7, mars 2005.
- [44] D. FIGARELLA-BRANGER, C. COLIN, A. TCHOGHANDJIAN, *et al.*, Glioblastomas: gliomagenesis, genetics, angiogenesis, and microenvironment, *Neurochirurgie*, vol. 56, n<sup>o</sup>. 6, p. 441-448, déc. 2010.
- [45] Y. NARITA, M. NAGANE, K. MISHIMA, *et al.*, Mutant epidermal growth factor receptor signaling down-regulates p27 through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in glioblastomas, *Cancer Res*, vol. 62, n<sup>o</sup>. 22, p. 6764-6769, nov. 2002.
- [46] H. K. GAN, A. H. KAYE, et R. B. LUWOR, The EGFRvIII variant in glioblastoma multiforme, *J Clin Neurosci*, vol. 16, n<sup>o</sup>. 6, p. 748-754, juin 2009.
- [47] M. WELLER, J. FELSBERG, C. HARTMANN, *et al.*, Molecular Predictors of Progression-Free and Overall Survival in Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma: A Prospective Translational Study of the German Glioma Network, *Journal of Clinical Oncology*, vol. 27, n<sup>o</sup>. 34, p. 5743-5750, déc. 2009.
- [48] E. R. LAWS, I. F. PARNEY, W. HUANG, *et al.*, Survival following surgery and prognostic factors for recently diagnosed malignant glioma: data from the Glioma Outcomes Project, *J. Neurosurg.*, vol. 99, n<sup>o</sup>. 3, p. 467-473, sept. 2003.
- [49] J. R. SIMPSON, J. HORTON, C. SCOTT, *et al.*, Influence of location and extent of surgical resection on survival of patients with glioblastoma multiforme: results of three consecutive Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) clinical trials, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys*, vol. 26, n<sup>o</sup>. 2, p. 239-244, mai 1993.
- [50] W. STUMMER, M. J. VAN DEN BENT, et M. WESTPHAL, Cytoreductive surgery of glioblastoma as the key to successful adjuvant therapies: new arguments in an old discussion, *Acta Neurochir (Wien)*, vol. 153, n<sup>o</sup>. 6, p. 1211-1218, juin 2011.
- [51] VAN DEN BENT MJ, STUPP R, MASON W, *et al.*, Impact of extent of resection on overall survival in newly-diagnosed glioblastoma after chemo-irradiation with temozolomide: further analysis of EORTC study 26981, *Eur J Cancer*, vol. Suppl 2, p. 134, 2005.

- [52] N. SHINOJIMA, M. KOCHI, J. HAMADA, *et al.*, The influence of sex and the presence of giant cells on postoperative long-term survival in adult patients with supratentorial glioblastoma multiforme, *J. Neurosurg.*, vol. 101, n<sup>o</sup>. 2, p. 219-226, août 2004.
- [53] T. HOMMA, T. FUKUSHIMA, S. VACCARELLA, *et al.*, Correlation among pathology, genotype, and patient outcomes in glioblastoma, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, vol. 65, n<sup>o</sup>. 9, p. 846-854, sept. 2006.
- [54] D. W. PARSONS, S. JONES, X. ZHANG, *et al.*, An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme, *Science*, vol. 321, n<sup>o</sup>. 5897, p. 1807-1812, sept. 2008.
- [55] S. ZHAO, Y. LIN, W. XU, *et al.*, Glioma-Derived Mutations in IDH1 Dominantly Inhibit IDH1 Catalytic Activity and Induce HIF-1 $\alpha$ , *Science*, vol. 324, n<sup>o</sup>. 5924, p. 261-265, avr. 2009.
- [56] M. LABUSSIÈRE, M. SANSON, A. IDBAIH, *et al.*, IDH1 Gene Mutations: A New Paradigm in Glioma Prognosis and Therapy?, *Oncologist*, vol. 15, n<sup>o</sup>. 2, p. 196-199, févr. 2010.
- [57] J. BALSS, J. MEYER, W. MUELLER, *et al.*, Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors, *Acta Neuropathologica*, vol. 116, n<sup>o</sup>. 6, p. 597-602, 2008.
- [58] F. E. BLEEKER, S. LAMBA, S. LEENSTRA, *et al.*, IDH1 mutations at residue p.R132 (IDH1R132) occur frequently in high-grade gliomas but not in other solid tumors, *Human Mutation*, vol. 30, n<sup>o</sup>. 1, p. 7–11, 2009.
- [59] M. SANSON, Y. MARIE, S. PARIS, *et al.*, Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas, *J. Clin. Oncol.*, vol. 27, n<sup>o</sup>. 25, p. 4150-4154, sept. 2009.
- [60] T. WATANABE, S. NOBUSAWA, P. KLEIHUES, *et al.*, IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas, *Am. J. Pathol.*, vol. 174, n<sup>o</sup>. 4, p. 1149-1153, avr. 2009.
- [61] H. YAN, D. W. PARSONS, G. JIN, *et al.*, IDH1 and IDH2 mutations in gliomas, *N. Engl. J. Med.*, vol. 360, n<sup>o</sup>. 8, p. 765-773, févr. 2009.
- [62] M. R. KANG, M. S. KIM, J. E. OH, *et al.*, Mutational analysis of IDH1 codon 132 in glioblastomas and other common cancers, *International Journal of Cancer*, vol. 125, n<sup>o</sup>. 2, p. 353–355, 2009.
- [63] K. ICHIMURA, D. M. PEARSON, S. KOCIALKOWSKI, *et al.*, IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas, *Neuro Oncol*, vol. 11, n<sup>o</sup>. 4, p. 341-347, août 2009.
- [64] L. DANG, D. W. WHITE, S. GROSS, *et al.*, Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate, *Nature*, vol. 465, n<sup>o</sup>. 7300, p. 966, juin 2010.

