

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la recherche scientifique
Université A. MIRA de Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-chimique



Mémoire de Master

Filière : sciences biologiques

Option : Biochimie appliquée

Thème

Analyse du métabolome dans le sang et le LCR des patients atteints de tumeurs cérébrales

Présenté par : HIMI Katia & ZEGHBIB Walid

Composition du jury

M ^{me} N. DEBBACHE	MCB, A/MIRA BEJAIA	Présidente
M ^{lle} D. AIT ALI	MAB, A/MIRA BEJAIA	Encadreur
M ^{me} K. BOUGOUFA	MCB, A/MIRA BEJAIA	Examinatrice

Année universitaire : 2015/2016

Remerciements

Avant tout on remercie notre Dieu le tout puissant, de nous avoir donné la force et la patience de bien mener ce travail.

Nos familles et nos amis pour leur présence et leurs soutiens

Nos profonds remerciements à M^{lle} AIT ALI Djida pour son encadrement, son encouragement et son oeil critique qui nous a été très précieux pour structurer ce travail.

Un grand merci à Mr GHIDOUCHE pour ses orientations, ses conseils précieux, sa disponibilité et sa gentillesse.

On remercie l'ingénieur du laboratoire BPC: M^{lle} TABTI Naima de mettre à notre disposition le matériel nécessaire a nos manipulations.

A Mlle KHIREDDINE Lydia et à Amina pour leurs aides et leurs serviabilités.

On remercie le service de neurochirurgie du CHU de Bejaia, de nous offrir les échantillons nécessaire pour effectuer ce travail on cite particulièrement Dr TAKBOU Idir et Mme BELKHIR Wahiba.

On adresse également notre profonde gratitude à l'ensemble des membres du jury qui nous ont fait l'honneur de juger ce travail.

Enfin, nous n'omettrons jamais d'exprimer toute notre gratitude a tous les membres du département de biologie de l'université de Bejaia ,que ce soit enseignants ou cadres administratif on cite M^{lle} KHERRAZ Djamila, M^{me} BOUABIDA Hiba et Mr AOUAD Fares.

Je dédie ce travail

A la mémoire de mon chère grand frère MIMED qui été au même temps mon frère et mon deuxième papa, aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour et respect que j'ai toujours eu pour lui et rien au monde ne vaut les efforts fournis pour mon éducation et mon bien être. Que dieu lui procure son vaste paradis inchallah.

A mes chers parents, je ne pourrais jamais les remercies assez pour tous les sacrifices qu'on fait pour moi, puisse dieu le tout puissant, vous accordez santé, longue vie et bonheur inchallah

A mes chère sœurs : Karima, Hakima, Hayette et Nacy.

A mes chères frères et beaux-frères : Rafik, Malek , Yacine, Ahmed , Redouane et Ali .

A mon neveu Nadjib et mes nièces : Nirmine, Nisrine, Chiraz et Maissa.

A toute ma famille maternelle et paternelle : ma grand mère, Mes tantes et oncles, cousins et cousines

A tous mes ami(e)s surtout : Imene , Lydia , Amina , Sabiha, Soumaya ,Wahiba ,Nadia lynda et célia .

A toute la promotion Biochimie appliquée 2016 , je citerais Zeghib waled , karima , souhila , sabiha ,djidji , wardia et Hammouche toufik .

A mes anciens enseignants Mr HADDAD Khodir, AISSAT Hakima, KARA Moumene, LAIDI Karima, BEN Mouhoub Fatah, M^{me} AMIR, Mr HAMOUM et Mr Ouchmoukhe. Sans eux je ne saurais jamais arriver à ce niveau.

A ma promotrice Dr AIT ALI, un profond respect et remerciement pour son suivi durant la réalisation de ce projet.

KATIA

Je dédie ce travail :

A mes parents et au reste de ma famille pour leurs éducation, leurs soutient et leurs encouragements dont j'ai reçu tout au long de ma vie.

A mes cousins et cousines surtout Nadjim, Sofiane et Linda pour avoir été présents à mes côtés.

A mes enseignants pour leurs conseils et leurs apprentissage en particulier M^{me} Bedjou dont j'ai eu l'honneur de l'avoir comme professeur et que j'aurais toujours un immense respect pour elle.

A M^{lle} Ait ali et M^r Ghidouche, Amina et Lydia pour leurs explications, conseils, et pour tous les moments passées à réaliser ce travail.

A Djamila, Hiba et Fares pour leurs aides et encouragements.

A mes amis avec qui j'ai passé d'inoubliables moments et souvenirs que je garderais dans mon cœur.

A Naima ma grande sœur pour son aide, sa présence, sa bonne humeur et sa gentillesse dont elle a fait preuve pour nous.

WALID

TABLES DES MATIÈRES

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction01

Chapitre I: Revue bibliographique

I.1- Organisation du système nerveux.....02

I.1.1- Neurones02

I.1.2- Gliocyte03

I.2- Biologie des tumeurs.....05

I.2.1- Les mutations conduisant à l'apparition d'une tumeur.....06

I.2.2- Les tumeurs cérébrales.....07

I.2.2.1- Classification des tumeurs cérébrale.....07

I.2.2.2- Epidémiologie des tumeurs cérébrale08

I.2.2.3- Les facteurs de risque des tumeurs cérébrales09

I.2.2.4- Altérations génétique des tumeurs cérébrales.....10

I.2.2.5- Les Biomarqueurs des tumeurs cérébrale.....14

I.3- Analyse du métabolome.....15

I.3.1- Les matériaux biologiques.....16

I.3.2- Les Hormones.....19

I.3.3- Méthodes analytiques20

TABLES DES MATIERES

Chapitre II : Matériels et méthodes

II.1- Matériels	21
II.2- Méthodes.....	22
II.2.1 - Préparation des échantillons.....	22
II.2.2- Dosage des protéines	22
II.2.2.1- Préparation du Réactif de Bradford.....	22
II.2.2.2- Réalisation de la courbe d'étalonnage.....	22
II.2.2.3 Dosage protéique du sang et LCR.....	23
II.2.3- Dosage hormonal	24

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1- Résultats du dosage des protéines totales.....	25
III.1.1- Résultats de la gamme d'étalon.....	25
III.1.2- Dosage protéique du sang.....	26
III.1.3- Dosage protéique dans le LCR.....	28
III.2- Résultat du dosage hormonal.....	29
III.2.1- Dosage de l'insuline dans le sang.....	29
III.2.2- Dosage de la progestérone et de l'œstradiol dans le LCR des patients.....	31
Conclusion et perspectives.....	33
Références bibliographiques.....	35
Annexes	

Liste des abréviations

AKT : Proteine Kinase B

ADN : Acide désoxyribonucléique.

a-KG : Alpha cetoglutarate

BHE : Barrière hématoencéphalique

BRCA : breast cancer

CSC : Cellule Souche Cancéreuse

CHU : Center Hospital-Universitaire.

CIRC : Centre International de Recherche sur Cancer.

CMV : cytomégalovirus

EGF : epithelium Growth Factor

EGFR : Récepteur épidermal de facteur de croissance

EBV : virus d'Epstein-Barr

FAK : focal adhesion kinase

HIF-1 : Facteur induit par l'hypoxie

IDH: Isocitrate deshydrogénase .

LCR : Liquide céphalo-rachidien.

NF : Neurofibromatose

NADH : Nicotinamide adenine dinucleotide réduit

NADP : Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

OMS : Organisation Mondiale de la santé .

LISTE DES ABBREVIATION

PIP3 : phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate

PI3K : Phosphoinoside 3-kinase

PTEN: Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome Ten

SNC: Systeme Nerveux Central.

SNP: Systeme Nerveux Peripherique .

VEGF: Vasculor Endothelial Growth Factor

2-HG : 2-hydroxyglutarate

Liste des figures

Figure 1 : coupe sagittale du cerveau.....	02
Figure 2 : les Gliocytes du système nerveux central.....	04
Figure 3 : Origine des cellules souches cancéreuses.....	05
Figure 4 : les altérations rencontrés pour le récepteur EGF.....	10
Figure 5 : les altérations moléculaires activatrices de l'EGFR entraînant l'activation de la voie de signalisation intracellulaire PI3K/AKT.....	11
Figure 6 : mode d'action de la protéine PTEN.....	12
Figure 7 : forme normale et muté IDH 1.....	13
Figure 8 : le rôle des enzymes IDH et de leur forme mutante dans le métabolisme cellulaire	14
Figure 9 : Mécanisme d'action des hormones stéroïdes.....	17
Figure 10 : mécanisme d'action des hormone hydrophile par activation du système du second messenger de l'AMP cyclique.....	19
Figure11 : spectrophotomètre à balayage UV-visible.....	23
Figure12 : dilution des échantillons dans le Bradford.....	24
Figure 13 : Représentation de la courbe d'étalonnage de la BSA.....	25
Figure 14 : comparaison des taux de protéines plasmatiques entre les échantillons tumoraux et non tumoraux.....	27
Figure 15 : Comparaison des concentrations protéiques entre les échantillons tumoraux et non tumoraux chez les femmes.....	27
Figure 16 : comparaison des taux de protéines dans les échantillons du LCR des patients tumoraux et non tumoraux.....	29
Figure 17 : Comparaison du taux d'insuline entre les patients.....	30
Figure 18 : comparaison des taux de la progestérone et de l'œstradiol entre les patients.....	32

Liste des tableaux

Tableau I: les différents types de gliocytes.....	3
Tableau II: Liste de quelques protooncogenes et leurs fonctions.....	4
Tableau III: Liste de quelques gènes suppresseurs de tumeurs et leurs fonctions.....	7
Tableau IV: Classification des tumeurs cérébrales selon le degré d'agressivité.....	8
Tableau V: Tableau récapitulatif des principaux marqueurs des tumeurs cérébrales.....	14
Tableau VI : La répartition des patients selon âge, sexe et leurs caractéristiques.....	21
Tableau VII : composition du réactif de Bradford.....	20
Tableau VIII: Gamme d'étalonnage pour le dosage des protéines.....	23
Tableau IX: Les Δ absorbance des dilutions de la BSA	25
Tableau X: les résultats des taux de protéines plasmatique obtenus chez les patients.....	26
Tableau XI : dosage protéique dans le LCR.....	28
Tableau XII : dosage de l'insuline dans le sang de patients tumoraux et non tumoraux.....	30
Tableau XIII : les taux de la progestérone et de l'œstradiol au niveau du LCR des patients.....	31

INTRODUCTION

Le corps humain est constitué de plusieurs grands systèmes dont les différents éléments coopèrent pour effectuer une fonction déterminée. Mais malgré, l'organisation parfaite du corps humain, ce dernier subit des dysfonctionnements causés par des différents facteurs qui sont responsables de l'apparition par exemple de tumeurs.

