

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



Mémoire de Master

Filière : Sciences biologiques

Option : Génétique Appliquée

Thème

Caractérisation moléculaire des
protéines intracellulaires et du
microenvironnement des tumeurs
cérébrales

Présenté par : BOUATIA Sabrina

Composition du jury

M^r A. GHIDOUCHE
M^{me} K. BOUGOFFA
M^{me} H. AMIR

Maitre de conférences B, Béjaia
Maitre Assistante A, Béjaia
Maitre Assistante A, Béjaia

Promoteur
Présidente
Examinatrice

Année Universitaire : 2015/2016

Remerciement

Mes attentions premières s'adressent sans hésitation à mon promoteur Monsieur Ghidouche et Mademoiselle Ait Ali. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance la plus sincère. Je les remercie pour leur confiance, leur enthousiasme, leur rigueur scientifique, et à leur disponibilité qui ont permis l'aboutissement de ce travail dans les meilleures conditions. Puisse ce travail répondre à leurs attentes.

Mes vifs remerciements aux membres du jury, composé de Mme Bougoffa ainsi que Mme Amir merci de nous faire part de votre présence.

Dieu le tout puissant, le miséricordieux pour m'avoir donné la chance et le courage d'arriver à ce niveau.

J'adresse mes tendres remerciements à ma très chère Mère et mon neveu Mehdi, à qui je dédie ce travail, sans qui ce travail aurait eu une toute autre saveur. Merci également à mon Frère, Sonia et Ayoub et à ma moitié Narimane pour tout ce que vous représentez pour moi. Vous avez toujours su m'encourager et m'accompagner dans ce que je voulais faire. Je vous en suis extrêmement reconnaissante. Merci pour toute l'aide que vous m'avez apportée durant ces longues années d'études.

Un grand merci à 박찬열, you have always been there to cheer me up.

Sans oublié les patients de l'Hôpital qui souffrent.

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE	1
<u>CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</u>	
I.1- Cancérogenèse.....	2
I.1.1- Eléments de neuroanatomie.....	2
I.1.1.1- Système nerveux.....	2
I.1.1.2- Cellules nerveuses	2
I.2- Cancer et la progression tumorale.....	4
I.2.1- Origine cancérogenèse	4
I.2.1.1- Hypothèse des « cellules souches cancéreuses »	4
I.2.1.2- Les deux modèle principaux expliquant l'origine du cancer	5
I.2.1.3- Néoplasie et transformation cellulaire maligne.....	6
I.2.2- Gènes intervenant dans le désordre génétique.....	10
I.3- Marqueurs tumoraux.....	12
I.3.1- Définition d'un marqueur tumoral.....	12
I.3.2- Utilisation potentielle des marqueurs tumoraux	12
I.3.3- Rapport cancer/marqueur	13
I.4-Introduction aux tumeurs cérébrales.....	13
I.4.1- Aspect épidémiologique des tumeurs cérébrales.....	13
I.4.1.1- L'incidence des tumeurs cérébrales.....	13
I.4.1.2- Facteurs de risque des tumeurs du système nerveux.....	14
I.4.2- Origine et progression tumorale	15
I.4.2.1- Cellules souches cancéreuse des tumeurs cérébrales	15
I.4.2.2-Progression des tumeurs du système nerveux central	16
I.4.3- Critères d'identification et classification des tumeurs cérébrales.....	16
I.4.3.1- Aspects histologiques des tumeurs primitives du système nerveux.....	16
I.4.3.2- Classification des gliomes selon l'OMS	17
I.4.3.3 – Physiopathologie moléculaire et cellulaire	19
I.4.3.4- Voies de signalisation altérées dans le glioblastome.....	23
<u>CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES</u>	
II.1- Echantillonnage	25
II.2- Préparation des échantillons	25

II.3- Dissociation ou lyse cellulaire et sonication27

II.4- Méthodes d'analyses28

 II.4.1- Méthodes quantitatives28

 II.4.1.1 Dosage des protéines par la méthode de Bradford28

 II.4.2- Caractérisation des protéines.....29

 II.4.2.1- Détermination de la nature protéique par sds- page.....29

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS

III.1- Etude quantitative des protéines de tumeurs cérébrales.....34

III.2- Etude qualitative des protéines de tumeurs cérébrales.....39

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....43

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Liste des abréviations

- AKT** Protéine kinase B
- BSA** Albumine de sérum bovin
- CD** Cluster de Différenciation
- CDK** Cyclin D Kinase
- CSC** Cellule souche cancéreuse
- E2F** Transcription Factor
- EDTA** Acide éthylène-diamine-tétraacétique
- EGF/VEGF** Facteur de croissance de l'épithélium/ Vascular endothélium growth factor
- EGFR** Récepteur du facteur de croissance de l'épithélium
- Erk** Extracellular Signal-regulated Kinase
- GBM** Glioblastome multiforme
- GFAP** Glial Fibrillary Acidic
- HCL** Chlorure d'Hydrogène
- LCR** Liquide Céphalo-Rachidien
- MEC** Matrice extracellulaire
- Mek** Methyl Ethyl Ketone (Protéine kinase activée par les agents mitogènes et activant ERK)
- mTOR** *mammalian target of rapamycin*
- NG2** Neural/glial antigen 2
- NSE** Enolase Neurospécifique
- P53** Protéine 53
- PAGE** Électrophorèse sur gel de polyacrylamide
- PBS** Tampon phosphate salin
- PI3K** Phosphatidylinositol-3-kinase
- PSA** Persulfate d'ammonium
- PTEN** Protéine homologue à la tensine délétée sur le chromosome 10
- Raf** family of three [serine/threonine-specific protein kinases](#)
- Ras** Reticular activating System
- SDS** Dodécyl sulfate de sodium

SNC/ SNP Système Nerveux Central / Système Nerveux Périphérique

TEMED N,N,N', N,-tétraméthylènediamin

TRIS Tris (hydroxyméthyl) aminométhane

LISTE DES FIGURES

Figure1 : représentation des deux modèles pouvant expliquer l'hétérogénéité tumorale dans le modèle stochastique, chaque cellule a une capacité élevée de prolifération tumorale.

Figure2 : schéma général de la progression métastatique.

Figure3 : les sept caractéristiques fondamentales des cellules tumorales.

Figure4 : principe de la cancérisation.

Figure5 : schéma du développement des cellules d'origine neuroectodermiques (neurones et cellules gliales).

Figure6 : principaux types de gliomes au sein de chaque grade selon la classification de l'oms 2007.

Figure7 : voie de signalisation pi3k/akt.

Figure8 : tissu tumoral prêt pour la fragmentation

Figure 9 : échantillons retirées après centrifugation.

Figure 10 : courbe d'étalonnage.

Figure 11: cuve à électrophorèse.

Figure 12 : variations des concentrations intracellulaire et surnageant en terme de concentrations protéiques pour chaque patient.

Figure 13 : concentrations des protéines intracellulaires selon le type de tumeur.

Figure 14 : quantité de protéines mesurées selon le poids de la tumeur.

Figure 15 : concentrations protéiques intracellulaire chez les deux sexes.

Figure 16 : concentrations des protéines intracellulaires réparties selon les âges.

Figure 17 : résultats électrophorèse des échantillons cytosoliques.

Figure 18: représentation des résultats d'électrophorèse des échantillons cytosoliques.

Figure 19 : résultats d'électrophorèse des échantillons de surnageants.

Figure 20 : représentation des résultats d'électrophorèse des échantillons de surnageants.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : liste des échantillons obtenus.

Tableau II : protocole de préparation du tampon phosphate salin(PBS).

Tableau III : protocole de préparation de la solution PBS_EDTA.

Tableau VI : protocole de préparation du tampon de lyse.

Tableau V : Série des dilutions de la BSA (chaque dilution est préparée à base de la solution précédente).

Tableau VI : préparation du réactif de Bradford.

Tableau VII : préparation du gel de séparation à 10% (running gel).

Tableau VIII : préparation du gel de concentration à 10% (stacking gel).

Tableau IX : préparation du gel de migration.

Tableau X : préparation du gel de dénaturation.

Tableau XI : préparation de la solution de coloration.

Tableau XII : préparation de la solution de décoloration.

Tableau XIII : résultats de la quantification protéique.

Introduction

Le Cancer est un ensemble de processus cellulaires et moléculaires conduisant à la transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse. Il s'agit d'une transformation cellulaire avec acquisition de nouveaux caractères transmissibles aux cellules filles. L'aspect d'une cellule cancéreuse est différent de la cellule normale, tant sur le plan morphologique, génétique et biologique. Tous les types cellulaires peuvent donner naissance à une tumeur, ce qui explique l'existence de plusieurs types de tumeurs au sein d'un même organe.

Le système nerveux central (SNC) contrôle la plupart des fonctions de l'organisme. Les pathologies qui le touchent ont généralement des conséquences dramatiques du fait de leur caractère très infiltrative et de leur localisation souvent proche des zones fonctionnelles sensibles. Les tumeurs qui se développent au sein du SNC se subdivisent selon leur localisation en tumeurs intrarachidiennes et intracrâniennes. Les tumeurs intracrâniennes se divisent en tumeurs des structures limitantes (méningiomes, neurinomes, adénomes), tumeurs intraventriculaires (épendymomes, médulloblastomes) et tumeurs intracérébrales (gliomes, métastases).

Les tumeurs cérébrales primitives de l'adulte constituent un groupe de tumeurs solides très hétérogène sur le plan clinique. Dans la majorité des cas, leur génétique est complexe avec de nombreux remaniements chromosomiques. Les études génétiques menées ces dernières années, ont permis de révéler, en partie, la signification clinique et biologique de ces altérations moléculaires non aléatoires.

Notre étude s'inscrit dans le cadre d'une meilleure compréhension et caractérisation des protéines cellulaires lors du processus de tumorigenèse. L'hypothèse de notre travail est basée sur le fait que les modifications de synthèse protéique de la cellule cancéreuse et son microenvironnement joue un rôle déterminant dans l'évolution des cancers et l'acquisition de leur caractère invasif.

Chapitre I

Revue

bibliographique

I.1- CANCEROGENESE

I.1.1- ELEMENTS DE NEUROANATOMIE

I.1.1.1- SYSTEME NERVEUX

Le système nerveux est un système complexe permettant les interactions entre l'organisme et son environnement, en captant, intégrant et émettant l'information. Le système nerveux se compose de deux parties :

- le système nerveux périphérique (SNP) constitué de nerfs, subdivisés en deux catégories fonctionnelles : les *éfférences* (issues du tronc cérébral) et *afférences* (issues de la moelle épinière) somatiques générales.
- le système nerveux central (SNC) ou névraxe, situé dans les cavités osseuses et entouré de membranes, appelées méninges (pie-mère, arachnoïde et dure mère). Il est constitué de deux sous-parties : l'encéphale et la moelle épinière. (**MacLean, 1990**)

I.1.1.2- LES CELLULES NERVEUSES

Le tissu nerveux se compose de deux types cellulaires majoritaires : les neurones (ou cellules nerveuses), et les cellules gliales (cellules de soutien et d'enveloppement).

A. Cellule gliales ou « névroglie » :

Les cellules gliales sont d'origine ectodermique ; elles entourent les neurones et participent au contrôle de l'environnement chimique et électrique, en leur fournissant des nutriments et en éliminant leurs déchets. Elles sont classées en deux grandes familles histologiques :

- La macroglie comprenant les astrocytes, les oligodendrocytes, les cellules épendymaires et les cellules NG2 positives.
- La microglie composée de macrophages spécialisés.

La description des astrocytes est détaillée ci-dessous. Les oligodendrocytes entourent les axones, formant ainsi la gaine de myéline protectrice et nutritive pour les neurones. De par sa richesse en lipides, la gaine de myéline isole les axones améliorant ainsi la vitesse de l'influx nerveux. Les cellules épendymaires, encore appelées épendymocytes, sont ciliées et

constitutives de la paroi délimitant les ventricules cérébraux. Grâce à leurs battements ciliaires, elles facilitent la circulation du liquide céphalorachidien (LCR) sécrété par le plexus choroïde. Les cellules NG2 positives présentent le protéoglycane NG2 à leur surface. Elles se différencient in-vitro en oligodendrocytes, et elles seraient impliquées dans la plasticité neuronale car des analyses électrophysiologiques ont montré qu'elles reçoivent des signaux synaptiques en provenance des neurones. (Nishiyama *et al.*, 2009)

La microglie est composée de macrophages spécialisés capables de phagocytose. Elles sont impliquées dans l'immunité locale notamment au cours de l'inflammation, assurant ainsi la protection des neurones du SNC. (Gehrmann *et al.*, 1995).

❖ Les astrocytes :

Les astrocytes sont les cellules gliales les plus nombreuses et il en existe divers types. L'apparence morphologique typique des astrocytes est due à l'expression de filaments intermédiaires qui forment le cytosquelette. Les principales protéines formant ces filaments sont la « Glial Fibrillary Acidic Protein » (GFAP) et la vimentine. Ces cellules expriment également une protéine dimérique, la calciprotéine S100, dont la sous-unité β est sélectivement synthétisée par les astrocytes. C'est une protéine intracytosolique qui fixe le calcium et participe activement à la régulation de l'organisation structurale de la cellule en interagissant avec différentes protéines du cytosquelette, et notamment la GFAP. Lorsqu'elle est sécrétée dans le milieu extracellulaire par les astrocytes, elle favorise la croissance neuritique et la prolifération astrocytaire. La protéine S100 β s'inscrit parmi les bio-marqueurs des traumatismes crâniens. (Chatfield *et al.*, 2002)

Par ailleurs, les astrocytes jouent un rôle important dans la progression des gliomes, y compris le glioblastome. En considérant la théorie des cellules souches cancéreuses, seules de petites populations cellulaires seraient capables de former une tumeur (Furnari *et al.*, 2007). La présence au niveau de cerveaux adultes, de cellules souches cancéreuses exprimant le marqueur astrocytaire, la GFAP, augmente la possibilité de la contribution de ces cellules à l'initiation des tumeurs astrocytaires, telles que le glioblastome. De plus, certaines propriétés des gliomes astrocytaires semblent en relation avec les fonctions des astrocytes. Il s'agit par exemple de la production du glutamate qui augmente l'invasion tumorale (Sontheimer, 2008), ou encore l'amplification de la signalisation STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) dans le glioblastome. Celle-ci est associée de façon classique à la fonction

des astrocytes et aurait pour rôle de diminuer l'inflammation et la surveillance immunitaire dans les GBM (Brantley *et al.*, 2008).

B. Les neurones :

Chaque neurone est composé d'un corps cellulaire ou soma et des prolongements cytoplasmiques appelés neurites. Le soma contient le noyau et cytoplasme périnucléaire appelé périakaryon. Il émane du soma plusieurs neurites de nature dendritique et un seul prolongement appelé axone. L'axone dont la longueur est parfois considérable, de 1 mètre et plus, émet au cours de son trajet des branches et se termine fréquemment par des fines ramifications. (Goffinet, 1994)

I.2- LE CANCER ET LA PROGRESSION TUMORALE

Le développement de pathologies malignes résulte de multiples facteurs exogènes et endogènes. L'accumulation des modifications génétiques et épigénétiques est d'une importance capitale car elle mène à la sélection d'une population cellulaire de phénotype malin dont les caractéristiques sont : prolifération illimitée, immortalisation ; perte des mécanismes de rétrocontrôle antiprolifératifs, croissance autonome, indépendante des signaux de prolifération (par ex. stimulation autocrine) ; perte de la capacité à induire l'apoptose ; néo vascularisation ; propriétés métastatiques et invasives ([Mertelsmann et al.](#), 2011).

I.2.1- ORIGINE CANCEROGENESE

I.2.1.1- HYPOTHESE DES « CELLULES SOUCHES CANCEREUSES »

En 1994, à la suite de recherches sur les leucémies, l'hypothèse selon laquelle « les cancers proviennent de la maturation de cellules souches et qu'ils sont autoalimentés par une petite fraction de cellules ayant les caractéristiques de cellules souches » prend plus d'ampleur.

De nombreuses découvertes sur les tumeurs solides, essentiellement après l'an 2000, renforcent cette hypothèse. Néanmoins, des interrogations persistent et les chercheurs tendent à se positionner sur de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant d'éradiquer spécifiquement les CSCs et leurs niches. (Grimwade et Enver, 2004)

I.2.1.2- LES DEUX MODELE PRINCIPAUX EXPLIQUANT L'ORIGINE DU CANCER

Une tumeur est un tissu très hétérogène. Son développement peut être vu comme une version aberrante d'un tissu normal. Deux modèles conceptuels de l'origine et de la progression tumorale ont été proposés pour exposer cette hétérogénéité.