- [65] S. NOBUSAWA, T. WATANABE, P. KLEIHUES, *et al.*, IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas, *Clin. Cancer Res.*, vol. 15, n<sup>o</sup>. 19, p. 6002-6007, oct. 2009.
- [66] J. ZHU, J. ZUO, Q. XU, *et al.*, Isocitrate dehydrogenase mutations may be a protective mechanism in glioma patients, *Med. Hypotheses*, vol. 76, n<sup>o</sup>. 4, p. 602-603, avr. 2011.
- [67] D. LOUSSOUARN, A.-G. LE LOUPP, J.-S. FRENEL, *et al.*, Comparison of immunohistochemistry, DNA sequencing and allele-specific PCR for the detection of IDH1 mutations in gliomas, *Int. J. Oncol.*, vol. 40, n<sup>o</sup>. 6, p. 2058-2062, juin 2012.
- [68] D. CAPPER, H. ZENTGRAF, J. BALSS, *et al.*, Monoclonal antibody specific for IDH1 R132H mutation, *Acta Neuropathol.*, vol. 118, n<sup>o</sup>. 5, p. 599-601, nov. 2009.
- [69] M. ESTELLER et J. G. HERMAN, Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O6-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer, *Oncogene*, vol. 23, n<sup>o</sup>. 1, p. 1-8, 2004.
- [70] M. E. HEGI, A.-C. DISERENS, T. GORLIA, *et al.*, MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma, *N. Engl. J. Med.*, vol. 352, n<sup>o</sup>. 10, p. 997-1003, mars 2005.
- [71] N. SHINOJIMA, K. TADA, S. SHIRAISHI, *et al.*, Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme, *Cancer Res.*, vol. 63, n<sup>o</sup>. 20, p. 6962-6970, oct. 2003.
- [72] M. L. SIMMONS, K. R. LAMBORN, M. TAKAHASHI, *et al.*, Analysis of complex relationships between age, p53, epidermal growth factor receptor, and survival in glioblastoma patients, *Cancer Res.*, vol. 61, n<sup>o</sup>. 3, p. 1122-1128, févr. 2001.
- [73] M. WELLER, J. FELSBERG, C. HARTMANN, *et al.*, Molecular Predictors of Progression-Free and Overall Survival in Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma: A Prospective Translational Study of the German Glioma Network, *Journal of Clinical Oncology*, vol. 27, n<sup>o</sup>. 34, p. 5743-5750, déc. 2009.
- [74] J.-S. FRENEL, M. BOTTI, D. LOUSSOUARN, *et al.*, Prognostic and predictive factors for gliomas in adults, *Bull Cancer*, vol. 96, n<sup>o</sup>. 4, p. 357-367, avr. 2009.
- [75] P. MENEI et P. METELLUS, Surgical treatment of glioblastomas, *Neurochirurgie*, vol. 56, n<sup>o</sup>. 6, p. 477-482, déc. 2010.
- [76] R. HELSETH, E. HELSETH, T. B. JOHANNESSEN, *et al.*, Overall survival, prognostic factors, and repeated surgery in a consecutive series of 516 patients with glioblastoma multiforme, *Acta Neurol. Scand.*, vol. 122, n<sup>o</sup>. 3, p. 159-167, sept. 2010.
- [77] M. LACROIX, D. ABI-SAID, D. R. FOURNEY, *et al.*, A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival, *J. Neurosurg.*, vol. 95, n<sup>o</sup>. 2, p. 190-198, août 2001.