Une tumeur résulte d'une prolifération incontrôlée des cellules suite à de nombreuses mutations, elles peuvent toucher n'importe quelle partie du corps en particulier le cerveau (**Soria et al., 2013**).

Les tumeurs cérébrales sont classées 12^{ème} en terme de mortalité et 17^{ème} en terme d'incidence, ce taux élevé a poussé les scientifiques à réaliser des recherches cliniques visant à élargir nos connaissances sur les aspects moléculaires intervenant dans le développement tumoral, notamment l'analyse du métabolome afin d'identifier des signatures moléculaires précises appelées marqueurs tumoraux (**OMS-Globcan, 2012**).

En effet, les techniques de dosage du métabolome dans les fluides biologiques tels que le sang, les urines, la salive et le liquide céphalo-rachidien qui est considéré comme le liquide biologique référentiel (**Waybright, 2013**), vont servir dans l'établissement du diagnostic et du pronostic du patient, ils peuvent également servir en tant qu'indicateurs d'une réponse pharmacologique dû à l'administration d'un traitement spécifique (**Mordente et al., 2015**).

Actuellement, les marqueurs tumoraux utilisés pour la détection et le suivie des tumeurs cérébrales restent peu nombreux, posant ainsi la nécessité d'identifier de nouveaux biomarqueurs de différentes natures en s'appuyant sur l'approche du métabolome.

L'intérêt de cette étude est donc d'explorer de nouvelles pistes pouvant mener à l'identification des marqueurs hormonaux tel que l'insuline, la progestérone et l'œstradiol à partir de leur expression chez des sujets non tumoraux et des patients atteint de tumeurs cérébrales, dont le taux d'expression peut refléter sur le statut tumorale du patients et servir ainsi dans le diagnostic, le pronostic et le suivi thérapeutique .

Chapitre I :
REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE

I.1- ORGANISATION DU SYSTEME NERVEUX

Le système nerveux représente l'un des plus importants moyens de communication de l'organisme avec son environnement, captant, intégrant et émettant de l'information. Il englobe deux parties : le système nerveux périphérique composé de nerfs et de ganglions, et du système nerveux central qui est le centre de traitement des informations importantes de l'organisme. Il est composé de l'encéphale qui regroupe le tronc cérébral, cervelet et le cerveau et de la moelle épinière (Figure1) (Kierszenbaum, 2006).

Sur le plan anatomique, le cerveau est subdivisé en deux parties le diencephale et le télencéphale. Le premier est situé au centre est composé de thalamus, l'hypothalamus et l'épithalamus et le second est constitué de deux hémisphères gauche et droit séparées par une scissure et chacune forme quatre lobes ayant des fonctions distinctes (Annexe 1) (Sablonniere, 2015).

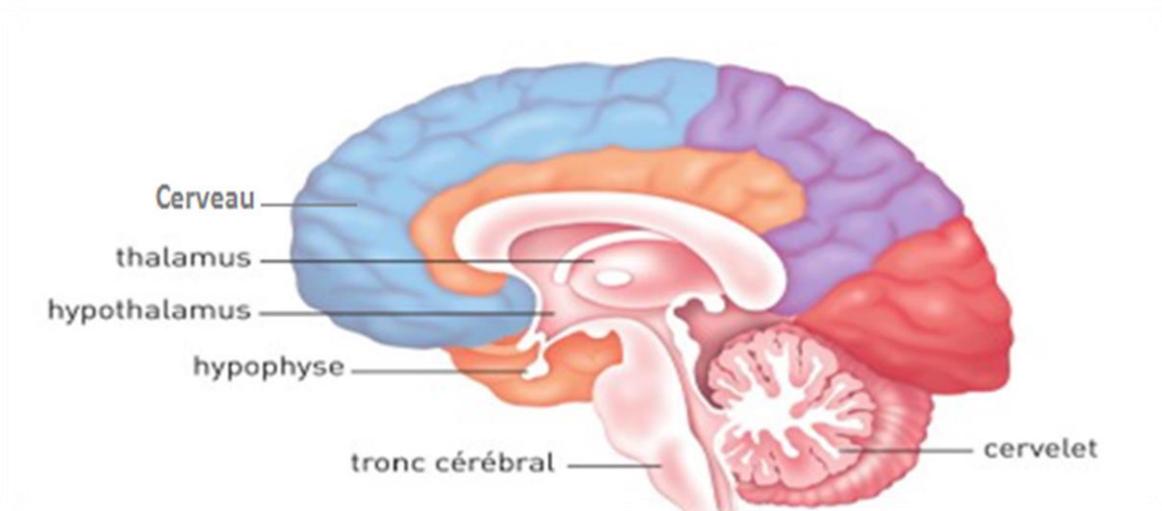


Figure 1 : Coupe sagittale du cerveau (Inca, 2010).

Le cerveau est situé dans la partie tégocéphale, qui représente 83% de l'encéphale. L'hypothalamus, thalamus et l'hypophyse sont situés au centre appelés diencephale.

Sur le plan histologique, le cerveau est constitué de :

I.1.1- Neurones

Ce sont des cellules excitables, elles permettent la gestion des informations en les analysant et en les traitant par la transmission d'un signal nerveux. Elles sont constituées de dendrites, d'un corps cellulaire et d'un axone (Kierszenbaum, 2006).

I.1.2- Gliocytes

Elles sont beaucoup plus petites mais plus nombreuses que les neurones, elles jouent un rôle primordial en assurant la nutrition, le soutien et la protection des neurones (Mader, 2010).

Ou en distingue plusieurs types résumés au niveau du Tableau I.

Tableau I : les différents types de gliocytes (Mader, 2010).

Types	Caractéristiques
Les astrocytes	<ul style="list-style-type: none"> • Cellules de forme étoilée avec plusieurs prolongements émergents de leurs corps cellulaires. • Favorisent le développement et la régulation des synapses. • Permettent l'union des cellules épithéliales autour des capillaires pour former une interface sélective appelée la Barrière Hémato-Encéphalique. • Secrètent des cytokines et chimiokines qui interviennent dans la différenciation, l'activation et la survie des cellules immunitaires.
Les épendymocytes	<ul style="list-style-type: none"> • Forment une membrane tapissant les cavités internes de l'encéphale et le canal central de la moelle épinière. • Elles s'associent avec les vaisseaux sanguins pour former le Plexus choroïdes.
Les microgliocytes	<ul style="list-style-type: none"> • Interviennent dans des réactions inflammatoires en phagocytant les cellules nécrosées, microorganismes et substances étrangères envahissants le SNC.
Les oligodendrocytes	<ul style="list-style-type: none"> • Ces cellules ont des prolongements cytoplasmiques qui peuvent s'enrouler autour des axones des neurones pour former la gaine de myéline.

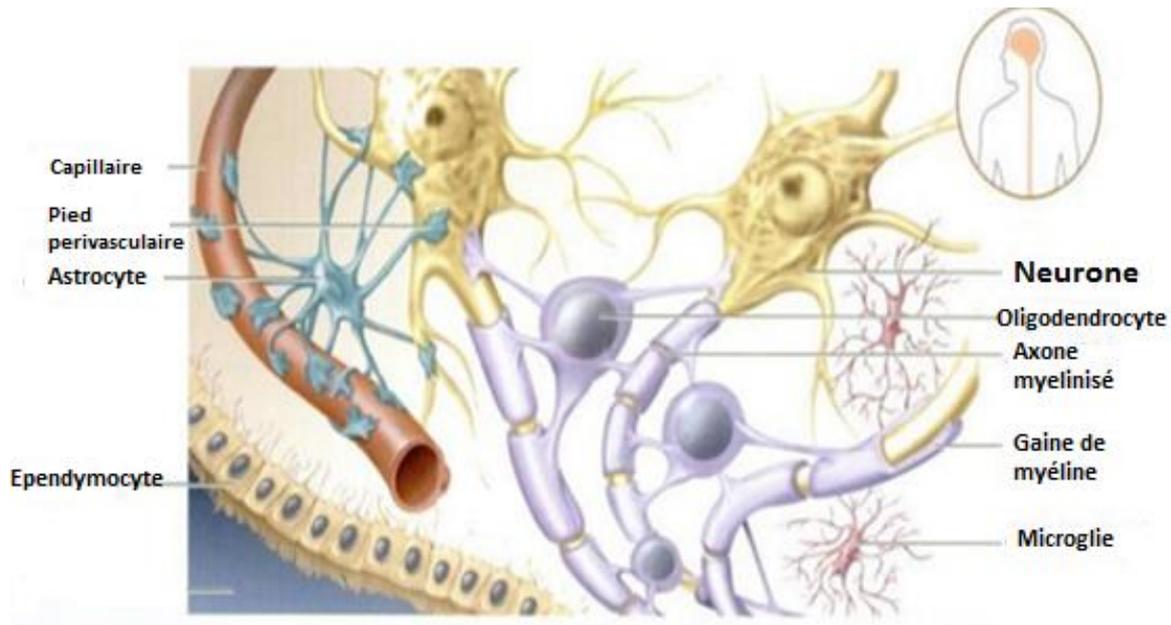


Figure 2 : Les Gliocytes du système nerveux central (Mader, 2010).

