

Faculté des Sciences et de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-chimique
Filière: science de la nature et de la vie
Option : Biochimie Appliquée



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Analyse protéomique du sang de patients
atteints de tumeurs cérébrales**

Présenté par :

KERBOUS Hafsa & MOULAI Siham

Soutenu le: **15 Juin 2015 a 8h30**

Devant le jury composé de:

Mme ATMANI	M.C.A, A-Mira,Bejaia	Présidente
M ^{lle} AIT ALI	M.A.B, A-Mira,Bejaia	Encadreur
M ^r GHIDOUCHE	M.C.B, A-Mira,Bejaia	Examineur

Année universitaire: 2014 / 2015

Dédicaces

Je dédie ce travail à la mémoire de mon oncle Bachir,

À mes chers parents qui m'ont donné un magnifique model de labeur et de persévérance tout au long de mon cursus et pour m'avoir apporté un grand support moral lors de la rédaction de ce mémoire.

À mon frère Hacène pour ses encouragements et son soutien, qu'il trouve ici le témoignage de mon amour et de mon respect.

À mes sœurs Lamia, Lynda, Lyla et Sabrina, pour leurs conseils, leur aide morale et leur simple présence à mes côtés.

Au terme de ce travail j'adresse mes plus sincères remerciements à ma promotrice M^{elle} AIT-ALI Djida, pour tous les conseils prodigieux qu'elle m'a toujours apportés, Qu'elle trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

À toute ma famille.

À ma binôme Hafsa.

À tous mes ami(e)s, surtout Souad et Nawel

SIHAM

Remerciements

Nos vifs remerciements vont d'emblée à Dieu tout puissant qui nous a dotés d'une grande volonté et d'un savoir adéquat pour mener à bien ce travail.

Nos remerciements sont adressés également à M^{elle} AIT-ALI Djida pour son encadrement et pour l'encouragement et l'intérêt qu'elle nous a apporté pour l'accomplissement de ce projet de fin de cycle et surtout pour sa grande aide et ses qualités humaines.

Nos sincères considérations sont exprimées aux membres de jury: Mme ATMANI qui nous a fait honneur par sa présence en qualité de présidente de jury et Mr GHIDOUCHE d'avoir accepté d'examiner ce travail, d'avoir vivement contribué à notre formation et pour tous les conseils prodigieux qu'il nous a apporté.

Nos remerciements sont également exprimés à Mme KHETTAL et Mr HAMOUM de nous avoir permis de réaliser ce travail au sein de leurs laboratoires

Enfin, Nous n'omettrons jamais d'exprimer toute notre gratitude à tous les membres du département de biologie de l'université de Bejaia, que ce soit enseignants ou cadres administratifs, qui de près ou de loin n'ont épargné aucun effort pour que notre formation et nos travaux se termine dans de bonne conditions.

Dédicaces

J'ai le plaisir de dédier ce modeste travail :

✎ A mes très chers parents qui m'ont soutenu tout le long de mes études.

Que DIEU leur procure bonheur, santé et longue vie.

✎ A mes sœurs: Khadidja, Hania, Djamila et Zineb, ainsi qu'à mes frères :

Yacine et Ali.

✎ A mes chers neveux: Mustapha amine, Islam, Aris et Abdrahman, sans oublier mes chers nièces: Racha et Ryme.

✎ A tous mes amis (es), surtout Sihem, Souad et Nawel.

✎ Au terme de ce travail j'adresse mes plus sincères remerciements à ma promotrice M^{elle} Ait ali Djida, et Mr Ghidouche pour m'avoir donné l'honneur de travaillé avec eux. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.

HAFSA

Liste des Abréviations

- β-HCG:** Human Chorionic Gonadotropin.
- ACE:** Carcinoembryonic antigen.
- APS:** Persulfate D'ammonium.
- AFP:** L'alpha-foetoprotéin.
- BHE:** Barrière Hematoencephalique.
- BSA:** Bovin Sérum Albumin.
- CA15-3:** Cancer antigen.
- CMV:** Cytomégalovirus.
- EBV:** Virus d'Epstein-Barr.
- EGF:** Epithelium Growth Factor.
- HTLV:** Virus T-lymphotrope Humain.
- HPLC:** High Performance Liquid Chromatography.
- IDH 1:** Isocitrate déshydrogénase 1.
- IDH 2:** Isocitrate déshydrogénase 2..
- MALDI:** Matrix-assisted laser desorption/ionization.
- MGMT:** O6-méthylguanine-DNA méthyl transferase.
- NF1:** Neurofibromatose 1.
- NSE:** Neuron specific enolase.
- PAGE:** Polyacrylamide Gel Electrophoresis.
- PDGF:** Platelet Derivated Growth Factor.
- PDGF-R:** Platelet-derived growth factor receptors.
- PSA:** prostate specific antigen.
- PTCH:** Patched tumor suppressor gene.
- PTCH1:** Protein patched homolog 1..
- R-EGF:** Receptor Epithelium Growth Factor.
- Rpm :** Rotation par minute.
- SDS:** Sodium Dodecyl Sulphate.
- Smo:** smoothened homolog.
- SNC:** Système Nerveux Central.
- SNP:** Système Nerveux Périphérique.
- SHH:** Signal Sonic Hedgehog.
- TEMED:** N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine.

Tris: Trishydroxyméthylaminométhane.

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor.

V/V: Volume par Volume

Liste des figures

Figure 1: Coupe sagittale de cerveau.....	2
Figure 2: Schéma du développement des cellules d'origine neuroectodermiques.....	7
Figure 3: Le récepteur R-EGF en réponse à la fixation du ligand.....	9
Figure 4: Représentation schématique de la voie de signalisation Sonic Hedgehog.....	9
Figure 5: Forme normal et muté d'IDH1.....	10
Figure 6: Action de MGMT sur une O6-methylguanine.....	11
Figure 7: Cascades d'événements conduisant à une métastase cérébrale.....	12
Figure 8: Répartitions des tumeurs cérébrales selon le type histologique.....	13
Figure 9: Image du dispositif d'électrophorèse.....	22
Figure 10: Courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines.....	25
Figure 11: Variation de la protéinémie totale entre les témoins et les patients tumoraux.....	27
Figure 12: Histogrammes illustrent les variations de la protéinémie totales entre tumoraux selon le sexe et l'âge.....	27
Figure 13: Profil électrophorétique (10%) obtenu par SDS-PAGE des échantillons de plasma.....	29
Figure 14: Profil électrophorétique (gel 15%) obtenu par SDS-PAGE des échantillons de plasma.....	30
Figure 15: Schéma récapitulatif de l'ensembles des zone (b) et (c)	30
Figure 16: Ensemble des profils T250, T271, NT223, NT309, NT273, NT248.....	31
Figure 17: Ensemble des profils A: T271, T197. B: T210, T329.....	32

Liste des tableaux

Tableau I: Aspect récapitulatif de la névrologie.....3

Tableau II: Les grades établis par l’OMS.....5

Tableau III: Fonctions des protéines plasmatiques.....14

Tableau IV: Marqueurs utilisés dans le dépistage, diagnostic et/ou la surveillance de cancers.....16

Tableau V: Applications clinique des bios marqueurs des tumeurs cérébrales.....17

Tableau VI: Caractéristiques des échantillons.....20

Tableau VII: les Absorbances et Δ Absorbance des différentes concentrations de BSA.....25

Tableau VIII: La teneur protéique de chaque échantillon.....26

Liste des figures.
Liste des tableaux.
Liste des abréviations.
Introduction.....1

Chapitre I : Revue Bibliographique

I.I. Principes de base du système nerveux.....2
 I.1.1. Organisation du système nerveux.....2
 I.1.2. Histologie du tissu nerveux.....2
I.2. La biologie des tumeurs cérébrales.....4
 I.2.1. Développement tumoral.....4
 I.2.2. Description des tumeurs cérébrales.....5
 I.2.2.1. Définition.....5
 I.2.2.2. Classification.....5
 I.2.2.3. Facteurs de risque.....6
 I.2.3. Etiologie des tumeurs cérébrales.....7
 I.2.3.1. La neuro-oncogenèse des cellules souches.....7
 I.2.3.2. Altérations génétique et épigénétique.....8
 I.2.3.3. Métastases cérébrales.....11
 I.2.4. Epidémiologique.....12
 I.2.4.1. Incidences.....12
 I.2.4.2. Epidémiologie à Bejaia.....13
I.3 Protéines du plasma.....14
 I.3.1. Les marqueurs tumoraux.....14
 I.3.1.1. Bios marqueurs des fluides biologiques.....15
 I.3.1.2. Bios marqueurs des tumeurs cérébrales.....16
 I.3.2. Approche Protéomique.....17
 I.3.2.1. Méthodes colorimétriques.....17
 I.3.2.2. Techniques quantitatives et analytiques.....18

Chapitre II : Matériels & Méthodes

II.1. Caractéristiques des échantillons.....	20
II.2. Matériels.....	21
II.3. Méthodes d'étude.....	21
II.3.1. Dosage des protéines.....	21
II.3.2. Electrophorèse SDS-PAGE.....	22
II.3.2.1. Préparation des échantillons.....	22
II.3.2.2. Préparation des gels.....	23
II.3.2.3. Migration.....	23
II.3.2.4. Coloration et décoloration.....	24

Chapitre III : Résultats & Discussions

III.1. Teneurs protéiques.....	25
III.2. Profils electrophorétique.....	29
Conclusion et perspectives.....	33
Références bibliographiques.....	34
Glossaire	
Annexe	

Introduction

Les tumeurs cérébrales sont des masses cellulaires anormales pouvant se développer au dépend des structures tissulaires intra ou extra cérébrales. Elles représentent, malgré leur rareté relative, un problème de santé publique à cause de la mortalité et de la morbidité qui les accompagnent. En Algérie le nombre de personne atteints est estimé 40.000 cas avec 22.000 décès/an, a Bejaia entre 2012 et 2014 l'incidence de ces tumeurs passe de 5 à 18 cas pour 100.000 habitants par ans.

En dépit d'avancées significatives dans la recherche biomédicale particulièrement dans l'oncogénomique et l'oncoprotéomique, nos connaissances sur la physiopathologie des tumeurs cérébrales sont encore parcellaires, et les retombées pratiques de ces recherches dans le domaine du dépistage, du diagnostic, du pronostic ou des traitements sont encore très limités. C'est pourquoi, il est nécessaire d'élaborer de nouvelles stratégies pour identifier les molécules impliquées dans des mécanismes d'initiation et/ou de la progression tumorale **(Hudler *et al.*, 2014)**.

Plusieurs approches se focalisent sur la détection de nouveaux marqueurs biologiques, notamment l'approche protéomique, celle-ci pourrait permettre d'établir un profil d'expression pour chaque tumeur. Par ailleurs, les caractéristiques des patients tels que l'âge, le sexe, l'origine ethnique affectent les valeurs de ces marqueurs tumoraux à un degré significatif, la mise en évidence de ces facteurs demeure actuellement ardue compte tenu de la faible fréquence de ces tumeurs et des difficultés de colliger des données exhaustives **(Solassol *et al.*, 2005)**.

Vu l'absence de consensus dans la définition de signatures moléculaires précises, le but de notre étude est d'établir une bio-signature à partir des profils d'expression protéiques de sujets non-tumoraux et patients atteints de tumeurs cérébrales, et d'acquérir de nouvelles données reliées a la discrimination rapide, précise et fiable de différents états pathologiques.

I. 1. PRINCIPE DE BASE DU SYSTEME NERVEUX

I.1.1. ORGANISATION DU SYSTEME NERVEUX

Le système nerveux est un système complexe qui tient sous sa dépendance toutes les fonctions de l'organisme. Il est divisé en deux systèmes complémentaires:

- Le système nerveux central (SNC), constitué par l'encéphale comprenant le cerveau, le tronc cérébral, et le cervelet situés dans la boîte crânienne, et la moelle épinière située dans le canal rachidien (Figure 1). Son rôle est de recevoir, enregistrer, interpréter les signaux qui parviennent de la périphérie, organiser et coordonner la réponse à envoyer (**Vigue, 2004**).
- Le système nerveux périphérique (SNP), constitué par les nerfs crâniens et les nerfs spinaux qui sont rattachés au SNC. Son rôle est de conduire jusqu'au SNC les informations issues des récepteurs périphériques, et de transmettre les ordres moteurs et sensitifs émis par les centres nerveux (**Marieb et al., 2014**).

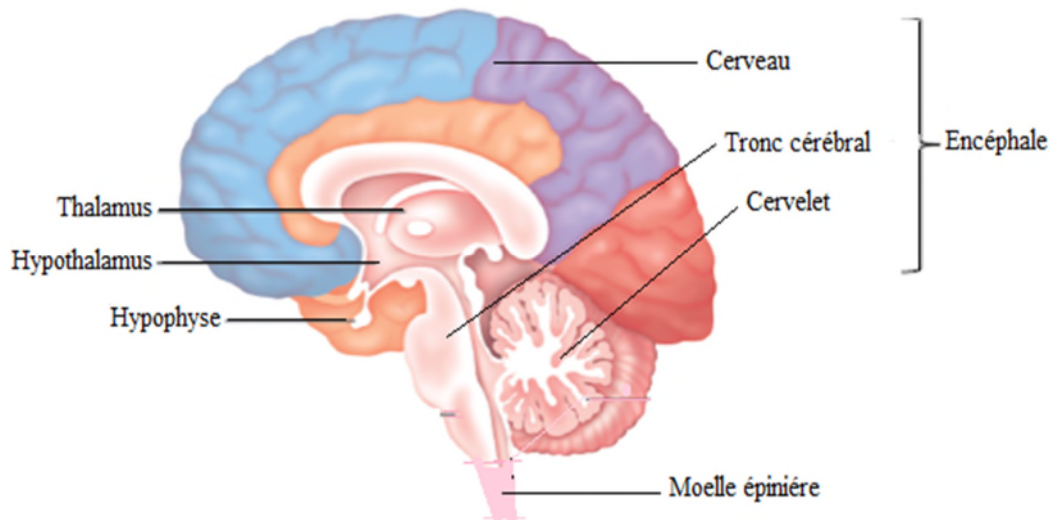








Figure 1: Coupe sagittale de cerveau (**INCa, 2010**). L'hypothalamus situé au-dessus de l'hypophyse, joue un double rôle de sécrétion des hormones, et de régulation du système nerveux végétatif. L'hypophyse quant à lui régule les glandes endocrines.