- [78] Y. SONODA, T. KUMABE, M. WATANABE, *et al.*, Long-term survivors of glioblastoma: clinical features and molecular analysis, *Acta Neurochir (Wien)*, vol. 151, n<sup>o</sup>. 11, p. 1349-1358, nov. 2009.
- [79] A. F. HOTTINGER, H. YOON, L. M. DEANGELIS, *et al.*, Neurological outcome of long-term glioblastoma survivors, *J. Neurooncol.*, vol. 95, n<sup>o</sup>. 3, p. 301-305, déc. 2009.
- [80] M. BAUR, M. PREUSSER, M. PIRIBAUER, *et al.*, Frequent MGMT (O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase) hypermethylation in long-term survivors of glioblastoma: a single institution experience, *Radiol Oncol*, vol. 44, n<sup>o</sup>. 2, p. 113-120, juin 2010.
- [81] R.-O. MIRIMANOFF, T. GORLIA, W. MASON, *et al.*, Radiotherapy and Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma: Recursive Partitioning Analysis of the EORTC 26981/22981-NCIC CE3 Phase III Randomized Trial, *JCO*, vol. 24, n<sup>o</sup>. 16, p. 2563-2569, janv. 2006.
- [82] M. L. SIKER, M. WANG, K. PORTER, *et al.*, Age as an independent prognostic factor in patients with glioblastoma: a Radiation Therapy Oncology Group and American College of Surgeons National Cancer Data Base comparison, *J. Neurooncol.*, vol. 104, n<sup>o</sup>. 1, p. 351-356, août 2011.
- [83] W. B. POPE, J. SAYRE, A. PERLINA, *et al.*, MR imaging correlates of survival in patients with high-grade gliomas, *AJNR Am J Neuroradiol*, vol. 26, n<sup>o</sup>. 10, p. 2466-2474, déc. 2005.
- [84] B. JEREMIC, B. MILICIC, D. GRUJICIC, *et al.*, Clinical prognostic factors in patients with malignant glioma treated with combined modality approach, *Am. J. Clin. Oncol.*, vol. 27, n<sup>o</sup>. 2, p. 195-204, avr. 2004.
- [85] W. STUMMER, H.-J. REULEN, T. MEINEL, *et al.*, Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias, *Neurosurgery*, vol. 62, n<sup>o</sup>. 3, p. 564-576, mars 2008.
- [86] R. E. MCLENDON et E. C. HALPERIN, Is the long-term survival of patients with intracranial glioblastoma multiforme overstated?, *Cancer*, vol. 98, n<sup>o</sup>. 8, p. 1745-1748, oct. 2003.
- [87] P. DAS, T. PURI, P. JHA, *et al.*, A clinicopathological and molecular analysis of glioblastoma multiforme with long-term survival, *J Clin Neurosci*, vol. 18, n<sup>o</sup>. 1, p. 66-70, janv. 2011.
- [88] A. OLAR et K. D. ALDAPE, Biomarkers Classification and Therapeutic Decision-Making for Malignant Gliomas, *Curr Treat Options Oncol*, sept. 2012.
- [89] J. BAXENDINE-JONES, I. CAMPBELL, et D. ELLISON, p53 status has no prognostic significance in glioblastomas treated with radiotherapy, *Clin. Neuropathol.*, vol. 16, n<sup>o</sup>. 6, p. 332-336, déc. 1997.

- [90] A. P. KYRITSIS, M. L. BONDY, K. R. HESS, *et al.*, Prognostic significance of p53 immunoreactivity in patients with glioma, *Clin. Cancer Res.*, vol. 1, n<sup>o</sup>. 12, p. 1617-1622, déc. 1995.
- [91] F. E. BLEEKER, R. J. MOLENAAR, et S. LEENSTRA, Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma, *Journal of Neuro-Oncology*, janv. 2012.
- [92] T. GAISER, A. WAHA, F. MOESSLER, *et al.*, Comparison of automated silver enhanced in situ hybridization and fluorescence in situ hybridization for evaluation of epidermal growth factor receptor status in human glioblastomas, *Mod. Pathol.*, vol. 22, n<sup>o</sup>. 9, p. 1263-1271, sept. 2009.
- [93] B. KIM, J. K. MYUNG, J. H. SEO, *et al.*, The clinicopathologic values of the molecules associated with the main pathogenesis of the glioblastoma, *J. Neurol. Sci.*, vol. 294, n<sup>o</sup>. 1-2, p. 112-118, juill. 2010.
- [94] B. COULIBALY, I. NANNI, B. QUILICHINI, *et al.*, Epidermal growth factor receptor in glioblastomas: correlation between gene copy number and protein expression, *Hum. Pathol.*, vol. 41, n<sup>o</sup>. 6, p. 815-823, juin 2010.
- [95] M. C. ETIENNE, J. L. FORMENTO, C. LEBRUN-FRENAY, *et al.*, Epidermal growth factor receptor and labeling index are independent prognostic factors in glial tumor outcome, *Clin. Cancer Res.*, vol. 4, n<sup>o</sup>. 10, p. 2383-2390, oct. 1998.
- [96] S. H. TORP, E. HELSETH, A. DALEN, *et al.*, Relationships between Ki-67 labelling index, amplification of the epidermal growth factor receptor gene, and prognosis in human glioblastomas, *Acta Neurochir (Wien)*, vol. 117, n<sup>o</sup>. 3-4, p. 182-186, 1992.
- [97] A. L. QUAN, G. H. BARNETT, S.-Y. LEE, *et al.*, Epidermal growth factor receptor amplification does not have prognostic significance in patients with glioblastoma multiforme, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, vol. 63, n<sup>o</sup>. 3, p. 695-703, nov. 2005.
- [98] M. HUNCHAREK et B. KUPELNICK, Epidermal growth factor receptor gene amplification as a prognostic marker in glioblastoma multiforme: results of a meta-analysis, *Oncol. Res.*, vol. 12, n<sup>o</sup>. 2, p. 107-112, 2000.
- [99] T. T. BATCHELOR, R. A. BETENSKY, J. M. ESPOSITO, *et al.*, Age-dependent prognostic effects of genetic alterations in glioblastoma, *Clin. Cancer Res.*, vol. 10, n<sup>o</sup>. 1 Pt 1, p. 228-233, janv. 2004.
- [100] J. S. SMITH, I. TACHIBANA, S. M. PASSE, *et al.*, PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme, *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 93, n<sup>o</sup>. 16, p. 1246-1256, août 2001.
- [101] R. MARTINEZ, G. SCHACKERT, R. YAYA-TUR, *et al.*, Frequent hypermethylation of the DNA repair gene MGMT in long-term survivors of glioblastoma multiforme, *J. Neurooncol.*, vol. 83, n<sup>o</sup>. 1, p. 91-93, mai 2007.

