

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane Mira de Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-chimique



Mémoire de Master

Filière : Sciences Biologique

Option : Génétique Appliquée

Thème

**Analyse immunohistochimique des tumeurs
cérébrales.**

Présenté par : AISSAT Aghiles Karim & OULHA Selma

Soutenu le 16 juin 2016

Composition du jury

M ^{elle} AIT ALI. Dj	Maitre de conférences B, Bejaia	Promotrice
M ^{me} TERKMANI. F	Maitre de conférences B, Alger	Co-promotrice
M ^{me} OUAHMED. H	Maitre assistante A, Bejaia	Présidente
M ^{me} BEDJOU.F	Professeur, Bejaia	Examinatrice

Remerciements

Tout d'abord, louange à « ALLAH »: le tout puissant, le très miséricordieux qui nous a donné la santé, la force, le courage et l'opportunité de mener ce travail à terme.

Nous tenons à remercier Mlle AIT ALI d'avoir accepté d'être notre promotrice et de nous avoir soutenu et orienté avec beaucoup de sympathie et de gentillesse, ce qui nous a permis de mener à terme ce projet.

Nous tenons à remercier également le Docteur TERKMANI d'avoir accepté de nous encadrer et de nous guider lors de notre pratique avec beaucoup de sérieux et de sympathie.

Nos sincères considérations et remerciements sont également exprimés aux membres du jury :

Mme OUAHMED pour nous avoir fait l'honneur et le plaisir de présider ce jury.

Mme BEDJOU d'avoir accepté de faire partie du jury et de donner de son temps pour examiner ce travail.

Nous sommes très honorés de leur présence dans ce jury.

Nous tenons à remercier le Pr TLIBA pour nous avoir reçus au sein du laboratoire génie biologique des cancers de Aboudaw.

Nous remercions également à Mr GHIDOUCHE, Lydia et Mina pour leur disponibilité, leurs conseils et leurs orientations.

Ainsi que le personnel du laboratoire de médecine d'Aboudaou et d'anatomie pathologique du CHU Mustapha Bacha et à tous nos enseignants durant notre cursus universitaire.

Nous remercions chaleureusement M^{me} AISSAT et Mr HAMOUMOU de nous avoir soutenus et orientés

Merci à tous

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

A maman, la lumière de ma vie, merci pour ta gentillesse, les valeurs que tu m'as enseigné, pour ton courage et tes doua, je te le dis rarement mais je t'aime plus que ma vie.

A mon père, l'homme de ma vie, merci papa pour tous tes sacrifices, pour la justesse de ton éducation, merci d'avoir été un ami avant d'être un papa que j'aime plus que tout.

J'espère qu'un jour je pourrais vous rendre un peu de ce que vous avez fait pour moi que dieu vous vous bénisse et vous garde pour moi.

A mon frère, merci de m'avoir soutenu et protéger, je te souhaite tout le bonheur du monde

A ma sœur Souha, je ne pourrais jamais assez te remercier pour ta présence, ton soutien et de ton accueil chez toi dans une période importante de ma vie.

A ma sœur Sarah, merci pour ton enthousiasme et ta joie de vie merci pour tes bon petits plats et de m'avoir toujours chouchoutée dans surtout dans cette période.

A mon petit neveu Anir, toi qui est ma joie de vivre.

A ma grade famille et à la mémoire de mes grand parents

A mes chères copines, Sonia, Hayate, Lamia, Rjma, avec qui j'ai partagé des moments de ma vie inoubliable, merci d'avoir été là dans mes hauts et mes bas et tout ce que vous avez fait pour moi. Je vous souhaite le bonheur et la réussite.

A mes meilleurs amies, Soumaya, Nabila, merci pour toutes ces années, et de m'avoir toujours soutenues et tout nos moment de rigolades. Je vous souhaite le bonheur du monde

A mon amie et confidente Esma, merci pour tout ce que tu fais pour moi.

A mon binôme Ghiles et à sa famille, merci pour cette expérience et pour ta sympathie.

MERCI A TOUS

SELMA

Je dédie ce travail,

*A mes parents qui m'ont soutenu, et supporté tout au long de la réalisation de ce mémoire.
Merci pour leur aide et leurs encouragements.*

A ma petite sœur adoré zouza qui m'a encouragé, je t'aime.

A Agnès, je tiens à te remercier d'avoir été là à tout moment

*A Yanis, Aimad papi, Youghou, Amine milore et Ghiles qui ont su me changer les idées
quand il le fallait.*

*Je remercie toutes les personnes qui ont participé à la réalisation de ce mémoire, plus
spécialement Sonia, Hayet, Lamia, Soumaya et Rima.*

*En fin, je remercie tout particulièrement ma binôme Selma d'avoir été patiente avec moi pour
sa gentillesse et sa sympathie*

Aghiles

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

INTRODUCTION.....1

CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1-LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL.....3

I.1.1-Anatomie du système nerveux central3

I.1.1.1-Encéphale.....3

I.1.1.2-Moelle épinière.....4

I.1.2-Histologie du Système Nerveux Central.....4

I.2- TUMEUR ET TUMOROGENESE.....6

I.2.1-Familles des gènes impliqués dans la tumorigénèse7

I.2.1.1-Oncogènes7

I.2.1.2-Gènes suppresseurs de tumeur.....9

I.2.1.3-Genès du maintien de l'intégrité11

I.2.2-Apparition d'une tumeur.....11

I.2.3-Développement tumoral.....12

I.2.3.1-La phase d'initiation.....12

I.2.3.2-La phase de promotion.....12

I.2.3.3-La phase de propagation.....12

I.3-LES TUMEURS CEREBRALES.....15

I.3.1-Les méningiomes.....16

I.3.1.1-Critères histologiques de certains méningiomes.18

I.3.1.2-Altérations génétiques des méningiomes.....19

I.4-LES BIOMARQUEURS.....20

I.4 1-Classification des biomarqueurs.....21

I.4.1.1-Classification des biomarqueurs selon leur intérêt clinique.....21

I.4.1.2-Classification des biomarqueurs selon leur nature biochimique.....22

I.5-IMMUNOHISTOCHEMIE.....23

I.5.1-Intérêts de l'immunohistochimie24

I.5.2-Limites de l'immunohistochimies.....24

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

II.1-ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE.....	25
II.2-ETUDE HISTO-PATHOLOGIQUE.....	25
II.2.1-Préparation des tissus.....	25
II.2.1.1-Matériels	25
II.2.1.2-Méthodes.....	26
II.2.2-Etude histochimique.....	28
II.2.2.1-Matériels.....	28
II.2.2.2-Méthodes.....	28
II.2.3-Etude Immunohistochimique.....	29
II.2.3.1-Matériels.....	29
II.2.3.2-Méthodes.....	30

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1-RESULTATS.....	32
III.1.1-Étude épidémiologique.....	32
III.1.2-Etude histo-pathologique.....	34
III.1.2.1-Etude histochimique.....	34
III.1.3-Etude immunohistochimique	36
III.1.3.1-Marquage du récepteur de la progestérone	36
III.1.3.2-Marquage de la protéine p53	39
III.2 DISCUSSION.....	42
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	45
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	47
REFERENCES ELECTRONIQUES.....	56

Annexes

Glossaire

Liste des abréviations

- AC:** Anticorps
- AF1, 2, 3:** Activation function 1, 2, 3
- PKB:** Protéine kinase B
- ARF:** ADP-riboxylation factor
- ATM:** Ataxia telangiectasia mutated
- ATR:** Ataxia telangiectasia and Rad3 related
- BAX:** Bcl-2-like protein 4
- BIM:** Bcl-2-like protein 11
- BRCA:** Breast Cancer Early Onset
- CDK:** Deoxyystidine kinas
- CDKN2A:** Cyline-dependent kinase inhibitor 2A
- CMV:** Cytomegalovirus
- CXCL12:** Cytosine X chimiokine ligand 12
- CXCR4:** Cytosine X chimiokine recpteur 4
- DAB:** Diaminobenzoyne
- DBD:** DNA-binding domain
- EGFR:** Epidermal growth factor receptor
- ERK:** Extracellular signal regulated kinas
- ERK:** Extracellular-regulated kinases
- GADD45:** Growth arrest and DNA damage inducible 45
- HE:** Hematoxyline Eosine
- HIF:** Hypoxia inducible factors
- HPV:** Papillomavirus humain
- Hsp:** Heat-shock protein “Protéine de choc thermique”
- IHC:** Immunohistochimie
- JAK:** Janus kinas
- LBD:** Ligand binding domain
- MAPK:** Mitogen Activated Protein Kinase
- MDM2:** Murine double minute 2
- MEK:** Methyl ethyl ketone
- MMP:** Métallo-protéinase

NF2: Neurofibromatosis type 2
OMS: Organisation mondiale de la santé
PBS: Phosphate Buffered Saline
PI3: Phosphoinositide 3
PI3K: Phosphoinositide 3-kinase
RP: Récepteur de la progestérone
PRA: Récepteur de la progestérone isoforme A
PRB: Récepteur de la progestérone isoforme B
PRbs: Progesterone Receptor binding sites
RAS: Reticular Activating system
SNC: Système nerveux central
STAT: Signal transducers and activators of transcription
TP53: Tumor protein 53
VEGF: Vascular endothelial growth factor

Liste de figures

Figure 1: Anatomie du système nerveux central	3
Figure 2 : Les méninges	6
Figure 3: Structure du RP	7
Figure 4: Mécanisme d'action du récepteur de la progestérone nucléaire.....	8
Figure 5: Structure de la p53 avec la fréquence des mutations faux-sens.....	9
Figure 6: Mécanisme d'action de la protéine 53	10
Figure 7 : Fixation des tissus dans du formol à 10%.....	26
Figure 8: Automate de circulation (photographie originale).....	27
Figure 9: Enrobage des tissus avec de la paraffine	27
Figure 10 : Etapes récapitulatifs de la réalisation des coupes.	28
Figure 11 : Photos représentant la coloration, le montage des lames et leurs observations	29
Figure 12 : Déparaffinage, démasquage antigénique et blocage des peroxydases.....	30
Figure 13 : Récapitulatif de l'ajout de l'anticorps secondaire, du chromogène et du DAB....	31
Figure 14 : Répartition des méningiomes selon le sexe.....	32
Figure 15 : Histogramme représentant la répartition de méningiomes par tranche d'âge.....	33
Figure 16 : Répartition des méningiomes selon le grade histologique.....	33
Figure 17 : Photo coloration Hématoxyline Eosine d'un méningiome psammomateux.....	34
Figure 18 : Photo coloration Hématoxyline Eosine d'un méningiome Atypique.....	35
Figure 19 : Photo coloration Hématoxyline Eosine d'un méningiome anaplasique.....	35
Figure 20 : Photo coloration Hématoxyline Eosine d'un méningiome atypique	36
Figure 21 : Répartition de l'immuno-réactivité du RP selon le grade.....	37
Figure 22: Marquage nucléaire fort du récepteur de la progestérone (3+) dans un méningiome méningothéliomateux	37
Figure 23: Marquage nucléaire modéré du récepteur de la progestérone (2+) dans un méningiome atypique	38
Figure 24: Marquage nucléaire faible du récepteur de la progestérone (1+) dans un méningiome psammomateux	38
Figure 25: Marquage nucléaire du récepteur de la progestérone négatif dans un méningiome anaplasique.....	39
Figure 26: Répartition de l'immuno-positivité de la p53 selon le grade	39

Figure 27: Marquage nucléaire de la protéine p 53 positif 1+ dans un méningiome atypique	
.....	40
Figure 28: Marquage nucléaire de la protéine p 53 négatif dans un méningiome transitionnel	
.....	40

Liste des tableaux

Tableau I : Classification simplifiée des tumeurs du système nerveux central (OMS 2007).....	16
Tableau II : Classification histologique des méningiomes selon OMS 2007.....	17
Tableau III : Classification des biomarqueurs selon l'intérêt qu'ils peuvent présenter sur le plan clinique.....	21
Tableau IV : Classification des biomarqueurs selon leur nature biochimique.....	22
Tableau V : Information sur les patients.....	25
Tableau VI : Récapitulatif des résultats de l'étude histopathologique.....	41

INTRODUCTION

Les tumeurs cérébrales se développent au dépend du cerveau et des structures anatomiques voisines notamment les méninges et les nerfs crâniens. Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), les tumeurs cérébrales représentent 5% de l'ensemble des cancers de l'adulte et 25% de ceux de l'enfant. En terme d'incidence elles sont classées 17^{ème} au niveau mondial et 4^{ème} en Algérie (**World Health Organization, 2012**). Elles sont principalement classées selon leur type histologique.

Les méningiomes représentent 30% de l'ensemble des tumeurs cérébrales primitives, et sont le deuxième type histologique le plus fréquent après les gliomes. Ils sont principalement retrouvés chez le sexe féminin et ils sont répartis en trois grades histologiques selon le degré de malignité. Ils se développent à partir des cellules arachnoïdiennes, qui subissent des modifications génétiques conduisant à un phénotype tumoral (**Fonkem et al., 2016**).

Plusieurs molécules entrent en jeu dans le développement tumoral caractérisant ainsi les biomarqueurs tumoraux, qui sont par définition des molécules caractéristiques d'un phénotype tumoral par rapport à leur contrepartie normale. (**Martin et al., 2005**). Tout biomarqueur doit être analysé et évalué en fonction de l'intérêt qu'il peut présenter sur le plan diagnostique ou pronostic (**Bast et al., 2001**), permettant ainsi l'établissement d'une classification moléculaire indispensable pour progresser vers des traitements ciblés et efficaces (**Martin et al., 2005**). Dans ce but, plusieurs techniques de détections sont utilisées, essentiellement l'immunohistochimie.

Notre choix s'est porté sur la p53 et le récepteur de la progestérone en raison de leur implication dans le développement tumoral. La p53 est retrouvée dans plus de 50% de l'ensemble des tumeurs, sa forme sauvage est considérée comme étant un gène suppresseur de tumeur responsable du contrôle du cycle cellulaire et de l'induction de l'apoptose (**Freed-Pastor et Prives, 2012**). Le récepteur de la progestérone est quant à lui principalement retrouvé au sein des tumeurs mammaire de bas grade dont l'origine embryonnaire est la même que les méninges. Il est considéré comme oncogène et sa forme sauvage est impliquée dans la croissance cellulaire (**Li et al., 2004**).

La présente étude vise à évaluer la répartition des méningiomes selon l'âge, le sexe, le grade histologique et à déterminer l'intérêt de la p53 et du récepteur de la progestérone (RP) dans le pronostic des méningiomes. Le présent manuscrit est réparti en deux parties. Dans un

premier temps nous avons synthétisé une revue bibliographique qui apportera des rappels sur l'anatomie du système nerveux central, le développement tumoral et des tumeurs cérébrales, ainsi que des données concernant les biomarqueurs. Par la suite, nous avons présenté la partie expérimentale, réalisée au sein du service d'anatomie pathologique du centre hospitalo-universitaire de MUSTAPHA BACHA d'Alger. Elle se compose d'une étude épidémiologique et d'une étude immunohistochimique réalisée sur des coupes de tissus tumoraux. Enfin, nous avons conclu ce travail par la présentation des différents résultats obtenus et leurs discussions, ainsi que les perspectives qui en découlent.

CHAPITRE I :
REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE

I.1- LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL:**I.1.1- Anatomie du Système Nerveux Central:**

Le système nerveux central (SNC) est le siège de la coordination des actions avec l'environnement extérieur. Il reçoit, enregistre, interprète les signaux qui proviennent de la périphérie, et organise les réponses à transmettre. Il est constitué de deux parties fondamentales; l'encéphale et la moelle épinière, qui se développent tous les deux à partir du tube neural. Ils sont parcourus par des cavités appelées ventricules et remplies de liquide céphalorachidien (Purve *et al.*, 2005).

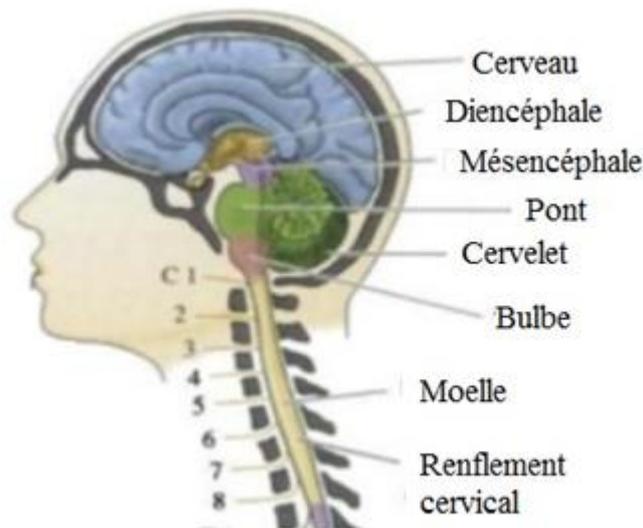


Figure 1: Anatomie du système nerveux central (Purve *et al.*, 2005).

I.1.1.1- Encéphale: L'encéphale est formé de plusieurs structures anatomiques:

Cerveau: Appelé aussi cerveau antérieur, il est le siège de la régulation de toutes les fonctions vitales et assure les fonctions motrices et cognitives (Ben Amar et Leonard, 2009). Il est subdivisé en :

- **Téleencéphale :** il correspond aux deux hémisphères cérébraux droit et gauche. Sa surface externe est constituée d'une substance grise formée de neurone amyélinisés. Cette couche superficielle est appelée le cortex cérébral (Purve *et al.*, 2005).
- **Diencéphale:** Cette partie du cerveau est recouverte en presque totalité par les deux hémisphères cérébraux. Elle est reparti principalement en thalamus et hypothalamus (Purve *et al.*, 2005).

Tronc cérébral: On appelle collectivement tronc cérébral l'ensemble formé par le bulbe rachidien, le pont et le mésencéphale. Il est impliqué dans une multitude de fonctions parmi

lesquelles, le contrôle du rythme cardiaque, de la pression artérielle et de la respiration (Crossman, 2004).

Cervelet: Le cervelet se situe à la base du cerveau et s'étend sur la majeure partie dorsale du tronc cérébral. Il joue un rôle primordial dans la coordination et la planification des mouvements (Genong et Jobin, 2005).

I.1.1.2- Moelle épinière :

La moelle épinière est située dans le canal rachidien. Elle est subdivisée en quatre régions : cervicale, thoracique, lombaire et sacrée. Elle est constituée d'une substance grise localisée dans la région centrale formée de corps cellulaires, et d'une substance blanche localisée dans la périphérie formée de fibres nerveuse myélinisées de communication (Moore et Dalley, 2006).

I.1.2- Histologie du Système Nerveux Central:

Le SNC est constituée de cellules nerveuses appelées neurones et de leur prolongement ainsi que de cellules de soutiens dénommées cellules gliales, telles que, les astrocytes, les oligodendrocytes, les ependymaires, et les microgliocytes. Il est recouvert et protéger par un ensemble de cellules constituant les méninges (Prades *et al.*, 1999).

- **Neurones:**

Les neurones sont organisés en trois zones, les corps cellulaire, aussi appelé «soma» qui renferment un noyau, une chromatine dispersée et un cytoplasme. Les Dendrites qui sont de nombreux prolongements généralement courts qui sont en contact avec les boutons synaptiques d'autres neurones et captent les signaux chimiques. Les axones qui sont de grands prolongements transmettant l'influx nerveux vers leurs parties terminales ou boutons synaptiques (Purve *et al.*, 2005).

- **Cellules gliales:** les cellules gliales sont constituées de cinq types cellulaires :

- **Les astrocytes :** Ils représentent les cellules les plus abondantes des cellules gliales, elles sont volumineuses et ont de nombreux prolongements. Elles sont impliquées principalement dans la formation de la barrière hémato-encéphalique (Sherwood et Lockhart, 2006).

- **Les oligodendrocytes :** Ce sont les cellules de soutien qui produisent la myéline dans le SNC, elle possède plusieurs prolongements cellulaires et myélinisent plusieurs axones (**Batterbury et al., 2005**).
- **Les ependymaires :** Ce sont des cellules de type épithélial qui tapissent les cavités du cerveau et le canal central de la moelle épinière, formant une couche de cellule cubiques et ciliées au contact du liquide céphalorachidien. Leur fonction principale est la sécrétion du liquide céphalo-rachidien et favoriser sa circulation (**Prugnonne et Theureau, 1996**).
- **Les microgliocytes :** Ce sont de petites cellules qui ont les mêmes origines embryonnaires que les monocytes et les macrophages. Elles assurent la protection des cellules du système nerveux central (**Renate, 2008**).

- **Les méninges:**

Le cerveau et la moelle épinière sont des organes fragiles, protégés d'une part par une structure osseuse, le crane et d'autre part par trois membranes constituant les méninges: la pie-mère et l'arachnoïde qui représentent les leptoméninges et la dure-mère (**Goffinet, 1994**).

- **La dure-mère:** C'est la membrane la plus externe, très résistante, elle est formée d'un tissu conjonctif et fibreux et est constituée de deux feuillets : le feuillet externe adhérent à l'os du crâne et le feuillet interne tapissé de cellules conjonctives aplaties (**Goffinet, 1994**).
- **L'arachnoïde:** C'est une membrane intermédiaire mince et non vascularisée, adhérent à la face interne de la dure-mère. Elle est séparée de cette dernière par un espace sous durale et de la pie-mère par un espace sous arachnoïdien permettant la circulation du liquide céphalorachidien (**Goffinet, 1994**).
- **La pie-mère:** Elle représente la membrane la plus interne, fine et vascularisée et formée d'un tissu conjonctif, adhérent au SNC (**Goffinet, 1994**).

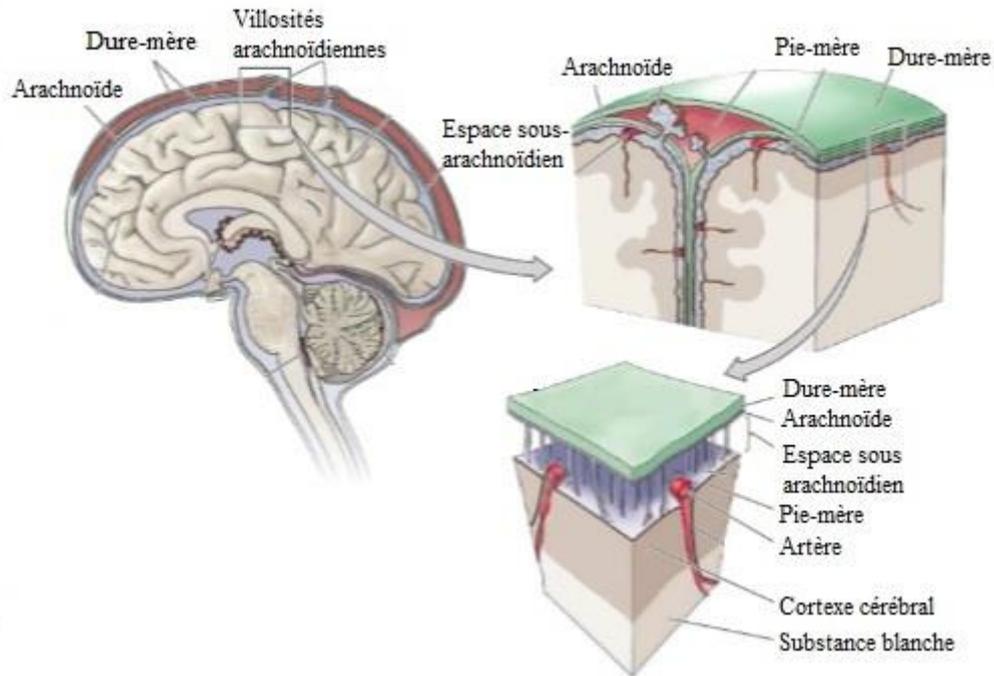


Figure 2 : Les méninges. En haut, à gauche, vue médio-sagittale montrant les trois couches des méninges par rapport au crâne et à l'encéphale. A droite, agrandissements montrant les détails (Purve et al., 2012).

I.2- TUMEUR ET TUMOROGENESE:

Une tumeur est la conséquence de la multiplication incontrôlée des cellules saines de l'organisme. Ces cellules sont transformées du fait de l'accumulation d'altérations génétiques dues à une pression ou non environnementale. Ces altérations engendrent l'activation d'oncogènes et/ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs, affectant ainsi l'homéostasie cellulaire (Sanson et Taillibert, 2004). Tous ces événements ont pour conséquence l'initiation d'un processus néoplasique (Hanahan et Weinberg 2011) qui se caractérise par :

- Indépendance vis-à-vis des signaux de prolifération
- Insensibilité aux signaux antiprolifératif
- Acquisition d'une résistance à l'apoptose
- Potentiel illimité de répliation
- Stimulation de l'angiogènèse
- Pouvoir d'invasion et de dissémination

La cellule tumorale se développe au dépens de l'organe d'origine et peut engendrer deux types différents: des tumeurs bénignes ou malignes. Les premières ne sont pas cancéreuses, en d'autres termes elles sont localisées et ne sont pas agressives; les secondes sont dites cancéreuses et peuvent notamment se développer à partir de tumeurs bénignes et ont la capacité d'envahir toute la région d'origine et sont aussi potentiellement métastatique (Lacave, 2005).

I.2.1- Familles des gènes impliquées dans la tumorigenèse:

I.2.1.1- Oncogènes:

Les oncogènes sont des versions altérées de gènes (proto-oncogènes) qui sont impliqués dans la prolifération ou la croissance cellulaire. Ils agissent de manière dominante, en d'autres termes une seule copie est nécessaire à leur activité. C'est le cas notamment du récepteur de la progestérone (RP) (Larsen, 2005).

✓ **Récepteur de la progestérone (RP):**

La protéine RP appartient à la famille des récepteurs nucléaires, dont le rôle est l'activation de la transcription des gènes cibles, dépendante de la liaison à son ligand, principalement la progestérone. Elle est codée par le gène humain PGR, et est localisé sur le chromosome 11q2.27 et possède deux isoformes principales PRA et PRB, transcrits à partir de deux promoteurs alternatifs. Ces deux isoformes possèdent des domaines d'activation de la transcription différents et coexistent de manière équilibrée, pour permettre le contrôle physiologique de l'action de la progestérone. La PRA possède deux fonctions d'activation de la transcription appelées AF1 et AF2, alors que la PRB a une fonction d'activation supplémentaire qui est la AF3 (Li *et al.*, 2004).