Selon l'ancien modèle stochastique, toutes les cellules tumorales ont une capacité proliférative élevée ; les cellules tumorales prolifèrent suite à l'âge, à un manque d'apports en nutriments ou en oxygène. N'importe quelle cellule du tissu, même différenciée, peut donc, à la suite de mutations acquises de façon aléatoire, proliférer de façon indéfinie et former un clone tumoral indépendant. D'après ce modèle, L'hétérogénéité tumorale est attribuée, non seulement à la différenciation, mais aussi à des variations génétiques et épigénétiques.

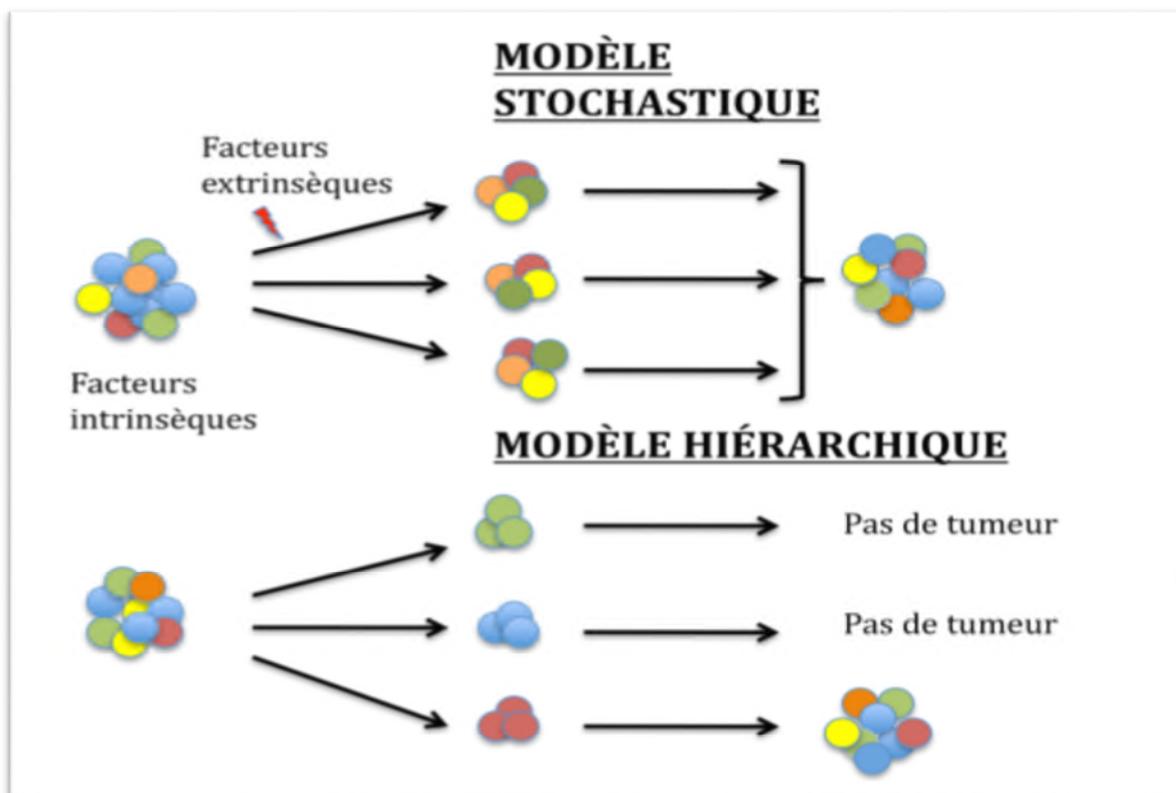


Figure 1 : Représentation des deux modèles pouvant expliquer l'hétérogénéité tumorale dans le modèle stochastique, chaque cellule a une capacité élevée de prolifération tumorale.

Dans le modèle hiérarchique, seulement une sous-population est capable de créer une tumeur; ce sont les cellules souches cancéreuses (en rouge) (Kinzler et Vogelstein, 1997).

Le second modèle est le modèle hiérarchique, encore appelé « l'hypothèse des cellules souches cancéreuses » selon lequel le cancer provient de la transformation d'une petite fraction de la population tumorale, composée de cellules souches cancéreuses. Selon ce second modèle, une cellule initiatrice de cancer est le moteur de l'activité tumorigène du cancer qui se développe de manière organisée. La cellule initiatrice de cancer présente toutes les caractéristiques d'une cellule souche, elles ont la capacité de s'autorenouveler de façon illimitée et de se différencier. Les CSCs ont la faculté de se diviser de façon asymétrique pour donner naissance à une nouvelle cellule souche cancéreuse identique à la cellule mère et de générer des progéniteurs cellulaires, qui eux-mêmes, seront à l'origine des lignées cellulaires différenciées. Les cellules filles vont ensuite proliférer et former la masse tumorale. (Catalano *et al.*, 2011).

I.2.1.3- NEOPLASIE ET TRANSFORMATION CELLULAIRE MALIGNE

L'ensemble des différentes cellules qui constituent l'organisme naissent et meurent de façon à maintenir la forme, l'architecture et les fonctions propres à chaque organe ou système. Pour maintenir l'harmonie de l'ensemble, la prolifération des cellules est régulée par les programmes génétiquement définis de chaque type cellulaire et par les contacts avec les autres cellules. Le propre du cancer est de briser cette harmonie. (Scotté *et al.*, 2008).

A. Du tissu sain au tissu cancéreux :

Les anatomopathologistes décrivent plusieurs étapes dans la transformation d'un tissu normal en un tissu cancéreux :

_ **L'hyperplasie** : les cellules sont d'apparence normale mais présentent le défaut de se multiplier excessivement par rapport au tissu normal les choses peuvent en rester là, ou bien apparait la dysplasie ;

_ **La dysplasie** : le tissu de la zone dysplasique subit une désorganisation architecturale et quand à ces cellules des anomalies de différenciations. La dysplasie est souvent qualifiée d'état pré cancéreux parce qu'un stade de plus peut être franchi lorsque ces cellules devenues franchement anormales forment un cancer *in situ*. On observe aussi une modification de la

membrane basale qui est une zone qui s'oppose au passage des cellules cancéreuses et son respect par les cellules néoplasiques a permis de définir le concept de carcinome in situ.

_ **Le cancer *in situ*** : c'est une tumeur qui se développe localement, sans franchir les limites séparant le tissu auquel elle appartient des autres tissus. Cette tumeur reste rarement confinée au tissu ou elle apparue. Elle s'étend en général au-delà : elle est alors devenu invasive ;

_ **Le cancer invasif** : prolifère à une vitesse très variable et pénètre les tissus adjacents.

_ **Les métastases** : sont des amas de cellules tumorales issues de certaines cellules de la tumeur primitive qui ont acquis la propriété de migrer par voie sanguine ou lymphatique puis celle de traverser les vaisseaux et celle de survivre et de proliférer dans d'autres tissus.

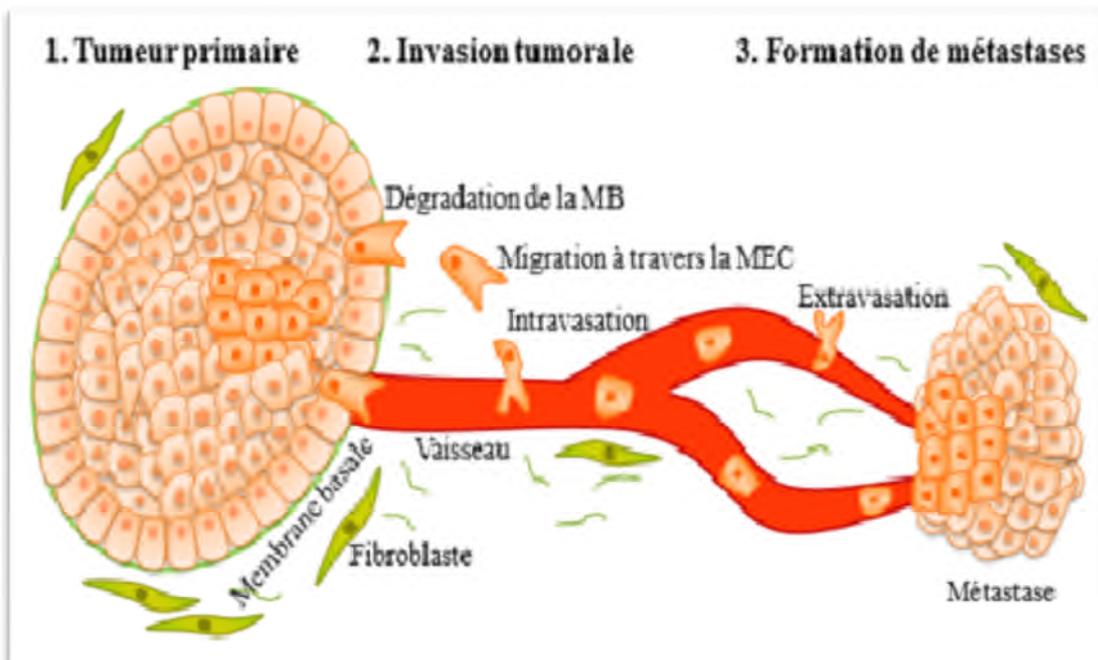


Figure 2 : Schéma général de la progression métastatique (Peinado et al., 2007).

B. Acquisition de nouvelles caractéristiques :

Les mutations somatiques acquises confèrent à la cellule cancéreuse ses principales caractéristiques. Cet ensemble de propriété a été et demeure fort utile pour définir le phénotype transformé d'une cellule.

1. Prolifération en l'absence de facteurs de croissance.
2. Perte d'inhibition de contact.
3. Perte de la nécessité d'un support d'ancrage.

Toutefois notre compréhension actuelle du cancer passe désormais par une vision moléculaire des étapes de la transformation maligne, c'est ce qui a conduit Hanahan et Weinberg à proposer une liste des propriétés acquises par les cellules tumorales (**Hanahan et al., 2011**).

1. Indépendance vis-à-vis des signaux de prolifération.
2. Insensibilité aux signaux antiprolifératifs.
3. Acquisition d'une résistance à l'apoptose.
4. Potentiel illimité de réplication.
5. Stimulation de l'angiogenèse.
6. Pouvoir d'invasion et dissémination.
7. Instabilité génomique.

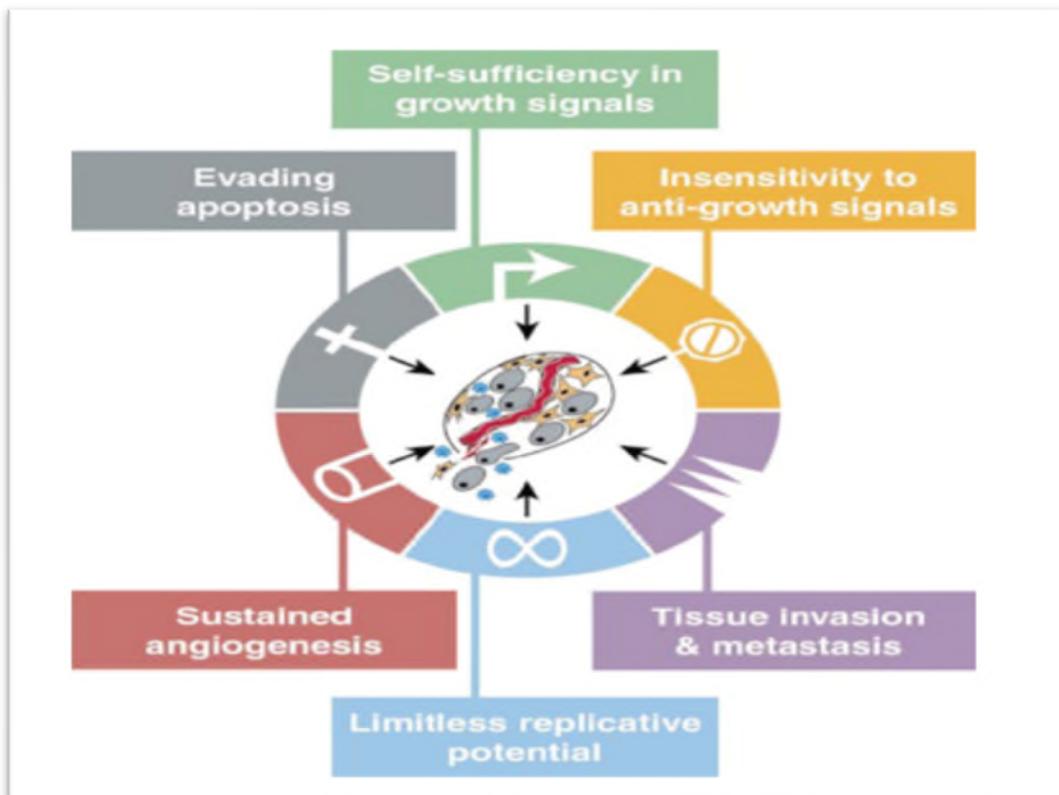


Figure 3: les sept caractéristiques fondamentales des cellules tumorales (**Hanhan, Weinberg, 2000**).

C. Remaniement de la matrice extracellulaire :

La matrice extracellulaire (MEC) correspond à l'ensemble de macromolécules extracellulaires du tissu conjonctif. Elle est constituée en grande partie de glycoprotéines (collagène, fibronectine, laminine,...), de protéines pures (élastine) et de glycosaminoglycanes. Ces macromolécules sont synthétisées et sécrétées par les cellules et la MEC est probablement propre à chaque type tissulaire. La MEC intervient dans le soutien structural, l'adhérence, le mouvement et la régulation de la cellule. La MEC est un environnement dynamique qui joue un rôle clé dans la régulation des fonctions cellulaires durant les procédés de remodelages normaux ou pathologiques tels que le développement embryonnaire, la réparation des tissus, l'inflammation et la métastase et l'invasion tumorales. Le remaniement de la MEC durant la tumorigenèse qui consiste en une dégradation de la MEC par l'activation des protéases et favorisant l'invasion du tissu. (Rao, 2003)

D. Les régulateurs de la métastase

Différents gènes peuvent augmenter le potentiel métastatique de la cellule. L'ostéopontine, phosphoprotéine sécrétée, a un niveau d'expression systématiquement corrélé avec le caractère métastatique (El-Tanani, 2008). Elle se lie notamment aux CD44 (cluster de différenciation) et intégrines, deux classes de protéines impliquées dans le processus métastatique. Les récepteurs aux chémokines (par exemple CXCR4 - CXCL12) sont exprimés par les cellules cancéreuses. Ils sont normalement impliqués dans les processus chimiotactiques permettant aux leucocytes de cibler des organes précis. La forte expression de chémokines dans certains tissus (os, poumon), combinée à l'expression de leurs récepteurs à la surface des cellules cancéreuses, constitue un mécanisme d'attraction de ces cellules vers des organes cibles. Les gènes suppresseurs de métastases sont peu nombreux. Nous pouvons notamment citer BRMS-1, E-cadhérine et KAI-1. (Hsu *et al.*, 2009)

E. Le Switch angiogénique :

L'angiogenèse tumorale correspond à l'apparition de nouveaux vaisseaux destinés à répondre aux besoins métaboliques de la tumeur. Les mécanismes de l'angiogenèse sont intriqués avec ceux de la vasculogenèse, de la lymphangiogenèse et de la neurogenèse. Cependant

contrairement à ce que l'on observe dans ces phénomènes physiologiques, l'angiogenèse tumorale est caractérisé par une organisation et des dimensions vasculaires anarchiques ainsi qu'une perméabilité vasculaire accrue. L'étape la plus importante du phénomène d'angiogenèse tumorale est le « Switch angiogénique». L'angiogenèse est en effet un équilibre entre activation et l'inhibition. La cicatrisation constitue un exemple d'activation physiologique de l'angiogenèse. A un moment de la croissance tumorale, le déséquilibre de ce rapport aboutit à la prolifération des cellules vasculaires, leur migration puis leur agencement en vaisseaux fonctionnels par une stabilisation et un modelage des structures cellulaires (**Kim, 2006**).

I.2.2- GENES INTERVENANT DANS LE DESORDRE GENETIQUE

- ❖ **les gardiens de la prolifération (gatekeepers)** interviennent dans le contrôle du déroulement du cycle cellulaire en empêchant le développement des cellules potentiellement cancéreuses dans le cadre d'une régulation au niveau de la cellule, du tissu ou de l'organisme en bloquant la prolifération ou en induisant la mort cellulaire (apoptose) (**Rao, 2003**).