- [102] A. L. RIVERA, C. E. PELLOSKI, M. R. GILBERT, *et al.*, MGMT promoter methylation is predictive of response to radiotherapy and prognostic in the absence of adjuvant alkylating chemotherapy for glioblastoma, *Neuro-oncology*, vol. 12, n<sup>o</sup>. 2, p. 116-121, févr. 2010.
- [103] R. OLSON, P. BRASTIANOS, et D. PALMA, Prognostic and predictive value of epigenetic silencing of MGMT in patients with high grade gliomas: a systematic review and meta-analysis, *Journal of Neuro-Oncology*, vol. 105, n<sup>o</sup>. 2, p. 325-335, 2011.
- [104] V. QUILLIEN, A. LAVENU, L. KARAYAN-TAPON, *et al.*, Comparative assessment of 5 methods (methylation-specific polymerase chain reaction, methylight, pyrosequencing, methylation-sensitive high-resolution melting, and immunohistochemistry) to analyze O6-methylguanine-DNA-methyltransferase in a series of 100 glioblastoma patients, *Cancer*, janv. 2012.
- [105] M. PREUSSER, R. CHARLES JANZER, J. FELSBURG, *et al.*, Anti-O6-methylguanine-methyltransferase (MGMT) immunohistochemistry in glioblastoma multiforme: observer variability and lack of association with patient survival impede its use as clinical biomarker, *Brain Pathol.*, vol. 18, n<sup>o</sup>. 4, p. 520-532, oct. 2008.
- [106] F. J. RODRIGUEZ, S. N. THIBODEAU, R. B. JENKINS, *et al.*, MGMT immunohistochemical expression and promoter methylation in human glioblastoma, *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.*, vol. 16, n<sup>o</sup>. 1, p. 59-65, janv. 2008.
- [107] C. HARTMANN, B. HENTSCHEL, W. WICK, *et al.*, Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas, *Acta Neuropathol.*, vol. 120, n<sup>o</sup>. 6, p. 707-718, déc. 2010.
- [108] H. NOUSHMEHR, D. J. WEISENBERGER, K. DIEFES, *et al.*, Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma, *Cancer Cell*, vol. 17, n<sup>o</sup>. 5, p. 510-522, mai 2010.
- [109] M. J. VAN DEN BENT, L. A. GRAVENDEEL, T. GORLIA, *et al.*, A hypermethylated phenotype is a better predictor of survival than MGMT methylation in anaplastic oligodendroglial brain tumors: a report from EORTC study 26951, *Clin. Cancer Res.*, vol. 17, n<sup>o</sup>. 22, p. 7148-7155, nov. 2011.
- [110] S. TURCAN, D. ROHLE, A. GOENKA, *et al.*, IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype, *Nature*, vol. 483, n<sup>o</sup>. 7390, p. 479-483, mars 2012.
- [111] K. ICHIMURA, Molecular pathogenesis of IDH mutations in gliomas, *Brain Tumor Pathol*, vol. 29, n<sup>o</sup>. 3, p. 131-139, juill. 2012.