I.2- BIOLOGIE DES TUMEURS

Une tumeur désigne une prolifération excessive de cellules anormales qui ont tendance à croître et à persister. Elle peut être bénigne lorsque ces cellules se multiplient lentement et n'envahissent pas les tissus voisins. ou malignes lorsqu'elles prolifèrent rapidement et indéfiniment pour donner des métastases aboutissant souvent à la mort de l'individu (Soria *et al.*, 2013).

Suite à de nombreuses mutations au niveau de leurs ADN, les cellules tumorales vont acquérir un phénotype propre et qui est défini par plusieurs caractéristiques, entre autre une prolifération incontrôlée, immortalité, perte de l'inhibition de contact, une invasion tissulaire et développement des métastases (Soria *et al.*, 2013).

L'origine de la tumeur repose sur 2 hypothèses :

a) Théorie de Knudson

Elle stipule que l'origine d'une tumeur est due à deux événements mutationnels successifs qui apparaissent sur un même gène intervenant dans le processus cellulaire. L'une de ces mutations peut être héritée, conséquence d'une mutation germinale dans ce cas l'individu est dit prédisposé, et la seconde mutation va survenir dans la cellule somatique (Knudson, 1971).

b) La théorie des cellules souches cancéreuses

Elle a été proposée par les scientifiques, après avoir remarqué la présence dans une tumeur une sous population de cellules qui partagent les mêmes caractéristiques que celles des cellules souches à savoir l'auto renouvellement, la quiescence et la différenciation. Entre autres, elles permettent la régénération et le maintien de la tumeur ce qui provoque l'échec des traitements anti-tumoraux (Hadjipanayis et Van Meir, 2009).

L'origine des cellules souches cancéreuses peut varier d'un type tumoral à un autre. Dans certaines tumeurs, elles peuvent provenir à partir des cellules souches normales d'un tissu, des progénitures cellulaires, des cellules matures ou même des cellules cancéreuses. Ces cellules auraient subi des mutations au niveau des gènes clés, pour exprimer les propriétés précédentes des cellules souches d'où leurs transformations (Wu, 2008).

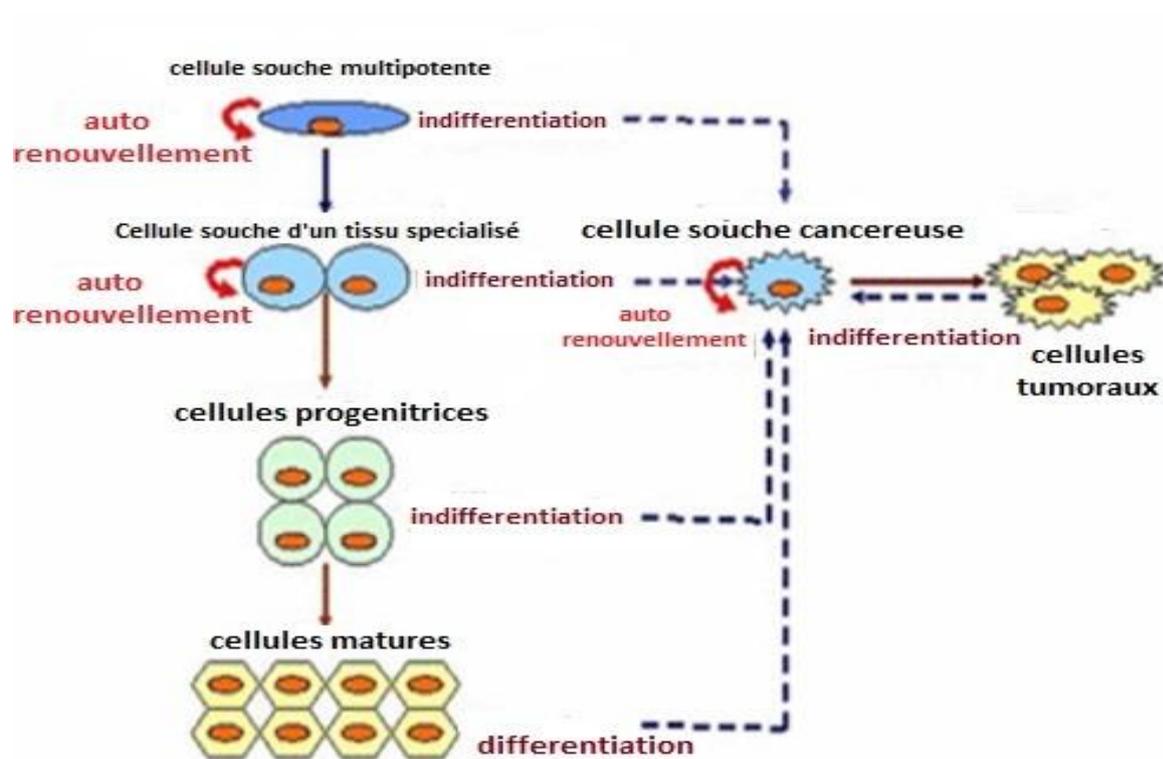


Figure 3 : Origine des cellules souches cancéreuses (Wu, 2008).

I.2.1- les mutations conduisant à l'apparition d'une tumeur

Pour qu'une cellule se transforme en une cellule tumorale, deux voies mutationnelles peuvent intervenir en touchant des gènes bien précis conduisant à la dérégulation cellulaire.

a) Mutation activatrice des proto-oncogènes

Les proto-oncogènes sont des gènes codant principalement des protéines assurant le contrôle positif du cycle cellulaire (Tableau II) (Soria *et al.*, 2013). Une mutation au niveau de l'un de leurs allèles conduit à leur transformation en oncogènes, ayant pour conséquence un gain de fonction pour ces gènes soit par :

- une augmentation du taux de protéines (mutation quantitative)
- l'acquisition par la protéine d'une propriété nouvelle (mutation qualitative) (Soria et Spano, 1999).

Tableau II : Exemples de Protooncogènes impliqués dans différents cancers (Soria et Spano, 1999).

Proto-oncogènes	Fonction de son produit
MYC	<ul style="list-style-type: none"> • Facteur de transcription activateur de gène de prolifération. • Impliquée dans la leucémie et cancer du poumon.
Bcl2	<ul style="list-style-type: none"> • Code une protéine qui bloque l'apoptose. • Des mutations au niveau de ce gène sont apparues dans Lymphome B.

b) Mutation inhibitrice des gènes suppresseurs de tumeurs

Les gènes suppresseurs de tumeurs sont des gènes codants principalement les protéines intervenant dans le contrôle négatif du cycle cellulaire et pour des protéines de la réparation des lésions de l'ADN (Tableau III) (Soria *et al.*, 2013). Une mutation au niveau de leurs deux allèles conduit à la perte totale ou partielle de leur fonctions soit par :

- une diminution de la production des protéines (mutation quantitative).
- une perte totale ou partielle de l'activité de la protéine (mutation qualitative) (Soria et Spano, 1999).

Tableau III: Exemple de gènes suppresseurs de tumeurs pouvant être mutés dans certains cas de cancers (Hoerni, 2001).

Gène	Fonction
TP53	<ul style="list-style-type: none"> • Code la protéine p53, qui peut interrompre la division cellulaire et déclencher l'apoptose des cellules anormale. • une mutation de ce gène conduit à l'apparition de divers cancers.
BRCA 1	<ul style="list-style-type: none"> • Code une protéine qui assure la réparation des lésions de l'ADN. Impliquée dans le cancer du sein et de l'ovaire.
RB	<ul style="list-style-type: none"> • Code une protéine RB qui constitue un frein essentiel du cycle cellulaire. impliquée dans le rétinoblastome, cancer de la vessie, cancer du poulmon.

I.2.2- Les tumeurs cérébrales

Elles correspondent à des tumeurs qui se développent à l'intérieur du crâne et qui peuvent toucher n'importe quelle partie du cerveau et sont aussi appelées tumeurs intracrâniennes. Ces dernières peuvent être classées en primaires lorsqu'elles se développent dans le cerveau et secondaires lorsqu'elles résultent d'une métastase provenant d'un autre organe (Steven *et al.*, 2004).

I.2.2.1- Classification des tumeurs cérébrales.