- ❖ **les gardiens du génome (caretakers)** qui sont les protéines de réparation des dommages de l'ADN qui interviennent pour protéger le génome de mutations acquises. L'inactivation des caretakers n'augmente pas la prolifération cellulaire mais initie l'acquisition de changements génétiques supplémentaires (**Rao, 2003**).

I.3- LES MARQUEURS TUMORAUX

I.3.1- DEFINITION D'UN MARQUEUR TUMORAL

Les implications potentielles de toute décision thérapeutique liée au cancer font que les biologistes cherchent à trouver les meilleurs indicateurs pour limiter les incertitudes et surtout pour cibler la maladie par des traitements de plus en plus spécifiques. Ces indicateurs sont appelés marqueurs tumoraux.

Ce sont un groupe de protéines (onco-protéine, immunoglobuline, albumine, globuline), hormones (ACTH, calcitonine, catécholamine), enzymes (phosphatase acide, phosphatase alcaline, amylase), récepteurs (d'œstrogène et progestérone, EGF, IL2) et autre produits

cellulaires surexprimés principalement par les cellules cancéreuses et que l'on retrouve dans le sang. La quantité de marqueurs présente reflète souvent le nombre de cellules cancéreuses présentes dans l'organisme (in situ ou métastatique). (Tiwari, 2012)

Avec les progrès des connaissances de la carcinogenèse et les nouveaux procédés techniques, de nouveaux marqueurs sont apparus. Ils ciblent des anomalies cellulaires ou génétiques. Ils bouleversent les classifications établies des cancers, peuvent être pronostiques (témoignant du devenir d'une tumeur en particulier) ou alors prédictifs de la réponse à des traitements dits ciblés. C'est le début de la personnalisation de l'oncologie. (Sarivalasis *et al.*, 2013)

On pourra en citer le NSE, se retrouve dans les Neuroblastome (cancer du SNC), ainsi que le cancer du poumon. Mais dans l'augmentation serait due à d'autres circonstances telles que les Maladies pulmonaires bénignes.

I.3.2- UTILISATION POTENTIELLE DES MARQUEURS TUMORAUX

La détermination du stade d'un cancer s'effectue par la quantification du bio-marqueur, ainsi que pour la surveillance de la progression de l'état patient durant le traitement est un des éléments qui va permettre au médecin de suivre la réponse à un traitement et d'ajuster celui-ci au cas de chaque malade. Toutefois à l'arrêt du traitement, le dosage des marqueurs va permettre de vérifier que la maladie est contrôlée, stabilisée ou éradiquée. (Eleftherios *et al.*, 2002)

I.3.3- LE RAPPORT CANCER/MARQUEUR

Les marqueurs ne sont ni spécifiques, ni sensibles à 100%. Ce ne sont donc pas des sécrétions spécifiques du cancer, mais la quantité et l'évolution de celles-ci sont des éléments d'orientation vers un cancer. On ne peut donc pas poser un diagnostic de cancer uniquement à partir de l'augmentation de la concentration des marqueurs tumoraux, il faut toujours se référer à l'histologie. Les marqueurs tumoraux aident au diagnostic, ils jouent le rôle d'éléments de surveillance dans le sens où, une fois le traitement terminé, on continue à les doser de manière régulière chez le patient, afin de dépister d'éventuelles rechutes.

Il faut donc considérer les marqueurs tumoraux comme des éléments d'orientation de forte présomption de diagnostic et de référence dans certains cas de l'évolutivité d'un cancer sans avoir une valeur de certitude. **(Lamy et Grenier, 2004).**

I.4- INTRODUCTION AUX TUMEURS CEREBRALES

Les tumeurs cérébrales résultent de la multiplication anarchique d'un amas cellulaire formant une masse. Cette masse augmente de volume et conduit à la compression et l'endommagement des autres cellules cérébrales intervenant dans les fonctions cérébrales. La tumeur pousse les tissus cérébraux autour créant ainsi une hypertension en se pressant au crâne et envahit les tissus cérébraux sains.

Au niveau du système nerveux central (SNC), les tumeurs sont dénommées en tenant compte de la cellule « d'origine ». Ainsi, les cellules astrocytaires donnent naissance aux astrocytomes, les oligodendrocytes aux oligodendrogliomes, les cellules épendymaires aux épendymomes, les cellules des nerfs périphériques aux neurinomes. Le terme de gliome regroupe d'une façon générale l'ensemble des tumeurs issues des cellules gliales. **(Cook et Freedman, 2012)**

I.4.1- ASPECT EPIDEMIOLOGIQUE DES TUMEURS CEREBRALES

I.4.1.1- L'INCIDENCE DES TUMEURS CEREBRALES

L'incidence des tumeurs cérébrales primitives est difficile à estimer précisément car les séries de la littérature sont très hétérogènes (autour de 10 à 20 pour 100 000 personnes par an) **(Adam and Mokhtari, 2011)**. Chez l'enfant, les tumeurs du SNC sont les tumeurs les plus fréquentes et représentent 20 % des cancers pédiatriques, juste après les leucémies (30 % des cancers). Chez l'adulte, les tumeurs cérébrales primitives sont relativement plus rares mais leur incidence augmente avec l'âge (pic entre 65 et 74 ans).

I.4.1.2- FACTEURS DE RISQUE DES TUMEURS DU SYSTEME NERVEUX

Il existe de nombreux facteurs de risques suspectés dans l'étiologie des tumeurs du système nerveux central. D'une manière générale, il ressort de ces synthèses que malgré de nombreuses études, les limites méthodologiques rendent souvent difficiles les conclusions. En effet, les auteurs constatent souvent des limites concernant la taille des échantillons, les schémas d'études, les sources d'information, la définition des tumeurs ou encore les mesures

des expositions. Notamment, les comparaisons des résultats sont souvent délicates du fait de classifications différentes pour les types histologiques. Le plus souvent, seuls les gliomes ont été étudiés, et plus rarement les méningiomes.

En ce qui concerne les Gliomes, deux facteurs de risque sont établis : l'exposition aux radiations ionisantes à haute dose (accident nucléaire, irradiation thérapeutique, expositions 42 environnementales et professionnelles) et les syndromes héréditaires avec des risques relatifs supérieurs à 3. D'autres facteurs constitutionnels sont associés à un risque accru de gliome, sur lesquels il est impossible d'agir comme le sexe masculin et l'âge avancé. Les antécédents familiaux de tumeurs cérébrales ou encore la sensibilité aux agents mutagènes sont actuellement suspectés de jouer un rôle dans la survenue de ces tumeurs, de même que certaine. Parmi les autres facteurs étudiés pour lesquels les études actuelles ne montrent pas de lien clair figurent l'exposition résidentielle aux champs électromagnétiques, le tabac, ou encore l'alcool, l'alimentation ou encore certains polymorphismes génétiques. (**Bondy et al., 2008**)

En ce qui concerne les méningiomes, les radiations à haute dose, les syndromes héréditaires, sont actuellement considérées comme des facteurs de risque établis. Par ailleurs, l'incidence accrue de ces tumeurs chez les femmes, notamment après la ménopause a conduit à une forte suspicion concernant le rôle des hormones, qu'elles soient endogènes ou exogènes (**Cowppli-Bonyet al., 2011**). Les antécédents familiaux de méningiome sont un facteur de risque probable, alors que les allergies ne semblent pas jouer de rôle Les traumatismes crâniens ont longtemps été suspectés d'avoir un lien avec les tumeurs cérébrales, cependant, la plupart des résultats suggèrent qu'il s'agirait plus d'un symptôme amenant au diagnostic que d'une cause, il en est de même pour l'épilepsie et les convulsions. Enfin, d'autres facteurs environnementaux comme les pesticides sont également suspectés en raison d'une élévation de risque de tumeur cérébrale mise en évidence de manière convergente dans les études en population agricole.

I.4.2- ORIGINE ET PROGRESSION TUMORALE

I.4.2.1- CELLULES SOUCHES CANCEREUSE DES TUMEURS CEREBRALES

À l'instar des leucémies et du cancer du sein, l'existence d'une cellule souche cancéreuse du cerveau a été documentée par l'injection de cellules CD133+ dans des souris

immunodéprimées à l'origine de différents types de cancer du cerveau par SINGH et al. (2003) ils ont pu identifier la cellule à l'origine de différentes tumeurs primitives du cerveau chez l'enfant. Cette cellule, très rare, présente les propriétés de prolifération, d'auto-renouvellement et de différenciation des cellules souches. Purifiée grâce au marqueur de surface CD133 et nommée « cellule souche cancéreuse du cerveau » de par ses propriétés intrinsèques, elle est mise en évidence dans différents types de tumeurs du système nerveux (médulloblastome, astrocytome juvénile pilocytique, astrocytome, gangliogliome, épendymome). Les cellules souches cancéreuses à l'origine de cancer du cerveau sont très faciles à isoler car elles ont des caractéristiques de croissance similaire à celles de cellules souches neurales : elles prolifèrent en culture comme un agrégat cellulaire non adhérent. (Singh *et al.*, 2003).

I.4.2.2-PROGRESSION DES TUMEURS DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL

Les gliomes situés dans le cortex envahissent la membrane arachnoïde et de là les cellules peuvent entrer dans le tissu cérébral et donner lieu à de multiples tumeurs secondaires qui se forment au contact de la dure-mère à laquelle elles adhèrent. Les gliomes peuvent aussi infiltrer et remplacer l'épendyme, provoquant le blocage du flux de liquide céphalo-rachidien(LCR). Des cellules cancéreuses peuvent alors être libérées dans le LCR. De là, elles forment des métastases dans le système ventriculaire, l'espace sous arachnoïdien ou les méninges. L'entrée des cellules de gliomes dans la circulation sanguines est exceptionnelle, et l'absence de système lymphatique au niveau cérébral fait que les métastases de ces cancers se retrouvent exceptionnellement hors du système nerveux central. (Andrieu, 1995).

I.4.3- CRITERES D'IDENTIFICATION ET CLASSIFICATION DES TUMEURS CEREBRALES

Les tumeurs du système nerveux sont généralement divisées selon leur localisation : système nerveux central (SNC) et périphérique (SNP), tumeurs intra- et extra-crâniennes (Figure 1), tumeurs intra- ou extra-rachidiennes ou selon leur origine tissulaire : tumeurs primaires

(primitives) et secondaires (métastases). Cependant, face à la complexité, la diversité et l'hétérogénéité des tumeurs du système nerveux, ces critères d'identification sont insuffisants pour donner une image claire et objective de toutes leurs caractéristiques. Historiquement, à défaut d'informations biologiques précises (moléculaires, cytogénétiques,...).

I.4.3.1- ASPECTS HISTOLOGIQUES DES TUMEURS PRIMITIVES DU SYSTEME NERVEUX

Chez les vertébrés, les tumeurs du SNC sont des néoplasies dérivées de cellules d'origine neuroectodermique. Ces tumeurs concernent donc soit les astrocytes soit les oligodendrocytes. On désigne fréquemment sous le terme général de gliomes: les astrocytomes, les oligodendrogliomes et les tumeurs mixtes (les oligo-astrocytomes). Les gliomes sont les tumeurs primitives du SNC les plus fréquentes chez l'adulte. Les tumeurs embryonnaires incluent également les médulloblastomes, les ganglioneuroblastomes et les neuroblastomes, tumeurs solides périphériques les plus fréquentes chez l'enfant (Figure 5).

Quant aux tumeurs du SNP, il's agit le plus souvent des tumeurs bénignes essentiellement représentées par les schwannomes et les neurofibromes et des tumeurs malignes regroupées sous le terme général de « tumeurs malignes de la gaine des nerfs périphériques » (malignant peripheral nerve sheath tumor, MPNST). La reconnaissance et la classification de ces tumeurs sont fondées sur l'identification du type cellulaire prédominant, reconnu au cours de l'examen d'histopathologie. (Bencokova, 2009).

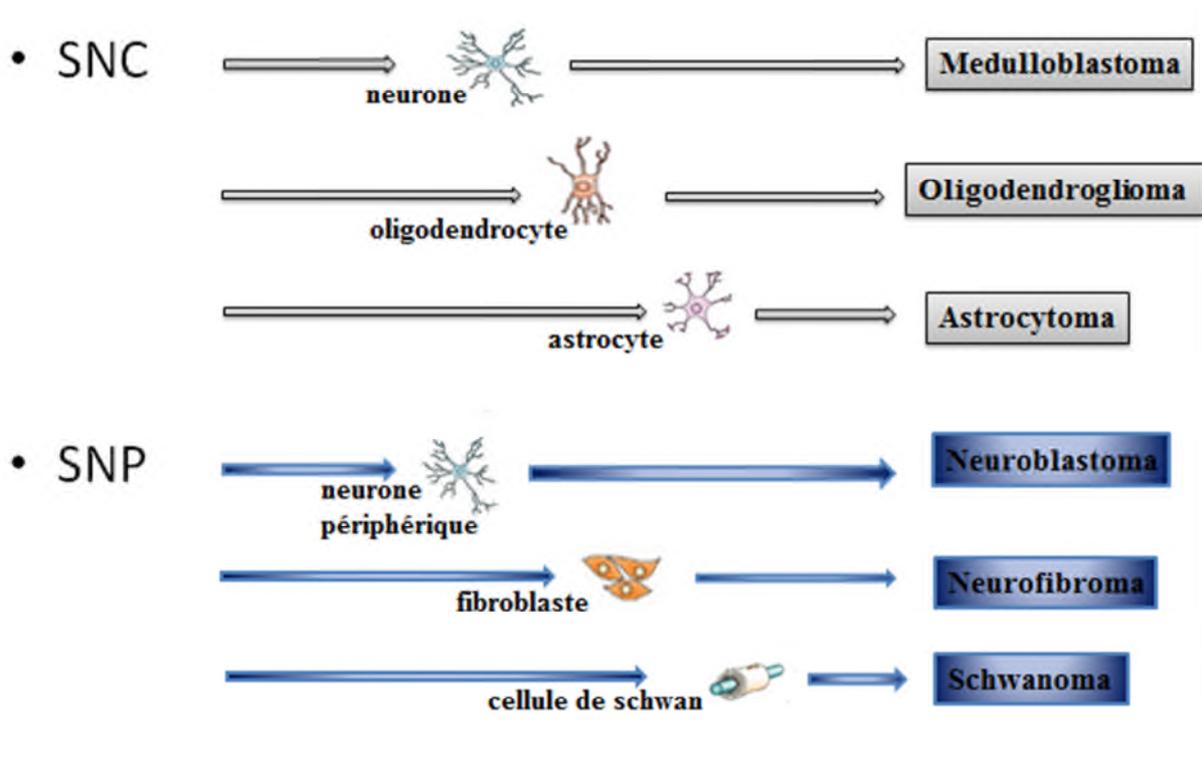


Figure 5 : Schéma du développement des cellules d'origine neuroectodermiques (neurones et cellules gliales).et classification des tumeurs du système nerveux central(A) et périphérique (B) (Zhu and Parada 2002).

I.4.3.2- CLASSIFICATION DES GLIOMES SELON L'OMS

En 1926, Bailey et Cushing proposent pour la première fois un modèle de classification des gliomes basé sur la morphologie histologique des cellules tumorales et sur la théorie des restes embryonnaires (**Bailey et Cushing, 1927**). Selon ces auteurs, les gliomes seraient issus de cellules embryonnaires arrêtées à différents stades de l'embryogenèse. En 1949, Kernohan et al. Suggèrent que les tumeurs gliales se développent à partir de cellules adultes spécialisées, capables de se différencier. Ils ajoutent la notion de classification en grade (ou stadification) en fonction de la malignité des lésions (**Kernohan, 1949**). L'OMS adopte en 1979 un consensus issu de ces deux classifications via un groupe d'experts neuropathologistes pour créer la première classification officielle basée essentiellement sur la localisation tumorale, l'histo-morphologie et le grade de la tumeur (**Zülch, 1979**). Près de quinze ans sont nécessaires avant la première révision de cette classification menée par Paul Kleihues en 1993

(Kleihues, 1993). L'édition de 2000 incorpore les premières données moléculaires en tant que marqueurs pronostiques ou prédictifs associées aux gliomes. La quatrième version de la classification de l'OMS date de 2007 (Kros, 2011) et représente le standard international actuel. Elle distingue plusieurs catégories de tumeurs gliales :

- les épendymomes provenant de cellules épendymaires et se développant à partir des parois des ventricules.
- les oligodendrogliomes aux caractéristiques oligodendrogiales,
- les astrocytomes composés de cellules à parenté astrocytaire,
- les oligoastrocytomes, tumeurs mixtes oligo-astrocytaires.