# ANNEXES

## FICHE DE RELECTURE

### CARACTERISTIQUES GENERALES DU PRELEVEMENT :

Identité du patient : DDN : / /

Numéro d'enregistrement en ACP :

EXAMEN MACROSCOPIQUE : Exérèse Biopsie

### EXAMEN MICROSCOPIQUE :

Architecture : solide infiltrante les deux

Densité cellulaire : faible modérée élevée

Type histologique : polymorphisme cellulaire monomorphisme cellulaire

Gemistocytes

Cellules fibrillaires

Cellules microkystiques

Cellules d'aspect « oligo »

Cellules géantes multinuclées

### GRADE HISTOPRONOSTIC :

Atypies cytonucléaires : discrètes modérées marquées

Mitoses

Hyperplasie endothéliale

Prolifération microvasculaire (touffes gloméruloïdes)

Nécrose

Palissades périnécrotiques

### AUTRES ELEMENTS :

Vaisseaux ramifiés, endocrinoïdes :

Calcifications :

Manchons lymphocytaires périvasculaires :

### IHC réalisée :

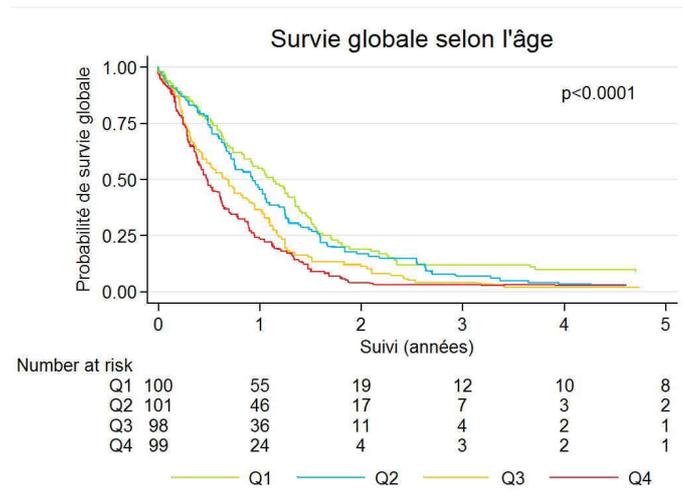
Anticorps utilisés :

Résultats :

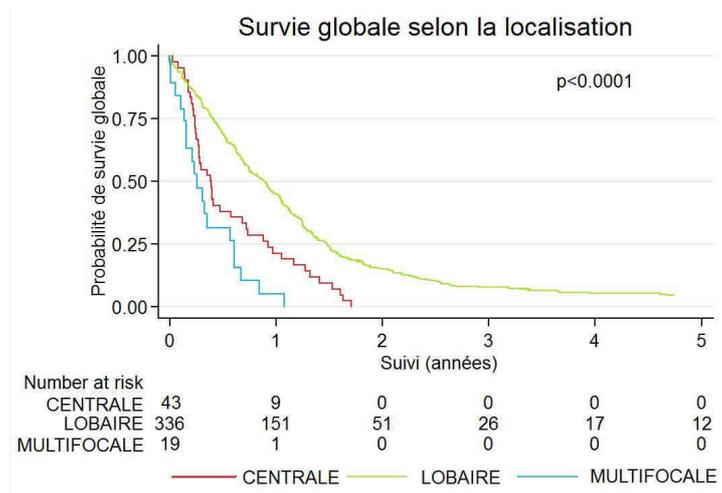
### CONCLUSION :

<b>Variable</b>	<b>Hazard Ratio (Intervalle de confiance à 95%)</b>	<b>p</b>
<b>Age</b>	1.03 (1.02 – 1.04)	<10 <sup>-4</sup>
<b>Sexe</b> masculin vs féminin	1.07 (0.87 – 1.31)	0.506
<b>Latéralité</b> gauche vs droite	1.11 (0.90 – 1.37)	0.313
<b>Localisation</b> centrale vs lobaire	2.01 (1.45 – 2.78)	<10 <sup>-4</sup>
multifocale vs lobaire	3.77 (2.34 – 6.06)	<10 <sup>-4</sup>
frontale vs autre lobe	1.07 (0.90 – 1.37)	0.518
<b>Prise en charge chirurgicale</b> Exérèse vs biopsie	0.38 (0.31 – 0.47)	<10 <sup>-4</sup>

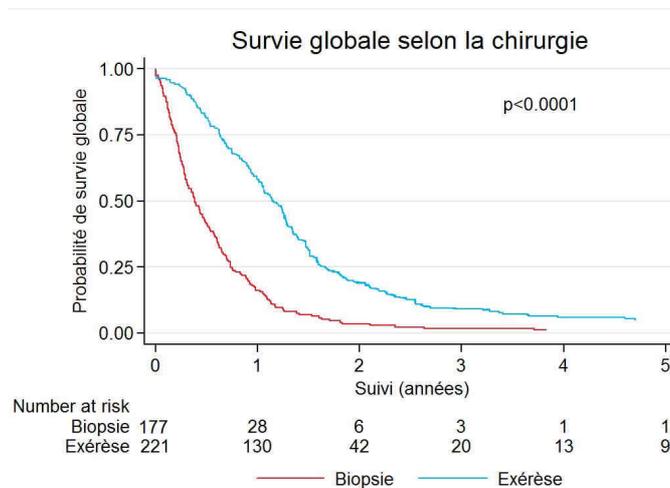
**Tableau 13 : Analyse des facteurs pronostiques de longue survie par la méthode univariée de Kaplan-Meier dans la population totale (n=398).**