Figure 3: Structure du RP. Le RP existe sous deux isoformes (PRA et PRB) qui sont transcrits à partir d'un seul gène. DBD: domaine de liaison à l'ADN; LBD: domaine de liaison du ligand (Cui *et al.*, 2005).

- Mécanisme d'action de RP:

En l'absence du ligand, le récepteur RP est localisé dans le cytoplasme de la cellule associé à des protéines chaperonnes de choc thermique *heat shock protein* (HSP). Une fois lié à son ligand, la PR se dissocie des protéines HSP et transloque vers le noyau où il se dimérise et se lie à des séquences spécifiques de l'ADN, appelées PREs (Progesterone Responsive Elements) localisées dans la région promotrice des gènes cibles, entraînant une cascade d'interaction protéine-protéine aboutissant à l'initiation de la transcription (Sainsbury *et al.*, 2015). Toutefois l'action de RP peut être non génomique et passe par l'activation des voies de signalisation des MAPK, Ras/Raf1 et celle de JAK/STAT (Figure 4) (Kramer *et al.*, 2005).

L'implication du récepteur de la progestérone dans le développement des cellules cancéreuses mammaires a été rapportée par plusieurs études. En effet la régulation de la transcription des gènes cibles de RP est altérée et l'expression de l'oncogène MYC est induite. Celui-ci joue un rôle dans la prolifération et la différenciation (Giulianelli *et al.*, 2013). Le RP, par ses voies de signalisation non génomiques (Ras/Erk, PI3K/Akt, et JAK/STAT), et stimule la prolifération des cellules cancéreuses mammaires (Kim *et al.*, 2013).

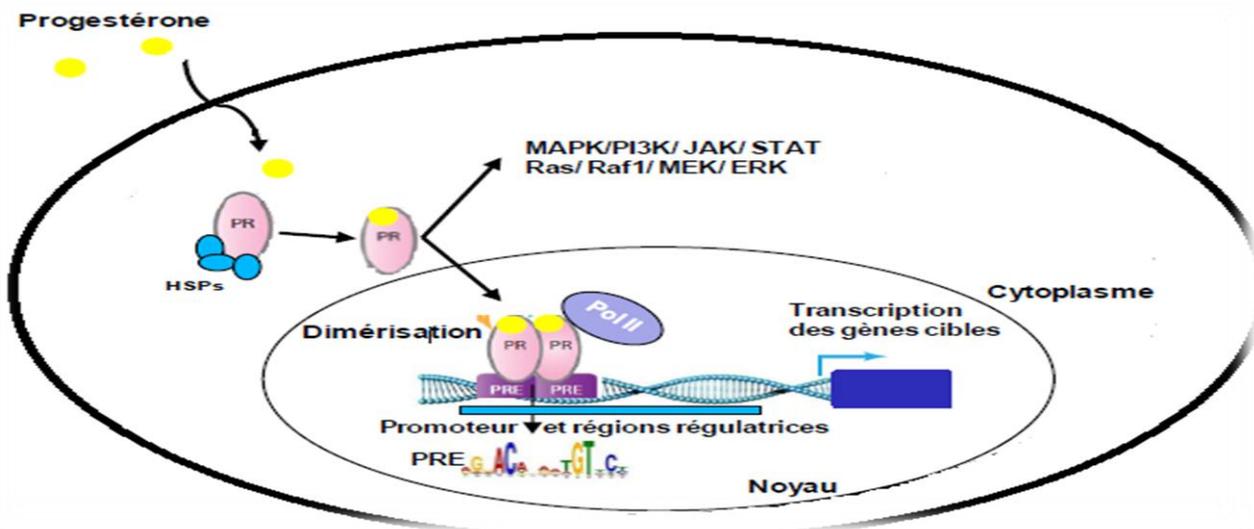


Figure 4: Mécanisme d'action du récepteur de la progestérone nucléaire. RP (Récepteur de la progestérone), HSPs (Protéines de choc thermique), Pol II (ARN polymérase II), PRE (Eléments de réponse à la progestérone). RP, en absence de ligand, est localisé dans le cytoplasme et est associé aux HSPs. Suite à la liaison du ligand, RP se dissocie de ces derniers, se dimérise et transloque dans le noyau (Sainsbury *et al.*, 2015).

I.2.1.2- Gènes suppresseurs de tumeur:

Les gènes suppresseurs de tumeur sont responsables de la régulation négative de la croissance cellulaire. Ils sont impliqués dans l'inhibition du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose. La perte de leur expression et de leur fonction, est due à une altération touchant les deux allèles. Le gène TP53 en est l'exemple le plus connu. (Bignon *et al.*, 2005).

✓ TP 53:

Le gène TP 53 se situe sur le chromosome 17p13.1 et code la protéine p53 qui est composé de quatre domaines: un domaine de transactivation, un domaine de liaison à l'ADN, un domaine de tetramérisation et enfin un domaine de régulation C-terminal (Figure 5). Plus de la moitié des tumeurs présentent des mutations au sein de ce locus. De ces mutations 90% sont localisées au niveau de la région codant le domaine de liaison a l'ADN et 75% correspondent à des mutations faux sens (William *et al.*, 2012).

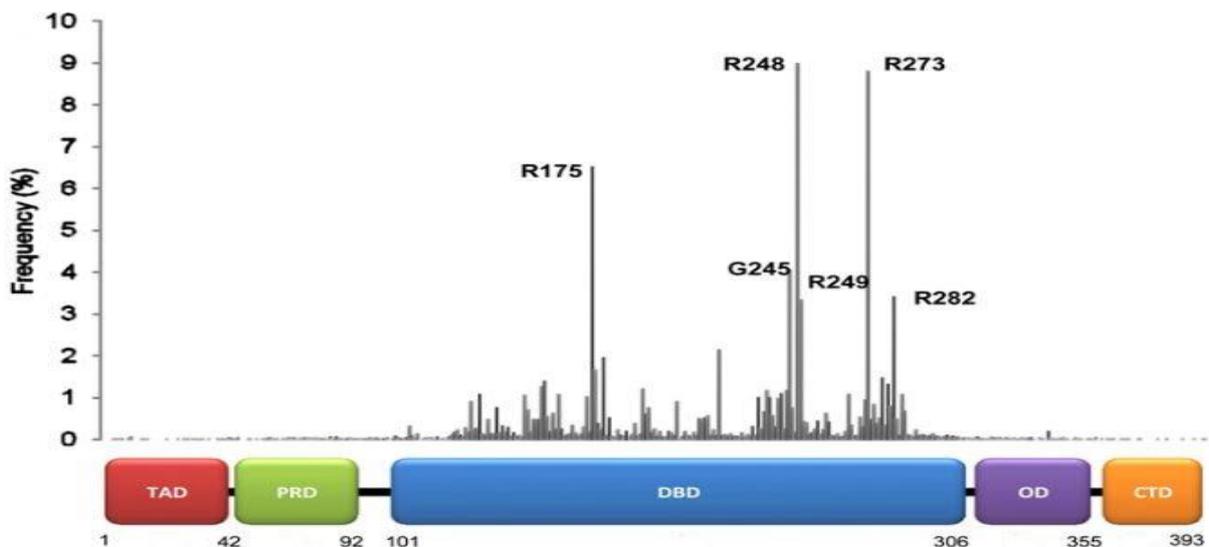


Figure 5: Structure de la p53 avec la fréquence des mutations faux-sens. Les barres verticales représentent la fréquence et la localisation des mutations. Le domaine TAD représente le domaine de trans-activation; le domaine DBD représente le domaine de liaison à l'ADN, le domaine OD représente le domaine tétramérisation ; CTD est le domaine de régulation c- terminal. (William *et al.*, 2012)

La protéine p53 non mutée joue le rôle de suppresseur de tumeur. Induite en condition de stress cellulaire, par des dommages de l'ADN, elle agit comme facteur de transcription des

protéines inhibant le cycle cellulaire et induisant l'apoptose (figure 5) (Petit jean *et al.*, 2007). Ça forme mutée est caractérisée par une demi-vie plus longue et une meilleure stabilité. Cependant, elle ne réalise plus ça fonction de facteur de transcription ce qui entraine une division cellulaire incontrôlé. Autrement dit, l'ADN est répliqué malgré la présence de dommages (William *et al.*, 2012).

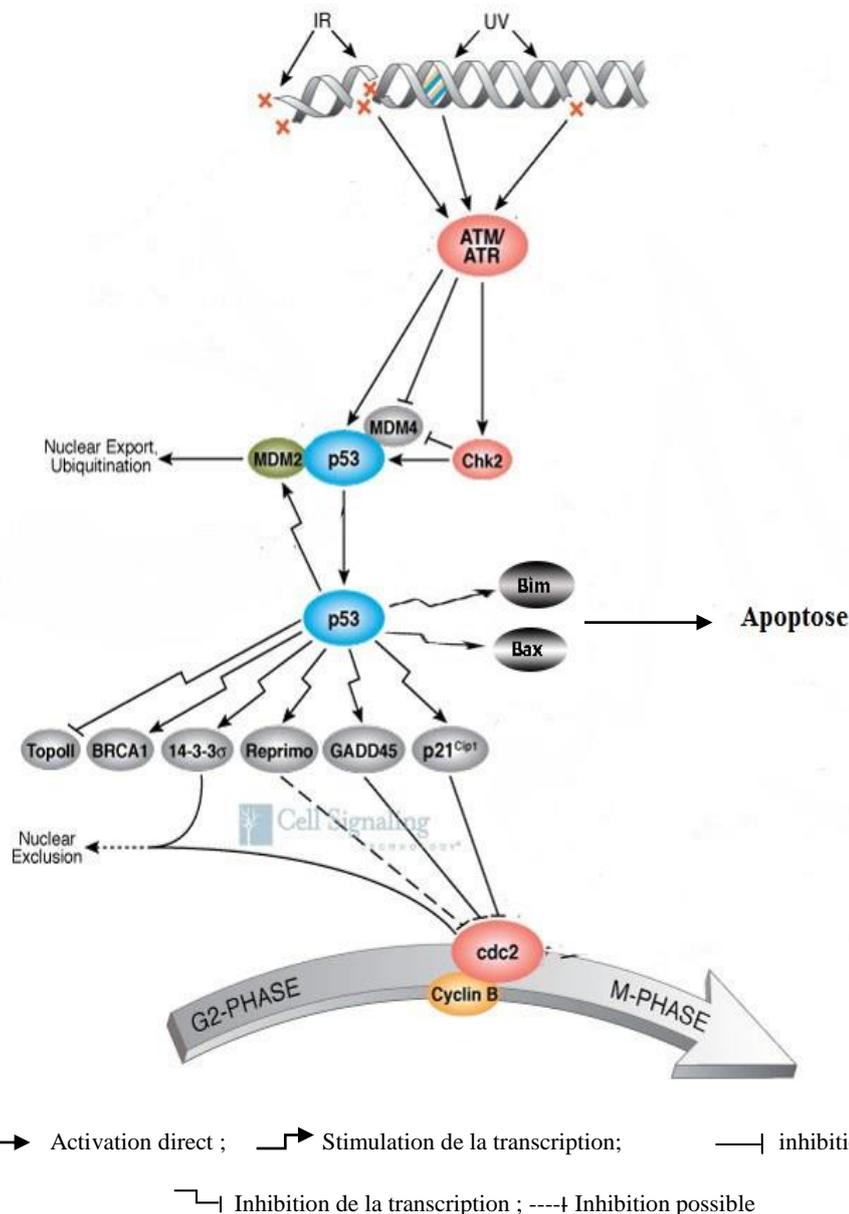


Figure 6: Mécanisme d'action de la protéine 53. Des dommages de l'ADN induisent l'activation des kinases ATM/ATR qui vont phosphorylé la p53. Une fois activée elle se détache de mdm2 et induit l'expression de facteurs tels que p21, GADD45 qui provoquera l'arrêt du cycle cellulaire, par l'inhibition des cdc2/cycline B. la transcription de Bim et Bax induira l'apoptose (Adapté de cell signaling technology, 2016).

I.2.1.3- Gènes du maintien de l'intégrité :

Appeler aussi gènes «*caretakers*», ils sont responsables du contrôle de la stabilité et de l'intégrité du génome, ils permettent ainsi, la transmission fidèle de l'information génétique de la cellule vers ses descendantes. Un déficit au niveau de l'un de ces gènes entraîne l'accumulation des mutations favorisant l'apparition de cancers. (Scotté *et al.*, 2008).

I.2.2- Apparition d'une tumeur:

L'apparition d'une tumeur est perçue depuis plusieurs années comme un processus à étapes multiples mettant en jeu plusieurs altérations génétiques successives. Selon la théorie de Knudson, deux altérations initiales sont d'abord nécessaires à l'apparition d'une cellule tumorale, Toutefois de nombreuses données indiquent que certaines tumeurs pourraient provenir d'une cellule unique non différenciée, appelée cellule souche cancéreuse. Celle-ci aurait subi plusieurs modifications génétiques aboutissant à un processus néoplasique (Marx, 2003).

Bien que ces deux théories ne soient pas mutuellement exclusives, elles seront abordées distinctement afin d'en souligner les caractéristiques.

✓ Théorie de Knudson:

Appelée *two-hit hypothesis*, cette théorie suggère qu'une mutation unique n'est pas suffisante pour initier un processus néoplasique. Un second évènement génétique sur le même gène est nécessaire à l'initiation de ce processus. La première mutation peut être soit hérité expliquant ainsi l'apparition précoces de certaines tumeurs, ou bien acquise et donc une apparition plus tardive (Knudson, 1971).

✓ Théorie des cellules souches cancéreuses :

La théorie des cellules souches cancéreuses s'est développée avec l'idée qu'une tumeur se comporte comme un organe. Les organes se développent et se renouvèlent grâce à un pool de cellules souches bien distinctes. La croissance des tumeurs et le maintien de leur hétérogénéité pourrait être ainsi entretenue par les cellules souches cancéreuses. Ces cellules, très rares, présentent par ailleurs une résistance à l'apoptose et aux différents traitements anti-tumoraux, ce qui expliquerait l'agressivité et les récives de certaines tumeurs (Rivera *et al.*, 2011).

I.2.3- Développement tumoral:

Le développement tumoral passe principalement par trois phases, l'initiation, la promotion et la propagation.

I.2.3.1- La phase d'initiation:

L'initiation est la première phase de la tumorigenèse. Elle concerne une seule cellule qui initie un processus néoplasique. De plus elle peut être déclenchée par des facteurs endogènes tels que, les mutations héréditaires présentes au niveau des cellules germinales, ou exogènes tels qu'une exposition prolongée à des agents mutagènes: chimiques (ex: les additifs alimentaire, l'amiante... etc), physiques (les radiations ionisantes, UV... etc) ou biologiques (les virus et les bactéries). Ces facteurs interagissent avec le génome, et induisent des mutations irréversibles aboutissant à une activation d'oncogène et ou une inactivation des gènes suppresseurs de tumeur (**Poupon, 2005**).

I.2.3.2- La phase de promotion:

C'est la deuxième phase de la tumorigenèse, elle débute quand un promoteur stimule la prolifération des cellules initiées et que celles-ci donnent naissance à un clone qui continue de croître jusqu'à atteindre une tumeur histologiquement détectable et localisée, mais toujours dépendante des signaux de prolifération extra cellulaire (**Poupon, 2005**).

De multiple facteurs aussi bien endogènes tels que les hormones (progestérone) et les facteurs de croissance, qu'exogènes stimulant la croissance cellulaire, entraînent une amplification de l'instabilité génomique et participent donc à la promotion de la cellule initiée (**Patrick et al., 2005**).

I.2.3.3- La phase de propagation:

Pendant cette troisième phase, les lésions précancéreuses continuent à croître et à se développer malgré l'absence de stimuli externe, étant donné que leur prolifération est devenue autonome, du fait de l'accumulation de certaines mutations (**Poupon, 2005**).

L'augmentation du volume de la tumeur induit une hypoxie et un appauvrissement en nutriments, l'une des réponses à cet état, peut-être l'enclenchement du processus d'angiogenèse, une des voies de la dissémination métastatique (**Poupon, 2005**). Celle-ci se décompose en plusieurs événements: l'angiogenèse et les étapes de migration cellulaire. Chacun de ces événements nécessite l'acquisition par la cellule des aptitudes particulières

(mobilité, protéolyse). Néanmoins de nombreux mécanismes sont impliqués dans la mort des cellules métastatiques circulantes: le stress mécanique de la circulation sanguine, la toxicité de la concentration en oxygène sanguin qui est supérieure à la concentration intra-tumoral, sans oublier l'implication du système immunitaire (**Patrick et al., 2005**).

✓ **L'angiogénèse:**

L'angiogénèse tumorale correspond à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins destinés à répondre aux besoins nutritionnels et en oxygène de la tumeur. Ce mécanisme est dépendant de la balance pro-angiogénique et anti angiogénique (**Lu et Kang, 2010**).

Le faible niveau d'oxygène intra tumoral déclenche la sécrétion de facteurs, qui induisent la germination et le chimiotactisme des cellules endothéliales en direction de la masse tumorale.

Au sein de l'environnement hypoxique de cette dernière, le facteur hypoxia-inducible factor 1 (hif-1) est exprimé et induit l'expression de plusieurs gènes codant des facteurs pro-angiogéniques, Comprenant le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) qui induit la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (**Sakurai et Kudo, 2011**).

✓ **La migration cellulaire:**

La migration cellulaire passe par plusieurs étapes nécessitant une transition épithélio-mésenchymateuse ainsi que l'intervention de nombreux facteurs tels que les chimiokines :

➤ **Transition épithélio-mésenchymateuse:**

L'acquisition de la capacité de mouvance des cellules tumorales qui implique la perte d'adhérence aux cellules voisines est un processus appelé «transition épithélio-mésenchymateuse (EMT)». Celui-ci découle de l'action du facteur HIF qui induit l'augmentation de l'expression des répresseurs des E-cadhérines, responsables du maintien de l'intégrité et de la polarité épithéliale (**Lu et Kang, 2010**).

➤ **Mobilité cellulaire:**

La mobilité cellulaire peut être considérée comme la somme d'évènements conduisant à un mouvement d'un corps cellulaire dans son environnement.

L'acquisition d'un phénotype polarisé, avec un front de migration et une zone arrière est l'une des conséquences de la transition épithélio-mésenchymateuse, suivis de l'action des intégrines sur le cytosquelette d'actine. Cette polarité est accompagnée par la formation de protrusions cellulaires appelées pseudopodes. En effet, les intégrines sont essentielles car, elles assurent l'adhésion à la matrice extracellulaire, mais aussi, elles régulent la signalisation intracellulaire responsable de l'organisation du cytosquelette (Lu et Kang, 2010).

➤ **Intravasation:**

L'angiogenèse tumorale est caractérisée par une organisation et des dimensions vasculaires anarchiques ainsi qu'une perméabilité vasculaire accrue. Ce qui contribue au risque d'intravasation (Poupon, 2005). Mais aussi l'augmentation de l'expression des métalloprotéases (MMP) qui induisent une dégradation de la lame basale et par la même favorise la perméabilité vasculaire et intravasculaire (Xie *et al.*, 2016).

➤ **Circulation, arrêt et extravasation :**

Une fois l'intravasation effectuée, les cellules tumorales sont transportées dans la circulation sanguine ou lymphatique à distance de la tumeur primitive, jusqu'au niveau de l'endothélium de l'organe cible. Cette étape ne se fait pas de façon aléatoire suggérant que ces cellules tumorales ne se développent que dans des sites qui leur sont favorables, on parlera alors de tropisme cellulaire (Méjean et Lebert, 2008). Cependant d'autres théories expliquent ce phénomène de *homing*, par l'implication du récepteur CXCR4 et son ligand CXCL12. Les cellules souches hématopoïétiques qui expriment le CXCR4, sont recrutées vers la moelle osseuse où est exprimé le CXCL12 (Sarvaiya *et al.*, 2013). Des études suggèrent que les métastases du cancer du sein qui expriment le récepteur CXCR migrent vers des organes où l'on retrouve une expression élevée de CXCL12 (Muller *et al.*, 2001). Dès que l'endothélium de l'organe cible est atteint, la cellule tumorale effectue une extravasation nécessitant les mêmes propriétés qu'à l'intravasation (Lu et Kang, 2010). Dès lors les cellules tumorales peuvent rester en dormance (en phase G0) pendant plusieurs mois ou années, ou bien proliférer directement induisant la formation de micrométastases pré-angiogéniques qui se développent jusqu'à ce qu'elles atteignent un stade cliniquement détectable.

I.3- LES TUMEURS CEREBRALES:

Les tumeurs primitives du SNC sont des néoplasies dérivées des cellules neuroectodermiques (**Wager et al., 2005**). Elles représentent un ensemble hétérogène de maladies de caractérisations complexes et de fréquences variables. Leur incidence est estimée à près de 17/100 000 personnes par ans. Elles constituent la troisième cause de décès pour le groupe de 15 à 34 ans et représentent 25 % des cancers pédiatriques (**World Health Organization, 2012**). Les tumeurs cérébrales sont actuellement identifiées suivant la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (Tableau I), créée à l'origine en 1965 et fréquemment remise à jour. Malheureusement, cette classification, qui se base essentiellement sur des critères histologiques et des degrés de malignité, est assez subjective et fait totalement abstraction des aspects génétiques des tumeurs. Ainsi, le développement d'une classification moléculaire plus précise est de plus en plus envisagée (**Gorlia et al., 2008**).

Dans la version 2007 de la classification de l'OMS, quelques modifications ont été apportées, pour mieux définir la signification biologique de chaque grade (**Louis, 2007 ; Brat, 2008**) :

- **Grade I** : est attribué aux tumeurs circonscrites à croissance lente et dont l'exérèse chirurgicale complète permet la guérison (exemples : astrocytome pilocytique, gangliogliome).
- **Grade II** : il correspond aux lésions tumorales infiltrantes de bas grade de malignité ayant tendance à récidiver après cure chirurgicale (exemple : astrocytome fibrillaire, oligodendrogliome, méningiome atypique)
- **Grade III** : il représente les tumeurs histologiquement malignes et nécessitant des traitements agressifs.
- **Grade IV** : correspond aux tumeurs qui, spontanément, sont d'évolution rapidement fatale (glioblastome, médulloblastome).

Les tumeurs cérébrales les plus fréquemment rencontrées sont les méningiomes et les glioblastomes représentant suivant les bases de données entre 28.5% et 33.6% pour les méningiomes et entre 17% et 27.7% pour les glioblastomes de l'ensemble des tumeurs primitives cérébrales (**Bauchet, 2007 ; Loiseau, 2009**).

Tableau I: Classification simplifiée des tumeurs du système nerveux central selon l’OMS adapté de (Louis *et al.*, 2007).

Tumeurs neuroépithéliales	<ul style="list-style-type: none"> • Tumeurs astrocytaires • Tumeurs oligodendrogiales • Tumeurs oligoastrocytaires • Tumeurs épendymaires • Tumeurs des plexus choroïdes • Tumeurs neuronales glioneuronales • Tumeurs de la région pinéale • Tumeurs embryonnaires
Tumeurs des nerfs crâniens et spinaux	<ul style="list-style-type: none"> • Schwannome • Périneuriome • Tumeurs maglines des gains nerveuse
Tumeurs des méninges	<ul style="list-style-type: none"> • Tumeurs des cellules méningées • Tumeurs mésenchymateuses • Hémingiopéricytome • Tumeurs mélanocytaires et melaniques primitives • Hémangioblastomes

L’intérêt de ce travail sera basé exclusivement sur les méningiomes

I.3.1- Les méningiomes :

Les méningiomes sont des tumeurs primaires du SNC fréquemment bénignes, qui se développent à partir des cellules arachnoïdiennes des leptoméninges. Elles représentent 30 % des tumeurs cérébrales chez l’adulte, avec une prédominance chez la femme et un sexe ratio H/F de 0,5 (Fonkem *et al.*, 2016). Plus de 90% des méningiomes sont sporadiques et rarement associés à des facteurs héréditaires (Smith, 2015).

Selon l’organisation mondiale de la santé les méningiomes peuvent être divisés en trois grades histologiques : grade 1 (bénin), grade 2 (atypique) et grade 3 (anaplasique), regroupant chacun différents sous-types (Tableau II) (Louis *et al.*, 2007).

Tableau II: Classification histologique des méningiomes selon l’OMS 2007 (Louis *et al.*, 2007).

Grade	Sous-type histologique
<p align="center">Méningiomes bénins (WHO grade I)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Meningothéliomateux • Fibroblastique ou fibreux • Transitionnel ou mixte • Psammomateux • Angiomateux • Microkystique • Sécrétant • Riche en lymphoplasmocytes • Métaplasique
<p align="center">Méningiomes atypiques (WHO grade II)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Chordoïde • A cellule claire • Atypique
<p align="center">Méningiomes anaplasiques (WHO grade III)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Papillaire • Rhabdoïde • Anaplasique ou malin

I.3.1.1- Critères histologique de certains méningiomes:

❖ **Grade I de l’OMS (Louis *et al.*, 2007) :**

Plusieurs types architecturaux cellulaires sont définis au sein de ce groupe. Les quatre types les plus fréquents sont les méningiomes méningothéliomateux, fibroblastiques et transitionnels.