I.1.2. HISTOLOGIE DU TISSU NERVEUX

Au niveau cellulaire, ce grand ensemble n'est constitué que de deux grands types cellulaires: les neurones sont des cellules dotées d'activités fonctionnelles variées. Un neurone présente un corps cellulaire soma muni de deux types de prolongements: l'axone et les dendrites (**Silbernagl et al, 2001**). Tandis que les cellules gliales, assurent le support physique et le soutien nutritionnel des neurones et jouent également un rôle majeur dans l'immunité, elles forment ce qu'on appelle la névroglie (Tableau I) (**Purves et al., 2001**).

Tableau I: Aspect récapitulatif de la névroglie.

Type cellulaire	Rôle physiologique	Images correspondante
Astrocytes	Rôle primordial dans la formation de la barrière hémato encéphalique. Assurent l'approvisionnement des neurones en oxygène et nutriments (Pritchard et Alloway, 2002).	
Oligodendrocytes	Jouent également un rôle de réseau de soutien pour les neurones du SNC mais assurent surtout leur myélinisation (Kierszenbaum, 2006).	
Microglie	Elles protègent les cellules du SNC contre les agressions infectieuses et toxiques (Pritchard et Alloway, 2002).	
Ependymocytes	Ils assurent la sécrétion du Liquide céphalo-rachidien et favorisent sa circulation (Eyre-Walker et Keightley, 1999).	
Gliocytes ganglionnaires	Présents dans le SNP, entourent le corps cellulaire des neurones situés dans les ganglions. Leur rôle est de réguler la composition ionique des neurones auxquels ils sont associés (Marieb, 1999).	
Cellules de Schwaan	Constituent les gaines de myéline qui enveloppent les gros axones du SNC, jouent le même rôle que les oligodendrocytes du SNC Elles jouent également un rôle très important dans la régénération des axones du SNP en cas d'éventuelles lésions (Kierszenbaum, 2006).	

I.2. LA BIOLOGIE DES TUMEURS CEREBRALES

I.2.1. DEVELOPPEMENT TUMORAL

Une tumeur est un tissu néoformé résultant du processus néoplasique. Ce dernier est caractérisé par une multiplication de cellules transformées, partiellement ou totalement autonome par rapport aux facteurs qui régulent normalement le renouvellement du tissu, et pouvant s'étendre de façon illimitée (**Monier et Tubiana, 2008**).

En premier lieu des agents initiateurs chimiques (alkylants), biologiques (virus, bactéries) ou physiques (radiations ionisantes) attaquent l'ADN, aboutissent à des mutations génétiques ou épigénétique irréversibles. La régulation épigénétique consiste en des modifications de l'expression des gènes, agissent sur l'équilibre entre activation/répression des différents gènes pour la régulation des transcriptions et la stabilité du génome. Des changements épigénétiques majeurs sont associés à la cancérogenèse, notamment les méthylations aberrantes de l'ADN (**Deltour et al., 2005**).

Les principales cibles de ces lésions touchent des gènes appelés proto-oncogènes, des gènes suppresseurs de tumeur, et gènes réparateurs de l'ADN:

Les proto-oncogènes codent pour des effecteurs du cycle cellulaire, ils sont activés en oncogènes. Leurs altérations peuvent provoquer leur surexpression et/ou des changements structuraux qui modifient ainsi leur fonction, les mutations se traduisent par un gain de fonction. Les gènes suppresseurs de tumeur codent pour des molécules qui vont au contraire bloquer la transmission du signal mitotique. Kundson (1971) proposa l'hypothèse que deux mutations successive sur la même cible génomique sont nécessaires au développement d'une tumeur dans une cellule. Les dysfonctions génomiques ont comme conséquence la transformation cellulaire en cellules tumorales immortalisées avec perte des régulations d'apoptose, et d'homéostasie (**Tubiana, 2008**).

A ce stade, le développement tumoral peut être accélérés par les promoteurs tumoraux qui stimulent la prolifération cellulaire et la différenciation, soit en synergie ou en potentialisant un facteur transformant associé, constituant ainsi un clone pré-néoplasique. Ce dernier devient capable d'échapper au contrôle tissulaire (**Calmels, 2004**). Au cours de la progression, les cellules néoplasiques devenues autonomes acquièrent la capacité d'envahir les autres tissus ou organes. La tumeur progresse localement, puis envahit les tissus avoisinants et distants (**Hadoux et Besse, 2012**).

I.2.2. DESCRIPTION DES TUMEURS CEREBRALES

I.2.2.1. DEFINITION

Les tumeurs cérébrales sont définies comme l'ensemble des tumeurs intracrâniennes et du canal spinal central. Ces masses cellulaires sont subdivisées en 2 types: il peut s'agir de tumeurs primaires issues de cellules présentes originellement dans le tissu cérébral ou de ses enveloppes (bénignes ou malignes), ou bien de métastases d'un autre cancer provenant d'un organe extérieur au cerveau (Norden et Claus, 2011).

I.2.2.2. CLASSIFICATION

La classification internationalement reconnue reste celle de l'Organisation Mondiale de la Santé OMS (voir Annexe I). Elle est basée sur les caractéristiques morphologiques du tissu tumoral, à savoir, la nature des cellules, la différenciation, la présence d'atypies cytonucléaires ainsi que la prolifération endothéliale (Louis *et al.*, 2007).

L'OMS combine le type histologique et un système de grade d'évolution (Tableau II). Le grade d'une tumeur dépend du degré d'anormalité (anaplasie) et du taux de croissance et d'expansion de la tumeur (Louis *et al.*, 2007).

Tableau II: Les grades établis par l'OMS (Andrew et Laws, 2012).

Grade	Nature de la tumeur	Description
Grade I	Tumeurs bénignes	Tumeurs à croissance lent et circonscrite (délimitation bien définies).
Grade II	Tumeurs bénignes	Tumeurs à croissance lente. Contrairement aux tumeurs de grade I, leurs délimitations sont imprécises.
Grade III	Tumeurs malignes	Tumeurs anaplasiques: plusieurs foyers se sont développés au sein d'une tumeur préexistante de bas grade (I ou II).
Grade IV	Tumeurs maligne	Présentent une anaplasie très prononcée. Leur croissance est plus rapide que celle des tumeurs de bas grade

Toutefois, le manque de reproductibilité de la classification OMS souvent dû à l'utilisation de critères subjectifs et la prise en compte exclusive du type cellulaire entraîne bien souvent des erreurs d'interprétation. Ces arguments ont conduit l'Hôpital Sainte-Anne a

développé son propre système de classification. Il repose sur l'analyse de la structure histologique tumorale et intègre les données cliniques et d'imagerie. Les groupes sont donc définis selon un plus grand nombre de critères et permettent de mieux garantir la représentativité des prélèvements (**Figarella-Branger et Bouvier, 2005**).

I.2.2.3. FACTEURS DE RISQUE

L'origine des tumeurs cérébrales reste encore mal connue. De nombreuses études ont été menées ou sont en cours, pour tenter de déterminer les facteurs qui favorisent leur apparition. Certains facteurs de risque sont suspectés mais leur influence reste peu claire. Parmi-eux:

❖ Des virus sont à l'origine des tumeurs cérébrales. L'infection par les différents virus du groupe herpès (virus Epstein - Barr (EBV), cytomégalovirus (CMV)) augmente le risque de tumeur du SNC. L'existence d'une immunodépression prolongée due le plus souvent au sida serait également impliquée dans l'apparition d'un lymphome malin primitif.

❖ Les radiations ionisantes sont les seuls facteurs de risque indiscutable pour l'apparition de tumeurs cérébrales. Plus récemment, l'usage des téléphones portables a été mis en cause, mais le recul n'est pas suffisant pour évaluer à long terme les risques potentiels du rayonnement électromagnétique (**Cardis et al., 2010**).

❖ Plusieurs syndromes génétiques semblent avoir un rôle dans l'apparition des tumeurs cérébrales. A titre d'exemple, la neurofibromatose de type 1 et 2, une maladie autosomique dominante causée par les mutations du gène NF1 et NF2, ou la maladie de Von Hippel Lindau (VHL) qui s'exprime par une pénétrance élevée et avec un spectre caractéristique de néoplasmes du système nerveux. En revanche, d'autres syndromes s'expriment avec une pénétrance plus faible, c'est notamment le cas du syndrome de Li-Fraumeni (**Kufe et al., 2003**).

❖ D'autres facteurs peuvent augmenter le risque de développer une tumeur au niveau du cerveau, tel que l'exposition aux pesticides, une autre étude a mis en évidence une recrudescence du risque de tumeurs chez les sujets exposés au plomb (**Loiseau et al., 2010**)

I.2.3. ETIOLOGIE DES TUMEURS CEREBRALES

I.2.3.1. LA NEURO-ONCOGENESE DES CELLULES SOUCHES

Lors de l'embryogénèse, le fœtus forme trois feuillets cellulaires distincts, l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme. Le système nerveux et la peau dérivent entièrement de l'ectoderme (Zhao *et al.*, 2008).

La plaque neurale, épaissement de l'ectoderme représentant le système nerveux primitif est induit par la notochorde *via* le signal *Sonic Hedgehog* (SHH) (voir détails page 9). Avant la neurogénèse, la plaque neurale et le tube neural sont composés d'une seule couche de cellules neuroépithéliales. Celles-ci (excepté le tube neural), subissent une prolifération mitotique active aboutissant à la formation des cellules filles forment les cellules progénitrices gliales et neuronales (Marti et Bovolenta, 2002; Guillemot, 2000).

La théorie sur les changements moléculaires pendant la tumorigénèse est fondée sur l'idée qu'une seule cellule est à l'origine du gliome. Les cellules souches multipotentes seraient à l'origine des tumeurs, les glioblastomes inclus (Figure 2).

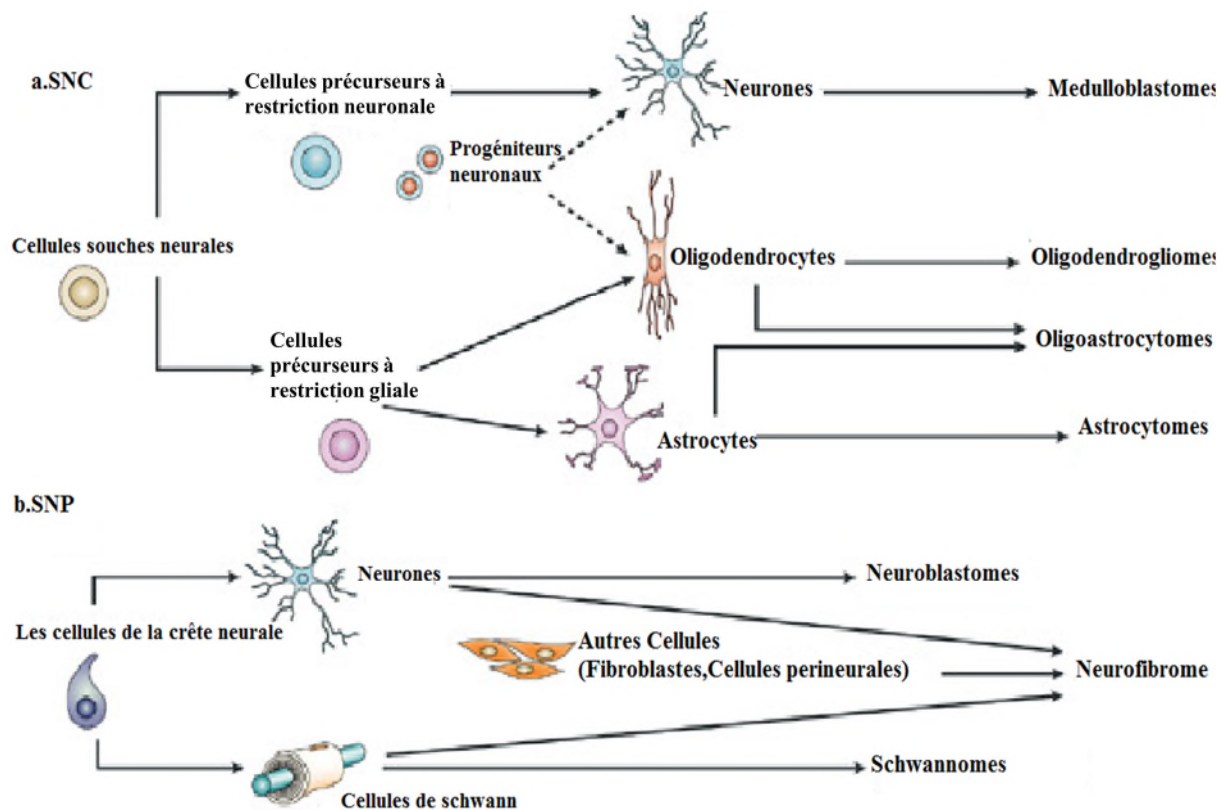


Figure 2: Schéma du développement des cellules d'origine neuroectodermiques (neurones et cellules gliales) et classification des tumeurs du SNC (a) et SNP (b) (Zhu et Parada., 2002).

Cette théorie propose que les gliomes se développent à partir de cellules pré-matures ou cellules souches par une succession de transformations génétiques. Une autre théorie présente la cellule qui donnera la tumeur comme n'ayant pas encore totalement accompli sa différenciation. La troisième théorie est basée sur l'hypothèse que les gliomes surviennent après une dédifférenciation d'un astrocyte mature, un type cellulaire prédominant dans les tissus cérébraux (**Galli et al., 2004**)

I.2.3.2. ALTERATIONS GENETIQUE ET EPIGENETIQUE

➤ Plusieurs altérations génétiques ont été identifiées éclairant l'oncogenèse des tumeurs cérébrales:

La protéine P53 peut interrompre la progression de la cellule agressée dans le cycle cellulaire pour la réparation de l'ADN, la P53 est inactive chez les gliomes, elle s'accumule dans le noyau, empêchant l'élimination des cellules par apoptose (**Hede et al., 2011**).

La codélétion 1p19q résulte d'une translocation déséquilibrée. Elle se distingue par une perte partielle du 1p et/ou 19q dont l'identification et la fonction des gènes touchés ne sont pas encore bien connus. La perte d'allèles du chromosome 19q se produit fréquemment dans les gliomes malins, suggérant que 19q est un gène dont la délétion est responsable des tumeurs gliales (**Ducray et al., 2008**).

Dans les tumeurs cérébrales, *Epidermal Growth Factor receptor* (R-EGF) est le principal oncogène. Il existe une délétion au niveau de ce gène qui correspond à la perte d'une large portion du domaine extra-cytoplasmique, dans cette forme mutante, appelée Δ EGFR, l'activité tyrosine kinase est permanente et ne nécessite plus la fixation de son ligand pour être active et confère à la cellule tumorale une augmentation de la vitesse de croissance, une inhibition de l'apoptose, une augmentation de l'invasion et de l'angiogenèse (Figure 3) (**Sanson et Taillibert, 2004**).