Parmi ces catégories tumorales, une stadification est effectuée en fonction de l'analyse de critères morphologiques dont le degré de différenciation, la densité cellulaire, l'atypie nucléaire, l'activité mitotique, le caractère nécrotique et la prolifération des micro-vaisseaux. Ces différents critères permettent d'obtenir quatre grades (Tableau 1), définis comme suit :

- **le grade I** : tumeurs bénignes à croissance lente et généralement bien circonscrites.
- **le grade II** : tumeurs pré-malignes, à croissance lente mais à limites imprécises.
- **le grade III** : tumeurs malignes composées de cellules anaplasiques, à croissance modérée.
- **le grade IV** : tumeurs hautement malignes, contenant divers types cellulaires se multipliant rapidement et ayant une forte propension à la nécrose. Les contours tumoraux sont mal définis et angiogéniques.

Grade I
Astrocytome à cellules géantes sous-épendymaire
Astrocytome pilocytique
Gliome angiocentrique
Grade II
Astrocytome pilocytique, variante pilomyxoïde
Astrocytome diffus (variantes fibrillaire, protoplasmique, gémistocytique)
Xanthoastrocytome pléiomorphe
Oligodendrogliome ou O II
Oligoastrocytome ou OA II
Grade III
Astrocytome anaplasique ou A III
Oligodendrogliome anaplasique ou O III
Oligoastrocytome anaplasique ou OA III
Grade IV
Glioblastome à composante oligodendrogliale
Glioblastome à petites cellules
Glioblastome à cellules géantes
Gliosarcome

Figure 6 : Principaux types de gliomes au sein de chaque grade selon la classification de l’OMS 2007 (Louis et al., 2007).

I.4.3.3–PHYSIOPATHOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

Plusieurs études ont été menées ces dernières années pour mieux comprendre les altérations génétiques et voies moléculaires impliquées dans l’oncogenèse des gliomes et des méningiomes.

A. Glioblastomes :

L’altération génétique la plus courante dans les glioblastomes, qu’ils soient primaires ou secondaires, est une perte d’hétérozygotie du chromosome 10q. (Ohgaki et Kleihues, 2007) Dans les glioblastomes primaires, on peut observer une activation de la voie de signalisation PI3K/AKT due principalement à une surexpression de l’EGFR (40% des

glioblastomes primaires) ou à une inactivation de PTEN (25% des glioblastomes primaires). En effet, l'EGFR devient actif après fixation des facteurs de croissance et recrute PI3K à la membrane cellulaire une fois activé. Cette protéine PI3K a pour rôle de phosphoryler PIP2 en PIP3 qui active des molécules effectrices telles qu'AKT ou mTOR ; cette voie de phosphorylation étant inhibée par la protéine PTEN. AKT inhibe l'apoptose et favorise la prolifération cellulaire, son activation suite à une augmentation de l'EGFR et/ou une inactivation de PTEN entraîne donc par la suite une augmentation de la prolifération et de la survie cellulaire. La voie de signalisation PI3K/AKT est présentée sur la figure. (Mellinghoff, 2005).

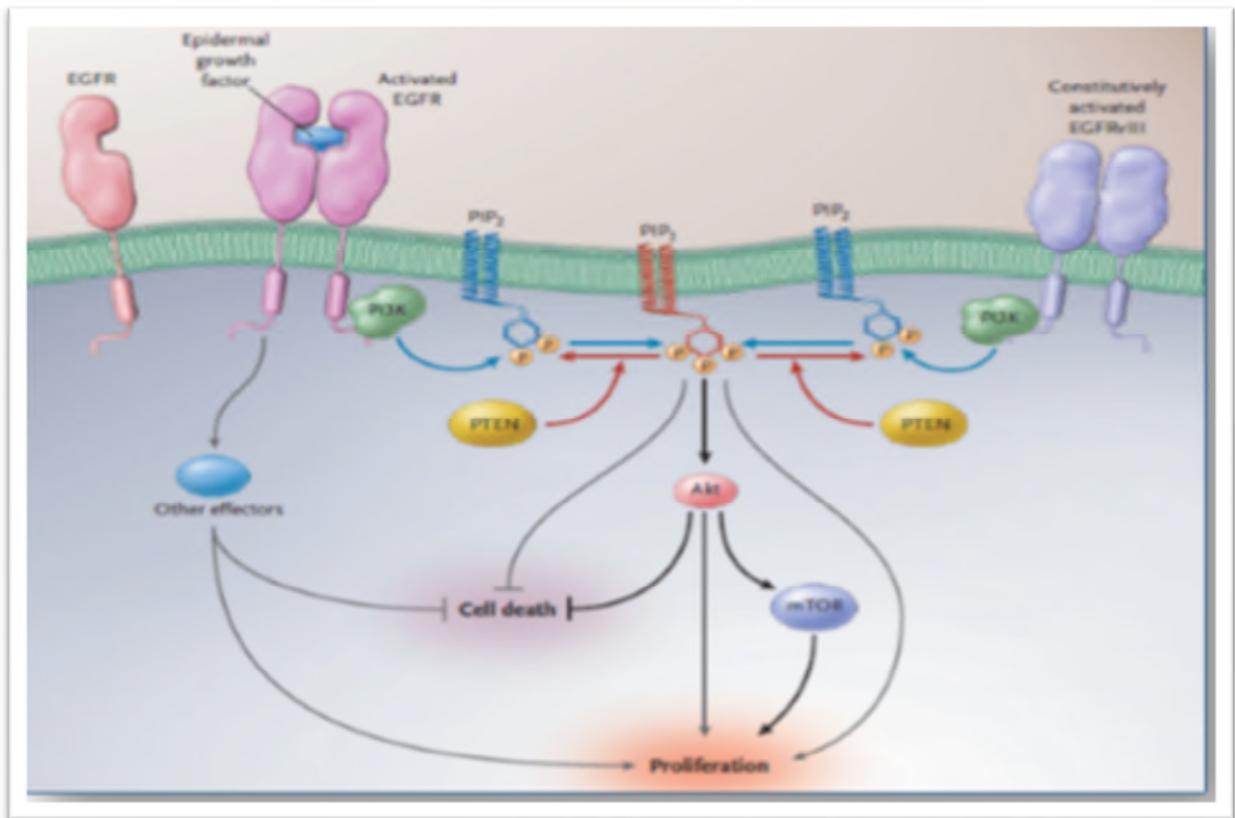


Figure7 : Voie de signalisation PI3K/AKT (Mellinghoff, 2005).

Une fois l'EGF (Epidermal growth factor) fixé au récepteur EGFR, l'enzyme PI3K est recrutée à la membrane cellulaire pour convertir PIP2 en PIP3. Cette molécule PIP3 entraîne ensuite l'activation d'un certain nombre d'effecteurs comme AKT et mTOR, effecteurs induisant une prolifération cellulaire et bloquant l'apoptose. PTEN, quant à elle, est l'enzyme impliquée dans la déphosphorylation de PIP3.

Une des altérations génétiques plus fréquemment observées dans les glioblastomes secondaires est une mutation du gène TP53 codant pour le suppresseur de tumeur p53 (fréquence de 65% dans les glioblastomes secondaires vs 30% dans les glioblastomes primaires). Cette protéine p53 joue un rôle dans le contrôle du cycle cellulaire puisqu'elle est capable, suite à une agression génotoxique, en activant la transcription de plusieurs gènes, de bloquer le cycle cellulaire en phase G1 mais également d'induire la mort par apoptose des cellules ou d'induire la réparation de l'ADN suivant les dégâts causés (**Vousden et Lu, 2002**). L'inactivation de p53 par mutation ponctuelle entraîne donc une perte de ce « check-point » en phase G1 et engendre des aberrations chromosomiques à l'origine de la tumorigenèse des glioblastomes. La voie de p53 peut également être inactivée par amplification de MDM2 qui entraîne la dégradation de p53. Une telle amplification est observée dans environ 10% des glioblastomes primaires ne présentant pas de mutation dans le gène TP53 (**Reifenberger et al., 1993**).

Une autre voie de signalisation, p16/RB1, est également impliquée dans la tumorigenèse des glioblastomes primaires et secondaires. Plusieurs altérations de p16 ont été mises en évidence dans les glioblastomes primaires et secondaires (**Nakamura et al., 2001a**). On retrouve également une méthylation importante du promoteur du gène RB1 dans 40% des glioblastomes secondaires et seulement 15% des glioblastomes primaires, hyperméthylation très souvent associée à une perte d'expression de la protéine RB1 (**Nakamura et al., 2001b**).

La protéine RB1 est impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire et notamment dans le contrôle de la progression de la phase G1 à la phase S. Elle est hypophosphorylée dans les cellules quiescentes et séquestre le facteur de transcription E2F. Sa phosphorylation par le complexe CyclinD1/CDK4 entraîne la libération d'E2F, libération induisant la transcription de gènes qui vont promouvoir l'avancée dans le cycle cellulaire. Cette protéine RB1 joue donc un rôle de contrôle négatif de la prolifération par sa liaison à E2F et ce rôle peut être aboli, soit par la phosphorylation de RB1 après amplification de CDK4 principalement, soit par inactivation du gène RB1 (par hyperméthylation par exemple). Le rôle de p16 est d'inhiber l'action du complexe CyclinD1/CDK4 par liaison avec CDK4 et donc d'inhiber la transition de la phase G1 à la phase S.

B. Oligodendrogliomes :

Une des altérations les plus fréquentes dans les oligodendrogliomes est la codélétion 1p et 19q (**Reifenberger et al., 1994**).codélétion très spécifique de ce type tumoral puisque retrouvé dans 75% des oligodendrogliomes et dans seulement 10% des tumeurs astrocytaires(**Smith et al.,1999**). Cette mutation n'est pas retrouvée dans les cancers affectant d'autres organes que le cerveau, ceci pouvant être expliqué par une forte pression de sélection due à des niveaux de stress oxydatifs plus importants dans le cerveau que dans les autres organes.

Deux voies de tumorigenèse principales ont été mises en évidence dans les oligodendrogliomes. La première voie est identifiée par la codélétion 1p19q entraînant le développement d'oligodendrogliomes de bas grade (grade II) alors que la deuxième voie, plutôt caractérisée par la présence des altérations génétiques isolées ou combinées telles que la perte du chromosome 10q, l'amplification de l'EGFR ou la délétion de p16/CDK4, donnerait plutôt lieu à des oligodendrogliomes infiltrants et plus agressifs (grade III). (**Ohgaki et al., 2004**)

C. Méningiomes :

Plusieurs altérations génétiques ont été décrites dans le cas du méningiome, la plus commune étant la perte d'hétérozygotie du chromosome 22), retrouvée dans près de 75% des méningiomes. (**Dumanski et al., 1990**)

D'autres altérations ont été observées telles que la perte d'hétérozygotie des chromosomes 1, 10 et 14. Il a été montré que les pertes alléliques des bras 1q, 10q et 14q sont plus fréquemment observées dans des méningiomes,. Dans le cas du chromosome 10, la perte d'hétérozygotie est associée à une augmentation du grade des tumeurs et à une baisse de la survie des patients (**Mihaila et al., 2003**). Concernant les gènes impliqués dans la pathogénicité, une étude rapporte une inactivation du gène de la neurofibromatose NF2 (localisé sur le chromosome 22) codant pour une protéine, appelée schwannomine ou merline, dans plus de 70% des méningiomes de grade II et III et une mutation de ce gène dans une partie des méningiomes bénins. Cette protéine est cytoplasmique, sous-membranaire et est localisée au niveau des jonctions adhérentes entre les cellules (**Bretscher et al., 2002**). Ces jonctions permettent la rigidité des tissus mais sont également nécessaires à l'inhibition de croissance par contact puisque ce contact permet aux cellules de stopper leur prolifération.

Cette protéine a donc un rôle de régulation de la croissance cellulaire et son inactivation favoriserait le développement et la progression tumorale (McClatchey *et al.*, 1998).

Plusieurs protéines ont été décrites comme étant des protéines intervenant dans les mécanismes de l'adhérence et de l'invasivité. Parmi elles, on retrouve plusieurs protéines de la matrice extracellulaire dont deux cathepsines, les métalloprotéases, SPARC (Secreted protein, acidic, cysteine-rich) et THBS1 (thrombospondin 1). Les cathepsines B et L, protéases de la matrice extracellulaire, sont retrouvées avec des fréquences variables dans les méningiomes atypiques et sont présentes dans 53% des méningiomes ayant une invasivité osseuse (Strojnik *et al.*, 2001). La métalloprotéase MMP9 également protéase de la matrice extracellulaire, est impliquée dans l'invasivité corticale des méningiomes.

La protéine SPARC serait un marqueur approprié de l'invasivité des méningiomes puisque une étude a montré que cette protéine n'était pas exprimée dans 9 méningiomes non invasifs mais l'était fortement dans 20 tumeurs invasives (Rempel *et al.*, 1999). Enfin, la thrombospondine 1 (THBS1) serait un marqueur plus spécifique de l'invasivité osseuse des méningiomes puisqu'il a été montré *in vitro* que cette protéine est fortement sécrétée par les cellules provenant de méningiomes avec une invasivité osseuse (Elodie, 2012). Ces deux dernières protéines appartiennent à la famille des protéines dites « matricellular proteins » qui sont des modulateurs des interactions entre la cellule et la matrice extra-cellulaire, mécanismes qui contrôlent l'adhérence, la motilité et l'invasivité (Sage et Bornstein, 1991).

I.4.3.4- VOIES DE SIGNALISATION ALTEREES DANS LE GLIOBLASTOME

Les grands projets de caractérisation pangénomique tels que celui de TCGA « The Cancer Genome Atlas » ont permis depuis 2008, d'identifier les principales voies cellulaires altérées dans les glioblastomes.

Trois voies de signalisation principales sont altérées dans plus de 80% des glioblastomes par l'un ou l'autre des mécanismes d'altérations suivants :

- ❖ **La voie oncogénique des RTK/RAS/PI3K :** De façon générale, les voies de signalisation débutent par la liaison d'un ligand (facteur de croissance ou cytokine) à son récepteur spécifique.

Cet événement conduit à une transduction du signal et à l'activation de diverses cascades de signalisation telle que les voies RAS/RAF/MEK/ERK et PI3K/PTEN/AKT/mTOR.

❖ **Les RTK (récepteur à activité tyrosine kinase) :**

De façon globale, plus de 60% des glioblastomes de l'adulte présentent une altération génomique d'au moins un RTK, principalement l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor). L'EGFR est le récepteur transmembranaire du facteur de croissance EGF, et possède donc dans sa partie cytosolique un domaine à activité tyrosine kinase activé lors de la fixation de son ligand, permettant la dimérisation du récepteur et la transduction intracellulaire du signal. (Paugh *et al.*, 2013).

❖ **La voie PI3K/PTEN/AKT/mTOR :**

Cette voie est essentielle à la survie et la croissance cellulaire et est altérée dans de nombreux cancers. L'activation du domaine tyrosine kinase des RTKs recrute et active à la membrane cellulaire, la phosphatidyl inositol-3 kinase qui active à son tour les la kinase AKT. La kinase AKT phosphoryle de très nombreux substrats comme les facteurs de transcription FOXO/ CREB, les acteurs du cycle cellulaires E2F et p21, les facteurs pro-apoptotique BAD et BIM. (McCubrey *et al.*, 2012)

❖ **La voie RAS/RAF/MEK/ERK :**

La voie RAS/RAF et sa cascade de kinases MEK et ERK sont également importantes pour la prolifération et la survie mais aussi l'adhésion et la motilité cellulaire ainsi que l'induction de signaux pro-angiogéniques. L'activation du domaine tyrosine kinase des RTKs entraîne l'activation de la GTPase RAS, ancrée à la face interne de la membrane cytoplasmique qui à son tour permet l'activation de la sérine/thréonine kinase RAF. (McCubrey *et al.*, 2007)

❖ **Dérégulation du cycle cellulaire et de la voie p53 :**

Des dérégulations du cycle cellulaire. Les deux voies principales régulant le cycle cellulaire (p16INK4A-CDK4-RB et p14ARF-MDM2-p53) sont touchées par des délétions dans près de 60% des glioblastomes, conduisant à une forte activation du cycle cellulaire (Ueki *et al.*, 1996).

CHAPITRE II

MATERIELS ET

METHODES

Ce chapitre retrace notre étude qui a porté sur 08 patients hospitalisés au service de neurochirurgie du CHU Khalil Amrane de Bejaia durant les années 2015/2016, Les 08 échantillons de tumeurs cérébrales ont été donnés par le service de neurochirurgie.

III.1- ECHANTILLONAGE

Tableau I : liste des échantillons obtenus.