- **Méningiomes méningothéliaux** : ils sont formés par des plages de cellules meningothéliales entourées par un tissu fibreux plus ou moins abondant et sont caractérisés par :
 - Un noyau rond ou ovale avec une chromatine fine possédant des inclusions.
 - Des membranes cellulaires mal délimitées.
 - Des pléomorphismes cellulaires.
 - Présence de cellules géantes avec noyau unique ou multiple.
 - **Méningiomes fibroblastiques** : ils sont composés de faisceaux de cellules allongées ressemblant aux fibroblastes, caractérisés par des noyaux ronds ou ovales avec de rares inclusions nucléaires et un stroma riche en collagène et réticuline.
 - **Méningiome transitionnel** : ce type de tumeur a les caractéristiques histologiques des méningiomes méningothéliaux et fibroblastiques, ajoutant à cela la présence de nombreux enroulements cellulaires ou *whorls* et des calcifications concentriques.
 - **Méningiomes psammomateux** : ce type de tumeur est caractérisé principalement par :
 - La richesse en corps psammeux.
 - Richesse en calcosphérites.
 - Un stroma contenant une substance amyloïde.
 - ❖ **Grade II de l’OMS (Louis *et al.*, 2007) :**
 - **Méningiome Atypique**: Ces tumeurs dérivent des tumeurs bénignes décrites ci-dessus. Les classifications de l’OMS de 2000 et de 2007 permettent de conclure à un méningiome atypique si l’on retrouve les critères suivants :
 - Plus de 4 mitoses pour 10 champs (x400).
 - Cellularité élevée.
 - Rapport nucléo cytoplasmique élevée.
 - Nucléoles proéminents.
 - Perte de l’organisation et de l’architecture tissulaire ainsi qu’une nécrose.
 - ❖ **Grade III de l’OMS :**
 - **Méningiomes anaplasiques** :
- Ce sont des tumeurs malignes ayant une anaplasie cellulaire caractérisée par :
- Une activité mitotique supérieure aux types atypique.
 - Présence de 20 mitoses pour 10 champs (x400).

I.3.1.4- Altérations génétique des méningiomes :

Les méningiomes sont caractérisés par des anomalies génétiques affectant principalement les voies de transduction du signal et du contrôle du cycle cellulaire. Les mutations du gène neurofibromatose 2, ainsi que les altérations des chromosomes 9 et 14, sont les plus retrouvés chez les méningiomes (**Domingues *et al.*, 2015**).

- **Le gène neurofibromatose 2 (NF2):**

Le gène NF2 est localisé sur le chromosome 22q12.2 et code une protéine appelée merline, impliquée dans la liaison des protéines de la membrane cellulaire au cytosquelette, ainsi que dans la mobilité et la prolifération cellulaire (**Pecina-salaus, 2013**).

Les mutations du gène NF2 sont retrouvées dans 40 à 70% des méningiomes sporadiques. Elles correspondent principalement à des insertions, délétions ou mutations non-sens qui affectent la région d'épissage et ont pour conséquence une protéine tronquée non fonctionnelle (**Domingues *et al.*, 2015**).

La principale caractéristique des cellules dépourvues de l'activité de la protéine merline est la perte de l'inhibition de contact (**Pecina-salaus, 2013**).

- **Le chromosome 9:**

Les pertes génétiques sur le chromosome 9p ont été rapportées dans 5-17 % de grades I, 18-52 % de grades II, et 38-74 % des grades III (**Choy *et al.*, 2011**).

Le rôle du chromosome 9 dans le développement des méningiomes a été associé à trois gènes suppresseurs de tumeurs codés sur le chromosome 9p21: CDKN2A / p16 Inka, CDKN2A / p14 et CDKN2B / p15 ARF. Les protéines codées par ces trois gènes sont connues pour jouer un rôle important dans la régulation de l'apoptose et du cycle cellulaire ; ainsi p16 et p15 régulent la progression du cycle cellulaire au point de contrôle G1 / S en inhibant les complexes cycline - cdk, alors que, p14 régule l'apoptose en favorisant l'activité de p53 par la régulation négative du proto-oncogène murin double minute 2 (MDM2) (**Choy *et al.*, 2011**).

- **Le chromosome 14 :**

La monosomie 14 est retrouvée dans 31% des grades I, 40-70% des grades II, et 100% des grades III. D'un point de vue pronostique cette anomalie est un indicateur de récurrence .Le

gène AKT1 est localisé sur le chromosome 14q32 et code une protéine Akt impliqué dans la prolifération cellulaire, en phosphorylant p21 et p27 inhibiteurs de CDK et la survie cellulaire, en inhibant des protéines pro-apoptotiques comme *the -2-associated death promoteur (BAD)* (Hers *et al.*, 2011; Brastianos *et al.*, 2013).

I.4- LES BIOMARQUEURS:

Un biomarqueur ou encore appelé marqueur biologique est défini selon le *National Institute of Health* comme «une caractéristique biologique mesurée de façon objective et évaluée comme un indicateur soit de processus normaux ou pathologiques, soit de réponses pharmacologiques résultant d'une intervention thérapeutique» (strambu *et al.*, 2010).

Le terme de marqueurs biologiques a été formulé pour la 1ère fois en 1975 «Advances in Cancer management». En 1980 Gross-Koln présentait les possibilités diagnostiques par les marqueurs tumoraux pour des études transversales (Martin et Muracciole, 2005). Cependant, les biomarqueurs ne sont pas un concept nouveau, leur utilisation a été connue par la médecine dans le passé, la détermination de la glycémie pour le diabète de type II est un exemple simple qui correspond à la définition d'un marqueur biologique, mais ils n'avaient pas la même dénomination et intérêt actuelle (Adam *et al.*, 2010).

Les biomarqueurs représentent aujourd'hui un domaine vaste et sont utilisés dans plusieurs disciplines, entre autres dans l'oncologie, l'endocrinologie, et même dans la psychiatrie. Ils sont mesurables au niveau des tissus et des liquides biologiques. Les caractéristiques d'un marqueur tumoral idéal sont (Pierre *et al.*, 2005):

- Application facile : dosage simple, reproductible.
- Déteçtabilité : le biomarqueur utilisé doit avoir une méthode de dosage permettant la mesure d'une différence quantitativement significative.
- Sensibilité : permet de déceler seulement les sujets atteints.
- Spécificité : permet la détection du site atteint (spécificité d'organe).

I.4.1- Classification des biomarqueurs:

Les biomarqueurs sont classés selon leur intérêt clinique et leur nature biochimique.

I.4.1.1- Classification des biomarqueur selon leur intérêt clinique:

Les biomarqueurs clinique sont classés selon leurs différents objectifs d'utilisation en biomarqueur pronostic, biomarqueur physiopathologique et diagnostic, biomarqueur Prédicatif de l'effet thérapeutique, et biomarqueur prédictif de l'effet pharmacodynamique (Tableau III).

Tableau III: Classification des biomarqueurs selon l'intérêt qu'ils peuvent présenter sur le plan clinique.

Application cliniques des marqueurs	Objectifs d'utilisation	Référence
Biomarqueur pronostic	-Prédire l'évolution de la maladie -Définir une population de bon ou de mauvais pronostic	(Fraser <i>et al.</i>, 2007)
Biomarqueur Physiopathologique et diagnostic	-Expliquer les modifications des fonctions de l'organisme ; -Identifier de nouvelles cibles thérapeutiques	(Fraser <i>et al.</i>, 2007)
Biomarqueur Prédicatif de l'effet thérapeutique	-Définir une population répondant à un traitement spécifique ciblé ou non	(McShane <i>et al.</i>, 2009)
Biomarqueur Prédicatif de l'effet pharmacodynamique	-Déterminer l'activité biologique du traitement	(McShane <i>et al.</i>, 2009)

I.4.1.2- Classification des biomarqueurs selon leur nature biochimique:

En fonction de leurs natures biochimiques, les biomarqueurs sont classé en biomarqueur génomique et transcriptionnel, biomarqueurs proteomique, biomarqueurs métalobolomique (Tableau IV).

Tableau IV : Classification des biomarqueurs selon leur nature biochimique.

Type	Nature biochimique	Intérêt	Référence
Génomique et transcriptionnel	ADN/ ARNm	-Analyse qualitative et quantitative des séquences d'acides nucléiques -Corrélation entre une variation génétique et une pathologie ou la réponse à un traitement	(Marrer et Dieterle, 2007)
proteomique	Ensemble de protéines	-Etudier les variations des taux d'expressions des différentes protéines.	(Scaros et al., 2005)
métabolomique	Métabolite endogènes	-Etablir le profil d'expression des métabolites endogènes issus des processus biologiques.	(Marrer et Dieterle, 2007)

I.4- IMMUNOHISTOCHEMIE :

L'immunohistochimie est une technique d'immuno-marquage utilisée principalement en anatomie et cytologie pathologiques, qui permet d'étudier les tissus présentant des lésions **(Caulet-Maugendre, 1999)**. En cancérologie, cette technique permet l'identification et le typage des cellules tumorales, grâce à la mise en évidence de marqueurs de différenciation spécifique et à l'identification de produits d'anomalies moléculaires ou génétiques sur des tissus préalablement fixés et paraffinés ou congelés, en utilisant des anticorps qui se fixe spécifiquement sur les motifs antigéniques de ces molécules **(Droz, 2011)**.

Deux méthodes de marquage sont utilisées en immunohistochimie:

- **Méthode directe:** elle repose sur l'utilisation d'un seul anticorps spécifique couplé à une molécule de détection.
- **Méthode indirecte:** elle consiste en l'utilisation de deux anticorps l'un primaire qui cible spécifiquement l'antigène et l'autre secondaire et couplé à une molécule de détection.

Le choix de la technique de préparation des tissus pour une étude immunohistochimique est déterminé en fonction des antigènes à révéler (**Caulet-Maugendres, 1999**). En effet, certains antigènes ne peuvent être étudiés que sur tissus congelés, c'est le cas; notamment des immunoglobulines au niveau de la surface membranaire des lymphocytes, étant donné leur destruction après fixation et inclusion en paraffine. La congélation peut se faire sur des tissus fixés ou de préférence frais non fixé (**Caulet-Maugendres, 1999**). Toutefois, sur les tissus fixés et inclus dans la paraffine, la morphologie est nettement mieux conservée que sur les tissus congelés.

La fixation joue un rôle primordial dans la conservation des antigènes, elle varie selon le type de fixateur et la durée de fixation. Le formol à 10 % reste le fixateur le plus utilisé, il permet la conservation des sites antigéniques de façon satisfaisante (**Caulet-Maugendres, 1999**).

I.4.1- Intérêts de l'immunohistochimie :

L'immunohistochimie est utile pour guider le diagnostic, en facilitant l'identification et la classification des tumeurs indifférenciées, le pronostic, en prédisant l'évolution de la tumeur, La mise en évidence d'agents infectieux tels que les Cytomégalovirus, les Papillomavirus humains et facilite le choix d'une thérapie anticancéreuse en ciblant les voies de signalisations (**Teague et al., 2016**).

I.4.2- Limites de l'immunohistochimies :

L'immunohistochimie nous renseigne sur le taux d'expression d'une molécule. Cependant, elle ne donne aucune information sur le changement possible de l'activité de cette dernière.

Il est important de prendre conscience des limites de spécificité et de sensibilité de chaque anticorps ce qui pourrait entraîner des résultats faux positifs (**Teague et al., 2016**).

CHAPITRE II :
MATERIEL ET
METHODES

II.1- Etude épidémiologique

Notre étude a débuté par une analyse épidémiologique au sein du service d'anatomo-pathologie du centre hospitalo-universitaire de MUSTAPHA BACHA d'Alger. Cette étude s'est portée sur 67 cas de méningiomes, allant de 2009 à 2011. Les données ont été recueillies à partir de fiches portant le numéro de dossier correspondant à chaque patient. Les paramètres pris en compte sont: l'âge, le sexe et le diagnostic (selon l'OMS 2007). Les données ont été analysées à l'aide du logiciel Excel stat.

II.2- Etude histo-pathologique :

Les techniques histologiques ont pour buts l'obtention de coupes fines de tissus colorés ou marqués, pour des études histochimiques et immunohistochimiques, observables au microscope optique. Pour cela, les pièces tumorales ont subies différents traitements afin d'obtenir des blocs de tissus paraffinés, selon le protocole suivi au sein du service d'anatomie pathologie de l'établissement hospitalo-universitaire MUSTAPHA BACHA.

II.2.1- Préparation des tissus

II.2.1.1- Matériels :

- **Patients :**

14 cas sur les 67 étudiés ont été sélectionnés sur la base de la disponibilité des tissus tumoraux et du grade des méningiomes pour une étude histo-pathologique (Tableau V).

Tableau V: Information sur les patients.

Grade	Nombre	Homme	Femme	Age (ans)
Grade 1	8	0	8	32-58
Grade 2	5	3	2	31-60
Grade 3	1	1	0	65

- **Matériels du laboratoire:**

Unicassettes d'inclusion ; Automate de déshydratation ; pinceaux ; Moules et Appareil d'enrobage.

- **Produits chimique:**

Formol 10% ; Xylène ; Alcool absolu ; Paraffine.

II.2.1.2- Méthodes:

- **Fixation:**

Les prélèvements tumoraux ont été découpés en tranches, placés dans des cassettes référencées selon le numéro de dossier et l'année, puis plongé dans un bocal contenant du formol à 10% pendant 24h (Figure 7), dans le but de conserver les tissus dans un état aussi proche que possible de l'état physiologique normal, et ce en bloquant l'autolyse protéique.



Figure 7 : Fixation des tissus dans du formol à 10% (photographie originale).

- **Circulation :**

Cette étape a été réalisée à l'aide d'un automate réglé sur un cycle de 12h (Figure 8). La circulation comprend trois étapes : la déshydratation, l'éclaircissement et l'imprégnation. Dans le but de rendre les tissus suffisamment rigides et facilement manipulables.

Les cassettes ont été plongées dans six baignoires d'alcool pendant une durée totale de 6h (1h par baignoire) à des concentrations croissantes, allant de 70% à 100% afin de déshydrater les tissus, suivies de trois baignoires de xylène (1h par baignoire), dans le but d'éliminer toute trace d'alcool et préparer les tissus à la pénétration de la paraffine. Pour l'imprégnation, les tissus ont été plongés dans trois baignoires de paraffine pendant 3h (1h par baignoire).



Figure 8: Automate de circulation (photographie originale).

➤ **Inclusion :**

Les fragments ont été placés au centre des moules préalablement enrobés de paraffine, puis laissés gélifier quelques secondes. Les moules ont été ensuite recouverts par des cassettes initialement référencées, puis enrobés une deuxième fois et laissés gélifier jusqu'à l'obtention de blocs durs (Figure 9).



Figure 9: Enrobage des tissus avec de la paraffine (Photographies originales).

II.2.2- Etude histochimique :

Une étude histochimique a été réalisée au niveau du laboratoire d'histologie du service d'anatomo-pathologie, dans le but de confirmer ou infirmer le diagnostic d'origine.

II.2.2.1- Matériels :**• Matériels du laboratoire :**

Microtome ; bain marie ; lames port objet ; lamelles 50/60mm ; porte lame ; bocaux de coloration ; bocaux de lavage ; plaque chauffante ; microscope optique.

• Produits chimiques :

Xylène ; alcool ; hématoxylène de HARRIS ; éosine ; EUKITT.

II.2.2.2- Méthodes :**➤ Réalisation des coupes :**

Les blocs de paraffine ont été montés sur le microtome afin de réaliser des coupes de $3\mu\text{m}$ d'épaisseur. Les rubans obtenus ont été immergés dans un bain-marie puis étalé sur des lames référencées et mises dans des portes lames puis laissées à l'étuve pendant 40 min à 70° (Figure 10).

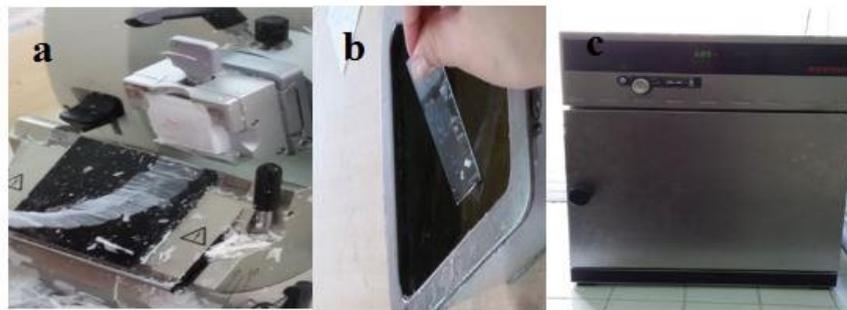


Figure 10 : Etapes récapitulatifs de la réalisation des coupes. (a) coupe au microtome ; (b) étalement ; (c) incubation. (Photographies originales)

➤ Coloration et montage:

Pour mettre en évidence les structures cellulaires une coloration Hématoxylène Eosine (HE) a été réalisée. Les coupes ont d'abord été déparaffinées après incubation dans l'étuve et par deux bains de xylène (5 mn par bains), suivi de trois bains d'alcool a concentrations décroissante (100%, 95%, 70%, 5 mn chacun), puis réhydraté avec l'eau du robinet. Elles ont été ensuite plongées dans un bac d'hématoxylène d'HARRIS (hémalun) pendant 5mn pour la coloration des noyaux. Après rinçage à l'eau du robinet, une contre coloration à l'éosine a été réalisée (quelque seconde) pour mettre en évidence le cytoplasme, le collagène, la kératine et

les érythrocytes. Après rinçage, les coupes ont été déshydratées par trois bains d'alcool (1min chacun) et éclaircies par deux passages rapides dans le xylène.

Les lames ont été séchées sur des plaques chauffantes puis recouvertes de lamelles en utilisant de l'eukitt, elles sont ainsi prêtes pour l'observation au microscope optique qui a été effectuée sous grossissement 10X4, 10X10 et 10X40 (Figure 11).



Figure 11 : Photos représentant la coloration, le montage des lames et leurs observations (Photographies originales).

II.2.3- Etude Immunohistochimie:

Une étude immunohistochimique a été réalisée au niveau du laboratoire d'immunohistochimie du service d'anatomo-pathologie, pour le marquage de la protéine P53 et du récepteur de la progestérone (RP), suivant le protocole du laboratoire et celui du fabricant des kits (DAKO) (Annexe 1 et 2).

II.2.3.1- Matériels :

- **Matériels du laboratoire :**

Microtome ; Etuve ; bain marie ; lames silanisées ; lamelles 50/60mm ; porte lames ; bacs de coloration ; bacs de lavage ; plaque chauffante ; chambres humides ; micropipette ; microscope optique.

- **Produits chimiques :**

PBS ; Alcool ; Xylène ; Dakopen ; Eau oxygénée ; Eau distillée ; Hématoxyline de Mayer ; Anticorps primaire anti p53 (clone DO-7) ; Anticorps primaire anti RP (clone PgR 636) ; Anticorps secondaires ; Peroxydase ; Diaminobenzène (DAB) ; Chromogène.

II.2.3.2- Méthodes:**❖ Déparaffinage, démasquage antigénique et blocage des peroxydases endogène :**

À fin de les déparaffinées, Les coupes préalablement étalées sur des lames silanisées référenciée, Ont était incubé dans une étuve à 54 C° pendant 24h puis ont subis 4 bains de xylème (5 mn chacun) et 3 bain d'alcool absolu (5mn chacun), respectivement. Après plusieurs rinçages à l'eau du robinet, l'excès d'alcool a été enlevé et les coupes ont subi un prétraitement pour le démasquage des sites antigéniques, et ce, en plaçant les lames dans un tampon tris-EDTA ph=9 et en les mettant dans un bain marie à 90°C pendant 40min. Les lames ont été retirées et laissées refroidir pendant 20 mn puis rincées avec de l'eau distillé et rangées dans un plateau humide. Les coupes ont été entourées à l'aide d'un dakopen pour ne pas perdre les réactifs à ajouter ultérieurement. Quelques gouttes d'eau oxygénée (H₂O₂) ont été ajoutées à la zone sélectionnée et laisser incuber à température ambiante 10 min, afin de bloquer la peroxydase endogène (figure 12).

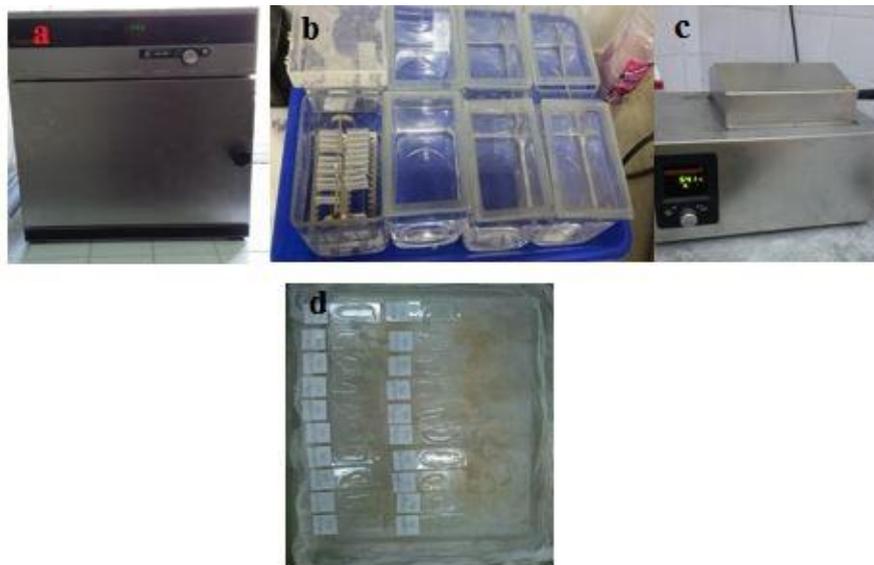


Figure 12 : Déparaffinage, démasquage antigénique et blocage des peroxydases endogène. (a) étuve ; (b) bain xylène et alcool ; (c) bain marie ; (d) blocage péroxydase endogène (photographie originale).

❖ Application des anticorps :

- **Anticorps primaire :** Après deux rinçages à l'eau désilé. On applique suffisamment de solution d'anticorps primaire pour couvrir les coupes. 14 lames ont reçus l'anticorps anti

p53, préalablement dilué dans du tampon tris-HCl selon une dilution comprise entre 1 : 25^{ème} et 1 : 50^{ème}, 30 minutes avant l'application de l'anticorps. 14 autres lames ont reçus l'anticorps anti RP. L'incubation a duré 30 min dans une chambre humide pour éviter la déshydratation des tissus. Les lames ont été ensuite rincées et baigné deux fois dans du PBS (5 min chaque bain) pour maintenir les propriétés physico-chimiques des cellules.

- **Anticorps secondaire** : L'anticorps secondaire biotinylé a été appliqué sur les échantillons et laissé incuber dans une chambre humide pendant 10min. Les lames ont été rincées en suite dans deux bains de PBS, puis, une solution de peroxydase-streptavidine a été ajoutée et laisser incuber pendant 10mn afin de permettre la fixation de la streptavidine sur la biotine de l'anticorps secondaire (figure 13).

❖ **Révélation :**

Les lames ont été immergées dans deux 2 bains de PBS (5min chacun), puis le chromogène et le DAB (substrat de la peroxydase) ont été appliqués (figure 13).



Figure 13 : Récapitulatif de l'ajout de l'anticorps secondaire, du chromogène et du DAB. (a) chromogène et DAB ; (b) application (photographie originale).

❖ **Contre coloration :**

Après rinçage dans de l'eau distillé, une contre coloration a été appliquée en immergeant les lames dans de l' Hématoxyline de Mayer pendant 3min. Un dernier rinçage de 10 mn pour enlever l'excès de colorant a été effectué et les coupes déshydraté et éclaircis dans deux bain d'alcool (5min chacun).

❖ **Montage :**

Les lames ont été recouvertes de lamelles en utilisant l'eukitte et observées par un microscope optique à grossissements X40, X100 et X400.

CHAPITRE III :
RESULTATS ET
DISCUSSION

III.1- RESULTATS :

Dans le but d'évaluer la répartition des méningiomes selon l'âge, le sexe, le grade histologique et l'intérêt de la p53 et du récepteur de la progestérone (RP) dans le pronostic des méningiomes. Trois études ont été réalisées : une étude épidémiologique, histochimique et immuno-histochimique

III.1.1 Étude épidémiologique :

Notre étude épidémiologique rétrospective qui s'est portée sur 67 cas, de 2009-2011 à aboutis aux résultats suivants :

❖ Répartition des méningiomes selon le sexe :

L'étude épidémiologique a montré que, 75% des cas soit 50 étaient de sexe féminin et 25% soit 17 cas étaient de sexe masculin (Figure 14), correspondant à un sexe ratio de 0.34.

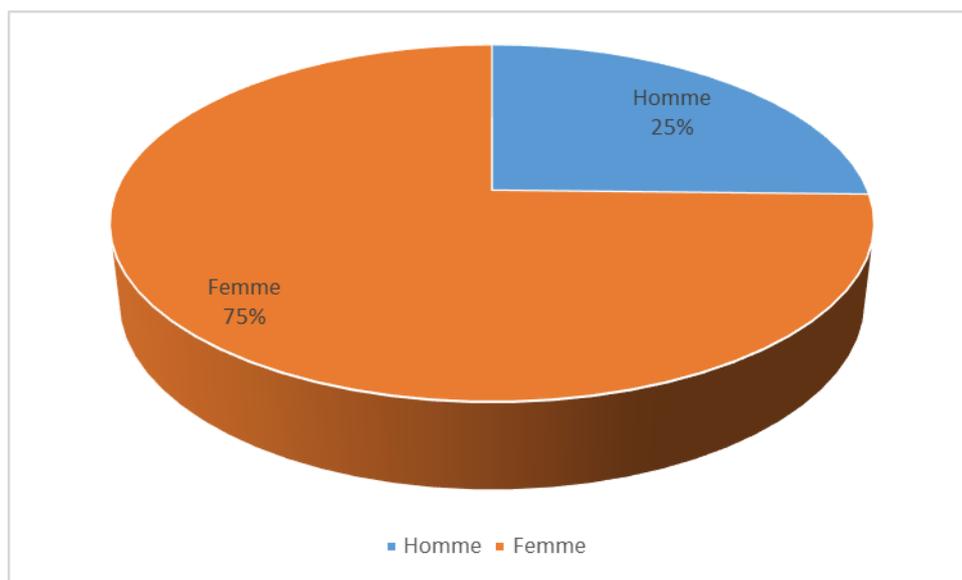


Figure 14 : Répartition des méningiomes selon le sexe. Etude rétrospective de 67 cas de méningiomes (2009-2011) Homme : 17 cas ; Femme : 50 cas.

❖ Répartition des méningiomes par tranche d'âge :

L'âge des patients varie entre 14 ans et 83 ans avec une moyenne d'âge d'apparition des méningiomes de 47.9 ans (SD± 13.16 ans). Lors de cette étude, huit tranches d'âge ont été établies correspondant à : [0-15[la tranche d'âge admissible en pédiatrie et 15 à 85 réparties en sept tranches de 10 ans (Figure 15).