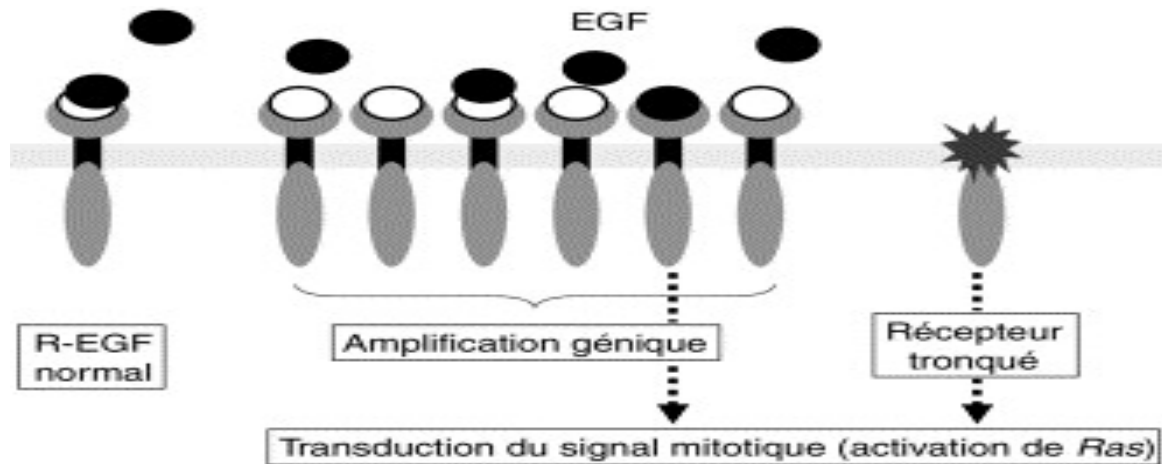


Figure 3: R-EGF en réponse à la fixation du ligand transmet un signal mitotique grâce à son activité tyrosine kinase. Il peut être activé par deux mécanismes génétiques, soit amplification génique aboutissant à une surproduction de récepteurs normaux, soit production d'un récepteur anormal, tronqué et actif de façon constitutive (Sanson et Taillibert, 2004).

Le gène suppresseur de tumeur *patched* (PTCH) code pour un récepteur transmembranaire des protéines *hedgehog* et permet l'activation de la voie de signalisation *Sonic Hedgehog* (Figure 4), voie ayant un rôle cruciale dans le développement embryonnaire et la morphogenèse du SNC. L'altération de PTCH est à l'origine d'une activation aberrante de la voie SHH qui favorise la progression des lésions précancéreuses en médulloblastomes (Watson *et al.*, 2010).

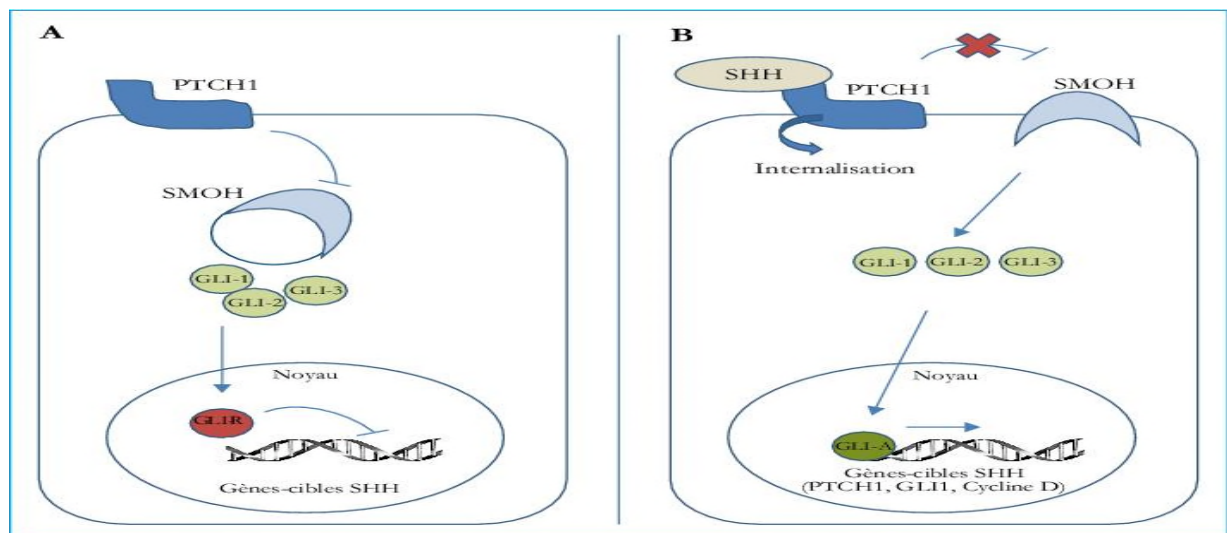


Figure 4: Représentation schématique de la voie de signalisation *Sonic Hedgehog* en l'absence et en présence ligand (Watson *et al.*, 2010) Deux récepteurs protéiques lui ont été associés, PTCH1 et SMOH A : En l'absence du ligand SHH, PTCH1 joue un rôle de répresseur en inhibant l'activité de SMOH, en empêchant sa translocation à la surface de la cellule. Lorsque SHH est sécrété, ce ligand se lie à PTCH1, induisant son internalisation et sa déstabilisation. Cela inhibe alors la fonction de répresseur sur SMOH, qui peut donc migrer au niveau de la membrane plasmique, il aboutit à l'activation des facteurs de transcription GLI.

Des mutations dans les gènes des enzymes du métabolisme isocitrate déshydrogénase IDH1 et IDH2 ont été trouvées pour être des altérations génétiques fréquentes chez les gliomes (Figure 5). Ces mutations impliquent la portion du gène codant le site catalytique de l'enzyme, entraînant ainsi une accumulation d'un métabolite, le 2-hydroxyglutarate, cette forme mutante acquiert une nouvelle spécificité qui favorise la survie cellulaire et le stress oxydatif (Choi *et al.*, 2012).



Figure 5: Forme normal et muté d'IDH1. L'α-cétoglutarate est le produit de la décarboxylation de l'isocitrate favorisée par IDH1. Le 2-hydroxyglutarate est le produit de la dégradation de α-cétoglutarate par IDH muté (Choi *et al.*, 2012).

➤ Parallèlement aux investigations génétiques, de nombreuses études analysant le profil épigénétique ont permis d'identifier des altérations moléculaires récurrentes et pertinentes sur le plan biologique (Alentorn *et al.*, 2013):

La O6-méthylguanine-DNA méthyl transferase (MGMT) est une enzyme impliquée dans la réparation de l'ADN après action des agents alkylants. Elle est engagée dans le transfert de groupements méthyl au niveau des cytosines de l'ADN qui précèdent des guanines (dinucléotides CG) (Figure 6). La méthylation des îlots CG du promoteur de MGMT inhibe la transcription du gène et l'expression de la MGMT. Une hyperméthylation concerne également de nombreux gènes suppresseurs de tumeur (p16, p14, p15) (Ducray, 2008). L'hyperméthylation du promoteur prédit la sensibilité à la chimiothérapie par agents alkylants (témozolomide), en effet, les patients dont le promoteur de la MGMT est méthylé ont une survie nettement plus longue après chimioradiothérapie que les patients non méthylés (Fiano *et al.*, 2014).

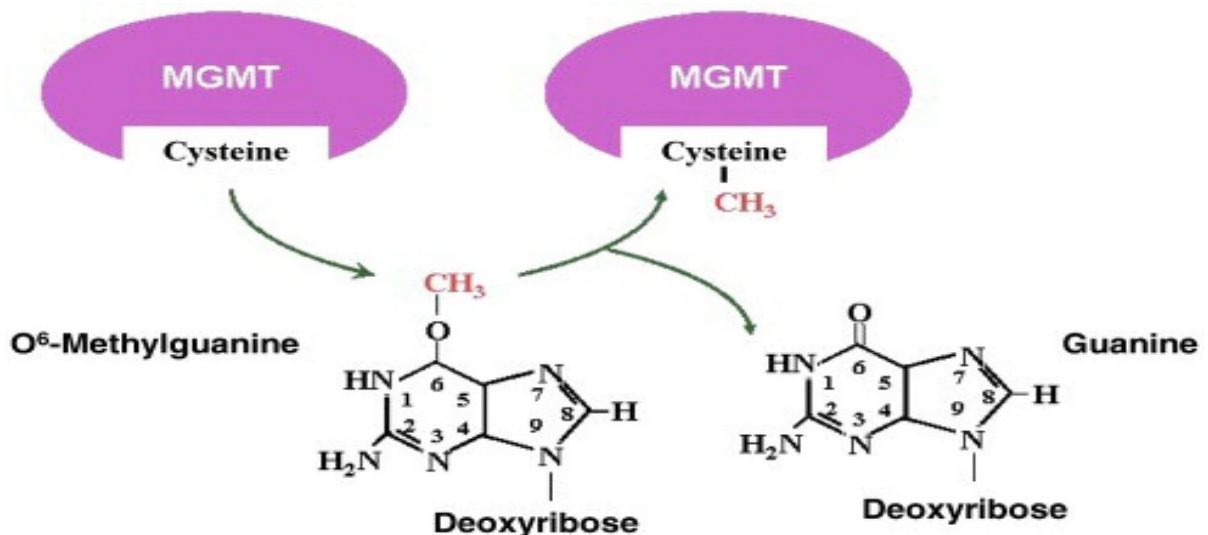


Figure 6: Action de MGMT sur une O⁶-methylguanine (Fiano *et al.* 2014). L'alkylation se fait par remplacement d'un hydrogène par CH₃ sur O₆ de la Guanine, la MGMT a pour rôle de transférer le groupe alkyl d'O₆ guanine vers une cystéine au sein de sa séquence, la protéine MGMT se détache de l'ADN et sera dégradé par ubiquitination.

Le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF, *Platelet Derivated Growth Factor*) a un éventail de spécificité tissulaire, plus étroit que celui de l'EGF, se limite aux cellules conjonctives et aux cellules gliales. la formation d'une boucle autocrine PDGF/PDGFR a été mise en cause a un stade précoce de la tumorigénèse gliale, induisant une augmentation de transduction du signal donc une prolifération cellulaire (Nazarenko *et al.*, 2012)

1.2.3.3. METASTASES CEREBRALES

Les métastases cérébrales sont des tumeurs dont l'origine est externe au système nerveux central et qui s'étend secondairement au système nerveux central, par voie hématogène ou par invasion directe des tissus adjacents (Hoang-Xuan *et al.*, 1999).

La survenue des métastases cérébrales au cours des cancers est un phénomène complexe. L'invasion du parenchyme cérébrale nécessite de traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE). L'implantation et la croissance des métastases seraient liées à une rupture de la BHE par l'intermédiaire d'une diminution de l'expression de certaines protéines des jonctions serrées comme claudine-3 et occludine, et par la sécrétion d'héparinases. De plus le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) entraîne un dysfonctionnement de la barrière endothéliale accompagné d'une augmentation de la perméabilité paracellulaire (Chargari *et al.*, 2012)

Une fois au niveau du parenchyme cérébral, les cellules cancéreuses interagissent avec les astrocytes en formant un contact de type synaptique. Le contact astrocyte-cellule tumorale induit l'expression de gènes de survie par les cellules cancéreuses, favorisant la croissance cellulaire locale (Chargari *et al.*, 2012).

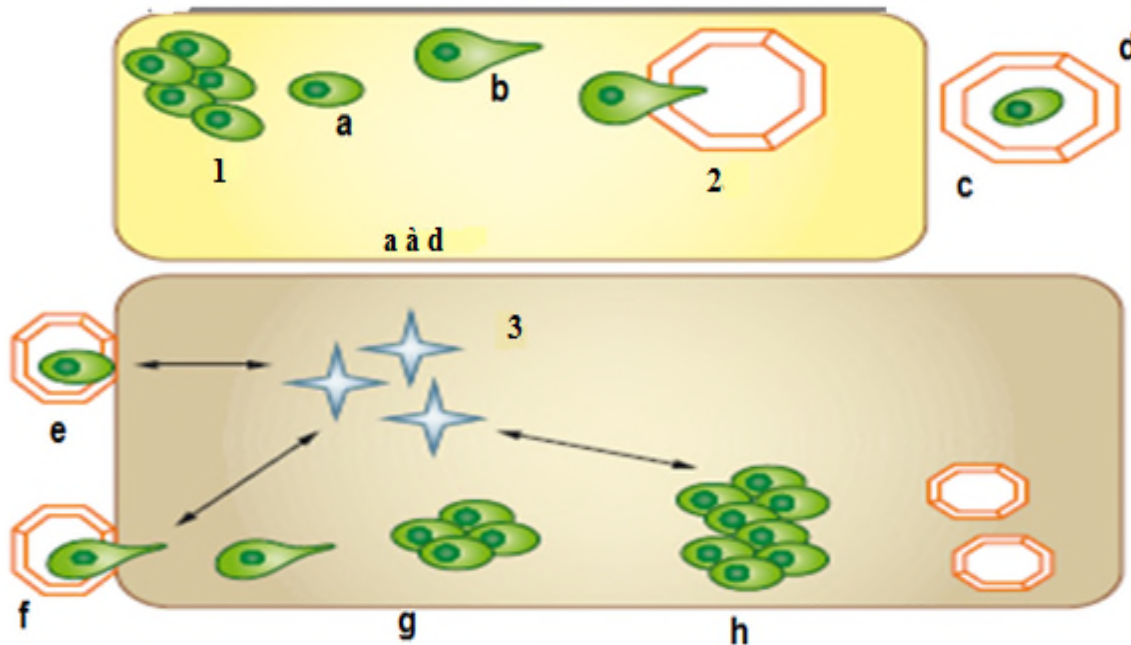


Figure 7: Cascades d'événements conduisant à une métastase cérébrale. **1:** Cellules tumorales primitives; **2:** Vaisseaux sanguins; **3:** Cellules gliales; **a:** Détachement des cellules tumorales; **b:** Migration au sein de la matrice extracellulaire du tissu; **c, d:** Passage et survie dans la circulation générale **e:** Arrêt dans la microvascularisation cérébrale et adhésion aux cellules endothéliales; **f :** Passage dans le parenchyme cérébral **g:** Prolifération et migration dans le parenchyme cérébral; **h:** Apparition d'une néo-vascularisation. Les étapes **e, f, g** et **h** sont en partie régulées par les interactions entre cellules métastatiques et tissu hôte (Chargari *et al.*, 2012).