La classification internationale utilisée est celle de l'Organisation Mondial de la Santé (OMS) qui a été éditée en 2007 (Annexe 2). Cette dernière repose sur l'identification des tumeurs suivant le type cellulaire prédominant et le degré de ressemblance morphologique avec le constituant histologique dont elle est supposée dériver. Ensuite chaque type tumoral est subdivisé en grade croissant selon leurs degré d'agressivité (tableau IV) (Louis *et al.*, 2007).

Toutefois, du fait que cette classification repose sur des critères morphologiques qualitatifs, elle est peu reproductible ce qui entraine une grande part d'interprétation et de subjectivité de la part des observateurs (Adam et Mokhtari, 2011).

Par ailleurs, l'OMS a pu améliorer son ancienne classification en ajoutant des paramètres moléculaires (implication d>IDH, EGF et TP53) pour définir les entités tumorales dans le but de faciliter les études cliniques et épidémiologiques (Louis *et al.*, 2016).

Tableau IV: Classification des tumeurs cérébrales selon leur degré de malignité.

Grade I Tumeurs bénignes	<ul style="list-style-type: none"> • Tumeurs à croissance lente et circonscrites (limites bien définies).
Grade II Tumeurs bénignes	<ul style="list-style-type: none"> • Tumeurs à croissance lente mais, contrairement aux tumeurs de grade I, leurs limites sont imprécises.
Grade III Tumeurs malignes	<ul style="list-style-type: none"> • Tumeurs anaplasiques • Un ou plusieurs foyers anaplasiques se sont développés au sein d'une tumeur préexistante de bas grade (I ou II). Leur croissance est plus rapide que celle des tumeurs de bas grade.
Grade IV Tumeurs maligne	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Les tumeurs de grade IV présentent une anaplasie très prononcée. Leur croissance est plus rapide que celle des tumeurs de Bas grade.

I.2.2.2 Epidémiologie des tumeurs cérébrales

Les tumeurs cérébrales peuvent survenir chez les hommes et les femmes à différents âges. Chez les enfants de moins de 15 ans, elles représentent la tumeur solide la plus fréquente (Sommelet *et al.*, 2009).

La diversité histologique des tumeurs cérébrales rend particulièrement complexe la comparaison des incidences estimées par les registres dans différentes régions sur des périodes de temps variables (Loiseau *et al.*, 2010).

Les tumeurs cérébrales qui comptent pour 85 à 90% des tumeurs du système nerveux centrale sont classées 12^{ème} en terme de mortalité dans le monde avec plus de 189000 de décès pour plus de 256000 cas recensés en 2012 et 17ème en terme d'incidence avec 3.4 pour 100000 cas (annexe 3) (OMS - Globocan, 2012).

➤ **Incidence à Bejaia**

Une étude épidémiologique a été réalisée entre 2012 et 2016 sur 422 patients au niveau du CHU de Bejaia, qui représente une incidence de (11/100000) par rapport à la moyenne mondiale. La moyenne d'âge est de 38ans. Le sexe-ratio Homme/Femme est en faveur des femmes (H/F)=0.61.

I.2.2.3- Les facteurs de risques

Les études menées sur les tumeurs cérébrales ont permis d'identifier certains éléments pouvant influencer leurs apparitions et qui peuvent être :

➤ Des facteurs génétiques

Certaines prédispositions génétiques augmentent la susceptibilité de développer une tumeur cérébrale, telle que : la neurofibromatose de type 1 qui est due à une mutation conduisant à la perte de la fonction du gène suppresseur de tumeur NF1 localisé sur le chromosome 17. La neurofibromatose de type 2 due à une anomalie au niveau du chromosome 22 et la sclérose tubéreuse qui est due fréquemment à une mutation du gène suppresseur de tumeur TSC 1 localisé sur le chromosome 9 (**Strong et al., 2015**).

➤ Les rayonnements ionisants :

Des études ont démontré qu'une exposition à long terme aux rayonnements ionisants quel que soit leur type, même lorsqu'il s'agit d'une exposition médicale provoquerait une tumeur cérébrale (**Preston, 2002 ; Sadetzki, 2005**).

➤ Les rayonnements non-ionisants (champs électromagnétiques)

Le lien entre les tumeurs cérébrales et les champs électromagnétiques a été évoqué à cause des radiofréquences émises par les téléphones portables et qui seraient lors de leurs émissions proches du cerveau. Cependant, les résultats des études effectuées ne sont pas toujours concordants (**Strong et al, 2015**). Toutefois, en mai 2011 le Centre International de Recherche contre le Cancer (CIRC) a classé les radiofréquences comme cancérogènes possibles pour l'Homme sur la base d'un risque accru de gliome.

➤ Exposition professionnelle.

Les dérivés de N-nitrosoguanidine, le caoutchouc, le formaldéhyde, le chlorure de vinyle et les pesticides constituent également des facteurs pouvant augmenter le risque de développer des tumeurs cérébrales (**Mallar, 2010 ; Vinson et al., 2011**).

➤ Virus

Une relation entre les virus et le développement des tumeurs cérébrales a été depuis longtemps étudiée par les virologistes et les oncologistes. A titre d'exemple le cas du

cytomégalovirus (CMV) qui a un rôle onco-modulateur dans les glioblastomes en entraînant un état inflammatoire chronique. Cependant de plus amples recherches nécessitent d'être menées pour étudier l'implication de ce virus dans l'initiation des gliomes (Dziurzynski, 2012).

I. 2.2.4-Altérations génétiques

De nombreux travaux ont été menés afin de caractériser les altérations génétiques présentes dans les tumeurs cérébrales :

- Le gène TP53 est un gène suppresseur de tumeur codant la p53, une protéine impliquée à la fois dans le contrôle du cycle cellulaire, la stabilité du génome et l'induction de l'apoptose. Une mutation au niveau de ce gène conduisant à la perte de ses fonctions, est observée dans la majorité des tumeurs cérébrales (environ 60%) (Idbaih *et al.*, 2009).
- Le gène du récepteur EGF est un proto-oncogène qui est souvent muté dans les gliomes notamment dans les glioblastomes, conduisant soit à une amplification génique, soit une délétion des gènes codant la partie extra-cytoplasmique avec pour résultat une forme du récepteur tronqué nommé Δ EGFR dont l'activité tyrosine kinase est permanente qui ne nécessite plus la fixation du ligand pour son activation (Sanson et Taillibert, 2004).

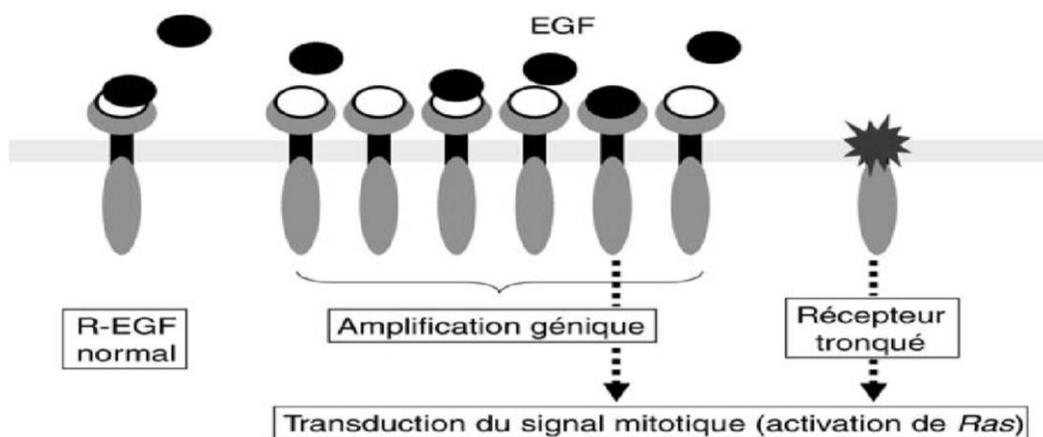


Figure 4: Les altérations rencontrées pour le récepteur EGF (Sanson et Taillibert, 2004)

Le récepteur EGF en réponse à la fixation du ligand transmet un signal mitotique grâce à son activité tyrosine kinase. Il peut être activé par deux mécanismes génétiques, soit amplification génique aboutissant à une surproduction de récepteurs normaux, soit production d'un récepteur anormal, tronqué et actif de façon constitutionnelle et non régulable.

La mutation activatrice de ce gène conduit principalement à l'activation de la voie de signalisation de la protéine kinase B (dite aussi AKT) (figure 5), dont les acteurs vont permettre l'expression des gènes favorisant le développement tumoral. Cette voie est d'autant plus amplifiée par les mutations du gène PTEN (**Idbaih et al., 2009**).