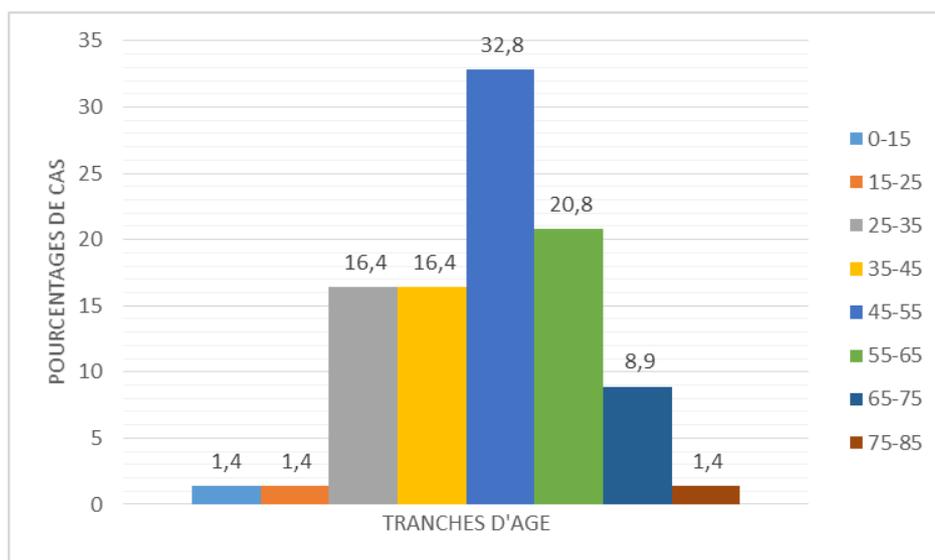


Figure 15 : Histogramme représentant la répartition de méningiomes par tranche d'âge. Etude rétrospective de 67 cas de méningiomes (2009-2011). [0-15[: 1 cas ; [15-25[: 1 cas ; [25-35[: 11 cas ; [35-45[: 11 cas ; [45-55[: 22 cas ; [55-65[: 14 cas ; [65-75[: 6 cas ; [75-85[: 1 cas.

❖ **Répartition des méningiomes selon le grade :**

La répartition des méningiomes selon le grade donne les chiffres suivant (Figure 16) : Les résultats montrent que le grade I représente 82% des cas, alors que, les grades II et III sont de 16% et 2% respectivement.

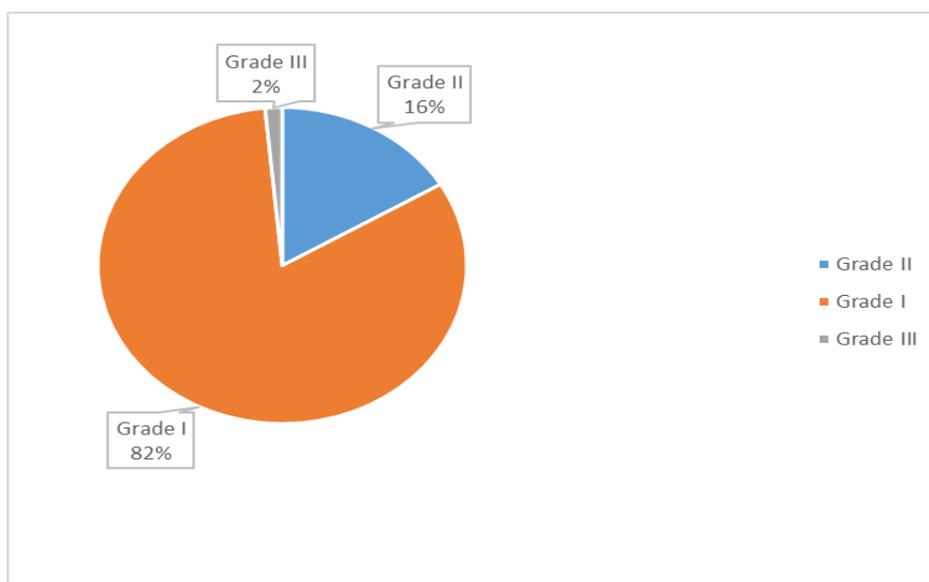


Figure 16 : Répartition des méningiomes selon le grade histologique. Etude rétrospective de 67 cas de méningiomes (2009-2011). Grade I : 55 cas ; Grade II : 11 cas ; grade III : 1 cas.

III.1.2- Etude histopathologique :

III.1.2.1- Etude histochimique :

L'étude histochimique réalisée sur 14 cas parmi les 67 a permis de confirmer le diagnostic de ces derniers. Les méningiomes atypiques (grade II) sont retrouvés dans 5 cas. Les types histologiques de grade I soit 8 cas sont représentés par les méningiomes meningothéliomateux, transitionnels et psammomateux, avec respectivement 4, 3 et 1 cas. Le grade III anaplasique est représenté par 1 cas (Tableau VI).

Les photomicrographies de certaines lames, colorées à l'hématoxyline et l'éosine sont représentées par les figures suivantes :

Des corps psammeux (E) sont observés dans la figure 17, ces derniers sont des critères de classification des méningiomes psammomateux. La figure 18 représente un méningiome atypique infiltrant le parenchyme cérébral (B). La figure 19 représente un méningiome anaplasique avec une nécrose tumorale (A). La figure 20 quant à elle représente un méningiome atypique, avec la présence de nucléoles proéminent et d'une mitose (H).

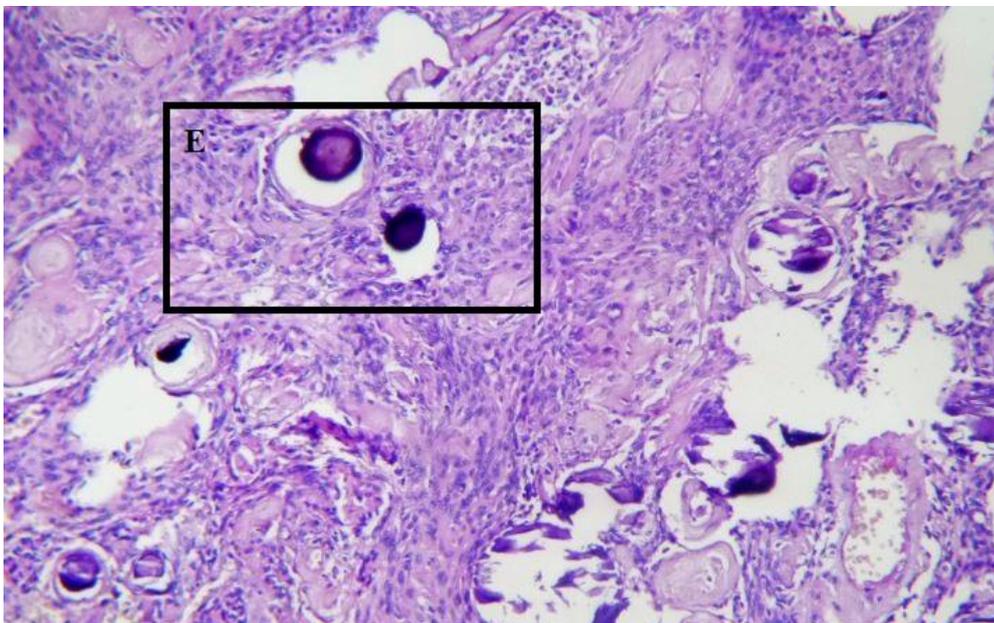


Figure 17 : Photo coloration Hématoxyline Eosine d'un méningiome psammomateux.
grossissement 10X4. Corps psammeux (E) (Photographie originale)

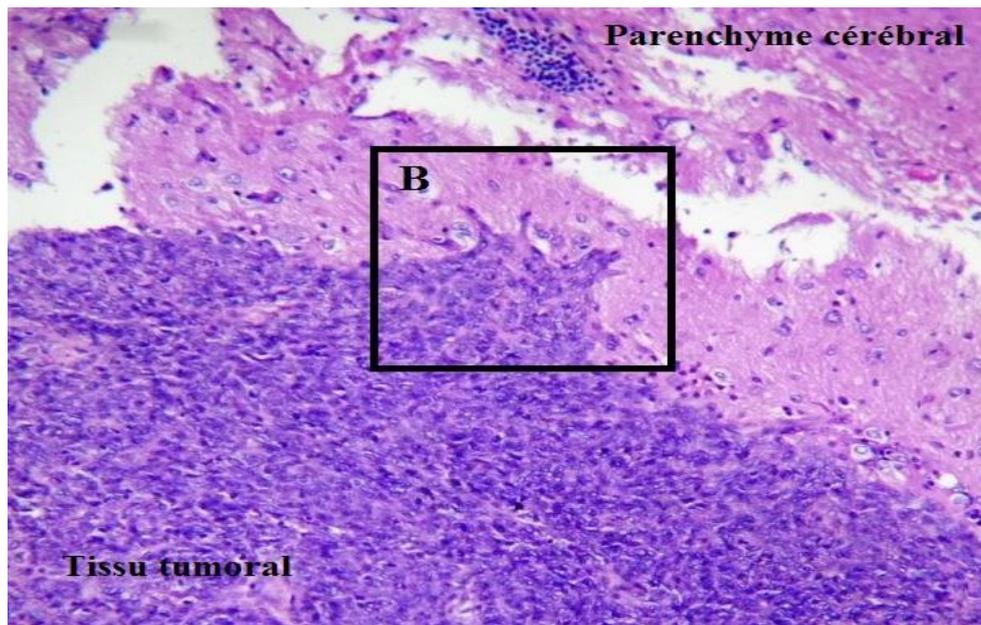


Figure 18 : Photo coloration Hématoxyline Eosine d'un méningiome Atypique. grossissement 10X10. B : Infiltration du parenchyme cérébral (photographie originale).

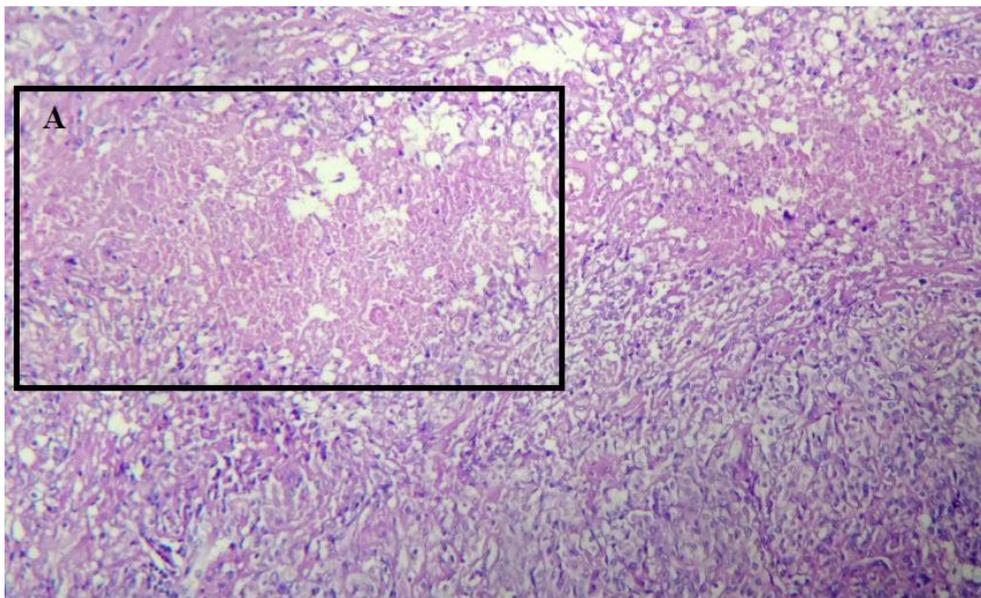


Figure 19 : Photo coloration Hématoxyline Eosine d'un méningiome anaplasique. Grossissement 10X4. A : nécrose tumorale (photographie originale)

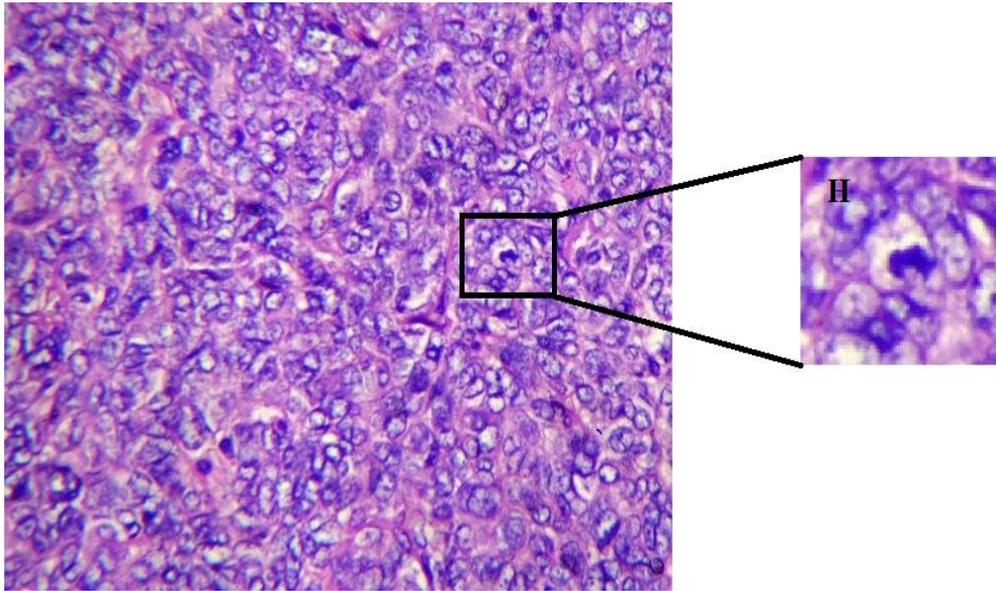


Figure 20 : Photo coloration Hématoxyline Eosine d'un méningiome atypique. Grossissement 10X40. H : Mitose et nucléole (photographie originale).

III.1.3- Etudes immunohistochimique :

III.1.3.1- Marquage du récepteur de la progestérone :

Les résultats du marquage nucléaire du récepteur de la progestérone (RP), sont exprimés en intensité (1+ à 3+) et en pourcentage de cellules tumorales marquées (tableau VI). Le seuil de positivité est de 10 %. Nos résultats montrent que 9 cas (soit 64.2%) sur 14 sont positifs au récepteur de la progestérone dont 1 homme et 8 femmes. 87.5 % des grades 1 (7/8 des cas), 40 % des grades 2 (2/5 des cas) et 0% des grades 3 (0/1 des cas) présentent une immuno-positivité pour RP (Figure 21).

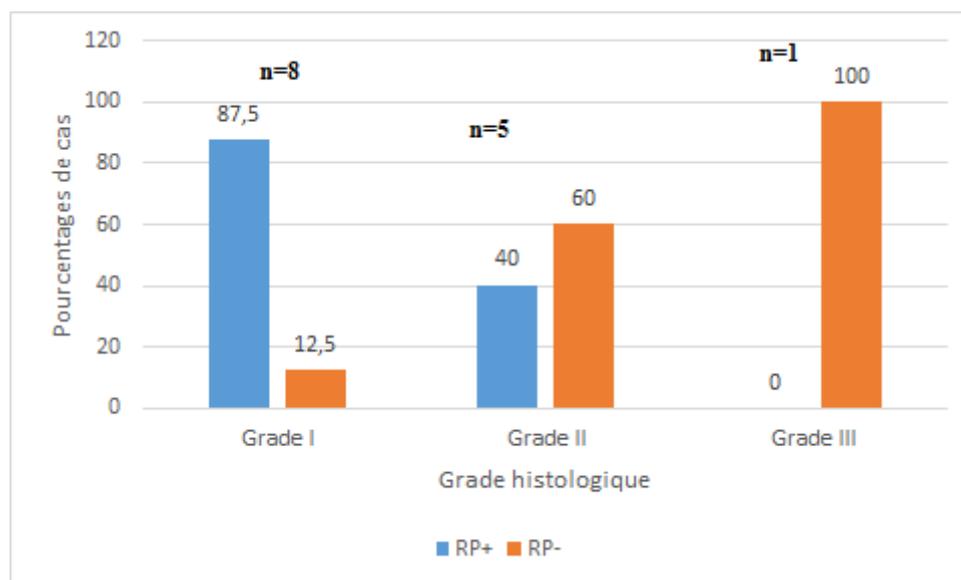


Figure 21 : Répartition de l'immuno-réactivité du RP selon le grade. La positivité du récepteur de la progestérone est retrouvée dans 7/8 des grades I, 2/5, des grades II et dans aucun grade III.

Dans les figures suivantes, le marquage nucléaire en marron du récepteur de la progestérone est fortement positif, chez un méningiome méningothéliomateux (Figure 22), modérément positif chez un méningiome atypique (Figure 23), faiblement positif chez un méningiome psammomateux (Figure 24) et négatif chez un méningiome anaplasique (Figure 25).

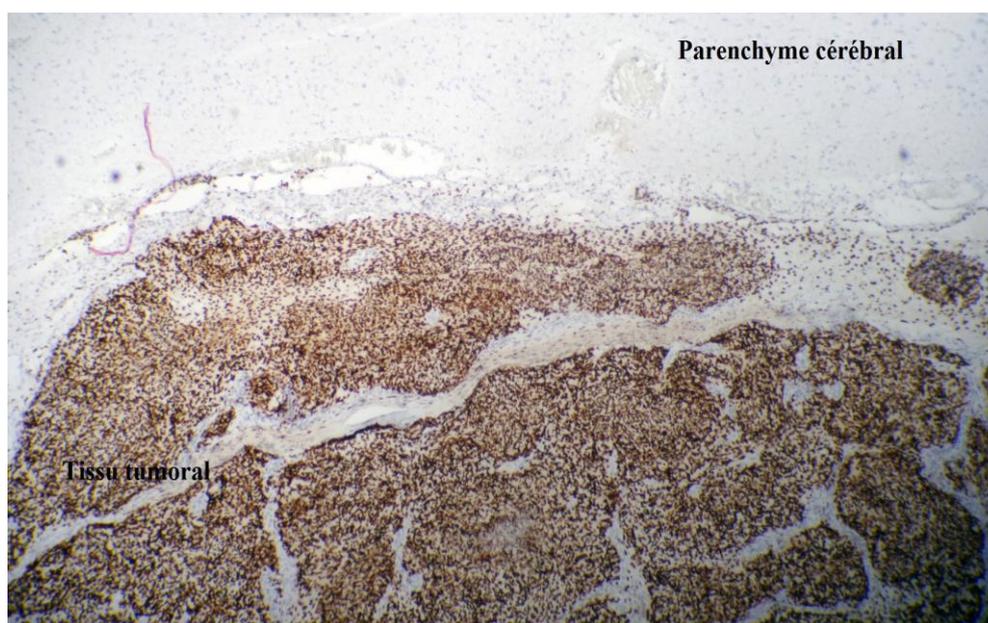


Figure 22: Marquage nucléaire fort du récepteur de la progestérone (3+) dans un méningiome méningothéliomateux. Grossissement 10X4 (Photographie originale).

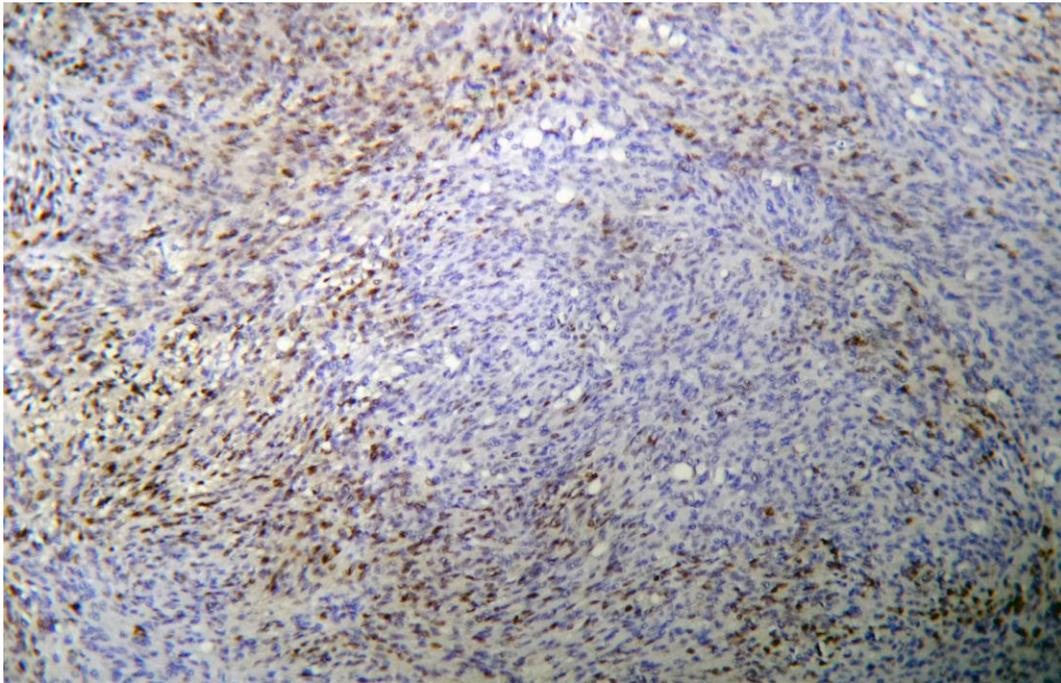


Figure 23: Marquage nucléaire modéré du récepteur de la progestérone (2+) dans un méningiome atypique. Grossissement 10X10 (photographie originale).

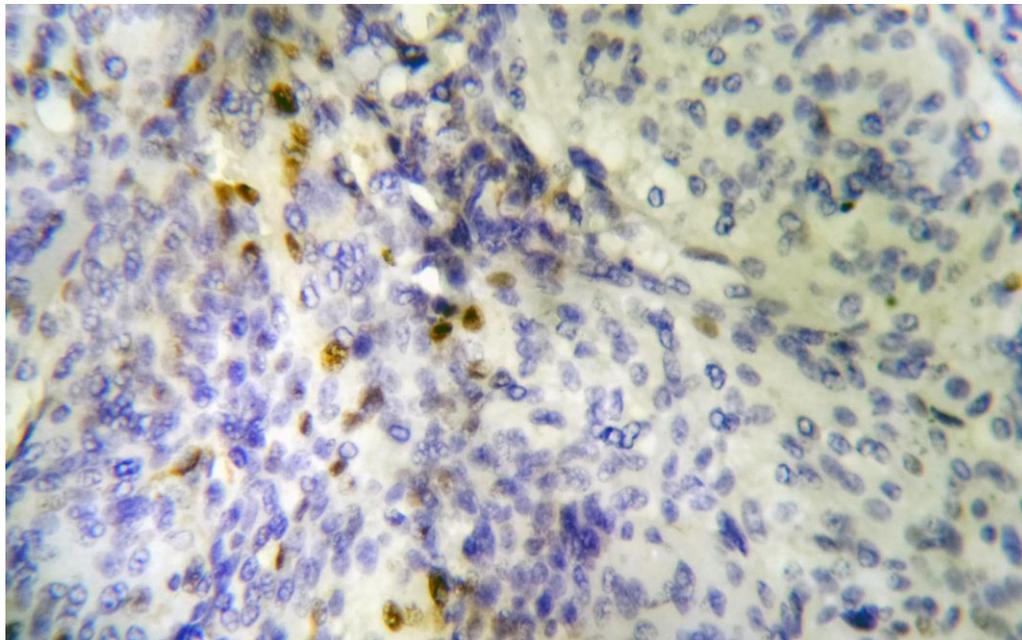


Figure 24: Marquage nucléaire faible du récepteur de la progestérone (1+) dans un méningiome psammomateux. Grossissement 10X40 (photographie originale).

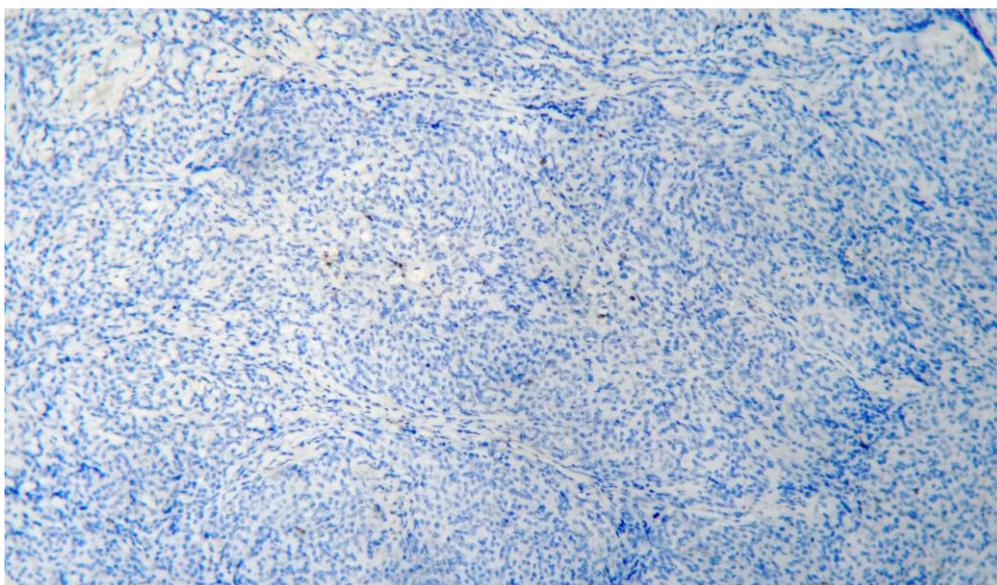


Figure 25: Marquage nucléaire du récepteur de la progestérone négatif dans un méningiome anaplasique. Grossissement 10X4 (photographie originale).

III.1.3.2 Marquage de la protéine p53 :

La P53 est positive dans 2 cas sur 14 soit 14.2% avec une intensité de 1+ (Tableau VI). Le tissu est positif à partir d'un focus de 5 cellules. Nos résultats montrent que, 0% des grades I, 20% des grades II et 100 % des grades III, sont positive pour la p53 (figure 26).