**Figure 18 : Courbe de survie globale selon l'âge, exprimé en quartiles (Q) : Q1 : moins de 55 ans, Q2 : 55 à 65 ans, Q3 : 65 à 70 ans, Q4 : plus de 70 ans.**



**Figure 19 : Courbe de survie globale selon la localisation centrale, lobaire ou multifocale.**



**Figure 20 : Courbe de survie globale selon le type de prise en charge chirurgicale**

Cas	Age/ genre	Topogra- phie	Chirurgie	Ttt adjuvant	Histologie	Survie	GFAP		P53		IDH1		EGFR		MGMT
							IHC	IHC	IHC	IHC	PCR	SEQ	IHC	SISH	
1	23.7/F	Temporal	Ex compl	RT+FOT	GBM	13.7	P	P	P	P	R132H	ND	2	NA	M
2	53.6/F	Temporal	Ex compl	RT	GBM CG	4.7	P	P	P	ND	ND	ND	ND	NA	ND
3	58.3/F	Temporal	Ex compl	RT+TMZ	GBMO	3.3	P	N	N	N	N	N	3	NA	M
4	55.9/F	Frontal	Ex compl	RT	GBM	3.4	P	N	N	N	N	N	3	A	M
5	51.4/H	Frontal	Ex part	RT+TMZ	GBM	6.4	P	P	N	N	N	N	2	NA	UM
6	36.2/F	Pariétal	Ex compl	RT+TMZ	GBM	5.9	P	N	N	N	N	N	0	NA	M
7	56.7/H	Pariétal	Ex compl	RT+TMZ	GBM	5.1	P	N	N	N	N	ND	3	A	M
8	72.3/F	Temporal	Biopsie	RT+FOT	GBM	6.5	P	P	N	N	N	N	2	A	M
9	64/F	Temporal	Ex compl	RT+TMZ	GBM	3.6	P	P	N	N	N	N	2	NA	M
10	51.3/H	Frontal	Ex compl	RT+TMZ	GBM	3.7	P	N	N	N	N	N	2	A	M
11	62/H	Frontal	Ex compl	RT+TMZ	GBM	3.9	P	P	P	R132H	R132H	0	0	NA	M
12	57.1/H	Frontal	Ex part	RT+TMZ	GBMO	4.6	P	P	N	N	N	N	3	A	M
13	46.3/H	Pariétal	Ex compl	RT+TMZ	GBMO	5.4	P	P	P	R132H	R132H	3	3	A	M
14	27.2/H	Frontal	Ex part	RT+TMZ	GBM	5.5	P	N	N	N	N	N	0	NA	UM
15	29.1/F	Temporal	Ex part	RT+TMZ	GBM	5.3	P	P	P	R132H	R132H	0	0	NA	M
16	35.7/F	Pariétal	Ex compl	RT+TMZ	GBM	5.3	P	P	N	N	N	N	0	NA	M
17	67.8/H	Occipital	Ex part	RT+TMZ	GBM	4.7	P	P	N	N	N	N	0	NA	M
18	73/F	Frontal	Ex part	RT+TMZ	GBM	4.3	P	N	N	N	N	N	2	A	M
19	33.7/F	Frontal	Biopsie	RT+TMZ	GBM	4.6	P	P	P	R132H	R132H	1	1	NA	ND
20	53.9/F	Pariétal	Biopsie	RT+TMZ	GBM	3.7	P	N	N	N	N	N	3	A	UM
21	39.9/H	Frontal	Biopsie	RT+FOT	GBM	11.0	P	P	P	R132H	R132H	2	2	NA	ND
22	59.3/H	Frontal	Ex part	RT+TMZ	GBM	5.9	P	P	N	N	N	N	0	NA	M
23	68.8/F	Frontal	Ex compl	RT+TMZ	GBM	3.2	P	P	N	N	N	N	1	NA	M
24	72/F	Frontal	Biopsie	RT+TMZ	GBM	3.8	P	P	N	N	N	N	1	NA	M
25	70.3/F	Frontal	Ex compl	RT	GBM	3.4	P	P	N	N	N	N	2	NA	M

**Tableau 14 : Résultats de l'analyse de la cohorte "long-survivants" (n=25).**

F = Femme, H = Homme, Ex compl/part = Exérèse complète/partielle, RT = Radiothérapie, Ttt = Traitement, TMZ = Temozolomide, FOT = Fotémustine, GBM CG = GBM à cellules géantes, GBMO = GBM avec composante oligodendrogliale, P = Positif, N = Négatif, ND = Non Déterminé, A = Amplifié, NA = Non Amplifié, M = Méthylé, UM = Non Méthylé