N° patients	Pathologie	Sexe	Age
N°(216)	Gliome	male	22ans
N°(217)	Méningiome	femelle	47ans
N°(219)	Méningiome	male	56ans
N°(255)	Glioblastome	male	47ans
N°(234)	Astrocytome	femelle	34ans
N°(8)	Glioblastome	femelle	56ans
N°(9)	Glioblastome	male	25ans
N°(351)	Méningiome	femelle	54ans

III.2- PREPARATION DES ECHANTILLONS

Après la collecte des échantillons, les tissus tumoraux ont été maintenus dans du formol, et par la suite rincés dans du PBS pour plus de 4heures afin de retirer toute trace du fixateur pour éviter l'interférence avec le réactif de Bradford et risqué de fausser les résultats du dosage protéique. Puis dans du PBS-EDTA pendant 20 minutes dans le but de séparer l'amas de cellules.

Tableau II : protocole de préparation du tampon phosphate salin(PBS).

Solution PBS (pH=7.4)	Vf=1L
NaCl	8gr
KCl	2gr

Na ₂ HPO ₄	1.44gr
KH ₂ PO ₄	0.25gr
Hcl	Quelques gouttes
dH ₂ O	Compléter pour 1L

Tableau III : *protocole de préparation de la solution PBS_EDTA.*

Solution PBS_EDTA	Vf=500ml
PBS	500ml
EDTA	0.5gr

Dissociation mécanique : Le fragment tumoral est extrait du tube et déposé dans une petite boîte de Pétri stérile et on procède finalement à la dissociation mécanique par une pince et scalpel stériles, pour obtenir des fragments plus petits fragments.



Figure 8 : *tissu tumoral prêt pour la fragmentation.*

- Transférer dans un tube et Récupérer le surnageant (protéines solubilisés) après centrifugation.
- Séparer les surnageant du culot tumoral dans du PBS.
- Et rajouter du 500µl de PBS au culot et le garder pour utilisation ultérieur.

III.3- DISSOCIATION OU LYSE CELLULAIRE ET SONICATION DU CULOT TUMORAL :

_ Ajouter 500µl de tampon de lyse, pour tous les échantillons tissulaires sur de la glace pendant 30min.

_ Centrifuger à 6000 rpm.5 min à 4°C.

_ Passer les échantillons à la sonication pendant 2min (10seconde sonication/10seconde repos) et les garder dans la glace pendant tout cela.

_ Centrifugation à 4°C pendant 30min à 6000 rpm.

_ Récupérer le surnageant qui correspond au cytosol tumoral.

Solution de lyse cellulaire :

Tableau VI : *protocole de préparation du tampon de lyse.*

Nacl	150mM
Triton X-100	1.0%
Tris pH 8.0	50mM



Figure 9 : *échantillons retirées après centrifugation.*

III.4- METHODES D'ANALYSES

III.4.1-METHODES QUANTITATIVES

III.4.1.1- DOSAGE DES PROTEINES PAR LA METHODE DE BRADFORD

Les protéines sont dosées d'après la méthode de Bradford (**Bradford, 1976**). Cette méthode est basée sur un dosage colorimétrique détectant le changement de couleur du bleu de Coomassie à 595 nm, après complexation avec les acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans la solution. Le changement d'absorbance est proportionnel à la quantité de colorant lié, et donc à la concentration en protéines dans l'échantillon.

Tableau V : *Série des dilutions de la BSA (chaque dilution est préparée à base de la solution précédente).*

Dilution (mg)	2mg	1mg	0.5mg	0.2mg	0.1mg
BSA (µl)	1000	500	500	400	500

dH ₂ O (μl)	/	500	500	600	500
------------------------	---	-----	-----	-----	-----

Tableau VI : préparation du réactif de Bradford.

Réactif de Bradford	Vf=1L
Bleue de coomassie G250	100mg
Ethanol 95%	50ml
H ₃ PO ₄ 85%	100ml
QSP dH ₂ O	1L

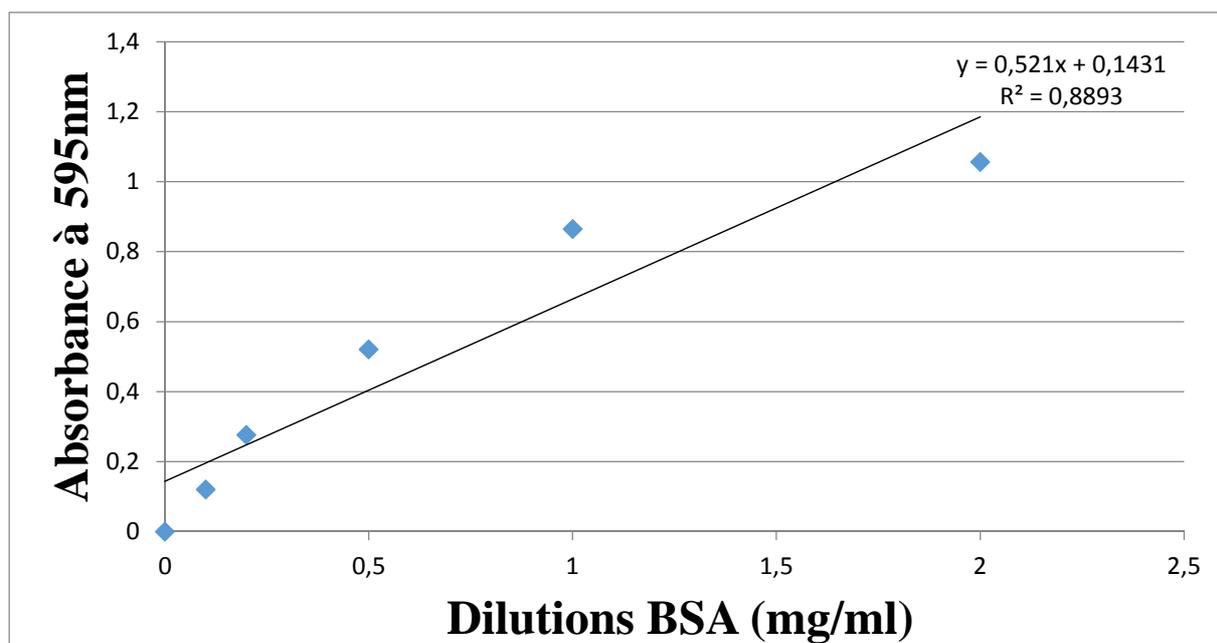


Figure 10 : courbe d'étalonnage.

Une courbe étalon est réalisée avec une série de dilutions de Sérum Albumine Bovine (BSA) 2mg/ml, en mettant 83μl de BSA en présence de 2.5 ml de réactif de Bradford. Le réactif est ensuite soumis à un balayage afin de pouvoir déterminer la longueur d'onde de travail.

Le dosage des protéines tumorales consiste à ajouter à 83μl d'échantillons à 2.5 ml de réactif de Bradford. Après homogénéisation le mélange est incubé pendant 30 min à l'obscurité, et la

lecture des absorbances est ensuite mesurée avec un spectrophotomètre à la longueur d'onde obtenue qui est de 595nm.

III.4.2- CARACTERISATION DES PROTEINES

III.4.2.1- DETERMINATION DE LA NATURE PROTEIQUE PAR SDS- PAGE

L'électrophorèse 1D ou SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) consiste à séparer les protéines selon leurs poids moléculaires, par migration de celles-ci sous l'effet d'un champ électrique dans un gel de polyacrylamide (**Laemmli, 1970**). La SDS-PAGE s'effectue en conditions dénaturantes, par utilisation d'un tampon TrisGlycine contenant du SDS (tampon de migration ou tampon de Laemmli). Le SDS ($\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{10}\text{-CH}_2\text{-O-SO}_3\text{- Na}^+$) est un détergent anionique qui se fixe sur les protéines, masquant leurs charges propres, et transformant donc les protéines en complexes anioniques. Ainsi, les protéines ont toutes le même rapport charge sur masse, et ne sont plus séparées en fonction de charges électriques uniformes. De plus, ces charges étant négatives, les protéines vont migrer selon leurs poids moléculaires, de la cathode (haut du gel) vers l'anode (bas du gel). Le SDS rompt aussi les liaisons hydrogènes, bloque les interactions hydrophobes, déplie partiellement les protéines et les stabilise sous une forme déroulée. La migration des protéines au cours de la SDS-PAGE s'effectue à l'intérieur d'un gel de polyacrylamide contenant du SDS. Le polyacrylamide est un ensemble de macromolécules poreuses, résultant de la copolymérisation de 2 monomères : l'acrylamide ($\text{CH}_2=\text{CH-CONH}_2$) et le N,N'- méthylène-bisacrylamide ($\text{CH}_2=\text{CH-CO-NH-CH}_2\text{-NH-CO-CH}=\text{CH}_2$) qui assure le pontage entre les chaînes d'acrylamide. Le gel de polyacrylamide agit comme un tamis moléculaire retenant plus ou moins les protéines en fonction de leur taille et de celle des pores. La distance de migration du polypeptide-SDS est proportionnelle au logarithme de son poids moléculaire. Par conséquent, une protéine de bas poids moléculaire migre plus loin à travers les pores du gel qu'une protéine de poids moléculaire plus élevé.

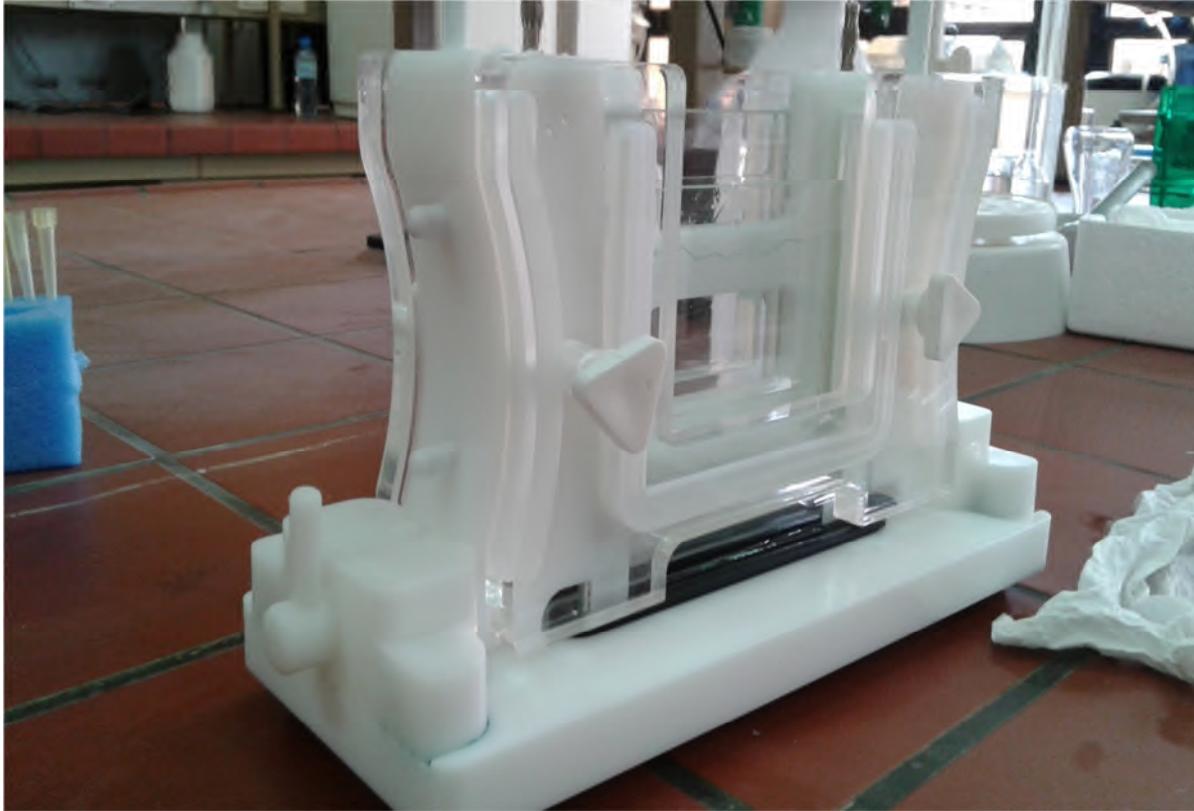


Figure 11: *cuve à électrophorèse.*

➤ **Les étapes de réalisations de l'électrophorèse SDS_PAGE :**

Dans la méthode de séparation par SDS-PAGE nous devons préparer deux types de gels : Un gel de séparation qui permet de fractionner les différentes protéines et les sous-unités protéiques selon leurs poids moléculaires et un gel de concentration permettant de retenir les impuretés et de tasser les protéines.

Avant de préparer les gels on doit procéder au montage des plaques, après les avoir nettoyées à l'éthanol. On les place l'une contre l'autre en les séparant avec deux espaceurs dont la largeur est choisie.

- ❖ Gel de séparation : Une fois tous les constituants mélangés, il est coulé entre les plaques (montées auparavant) doucement pour ne pas faire de bulles jusqu'à un niveau délimité sur la plaque pour laisser la place au gel de concentration. Ensuite, on coule une fine couche d'eau distillé pour égaliser la surface du gel et pour éviter son contact avec l'air (pour faciliter la polymérisation). Au bout de quelques minutes le gel prend, on se débarrasse de l'eau.

Tableau VII : *préparation du gel de séparation à 10% (running gel).*

Solution	Vf= 5ml
Solution Acrylamide30%	1.67ml
Solution Tris_Hcl ph 8.8	1.25ml
Solution SDS 10%	50µl
dH₂O	2ml
PSA 10%	50µl
TEMED	5µl

Remarque : la solution de persulfate d'ammonium et le TEMED sont des catalyseurs qui sont ajoutés en dernier lieux car ce sont eux qui créent la polymérisation du gel.

- ❖ **Gel de concentration :** Il est constitué de la même façon que le gel de séparation avec une seule différence au niveau du Tris HCL qui a un pH de 6.8. Le gel est coulé sur le gel de séparation, les peignes sont posés bien centrés entre les plaques et sans faire de bulles. Le gel prend après quelques minutes, les peignes sont retirés soigneusement pour ne pas casser les puits. Enfin, on verse du tampon dans les puits et on réalise les dépôts.

Tableau VIII : *préparation du gel de concentration à 10% (stacking gel).*

Solution	Vf= 2.5ml
Solution Acrylamide30%	500 µl
Solution Tris_Hcl ph 8.8	625 µl
Solution SDS 10%	25µl
dH₂O	1.25ml
PSA 10%	25µl
TEMED	2.5µl

- ❖ tampon de migration :

Tableau IX : *préparation du gel de migration.*

Solution	Vf= 290ml
Tris	7.56gr
SDS 10%	40ml
Glycine	36gr
dH₂O	250ml

Les échantillons sont mis dans un bain chauffant pendant 05minutes à 95°C, les protéines sont ainsi dénaturées, ensuite 30µl de chaque échantillon sont mis au contact de 30 µl de solution dénaturante.

Tableau X : préparation du gel de dénaturation.

Solution	Vf= 40ml
Tris_HCL pH 6.8	5ml
SDS 10%	8ml
Glycérol 50%	8ml
B-mercaptoéthanol	2ml
Bleu de bromophénol	2ml

- ❖ Les dépôts : Une fois le peigne retirée, on dépose dans les puits formés 30µl des échantillons protéiques et 30 µl de tampon de dénaturation, ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire qui est dans notre cas de la BSA 2mg/ml on branche le dispositif et on laisse migrer.
- ❖ La migration : Après le dépôt des différents échantillons ; la cuve d'électrophorèse (bac inférieur) est remplie à un niveau suffisant avec le tampon d'électrophorèse. Ensuite, le bac supérieur situé entre les deux plaques (bien serré contre les joints pour éviter les fuites) est rempli lui aussi avec le même tampon jusqu'à ce que les faces supérieures des gels soient immergées. Ensuite, ce dernier est placé dans la cuve d'électrophorèse pour que les faces inférieures des gels plongent dans le tampon. Enfin, la cuve est fermée et est reliée à un générateur qui va assurer le passage du

courant électrique. La migration est menée à une intensité constante de 150V, 30Watt, 50mA pendant 1heure.

- ❖ coloration : Après la sortie du front de migration (coloré en bleu), la migration est arrêtée. Les gels sont démoulés et récupérés dans des bacs en plastique puis recouverts avec une solution de coloration. Les gels doivent être maintenus en agitation pendant quelques heures pour éviter le dépôt du colorant. Après ils sont décolorés dans une solution de décoloration.

Tableau XI : préparation de la solution de coloration.

Solution coloration	Vf=100ml
Méthanol	45%
Acide acétique glacial	10%
Bleue de coomassie R250	0.25%
dH₂O	45%

Tableau XII : préparation de la solution de décoloration.

Solution décoloration	Vf=100ml
Méthanol	20%
Acide acétique glacial	10%
dH₂O	70%

- ❖ On procède à la visualisation des bandes et déterminer le poids moléculaire des protéines.