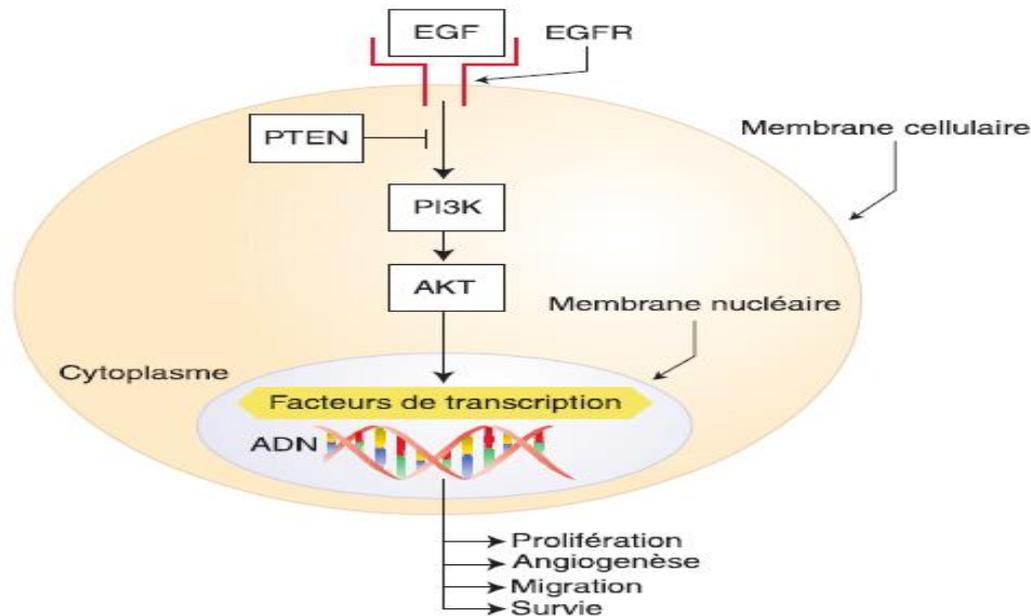


Figure 5 : Les altérations moléculaires activatrices de l'EGFR entraînant l'activation de la voie de signalisation intracellulaire de l'AKT (**Idbaih et al., 2009**).

EGF: epithelium Growth Factor. **PI3K:** Phosphoinoside 3-kinase. **PTEN:** Phosphatase and Tensin homolog.

- Le gène PTEN code une enzyme à activité phosphatase localisée sur la face intracellulaire de la membrane plasmique. D'une part, PTEN exerce son activité sur les protéines FAK qui en les inhibant empêche leurs interactions avec les récepteurs de type intégrine et de ce fait empêche la migration et l'invasion cellulaire. D'autre part, elle bloque la transduction du signal par la déphosphorylation du second messager phosphatidyl inositol 3 phosphate (IP3) intervenant dans l'activation de la voie de l'AKT (Figure 6) (**Sanson et Taillibert, 2004**).

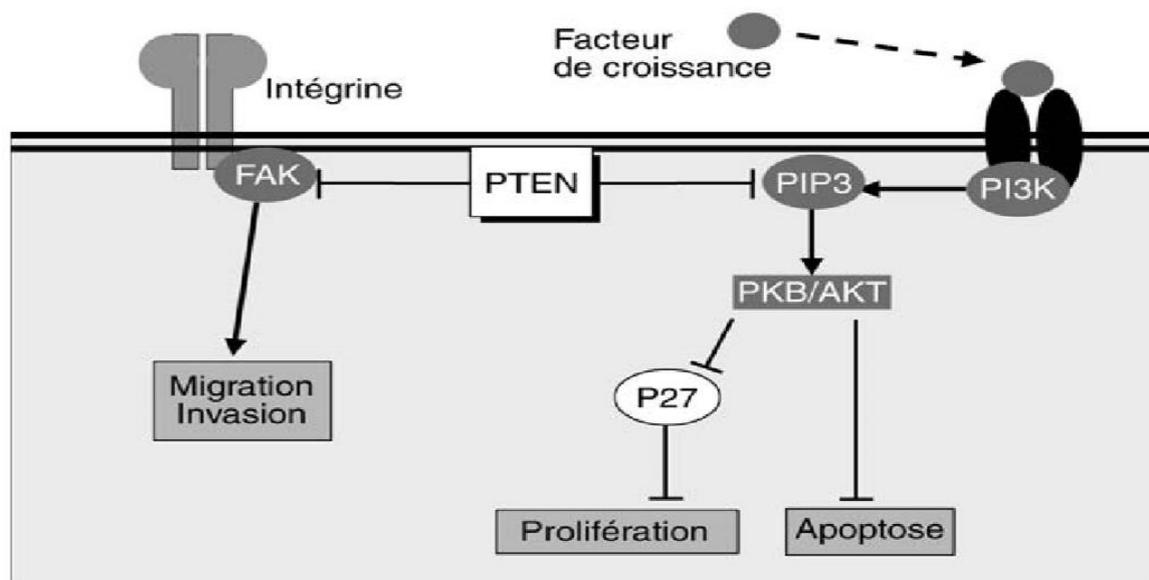


Figure 6 : Mode d'action de la protéine PTEN (Sanson et Taillibert, 2004).

La déphosphorylation du phosphatidyl inositol triphosphate (IP3) par PTEN bloque la transduction du signal mitotique ainsi que l'activation de la protéine kinase B (PKB/AKT), antiapoptotique. D'autre part, PTEN inhibe (par déphosphorylation) les protéines FAK (focal adhésion kinase) qui interagissent avec les récepteurs de type intégrine et, par ce mécanisme, inhibe la migration cellulaire et l'invasion.

- Une délétion partielle ou totale du chromosome 22q est très fréquente dans les méningiomes et dans les neurinomes. Des recherches sur ce chromosome ont permis de découvrir que cette délétion touche le gène de la neurofibromatose de type 2 (NF2). Ce dernier code la schwannomine, une protéine qui joue un rôle dans l'inhibition de contact en interagissant avec plusieurs effecteurs tel que la CD44 (Sanson et Taillibert, 2004).
- La délétion des gènes du chromosome au niveau des bras 1p et 19q a été longtemps identifiée dans les tumeurs oligodendrogiales, cette perte résulte par une translocation déséquilibrée conduisant à une perte d'hétérozygotie. Par ailleurs la perte des régions 1p et/ou 19q est observée dans les astrocytomes. Les gènes présents sur ces bras ont été étudiés et plusieurs d'entre eux ont été évalués en tant que candidats des gènes suppresseurs de tumeurs (Jansen, 2010).

➤ Les mutations des gènes IDH

Il existe deux gènes IDH, l'IDH 1 codant l'enzyme isocitrate deshydrogénase cytosolique et l'IDH 2 qui code la même enzyme cependant mitochondriale. Les deux catalysent la même réaction : une décarboxylation oxydative de l'isocitrate en alpha-cétoglutarate (α -KG) en utilisant le NADP comme cofacteur (figure 7). Les mutations au niveau ces gènes sont observées dans plus de 70% des gliomes de bas grade et a un moindre pourcentage dans les glioblastomes (Izquierdo-Garcia *et al.*, 2014).

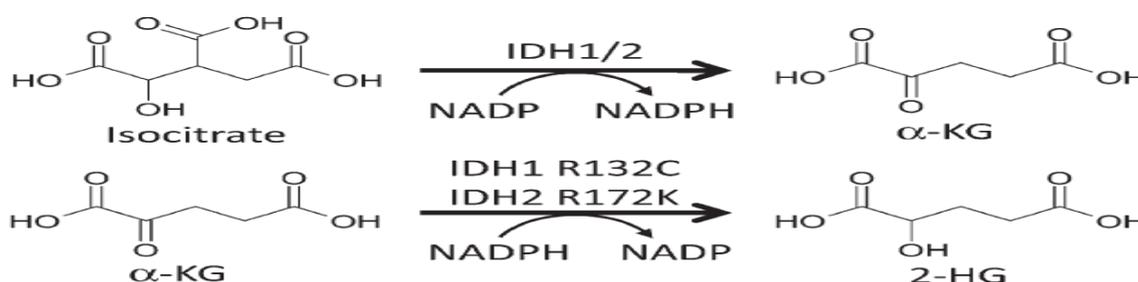


Figure 7 : forme normale et muté IDH 1 (Gross et al 2010).

Abréviations : **IDH** : isocitrate deshydrogénase ; **α -KG** : alpha-cetoglutarate ;

2-HG: 2 hydroxyglutarate ; **NADP**: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate.

Les sites de mutation touchent les codons R132 pour IDH1 et R172 pour IDH2, ayant pour résultat une enzyme qui catalyse le α -KG en 2 hydroxyglutarate (2-HG) en utilisant le NADPH comme cofacteur (figure 7), alors que ce dernier joue un rôle fondamentale dans la défense contre les espèces réactifs de l'oxygène par la réduction du glutathion.

En outre, la réduction du α -KG par l'enzyme IDH mutée permet l'inhibition de l'activité des protéines de la famille des prolyl hydroxylases (PHD), qui sont dépendantes de ce substrat, et dont le rôle est la dégradation par hydroxylation du facteur induit par l'hypoxie (HIF) (Figure 8) Par conséquent, la diminution de la concentration du α -KG entraîne l'augmentation du facteur de transcription HIF-1 qui facilite la croissance tumorale dans des conditions où la concentration de l'oxygène est basse (Yoshimoto *et al.*, 2012 ; Wang *et al.*, 2015).