I.2.4. INCIDENCE EPIDEMIOLOGIQUE

I.2.4.1. INCIDENCE

L'épidémiologie des tumeurs cérébrales repose sur un recueil de données hétérogènes variant selon de nombreux paramètres, de ce fait l'estimation de l'incidence de ces tumeurs est ardue. Une répartition mondiale des différents types des tumeurs cérébrales est présentée dans la figure 8 (Adam et Mokhtari, 2011).

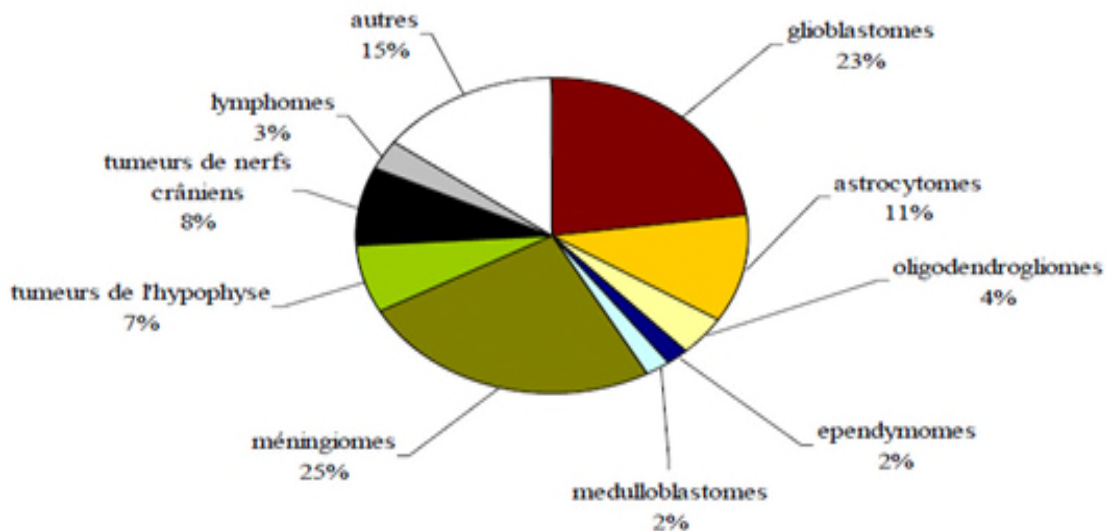


Figure 8: Répartitions des tumeurs cérébrales selon le type histologique

Les tumeurs cérébrales occupent la 17^{ème} place en termes d'incidence et 12^{ème} en termes de mortalité. L'incidence des tumeurs cérébrales en 2008 est estimée globalement (3,5/100000/an) ce qui correspond à 237 913 nouveaux cas par an dans le monde (**Chargari et al., 2012**). L'incidence des tumeurs cérébrales bénignes est (11,52/100000) et pour les tumeurs malignes (7,19/100000) (**Ostrom et Barnholtz-Sloan, 2011**).

Les oligodendrogliomes sont plus fréquente chez les adultes que chez les enfants, et atteignent un peu plus l'homme que la femme, d'un autre côté, les ependymomes atteignent essentiellement l'enfant dans 50% des cas avant l'âge de 4 ans. Le glioblastome est plus fréquent chez l'homme que chez la femme tandis que les méningiomes sont deux fois plus fréquents chez la femme (**Behin et Pradat, 2002**).

Pour le médulloblastome, les patients masculins sont plus souvent atteints que ceux de sexe féminin, tant pour la population pédiatrique que adulte. Moins de 50% des enfants atteints parviennent à l'âge adulte et 50% des adultes présentent une rechute dans les 5 ans (**Bondy et al., 2007**).

I.2.4.2. EPIDEMIOLOGIE A BEJAIA

Une étude épidémiologique a été réalisée entre juin 2012 et juin 2014 sur 210 patients au niveau du CHU de Bejaia (Algérie) représente une incidence (11/100000) par rapport à la moyenne mondiale. L'âge médian est de 39 ans. Le sex-ratio Homme/Femme est en faveurs des femmes (H/F)=0,66 (**Ghidouche et al., 2014**).

I.3. PROTEINES DU PLASMA

Le plasma sanguin contient au moins une centaine de protéines qui ont été isolées et identifiées, elles sont douées de propriétés biologiques aussi multiples que variées (voir Tableau III). En fonction de l'état physiologique et pathologique de l'individu, la protéinémie peut soit augmenter ou diminuer, indiquant ainsi une augmentation ou une diminution d'une fraction protéique ou d'un ensemble des fractions (**Estepa, 2006**).

Tableau III : Fonctions des protéines plasmatiques (**Estepa, 2006**).

Domaine	Type de protéines	Fonctions
Homéostasie sanguine	Toutes les protéines mais essentiellement l'albumine	Maintien de la pression oncotique sanguine
Transport de substances physiologiques	Fer (transferrine) Hémoglobine (haptoglobine) Médicaments (albumine) Phospholipides (apoprotéine) Cuivre (céruloplasmine)	Protéines porteuses de spécificité plus ou moins large
Régulation du métabolisme	Alpha 1 antitrypsine Antithrombine III Alpha 2 macroglobuline	Inhibiteur des protéases plasmatiques et tissulaires
Hémostase	Facteurs de la coagulation dont le fibrinogène (enzymes)	Formation du caillot de la coagulation
Système immunitaire	Immunoglobulines Fractions du complément (enzymes)	Défense humorale
Équilibre acido-basique	Toutes les protéines	Systèmes tampons sanguins

I.3.1. LES MARQUEURS TUMORAUX

Il existe des variations d'origine pathologique, qui peuvent conduire à des taux très élevés de certaines substances. Certains états cancéreux sont ainsi responsables de l'apparition ou de l'augmentation très importante des taux de certaines protéines ou peptides. Ces substances produites par les cellules tumorales ou qui accompagnent la prolifération tumorale, sont appelées marqueurs tumoraux. Les marqueurs tumoraux peuvent être des hormones, des enzymes, des glycoprotéines ou des antigènes oncofoetaux (**Alexandre, 2010**).

Le taux de marqueur peut être le reflet indirect du volume de la masse tumorale. Ainsi, un taux très élevé au moment du diagnostic est généralement significatif d'une maladie avancée. Un taux bas peut cependant aussi traduire une dédifférenciation de la tumeur. Ces marqueurs peuvent aider à améliorer la compréhension des états pathologiques (**Kalinina et al., 2011**).

La recherche du marqueur doit répondre à plusieurs critères, notamment une de discrimination complète grâce à d'excellentes spécificité et sensibilité, (discernable seulement dans un type de tumeur et non détectable dans les états physiologiques), standardisée et reproductible avec des limites de référence clairement définies (**Sharma, 2009**).

I.3.1.1. BIO MARQUEURS DES FLUIDES BIOLOGIQUES

Les bios fluides tels que le plasma, l'urine et le liquide céphalo-rachidien, ont joués un rôle de première importance dans le domaine de découverte des bios marqueurs. Le plasma ou le sérum représente un échantillon idéal pour l'analyse protéomique pour sa facilité de prélèvement. En effet, il contient les hormones, les facteurs de croissance, des neuropeptides et les neurotransmetteurs qui fournissent des informations précieuses concernant le courant état de santé ou de maladie et les nombreux processus qui ont lieu dans le corps (**Biosa et al., 2011**).

Il apparaît donc particulièrement intéressant d'évaluer l'impact de ces pathologies au niveau du sang, toute modulation de l'équilibre physiologique peut générer une réponse entraînant une modification d'expression de certains gènes et protéines, dont l'expression dans le sang circulant reflétera la réponse de l'organisme face à l'agression et permettra d'identifier des signatures spécifiques d'une situation pathologique donnée et éventuellement de détecter de nouvelles cibles thérapeutiques (**Henry et Hayes, 2012**).

En pratique, bien qu'un grand nombre de marqueurs présomptifs ait été identifié, peu d'entre eux ont été promus et recommandés pour une utilisation (Tableau IV). Leur utilisation est actuellement limitée le plus souvent à l'établissement du bilan initial du cancer (valeur de référence), à l'évaluation de l'efficacité thérapeutique et à la surveillance d'une récurrence (**Gaucher, 2013**).

Tableau IV: Marqueurs utilisés dans le dépistage, diagnostic et/ou la surveillance de cancers (Gauchez, 2013). ACE: antigène carcino embryonnaire, NSE: neuron specific enolase, PSA: prostate specific antigen, β -HCG: hormone chorionique gonadotrope, CA15-3: antigène cancer, AFP: L'alpha-foetoprotéin.

<i>Marqueurs</i>	<i>Utilisation</i>	<i>Cancers cibles</i>
AFP	Diagnostic ou surveillance	Foie, testicule
Thyroglobuline	Surveillance	Pathologie thyroïdienne
β -HCG	Diagnostic ou Surveillance	Choriocarcinome placentaire/testiculaire Autres tumeurs germinales
NSE	Diagnostic/Surveillance	Cancer bronchique, Neuroblastome
Thyrocalcitonine	Diagnostic, Dépistage	Cancer médullaire thyroïde
PSA	Diagnostic, Dépistage	Adénocarcinome prostatique
CA15-3	Surveillance	Sein, Colorectal, ovaire, pancréas, hépatobiliaire

I.3.1.2. BIO MARQUEURS DES TUMEURS CEREBRALES

Les tumeurs cérébrales est un groupe hétérogène résultant de facteurs multiples, ce qui rend difficile l'utilisation un marqueur biologique unique pour son évaluation. Le nombre de marqueurs identifiés, cependant, a été limité (Tableau V) leur reproductibilité entre les études est peu claire (Yoshimoto *et al.*, 2012).

La découverte d'un marqueur spécifique est toujours un objectif principal pour l'évaluation des tumeurs cérébrales.

Tableau V: Applications clinique des bios marqueurs des tumeurs cérébrales (**Yoshimoto et al., 2012**) MGMT: O6-méthylguanine-DNA méthyl transferase, IDH: isocitrates déshydrogénase, EGFR: receptor epithelium growth factor, PDGFR: receptor platelet-derived growth factor. MGMT, IDH, EGFR, et PDGFR: marqueurs protéiques. Co-délétion 1p19q: marqueur génomique.

<i>Marqueurs</i>	<i>Applications clinique</i>
Méthylation promoteur MGMT	Diagnostic/pronostic
Mutation IDH 1 / 2	pronostic
Co-délétion 1p19q	Diagnostic/pronostic et prédictif
Amplification EGFR / Mutation	Diagnostic/pronostic et prédictif
PDGFR	pronostic

I.3.2. APPROCHE PROTEOMIQUE

Le protéome, terme proposé en 1995 par M.R. Wilkins désigne l'ensemble des protéines exprimées par le génome d'une cellule, d'un tissu ou d'un organe. L'analyse protéomique consiste à caractériser de manière quantitative et qualitative les protéines présentes dans un échantillon biologique obtenu dans des conditions définie (**Lopez, 2005**).

En cancérologie, l'analyse protéomique permet, en théorie, l'identification de profils protéiques et de marqueurs biologiques pour le diagnostic et prédire l'évolution tumorale (**Wulfschlegel et al., 2003**).

I.3.2. 1.METHODES COLORIMETRIQUES

De nombreuses méthodes colorimétriques ont été mises au point pour le dosage des protéines. Le principe repose sur un changement de couleur, au contact des protéines, que l'on peut quantifier par spectrophotométrie.

➤ Méthode du Biuret

La réaction de Biuret est la formation d'un complexe pourpre entre le Biuret (NH₂-CO-NH-CO-NH₂) et deux liens peptidiques consécutifs en présence de cuivre en milieu alcalin. Le complexe résultant absorbe fortement dans le bleu. Les protéines peuvent être dosées par colorimétrie à 540 nm (**Gavrilovic et al., 1999**).

➤ **Méthode de Lowry**

Cette méthode combine une réaction au Biuret et une réaction au réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier, réagit avec les tyrosines et les tryptophanes, pour donner une coloration bleue qui s'ajoute à mesuré entre 650 et 750 nm (**Lowry et al., 1951**).

➤ **Méthode de Bradford**

La méthode de Bradford utilise le bleu de Coomasie, sous sa forme cationique libre, ce réactif absorbe la lumière à une longueur d'onde de 465nm. Lorsqu'il est mis en contact avec une solution protéique à doser, il se lie aux protéines présentes et aux groupements aromatiques ce qui a pour effet de déplacer sa principale raie d'absorption à 595nm (**Bradford, 1976**).

Les méthodes de dosage des protéines totales sont nombreuses et présentent chacune des caractéristiques différentes, la méthode de Bradford est une méthode très sensible (2-5 µg de protéines) et très rapide. Elle est aussi assez résistante à la plupart des interférents qui nuisent à la plupart des autres méthodes.

I.3.2.2. TECHNIQUES QUANTITATIVES ET ANALYTIQUES

De nombreux procédés biochimiques permettent le fractionnement des molécules biologiques en fonction de leur charge nette ou de leur poids moléculaire, le choix dépend des caractéristiques recherchées (**Sollasol et al., 2005**).

➤ **Electrophorèse**

L'électrophorèse sépare les protéines par le passage du courant électrique, la vitesse de migration dépend non seulement de la charge des protéines, de leur taille et de leur forme mais aussi des conditions expérimentales de tels que le pH, la composition des solutions et le support électrophorétique. L'électrophorèse dodécylsulfate de sodium sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) décrite par Laemmli (1970) est utilisée en raison de sa haute résolution dans la séparation des protéines. Le procédé SDS-PAGE consiste à séparer les protéines selon leurs poids moléculaires, par migration, sous l'effet d'un champ électrique. Elle s'effectue en conditions dénaturantes, avec un détergent, le dodécylsulfate de sodium SDS

➤ **Chromatographie**

La chromatographie utilise la différence d'affinité des protéines entre une phase mobile et une phase stationnaire. La *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) est l'une des méthodes les plus utilisées. Suivant la nature des deux phases utilisées, les éléments à séparer se répartissent de façon sélective, cette technique s'applique à des produits de hautes masses moléculaires, non volatiles, elle nous renseigne sur la présence ou l'absence de certaines substances en obtenant un chromatogramme qui présente le temps de rétention de chacun des constituants (Mitulović et Mechtler., 2006).