Chapitre III :

Résultats et

Discussions

Les protéines jouent un rôle primordial fonctionnel et structural de la cellule, la quantité de protéines est maintenue par la balance entre le taux de synthèse protéique et le taux de catabolisme ou perte. On sait aujourd'hui que ces taux peuvent subir des transformations durant des processus néoplasiques. Ainsi, notre objectif principal a été de caractériser et quantifier ces protéines, ainsi que d'étudier leur implication potentielle dans la progression tumorale. Les résultats sont présentés en deux parties :

III.1- ETUDE QUANTITATIVE DES PROTEINES DE TUMEURS CEREBRALES:

La croissance est la progression tumorale s'avère affectée par les interactions entre les protéines secrétées (secretome). De ce fait notre étude s'est basé sur l'explication des fluctuations quantitatives et qualitative des concentrations protéiques microenvironnementale et intracellulaire de différents types de tumeurs cérébrales. La compréhension de la variabilité des taux de sécrétions parmi les différents cas sur lesquels cette étude a porté et vise à détecter l'expression protéique parmi les tissus tumoraux et de nous permettre de discuter leur corrélation et des significations cliniques.

Après avoir effectué une lecture de spectrophotométrie de nos 08 échantillons de tumeurs cérébrales. On a pu quantifier et coordonner les contrastes des concentrations des protéines microenvironnementale et intracellulaire, Les résultats sont présentés comme suit :

Tableau XIII : résultats de la quantification protéique

Cas	Masse tumeur (gr)	Δ Abs surnageant	C1 mg/ml	Volume surnageant (ml)	Quantité 1 (mg)	Δ Abs cytosol	Volume cytosol (ml)	C2 mg/ml	Quantité 2 (mg)
N216	0,1	0,771	1,2	2,3	2,76	0,51	1	0,7	0,7
N217	< 0,1	0,666	1	1,9	1,9	1,171	1	1,97	1,97
N219	0,5	0,68	1,03	5	5,15	1,308	0,7	2,23	1,56
N255	0,4	0,682	1,03	5	5,15	0,593	0,8	0,86	0,68
N234	0,3	0,743	1,15	3,5	4,02	0,824	0,7	1,3	0,91
N8	0,4	/	/	/	/	0,134	1,3	0,315	0,4
N9	0,4	/	/	/	/	0,328	0,8	0,76	0,6
N351	0,1	0,028	0,067	1,6	0,1	0,328	0,9	0,76	0,68

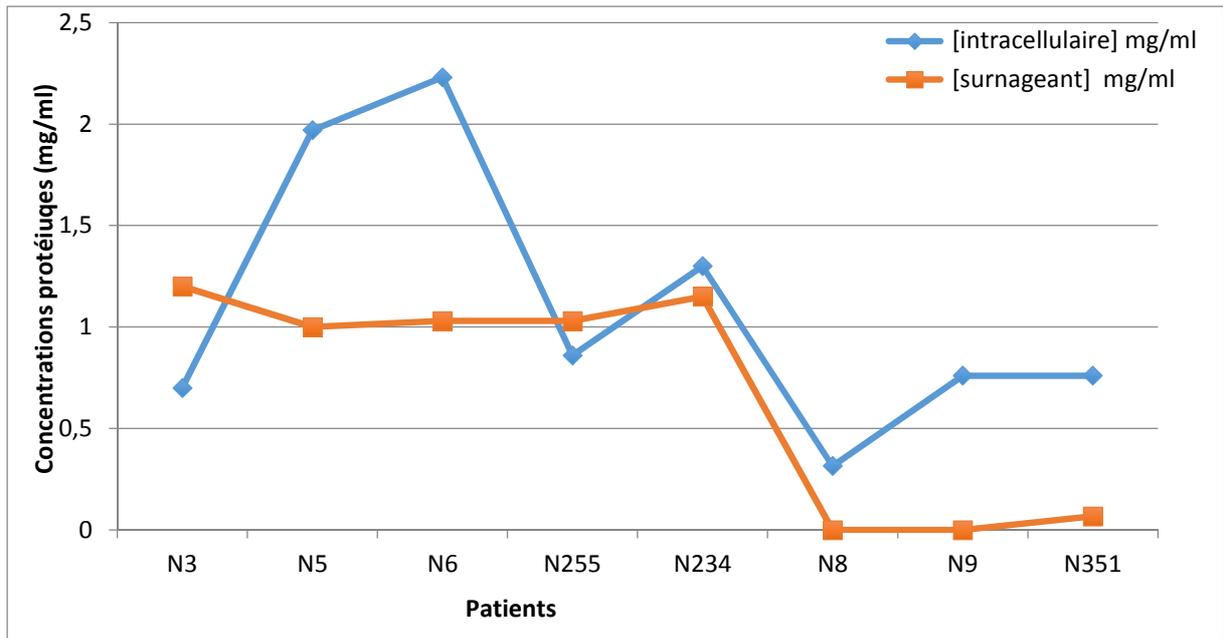


Figure 12 : variations des concentrations intracellulaire et surnageant (microenvironnement) en terme de concentrations protéiques pour chaque patient.

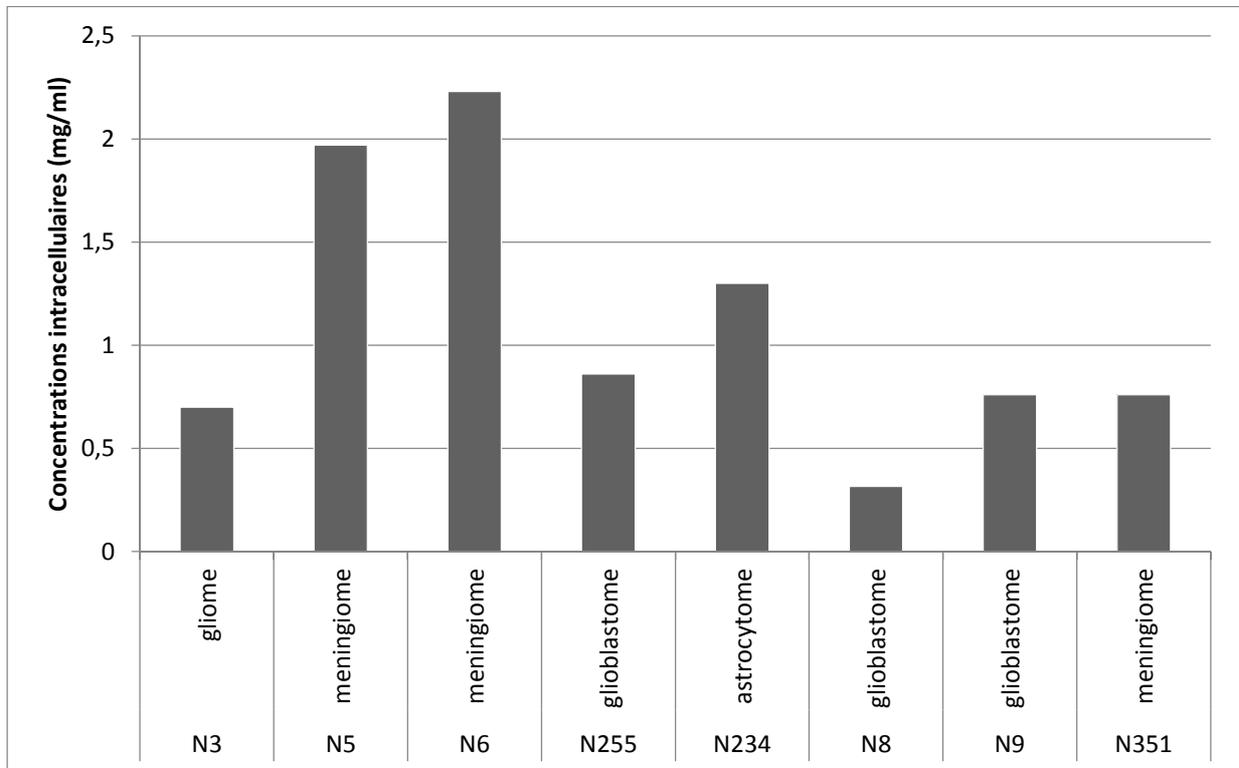


Figure 13 : concentrations des protéines intracellulaires selon le type de tumeur.

_ Les résultats obtenus indiquent qu'il y'a une différence des concentrations des protéines de l'environnement tumoral comparé aux protéines intracellulaire chez chacun des patients. Patients où on observe une hausse des protéines intracellulaire par rapport aux protéines extracellulaire dans les cas de méningiomes (**Gilman, 2006**) et de glioblastome (**Knobbe et Reifenberger, 2003**) donc, on confirme que c'est due à une abondante activité intracellulaire de la cellule et à une amplification des voies de signalisations traduit par une surexpression des molécules de signalisations, contrairement au cas de gliome et astrocytome ou ce dernier présente une légère divergence. On note également qu'il y a au sein du même type des différences des taux protéiques cela serait due à la variabilité inter-individuelle (hétérogénéité inter-patients) ainsi que l'hétérogénéité au sein des tumeurs. Ces résultats montrent aussi que l'ensemble des tumeurs influent sur leur environnement immédiat, car la production protéique permet de remodeler le microenvironnement tumoral. Toutefois, cette influence semble être dépendante du sous type histologique.

➤ Selon les masses tumorales :

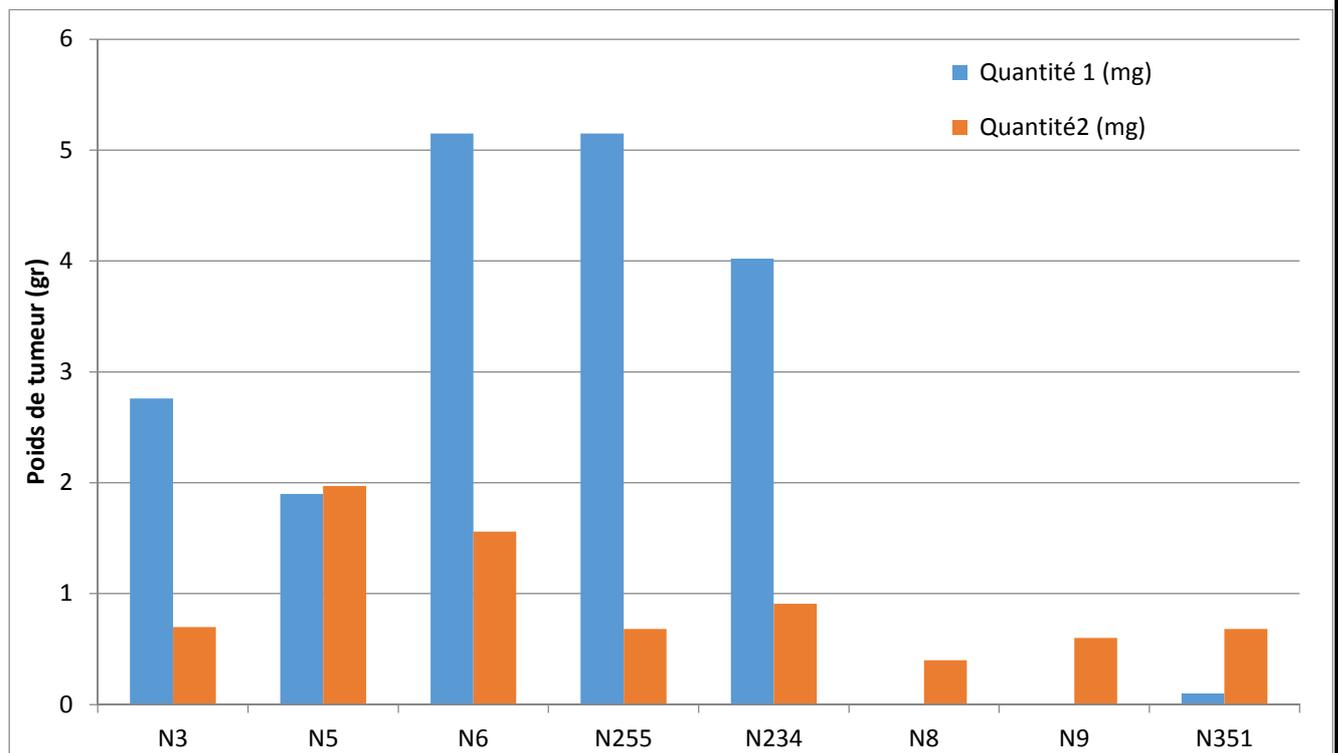


Figure 14 : quantité de protéines mesurées selon le poids de la tumeur.

_ On note que pour les cas N6 et N255 dont les poids respectives sont de 0.5gr, 0.4gr que les concentrations protéiques sont extrêmement élevées par contre on remarque des contradictions si on prend en exemple le N5 qui pèse moins de 0.1gr, mais qui exprime malgré cela des concentrations plus élevées que N8 (0.4gr) et N9 (0.4gr). On déduit qu'il n'y a pas de corrélation entre le poids de la tumeur et la quantité de protéines secrétées. Cette observation nous laisse supposer que la taille tumorale à elle seule ne peut pas être prise comme un facteur d'agressivité tumorale. Car la production protéique témoigne de l'activité intrinsèque de la tumeur.

➤ Selon le sexe:

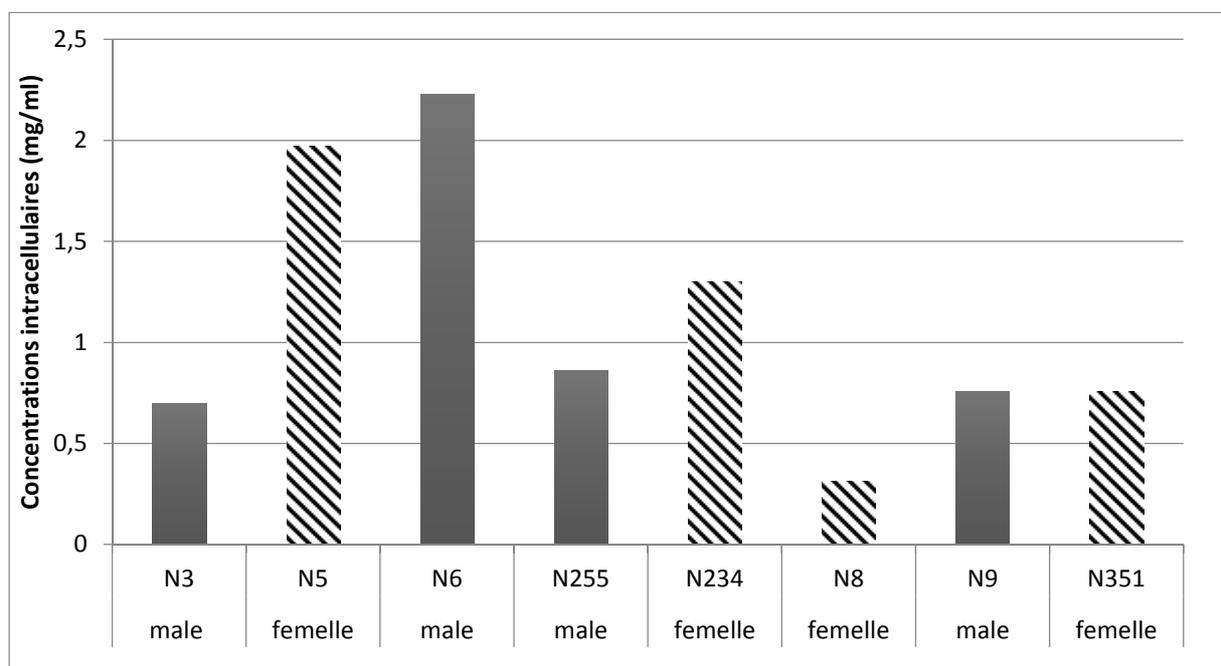


Figure 15: concentrations protéiques intracellulaire chez les deux sexes.

_ D'après les résultats on constate que la disparité des genres à pour résultats une différence des concentrations protéiques, qui s'exprime par un contraste dans les voies de signalisations moléculaires (Warrington et al., 2015).et on penserait même que ces différences inter-sexe jouerait un rôle fondamental dans la biologie tumeurs cérébrales et le processus de leur développement (Sun et al., 2015).