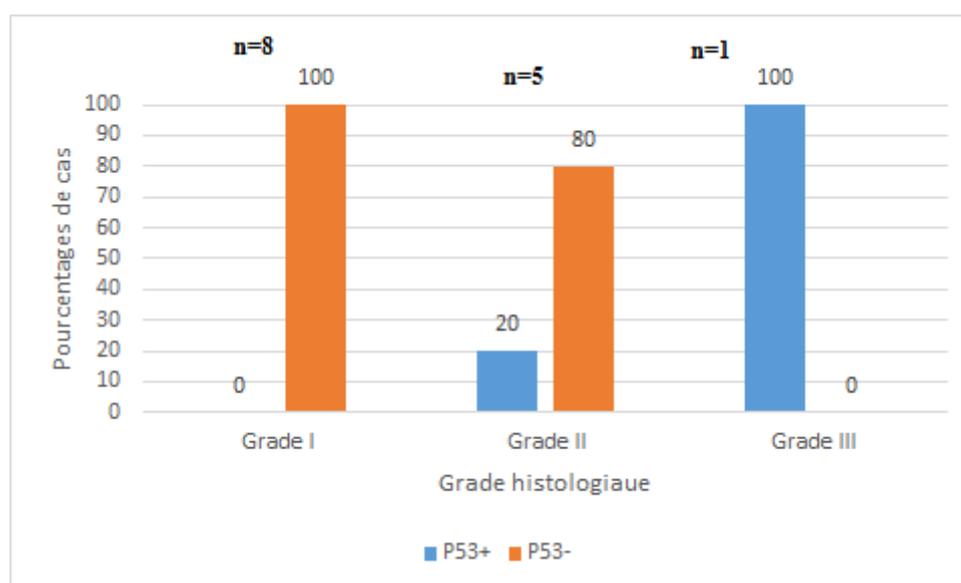


Figure 26: Répartition de l'immuno-positivité de la p53 selon le grade. Aucun grade I n'est positif pour la p53, seul un cas de grade II et un cas de grade III sont positifs.

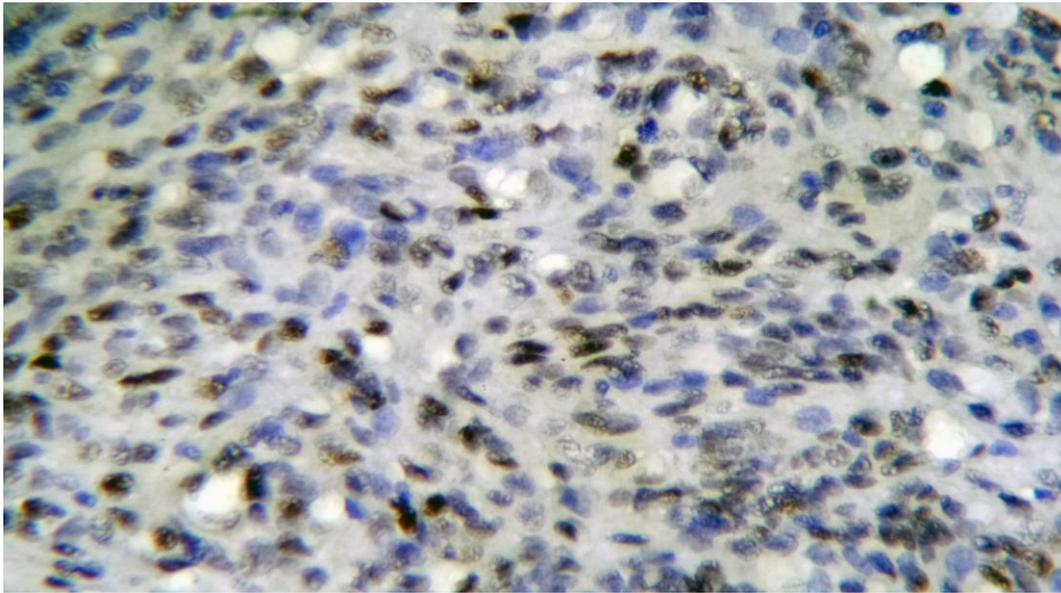


Figure 27: Marquage nucléaire de la protéine p 53 positif 1+ dans un méningiome atypique.
Grossissement 10X40 (photographie originale).

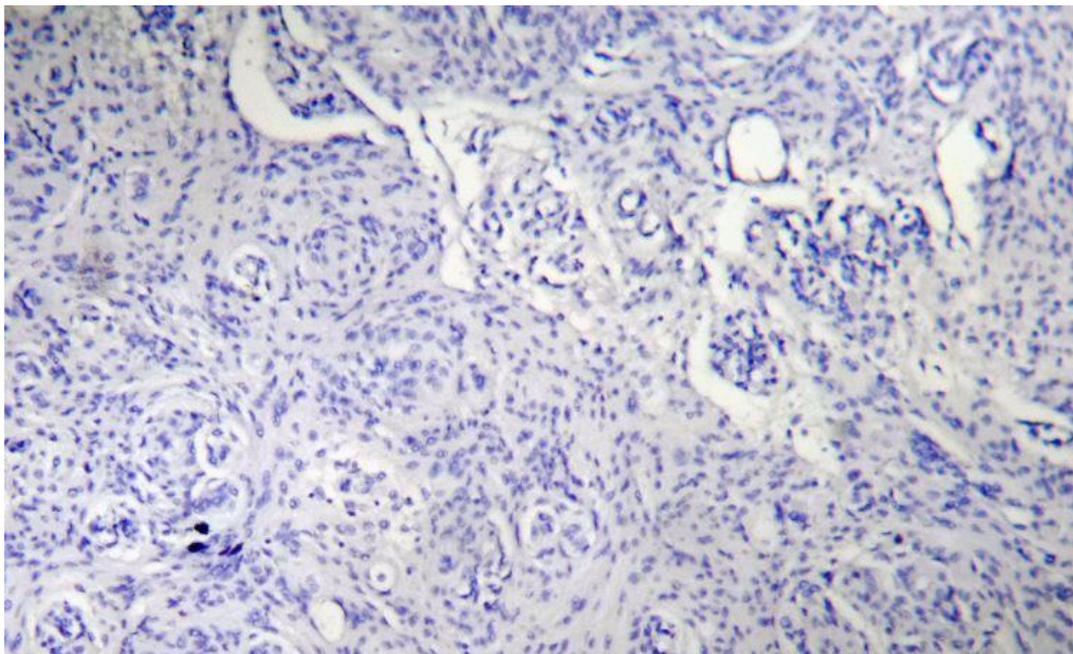


Figure 28: Marquage nucléaire de la protéine p 53 négatif dans un méningiome transitionnel.
Grossissement 10X10 (photographie originale).

Tableau VI: Récapitulatif des résultats de l'étude histopathologique.

Numéro de dossier	Sexe	âge	Diagnostique	Type histologique	HIC	
					P53	RP
11263/09	F	31	Méningiome atypique	Grade II	–	–
9270/09	H	54	Méningiome atypique	Grade II	–	–
5339/09	H	50	Méningiome atypique	Grade II	1+	1+
9267/10	H	65	Méningiome anaplasique	Grade III	1+	–
6105/10	F	49	Méningiome Meningotheliomateux	Grade I	–	2+
13243/10	F	49	Méningiome transitionnel	Grade I	–	–
13288/10	F	58	Méningiome atypique	Grade II	–	3+
11830/11	F	39	Méningiome atypique	Grade II	–	–
5184/11	F	32	Méningiome meningotheliomateux	Grade I	–	2+
12404/11	F	50	Méningiome transitionnel	Grade I	–	1+
6070/11	F	50	Méningiome psammomateux	Grade I	–	2+
4894/11	F	55	Méningiome transitionnel	Grade I	–	3+
1783/11	F	56	Méningiome meningotheliomateux	Grade I	–	2+
5366/11	F	45	Méningiome meningotheliomateux	Grade I	–	3+

III.2 DISCUSSION:

Notre étude épidémiologique s'est portée sur un effectif de 67 cas de méningiomes. Les résultats obtenus ont montré une distribution hétérogène des tumeurs dans un intervalle d'âge allant de 14 à 83 ans avec une moyenne d'âge de 47.9 ans ($SD \pm 10,54$ ans). Une augmentation de la survenue des méningiomes a été observée chez le groupes d'âge de [45-55], avec un pourcentage de 33 %, tandis que, des taux d'apparition inférieurs ont été observés pour les groupes [0-15]; [15-25]; [25-35]; [35-45]; [55-65]; [65-75]; [75-85]. De nombreuses études rétrospectives réalisées chez les populations africaines ont montrés des moyennes d'âges d'apparition précoces, notamment 42 ans en Côte d'Ivoire, 45.10 ans au Maroc et 43 ans en Afrique du Sud (**Froman et lipschitz, 1970 ; Achehboune, 2007 ; Oka et al., 2008**). Ces résultats sont concordants avec ceux obtenus dans notre étude. En revanche, dans les pays occidentaux des études similaires ont montré des moyennes d'âge d'apparition plutôt tardive. Elle est de 65 ans aux Etats Unis et de 57.7 ans en France (**Zouaoui et al., 2015 ; Fonkem et al., 2016**). L'ensemble de ces données suggère que l'apparition précoce des méningiomes au niveau africain pourrait s'expliquer par des facteurs environnementaux et/ou des prédispositions génétiques partagées en Afrique.

Notre étude a également révélé une prédominance du méningiome chez les femmes (76.1%), avec un sexe ratio Homme/Femme de 0.34. Il est intéressant de noter que des études rétrospectives menées par les équipes de **Fonkem (2016), de Achehboune (2007) et Menon (2009)**, ont révélé des sexes ratio H/F de 0.4; 0.3; 0.5 respectivement. Cette prédominance pourrait s'expliquer par l'intervention de facteurs hormonaux. En effet une étude réalisée, sur trois cas de transgenres homme-femme, a révélé que ces derniers avaient développé des méningiomes après avoir subis des traitements hormonaux aux œstrogènes et progestérones (**Wengel et al., 2016**). Des résultats similaires ont été rapportés par **Gazzeri et al. (2007); Mueller, (2008); Bergoglio et al. (2013)** qui ont évalués le risque de développement de tumeurs chez les transsexuels recevant un traitement *cross-sexe*, appuyant ainsi l'hypothèse hormonale. De plus, des études menées par l'équipe de **Claus (2007)**, qui a collecté des résultats à partir de deux analyses démographiques, toutes deux tirées d'une grande cohorte nationale, ainsi qu'une cohorte rétrospective, ont suggéré que l'administration d'hormones exogènes à des femmes déjà atteintes de méningiomes, augmenterait la taille de ces derniers.

Enfin, notre étude épidémiologique a révélé que le grade histologique le plus retrouvé est le grade I avec 82% des cas. A noter que ces résultats sont en concordance avec ceux de la littérature (**Louis et al., 2007**).

Afin de mieux comprendre l'intérêt pronostic des récepteurs de la progestérone dans le cas de méningiomes, nous avons entamé une analyse de l'expression de RP en utilisant des techniques immunohistochimique. L'immuno-positivité du récepteur de la progestérone a été retrouvé dans 87.5 % des grades I, 40% des grades II, tandis qu'aucun cas des grades III n'a été positifs, montrant ainsi une corrélation inverse avec le grade. Une étude rétrospective menée par l'équipe de **Iplikacioglu (2014)** sur 48 cas de patients qui ont subi une chirurgie pour un méningiome intracrânien, montre une positivité de 73% des méningiomes bénins et 36% des méningiomes malins. Des résultats similaires ont été décrits dans la littérature (**Hsu et al., 1997; Gabos et Berkel, 1992**). De plus il s'est avéré que la négativité du récepteur de la progestérone était associée à un taux élevé de MIB-1 un représentatif de l'index mitotique fortement exprimé au niveau des méningiomes de haut grade. A l'inverse les méningiomes positifs au récepteur de la progestérone présente une faible expression de MIB-1 (**Wolsberger et al., 2004**). La présence du récepteur de la progestérone dans les méningiomes et sa corrélation inverse avec le grade est donc bien connue, ceci conforte l'hypothèse que l'immuno-positivité de RP pourrait être un facteur de bon pronostic. Cependant le nombre de patients pris en compte dans notre étude n'étant pas statistiquement significatif, une étude avec une cohorte de patients plus importante, serait à envisager.

L'acétate de mégestrol, molécule progestative agoniste de la progestérone, utilisée comme traitement palliatif dans le cancer du sein, a également été incriminé dans plusieurs cas de méningiome positifs au récepteur de la progestérone (**Vadivelu et al., 2010**). Soulignant de ce fait, l'implication du récepteur de la progestérone dans le développement de ces derniers. Néanmoins, l'acquisition de la capacité de prolifération indépendamment des signaux extérieurs par la tumeur, rendrait la présence du RP facultative, ce qui expliquerait son absence dans la majorité des hauts grades. Toutefois, nos résultats montrent une expression de RP dans deux cas de grade II. D'une part les méninges partagent la même origine embryonnaire que les glandes mammaires. De plus, les données relatives au cancer du sein montrent une association entre l'expression du récepteur de la progestérone et les mutations du gène BRCA2 qui sont retrouvées chez certains patient atteints d'un cancer du

sein de haut grade (**Atchley et al., 2008**). Il est donc possible de suggérer que les deux patients atteints de méningiomes de grade II soient potentiellement porteurs d'une mutation du gène BRCA2, qui dans le cas normal code une protéine capable de réguler négativement l'activité de RP.

Dans notre étude, l'immunopositivité de la p53 est retrouvée dans 2/6 des cas de haut grade tandis qu'aucun grade 1 ne s'est révélé positif. Toutefois cette analyse préliminaire ne nous a pas permis d'affirmer ou d'infirmer l'implication de la p53 dans l'évolution des méningiomes. Or, des données rapportées par différentes études, indiquent clairement la corrélation entre l'expression de la P53 et l'agressivité des méningiomes (**Karamitopoulou et al., 1998; Aguiar et al., 2002; Kheirollahi et al., 2011**). En effet, l'équipe de **Telugu (2016)** ont observé une positivité de la p53 dans 77.1% des grades 1, 83.3% des grades 2 et 100% des grades 3, suggérant ainsi une corrélation avec le grade.

Eu égard aux données bibliographiques, il est intéressant de noter que les altérations du gène TP53 sont retrouvées dans plus de 50% des tumeurs, l'implication de cette dernière dans l'évolution des méningiomes peut potentiellement s'expliquer par des mutations touchant la protéine p53 entre autre dans la région de liaison à l'ADN. A titre d'exemple, la mutation R248W, a pour conséquence un gain de fonction de la p53 favorisant de ce fait la prolifération des cellules tumorales, par la transactivation de certains oncogènes tels que MYC et EGFR (**Freed-Pastor et Prives, 2012**). De plus, la protéine P53 mutante a une stabilité élevée, par conséquent elle s'accumule à des taux considérables, contrairement au type sauvage qui à une demi vie plus courte et n'est présente qu'en infime quantité (**Vojtesek et al., 1992**) et donc généralement en-dessous du niveau de détection des méthodes immunohistochimiques (**Cooper et al., 1997**). Ceci peut potentiellement expliquer la négativité de la p53 que nous avons observé dans les méningiomes.

*CONCLUSION ET
PERSPECTIVES*

Ce travail avait pour but dans un premier temps la réalisation d'une étude épidémiologique rétrospective sur 67 cas de méningiomes admis au sein du CHU Mustapha Bacha d'Alger et dans un second temps, une étude immunohistochimique visant à étudier l'intérêt de la p53 et du récepteur de la progestérone dans le pronostic des méningiomes. Les résultats épidémiologiques montrent, un sexe ratio H/F de 0.34 et une moyenne d'âge d'apparition de 47.9 ans (\pm 13.16 ans), d'autre part les résultats de l'étude immunohistochimique montrent une expression majoritaire de RP dans le grade I (87.5 %), alors que, l'expression de p53 est retrouvée uniquement dans les hauts grades.

A l'issu de ce travail, nos résultats montrent que les méningiomes de notre série ont une fréquence d'apparition plus élevé chez les femmes. De plus, leurs moyenne d'âge d'apparition est précoce en comparaison aux pays occidentaux, mais aussi que le grade I est le plus fréquent. Enfin, la P53 peut potentiellement être associée à une agressivité tumorale, tandis que le récepteur de la progestérone pourrait être un facteur de bon pronostic.

Il existe actuellement un intérêt considérable pour les marqueurs biologiques liés au besoin thérapeutique ciblé en oncologie. Par conséquent, la recherche dans ce domaine est en constante évolution.

Notre étude étant préliminaire, elle nécessitera une augmentation de la cohorte afin d'obtenir des résultats significatifs. L'immunohistochimie est une méthode efficace pour la détection des biomarqueurs, cependant, elle ne permet la compréhension des événements moléculaires impliqués dans le développement de la tumeur. De ce fait il serait intéressant de mener des études complémentaires notamment :

- Faire un dosage du taux de la progestérone pour les patients atteints de méningiome afin de déterminer l'implication de cette dernière dans l'action de sont récepteur.
- Réaliser une étude plus approfondie des dossiers des patients et de leurs conditions de vie, qui permettra d'évaluer l'impact des facteurs extrinsèques, notamment les analogues de la progestérone retrouvés, à titre d'exemple, dans les traitements hormonaux, les pesticides et les nutriments.
- Utiliser des inhibiteurs pharmacologiques dans le but de déterminer l'implication réelle des voies de signalisations de la p53 et du récepteur de la progestérone dans le développement des méningiomes.

- Effectuer le séquençage des gènes de la p53 et du récepteur de la progestérone afin de mettre en évidence les altérations génétiques impliquées.
- Faire une corrélation entre la localisation des méningiomes et leurs agressivités.
- Faire une corrélation entre l'expression de la p53 et le sexe.
- Etablir une classification moléculaire des tumeurs cérébrales pour envisager des traitements plus ciblés.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- ❖ **Acheboune. (2007).** *La prise en charge des meningiomes itrcanniens.* Thèse, Medecine, université cad i ayyad, 87 p.

- ❖ **Adam, C. and Mokhtari, K. (2011).** Tumeurs du système nerveux central. Classifications histologiques et topographiques, épidémiologie. *EMC.*

- ❖ **Aguiar, P. H., Agner, C., Simm, R., Freitas, A. B., Tsanaclis, A. M. and Plese, J. (2002).** p53 Protein expression in meningiomas—a clinicopathologic study of 55 patients. *Neurosurgical review*, 25(4): 252-257.

- ❖ **Atchley, D. P., Albarracin, C. T., Lopez, A., Valero, V., Amos, C. I., Gonzalez-Angulo, A. M., Hortobagyi. and Arun, B. K.(2008).**Clinical and pathologic characteristics of patients with BRCA-positive and BRCA-negative breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 26(26): 4282-4288.

- ❖ **Bast, R. C., Ravdin, P., Hayes, D. F., Bates, S., Fritsche, H., Jessup, J. M., Kemeny, N., Locker, G.Y., Mannel, R.G. et al. (2001).** 2000 Update of Recommendations for the Use of Tumor Markers in Breast and Colorectal Cancer: Clinical Practice Guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *Journal of Clinical Oncology*, 19(6) : 1865-1878.

- ❖ **Batterbury, M., Bowling, B. and Catier, A., (2005).***Ophthalmologie.* Paris: Elsevier Masson.122 p.

- ❖ **Benamar, M. and Léonard. (2009).***Les psychotrope pharmacologie et toxicomanie.* Montréal:PUM. 894 p.

- ❖ **Bergoglio, M. T., Gómez-Balaguer, M., Folch, E. A., Murillo, F. H. and Hernández-Mijares, A. (2013).** Symptomatic meningioma induced by cross-sex hormone treatment in a male-to-female transsexual. *Endocrinologia y Nutricion*, 60(5): 264-267.

- ❖ **Bignon, Y.J. and Uhrhammer, N. (2005).** Gènes suppresseurs de tumeurs. In: Lacave, R., Larsen., C.J., Robert, J. *Cancerologie fondamentale.* Paris: johnlibbey.

- ❖ **Brat, D.J., Parisi, J.E., Kleinschmidt-Demasters, B.K., Yachnis, A.T., Montine, T.J., Boyer, P.J., Powell, S.Z., Prayson, R.A. and McLendon, R.E. (2008).** Surgical neuropathology Update. A review of change introduced by the WHO classification of tumours of the central nervous system. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 132 (6): 933-1007.
- ❖ **Caulet-maugendre, S. (1999).** Immunohistochimie: Aspects techniques actuels; applications pratiques et scientifiques en anatomie et cytologie pathologiques. *Revue française d'histotechnologie*, 12(1) : 23-34.
- ❖ **Choy, W., Kim, W., Nagasawa, D., Stramotas, S., Yew, A., Gopen, Q., Parsa, A.T. and Yang, I. (2011).** The molecular genetics and tumor pathogenesis of meningiomas and the future directions of meningioma treatments. *Neurosurgical focus*, 30(5): E6.
- ❖ **Claus, E. B., Black, P. M., Bondy, M. L., Calvocoressi, L., Schildkraut, J. M., Wiemels, J. L. and Wrensch, M. (2007).** Exogenous hormone use and meningioma risk. *Cancer*, 110(3): 471-476.
- ❖ **Cooper, K. and Haffajee, Z. (1997).** Bcl-2 and p53 protein expression in follicular lymphoma. *The Journal of pathology*, 182(3): 307-310.
- ❖ **Crossman, A.R. and Neavy, D. (2004).** *Neuroanatomie*. Paris: Elsevier Masson. 174 P
- ❖ **Cui, X., Schiff, R., Arpino, G., Osborne, C. K. and Lee, A. V. (2005).** Biology of progesterone receptor loss in breast cancer and its implications for endocrine therapy. *Journal of Clinical Oncology*, 23(30): 7721-7735.
- ❖ **Droz, J.P. (2011).** Méthode de diagnostic anatomique anatomopathologique et caractérisation moléculaire. In: *Tumeur maligne rares*. Paris: Springer. 585 p.
- ❖ **Fonkem, E., Dandashi J. A., Stroberg, E., Garrett Jr, D., Harris, F. S., El Nihum, I. M., Cooper, J., Dayawansa, S. and Huang, J.H. (2016).** A retrospective analysis of meningioma in a rapidly developed demographic area. *ELSEVIER*, 6(2):87-93.

Références bibliographiques

- ❖ **Forman, C. and Lipschitz, R. (1970).** Demography of tumors of the central nervous system among the Bantu (African) population of the transvaal, South Africa. *Journal of neurosurgery*, 32(6): 660-664
- ❖ **Fraser, G. A. and Meyer, R. M. (2007).** Biomarkers and the design of clinical trials in cancer. *Biomark med*, 1 (3): 387-397.
- ❖ **Freed-Pastor, W. A. and Prives, C. (2012).** Mutant p53: one name, many proteins. *Genes & development*, 26(12): 1268-1286.
- ❖ **Gabos, S. and Berkel, J. (1992).** Meta-analysis of progesterin and estrogen receptors in human meningiomas. *Neuroepidemiology*, 11(4-6): 255-260.
- ❖ **Ganong, W. and Jobin, M. (2005).** *Physiologie médiale*. Bruxelles: De Boeck. 850 P.
- ❖ **Gazzeri, R., Galarza, M. and Gazzeri, G. (2007).** Growth of a meningioma in a transsexual patient after estrogen–progesterin therapy. *New England Journal of Medicine*, 357(23): 2411-2412.
- ❖ **Giulianelli, S., Molinolo, A., and Lanari, C. (2013).** Targeting progesterone receptors in breast cancer. *Vitamins and hormones* 93, 161-184.
- ❖ **Goffinet, A.M. (1994).** *Anatomie clinique du système nerveux central*. Belgique: Presses Universitaires de 302 p.
- ❖ **Gorlia, T., van den Bent, M.J., Hegi, M.E., Mirimanoff, R.O., Weller, M., Cairncross, J.G., Eisenhauer, E., Belanger, K., Brandes, A.A. et al. (2008).** Nomograms for predicting survival of patients with newly diagnosed glioblastoma: prognostic factor analysis of EORTC and NCIC trial 26981-22981/CE.3. *The lancet oncology*, 9 (1): 29-38.

Références bibliographiques

- ❖ **Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011).** Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*. 144(5): 646-674.
- ❖ **Hers, I., Vincent, E. E. and Tavaré, J. M. (2011).** Akt signalling in health and disease. *Cellular signalling*, 23(10): 1515-1527.
- ❖ **Hsu, D. W., Efird, J. T. and Hedley-Whyte, E. T. (1997).** Progesterone and estrogen receptors in meningiomas: prognostic considerations. *Journal of neurosurgery*, 86(1): 113-120.
- ❖ **Iplikcioglu, A. C., Hatiboglu, M. A., Ozek, E. and Ozcan, D. (2014).** Is progesteron receptor status really a prognostic factor for intracranial meningiomas?. *Clinical neurology and neurosurgery*, 124: 119-122.
- ❖ **Karamitopoulou, E., Perentes, E., Tolnay, M. and Probst, A. (1998).** Prognostic significance of MIB-1, p53, and bcl-2 immunoreactivity in meningiomas. *Human pathology*, 29(2): 140-145.
- ❖ **Kheirollahi, M., Mehr-Azin, M., Kamalian, N. and Mehdipour, P. (2011).** Expression of cyclin D2, P53, Rb and ATM cell cycle genes in brain tumors. *Medical Oncology*, 28(1): 7-14.
- ❖ **Kim, J.J., Kurita, T. and Bulun, S.E. (2013).** Progesterone action in endometrial cancer, endometriosis, uterine fibroids, and breast cancer. *Endocrine reviews* .34, 130-162.
- ❖ **Knudson, A. G. (1971).** Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68(4), 820-823.
- ❖ **Kramer, E. A., Seeger, H., Kramer, B., Wallwiener, D. and Mueck, A. O. (2005).** Characterization of the stimulatory effect of medroxyprogesterone acetate and chlormadinone acetate on growth factor treated normal human breast epithelial cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 98(2), 174-178.

Références bibliographiques

- ❖ **Lacave, R. (2005).** Histoire naturelle des cancers biologie des lésions précancéreuses. In: Lacave, R., Larsen., C.J., Robert, J. *Cancerologie fondamentale*. Paris : johnlibbey. 165-172.

- ❖ **Larsen, C. J. (2005).** Oncogènes. In: Lacave, R., Larsen., C.J., Robert, J. *Cancerologie fondamentale*. Paris: john libbey.86-104.