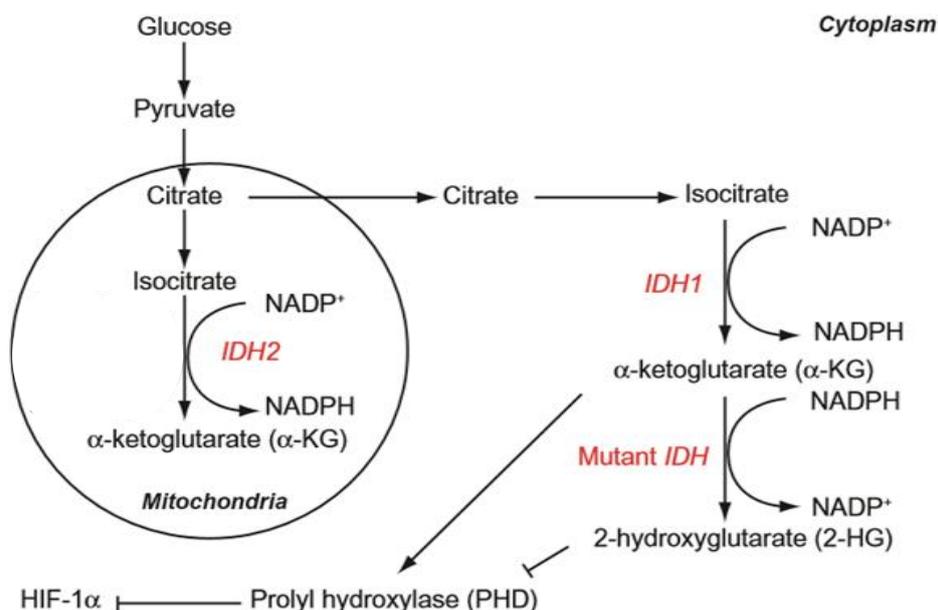


Figure 8 : Le rôle des enzymes IDH et de leur forme mutante dans le métabolisme cellulaire (Yoshimoto *et al.*, 2012).

Les deux enzymes IDH convertissent le NADP^+ en NADPH , et génèrent le α -KG à partir de l'isocitrate. Les enzymes IDH mutées convertissent le α -KG en 2-HG qui inhibe l'activité des protéines de la famille prolyl hydroxylase (PHD). L'inhibition de ces derniers conduit à l'augmentation de l'expression de HIF-1 α .

Abbréviations : **IDH :** isocitrate deshydrogenase ; **NADP :** nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ; **HIF-1 α :** facteur induit par l'hypoxie-1 alpha.

I.2.2.5- Les Biomarqueurs

Les biomarqueurs peuvent être des molécules, des mutations génétiques, ou tout autre paramètre biologique, qui une fois qualifiés ou quantifiés, permettent de se renseigner sur un processus biologique physiologique ou pathologique.

En oncologie, les biomarqueurs peuvent être utilisés pour représenter le statut tumoral du patient, ils sont nommés ainsi des marqueurs tumoraux. Ces derniers sont aussi utilisés en clinique, afin d'établir un diagnostic de la présence d'une tumeur chez un individu, déterminer son pronostic, et identifier ceux qui bénéficieront d'un traitement particulier. (Mordente *et al.*, 2015).

Les marqueurs des tumeurs cérébrales utilisés en clinique sont cités dans le tableau suivant (Tableau V).

Tableau V : Tableau récapitulatif des principaux marqueurs des tumeurs cérébrales.

Marqueurs tumoraux	Applications cliniques	Références
Mutation de l'enzyme IDH	Bon pronostic/ diagnostic	(Siegall, 2015)
Co-délétion 1p19q	Bon pronostic. Prédit une bonne réponse à la chimiothérapie	(Siegall, 2015)
Mutation d'EGFR	Mauvais pronostic	(Yoshimoto et al, 2012)
2 hydroxyglutarate	Bon pronostic/diagnostic	(Yoshimoto et al, 2012)

Les tumeurs cérébrales sont un groupe résultant de différents facteurs moléculaires, ce qui nécessite la recherche de marqueurs biologiques pouvant être de différentes natures. L'une des cibles actuellement recherchées dans l'identification de ces molécules est l'analyse du métabolome.

I.3- ANALYSE DU METABOLOME

Le métabolome se définit comme étant une collection de molécules intervenant dans le métabolisme cellulaire du corps, elles peuvent être des sucres, des oligonucléotides, des acides organiques, des peptides ou même des lipides (Wishart *et al.*, 2013).

L'analyse du métabolome permet d'identifier et de quantifier les métabolites présents dans les extraits tissulaires et les fluides biologiques, par l'utilisation de différentes techniques analytiques (Villas-boas *et al.*, 2007). Cette analyse peut être divisée en deux classes : l'analyse ciblée pour l'identification et la quantification d'un métabolite précis et l'analyse non ciblée qui permet d'analyser l'ensemble des métabolites présents dans un échantillon donné (Trezzini *et al.*, 2015).

I.3.1- Les matériaux biologiques

Les échantillons tissulaires et cellulaires sont rarement utilisés, contrairement aux fluides biologiques. principalement en raison d'une difficulté de collecte qui est réalisée par biopsie (Bujak *et al.*, 2015).

Par ailleurs, l'analyse des fluides biologiques tel que le sang et le Liquide céphalorachidien (LCR) est une bonne alternative, comparée aux urines qui sont issues de la filtration glomérulaire du sang qui ne laisse passer que les protéines avec un poids moléculaire inférieur à 60 KDa et la salive qui est produite par les différentes glandes salivaires et peut être mélangé aux aliments consommés (**Marieb,1998**).

- Le LCR est produit par le plexus choroïde des 3^{èmes} et 4^{èmes} ventricules latéraux, il circule entre les tissus du SNC. Il forme une barrière liquide entre le crâne le protégeant ainsi des chocs physiques. De plus, ce liquide permet le transport et la distribution d'une multitude d'éléments physiologiques telle que : les nutriments, facteurs endocriniens et les déchets. Du fait, qu'il ne soit pas exposé à la circulation systémique et aux autres organes, il dispose des quantités faibles de protéines et de métabolites reflétant ainsi les processus qui se déroulent au niveau du cerveau (**Waybright, 2013**).

- Le sang est un vecteur primaire de petites molécules dans l'organisme et joue un rôle important dans le transport des gaz dissous, des nutriments, des hormones et des déchets métaboliques. La présence d'une barrière hémato-encéphalique, qui est une interface sélective entre le sang et le LCR permet le passage des métabolites à petit poids moléculaire sécrétés par le cerveau et qui se retrouvent dans le sang. Pour cela une analyse chimique détaillée du sang permet d'obtenir les concentrations des molécules sécrétées par le cerveau et des autres molécules sécrétées par les autres organes (**Marieb,1998**).

I.3.2- Hormones

Les hormones sont des messagers chimiques, libérés par le corps afin de permettre le déclenchement ou la régulation de nombreuses fonctions tels que la croissance, le métabolisme, la reproduction et le fonctionnement de divers organes (**Abiven et al., 2004**).

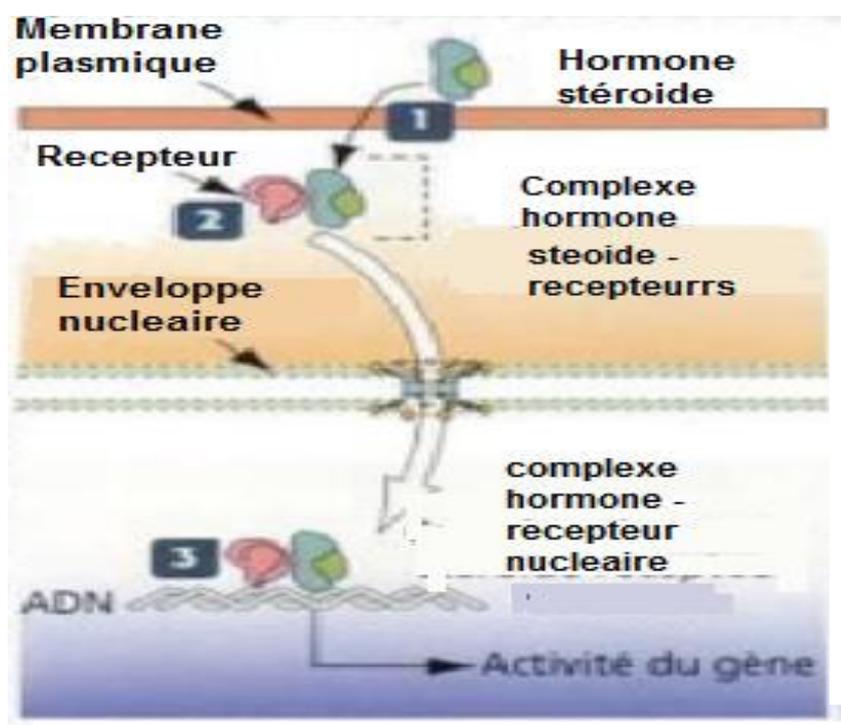
il existe deux classes d'hormones qui diffèrent selon leurs natures et leurs mécanismes d'actions :

➤ Hormones stéroïdiennes

Ce sont des molécules de nature lipidique synthétisées par les glandes surrénales, les gonades et les cellules du système nerveux dans ce cas elles sont appelées neurostéroïdes.

Les hormones faisant partie de cette classe possèdent toutes au niveau de leurs structures un noyau stérane, et dérivent toutes du métabolisme du cholestérol qui va subir plusieurs réactions métaboliques pour donner naissance à divers types de stéroïdes (Baulieu *et al.*, 2001).

Du fait de leur caractère hydrophobe, ces hormones sont transportées dans le sang grâce à des protéines plasmatiques vers les cellules cibles ou elles pénètrent en passant la membrane plasmique et se lient à leurs récepteurs spécifiques intra-cellulaires au niveau du cytoplasme. Par la suite, ce complexe pénètre dans le noyau et se lie à une région de l'ADN dite élément de réponse à l'hormone (ERH) afin d'activer ou de réprimer la transcription des gènes (Figure 9) (Kierszenbaum, 2006).