Cas	Age/ genre	Topogra- -phie	Chirurgie	Ttt adjuvant	Histologie	Survie	P53.			IDH1			EGFR			MGMT
							IHC	IHC	IHC	IHC	PCR	SEQ	IHC	SISH	PCR	
1	69.2/F	Frontal	Ex compl	RT+TMZ	GBM	0.4	P	N	N	N	N	0	NA	NA	M	
2	53.4/H	Frontal	Ex compl	RT+TMZ	GBM CG	1.2	P	N	N	N	N	2	NA	NA	UM	
3	58/M	Pariétal	Biopsie	RT	GBM	0.3	P	N	N	N	N	2	ND	ND	UM	
4	72.1/F	Frontal	Biopsie	TMZ	GBM	0.4	P	N	N	N	N	1	NA	NA	UM	
5	54.9/H	Temporal	Ex part	RT+FOT	GBM	0.4	P	N	N	N	N	2	A	A	M	
6	51.5/F	Frontal	Ex compl	abstention	GBM CG	0.4	P	N	N	N	N	2	NA	NA	UM	
7	38.1/H	Frontal	Biopsie	RT+FOT	GBM	0.5	P	N	N	N	N	2	NA	NA	UM	
8	72.3/F	Temporal	Biopsie	abstention	GBM	0.6	P	N	N	N	N	0	NA	NA	UM	
9	47.5/H	Pariétal	Ex compl	RT+TMZ	GBM	0.6	P	N	N	N	N	1	NA	NA	UM	
10	51.0/F	Frontal	Ex compl	RT+TMZ	GBM	0.6	P	N	N	N	N	3	A	A	UM	
11	64.2/F	Temporal	Ex part	RT+FOT	GBM	0.7	P	N	N	N	N	2	NA	NA	ND	
12	70.8/F	Occipital	Ex compl	RT+TMZ	GBM	0.7	P	N	N	N	N	3	A	A	ND	
13	62.8/H	Frontal	Ex compl	RT	GBM	0.7	P	N	N	N	N	3	A	A	UM	
14	68.5/F	Frontal	Ex compl	RT	GBM	0.7	P	N	N	N	N	3	A	A	M	
15	27.1/F	Pariétal	Ex compl	RT+TMZ	GBM	0.8	P	N	N	N	N	2	NA	NA	M	
16	55.5/H	Frontal	Ex compl	RT	GBM	0.9	P	N	N	N	N	1	NA	NA	UM	
17	73/F	Frontal	Ex compl	RT	GBM	0.9	P	N	N	N	N	3	A	A	UM	
18	59.3/H	Frontal	Ex compl	TMZ	GBM	1.1	P	N	N	N	N	1	NA	NA	UM	
19	54.7/F	Pariétal	Biopsie	RT+TMZ	GBM	1.1	P	N	N	N	N	3	A	A	UM	
20	36.7/H	Temporal	Ex compl	RT+TMZ	GBM	1.2	P	N	N	N	N	1	NA	NA	UM	
21	38/F	Temporal	Ex part	RT+TMZ	GBM	1.3	P	N	N	N	N	1	NA	NA	ND	
22	47.8/F	Temporal	Ex compl	RT+TMZ	GBM	1.3	P	N	N	N	N	2	NA	NA	UM	
23	26.8/F	Frontal	Ex compl	RT	GBM	1.5	P	P	R132H	N	N	2	NA	NA	M	
24	33.5/H	Frontal	Ex compl	RT+TMZ	GBM	1.5	P	N	P	R132H	N	3	A	A	M	
25	44.8/F	Pariétal	Ex compl	RT+FOT	GBM	2.1	P	N	N	N	N	3	A	A	UM	

**Tableau 15 : Résultat de l'analyse de la cohorte « court-survivants » (n = 25)**

F = Femme, H = Homme, Ex compl/part = Exérèse complète/partielle, RT = Radiothérapie, Ttt = Traitement, TMZ = Temozolomide, FOT = Fotémustine, GBM CG = GBM à cellules géantes, P = Positif, N = Négatif, ND = Non Déterminé, A = Amplifié, NA = Non Amplifié, M = Méthylé, UM = Non Méthylé