- ❖ **Li, X., Lonard, D. M. and O'Malley, B. W. (2004).** A contemporary understanding of progesterone receptor function. *Mechanisms of ageing and development*, 125 (10): 669-678.

- ❖ **Loiseau, H., Huchet, A., Rue, M., Cowppli-Bony, A. and Baldi, I. (2009).** Epidémiologie des tumeurs cérébrales primitives.*Revue neurologique*, 165 (8) : 650-670.

- ❖ **Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.k., Burger, P.C., Jouvét, A., Scheithauer, W.K. and Kleihues, P. (2007).** The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Actaneuropathologica*, 114 (2) : 97-109.

- ❖ **Lu, X. and Kang, Y. (2010).** Hypoxia and hypoxia-inducible factors: master regulators of metastasis. *Clinical cancer research*. 16(24): 5928-5935.

- ❖ **Marrer, E. and Dieterle, F. (2007).** Promises of biomarkers in drug development—a reality check. *Chemical biology & drug design*, 69 (6) : 381-394.

- ❖ **Martin, P.M. and Muracciole, X. (2005).** Biomarqueur tumoraux sériques dans les tumeurs solides humaines. In : lacave, R., Larsen, C.J., Robert, J. *Cancérologie fondamentale*. Paris: john libbeyEurotext.

- ❖ **Marx, j. (2003).** Cancer research. Mutant stem cells may seed cancer. *Science*, 301, 1308-1310.

- ❖ **McShane, L. M., Hunsberger, S. and Adjei, A. A. (2009).** Effective incorporation of biomarkers into phase II trials. *Clinical Cancer Research*, 15 (6) : 1898-1905.

- ❖ **Méjean, A. and Le Bret, T. (2008).** La cascade métastatique: angiogenèse et nouveaux concepts. *Progrès en Urologie*, 18: S156-S166.
- ❖ **Menon, G., Nair, S., Sudhir, J., Rao, B. R. M., Mathew, A. and Bahuleyan, B. (2009).** Childhood and adolescent meningiomas: a report of 38 cases and review of literature. *Acta neurochirurgica*, 151 (3): 239-244.
- ❖ **Moore, K.L. and Dalley, A.F. (2006).** *Anatomie médicale: Aspects fondamentaux et applications cliniques*. Bruxel: De Boeck. 1216 p.
- ❖ **Mueller, A., Gooren, L. J., Naton-Schotz, S., Cupisti, S., Beckmann, M. W. and Dittrich, R. (2008).** Prevalence of polycystic ovary syndrome and hyperandrogenemia in female-to-male transsexuals. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 93(4): 1408-1411.
- ❖ **Müller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M. E., McClanahan, T. E., Murphy, Yuan, W et al. (2001).** Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, 410(6824): 50-56.
- ❖ **Murnyák, B., Bognár, L., Klekner, Á. and Hortobágyi, T. (2015).** Epigenetics of Meningiomas. *BioMed research international*, 2015.
- ❖ **Oka, D. N. D., Broalet, E., Kakou, M., Broalet, P., Haidara, A., N'Guessan, R. B., Varlet, L., Dechambenoit, G. and Bazeze, V. (2008).** Les méningiomes intracrâniens en milieu ivoirien. Étude d'une série chirurgicale. *African Journal of Neurological Sciences*, 27(1).
- ❖ **Patrick, B., Laurent, M. and Verdum-Esquer, C. (2005).** Facteurs de la cancérogenèse. In: Lacave, R., Larsen Larsen, C. J., Robert, J. *Cancérologie fondamentale*. Paris: John Libbey. P 283-292

Références bibliographiques

- ❖ **Petitjean, A., Achatz, M.I., Borresen-Dale, A.L., Hainaut, P. and Olivier, M. (2007).** TP53 mutations in human cancers: Functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene*, 26: 2157–2165.

- ❖ **Poupon, M.F. (2005).** Dissémination métastatique des cancers. In: Lacave, R., Larsen Larsen, C. J., Robert, J. *Cancérologie fondamentale*. Paris: John Libbey. P 145-154.

- ❖ **Prades, J.M., Laurent, B. and Navez, M.L. (1999).** *Anatomie clinique du système nerveux central*. Paris: Elsevier Masson. 260 p.

- ❖ **Prugnotte, H. and Thoreau, F. (1996).** *Histologie*. Rennes : Estem. 128 p.

- ❖ **Purves, D., Augustin, G.J., Fitzpatrick, D., Hall, W., LaMantia, A.S., McNamara, J.O. and Williams, C. (2005).** Les neurotransmetteurs et leurs récepteurs. In: *Neurosciences*. 3^{ème} édition. Bruxelles, De Boeck: 129-164.

- ❖ **Purves, D., Augustin, G.J., Fitzpatrick, D., Hall, W., LaMantia, A.S. and White, L.E. (2012).** Neurotransmitters and their receptors. In: *Neuroscience*. 5^{ème} édition. USA: Sinauer Associates. 109-140.

- ❖ **Renate, L.R., (2008).** *Histologie* Paris: De Boeck. 704 p.

- ❖ **Rivera, S., Rivera, C., Lorient, Y., Hennequin, C., Vozenin, M.C. and Deutsch, E. (2011).** Cellules souches cancéreuses: nouvelle cible thérapeutique dans les traitements des cancers bronchopulmonaires. *Cancer/Radiothérapie*, 15(5): 355-364.

- ❖ **Sainsbury, S., Bernecky, C. and Cramer, P. (2015).** Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(3): 129-143.

- ❖ **Sakurai, T. and Kudo, M. (2011).** Signaling pathways governing tumor angiogenesis. *Oncologie*, 81 (Suppl 1): 24-29.

- ❖ **Sanson, M. and Taillibert, S. (2004).** Données générales de neuro-oncogénèse. *EMC-Neurologie*, 1(1): 75-89.

Références bibliographiques

- ❖ Sarvaiya, P. J., Guo, D., Ulasov, I., Gabikian P. and Lesniak. M. S. (2013). Chemokines in tumor progression and metastasis. *Oncotarget*, 4(12): 2171-2185.
- ❖ Scaros, O. and Fisler, R. (2005). Biomarker technology roundup: from discovery to clinical applications. A broad set of tools is required to translate from the lab to the clinic. *Biotechniques*, 5.
- ❖ Scotté, F., Colonna, P. and Andrien, J.M. (2008). *cancerologie*. Paris: Ellipses. 316 P.
- ❖ Sherwood, L. and Lockhart, A. (2006). *Physiologie humaine*. Bruxle: De Boeck. 629 P.
- ❖ Smith, M. J. (2015). Germline and somatic mutations in meningiomas. *Cancer genetics*, 208 (4) : 107-114.
- ❖ Strambu, K., Jorge, A. and Tavel, M.D. (2010). What are Biomarkers?. *NIH Public Access Anthon Manuscript*, 5(6): 463-466.
- ❖ Telugu, R.B., Chowhan, A.k., Rukmangadha, N., Patnayak, R., Phaneendra, B.V., Prasad, B.C.M. and Reddy, M.K. (2016). Histopathological and immunohistochemical evaluation of meningiomas with reference to proliferative markers p53 and ki-67. Pathology Section. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 10(1): 15-19.
- ❖ Tubiana-Mathieu, N. (2002). *Cancers: prévention et dépistage*. Paris : MASSON. p 215.
- ❖ Vadivelu, S., Sharer, L. and Schulder, M. (2010). Regression of multiple intracranial meningiomas after cessation of long-term progesterone agonist therapy: Case report. *Journal of neurosurgery*, 112(5): 920-924.
- ❖ Vojtěšek, B., Bartek, J., Midgley, C. A. and Lane, D. P. (1992). An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53: new monoclonal antibodies and

Références bibliographiques

epitope mapping using recombinant p53. *Journal of immunological methods*, 151(1): 237-244.

- ❖ **Wager, M., Karayan-Tapon, L. and Larsen, C.J. (2005).** Tumeurs des systèmes nerveux central et périphérique. In: Lacave, R., Larsen, C.J., Robert, J. *Cancérologie fondamentale*. Paris: John Libbey Eurotext. P. 256-266.
- ❖ **Wengel, P. V., Martin, E., Gooren, L., Den Heijer, M. and Peerdeman, S. M. (2016).** Meningiomas in three male-to-female transgender subjects using oestrogens/progestogens and review of the literature. *Andrologia*.
- ❖ **William, A., Pastor, F. and Prives, C. (2012).** Mutant p53: one name, many proteins. *Genes & Development*, 26:1268-1286.
- ❖ **Wolfsberger, S., Doostkam, S., Boecher-Schwarz, H. G., Roessler, K., van Trotsenburg, M., Hainfellner, J. A. and Knosp, E. (2004).** Progesterone-receptor index in meningiomas: correlation with clinico-pathological parameters and review of the literature. *Neurosurgical review*, 27(4): 238-245.
- ❖ **Xie, T., Dong, B., Y., Hu, G. and Xu, Y. (2006).** Association between MMP-2 expression and prostate cancer: A meta-analysis. *Biomedical Reports*, 4(2): 241-245.
- ❖ **Zouaoui, S., Darlix, A., Rigau, V., Mathieu-Daudé, H., Bauchet, F., Bessaoud, F., Fabbro-Peray, P., Trétarre, B. et al. (2015).** Descriptive epidemiology of 13,038 newly diagnosed and histologically confirmed meningiomas in France: 2006–2010. *Neurochirurgie*.

Les références électroniques

Cell signaling technology. (2016). Cell Cycle G2/M DNA Damage Signaling Pathway. In : *CST Pathways* [En ligne]. <http://www.cellsignal.com/common/content/content.jsp?id=pathways-cc-g2m>. (Consulté le 25/04/2016).

World Health Organization. (2012). Cancer by population. In : *Globocan*. http://globocan.iarc.fr/Pages/summary_table_pop_sel.aspx. (Consulté le 25/04/2016).

ANNEXES

**Monoclonal Mouse
Anti-Human p53 Protein**
Clone DO-7
Code No./ Code/ Code-Nr. M 7001
Edition/ Ausgabe 18.12.02

ENGLISH

Intended use	For in vitro diagnostic use. Monoclonal Mouse Anti-Human p53 Protein is intended for use in immunocytochemistry. The antibody labels wild-type and mutant-type p53 protein and is a useful tool for the identification of p53 accumulation in human neoplasias (1-3). Differential identification is aided by the results from a panel of antibodies. Interpretation must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.
Introduction	p53 is a nuclear phosphoprotein with a molecular mass of 53 kDa. Wild-type p53 protein is present in a wide variety of normal cells, but the protein has a very short half-life and thus is present in only minute amounts (1), generally below the detection level of immunocytochemical methods (4). Somatic mutation of the <i>p53</i> gene is a very frequent event in the development of human neoplasia, and because mutant p53 proteins often are much more stable than wild-type p53 protein, the mutant p53 protein accumulates to a high level (1). As examples, p53 protein accumulation was observed in 76% of 212 human malignant lesions, including breast, colon and stomach carcinomas, melanoma, embryonal carcinoma of the testis, transitional carcinoma of the urinary bladder, uterine carcinoma and soft tissue sarcomas (5). Wild-type p53 protein functions as a transcription factor, i.e. as a modulator which can turn crucial genes either on or off. It also inhibits DNA replication and is a check-point control molecule for progression of the cell cycle. Furthermore, p53 protein is involved in the regulation of apoptosis (2). In transfection assays, wild-type <i>p53</i> behaves as a tumour suppressor, while mutant <i>p53</i> behaves as a dominant transforming oncogene (1).
Reagent provided	Monoclonal mouse antibody provided in liquid form as cell culture supernatant dialysed against 0.05 mol/L Tris/HCl, pH 7.2, and containing 15 mmol/L NaN ₃ . <u>Clone:</u> DO-7 (1). <u>Isotype:</u> IgG2b, kappa. <u>Mouse IgG concentration:</u> see label on vial.
Immunogen	Recombinant human wild-type p53 protein (1).
Specificity	SDS-PAGE analysis of immunoprecipitates formed between lysate of the BT474 breast cancer cell line and the antibody shows reaction with a 53 kDa protein corresponding to p53 (1). In Western blotting of lysate of the A431 human vulval carcinoma cell line, the antibody labels a 53 kDa band, corresponding to the mutant type p53, which is expressed by A431. The epitope recognized by the antibody is located between the N-terminal amino acids 1 and 45 and possibly between amino acids 37 and 45 of the human p53 protein (1). In immunocytochemistry the antibody labels mutant-type p53 in the A431 cell line and wild-type p53 in the SVK14 cell line (SV40-transformed keratinocyte line) (1).
Precautions	1. For professional users. 2. This product contains sodium azide (NaN ₃), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing. 3. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.
Storage	Store at 2-8 °C. Do not use after expiration date stamped on vial. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the user must verify the conditions. There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the antibody is suspected, contact our Technical Services.
Specimen preparation	<u>Paraffin sections:</u> The antibody can be used for labelling paraffin-embedded tissue sections fixed in formalin or methacarn (1). Pre-treatment of tissues with heat-induced epitope retrieval is required. For tissues fixed in formalin, optimal results are obtained with Dako Target Retrieval Solution, High pH, code No. S 3308, or 10 mmol/L Tris buffer, 1 mmol/L EDTA, pH 9.0. Less optimal results are obtained with Dako Target Retrieval Solution, code No. S 1700, or 10 mmol/L citrate buffer, pH 6.0. Pre-treatment of tissues with proteinase K was found inefficient. The tissue sections should not dry out during the treatment or during the following immunocytochemical staining procedure. <u>Frozen sections and cell preparations:</u> The antibody can be used for labelling acetone-fixed, frozen sections and acetone-fixed, cultured cells (1).
Staining procedure	<u>Dilution:</u> Monoclonal Mouse Anti-Human p53 Protein, code No. M 7001, may be used at a dilution range of 1:25-1:50 when applied on formalin-fixed, paraffin-embedded sections of breast carcinoma and epidermoid carcinoma cell line and using 20 minutes heat-induced epitope retrieval in Dako Target Retrieval solution, High pH, code No. S 3308, and 30 minutes incubation at room temperature with the primary antibody. Optimal conditions may vary depending on specimen and preparation method, and should be determined by each individual laboratory. The recommended negative control is Dako Mouse IgG2b, code No. X 0944, diluted to the same mouse IgG concentration as the primary antibody. Unless the stability of the diluted antibody and negative control has been established in the actual staining procedure, it is recommended to dilute these reagents immediately before use, or dilute in Dako Antibody Diluent, code No. S 0809. Positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimen. <u>Visualization:</u> DAKO LSAB™+/HRP kit, code No. K 0679, and DAKO EnVision™+/HRP kits, code Nos. K 4004 and K 4006, are recommended. For frozen sections and cell preparations, the Dako APAAP kit, code No. K 0670, is a good alternative if endogenous peroxidase staining is a concern. Follow the procedure enclosed with the selected visualization kit. <u>Automation:</u> The antibody is well-suited for immunocytochemical staining using automated platforms, such as the Dako Autostainer.
Performance characteristics	Cells labelled by the antibody generally display a nuclear staining pattern, but cytoplasmic staining has been reported in some cases (6). <u>Normal tissues:</u> In normal and reactive mesothelium the antibody labelled 0/40 cases, and in 27 mesotheliomas, normal cells, e.g. fibroblasts and endothelial cells were negative (3).

Abnormal tissues: In follicular lymphoma an increasing accumulation of p53 in centroblasts is observed with morphological progression resulting in 1/16 cases of grade I, 10/21 cases of grade II, and 6/6 cases of grade III being positive (4). In mesotheliomas the antibody labelled 7/26 cases of epithelial type (1 to 25% positive cells), 1/7 cases of mixed type (25 to 50% positive cells), and 1/3 cases of mesenchymal type (more than 75% positive cells) (3). In Hodgkin's lymphoma 65% or more show positive labelling for p53, whereas around 50% of non-Hodgkin's lymphomas are positive (2).

FRANÇAIS

Intérêt	<p>Pour diagnostic <i>in vitro</i>.</p> <p>Monoclonal Mouse Anti-Human p53 Protein est destiné pour un usage en immunocytochimie. L'anticorps marque la protéine p53 de type sauvage et de type mutant et est un moyen utile pour la détermination de l'accumulation de p53 dans les néoplasies humaines (1-3). L'identification différentielle s'appuie sur les résultats obtenus à l'aide d'un panel d'anticorps. L'interprétation des résultats doit être entreprise dans le contexte de l'histoire clinique du patient et des autres examens diagnostics par un professionnel certifié.</p>
Introduction	<p>p53 est une phosphoprotéine nucléaire de masse moléculaire de 53 kDa. La protéine p53 de type sauvage est présente dans un grand nombre de cellules normales, mais la protéine a une demi-vie très courte et par conséquent elle n'est présente qu'en infime quantité (1), généralement au dessous du niveau de détection des méthodes immunocytochimiques (4). La mutation somatique du gène <i>p53</i> est un évènement très fréquent dans le développement des néoplasies humaines et parce que les protéines p53 mutantes sont souvent plus stables que la protéine de type sauvage, la protéine p53 mutante s'accumule à un haut niveau (1). Par exemple, l'accumulation de la protéine p53 était observée dans 76% de 212 lésions malignes humaines, y compris les carcinomes du sein, du côlon et de l'estomac, le mélanome, le carcinome embryonnaire des testicules, le carcinome de transition de la vessie, le carcinome utérin et les sarcomes des tissus mous. (5).</p> <p>La protéine p53 de type sauvage fonctionne comme un facteur de transcription, c.-à-d. comme un modulateur capable de « mettre en marche ou d'arrêter » des gènes cruciaux. De plus, cette protéine empêche la réplication de l'ADN et est une molécule de contrôle dans le déroulement du cycle cellulaire. Par ailleurs, la protéine p53 est impliquée dans la régulation de l'apoptose (2). Dans les dosages de transfection, la p53 de type sauvage se comporte comme un suppresseur de tumeur, alors que la p53 mutante se comporte comme un oncogène transformateur dominant (1).</p>
Réactif fourni	<p>L'anticorps de souris monoclonale fourni à l'état liquide comme culture cellulaire surageante dialysée contre 0,05 mol/L Tris/HCl, pH 7.2, et contenant 15 mmol/L NaN₃.</p> <p><u>Clone:</u> DO-7 (1). <u>Isotype:</u> IgG2b, kappa.</p> <p><u>Concentration IgG de Souris:</u> Voir l'étiquette sur le flacon de l'échantillon.</p>
Immunogène	<p>Protéine p53 de type sauvage recombinante humaine (1).</p>
Spécificité	<p>L'analyse SDS-PAGE des immunoprécipités formés entre le lysat de lignée cellulaire du cancer du sein BT474 et l'anticorps montre une réaction à une protéine de 53 kDa correspondant à la p53 (1).</p> <p>En transfert de Western du lysat de lignée cellulaire du carcinome vulvaire humain A431, l'anticorps marque une bande de 53 kDa, correspondant à la p53 de type mutant, qui est exprimée par A431. L'épitope reconnu par l'anticorps est situé entre les acides aminés N-terminaux 1 et 45 et probablement entre les acides aminés 37 et 45 de la protéine p53 humaine (1).</p> <p>En immunocytochimie l'anticorps marque la p53 de type mutant dans la lignée cellulaire A431 et la p53 de type sauvage dans la lignée cellulaire SVK14 (lignée de kératinocytes transformés au SV40) (1).</p>
Précautions d'emploi	<ol style="list-style-type: none">1. Pour utilisateurs professionnels.2. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN₃), un produit chimique hautement toxique à l'état pur. Aux concentrations du produit, bien qu'il ne soit pas classé comme étant nuisible, l'azide de sodium peut réagir avec la tuyauterie en plomb et en cuivre pour former des dépôts hautement explosifs d'azides métallisés. Lors de l'élimination du produit, laisser couler l'eau à flot pour éviter toute accumulation d'azides métallisés dans la tuyauterie.3. Comme pour tout dérivé biologique dangereux à manipuler, une précision s'impose.
Conservation	<p>Stocker entre 2 et 8 °C. A ne pas utiliser après la date de péremption mentionnée sur le flacon. Dans le cas où les réactifs sont conservés sous d'autres conditions que celles spécifiées, les conditions doivent être vérifiées par l'utilisateur. Il n'existe pas de signe particulier pour indiquer l'instabilité de ce produit. Par conséquent, les contrôles doivent être opérés simultanément avec les échantillons du patient. En cas de résultats imprévus qui ne peuvent pas être expliqués par des changements de procédures de laboratoire et qu'un problème avec le produit est suspecté, contactez nos Services Techniques.</p>
Préparation de l'échantillon	<p><u>Coupes en paraffine:</u> L'anticorps peut être utilisé pour le marquage des coupes de tissus incluses en paraffine, fixées au formol ou à la méthacarne (1). Le prétraitement des tissus par démasquage de l'épitope par la chaleur est requis. Pour les tissus fixés au formol, des résultats optimaux sont obtenus avec Dako Target Retrieval Solution, pH élevé, code S 3308 ou en tampon Tris 10 mmol/l, 1 mmol/l EDTA, à 9,0 de pH. Des résultats plus faibles sont obtenus avec Dako Target Retrieval Solution, code S 1700, ou 10 mmol/L tampon citrate, pH 6.0. Le prétraitement des tissus par la protéinase K est inefficace. Les coupes de tissus ne doivent pas sécher pendant le traitement ou la procédure d'immunomarquage immunocytochimique suivante.</p> <p><u>Coupes congelées et préparations cellulaires:</u> L'anticorps peut être utilisé pour le marquage des coupes en congélation fixées à l'acétone et les cultures cellulaires fixées à l'acétone. (1).</p>
Procédure d'immunomarquage	<p><u>Dilution:</u> Monoclonal Mouse Anti-Human p53 Protein, code M 7001, peut être dilué entre 1:25 et 1:50 pour application sur des coupes incluses en paraffine, fixées au formol de lignées de cancer du sein et épithéliome pendant 20 minutes de démasquage de l'épitope par la chaleur dans Dako Target Retrieval Solution, pH Elevé, code S 3308, et 30 minutes d'incubation à température ambiante avec l'anticorps primaire. Les conditions optimales peuvent varier selon l'échantillon et la méthode de préparation, et doivent être déterminées par chaque laboratoire particulier. Le contrôle négatif requis est Dako Mouse IgG2b, code X 0944, dilué à la même concentration en IgG de souris que l'anticorps primaire. A moins que la stabilité de l'anticorps dilué et du contrôle négatif ait été établie dans la procédure d'immunomarquage réelle, il est recommandé de diluer ces réactifs juste avant leur emploi; ou de les diluer dans Dako Antibody Diluent, code S 0809. Les contrôles positifs et négatifs doivent être opérés simultanément avec l'échantillon du patient.</p> <p><u>Révélation:</u> DAKO LSAB™+HRP kit, code K 0679, et DAKO EnVision™+HRP kits, codes K 4004 et K 4006, sont requis. Pour les coupes en congélation et préparations cellulaires, Dako APAAP kit, code K 0670, est une alternative valable si le marquage endogène peroxydasique est à craindre. Suivre la procédure incluse avec le kit de révélation choisi.</p> <p><u>Automatisation:</u> L'anticorps est bien adapté au marquage immunocytochimique sur des plates-formes automatisées comme le Dako Autostainer.</p>
Performances	<p>Les cellules marquées par l'anticorps révèlent généralement un profil de marquage nucléaire, mais le marquage cytoplasmique a été reporté dans certains cas (6).</p> <p><u>Tissus normaux:</u> Dans le mésothélium normal et réactif, l'anticorps marquait 0/40 cas, et dans 27 mésothéliomes, les cellules normales, par ex. les fibroblastes et les cellules endothéliales, étaient négatives (3).</p>

Tissus anormaux: Dans les lymphomes folliculaires, une accumulation croissante de p53 dans les centroblastes est observée avec une progression morphologique résultant dans 1/16 cas de grade I, 10/21 cas de grade II, et 6/6 cas de grade III positifs (4). Dans les mésothéliomes, l'anticorps marquait 7/26 cas de type épithélial (1 à 25% de cellules positives), 1/7 cas de type mixte (25 à 50% de cellules positives), et 1/3 cas de type mésenchymateux (plus de 75% de cellules positives) (3). Dans les lymphomes de Hodgkin, 65% ou plus révèlent un marquage positif pour la p53, alors qu'environ 50% des lymphomes non-Hodgkiniens sont positifs (2).