➤ **Spectrométrie de masse**

Permet d'identifier ces protéines par la génération d'ions chargés en phase gazeuse par la source *Electro spray ionisation* (Esi) ou *Matrix assisted-laser desorption/ionisation* (Maldi) à partir d'analytes non volatiles. La séparation de ces ions se fait dans l'analyseur *Time of flight* (Tof), et la détection par un photomultiplicateur. On fait appel à l'analyse d'images et à la bioinformatique. L'approche protéomique est fondée sur le couplage de ces technologies (Sollasol *et al.*, 2005)

II.1 .CARACTERISTIQUES DES ECHANTILLONS

Ce travail a été réalisé sur 14 échantillons sanguins présentant des tumeurs cérébrales et des témoins (sujets non tumoraux et un témoin absolu). Les échantillons collectés appartiennent aux patients admis au service de neurochirurgie du CHU Khelil Amrane de Bejaia. La partie expérimentale de ce mémoire a été réalisé au laboratoire de méthodes chimiques d'analyse et au laboratoire de Biochimie (enzymologie), Université Abderrahmane Mira de Bejaia.

Le Tableau ci-dessous représente les caractéristiques des échantillons de notre étude:

Tableau VI: Caractéristiques des échantillons. *, Tumoraux; **, Non Tumoraux, F: Femelle, M: Male. L'âge moyen des patients non tumoraux y compris le témoin absolu est de 71,31 \pm 7,79 avec un sex ratio de 1,25. Tandis que pour les patients tumoraux est de 66,92 avec un sex ratio de 1,5

N°échantillons	Age (ans)	Sexe (F/M)	Type de la pathologie
T*197	56	F	Méningiome
NT**201	52	M	Compression médullaire
NT214	53	M	Hémorragie méningé
NT217	22	F	Hydrocéphale bénigne
NT223	4	F	Hydrocéphale bénigne
NT248	4	M	Hydrocéphale
T271	53	M	Méningiome
T210	60	M	Tumeur intracrânienne
T250	46	F	Adénome hypophysaire
NT273	30	M	Traumatisme crânien
NT309	69	F	Malformation
NT315	66	M	Hématome sous-dural
T329	21	M	Tumeur intracrânienne
Témoin absolu	23	F	/

II.2. MATÉRIELS

➤ Appareillages et réactifs chimiques:

L'appareillage et les réactifs chimiques utilisés dans le présent travail sont cités dans l'annexe II.

➤ Matériels biologiques:

Les échantillons du sang veineux ont été prélevés dans des tubes héparinés à partir de patients atteints de tumeurs cérébrales et des témoins, ils ont été soumis ensuite à une centrifugation de 10 min à 1500 rpm (rotations par minutes) à 4°C. Les plasmas sont récupérés puis conservés à 4°C (voir erratum page 28).

II.3. MÉTHODES

II.3.1 DOSAGE DES PROTÉINES

Le dosage de protéines par la méthode de Bradford utilise le réactif dont le constituant principal est le bleu de Coomassie G250. L'absorbance du rayonnement visible à 595nm est mesurée par un détecteur spectrophotométrique, et permet de doser la teneur en protéines de la solution à l'aide d'une courbe d'étalonnage du sérum albumin bovin (BSA) (**Bradford, 1976**).

Le dosage consiste à ajouter au plasma diluer au 50ème, le réactif de Bradford (voir annexe III). Après homogénéisation, le mélange est incubé pendant 20 min à l'obscurité, et la lecture des absorbances est mesurée à 595 nm avec un spectrophotomètre.

La concentration de la solution mère de BSA est de 1 mg. ml⁻¹(voir annexe III)

II.3.2. ELECTROPHORESIS SDS-PAGE

Dans le but d'analyser le profil protéique de nos différents échantillons, nous avons utilisé la technique du SDS-PAGE selon le protocole de Laemmli, (1970). Le dispositif d'électrophorèse (Figure 9) est utilisé pour la préparation des mini gels. La manipulation nécessite une cuve à électrophorèse, un générateur électrique, un gel de polyacrylamide et des solutions tampons adaptées au gel.

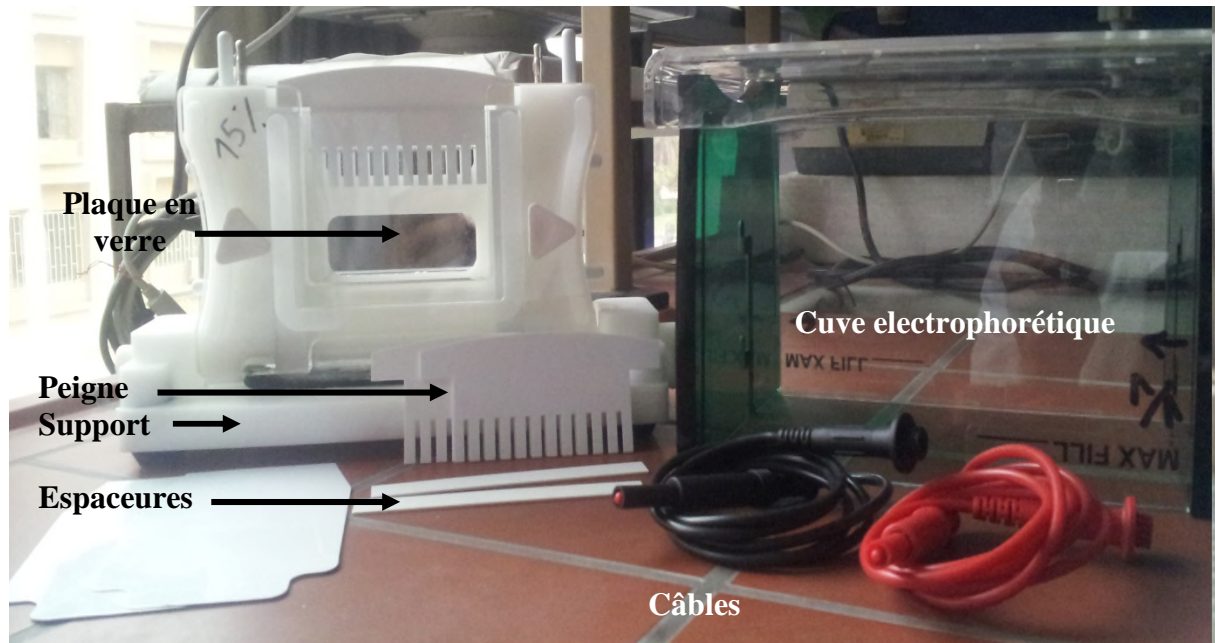


Figure 9: Image du dispositif d'électrophorèse

II.3.2.1. PREPARATION DES ECHANTILLIONS

La dénaturation consiste à ajouter (v/v) du plasma et du tampon de Laemmli dont les constituants sont présentés dans l'annexe IV. Le contenu de chaque tube est vortexé puis placé dans un bain marie à 95°C pendant 5 min.

Le SDS contenu dans le tampon de dénaturation confère une charge globale négative élevée aux protéines tandis que le β -mercaptoéthanol réduit les ponts disulfures. Puisque toutes les protéines ont la même forme générale cylindrique, l'ajout de ces deux composés élimine les différences dues à la forme des protéines au niveau des effets de tamisage. La mobilité devient seulement en fonction de la masse moléculaire et non de la forme.

La plupart des protéines n'absorbent pas dans les longueurs d'onde visible, elles ne seront donc pas visibles durant la migration. Pour s'assurer que les protéines ne soient pas éluées dans le réservoir inférieur, un colorant anionique de faible masse moléculaire, le bleu de bromophénol, est ajouté aux protéines.

Le glycérol qui présent dans le tampon de dénaturation donne une forte densité aux dépôts, ce qui les fait couler au fond des puits.

II.3.2.2. PREPARATION DES GELS

Deux types de gels sont préparés lors de ces manipulations. Un gel de séparation (10% et 15%) permettant le fractionnement des différentes protéines et des sous-unités protéiques selon leurs poids moléculaires, et un gel de concentration à 5% qui retient les impuretés et tasse les protéines. Les constitutions de ces 2 gels sont présentées dans l'annexe IV.

En premier lieu le gel de séparation est coulé entre les deux plaques. Ensuite, une fine couche d'acétone est coulée pour égaliser la surface du gel et pour éviter son contact avec l'air.

Après la polymérisation. L'acétone est éliminé, le gel de concentration est coulé, le gel de concentration comprend les zones de dépôt des échantillons établi par un peigne.

Les gels de polyacrylamide sont obtenus par polymérisation du monomère acrylamide en présence d'un autre monomère bifonctionnel et donc réticulant, le N,N'-méthylène bisacrylamide. La polymérisation est initiée par du persulfate d'ammonium en présence de l'accélérateur TEMED (N,N,N',N'-tétraméthylènediamine) qui catalyse la formation de radicaux libres à partir du persulfate. Les radicaux libres initient la polymérisation. La porosité des gels obtenus dépend de la concentration totale en monomères et de la proportion d'agent monomère réticulant (le bisacrylamide). On appelle T la concentration totale en monomères, et on appelle C la proportion d'agent réticulant La porosité diminue quand T augmente.

II.3.2.3. MIGRATION

Une fois bien polymérisé, l'ensemble des deux plaques est placé dans la cuve. On procède à la préparation de 1,5 Litre de tampon de migration (annexe IV). Celui-ci est versé dans les bacs supérieur et inférieur de l'appareil ce qui permet la conduction ionique

On dépose les échantillons protéiques dans les puits. La cuve d'électrophorèse est montée entièrement et branchée à un générateur de courant continu qui délivrera un courant électrique de 30mA à 100 Volts de façon régulière.

L'utilité de ce tampon réside dans le fait que les protéines vont se déplacer rapidement dans le gel de concentration et s'accumuler à l'interface, ce qui augmente la résolution.

A l'interface gel de concentration / gel de séparation, les protéines ne peuvent plus toutes se déplacer à la même vitesse à cause de l'effet de tamassage du gel plus concentré et donc elles se séparent dans le gel de séparation.

II.3.2.4. COLORATION ET DECOLORATION

L'électrophorèse est arrêtée lorsque le front de migration, représenté par le bleu de bromophénol approche de l'extrémité inférieure du gel de séparation. Le gel est démoulé, éliminer de sa partie de gel concentration.

Les protéines sont fixées dans le gel par une solution de coloration (voir annexe IV) qui dénature de manière irréversible les protéines dans les mailles du gel. Le gel est coloré pendant 45 minutes sous agitation à température ambiante. Les protéines sont révélées par le bleu de Coomassie R250.

Après la coloration, le gel est immergé dans plusieurs bains (3 à 4 fois) de solution de lavage (voir annexe IV) jusqu'à retrouver un fond incolore.

III. 1. TENEURS PROTEIQUES

Nos résultats sont présentés par âge et par sexe sur un total de 14 échantillons. Notre série d'échantillons comprend six femmes et huit hommes soit respectivement 43% et 57%, avec un âge moyen de 40 ans.

Les tumeurs cérébrales sont associés à une rupture de la barrière hémato-encéphalique, des protéines/peptides peuvent apparaître dans le plasma, dans ce contexte, nous avons analysé le niveau des protéines plasmatique des échantillons cas et témoins, pour une possibilité de diagnostic et le suivi de la maladie.

Le résultat du balayage nous a permis l'utilisation du réactif de Bradford avec les différentes concentrations de BSA. Les absorbances à 595 nm obtenues pour ces dernières sont représentées dans le tableau suivant:

Tableau VII: les Absorbances et Δ Absorbance des différentes concentrations de BSA

Concentrations (mg/ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Absorbances	0,434	0,525	0,648	0,759	0,837	0,949
Δ Absorbance	0	0,091	0,214	0,325	0,403	0,515

Une courbe étalon pour le dosage des protéines est obtenue d'après les résultats du tableau ci-dessus. La courbe d'étalonnage (Figure 10) nous permet ainsi d'obtenir les concentrations en protéines de nos différents échantillons.

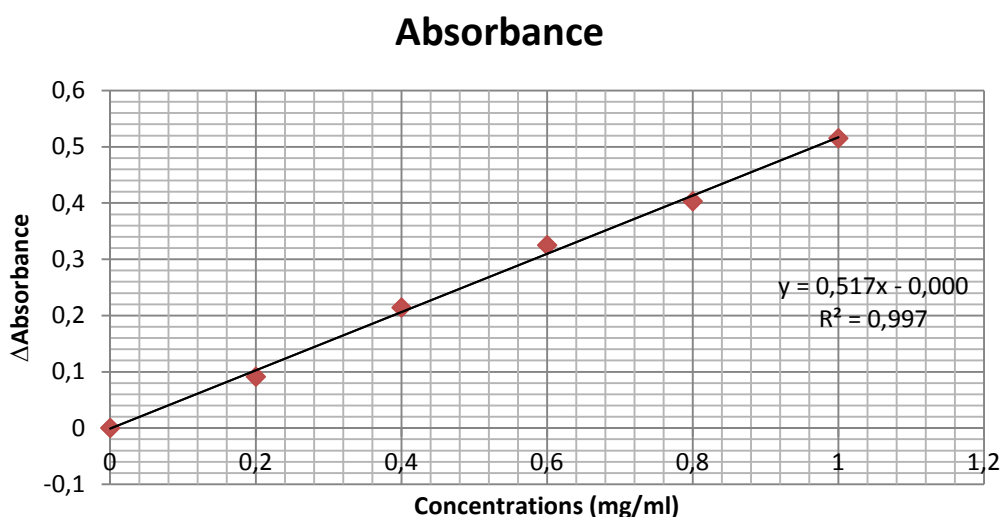


Figure 10: Courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines

Les résultats des concentrations protéiques des différents échantillons de notre étude sont présentés dans le tableau ci-dessous:

Tableau VIII: La teneur protéique de chaque échantillon

N°échantillons	\bar{X} Absorbances	Concentration de la solution mère ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
T197	0,692	66,92
NT201	0,883	85,39
NT214	0,679	65,66
NT217	0,706	68,27
NT223	0,686	66,34
NT248	0,706	68,27
T271	0,664	64,21
T210	0,718	69,43
T250	0,689	66,63
NT273	0,816	78,91
Témoin absolu	0,879	85,00

Blanc=0,641

NT309	0,708	68,47
NT315	0,691	66,92
T329	0,729	65,28

Blanc=0,447

Nos résultats montrent que la totalité des individus analysés présentent des protéinémies normales comprises entre 64,21 et 85,39 mg/ml. En effet, selon **Estepa (2006)** les valeurs référentielles pour une personne adulte et saine, sont comprises entre 64 à 83 mg/ml tandis que chez les enfants de plus de 3ans, la protéinémie totale varie de 60 à 80 mg/ml.