1 L'hormone stéroïde hydrophobe diffuse à travers la membrane plasmique.

2 L'hormone stéroïde se fixe sur un récepteur cytoplasmique.

3 Le complexe stéroïde-récepteur cytosolique est transféré dans le noyau, se fixe à l'ADN et active ou réprime l'expression du gène.

Figure 9: Mécanisme d'action des hormones stéroïdes (Kierszenbaum,2006).

Selon certaines études, les hormones stéroïdes peuvent influencer le développement des tumeurs. Kahal et collaborateurs, ont remarqué qu'un taux élevé d'hormones stéroïdiennes pouvaient être la cause de l'apparition du cancer du sein chez une population. Ceci est expliquée par le fait que certains de ces hormones comme la progestérone, va activer son récepteur dont le rôle est de permettre la régulation des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (Kahal, 2012).

Entre autres, des études supplémentaires ont permis d'identifier la présence de nombreux récepteurs des hormones stéroïdiennes, comme ceux de la progestérone et l'estrogène au niveau des cellules des tumeurs cérébrales notamment les méningiomes, suggérant leurs implications dans le développement de ces tumeurs (Milgrom et Baulieu, 2008).

➤ **Les hormones polypeptidiques**

Ce sont des peptides ou des protéines, constituées par des chaînes spécifiques d'acides aminés de longueur variable. Ces hormones sont stockées dans des vésicules cytoplasmiques, et seront libérées dans la circulation systémique suite à la présence pour certains d'un stimulus nerveux et pour d'autres le métabolite sanguin, dont elles sont chargées de contrôler, comme le glucose dans le cas de l'insuline ou du glucagon et du calcium dans le cas de la calcitonine (Sherwood, 2006).

Contrairement aux hormones stéroïdiennes, les hormones polypeptidiques sont hydrophiles et sont secrétées directement dans le sang sans être liées à une protéine, et une fois arrivées au niveau de la cellule cible, elles se lient directement à leurs récepteurs spécifiques extracellulaires, entraînant soit une modification de la perméabilité membranaire par l'ouverture ou la fermeture des canaux ioniques, soit en activant le système de second messager qui va modifier l'activité des protéines intracellulaires préexistantes (Figure 10) (Sherwood, 2006).

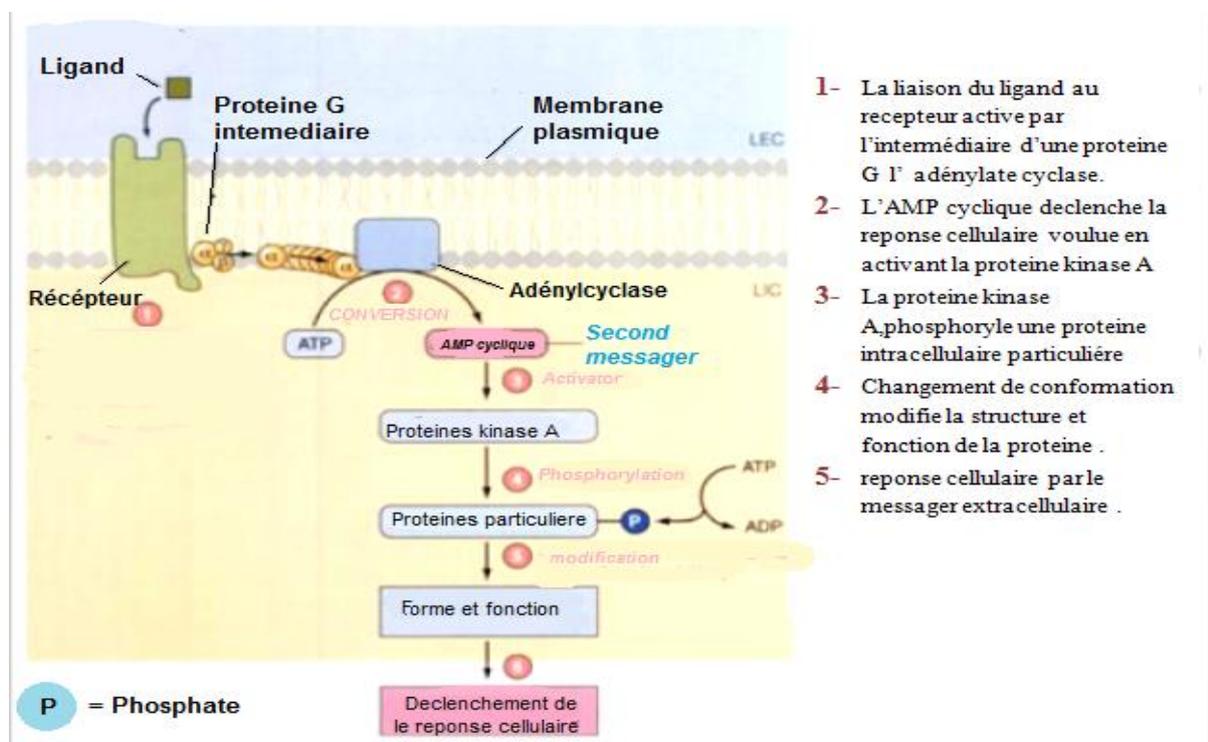


Figure 10 : Mécanisme d'action des hormones hydrophiles par activation du système du second messager de l'AMP cyclique (Sherwood, 2006).

Des études ont permis d'établir une relation entre les hormones polypeptidiques et les tumeurs, l'une d'entre elles, faite par Gunter et collaborateurs a révélé la surexpression de l'insuline dans les cancers de la prostate, du sein et de l'endomètre (**Gunter *et al.*, 2008**). Par conséquent, il serait intéressant de suivre l'expression de cette hormone au niveau des tumeurs du cerveau.

I.3.3 Methodes analytiques

I.3.3.1- Dosage colorimétrique des protéines

Il existerait plusieurs méthodes colorimétriques dont le but est de déterminer la concentration des protéines d'un échantillon donné. Leur principe est d'ajouter un réactif spécifique qui se lie soit aux liaisons peptidiques soit à certains acides aminés des protéines, ceci a pour résultat : une coloration visible à l'œil nu dont l'intensité est proportionnelle à la concentration des protéines, laquelle sera déterminée grâce à une spectrophotométrie d'absorption. Parmi les méthodes colorimétriques les plus utilisées on trouve :

a) La méthode de biuret

Elle est basée sur l'utilisation du réactif de Gornal qui se complexe avec deux liens consécutifs en présence de cuivre dans un milieu alcalin. Le complexe donnera une coloration violet-rouge et la concentration des protéines sera déterminée à 540 nm (**Gavrilovic *et al.*, 1999**).

b) La méthode de Lowry

Cette méthode est essentiellement basée sur la méthode de biuret laquelle est ajoutée un second réactif qui est le folin-ciocalteu qui réagit avec les acides aminés aromatiques : tyrosine et tryptophane conduisant à la formation d'un complexe de couleur bleu foncé qui absorbe à 750nm.

c) La méthode de Bradford

C'est une méthode très sensible et reproductible pour le dosage des protéines en utilisant le bleu de coomassie G250, ce dernier qui est de couleur marron lorsqu'il est en contact avec les acides aminés basiques et les résidus hydrophobes des protéines, change de couleur en bleu avec un déplacement du maximum d'absorption de 465nm à 595nm (**Bradford 1976**).

I.3.3.2- Dosage Hormonal

Les techniques immunologiques sont l'une des techniques les plus utilisées dans le dosage des hormones. Elles reposent sur la formation d'un complexe immun entre un anticorps et son antigène dans ce cas l'hormone, qui sera détecté grâce à l'utilisation de marqueurs liés sur des anticorps et qui peuvent être des enzymes conduisant à la formation d'un produit coloré, des marqueurs fluorescents ou radioactifs. Le signal obtenu par ce marqueur permettra de mesurer la quantité de l'hormone au niveau du liquide biologique (**Pelizzola et al., 1995**).

L'une des types des techniques immunologiques les plus utilisées est celle du type compétitive en phase hétérogène, dont le principe est une compétition entre un antigène marqué et un antigène non marqué (l'hormone) pour les sites de liaison des anticorps dont la quantité est limitée et connue. Plus la concentration de l'antigène est grande plus l'antigène marqué se détache de l'anticorps, le signal ainsi obtenu sera mesuré par un automate (**Benoist et al, 2011**).

Chapitre II :
MATERIELS
ET
METHODES

II.1 - Matériel

Les matériaux biologiques utilisés dans ce travail sont au nombre de 11, constitués de huit échantillons sanguins et de trois LCR collectés de patient admis au service de neurochirurgie du Centre Hospitalo-universitaire Khalil Amrane de Bejaia.

Trois de ces échantillons sont collectés à partir de personnes atteintes de tumeurs cérébrales, et huit non tumoraux mais présentent une autre pathologie, et un échantillon sanguin considéré comme témoin sain (Tableau VI).

Une partie de notre travail expérimentale a été réalisé au niveau du laboratoire de biologie physico-chimique de l'université Abderrahmane mira de Bejaia, les matériaux utilisés sont cités dans (annexe 4). L'autre partie qui concerne le dosage hormonal a été réalisé au laboratoire d'analyse médicale LALAOUI K de la wilaya de Bejaia.

Tableau VI : La répartition des patients selon âge, sexe et leurs caractéristiques.

F : Femelle, **M** : Male, **T** : Tumorale, **NT** : Non tumoral.