DEUTSCH

Zweckbestimmung	Zur Verwendung für In-vitro-Untersuchungen. Monoclonal Mouse Anti-Human p53 Protein ist für den immunzytohemischen Gebrauch bestimmt. Der Antikörper markiert den Wildtyp und den Mutantentyp des p53-Proteins und eignet sich zur Identifizierung von p53-Akkumulationen in humanen Neoplasien (1-3). Die differentielle Identifizierung wird durch die mit einem Antikörper-Panel erhaltenen Resultate unterstützt. Die Interpretation muss unter Berücksichtigung der klinischen Anamnese des Patienten und im Kontext weiterer diagnostischer Verfahren durch einen erfahrenen Pathologen erfolgen.
Einleitung	p53 nukleäres Phosphoprotein mit einer Molekülmasse von 53 kDa. Wildtyp-p53-Protein findet sich in einer Vielfalt normaler Zellen. Seine Halbwertszeit ist aber sehr kurz, so dass es in nur winzigen Mengen vorliegt (1) und normalerweise die Nachweisgrenze immunzytochemischer Methoden unterschreitet (4). Die somatische Mutation des p53-Gens ist ein sehr häufiges Geschehen bei der Entstehung menschlicher Neoplasien. Weil mutante p53-Proteine oft bedeutend stabiler als das p53-Protein vom Wildtyp sind, kann mutantes p53-Protein einen hohen Spiegel erreichen (1). Akkumulation von p53-Protein wurden z. B. bei 76 % der 212 malignen Läsionen des Menschen beobachtet, darunter bei Mamma-, Kolon- und Magenkarzinomen, Melanome, embryonale Karzinome der Testes, Übergangszellkarzinome der Harnblase, Uteruskarzinomen und Weichteilsarkomen (5). Das Wildtyp-p53-Protein fungiert als Transkriptionsfaktor, das heißt als Modulator, der ausschlaggebende Gene ein- und ausschalten kann. Es hemmt auch die DNA-Reduplikation und ist ein „Check-point“-Kontrollmolekül für die Progression des Zellzyklus. Darüber hinaus ist das p53-Protein an der Regulation der Apoptose beteiligt (2). Bei Transfektionsassays verhält sich das Wildtyp-p53 wie ein Tumor-Suppressor. Demgegenüber fungiert das mutante p53 als ein dominantes transformierendes Onkogen (1).
Geliefertes Reagenz	Der monoklonale Mausantikörper wird in flüssiger Form als Zellkulturüberstand geliefert, wurde gegen 0,05 mol/l Tris/HCl, pH-Wert 7,2 dialysiert und enthält 15 mmol/l Na ₃ N. <u>Klon:</u> DO-7 (1). <u>Isotyp:</u> IgG2b, Kappa. <u>Maus-IgG-Konzentration:</u> Siehe Produktetikett.
Immunogen	Rekombinantes humanes Wildtyp-p53-Protein (1).
Spezifität	Die SDS-PAGE-Analyse der Immunpräzipitate, die zwischen dem Antikörper und dem Lysat aus BT474-Brustkrebs-Zelllinie gebildet wurden, zeigte Reaktion mit einem 53 kDa schweren, p53 entsprechenden Protein (1). Beim Western-Blotting von Lysaten der humanen Vulvakarzinom-Zelllinie A431 markiert der Antikörper eine 53 kDa-Bande, die dem durch A431 exprimierten, mutanten p53-Typ entspricht. Das vom Antikörper erkannte Epitop ist zwischen den N-terminalen Aminosäuren 1 und 45 und möglicherweise zwischen den Aminosäuren 37 und 45 des humanen p53-Proteins (1) lokalisiert. Der Antikörper markiert immunzytochemisch den mutanten p53-Typ in der A431-Zelllinie und das Wildtyp-p53 in der SVK14-Zelllinie (SV40-transformierte Keratozyten-Zelllinie) (1).
Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	1. Für geschultes Fachpersonal. 2. Dieses Produkt enthält Natrium-Azid (Na ₃ N), eine in reiner Form hochtoxische chemische Verbindung. Bei den in diesem Produkt verwendeten Konzentrationen kann Natrium-Azid, obwohl nicht als gefährlich klassifiziert, mit in Wasserleitungen vorhandenem Blei oder Kupfer reagieren und zur Bildung von hochexplosiven Metall-Azid-Anreicherungen führen. Nach der Entsorgung muss mit reichlich Wasser nachgespült werden, um Metall-Azid-Anreicherung zu vermeiden. 3. Wie bei allen aus biologischen Materialien gewonnenen Produkten müssen die ordnungsgemäßen Handhabungsverfahren eingehalten werden.
Lagerung	Bei 2 – 8 °C lagern. Nicht nach dem auf dem Fläschchen angegebenen Verfallsdatum verwenden. Sollten die Reagenzien unter anderen Bedingungen als den beschriebenen aufbewahrt worden sein, so müssen diese vom Anwender verifiziert werden. Es gibt keine offensichtlichen Anhaltspunkte für die mögliche Instabilität dieses Produktes. Es sollten daher die Positiv- und Negativkontrollen gleichzeitig mit den Patientenproben mitgeführt werden. Wenn unerwartete Verfärbung beobachtet wird, welche durch Änderungen in den Labormethoden nicht erklärt werden kann und falls Verdacht auf ein Problem mit dem Antikörper besteht, ist bitte Kontakt mit unserem technischen Kundendienst aufzunehmen.
Probenvorbereitung	<u>Paraffinschnitte:</u> Der Antikörper kann für die Markierung von paraffineingebetteten, in Formalin oder Methacarn fixierten histologischen Schnitten genutzt werden (1). Eine Vorbehandlung der Gewebe mit hitzeinduzierter Epitopdemaskierung ist erforderlich. Für formalinfixierte Gewebeschnitte werden optimale Resultate erzielt mit Dako Target Retrieval Solution, pH 9,9, Code-Nr. S 3308 oder mit 10 mmol/l Tris-Puffer, 1 mmol/l EDTA, pH 9,0. Die Nutzung von Dako Target Retrieval Solution, pH 6,1, Code-Nr. S 1700 oder 10 mmol/l Citratpuffer, pH 6,0, erbringt weniger optimale Resultate. Die Vorbehandlung der Gewebe mit Proteinase K hat sich als ineffizient erwiesen. Während der Gewebevorbehandlung oder während der sich anschließenden immunzytochemischen Färbeprozedur dürfen die Gewebeschnitte nicht austrocknen. <u>Gefrierschnitte und zytologische Präparate:</u> Der Antikörper kann zur Markierung von azetonfixierten Gefrierschnitten und azetonfixierten kultivierte Zellen genutzt werden (1).
Färbeprozedur	<u>Verdünnung:</u> Monoclonal Mouse Anti-Human p53 Protein, Code-Nr. M 7001, kann bei einem Verdünnungsbereich von 1:25-1:50 eingesetzt werden, wenn es für formalinfixierte, paraffineingebettete Schnitte des menschlichen Mamma- und epidermoiden Karzinoms genutzt wird und wenn 20 Minuten lang die hitzeinduzierte Epitopdemaskierung mit Dako Target Retrieval solution, pH 9,9, Code-Nr. S 3308, gefolgt von 30 Minuten Inkubation mit dem primären Antikörper bei Raumtemperatur, durchgeführt wird. Die optimalen Bedingungen schwanken je nach Probe und Methode der Probenvorbereitung und sollten von jedem einzelnen Labor bestimmt werden. Die empfohlene Negativkontrolle ist Dako Mouse IgG2b, Code-Nr. X 0944, das auf dieselbe murine IgG-Konzentration wie der primäre Antikörper verdünnt wurde. Solange mit dem eigentlichen Testsystem die Stabilität des verdünnten Antikörpers und der Negativkontrolle nicht sichergestellt ist, wird empfohlen, diese Reagenzien unmittelbar vor Gebrauch zu verdünnen oder die Verdünnung mit Dako Antibody Diluent, Code-Nr. S 0809, vorzunehmen. Es sollten die Positiv- und Negativkontrollen gleichzeitig mit den Patientenproben mitgeführt werden. <u>Visualisierung:</u> Folgende Kits werden empfohlen: DAKO LSAB™ +/HRP-Kit, Code-Nr. K 0679 und DAKO EnVision™ +/HRP-Kits, Code-Nr. K 4004 und K 4006. Falls bei Gefrierschnitten und Zellpräparaten Probleme mit endogener Peroxidasefärbung auftreten, bietet der Dako APAAP Kit, Code-Nr. K 0670, eine gute Alternative. Es ist dem Verfahren zu folgen, das in den Anleitungen des genutzten Kits für die Visualisierung erläutert wird. <u>Automatisierung:</u> Der Antikörper ist gut für das immunzytochemische Färben unter Nutzung automatisierter Plattformen wie beispielsweise des „Autostainer“ von Dako geeignet.

Leistungseigenschaften

Die vom Antikörper markierten Zellen zeigen normalerweise ein nukleäres Färbungsmuster, in einigen Fällen wurde aber eine zytoplasmatische Färbung mitgeteilt (6).

Normalgewebe: Beim normalen und reaktiven Mesothel markierte der Antikörper 0/40 Fälle. Bei 27 Mesotheliomen testeten die normalen Zellen (d. h. Fibroblasten und Endothelzellen) negativ (3).

Anomales Gewebe: Beim follikulären Lymphom wird mit morphologischer Progression eine zunehmende Akkumulation von p53 in Zentroblasten beobachtet, mit resultierender Zunahme der positiven Reaktion: 1/16 bei Grad I, 10/21 bei Grad II und 6/6 bei Grad III (4). Bei Mesotheliomen markierte der Antikörper 7/26 Fälle der epithelialen Form (1 bis 25 % positive Zellen), 1/7 Fall der Mischform (25 bis 50% positive Zellen) und 1/3 Fall der mesenchymalen Form (über 75 % positive Zellen) (3). Beim Hodgkin-Lymphom zeigen mindestens 65 % der Zellen positive p53-Markierung, während ungefähr 50 % der Non-Hodgkin-Lymphome positiv sind (2).

References/ Références/ Literatur

1. Vojtěšek B, Bártek J, Midgley CA, Lane DP. An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. J Immunol Methods 1992;151:237-44.
2. Nieder C, Petersen S, Petersen C, Thames HD. The challenge of p53 as prognostic and predictive factor in Hodgkin's or non-Hodgkin's lymphoma (review). Ann Hematol 2001;80:2-8.
3. Ramael M, Lemmens G, Eerdekens C, Buysse C, Deblier I, Jacobs W, et al. Immunoreactivity for p53 protein in malignant mesothelioma and non-neoplastic mesothelium. J Pathol 1992;168:371-5.
4. Cooper K, Haffajee Z. bcl-2 and p53 protein expression in follicular lymphoma. J Pathol 1997;182:307-10.
5. Bártek J, Bártková J, Vojtěšek B, Stašková Z, Lukáš J, Rejthar A, et al. Aberrant expression of the p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies. Oncogene 1991;6:1699-703.
6. Kontogeorgos G, Kapranos N, Thodou E, Sambaziotis D, Tsagarakis S. Immunocytochemical accumulation of p53 in corticotroph adenomas: Relationship with heat shock proteins and apoptosis. Pituitary 1999;1:207-12.

Explanation of symbols/ Légende des symboles/ Erläuterung der Symbole

 Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer	 Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich	 Manufacturer Fabricant Hersteller
 In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-Vitro-Diagnostikum	 Batch code Code du Lot Chargenbezeichnung	
 Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten	 Use by Utiliser jusque Verwendbar bis	

**Monoclonal Mouse
Anti-Human
Progesterone Receptor
Clone PgR 636**

ENGLISH
Code M3569

Intended use

For In Vitro Diagnostic Use.

Monoclonal Mouse Anti-Human Progesterone Receptor, clone PgR 636 (Anti-PR, PgR 636) is intended for laboratory use for the semi-quantitative detection of progesterone receptor by light microscopy in normal and pathological human paraffin-embedded tissue processed in neutral buffered formalin. This antibody is indicated for use as an aid in the management, prognosis and prediction of outcome of breast cancer. Positive results aid in the classification of normal and abnormal cells/tissues and serve as an adjunct to conventional histopathology. The clinical interpretation of any positive staining or its absence should be complemented by morphological and histological studies with proper controls. Evaluations should be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified individual.

Summary and explanation

The role of steroid hormone receptors in breast cancer is well-known.^{2,3} The absence of ER and PR predicts early recurrence and poor survival of breast cancer patients.⁴⁻⁷ Also, the presence of ER and PR in tumors predicts the potential for benefit from tamoxifen and other endocrine-related therapies. Measurement of ER and PR can be determined semi-quantitatively using IHC or quantitatively using DCC or EIA. Correlation between the semi-quantitative and quantitative evaluations of PR have ranged from 73 to 91% depending on the laboratory and antibody used.⁸⁻¹⁰

Refer to Dako's *General Instructions for Immunohistochemical Staining* or the detection system instructions of IHC procedures for: 1) Principle of Procedure, 2) Materials Required, Not Supplied, 3) Storage, 4) Specimen Preparation, 5) Staining Procedure, 6) Quality Control, 7) Troubleshooting, 8) Interpretation of Staining, 9) General Limitations.

Reagent provided

Monoclonal Mouse antibody provided in liquid form as tissue culture supernatant in 0.05 mol/L Tris-HCl, pH 7.2 and 0.015 mol/L sodium azide. This product contains stabilizing protein.

Clone: PgR 636¹ Isotype: IgG₁, kappa
Mouse IgG concentration mg/L: See label on vial.

When performing IHC with the LSAB™2 detection system, use a 1:50 dilution in a 10- to 30-minute incubation with the diluted Anti-PR, PgR 636. These are guidelines only. Optimal antibody concentrations may vary depending on specimen and preparation method, and should be determined by each individual laboratory.

The protein concentration between lots may vary without influencing the optimal dilution. The titer of each individual lot is compared and adjusted to a reference lot to ensure a consistent immunohistochemical staining performance from lot-to-lot.

Immunogen

Formalin-fixed recombinant full-length A-form of human progesterone receptor¹

Specificity

Anti-PR, PgR 636 has been demonstrated to react with the PR-A and PR-B forms by Western blot of whole cell extracts and reacts with both free and hormone-bound PR.¹ The epitope has been mapped to the amino terminal domain shared by PR-A and PR-B.

Materials required, but not supplied

Refer to Dako's *General Instructions for Immunohistochemical Staining* and/or the detection system instructions. In addition, use the following negative reagent control:

Mouse IgG₁ (code X0931)

Precautions

1. For professional users.
2. This product contains sodium azide (NaN₃), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, NaN₃ may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing.
3. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.
4. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.
5. Unused reagents should be disposed of according to local, State, and Federal regulations.

Storage

Store at 2–8 °C. Do not use after expiration date stamped on vial. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user. There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the antibody is suspected, contact Dako Technical Support.

Specimen preparation

Biopsy specimens may be preserved for IHC staining by formalin fixation followed by paraffin embedding.

Anti-PR, PgR 636 can be used on tissues fixed in neutral buffered formalin, methacarn or Carnoy's fixative prior to paraffin embedding. The deparaffinized tissue sections must be treated with heat prior to the IHC staining procedure.¹⁰ Target retrieval involves immersion of tissue sections in a pre-heated buffer solution and maintaining heat, either in a water bath (95–99 °C), a steamer (95–99 °C) or an autoclave (121 °C). For greater adherence of tissue sections to glass slides, the use of Silanized Slides (code S3003) is recommended. Target Retrieval Solution (code S1700) or 10x Concentrate (code S1699) is recommended using a 20- to 40-minute heating protocol.

Anti-Progesterone receptor can also be used to label cryostat sections or cell smears.

Staining procedure

Follow the procedure for the detection system selected.

Staining interpretation

The cellular staining pattern for anti-PR, PgR 636 is nuclear. A positive staining result is defined as more than 10% of cells with stained nuclei of any intensity.

Performance characteristics

Normal Tissues

Distribution of PgR throughout normal tissue has been reported in a variety of studies. The nuclei of uterine gland cells were found to be strongly immunoreactive. Weaker immunostaining was observed in the nuclei of endometrial and prostatic stromal cells.

Immunoreactivity in a panel of normal tissues: Table 1 contains a list of positive tissues with PgR 636 immunoreactivity. All tissues were formalin-fixed and paraffin-embedded and stained with Anti-PR, PgR 636 according to the instructions in the package insert using the LSAB™2 detection system (code K0675). Negative tissues included adrenal (4), bone marrow (2), brain/cerebellum (4), brain/cerebrum (3), colon (3), esophagus (3), heart (3), kidney (3), liver (3), lung (3), mesothelial cells (3), ovary (3), pancreas (3), parathyroid (3), peripheral nerve (3), salivary gland (3), skeletal muscle (3), skin (3), small intestine (3), spleen (4), stomach (3), testis (3), thymus (3), thyroid (3) and tonsil (3).

Table 1: Summary of PgR 636 Normal Tissue Reactivity

<i>Tissue Type (# Tested)</i>	<i>Positive Tissue Element</i>	<i>Staining and Staining Pattern</i>
Breast (3)	Ductal epithelial cells	3+ staining intensity, 3/3 tissues
Cervix uteri (3)	Glandular epithelial cells	2+ staining intensity, 1/3 tissues
	Stromal fibroblasts	2+ staining intensity, 2/3 tissues
Pituitary (3)	Pituicytes	2+ staining intensity, 1/3 tissues
Prostate (3)	Stromal fibroblasts	2+ staining intensity, 1/3 tissues
Uterus (3)	Endometrial stroma	2+ staining intensity, 3/3 tissues
	Myometrium	2+ staining intensity, 3/3 tissues
	Endometrial glands	2+ staining intensity, 2/3 tissues

A second survey of normal tissues demonstrated positivity in endometrium and weak positivity in prostate after heat-induced epitope retrieval using the LSAB™+ detection system. Negative tissues included esophagus, testes, breast, liver, kidney, skeletal muscle, placenta, adrenal, tonsil, lung, colon, skin, pancreas, spleen, thyroid, stomach and cardiac muscle.¹

Abnormal Tissues

Ninety-seven breast cancer tissues were tested using the anti-PR, PgR 636 with the LSAB2 detection system, which had been previously assessed for PR expression using the PR-EIA. Correlation between the 2 assays was 90.7% while specificity was 94% and sensitivity was 87.2%. In another study, 31 breast carcinomas previously tested with the DCC assay were stained using the LSAB+ detection system. Positive staining was reported for 21/23 previously determined positive tumors, while 6/8 remained negative (91% sensitivity and 75% specificity).¹

Anti-PR, PgR 636 with a peroxidase/antiperoxidase detection system was used to immunostain a variety of 60 different tumor types. Breast cancer (5/11), uterine (2/2), ovarian (2/6) and endometrial (2) carcinomas stained strongly. Medullary carcinoma of the thyroid (1/2) and testicular yolk sac tumor were positive. Other tumors including melanoma, lymphoma and neuroendocrine and neural tumors were negative for PR expression.¹

Reproducibility

Reproducibility

Eight serial sections from each of three different formalin-fixed, paraffin-embedded blocks of breast carcinoma were collected for testing. Testing was performed as follows:

Intra-run Reproducibility

Following the standard EnVision™+ Peroxidase Kit protocol (code K4007), three slides from each tissue block randomly distributed through the staining order were stained with ready-to-use Mouse Anti-Human Progesterone Receptor, clone PgR 636. Concurrently, one slide from each block was stained with a matched negative control reagent.

Inter-run Reproducibility

Staining one slide from each tissue block, the above procedure was repeated on two additional days with another technician staining on the third staining procedure. Concurrently, one slide from each block was stained with a matched negative control reagent.

Reproducibility experiments with anti-PR, PgR 636 yielded consistent results with intra-run and inter-run testing. Consistent test conditions were maintained throughout the study and reagents were stored at 2–8 °C between test runs.

FRANÇAIS
Réf. M3569**Utilisation prévue**

Pour utilisation en diagnostic in vitro.

L'anticorps Monoclonal Mouse Anti-Human Progesterone Receptor, clone PgR 636 (anti-PR, PgR 636) est destiné à être utilisé en laboratoire en vue de la détection semi-quantitative du récepteur de la progestérone par microscopie optique dans des tissus humains sains et pathologiques inclus en paraffine et traités au formol neutre tamponné. L'utilisation de cet anticorps est recommandée pour faciliter la gestion, le pronostic et la prévision des résultats de cancer du sein. Des résultats positifs facilitent la classification des cellules et/ou tissus normaux et anormaux et servent de complément à l'histopathologie traditionnelle. L'interprétation clinique de toute coloration positive ou de son absence doit être associée à des études morphologiques et histologiques utilisant les contrôles adéquats. Les évaluations doivent tenir compte des antécédents cliniques du patient et d'autres tests diagnostiques réalisés par une personne qualifiée.

Résumé et explication

Le rôle des récepteurs des hormones stéroïdiennes dans le cancer du sein est bien connu.^{2,3} L'absence de récepteurs des œstrogènes (ER) et de récepteurs de la progestérone (PR) prédit une récurrence précoce et un taux de survie réduit des patientes atteintes du cancer du sein.⁴⁻⁷ De même, la présence d'ER et de PR dans les tumeurs prédit l'éventuel bénéfice d'une thérapie au tamoxifène ou d'autres thérapies endocriniennes. La mesure des ER et du PR peut être déterminée semi-quantitativement en utilisant une méthode IHC ou quantitativement à l'aide d'une méthode charbon dextran (« dextran-coated charcoal - DCC ») ou immunoenzymatique (EIA). La corrélation entre les évaluations semi-quantitatives et quantitatives des PR allait de 73 à 91 % en fonction du laboratoire et de l'anticorps utilisé.⁸⁻¹⁰

Se référer aux *Instructions générales de coloration immunohistochimique* de Dako ou aux instructions du système de détection concernant les procédures IHC pour : 1) Principe de procédure, 2) Matériaux requis mais non fournis, 3) Conservation, 4) Préparation des échantillons, 5) Procédure de coloration, 6) Contrôle qualité, 7) Dépannage, 8) Interprétation de la coloration, 9) Limites générales.

Réactifs fournis

Anticorps monoclonal de souris fourni sous forme liquide comme surnageant de culture tissulaire dans un tampon Tris-HCl à 0,05 mol/L, de pH 7,2, contenant de l'azide de sodium à 0,015 mol/L. Ce produit contient une protéine stabilisante.

Clone: PgR 636¹ Isotype: IgG₁, kappa
Concentration des IgG de souris en mg/L : voir l'étiquette du flacon.

Lors de la réalisation d'une procédure IHC à l'aide du système de détection LSABTM2, utiliser une dilution au 1/50 avec une incubation de 10 à 30 minutes avec l'anticorps anti-PR, PgR 636 dilué. Il ne s'agit là que de conseils. Les concentrations d'anticorps optimales peuvent varier en fonction de l'échantillon et de la méthode de préparation et doivent être déterminées par chaque laboratoire de manière indépendante.

La concentration en protéines peut varier d'un lot à l'autre sans que cela influence la dilution optimale. Le titre de chaque lot est comparé et ajusté par rapport à un lot de référence pour assurer des performances de coloration immunohistochimiques cohérentes d'un lot à l'autre.

Immunogène

Forme A de pleine longueur recombinante fixée au formol du récepteur de la progestérone humaine¹

Spécificité

Il a été montré que l'anticorps anti-PR, PgR 636 réagit avec les formes PR-A et PR-B par Western blots effectués sur des extraits cellulaires totaux et il réagit à la fois avec les PR libres et avec les PR liés à l'hormone.¹ L'épitope a été cartographié comme se trouvant au niveau du domaine N-terminal partagé par PR-A et PR-B.

Matériels requis mais non fournis

Se référer aux Dako's *Instructions Générales relatives à la procédure de Marquage Immunohistochimique* et/ou aux instructions du système de détection. De plus, utiliser le contrôle de réactif négatif suivant :

Mouse IgG₁ (IgG₁ de souris) (réf. X0931)

Précautions

1. Pour utilisateurs professionnels.
2. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN₃), produit chimique hautement toxique dans sa forme pure. Aux concentrations du produit, bien que non classé comme dangereux, le NaN₃ peut réagir avec le cuivre et le plomb des canalisations pour former des azides métalliques hautement explosifs. Lors de l'élimination, rincer abondamment à l'eau pour éviter toute accumulation d'azide métallique dans les canalisations.
3. Comme avec tout produit d'origine biologique, respecter les procédures de manipulation appropriées.
4. Porter un vêtement de protection approprié pour éviter le contact avec les yeux et la peau.
5. Les réactifs non utilisés doivent être éliminés conformément aux réglementations locales et nationales.

Conservation

Conserver entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption imprimée sur le flacon. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles indiquées, celles-ci doivent être validées par l'utilisateur. Il n'y a aucun signe évident indiquant l'instabilité de ce produit. Par conséquent, les contrôles positifs et négatifs doivent être testés en même temps que des échantillons de patient. Si une coloration inattendue est observée, qui ne peut être expliquée par un changement des procédures du laboratoire, et en cas de suspicion d'un problème lié à l'anticorps, contacter l'assistance technique de Dako.

Préparation des échantillons

Les échantillons de biopsie peuvent être préservés pour la coloration IHC par fixation au formol suivie d'une inclusion en paraffine.

L'anticorps anti-PR, PgR 636 peut être utilisé sur des tissus fixés au formol neutre tamponné, au methacarn ou au fixateur de Carnoy avant d'être inclus en paraffine. Les coupes de tissus déparaffinées doivent être traitées à la chaleur avant de procéder à la coloration IHC.¹⁰ Le démasquage des cibles implique l'immersion des coupes de tissus dans une solution tampon préchauffée et le maintien de la chaleur, dans un bain-marie (95–99 °C), une étuve (95–99 °C) ou une autoclave (121 °C). Pour une meilleure adhérence des coupes de tissus sur les lames de verre, il est recommandé d'utiliser des Silanized Slides (réf. S3003). La Target Retrieval Solution (réf. S1700) ou la Target Retrieval Solution 10x Concentrate (réf. S1699) sont recommandées lors d'un protocole de chauffage de 20 à 40 minutes.

L'anticorps anti-récepteur de la progestérone peut être utilisé pour le marquage de coupes cryostat ou de frottis cellulaires.

Procédure de coloration

Suivre la procédure pour le système de détection sélectionné.

Interprétation de la coloration

Le profil de coloration cellulaire pour l'anticorps anti-PR, PgR 636 est nucléaire. Un résultat de coloration est positif si plus de 10 % des cellules présentent une coloration nucléaire, quelle que soit l'intensité.

Caractéristiques de performance

Tissus sains

La répartition du PgR dans les tissus sains a été reportée dans diverses études. Les noyaux des cellules glandulaires de l'utérus se sont avérés très immunoréactifs. Une coloration immunologique plus faible a été observée dans les noyaux des cellules stromales endométriales et prostatiques.

Immunoréactivité dans un panel de tissus sains : le tableau 1 contient une liste de tissus positifs présentant une immunoréactivité avec le PgR 636. Tous les tissus ont été fixés au formol et inclus en paraffine puis colorés avec l'anticorps anti-PR, PgR 636 conformément aux instructions de la notice, à l'aide du LSAB™2 Detection System (code K0675). Les tissus négatifs incluent : la glande surrénale (4), la moelle osseuse (2), le cerveau/cervelet (4), le cerveau/cerebrum (3), le côlon (3), l'œsophage (3), le cœur (3), le rein (3), le foie (3), le poumon (3), les cellules mésothéliales (3), l'ovaire (3), le pancréas (3), la parathyroïde (3), le nerf périphérique (3), la glande salivaire (3), le muscle squelettique (3), la peau (3), l'intestin grêle (3), la rate (4), l'estomac (3), le testicule (3), le thymus (3), la thyroïde (3) et l'amygdale (3).