La comparaison des taux protéiques entre les témoins et les tumoraux ne montre aucun changement significatif entre ces deux cohortes. En effet, ces résultats sont confirmés par l'analyse statistique en utilisant le logiciel d'analyse GraphPad Prism (Figure 11).

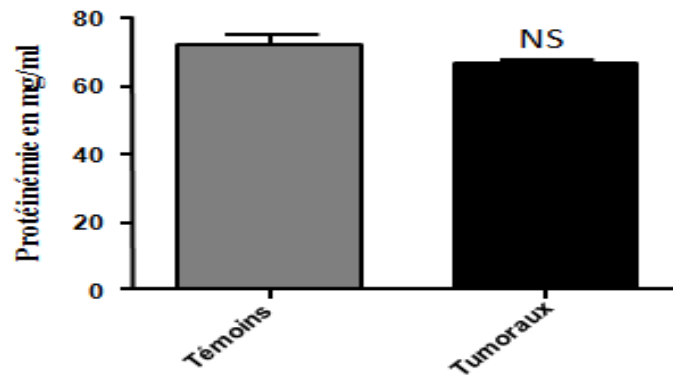


Figure 11: Variation de la protéinémie totale entre les témoins et tumoraux. L'analyse statistique a été réalisée par le test de *Mann-Whitney* en comparant les concentrations protéiques des témoins et tumoraux. Les valeurs sont en moyenne \pm écart type. Témoins, $n=9$ avec 72.34 ± 8.38 ; tumoraux, $n=5$ avec 66.92 ± 1.53 . Ce résultat est représentatif d'une seule expérience. NS, $p > 0.005$.

Aucune différence significative des concentrations des protéines totales n'est retrouvée entre les témoins et les tumoraux ($p > 0.005$). Les concentrations varient entre 64,28 et 85,35 mg/ml et sont conformes aux normes.

L'âge et le sexe ont été utilisés comme variables continues. La corrélation de ces deux facteurs avec la protéinémie totale au sein des patients tumoraux est représentée dans la figure ci-dessous (Figure 12).

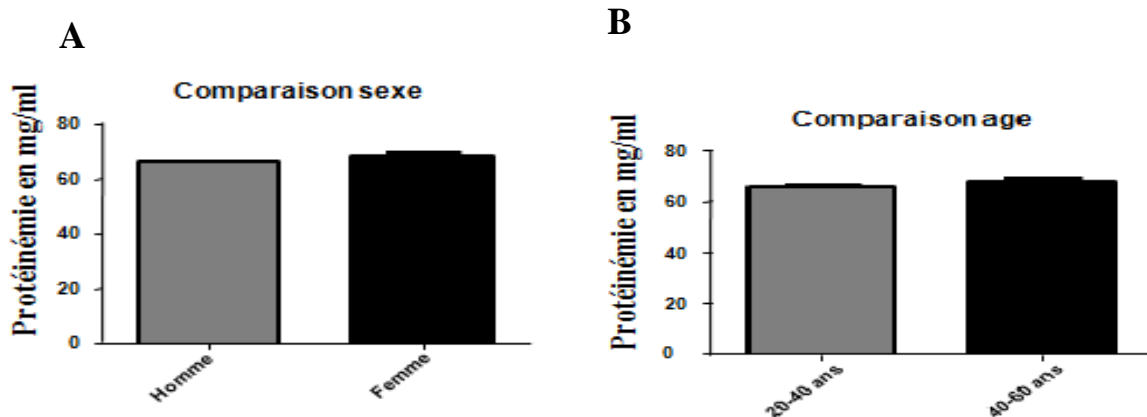


Figure 12: Histogrammes illustrent les variations de la protéinémie totale entre tumoraux selon le sexe (A) et l'âge (B). L'analyse statistique a été réalisée par le test de *Mann-Whitney*. A, Hommes, $n=3$; Femmes, $n=2$. B, 20-40 ans, $n<3$; 40-60 ans, $n=3$. Les valeurs sont représentées en moyenne \pm écart type. Les données présentées sont représentatives d'une seule expérience.

Le taux des protéines totales ne varie apparemment pas selon l'âge et le sexe. Toutefois, l'effectif restreint ne nous permet pas de confirmer, ni d'infirmer ce résultat que par une analyse statistique, de ce fait il serait préférable d'accroître le nombre d'échantillons pour une étude plus approfondie.

Des travaux antérieurs, ont rapportés que les concentrations des protéines totales chez les patients atteints de tumeurs cérébrales étaient dans les normes, ce qui est conforme à nos résultats (**Han et al., 2015; Dawani et Tayyab, 1992 et Dawani et al., 2002**).

Cette protéinémie normale des tumoraux est probablement due aux protéines les plus abondantes (albumine et immunoglobuline), qui ont-elles seules, ont un effet significatif sur la concentration totales des protéines plasmatiques. De plus, d'un point de vue quantitatif, les protéines majeurs telles que l'albumine, les immunoglobulines ont tendance à masquer les protéines mineurs (**Tirumalai et al., 2003**). En effet, dans une étude parallèle le taux de la progesterone est retrouvé élève chez le patient T271 alors qu'il possède une protéinémie dans les normes.

L'élimination des protéines à grande abondance par des procédures pré analytiques spécifiques peuvent être utile dans une analyse sanguine. Celles-ci peuvent inclure des techniques de préfractionnement. Cependant, il est possible qu'un nombre importants de protéines ou de peptides de faible poids moléculaires soit enlevé de façon concomitante par ces procédés (**Tirumalai et al., 2003**).

Par ailleurs, une autre alternative peut être envisagée. Ainsi Dawani et collaborateurs (2002) ont effectué le dosage des différentes fractions protéiques séparément: albumine, $\alpha 1$ globuline, $\alpha 2$ globuline, β globuline et γ globuline, le taux d'IgG est retrouvé significativement faible dans le sérum chez des patients atteints de tumeurs cérébrales.

D'après les résultats obtenus dans notre étude, le dosage des protéines totales dans le plasma ne peut apparemment pas aider au diagnostic des tumeurs cérébrales. Des travaux effectués par l'équipe de Syeda en 2013, montrent que les taux protéiques totaux pré-et post opératoires des patients atteints de tumeurs cérébrales étaient dans les normes physiologiques, ne permettant pas ainsi de prédire l'évolution de la maladie.

Dans une étude parallèle, Aucune différence de la protéinémie n'est retrouvée chez les patients atteints de tumeurs cérébrales, cependant le taux protéique du LCR varie selon l'âge, de ce fait des études plus approfondies peuvent être mené sur ces derniers.

Cependant, même si les concentrations des protéines totales sont normales, on peut avoir un dysfonctionnement au niveau de la répartition des différentes fractions protéique. Il est donc préférable d'effectuer une analyse des profils protéiques.

III.2. PROFILS ELECTROPHORETIQUES

Afin de déterminer les profils protéiques des patients atteints de tumeurs cérébrales, nous avons utilisé la technique du SDS-PAGE. Cette étude a porté sur 14 échantillons dont cinq tumoraux et neuf témoins. Cinq expériences sur gel de 10%, et quatre sur gel de 15 % ont été réalisées. Les résultats les plus représentatifs sont illustrés dans les figures 13, 14.

Pour plus de clarté, nous avons subdivisées les images des gels en zone (a), zone (b) et zone (c). La zone (a) présente un signal non spécifique, tandis que la zone (b) représente des bandes très intense et bien focalisé. Enfin la zone (c) représente des bandes de faibles intensités, celle-ci nous a permis de donner à chaque profil sa particularité en termes de signal.

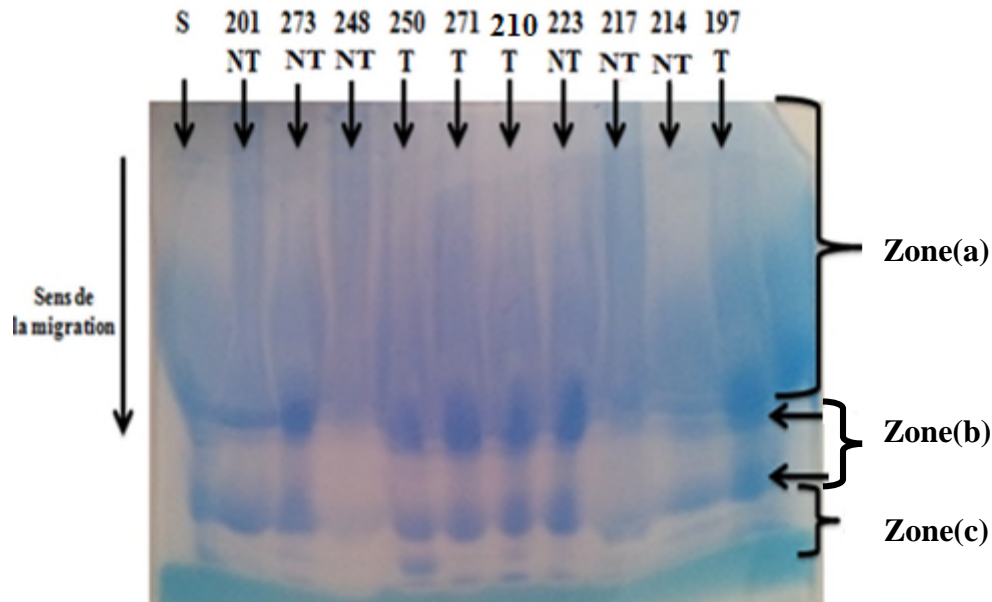


Figure 13: Profil électrophorétique (gel 10%) obtenu par SDS-PAGE des échantillons de plasma de sujets tumoraux (T): 250, 271, 210, et 197, et non tumoraux (NT): 273, 248, 223, 217, 214, 201 et un témoin sain.

Il faut noter que, le gel de 10 %, ne permet pas une bonne identification des protéines à faible poids moléculaire de ce fait, nous avons décidé d'effectuer un gel de 15% afin d'augmenter la résolution et de mettre en évidence d'éventuelles bandes de faible poids moléculaire (voir figure14).

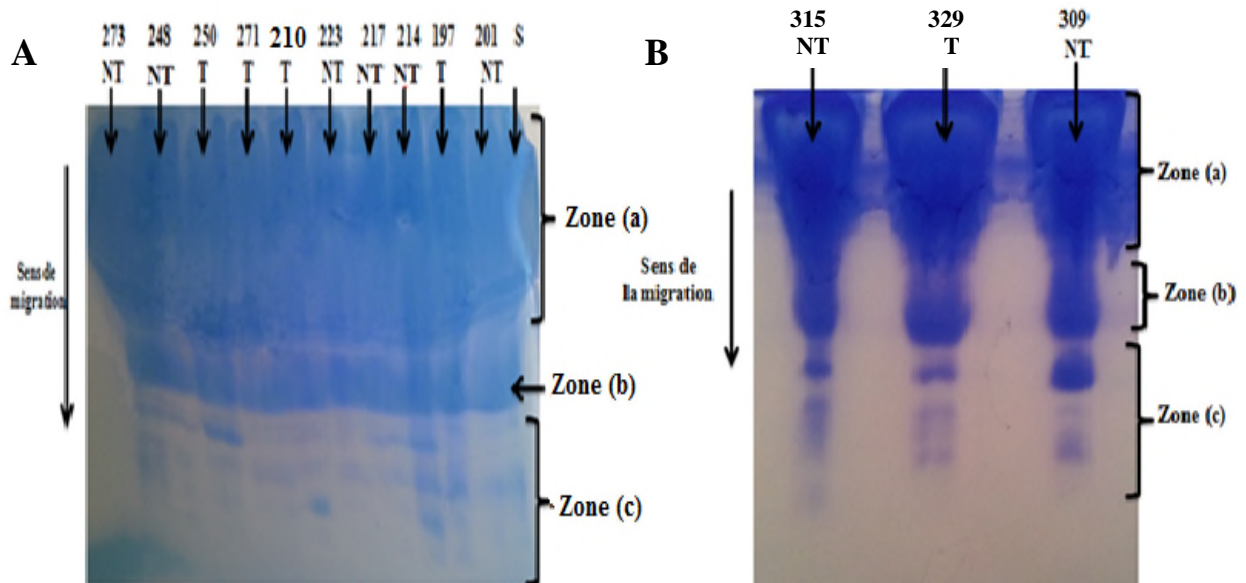


Figure 14: Profil électrophorétique (gel 15%) obtenu par SDS-PAGE des échantillons de plasma de sujets tumoraux. A: (T): 250, 271, 210, et 197, et non tumoraux (NT): 273, 248, 223, 217, 214, 201 et un témoin sain. B: (T): 329 et non tumoraux (NT): 309 et 315.

Pour mieux analyser les résultats obtenus, un schéma récapitulatif de l'ensemble des zones (b) et (c) est donné dans la figure 15.

F	M	M	M	F	M	M	F	F	M	F	M	M	F	S
23	52	30	4	46	53	60	4	22	53	56	21	66	69	A
S	201	273	248	250	271	210	223	217	214	197	329	315	309	N°
/	CM	TC	HC	AH	M	TIC	HB	HB	HM	M	TIC	HSD	MF	T
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
—		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	15%
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	

Figure 15: Schéma récapitulatif de l'ensemble des zones (b) et (c). CM: compression médullaire; TC: traumatisme crânien; HC: hydrocéphalie; AH: adénome hypophysaire; M:meningiome; TIC: tumeur intracrânienne; HB: hydrocéphalie bénigne; HM: hémorragie méningée; HSB: hématome sous dural; MF: malformation. F: femelle, M: male, S: sexe, A: âge, N: numéro du patient; T: type de tumeur. les numéro motionné en rouge représente les patients tumoraux.

- Bande foncé: taux de protéine élevé
- Bande clair: taux de protéine réduit
- Bande très claire: taux faible de protéine

L'analyse des profils protéiques obtenus pour les différents échantillons, présente d'une manière générale une certaine homogénéité des profils. Toutefois, des différences au niveau de l'intensité du signal, procure aux profils une certaine spécificité.

Nos résultats montrent que les deux patients T271 et NT223 présentent une similitude parfaite, ce qui permet d'émettre l'hypothèse que le sujet T271 présente les mêmes facteurs de croissance que le patient NT223 de 4 ans. Toutes fois une différence de profil existe lorsque l'on compare ces deux profils à celui du témoin sain. Par conséquent, l'analyse par profil protéomique peut nous indiquer qu'il existe une pathologie sans pour autant nous permettre de diagnostiquer précisément sa nature.