➤ Selon l'Age des patients :

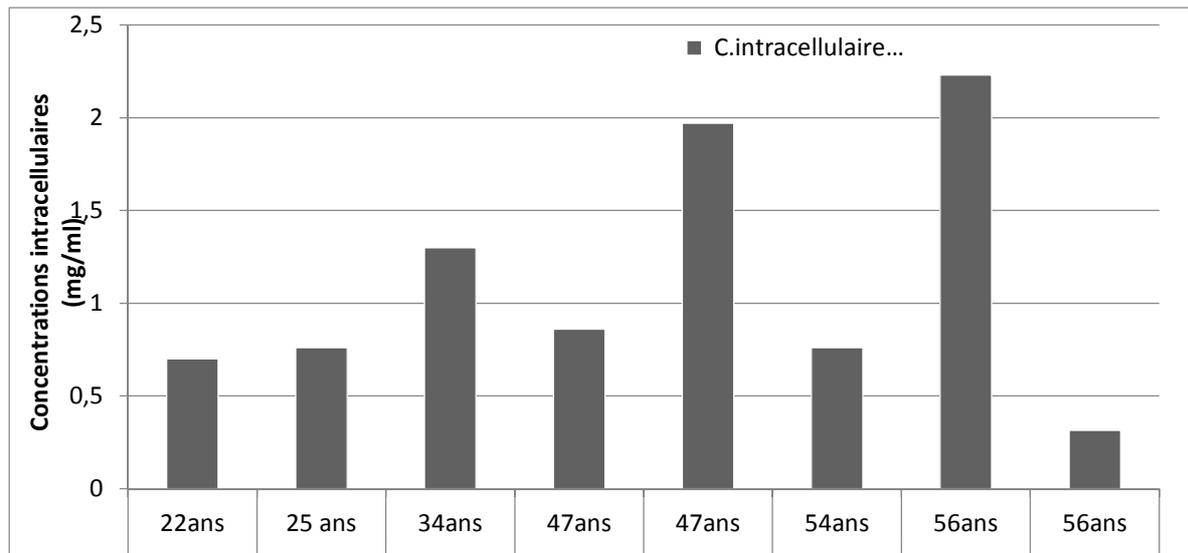


Figure 16 : concentrations des protéines intracellulaires réparties selon les âges.

_ le vieillissement est caractérisé par une perte progressive de l'instabilité génomique, et l'accumulation d'altération épigénétiques, et une sénescence cellulaire conduisant à la détérioration des communication intercellulaire et donc une diminution des molécules de signalisations (**Lopez, 2013**), par contre cela ne s'applique pas sur nos données, où l'on retrouve dans les cas N°217 et N°219 malgré l'avancée de leur âge, une concentrations très élevées des protéines intracellulaires et donc le dynamisme cellulaire est toujours présent. Ceci laisse alors supposer que les altérations génomiques observées chez les patients ayant des tumeurs cérébrales, ne sont pas due à l'âge, mais à d'autre processus, comme les polluants environnementaux.

III.2-ETUDE QUALITATIVE DES PROTEINES DE TUMEURS CEREBRALES :

Les analyses en électrophorèse s'agissent d'une série d'expérimentations permettant de détecter la présence de protéines spécifiques dans échantillon de tissu par la détermination de leur masse. Ces méthodes nous permettent l'identification de potentiels biomarqueurs.

Après la réalisation du SDS-PAGE pour le fractionnement des protéines sériques de 7 échantillons dont 3 ayant des méningiomes et 2 autres des glioblastomes et un cas de gliome et un astrocytome. *On constate que :*

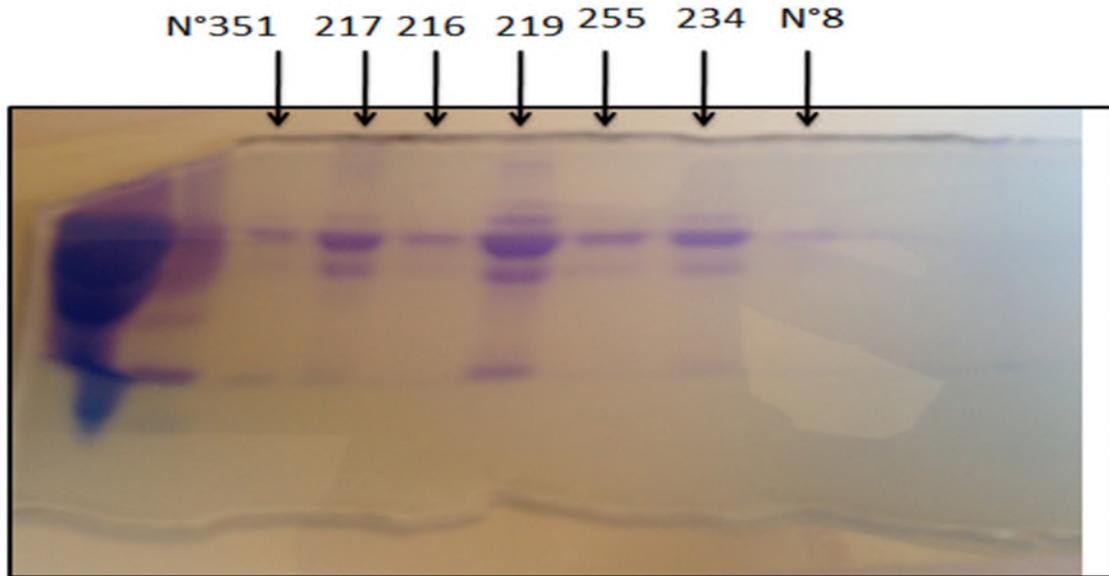


Figure 17 : Résultats électrophorèse des échantillons cytosoliques.

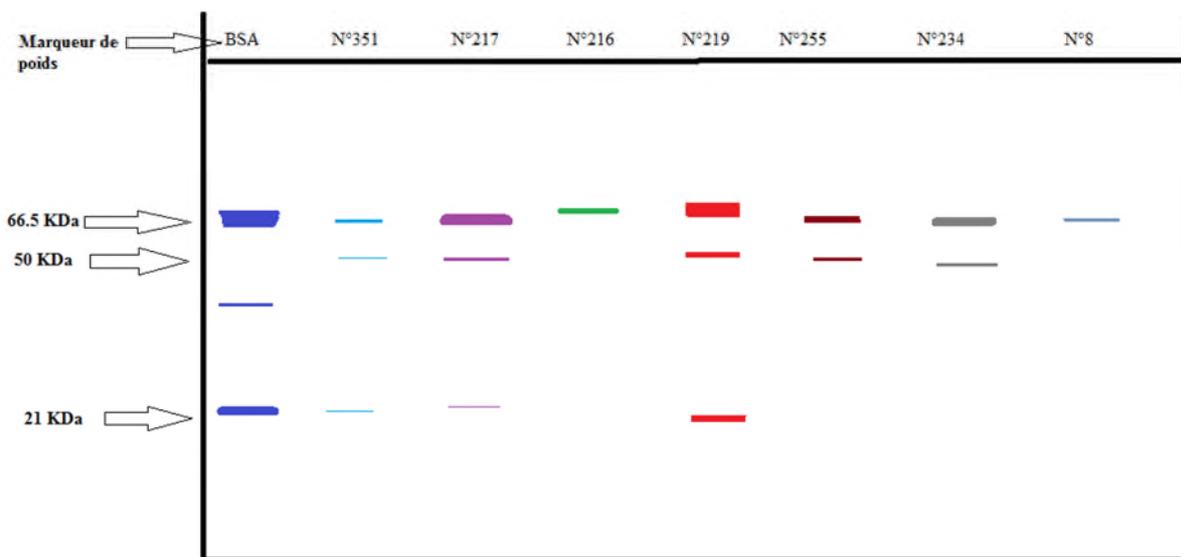


Figure 18 : Représentation des résultats d'électrophorèse des échantillons cytosoliques (microenvironnement).

➤ Pour les échantillons cytosoliques :

Les masses moléculaires apparentes observées se retrouvent aux alentours de 66.5 kDa qui correspond au poids moléculaire de la BSA (- 66.5 kDa). On peut en déduire que les protéines isolées sont inférieure au poids moléculaire 66 kDa et on suppose que les protéines

des cas N°351, N°217, N° 219, N°255, N°234 cela pourrait s'agir de la protéine GFAP présente dans les cellules gliales dont le poids moléculaires est de 50KDa.

Par contre on observe dans les 03 cas de méningiomes N°217, N°219, N°351 qu'en plus de la protéine GFAP il y'a une expression d'une autre protéine qui est la S100 (Ng et al., 2015), qui est définis comme le marqueur des lésions cérébrales par excellence, semble faire son apparition dans les méningiomes, donc il pourrait servir de biomarqueurs dans les cas de méningiomes.

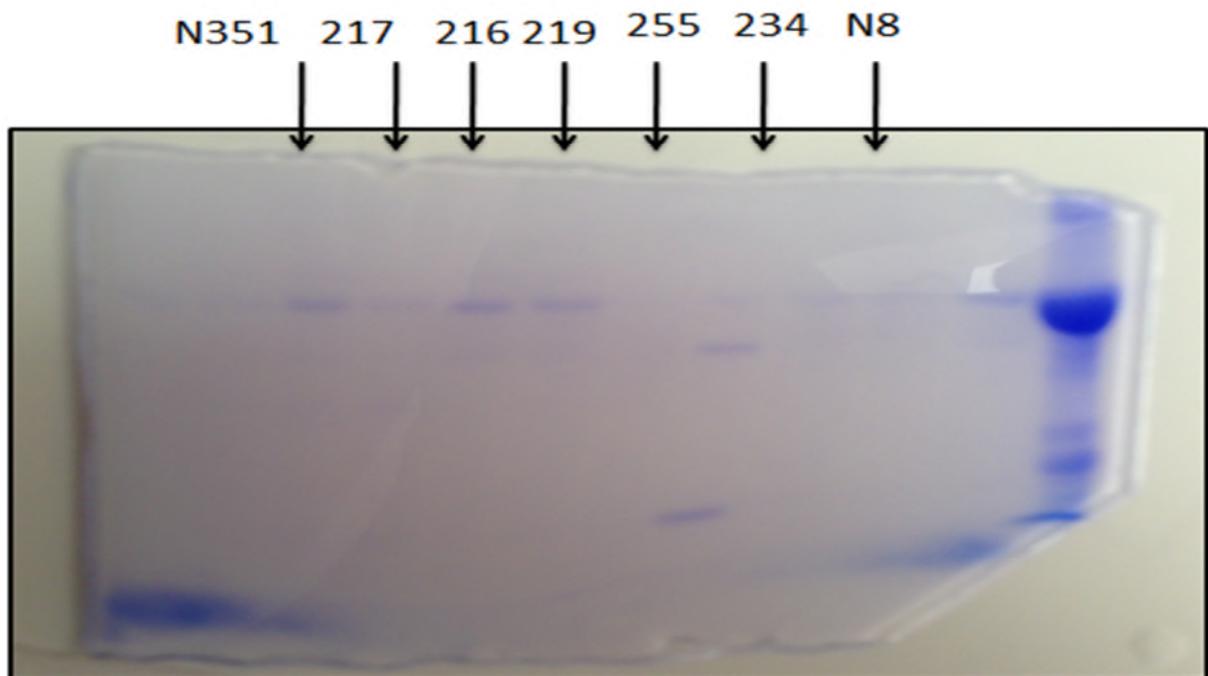


Figure 19 : *Résultats d'électrophorèse des échantillons de surnageants.*

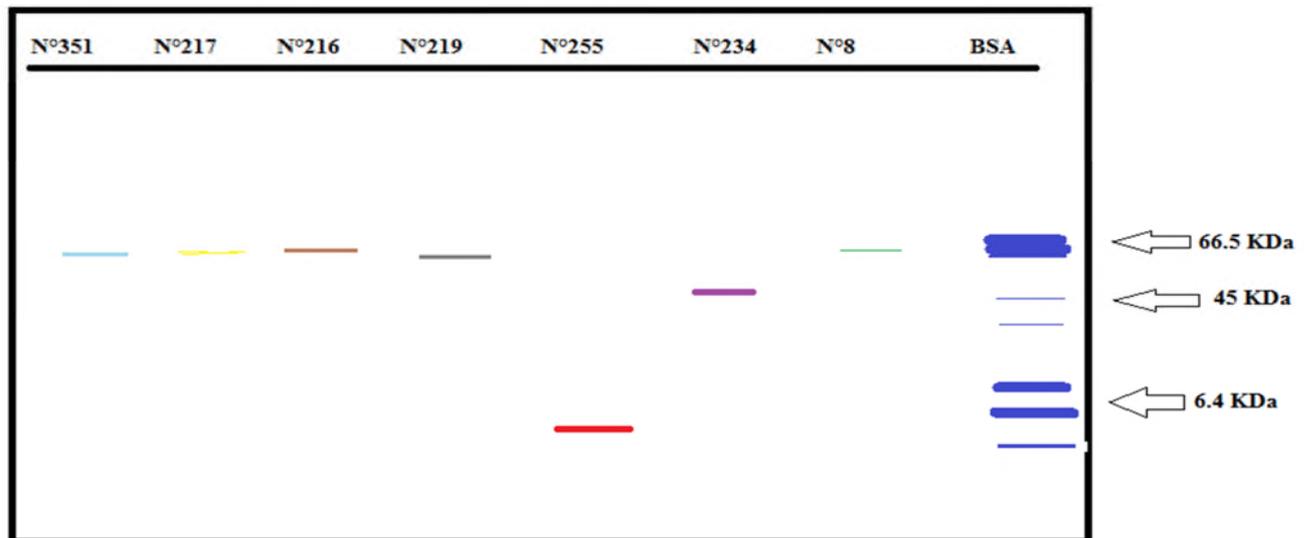


Figure 20 : Représentation des résultats d'électrophorèse des échantillons de surnageants.

➤ Pour les échantillons de surnageants :

On remarque l'apparition de bandes diffuses à 70-55 KDa pour les cas N°351, N°217, N°216, N°219, N°8,

Le N° 234 pourrait s'agir du facteur de croissance vasculaire VEGF dont le poids moléculaire est de 45 KDa cela se traduirait par un début du phénomène d'angiogenèse. Et donc la tumeur contracte une agressivité et un degré de malignité.

Par contre le cas d'astrocytome N°255 pourrait correspondre au facteur de croissance EGF dont le poids moléculaire est de 6.4 KDa donc l'astrocytome aurait acquis les caractéristiques d'invasivité.

_ Pour le premier gel ou on retrouve les échantillons des protéines intracellulaires on constate que les bandes sont plus denses, épaisses et abondantes comparés aux échantillons de protéines du surnageant sur le deuxième gel ou l'on distingue moyennement les bandes qui apparaissent avec un aspect très léger, cela pourrait nous mener à dire que les échantillons intracellulaires sont plus concentrés et riches en terme de protéine que les surnageant tumoral.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les tumeurs cérébrales sont des pathologies qui se caractérisent par une prolifération incontrôlée de cellules, et une résistance aux thérapies classiques. Malgré de nombreuses études menées à ce sujet, les tumeurs cérébrales demeurent de pronostic vital défavorable.

Les protéines présentent une hétérogénéité structurale, fonctionnelle, et de concentration, dont les variations pathologiques peuvent être détectables par des méthodes quantitatives ou qualitatives. Les taux protéiques quantifiés lors de cette étude ont permis d'illustrer l'existence de contraste au sein des patients, et nous indique que le milieu intracellulaire est doté d'un dynamisme assez important qui persiste même avec l'âge, ainsi que les variations des concentrations protéiques qui diffèrent d'un cas à l'autre, ce qui serait due aux variabilités interindividuelles et confirme donc l'hétérogénéité des tumeurs cérébrales.

Le fractionnement des protéines tumorales par électrophorèse sur gel de polyacrylamide nous a permis de distinguer des groupes protéiques hétérogènes dans la partie cytosolique des types tumoraux étudiés, ainsi que des facteurs de croissance en abondance dans le microenvironnement tumoral, on a rencontré des protéines d'activité biologique très variée qui signalerait une haute activité au sein des cellules tumorales.

Projeter ces recherches sur un plus grand nombre de patients ainsi que l'exploration d'autres méthodes d'identification des protéines tumorales plus spécifiques serait une avancée majeure dans l'élucidation des mécanismes de variations protéiques inter-individuelle ou inter-sexes et la compréhension de l'interactivité de la cellule tumorale avec son microenvironnement.