Tableau 1 : Résumé de la réactivité au PgR 636 dans les tissus sains

Type de tissu (nbre testés)	Élément tissulaire positif	Coloration et profil de coloration
Sein (3)	Cellules épithéliales canalaire	intensité de coloration 3+, 3 tissus sur 3
Col de l'utérus (3)	Cellules épithéliales glandulaires	intensité de coloration 2+, 1 tissu sur 3
	Fibroblastes stromaux	intensité de coloration 2+, 2 tissus sur 3
Hypophyse (3)	Pituicytes	intensité de coloration 2+, 1 tissu sur 3
Prostate (3)	Fibroblastes stromaux	intensité de coloration 2+, 1 tissu sur 3
Utérus (3)	Stroma endométrial	intensité de coloration 2+, 3 tissus sur 3
	Myomètre	intensité de coloration 2+, 3 tissus sur 3
	Glandes endométriales	intensité de coloration 2+, 2 tissus sur 3

Une deuxième étude sur des tissus sains a mis en évidence une positivité au niveau de l'endomètre et une faible positivité au niveau de la prostate après démasquage de l'épitope par la chaleur (HIER) en utilisant le système de détection LSAB™+. Les tissus négatifs incluent l'œsophage, le testicule, le sein, le foie, le rein, le muscle squelettique, le placenta, la glande surrénale, l'amygdale, le poumon, le côlon, la peau, le pancréas, la rate, la thyroïde, l'estomac et le muscle cardiaque.¹

Tissus tumoraux

Quatre-vingt dix-sept tissus de cancer du sein ont été testés en utilisant l'anticorps anti-PR, PgR 636 avec le système de détection LSAB2 qui avait auparavant été évalué en termes d'expression du PR via une méthode immunoenzymatique (EIA) portant sur le PR. La corrélation entre les 2 tests était de 90,7 % tandis que la spécificité s'élevait à 94 % et la sensibilité à 87,2 %. Dans une autre étude, 31 carcinomes mammaires précédemment testés par une méthode charbon dextran (« dextran-coated charcoal-DCC ») ont été colorés en utilisant le système de détection LSAB+. Une coloration positive a été notée pour 21 cas sur 23 de tumeurs précédemment déterminées comme étant positives, alors que 6 tumeurs sur 8 demeuraient négatives (sensibilité de 91 % et spécificité de 75 %).¹

L'anticorps anti-PR, PgR 636 associé à un système de détection peroxydase/antiperoxydase a été utilisé pour colorer un grand nombre de tumeurs de 60 types différents. Les cancers du sein (5/11), de l'utérus (2/2), de l'ovaire (2/6) et les carcinomes de l'endomètre (2) ont été fortement colorés. Le carcinome médullaire de la thyroïde (1/2) et la tumeur du sac vitellin testiculaire étaient positifs. D'autres tumeurs incluant le mélanome, le lymphome et les tumeurs neuroendocriniennes et neurales étaient négatives pour l'expression du PR.¹

Reproductibilité

Reproductibilité

Huit coupes en série ont été prélevées pour évaluation sur chacun des trois blocs de carcinome mammaire différents fixés au formol et inclus en paraffine. L'analyse a été réalisée comme suit :

Reproductibilité intra-cycle

Selon le protocole standard du EnVision™+ Peroxidase Kit (réf. K4007), trois lames issues de chacun des blocs de tissus distribués au hasard dans l'ordre de la coloration ont été colorées à l'aide de l'anticorps prêt à l'emploi Mouse Anti-Human Progesterone Receptor, clone PgR 636. Simultanément, une lame provenant de chaque bloc a été colorée à l'aide d'un réactif de contrôle négatif.

Reproductibilität inter-cycles

En colorant une lame provenant de chaque bloc de tissu, la procédure ci-dessus a été répétée sur deux jours supplémentaires avec un autre technicien effectuant la coloration pour la troisième procédure de coloration. Simultanément, une lame provenant de chaque bloc a été colorée à l'aide d'un réactif de contrôle négatif.

Les expériences de reproductibilité avec l'anticorps anti-PR, PgR 636 ont donné des résultats cohérents avec les analyses inter-cycles et intra-cycle. Les mêmes conditions d'analyse ont été conservées tout au long de l'étude et les réactifs ont été conservés entre 2 et 8 °C entre les cycles de test.

DEUTSCH

Code-Nr. M3569

Verwendungszweck

Zur In-vitro-Diagnostik.

Monoclonal Mouse Anti-Human Progesterone Receptor, Clone PgR 636 (Anti-PR, PgR 636) wird im Labor dazu verwendet, den Progesteronrezeptor in normalen und pathologischen Humangeweben, die in Paraffin eingebettet und mit neutral gepuffertem Formalin behandelt wurden, mit Lichtmikroskopie halbquantitativ nachzuweisen. Dieser Antikörper ist als Unterstützung bei der Behandlung und Prognose von Brustkrebs sowie bei der Vorhersage seines Verlaufs indiziert. Positive Ergebnisse unterstützen die Klassifizierung normaler und abnormaler Zellen/Gewebe und ergänzen die konventionelle Histopathologie. Die klinische Auswertung vorhandener oder fehlender Färbungen sollte durch morphologische und histologische Untersuchungen mit entsprechenden Kontrollen ergänzt werden. Auswertungen müssen von einer qualifizierten Person unter Berücksichtigung der Krankengeschichte und anderer Diagnostiktests des Patienten vorgenommen werden.

Zusammenfassung und Erklärung

Die Rolle der Steroidhormonrezeptoren bei Brustkrebs ist gut bekannt.^{2,3} Das Fehlen des Östrogenrezeptors (ER) bzw. Progesteronrezeptors (PR) zeigt frühe Rezidive und eine geringe Überlebenschance für Brustkrebspatientinnen an.⁴⁻⁷ Dagegen erlaubt das Vorliegen von ER und PR in Tumoren die Prognose des potenziellen Nutzens einer Therapie mit Tamoxifen bzw. anderen endokrin wirksamen Therapeutika. Die Messung des ER und PR kann halbquantitativ durch IHC oder quantitativ mit DCC oder EIA erfolgen. Die Korrelation zwischen halbquantitativen und quantitativen PR-Bestimmungen lag je nach Labor und eingesetztem Antikörper zwischen 73 % und 91 %.⁸⁻¹⁰

Folgende Angaben bitte den *Allgemeinen Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung* von Dako bzw. den Anweisungen des Detektionssystems für IHC-Verfahren entnehmen: 1) Verfahrensprinzipien, 2) Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien, 3) Aufbewahrung, 4) Vorbereitung der Probe, 5) Färbeverfahren, 6) Qualitätskontrolle, 7) Fehlerbehebung, 8) Auswertung der Färbung, 9) Allgemeine Beschränkungen.

Mitgelieferte Reagenzien

Monoklonaler Maus-Antikörper in flüssiger Form als Gewebekulturüberstand in 0,05 mol/L Tris-HCl-Puffer, pH 7,2 und 0,015 mol/L Natriumazid. Dieses Produkt enthält ein Stabilisatorprotein.

Klon: PgR 636¹ Isotyp: IgG₁, kappa
Konzentration Maus-IgG mg/L: Siehe Fläschchenetikett.

Anti-PR, PgR 636 bei Tests mit dem LSAB™2-Nachweissystem in einer Verdünnung von 1:50 und mit einer Inkubationsdauer von 10 bis 30 Minuten verwenden. Hierbei handelt es sich lediglich um eine Richtlinie. Optimale Antikörperkonzentrationen können je nach Probe und Vorbereitungsmethode unterschiedlich sein und sollten von jedem Labor selbst bestimmt werden.

Die Proteinkonzentration kann bei den Chargen verschieden ausfallen, ohne die optimale Verdünnung zu beeinflussen. Der Titer wird bei jeder einzelnen Charge angeglichen, um vergleichbare immunhistochemische Färbeergebnisse zwischen den Chargen mit einer Referenzcharge zu gewährleisten.

Immunogen

Formalinfixierte rekombinante A-Form (vollständig) des humanen Progesteronrezeptors¹

Spezifität

Anti-PR, PgR 636 hat im Western Blotting an Ganzzell-Extrakten nachweislich mit den A- und B-Formen des Progesteronrezeptors reagiert. Es reagiert ebenfalls mit freien und hormonegebundenen Progesteronrezeptoren.¹ Die Lage des Epitops wurde an der aminoterminalen Domäne bestimmt, in der auch PR-A und PR-B liegen.

Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien

Siehe *Allgemeine Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung* von Dako und/oder Anweisungen des Detektionssystems. Darüber hinaus folgendes Negativkontrollreagenz verwenden:

Mouse IgG₁ (Code-Nr. X0931)

Vorsichtsmaßnahmen

1. Nur für Fachpersonal bestimmt.
2. Dieses Produkt enthält Natriumazid (NaN₃), eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. Ansammlungen von NaN₃ können auch in Konzentrationen, die nicht als gefährlich klassifiziert sind, mit Blei- und Kupferabflussrohren reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Nach der Entsorgung stets mit viel Wasser nachspülen, um Azidansammlungen in den Leitungen vorzubeugen.
3. Wie alle Produkte biologischen Ursprungs müssen auch diese entsprechend gehandhabt werden.
4. Entsprechende Schutzkleidung tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.
5. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, bundesstaatlichen und staatlichen Richtlinien zu entsorgen.

Aufbewahrung

Bei 2–8 °C aufbewahren. Nach Ablauf des auf dem Fläschchen aufgedruckten Verfallsdatums nicht mehr verwenden. Werden die Reagenzien nicht entsprechend den angegebenen Bedingungen aufbewahrt, müssen die Bedingungen vom Anwender geprüft werden. Es gibt keine offensichtlichen Anzeichen für eine eventuelle Produktstabilität. Positiv- und Negativkontrollen sollten daher zur gleichen Zeit wie die Patientenproben getestet werden. Falls es zu einer unerwarteten Färbung kommt, die sich nicht durch Unterschiede bei Laborverfahren erklären lässt und auf ein Problem mit dem Antikörper hindeutet, ist der technische Kundendienst von Dako zu verständigen.

Vorbereitung der Probe

Biopsieproben können für die IHC-Färbung durch Formalinfixierung und anschließende Paraffineinbettung haltbar gemacht werden.

Anti-PR, PgR 636 kann auf Geweben verwendet werden, die vor der Paraffineinbettung in neutral gepuffertem Formalin, Methacarn oder Carnoy-Fixiermittel fixiert wurden. Vor dem IHC-Färbeverfahren müssen die entparaffinierten Gewebeschnitte mit Wärme behandelt werden.¹⁰ Zur hitzeinduzierten Epitopdemaskierung gehört ein Eintauchen der Gewebeschnitte in eine vorgewärmte Pufferlösung, deren Temperatur in einem Wasser- bzw. Dampfbad (95–99 °C) oder einem Dampfsterilisator (121 °C) beibehalten wird. Zur besseren Haftung der Gewebeschnitte an den Glasobjektträger wird die Verwendung von Silanized Slides (Code-Nr. S3003) empfohlen. Für ein Wärmeprotokoll von 20–40 Minuten werden Target Retrieval Solution (Code-Nr. S1700) oder 10x Concentrate (Code-Nr. S1699) empfohlen.

Anti-Progesterone Receptor eignet sich auch zur Markierung von Gefrierschnitten oder Zellausstrichen.

Färbeverfahren

Das für das ausgewählte Detektionssystem empfohlene Verfahren befolgen.

Auswertung der Färbung

Das zelluläre Färbemuster für Anti-PR, PgR 636 ist nukleär. Als positives Ergebnis gilt die Färbung von mehr als 10 % der Zellkerne mit beliebiger Intensität.

Leistungsmerkmale

Normale Gewebe

Die Verteilung von PgR im normalen Gewebe ist in zahlreichen Studien beschrieben worden. Eine starke Immunreaktivität wurde bei den Nuklei von Zellen der Gebärmutterdrüse beobachtet. An den Kernen der Stromazellen aus Endometrium und Prostata war die Immunfärbung schwächer.

Immunreaktivität in verschiedenen normalen Geweben: Tabelle 1 enthält eine Aufstellung von Geweben mit positiver PgR 636-Immunreaktivität. Alle Gewebe wurden formalinfixiert, paraffineingebettet und mit Anti-PR, PgR 636 gemäß den Anweisungen der Packungsbeilage mit dem LSAB™2 Detection System (code K0675) eingefärbt. Negative Gewebe waren Nebennieren (4), Knochenmark (2), Gehirn/Zerebellum (4), Gehirn/Zerebrum (3), Darm (3), Ösophagus (3), Herz (3), Niere (3), Leber (3), Lunge (3), Mesothelzellen (3), Eierstöcke (3), Pankreas (3), Nebenschilddrüse (3), peripherer Nerv (3), Speicheldrüsen (3), Skelettmuskulatur (3), Haut (3), Dünndarm (3), Milz (4), Magen (3), Hoden (3), Thymus (3), Schilddrüse (3) und Mandeln (3).

Tabelle 1: Übersicht über die PgR 636-Reaktivität in normalem Gewebe

<i>Gewebetyp (Anz. getestet)</i>	<i>Positives Gewebe-Element</i>	<i>Färbung und Färbungsmuster</i>
Brust (3)	Gangepithelzellen	Färbungsintensität 3+, 3/3 Geweben
Gebärmutterhals (3)	Glanduläre Epithelzellen Stromafibroblasten	Färbungsintensität 2+, 1/3 Geweben Färbungsintensität 2+, 2/3 Geweben
Hypophyse (3)	Pituizyten	Färbungsintensität 2+, 1/3 Geweben
Prostata (3)	Stromafibroblasten	Färbungsintensität 2+, 1/3 Geweben
Uterus (3)	Endometrales Stroma Myometrium Endometrane Drüsen	Färbungsintensität 2+, 3/3 Geweben Färbungsintensität 2+, 3/3 Geweben Färbungsintensität 2+, 2/3 Geweben

Eine weitere Studie an normalen Geweben ergab Positivität im Endometrium und schwache Positivität in der Prostata nach hitzeinduzierter Epitopdemaskierung mit einem LSAB™+ Detektionssystem. Negative Gewebe waren Ösophagus, Hoden, Brust, Leber, Nieren, Skelettmuskulatur, Plazenta, Nebennieren, Mandeln, Lunge, Darm, Haut, Pankreas, Milz, Schilddrüse, Magen und Herzmuskel.¹

Abnormale Gewebe

Siebenundneunzig zuvor mit dem PR-EIA auf Progesteronrezeptor-Expression bewertete Brustkrebsgewebeproben wurden mit dem LSAB2 Detektionssystem mit Anti-PR, PgR 636 getestet. Die Korrelation zwischen den beiden Assays betrug 90,7 %, die Spezifität 94 % und die Empfindlichkeit 87,2 %. In einer anderen Studie wurden 31 zuvor nach der DCC-Methode getestete Mammakarzinome mit dem LSAB+ Detektionssystem eingefärbt. Positive Färbung wird für 21/23 zuvor bestimmte positive Tumore beschrieben, hingegen blieben 6/8 negativ (Empfindlichkeit 91 % und Spezifität 75 %).¹

Mit einem Peroxidase/Antiperoxidase-Detektionssystem wurde Anti-PR, PgR 636 zur Immunfärbung von 60 verschiedenen Tumortypen verwendet. Beim Mamma- (5/11), Uterus- (2/2), Eierstock- (2/6) und Endometriumkarzinom (2) trat eine starke Färbung auf. Auch das medulläre Karzinom der Schilddrüse (1/2) und der testikuläre Dottersacktumoren waren positiv. Andere Tumore wie Melanom, Lymphom und neuroendokrine bzw. neurale Tumore wiesen keine PR-Expression auf.¹

Reproduzierbarkeit

Reproduzierbarkeit

Für den Test wurden acht serielle Schnitte von jedem von drei verschiedenen formalinfixierten, paraffineingebetteten Mammakarzinom-Gewebeblöcken entnommen. Die Tests wurden wie folgt durchgeführt:

Reproduzierbarkeit innerhalb eines Durchlaufs

Gemäß der Verfahrensanleitung des standardmäßigen EnVision™+ Peroxidase Kits (Code-Nr. K4007) wurden von jedem Gewebblock drei in Zufallsreihenfolge für die Färbung ausgewählte Objektträger mit gebrauchsfertigem Mouse Anti-Human Progesteron Receptor, Clone PgR 636 eingefärbt. Gleichzeitig wurde wieder ein Objektträger aus jedem Block mit einer darauf abgestimmten Negativkontrolle eingefärbt.

Reproduzierbarkeit bei verschiedenen Durchläufen

Das oben beschriebene Verfahren wurde an zwei weiteren Tagen an je einem Objektträger aus jedem Gewebblock wiederholt, wobei ein anderer Labormitarbeiter für das dritte Färbeverfahren zuständig war. Gleichzeitig wurde wieder ein Objektträger aus jedem Block mit einer darauf abgestimmten Negativkontrolle eingefärbt.

Versuche zur Reproduzierbarkeit mit Anti-PR, PgR 636 ergaben sowohl bei Versuchen innerhalb eines Durchlaufs als auch in verschiedenen Durchläufen übereinstimmende Ergebnisse. Während der gesamten Studie wurden gleich bleibende Versuchsbedingungen beibehalten; die Reagenzien wurden zwischen den Durchläufen bei 2–8 °C aufbewahrt.

References

Bibliographie

Literaturangaben

1. Press M, Spaulding B, Groshen S, Kaminsky D, Hagerty M, Sherman L, Christensen K, Edwards DP. Comparison of different antibodies for detection of progesterone receptor in breast cancer. *Steroids* 2002;67(9):799-813
2. Henderson C. Breast cancer. In: Harrison's principles of internal medicine, 12th edition, Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Martin JB, Fauci AS, Root RK (eds). McGraw-Hill, Inc. New York, 1991
3. Fuqua SAW. Estrogen and progesterone receptors and breast cancer. *Diseases of the Breast*, Harris et al, eds. Lippincott-Raven, 1996. p. 261
4. McGuire WL, Clark GM. The prognostic role of progesterone receptors in human breast cancer. *Sem Oncol* 1983;10(4 Suppl 4):2-6
5. Clark GM, McGuire WL, Hubay CA, Pearson OH, Marshall JS. Progesterone receptors as prognostic factor in stage II breast cancer. *N Engl J Med* 1983;309(22):1343-7
6. Ravdin PM, Green S, Dorr TM, McGuire WL, Fabian C, Puch RP, Carter RD, Rivkin SE, Borst JR, Belt RJ, Metch B, Osborne CK. Prognostic significance of progesterone receptor levels in estrogen receptor-positive patients with metastatic breast cancer treated with tamoxifen: Results of a prospective southwest oncology group study. *JCO* 1992;10(8):1284-91
7. Chevallier B, Heintzmann F, Mosseri V, Dauce JP, Bastit P, Graic Y, Brunelle P, Basuyay JP, Comoz M, Asselain B. Prognostic value of estrogen and progesterone receptors in operable breast cancer: Results of a univariate and multivariate analysis. *Cancer* 1988;62(12):2517-24
8. Page DL, Jensen RA, Simpson JF. Routinely available indicators of prognosis in breast cancer. *Breast Can Res Treat* 1998;51(3):195-208
9. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* 1998;11(2):155-68
10. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, Ruby SG, O'Malley F, Simpson JF, Connolly JL, Hayes DF, Edge SB, Lichter A, Schnitt SJ. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists consensus statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124(7):966-78

 Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer	 Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich	 Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten
 Manufacturer Fabricant Hersteller	 Batch code Code du lot Chargenbezeichnung	 Use by Utiliser jusque Verwendbar bis
 Authorized representative in the European Community Représentant Autorisé dans la Communauté Européenne Autorisierter Repräsentant in der EU	 In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-vitro-Diagnostikum	



Dako North America, Inc.
6392 Via Real
Carpinteria, California 93013 USA

Tel 805 566 6655
Fax 805 566 6688
Technical Support 800 424 0021
Customer Service 800 235 5763

 EC REP

Dako Denmark A/S
Produktionsvej 42
DK-2600 Glostrup Denmark

Tel +45 4485 9500
Fax +45 4485 9595

www.dako.com

PT0039/Rev C

Edition 01/09

GLOSSAIRE

Glossaire

- **Anatomopathologie:**

Fréquemment abrégée en « anapath » dans le jargon des cliniciens, c'est une spécialité médicale. C'est la partie de la pathologie dédiée à l'étude morphologique des anomalies macroscopiques et microscopiques des tissus biologiques.

- **Angiogenèse :**

Processus physiologique par lequel de nouveaux vaisseaux sanguins se développent autour d'une tumeur, ce qui permet à celle-ci de s'approvisionner et de croître.

- **Epidémiologie :**

C'est l'étude des facteurs influant sur la santé et les maladies de populations. Il s'agit d'une discipline qui se rapporte à la répartition, à la fréquence et à la gravité des états pathologiques.

- **Histologie :**

Autrefois appelée anatomie microscopique, c'est la branche de la biologie et de la médecine qui étudie les tissus biologiques. Elle se situe au carrefour de la biologie cellulaire, l'anatomie, la biochimie et la physiologie. Elle a pour but d'explorer la structure des organismes vivants. Elle participe à l'exploration des processus pathologiques et de leurs effets.

- **Incidence :**

C'est une mesure de l'état de santé d'une population dénombrant le nombre de nouveau cas sur une période donnée. Le taux d'incidence est calculé en rapportant l'incidence à la taille de la population considérée, toujours sur une période donnée. On dira par exemple que le taux d'incidence d'une maladie se situe entre tant et tant de personnes par million d'habitants, par an.

- **Néoplasie :**

Le terme néoplasie désigne une formation nouvelle « néoplasme » qui se développe par prolifération cellulaire. Le mot « néoplasme » est le terme utilisé en médecine pour désigner une tumeur ou un cancer.

Résumé:

Les tumeurs cérébrales sont classées à la 17^{ème} place au niveau mondial et à la 4^{ème} place au niveau algérien en termes d'incidence. Le deuxième type histologique le plus fréquent est représenté par les méningiomes avec 30% des cas. Ils proviennent des cellules arachnoïdiennes et leur classification est principalement basée sur des critères morphologiques qui peuvent être complétés par des études immunohistochimiques (IHC). En effet certains biomarqueurs peuvent déterminer le pronostic des méningiomes. Notre étude avait pour objectif d'évaluer la répartition des méningiomes selon l'âge, le sexe et le grade histologique ainsi que l'intérêt de la p53 et du récepteur de la progestérone (RP) dans le pronostic des méningiomes. Pour cela une étude épidémiologique rétrospective sur 67 cas a été effectuée, suivi d'une étude immunohistochimique sur 14 cas de méningiome en utilisant des anticorps monoclonaux. Nous avons obtenue comme résultats une moyenne d'âge d'apparition de 47.9 ans, un sexe ratio de 0.34. Le grade I été le plus fréquent (82 % des cas). L'immunohistochimie a montré une immuno positivité de RP dans 87.5 % des grades I, 40 % des grades II, 0% pour le grade III. La P53 été positive dans 20% des grades II et 100 % des grades III, et négative pour le grade I. De cela on conclue qu'il existe une prédominance du sexe féminin et une apparition précoce des méningiomes dans notre série en comparaison avec les pays occidentaux, mais aussi que le grade I est le plus fréquent. Enfin la p53 peut potentiellement être associé, à une agressivité tumorale, tandis que RP peut être un facteur de bon pronostic.

Mots clés: Méningiome, Immunohistochimie, P53, RP, Epidémiologie.

Summary:

Brain tumors are classified at the 17th place worldwide and the 4th place in the Algerian level in terms of incidence. The second most common histological type is represented by meningiomas with 30% of cases. They generate from arachnoid cells and their classification is mainly based on morphological criteria that can be supplemented by immunohistochemical studies (IHC). Indeed, some biomarkers can determine the prognosis of meningioma. Our study aimed to evaluate the distribution of meningiomas by age, gender and histological grade and the interest of p53 and the progesterone receptor (PR) in meningiomas prognosis. In this scope, a retrospective epidemiological study of 67 cases was performed, followed by immunohistochemical study of 14 cases of meningioma using monoclonal antibodies. We obtained as results an age average of onset of 47.9 years, a sexe ratio of 0.34, and grade I was most frequent 82% of cases. Immunohistochemistry analysis showed a PR immuno positivity in 85.7% of grade I, 40% of Grade II 0% for grade III. The P53 was positive in 20% of grade II and grade III 100%, and negative for grade I. in conclusion, our data show that there is a predominance of the female, early onset of meningiomas in our series compared to Western countries, but also that the most common grade is the grade I. finally, p53 may potentially be associated with tumor aggressiveness, while RP can be a good prognosis factor.

Keywords: Meningioma, Immunohistochemistry, P53, PR, Epidemiology.

ملخص:

تحتل أورام المخ المرتبة السابعة عشر عالميا و الرابعة على المستوي الجزائري من حيث الإصابة، النوع الثاني النسيجي الأكثر شيوعا و الممثل عبر الأورام السحائية بنسبة 30% الناتجة من الخلايا الارشودنية و تصنيفها على أساس معايير شكلية و التي تستكمل بدراسات مناعية كيميائية نسيجية، بالفعل بعض العلامات البيولوجية يمكن تشخيص السحائي. دراستنا تهدف الى تقييم توزيع السحائية حسب العمر و الجنس و الصف النسيجي و مهام p53 و مستقبل البروجيسترول في تشخيص السحائي و لهذا دراسة ايديميولوجيا رجعية ل67 حالة تليها دراسة مناعية نسيجية كيميائية على 14 حالة باستعمال الأجسام المضادة، حصلنا على نتائج بمعدل عمر 47,9 سنة بالنسبة للجنس مقدار 0,34 الصف الأكبر 82% حالة. المناعة الكيميائية النسيجية بينت مناعة نسيجية ايجابية للمستقبل 77,7% في الصف الأول، 40% في الصف الثاني، 0% في الصف الثالث و P53 لها ايجابية في 20% في الصف الثاني و 100% في الصف الثالث و سلبي في الصف الأول و هنا نستنتج انه يوجد اغلبيية لجنس انثي و ظهور مبكر مقارنة بالبلدان الغربية و الصف الأول الأكثر شيوعا، p53 تستطيع ان تشارك في عدوانية الورم في حين ان المستقبل يمكن ان يكون عامل جيد

الكلمات المفتاحية: سحائي، مناعة كيميائية نسيجية، مستقبل، البروجيسترول، ايديميولوجيا، p53.