Ainsi, nous constatons une certaine similarité entre les profils protéiques des patients T250, NT248, NT273, T271, NT223, NT309 (voir figure16). Cependant l'intensité du signal diffère d'un patient à un autre spécifiquement au niveau de la bande A (voir figure). L'intensité de la bande reflète sa concentration plasmatique.

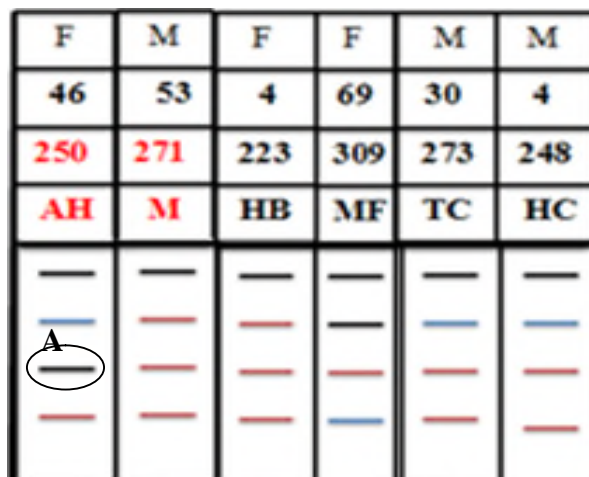


Figure 16: Ensemble des profils T250, T271, NT223, NT309, NT273, NT248.

Dans une étude parallèle, les dosages hormonaux montrent que les taux de FSH, LH sont élevé chez ce même patient T250 qui est atteint d'un adénome hypophysaire. Ces résultats mis ensemble laisse penser qu'il existerait donc un profil protéomique spécifique des adénome hypophysaire potentiellement correspondant à la sous unités β -LH (PM=20.5 Kda) ou à la β -FSH (PM=30Kda) (Demura *et al.*, 1977) Toutefois des études montrent que la β -HCG, une hormone de croissance à faible poids moléculaire (PM=22.2 Kda) est présente à des taux élevé chez les adénomes hypophysaire (Doyle *et al.*, 2009). Il serait donc intéressant d'inclure cette protéine dans les prochains dosages hormonaux de nos échantillons sanguins.

D'un autre coté, les deux patients atteints de méningiome T197 (patient féminin) et T271 (patient masculin) présentent des profils distincts. En effet, il existe une disparité des bandes. Cependant étant que les deux patients sont du même âge (56 et 53) il est probable que cette différence soit liée au sexe (voir figure 17. A)

Une différence de profil est notamment observée chez les deux patients T210 et T329 qui sont tout les deux atteints d'une tumeur intracrânienne. En effet, d'une part cette dissemblance se manifeste par un signal spécifique qui apparait chez le patient T210 (figure 17.B). D'autre part le patient T329, présente un signal spécifique qui n'apparait pas chez les autres patients. Etant donné, que nos patient sont du même sexe mais de groupe d'âge différent, cette différence de profil peut être due aux différences liés à l'âge.

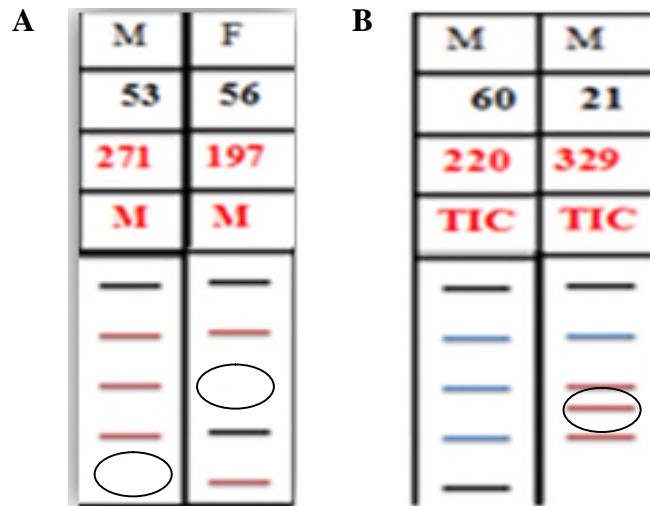


Figure 17: Ensemble des profils A: T271, T197. B: T210, T329.

CONCLUSION ET PERSPECTIVE

A l'issu de ce travail, portant sur l'établissement d'une bio-signature à partir des profils d'expression protéique de témoins et patients atteints de tumeurs cérébrales, nous avons pu dans un premier temps montrer que le taux des protéinémies ne varie pas entre les patients atteints de tumeurs cérébrales et les témoins, la protéinémie reste dans les normes physiologiques quelque soit l'âge ou le sexe ,Comme nous l'avons déjà mentionné, cela est dû probablement à la dominance d'un groupe protéique majoritaire. Les résultats obtenus dans ce contexte révèlent que le dosage des protéines totales dans le plasma ne peut prédire l'état pathologique d'un patient atteint de tumeurs cérébrales.

Les premières investigations qui se sont portées sur l'étude des profils protéiques des patients atteints de tumeur cérébrale et de témoins révèlent qu'on ne peut poser un premier diagnostic entre les patients tumoraux et non tumoraux, les profils présentent une certaine homogénéité (nombre de bandes) mais l'intensité des bandes différent entre les patients. D'un autre coté, le sexe et l'âge pouvait affecter les résultats des profils électrophorétique, notre approche expérimentale s'avère être prometteuse pour l'identification d'une bio-signature caractéristique des tumeurs cérébrales ce qui permettra dans le long terme de poser un diagnostic et pronostic précoce, précis et peu coûteux de ces pathologies.

Pour cela et en perspectives de ce travail, il serait intéressant:

- D'accroître l'effectif de l'étude afin de mettre en évidence les différences dû à l'âge et au sexe, et de confirmer ou d'infirmer nos résultats obtenus
- D'étudier les protéomes sérique avec des techniques de préfractionnement tel que la chromatographie d'affinité qui permettra la réduction de la complexité de l'échantillon, dans le but d'appauvrir le niveau des protéines abondantes, ce qui facilite la reconnaissance des protéines qui présentent des différences d'expression entre les témoins et les patients.
- Diriger l'analyse protéomique vers des procédés beaucoup plus spécifique en utilisant l'électrophorèse bidimensionnelle et la spectrophotométrie de masse ou la combinaison entre SDS-PAGE et la chromatographie en phase liquide à haute performance. Cela va permettre l'identification des différentes fractions protéique.
- D'un autre coté, l'utilisation d'une approche génomique telle que la PCR qui permet de détecter l'ADN tumoral circulant, ce qui permet ainsi d'ouvrir des perspectives importantes non seulement en termes de diagnostic mais également du suivi des patients.

Adam,C.,Mokhtari,K.(2011) Tumeurs du système nerveux central. Classifications histologiques et topographiques, épidémiologie. *EMC - Neurologie*,11:1-9.

...

Alentorn,A.,Labussière,M., Sanson,M.,Delattre,J.V., Hoang-Xuan,K., Idbaih,A (2013) Génétique et gliomes cérébraux. *Presse Med*, 42 : 806–813.

Alexandre.J.(2010).Du bon usage des marqueurs tumoraux sériques. *Francophone des Laboratoires*,(419) : 25-27.

Andrew, H.K, Laws, E.R.(2012).Brain tumors, in *An Encyclopedic Approach*, New York : 2012, 3rd ed,vol.13, p.7.

Behin,A., Pradat,P.F.(2002).*Neurologie* ,Toulouse: Doin,323p.(Inter med)

Biosa ,G., Addis,M.F., Tanca,A., Pisanu,S., Roggio,T., Uzzau,S., Pagnozzi,D. (2011). Comparison of blood serum peptide enrichment methods by Tricine SDS-PAGE and mass spectrometry,*journal of proteomics* ,75 : 93-99.

Bondy,M.L.,El-Zein,R.,Scheurer,M.E.(2007). Epidemiology of Brain Tumors.In : Demonte,F.,Gilbert,M.R.,Mahajan,A.,Mccutcheon,I.E.,Sawaya,R.,Yung,W.K.A.*Tumors of the Brain and Spine*.Texas : MD Anderson Cancer Care Series,364 p.

Bradford,M.(1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *72* (1–2) : 248–254

Calmels,B.(2004) Immunologie et cancer : mécanismes d'échappement tumoraux, *Oncologie* 6 : 525-533

Cardis ,E., Deltour ,I., Vrijheid ,M., Combalot ,E., Moissonnier, M., Tardy, H., Armstrong,B., Giles,G., Brown ,J., Siemiatycki ,J., Parent,ME et al. (2010). Brain tumour risk in relation to mobile telephone use: results of the interphone .international case-control study .International case-control study .*International journal of epidemiology*,39 (3) : 675-694.

Chargagi,C.,. Kaloshi,G., Benouaich-Amiel, A., Lahutte, M.,HoangXuan,K.,Ricard,D. (2012) . Métastases cérébrales.*EMC - Neurologie*,9 (1) : 1-3.

Choi,C et al.(2012).2-hydroxyglutarate detection by magnetic resonance spectroscopy in IDH-mutated glioma patients. *Nature Medecine*,18(4) : 624–629.

Dawani,K., Tayyab,M.(1992).Immunoglobulin classes G,A,M in brain tumours. *J Pak Med Assoc*, 42 (7): 157-8.

Dawani,K.,Tayyab,M et Karira,K,A .(2002).Serum and CSF Immunoglobulins G, A and M in 37 Intracranial tumor.*JPMA*,52 : 549.

Deltour,S., Chopin V., Leprince,D.(2005).Modifications épigénétiques et cancer. *Medecine/Sciences*,21 : 405-11.

Doyle ,PM., Thiryayi ,WA., Joshi, A., du Plessis ,D., Kearney, T ., Gnanalingham, KK.(2009). Beta human chorionic gonadotropin (beta-hCG) expression in pituitary adenomas: relationship to endocrine function and tumour recurrence. *Pituitary*,12(3):190-5.

Demura, R,Kubo, O., Demura, H., Shirzuma, K. (1977) FSH and LH secreting pituitary adenoma, *J Clin Endocrinol Metab*,45(4):653-7.

Ducray, F. (2008).Biologie des gliomes cérébraux. *Cancer/Radiothérapie*, 12 : 663–668.

Ducray, F., Idbah, A., De Reyniès, A., BIECHE, I., Thillet, J., Mokhtari, K., Lair, S., Marie, Y., Paris, S., Vidaud, M., Xuan, K.H., Delattre, O., Delattre, J.Y., Sanson, M.(2008) Anaplastic oligodendrogliomas with 1p19q codeletion have a proneural gene expression profile. *Molecular Cancer*, 7 : 41.

Estepa, L.(2006). Proteines Totales. *EMC - Biologie médicale*,p.1-3.

Eyre-Walker A, Keightley PD. (1999). L'épendymocyte: un progéniteur neuronal et glial bien caché. *médecine/sciences*, 15 (5) : 751-3

Fiano et al. (2014).MGMT promoter methylation in plasma of glioma patients receiving temozolomide,*Journal of Neuro-Oncology*,2014,117(2) : 347-357.

Figarella-Branger,D.,Bouvier,C.(2005).Classification anatomopathologique des gliomes : fait et controverses,*Bulletin du Cancer*,92(4)

Galli, R., E. Binda, et al.(2004).Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma.*Cancer Res*, 64(19): 7011-21.

Gaucher, A.S. (2013).Marqueurs biologiques pour le suivi des cancers. *Médecine Nucléaire*, 37 : 203–208

Gavrilovic, M., Maginot, M-J., Schwartz-Gavrilovic, C., Wallach, J. (1999). Dosage des protéines totales, méthode de Biuret. In: *Manipulations d'analyse biochimique*.3eme éd. Wolters Kluwer France: Doin Editions, 453p. (*Biosciences et techniques*)

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- Ghidouche, A., Ait-Ali, D., Kheireddine, L., Takbou, I., khechfoud, H. ; Hannou, L., Himeur, H., Ait Bachir, M., Tliba, S.(2014). Étude épidémiologique des tumeurs cérébrales: cas du CHU de Bejaia, *Neurochirurgie*,60 (6) : 350.
- Guillemot, F. (2000). Signaux extracellulaires et programmes transcriptionnels contrôlant la neurogenèse. *médecine/sciences* , 16 : 159-63
- Hadoux, J., Besse. B. (2012). Antiangiogéniques et métastases cérébrales : plus de peur que de mal ?*Oncologie*,14 : 230–236
- Han, S., Huang, Y. Li, Z., Hou, H et Wu, A. (2015).The prognostic role of preoperative serum albumin levels in glioblastoma patients.*BMC Cancer* ,15 :108.
- Hede,S.M.,Nazarenko,I, Nistér,M., Lindström,M.S. (2011).Novel Perspectives on p53 Function in Neural Stem Cells and Brain Tumors. *Journal of Oncology*, p.11.
- Henry,N.L. ,Hayes,D.F.(2012).Cancer biomarkers. *Molecular Oncology*,2012,6 (2) :140–146
- Hoang-Xuan,K., Napolitano,M., Cornu, P et Delattre J.Y.(1999). Métastases cérébrales et leptoméningées des cancers solides. *Encycl Méd Chirurgie*,p22.
- Hudler P., Kocevar N ., Komel R.(2014). Proteomic Approaches in Biomarker Discovery: New Perspectives in Cancer Diagnostics .*the Scientific World Journal*.p.18
- Inserm Cancer et environnement : facteur de risque chez l'adulte , 2008.
- Institut national du cancer. (2010).*Les tumeurs du cerveau*. p87 (Guides de référence Cancer info)
- Kalinina,J.,Peng,J.,Ritchie,J.C et Van Meir,E.G.(2011). Proteomics of gliomas: Initial biomarker discovery and evolution of technology.*Neuro oncology*,13(9) : 926-942.
- Kierszenbaum,A.L(2006). Histologie et biologie cellulaire : *Une introduction à l'anatomie pathologique*.1ere éd. bruxelle : De Boeck,638 p.(histologie)
- Knudson, JR.,Alfred, G. (1971). Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *National Academy Science*. 68 (4): 820-823,
- Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR et al (2003) . Familial Tumors Syndromes of the Central Nervous system.In : Pan,E.,Prados,M. Holland-Frei. *Cancer Medicine*.PMPH USA : B C Decker .p178
- Lopez, F.(2005). Protéomique et spectrométrie de masse : applications en clinique. *Hépatogastro*,12 (6) : 247-435.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Webster, K.C., Burger, P.C., Jouvett, A., Scheithauer, B., Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol*, 114 (2) : 97–109.
- Loiseau, H., Huchet, A., Baldi, I. (2010). Épidémiologie des tumeurs cérébrales primitives. *Neurologie*, vol. 2, n.4.
- Lowry, O H., Rosebrough, N J., Farr, A L., Randall, R J. *Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. biol. Chem*, 1951, vol.193, n°1, 275-p.265
- Marieb, E.N. (1999). *Anatomie et physiologie humaines*. 4ème ed. paris : De Boeck, 1204 p.
- Marieb, E., Hoehn, K., Moussakova, L., Lachaine, R. 2014. *Anatomie et physiologie humaines*. Québec: Pearson Education. 1470 p
- Marti, E., Bovolenta, P. (2002). Sonic hedgehog in CNS development: one signal, multiple outputs. *Trends Neurosci*, 25(2):89-96.
- Mitulović, G., Mechtler, K. (2006). HPLC techniques for proteomics analysis—a short overview of latest developments. *Briefings in functional genomics*, 5 (4) : 249-260.
- Monier, R., Tubiana, M. (2008). Cancérogénèse : Accroissement des connaissances et évolution des concepts. *Oncologie*, 10 : 319–347.
- Nazarenko, I., Maria-Hede, S., Xiaobing, J., Hedrén, A., Thompson, J., Lindström, S.M., Nister, M. PDGF et PDGF réceptors in glioma, (2012). *Uppsala Journal of Medical Sciences*, 117 (2) : 99-112.
- Norden, A.D., Claus, E.B. (2011). Benign and Malignant Tumors of the Brain. *Principles and Practice of Geriatric Surgery*, p1151-1164
- Ostrom, QT et Barnholtz-Sloan, JS. (2011) Current state of our knowledge on brain tumor epidemiology, *Curr Neurol Neurosci Rep*, 11(3) : 329-35
- Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Katz, L.C., LaMantia, A.S., McNamara, O., Williams, S. (2001) *Neuroscience*. 2ème éd. sunderland (MA): Sinauer Associates, p377.
- Pritchard, T.C., Alloway, K.D. (2002) *Neurosciences médicales: Les bases neuroanatomiques et neurophysiologiques*. 1er éd. Paris : De Boeck, 528 p. (Sciences médicales).
- Sanson, M., Taillibert, S. (2004) Données générales de neuro oncogénèse. *Neurologie*, Janvier, 1(1) : 175–89.
- Sharma, S. (2009). Tumor markers in clinical practice: General principles and guidelines. *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology*, 30 (1) : 1–8.
- Silbernagl, Stefan, Despopoulos, Agamemnon. (2001). *Atlas de poche de physiologie*. 3e éd. Paris : Médecine Sciences Publications, 436 p. (Atlas de poche)