BIBLIOGRAPHIE

1. Adam, C., Mokhtari, K. (2011). Tumeurs du système nerveux central. Classification histologiques et topographiques épidémiologie. *EMC-Neurologie*, 8 :1-9.
2. Andrieu, J.M. (1991). Eléments de compréhension de quelques cancers humains. In : *Biologie des cancers*. Paris : Ellipses. P. 132.
3. Bailey, P., Cushing, H. (1927). A classification of tumors of the glioma group on a histogenetic basis with a correlation study of prognosis. *British journal of surgery*, 14(55): 554-555.
4. Bencokova, Z. (2009). *Signalisation et réparation des cassures double-brin de l'ADN dans les gliomes : Modulation de la réponse aux traitements chimio-radiothérapeutiques*. Thèse en vue de l'obtention d'un doctorat, Discipline Biotechnologie-santé et management, université grenoble, P. 2-3.
5. Bondy, M.L., Scheurer, M.E., Malmer, B., Barnholtz-Sloan, J.S., Davis, F.G., Il'yasova, D., et al. (2008). Brain tumor epidemiology: consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium. *Cancer*, 113(7): 1953-1968.
6. Bradofr, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72 : 248-254
7. Brantley, E.C., Nabors, L.B., Gillespie, G.Y., Choi, Y.-H., Palmer, C.A., Harrison, K., Roarty, K., and Benveniste, E.N. (2008). Loss of protein inhibitors of activated STAT-3 expression in glioblastoma multiforme tumors: implications for STAT-3 activation and gene expression. *Clin. Cancer Res*, 14(15) : 4694–4704.
8. Bretscher, A., Edwards, K., and Fehon, R.G. (2002). ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3:586-599.
9. Catalano, V., Gaggianesi, M., Spina, V., Iovino, F., Dieli, F., Stassi, G. et al. (2011). Colorectal Cancer Stem Cells and Cell Death. *Cancers*, 3: 1929-1946.
10. Chatfield, D.A., Zemlan, F.P., Day, D.J., Menon, D.K. (2002). Discordant temporal patterns of S100beta and cleaved tau protein elevation after head injury: a pilot study. *Br. J. Neurosurgery*, 16(5): 471-476.
11. Cook, L.J., Freedman, J. (2012). The basics about brain tumors. In: *Brain tumors*. New York: Rosen publishing. P. 6-18.
12. Cowppli-Bony, A., Bouvier, G., Rue, M., Loiseau, H., Vital, A., Lebailly, P., et al. (2011). Brain tumors and hormonal factors: review of the epidemiological literature. , 22(5): 697-714.
13. Dumanski, J.P., Rouleau, G.A., Nordenskjold, M., and Collins, V.P. (1990) . Molecular genetic analysis of chromosome 22 in 81 cases of meningioma. *Cancer Res*, 50:5863-5867.
14. Eleftherios, P., Diamandis, H.A., Fritche, H.L., Daniel, W.C., Morton, K.S. (2002). Tumor marker: Introduction and general principles. In: *Tumor markers: physiology, pathobiology, technology and clinical application*. Washington: AACC Press. P.9-18.
15. Elodie, L. (2010). *Expression et fonction des microARN dans les tumeurs du Système nerveux central*. Travail pour l'obtention de diplôme de docteur, filière biologie cellulaire, Université de Grenoble, P. 25.
16. El-Tanani, M. K. (2008). Role of osteopontin in cellular signaling and metastatic phenotype. *Front Biosci*, 13: 4276-4284.
17. Furnari, F.B., Fenton, T., Bachoo, R.M., Mukasa, A., Stommel, J.M., Stegh, A., Hahn, W.C., Ligon, K.L., Louis, D.N., Brennan, C., et al. (2007). Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev*, 21(21): 2683–2710.

18. Gehrman, J., Matsumoto, Y., and Kreutzberg, G.W. (1995). Microglia: intrinsic immuneffector cell of the brain. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 20(3) : 269–287.
19. Gilman, S. (2006). Neoplastic disease. In: *Neurobiology of disease*. London : Elsevier. P. 371-433
20. Goffinet, A.M. (1994). Organisation générale du système nerveux. In : *Anatomie clinique du système nerveux central*.belgique : presse universitaire de namur. P. 11-59.
21. Grimwade, D., Enver, T. (2004). Acute promyelocytic leukemia: where does it stem from? *Leukemia*. 18(3): 375-384.
22. Hage, F., Abouzahr, S., Meslin, F., Chouaib, F., Chouaib, S. (2008). Réponse immune et cancer. *John Libbey Eurotext*, 95(1) : 57-67.
23. Hanhan, Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1): 57-70.
24. Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2011). The hallmarks of cancer. *Cell*, 144(5): 646-669.
25. Kernohan, J.W., Mabon, R.F., Svien, H.J. and A. AW. (1949). A simplified classification of gliomas. *Proc Staff Meet Mayo Clin*, 24(3): 71-75.
26. Kim, W.Y., Kaelin, W.G. (2006). Molecular pathways in renal cell carcinoma—rationale for targeted treatment. *Semin Oncol*, 33(5): 588-595.
27. Kinzler, K. W., Vogelstein, B. (1997). "Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers." *Nature*, 386(6627): 761-763.
28. Kleihues, P., Burger, P.C., and S. BW. (1993).The new WHO classification of brain tumours. *Brain Pathology*, 3 (3): 255-68.
29. [Knobbe, C.B.](#), [Reifenberger, G.](#) (2003). Genetic alterations and aberrant expression of genes related to the phosphatidylinositol-3'-kinase/protein kinase B (Akt) signal transduction pathway in glioblastomas. *Brain Pathol*, 13(4): 507-518.
30. Kros, J.M. (2011). WHO Guidelines for Diagnosis of Glial Tumours: What Is Old and What Is New? , *European Association of NeuroOncology Magazine*, 1 (1)9-12.
31. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
32. Lamy, P.J., Grenier, J. (2004). Tomographie par émission de positons au 18-Fluorodéoxyglucose et marqueurs tumoraux. *Médecine nucléaire – imagerie fonctionnelle et métabolique*, 28(11) : 561-567.
33. Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres, J. et al. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, 367(6464): 645-648.
34. [López, C.](#), [Blasco, M.A.](#), [Partridge, L.](#), [Serrano, M.](#), [Kroemer, G.](#) (2013). The hallmarks of Aging. *Cell*, 153(6): 1194-1217.
35. Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvét, A. Scheithauer, B.W. and Kleihues, P.(2007). The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System, *Acta Neuropathol* , 114(2): 97-109.
36. McClatchey, A.I., Saotome, I., Mercer, K., Crowley, D., Gusella, J.F., Bronson, R.T., and Jacks, T. (1998). Mice heterozygous for a mutation at the Nf2 tumor suppressor locus develop a range of highly metastatic tumors. *Genes Dev*, 12:1121-1133.
37. MacLean, P. D. (1990). Specific indications for brain research, In: *The triune brain in evolution: role in paleocerebral functions*. New York: Plenum Press. P. 8-18.
38. [McCubrey, J.A.](#), [Steelman, L.S.](#), [Chappell, W.H.](#), [Abrams, S.L.](#), [Wong, E.W.](#), [Chang, F.](#), [Lehmann, B.](#), [Terrian, D.M.](#), [Milella, M.](#), et al., (2007). *Biochim Biophys Acta.*, 1773(8):1263-1284.
39. [McCubrey, J.A.](#), [Steelman, L.S.](#), [Chappell, W.H.](#), [Abrams, S.L.](#), [Montalto, G.](#), [Cervello, M.](#), [Nicoletti, F.](#), [Fagone, P.](#), et al., (2012). Mutations and deregulation of Ras/Raf/MEK/ERK

- and PI3K/PTEN/Akt/mTOR cascades which alter therapy response. *Oncotarget*, 3(9): 954-978.
40. Mellingshoff, I.K., Wang, M.Y., Vivanco, I., Haas-Kogan, D.A., Zhu, S., Dia, E.Q., Lu, K.V., Yoshimoto, K., Huang, J.H., Chute, D.J., et al. (2005) Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *N Engl J Med*, 353:2012-24.
 41. Mertelsmann, R., Engelhardt, M., Berger, D.P. (2011). Principes de l'oncologie médicale. In : *précis d'hématologie et d'oncologie*. Paris : Springer. P. 1-35.
 42. Mihaila, D., Jankowski, M., Gutierrez, J.A., Rosenblum, M.L., Newsham, I.F., Bogler, O., and Rempel, S.A. (2003). Meningiomas: loss of heterozygosity on chromosome 10 and marker-specific correlations with grade, recurrence, and survival. *Clin Cancer Res*, 9:4443-4451.
 43. Nakamura, M., Watanabe, T., Klangby, U., Asker, C., Wiman, K., Yonekawa, Y., Kleihues, P., and Ohgaki, H. (2001a). p14ARF deletion and methylation in genetic pathways to glioblastomas. *Brain Pathol*, 11:159-168.
 44. Nakamura, M., Yonekawa, Y., Kleihues, P., and Ohgaki, H. (2001b) Promoter hypermethylation of the RB1 gene in glioblastomas. *Lab Invest*, 81:77-82.
 45. Nishiyama, A., Komitova, M., Suzuki, R., and Zhu, X. (2009). Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity. *Nat. Rev. Neurosci*, 10(1) : 9–22.
 46. [Ng, J.](#), [Celebre, A.](#), [Munoz, D.G.](#), [Keith, J.L.](#), [Karamchandani, J.R.](#) (2015). Sox10 is superior to S100 in the diagnosis of meningioma. [Appl Immunohistochem Mol Morphol](#). 23(3):215-219.
 47. Ohgaki, H., P. Dessen, B. Jourde, S. Horstmann, T. Nishikawa, P.L. Di Patre, C. Burkhard, D. Schuler, N.M. Probst-Hensch, P.C. Maiorka, N. Baeza, P. Pisani, Y. Yonekawa, M.G. Yasargil, U.M. Lutolf, and P. Kleihues. (2004). Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res*, 64:6892-6899.
 48. Ohgaki, H., and P. Kleihues. (2007) Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol*, 170:1445-53.
 49. [Paugh, B.S.](#), [Zhu, X.](#), [Qu, C.](#), [Endersby, R.](#), [Diaz, A.K.](#), [Zhang, J.](#), [Bax, D.A.](#), [Carvalho, D.](#), [Reis, R.M.](#), [Onar-Thomas, A.](#), [Broniscer, A.](#), [Wetmore, C.](#), [Zhang, J.](#), [Jones, C.](#), [Ellison, D.W.](#), [Baker, S.J.](#) (2013). Novel oncogenic PDGFRA mutations in pediatric high-grade gliomas. *Cancer Res*, 73(20): 6219-6229.
 50. Peinado, H., Olmeda, D. & Cano, A. (2007). Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer*, 7 : 415-428.
 51. Rao, J. S. (2003). Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nature*, 3: 489-501.
 52. Reifengerger, G., L. Liu, K. Ichimura, E.E. Schmidt, and V.P. Collins. (1993) Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations. *Cancer Res*, 53:2736-2739.
 53. Reifengerger, J., G. Reifengerger, L. Liu, C.D. James, W. Wechsler, and V.P. Collins. (1994). Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p. *Am J Pathol*, 145:1175-1190.
 54. Rempel, S.A., Ge, S. and Gutierrez, J.A. (1999). SPARC: a potential diagnostic marker of invasive meningiomas. *Clin Cancer Res*. 5:237-241.
 55. Sarivalasis, A. Amram, M.L., Dietrich, P.Y. (2013). Marqueurs tumoraux : quelle utilité en pratique clinique ? *Rev. Med. Suisse*, 387 :1102-1107.
 56. Sage, E.H., Bornstein, P. (1991). Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions. SPARC, tenascin, and thrombospondin. *J Biol Chem*, 266:14831-14834.

57. Scotté, F., Colonna, P., Andrieu, J.M. (2008). Biologie des cancers .In : *cancérologie*. Paris : Ellipses. P. 11-23.
58. Singh, S.K., Clark, I.D., Terasaki, M., Bonne, V.E., Hawkins, C., Squire, J. et al. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*, 63(18), 5821-5828.
59. Smith, J.S., B. Alderete, Y. Minn, T.J. Borell, A. Perry, G. Mohapatra, S.M. Hosek, D. Kimmel, J. O'Fallon, A. Yates, B.G. Feuerstein, P.C. Burger, B.W. Scheithauer, and R.B. Jenkins. (1999). Localization of common deletion regions on 1p and 19q in human gliomas and their association with histological subtype. *Oncogene*, 18:4144-4152.
60. Sontheimer, H. (2008). A role for glutamate in growth and invasion of primary brain tumors. *J. Neurochem*, 105(2) : 287–295.
61. Strojnik, T., Zidanik, B., Kos, J., and Lah, T.T. (2001). Cathepsins B and L are markers for clinically invasive types of meningiomas. *Neurosurgery*, 48:598-605.
62. [Sun, T.](#), [Plutynski, A.](#), [Ward, S.](#), [Rubin, J.](#) (2015). An integrative view on sex differences in brain tumors. *Cell Mol Life Sci*, 72(17): 3323–3342.
63. Tiwari, M. (2012). Tumor marker in relation to carcinogenesis. In: *Tumor marker and carcinogenesis*. India: River publishers. P. 49-74.
64. Ueki, K., Ono, Y., Henson, J.W., Efird, J.T., von Deimling, A., and Louis, D.N. (1996). CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated. *Cancer Res*. 56(1) : 150–153.
65. Vousden, K.H., and X. Lu. (2002) Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer*, 2:594-604.
66. [Warrington, N.M.](#), [Sun, T.](#), [Luo, J.](#), [McKinstry, R.C.](#), [Parkin, P.C.](#), [Ganzhorn, S.](#), [Spoljaric, D.](#), [Albers, A.C.](#) Et al., (2015).The cyclic AMP pathway is a sex-specific modifier of glioma risk in type I neurofibromatosis patients. *Cancer Res*, 75(1): 16-21.
67. Zhu, Y., Parada, L. F. (2002). "The molecular and genetic basis of neurological tumours." *Nat Rev Cancer*, 2(8): 616-26.
68. Zülch, K.J. (1979).Histological classification of tumors of the central nervous system. In: *Histological typing of tumors of the central nervous system*. Genève: World health organization. P.19-24.

Mots-Clés : Tumeur, Cerveau, Protéine, Signalisation.

Résumé :

Les tumeurs cérébrales primitives et secondaires, bénignes et malignes constituent un complexe hétérogène de pathologies pouvant altérées les autres fonctions cérébrales, les tumeurs sont dénommées en tenant compte de la cellule « d'origine », notre étude consiste à évaluer les modifications de l'expression protéique au sein de 08 échantillons de tissus tumoraux, et le discernement des principales protéines ayant subi des modifications par des méthodes qualitatives (SDS-PAGE) et quantitatives (méthode de Bradford), et de déceler une corrélation entre les taux protéiques révélés et plusieurs paramètres tels que le poids de la tumeur, le Sexe, l'âge, et le type tumoral. Notre but est d'ouvrir de nouvelles perspectives concernant les changements qualitatifs et quantitatifs et cela en dépit du fait qu'il existe des nombreux facteurs influençant la progression tumorale. Notre approche a pour but de diriger les nouvelles études vers une meilleure compréhension des changements protéiques opérés au niveau tumoral, afin de pouvoir à l'avenir proposer des traitements plus individualisés qui contribueront à l'amélioration de la qualité de vie des patients.

Keywords: Tumor, Brain, Protein, Signalization

Abstract:

Primary and secondary brain tumors, benign and malignant compose an heterogeneous complex of pathologies which can alter other brain functions, tumors are denominated by the cell's origin, our study consist on the evaluation of the modified protein expression within 08 tumor tissue samples, and the discernment of principals protein having suffered from changes by qualitative (SDS-PAGE) and quantitative (Bradford) methods, including detection of a correlation between revealed protein rate and other parameters like tumor weight, gender, aging, and tumor kind. We aim to come up with new prospects regarding qualitative and quantitative changing and despite of the fact that many factors may influence tumor progression. Our approach tend to conduct recent studies into a better comprehension of protein changing in tumor level, in order to suggest individualized treatments which will contribute to improve quality's life of patients.

مفتاح: ورم, دماغ, بروتينات, تأشير.

ملخص :

أورام الدماغ البدائية والثانوية، الحميدة والخبيثة هي مجمع متنوع من الأمراض التي تغير وظائف المخ الأخرى، ومن المعروف الأورام كما أخذ في الاعتبار خلية "الأصلية"، دراستنا لتقييم التغيرات في التعبير البروتين في أنسجة الورم، وحكم من البروتينات الرئيسية التي قد تعرضت لتغيرات النوعية والكمية، وكشف عن وجود ارتباط بين مستويات البروتين

كشفت والعديد من المعلمات مثل وزن الورم، والجنس، والعمر، و نوع الورم. هدفنا هو فتح آفاق جديدة للنوعية والتغيرات الكمية وهذا على الرغم من أن هناك العديد من العوامل التي تؤثر على تطور الورم. ويهدف نهجنا لقيادة دراسات جديدة نحو فهم أفضل للتغيرات البروتين المحرز في الورم، وذلك لفي المستقبل لتقديم علاجات أكثر فردية من شأنها أن تسهم في تحسين نوعية حياة المرضى.