# INDEX DES TABLEAUX ET DES FIGURES

Figure 1 : Distribution des gliomes (n=12 605). Figure adaptée du registre français des tumeurs cérébrales [9].....	9
Figure 2 : Classification des gliomes selon l'OMS 2007 [1].....	10
Figure 3 : Evolution de l'incidence des gliomes entre 1985 et 1999. Figure modifiée d'après les registres de six états d'Amérique [17].....	11
Figure 4 : Structure solide et infiltrante d'un glioblastome.....	16
Figure 5 : Aspects histologiques d'un glioblastome classique.....	16
Figure 6 : Composante oligodendrogliale au sein d'un glioblastome.....	17
Figure 7 : Glioblastome à cellules géantes. ....	19
Figure 8 : Schéma simplifié des 3 principales voies moléculaires altérées dans les glioblastomes. ....	23
Figure 9 : La mutation d'IDH1 résulte à la fois en une perte et un gain de fonction enzymatique (modifié d'après [56]).....	26
Figure 10 : Principe de la PCR spécifique d'allèle.....	37
Figure 11 : Courbe de survie globale de la population totale (n = 398) .....	41
Figure 12 : Immunomarquage anti-P53 . ....	45
Figure 13 : Immunomarquage anti-EGFR .....	46
Figure 14 : Recherche de l'amplification d'EGFR par technique SISH .....	47
Figure 15 : Recherche de la mutation d'IDH1 selon 3 méthodes . ....	48
Figure 16 : Exemple de courbes d'amplification .....	49
Figure 17 : Survie globale selon le statut de méthylation du promoteur de <i>MGMT</i> et le traitement selon protocole Stupp. ....	52
Figure 18 : Courbe de survie globale selon l'âge, exprimé en quartiles (Q). ....	72
Figure 19 : Courbe de survie globale selon la localisation centrale, lobaire ou multifocale. ..	72
Figure 20 : Courbe de survie globale selon le type de prise en charge chirurgicale.....	72

Tableau 1 : Anticorps primaires utilisés en immunohistochimie (IHC).....	32
Tableau 2 : Amorces utilisées pour la recherche de la méthylation du promoteur de MGMT et pour l'amplification d'une séquence d'actine par MS- PCR en temps réel . ....	35
Tableau 3 : Amorces utilisées pour la mise en évidence de la mutation R132H sur le gène IDH1 par PCR spécifique d'allèle en temps réel .....	38
Tableau 4 :Amorces utilisées pour la recherche des mutations du gène IDH1 par séquençage .....	38
Tableau 5 : Données cliniques de la population totale .....	40
Tableau 6 : Analyse des facteurs pronostiques de longue survie par la méthode multivariée du modèle de Cox dans la population totale (n=398).....	42
Tableau 7 : Comparaison des données cliniques entre la cohorte « long-survivants » et la cohorte « court-survivants » . ....	43
Tableau 8 : Comparaison des données moléculaires entre la cohorte "long-survivants" et la cohorte "court-survivants".....	50
Tableau 9 : Analyse des facteurs pronostiques de longue survie par la méthode univariée de Kaplan-Meier (n = 50).....	51
Tableau 10 : Analyse des facteurs pronostiques de longue survie par la méthode multivariée du modèle de Cox (n = 50).....	52
Tableau 11 : Liaison entre la mutation d'IDH1 et la méthylation du promoteur de MGMT. ....	53
Tableau 12 : Absence de liaison entre la mutation d'IDH1 et le traitement selon le protocole Stupp.....	53
Tableau 13 : Analyse des facteurs pronostiques de longue survie par la méthode univariée de Kaplan-Meier dans la population totale (n=398).....	71
Tableau 14 : Résultats de l'analyse de la cohorte "long-survivants" (n=25). ....	73
Tableau 15 : Résultat de l'analyse de la cohorte « court-survivants » (n = 25) .....	74

NOM : DENIS-MUSQUER

PRENOM : Marie

**Titre de Thèse :** Etude des facteurs histopathologiques et moléculaires pronostiques de longue survie chez des patients atteints de glioblastome primaire

---

## RESUME

Le glioblastome primaire est la tumeur gliale la plus fréquente et la plus agressive avec une médiane de survie de 8 à 12 mois. Cependant, de rares patients présentent une survie supérieure à 3 ans et sont appelés « long-survivants ». Le but de notre étude est d'identifier les facteurs histologiques et moléculaires pronostiques de longue survie chez des patients atteints de glioblastome primaire. Nous avons évalué l'impact pronostique du type histologique, du traitement adjuvant reçu, de l'expression des protéines P53 et EGFR, de l'amplification du gène *EGFR*, du statut mutationnel du gène *IDH1* et de la méthylation du promoteur du gène *MGMT*. Cette recherche a été réalisée sur une cohorte de 25 patients « long-survivants » appariée à une cohorte de 25 patients « court-survivants » présentant une survie inférieure à 3 ans. Les critères d'appariement étaient l'âge, le type de chirurgie et la localisation tumorale. Nos résultats en analyse univariée montraient que les facteurs pronostiques positifs sont la mutation d'*IDH1*, la méthylation du promoteur de *MGMT* et le traitement selon le protocole Stupp. L'analyse multivariée montrait le caractère indépendant de la méthylation du promoteur de *MGMT* et du traitement selon le protocole Stupp. La mutation d'*IDH1* et la méthylation du promoteur de *MGMT* étaient statistiquement associées. Notre étude souligne l'importance de déterminer en pratique courante le statut mutationnel

d'*IDH1* et la méthylation du promoteur de *MGMT* afin de mieux appréhender le pronostic individuel des patients atteints de glioblastome primaire.

---

### **MOTS-CLES**

Glioblastome primaire – Pronostic – Longue survie – *MGMT* – *IDH1*