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

Solassol,J.,Boulle,N.,Maudelonde,T.,Mangé,A.(2005).Protéomique clinique : vers la détection précoce des cancers ?. *Medecine /Sciences* ,21 : 722-728.

Syeda,T. (2013). *Biomarkers As Indicators Of Severity Of Cerebral Damage In Postoperative Brain Tumor Patients*. A Thesis Submitted in Partial Fulfilment for the degree of doctor of Biochemistry, Jinnah University for Women Karachi Pakistan ,p205.

Tirumalai,R.S.,Chan,R.,Prieto,D.,Issaq,H.J.,Conrads,T.P.,Veenstra,T.D.(2003).Caractérisation de la faible poids moléculaire Sérum protéome humain. *Molecular & Cellular Proteomics*,2 : 1096-1103.

Tubiana,M.(2008). Généralités sur la cancérogénèse.*C. R. Biologies* ,331 : 114–125.

Vigue, M.(2004).Système nerveux .In : *Atlas d'anatomie humaine*. Paris : Desiris, p.126

Watson, S .,Serrate,C.,Vignot ,S.(2010) Voie de signalisation Sonic Hedgehog : du développement embryonnaire aux thérapies moléculaires ciblées. *bulletin du Cancer*,97 (12) : 1477-83.

Wulfkuhle,J.D.,Liotta,L.A.,Petricoin,E.F.(2003) Proteomic applications for the early detection of cancer.*Natural Reviews Cancer*, 3 (4) : 267-275.

Yoshimoto ,K. ,Mizoguchi,M.,Hata,N.,Mano,T.,Nakamizo ,A., Sasaki,T.(2012).Biomarkers Molecular biomarkers of glioblastoma: current targets and clinical implications.*Dovepress* ,2 : 63-76.

Zhao,C.,Deng,W.,Gage,F.H.(2008).Mechanisms and Functional Implications of Adult Neurogenesis.*Cell*,132 (4) : 645-660.

Zhu, Y., Parada, L.(2002).The Molecular and Genetic Basis of Neurological Tumours.*Nature Reviews Cancer*,2 : 616-626.

Annexe I

Tableau: classification histologique simplifiée des tumeurs intracrâniennes (Louis *et al.*, 2007)

Tumeurs primitives		
	Astrocytes	Astrocytomes, Glioblastomes
Oligodendrocytes	Cellules gliales	Oligodendrocytomes
	Ependymocytes	Ependymomes
Cellules nerveuses		Médulloblastomes
Pinéalocytes		Pinéalomes
Cellules de Schwann		Neurinomes, neurofibromes
Cellules arachnoïdiennes		Méningiomes
Lymphocytes		Lymphomes
Cellules adénohypophysaires		Adénomes hypophysaires
Cellules ectodermiques		Craniopharyngiomes
Cellules de la chorde		Chordomes
Cellules réticulaires		Hémangioblastomes
Cellules germinales		Germinomes
Tumeurs secondaires (métastases)		
Tumeurs osseuses primitives ou secondaires, bénignes ou malignes		

Annexe II

Pour réaliser ce travail, nous avons utilisé le matériel suivant:

1. Matériel utilisé

- Balance;
- Centrifugeuse;
- PH-mètre;
- Spectrophotomètre;
- Dispositif d'électrophorèse;
- Bain marie.

2. Produits utilisés

- BSA (bovin Sérum albumin) ;
- Bleu de coomassie G250 ;
- Bleu de coomassie R250 ;
- Bleu de bromophénol ;
- SDS (dodécylsulfate de sodium) ;
- Ethanol ;
- Acide phosphorique ;
- Tris-HCL ;
- Acide acétique ;
- Glycérol ;
- β -Mercaptoethanol ;
- Acrylamide ;
- Bis-acrylamide ;
- Persulfate d'ammonium ;
- TEMED ;
- Glycine ;
- Eau distillée.

Annexe III

Tableau: Gamme d'étalonnage pour le dosage des protéines.

BSA (mg/ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
BSA (µl)	0	20	40	60	80	100
Eau déminéralisée (µl)	100	80	60	40	20	0

Annexe IV

✚ Réactif de Bradford:

Réactif	Quantité
Bleu de Coomassie G250	75 mg
Ethanol 99,5%	37.5 ml
Acide phosphorique 85%	75 ml
Eau distillée	637.5 ml

Vf=750ml

✚ Protocole SDS-PAGE selon (Laemmli, 1970):

1. Tampon de solubilisation:

Produit	Quantité
Tris-HCl (PH 6,8 /0,5M)	5 ml
SDS 10%	8 ml
Glycérol 50%	8 ml
β-Mercaptoethanol	2 ml
Bleu de bromophénol	2 ml

Vf=40 ml

➤ Le tris-HCl (PH=6,8 et PH=8,8) est préparé à T°= 22°C selon les mesures suivantes:

- PH=6,8

Produit	Quantité
Tris	3,029 g
HCl	1,97 ml
QSP ddH ₂ O	50 ml

- PH=8,8

Produit	Quantité
Tris	9,086 g
HCl	1,07 ml
QSP ddH ₂ O	50 ml

2. Tampons utilisées pour l'électrophorèse:

- Tampon de migration:

Produit	Quantité
Tris	7,56 g
Glycine	36 g
SDS 10%	40 ml
Eau distillée	250 ml

Vf=290 ml

- Solution de fixation (décoloration):

Produit	Quantité
Méthanol 40%	200 ml
Acide acétique 10%	50 ml
Eau distillée	250 ml

Vf=500 ml

- Solution de coloration:

Produit	Quantité
Acide acétique 10%	50 ml
Méthanol 40 %	200 ml
Bleu de coomassie R250	0.25 g
Eau distillée	250 ml

Vf =500ml

3. Gels d'électrophorèse:

- **Gel de séparation:**

Réactif	15%	10%
Solution d'acrylamide	4ml	2,67ml
Tris-Hcl 8,8	2ml	2ml
TEMED	8 μ l	8 μ l
Persulfate d'ammonium(APS)	80 μ l	80 μ l
SDS10%	80 μ l	80 μ l
Eau distillée	1,8 ml	3,2ml
		Vf=8ml

- **Gel de concentration:**

Réactif	15%	10%
Solution d'acrylamide	3ml	1ml
Tris-Hcl 6,8	1,25ml	1,25ml
TEMED	5 μ l	5 μ l
Persulfate d'ammonium (APS)	50 μ l	50 μ l
SDS	50 μ l	50 μ l
Eau distillée	3ml	2,6ml
		Vf=5ml

Glossaire

Activité tyrosine kinase: Certains récepteurs membranaires sont capables d'une activité enzymatique à type de protéine tyrosine kinase. Lors de la fixation du ligand, ces récepteurs se groupent en dimères et leur activité tyrosine kinase permet la phosphorylation d'une tyrosine de l'autre protomère. Ces récepteurs exercent aussi leur activité tyrosine kinase sur des substrats protéines du cytoplasme, qui transmettent à leur tour le signal aux cascades de phosphorylation de la cellule.

Agents cancérigènes: Tout facteur physique, chimique ou biologique de l'environnement susceptible de provoquer un cancer lorsqu'un individu y est exposé sur une certaine durée.

Agents promoteur: agents qui n'induisent pas de lésions de l'ADN mais favorisent l'expression d'une lésion, préalablement induite par un agent initiateur. Expérimentalement, ils réduisent le temps écoulé entre l'initiation et le développement de la tumeur.

Angiogenèse: Processus de croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir des vaisseaux préexistants. L'angiogenèse est notamment impliquée dans la croissance des tumeurs malignes et le développement des métastases.

Endoderme: Feuillet embryonnaire qui forme le tube digestif (à l'exception de la bouche et du rectum) et les glandes digestives, ainsi que les voies respiratoires.

Héparinases: enzyme catalyse l'hydrolytique et le clivage des heparines, ont la capacité de détruire la barrière hématoencéphalique et la matrice extracellulaire locale, favorisant ainsi la prolifération tumorale cérébrale.

Immunoepression: Suppression ou diminution de la résistance naturelle ou acquise d'un organisme à des agents reconnus comme étrangers.

Mésoderme: La couche de germe embryonnaire intermédiaire, située entre l'ectoderme et l'endoderme, à partir de laquelle le tissu conjonctif, les muscles, les os et le système circulatoire urogénital et se développent.

Sarcomes: Tumeurs se développant à partir des tissus conjonctifs d'origine (liposarcome, ostéosarcome, angiosarcomes, chondrosarcome).

Témozolomide: est un agent alkylant de l'ADN administré par voie orale. Il provoque une alkylation de la guanine en position O6 et N7 de l'ADN ce qui déclenche l'apoptose des cellules.

Virus Herpes: virus à ADN bicaténaire, provoque une maladie infectieuse contagieuse et récurrente (qui revient régulièrement), due à un virus dont le nom est l'herpès simplex.

Introduction

Chapitre I: Revue Bibliographique

Chapitre II : Matériels & Méthodes

Chapitre III : Résultats & Discussion

Annexes

Glossaire

Références bibliographiques

Conclusion et perspectives

Résumé

Les tumeurs cérébrales se caractérisent par des proliférations anarchiques de cellules au sein du cerveau. Les marqueurs biologiques de tumeurs sont des molécules retrouvées en quantité détectable dans le sang. Ces marqueurs peuvent également être utilisés pour prédire l'évolution de la maladie cancéreuse.

Le but de notre étude est d'établir une bio-signature à partir des profils d'expression protéique de témoins et patients atteints de tumeurs cérébrales qui pourrait s'avérer utile au diagnostic.

Les sérums de quatorze (14) échantillons dont cinq (5) atteints de tumeurs cérébrales et neuf (9) témoin (six femmes et huit hommes d'âge moyen de 40 ans) admis respectivement au service de neurochirurgie du Centre Hospitalo-universitaire Khalil Amrane de Béjaia ont servi à l'étude protéomique par la méthode de Bradford et la technique de SDS-PAGE.

Nos résultats montrent que la protéinémie normale obtenue chez tous les échantillons ne peut aider au diagnostic des pathologies tumorales pas rapport aux autres types de pathogènes affectant le système nerveux central. Tandis que l'analyse des profils protéiques obtenus par une électrophorèse SDS PAGE, nous a permis de mettre en évidence des profils protéiques relativement distincts entre les tumoraux et les non-tumoraux, mais aussi entre les tumoraux eux-mêmes, particulièrement au niveau des protéines à faible poids moléculaire.

Notre approche expérimentale s'avère être prometteuse pour l'identification d'une bio-signature caractéristique des tumeurs cérébrales ce qui permettra dans le long terme de poser un diagnostic et pronostic précoce, précis et peu coûteux de ces pathologies.

Mots clés: tumeurs cérébrales, protéomique, biomarqueurs, protéines, profils électrophorétique.

Abstract

Brain tumors are characterized by uncontrolled proliferation of cells within the brain. The biomarkers of tumors are found in detectable amounts in the blood. These markers can also be used to predict the evolution of the cancer disease.

The aim of our study is to establish a bio-signature from the protein expression profiles of control and patients with brain tumors that could be useful for diagnosis.

Fourteen plasma samples (14) with five (5) patients suffering from brain tumors and nine (9) controls (six women and eight men, mean age 40 years) respectively admitted to the Neurosurgical Service of Hospitalo-University Centre Khalil Amrane Bejaia were used for proteomic study by the Bradford method and SDS-PAGE technique.

Our results show that normal proteinemia obtained in all samples cannot help the diagnosis of malignant disease compared to other types of disease affecting the central nervous system. While the analysis of protein profiles obtained by SDS PAGE electrophoresis, allowed us to highlight relatively distinct protein profiles between tumor and non-tumor, but also between the tumors itself, especially at the protein level low molecular weight.

Our experimental approach is promising for the identification of a bio- signature characteristic of brain tumors which will help in diagnosis and early prognosis, to the brain tumor

Keywords: brain tumors, proteomics, bios markers, protein, electrophoretic profiles