N° échantillon Sang	Age (ans)	Sexe	Nature	Pathologie
202/16	8 mois	M	NT	Hydrocéphalie
291/16	24	M	NT	Cavernome
367/16	53	M	NT	Hémorragie
337/16	37	F	NT	Hémorragie
305/16	85	F	T	PEIC
301/16	22 mois	F	NT	Hydrocéphalie
368/16	47	M	NT	Hémorragie
205/16 Témoin sains	23	M	NT	–

N° échantillon LCR	Age (ans)	Sexe	Nature	Pathologie
184/16	16 mois	F	T	Astrocytome
311/16	3	M	NT	Hydrocephalie
302/16	21	F	T	Astrocytome

II.2.-Méthodes**II.2.1 - Préparation des échantillons**

- Les LCR sont recueillis puis conservé dans des tubes à 4 °C
- Les échantillons sont prélevés dans des tubes héparines, puis ils sont centrifugés à une vitesse de 2500 rpm pendant 10 min à une température ambiante dans le but est de récupérer le sérum qui est par la suite conservé à 4°C.

II.2.2- Dosage des protéines**II.2.2.1-Préparation du Réactif de Bradford**

Une solution de 500ml du Bradford préparés en utilisant la composition décrite dans le Tableau VII, ce mélange a été soumis à une agitation magnétique pendant 1h suivie d'une filtration par le papier wattmen et on conserve à l'obscurité à 4°C.

Tableau VII : composition du réactif de Bradford.

Réactifs	Quantité
Bleu de Coomassie G250	50 mg
Ethanol 100%	25 ml
Acide phosphorique 85%	50ml
Eau distillée	425 ml

II.2.2.2- Réalisation de la courbe d'étalonnage

Une solution mère de 2mg/ml de BSA à été préparer au préalable puis diluée en série afin d'obtenir une gamme étalon pour un volume total de 800 µl (Tableau VIII)

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

BSA (mg/ml)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1	2
BSA (µl)	0	400	533	601.5	640	400	800
Eau distillée (µl)	800	400	267	198.5	160	400	0

A partir des tubes précédents, on a prélevé 83 µl de chaque dilution et on additionne 2500 µl de Bradford, ce mélange a été incubé à l'obscurité pendant 30min. pour finir, en s'aidant d'un spectrophotomètre, on mesure l'absorbance à 596nm (longueur trouvée par utilisation d'un spectrophotomètre à balayage).

II.2.2.3 Dosage protéique dans le sang et le LCR

Pour le dosage des protéines sanguines une dilution au 50^{ème} a été réalisée en diluant 20 µl de chaque échantillon dans 980 µl d'eau distillée. Puis, à partir des nouvelles concentrations, on prélève un volume de 83µl dans lequel est ajouté à 2500 µl de réactif de Bradford. Le mélange est incubé pendant 30 min à l'obscurité (Figure 12), puis on mesure les absorbances à la même longueur d'onde déjà utilisée précédemment.

Pour le dosage des protéines du LCR, le même protocole décrit ci-dessus a été suivi sans effectuer de dilution.

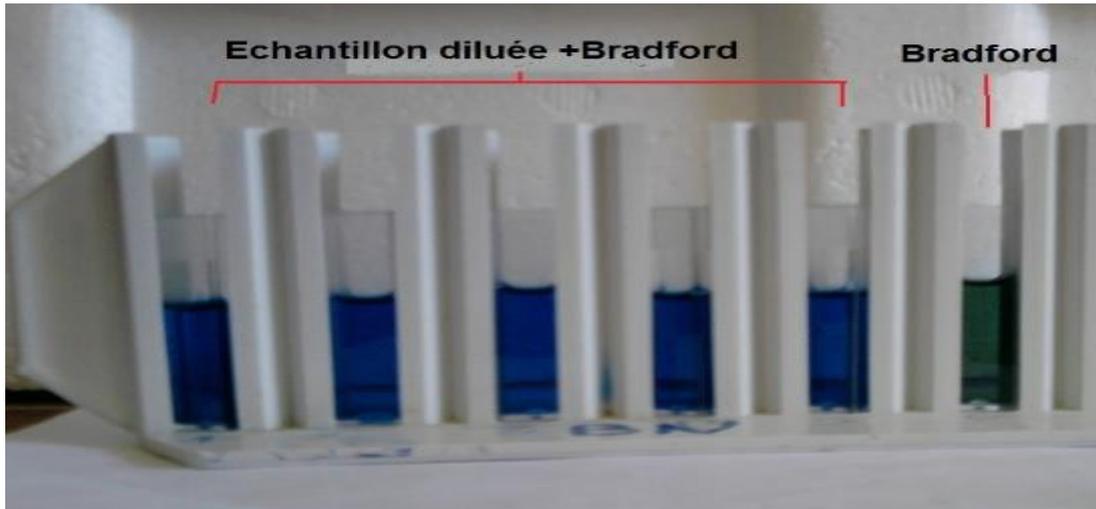


Figure 11: dilution des échantillons dans le Bradford

II.2.3- Dosage hormonal

Le dosage des différentes hormones : insuline dans le sang ainsi que de la progestérone et œstradiol dans le LCR a été effectués au niveau de laboratoire d'analyse médical du Dr LALAOUI K.

Ces dosages ont été réalisées par une méthode d'immunologie de type compétition en phase hétérogène, révélé par électrochimiluminescence, réalisé sur l'automate Elecsys 2010.

Chapitre III:
RESULTATS
ET
DISCUSSION

III.1- RESULTATS DU DOSAGE DES PROTEINES TOTALES

III.1.1- Résultats de la gamme d'étalon

Afin de doser la quantité en protéines totales pour chaque patient, l'ensemble des échantillons a été traité en suivant la méthode de Bradford. Le but est de chercher une éventuelle corrélation entre les tumeurs cérébrales et la teneur en protéines.

La concentration en protéines a été déterminée grâce à la courbe d'étalonnage du standard utilisé (BSA).

Tableau IX: Les Δ absorbances des dilutions de la BSA

BSA (mg/ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1	2
Δ absorbance	0,013	0,236	0,448	0,735	0,912	0,733	1,859

Absorbance du Blanc=1,115

A partir de la courbe tracée grâce au logiciel Excel (Figure 13), nous avons obtenu l'équation suivante : $y = 0,883x + 0,074$ qui sera utilisé afin de calculer les concentrations en protéines des échantillons représentées dans le tableau X, Sachant que x représente la concentration et y l'absorbance retrouvée.

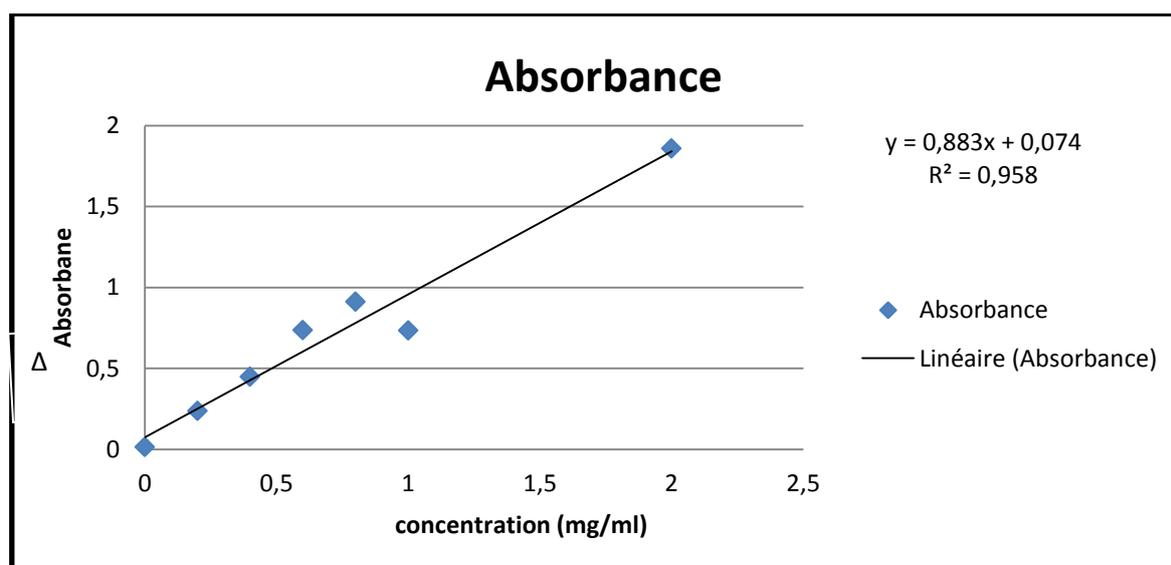


Figure 12 : Représentation de la courbe d'étalonnage de la BSA

III.1.2- Dosage protéique du sang

Les résultats obtenus pour les échantillons sanguins (Tableau X), montrent que pour la totalité des individus analysés, le taux en protéines sériques est compris entre 58.77 et 76.78 mg/ml. Ceci concorde parfaitement avec les valeurs référentielles citées par Estepa qui a trouvé que pour un adulte sain, la concentration des protéines sériques est comprise entre 64 et 83 mg/ml, alors que chez les enfants elle est entre 60 et 80 mg/ml (**Estepa, 2006**). De plus, il est intéressant de noter que dans un précédent travail, les mêmes concentrations ont été retrouvés dans le sang des patients atteints de pathologies similaires et recueillis en 2013 au CHU de Bejaia (entre 64,21 et 85,39 mg/ml).

Tableau X: les résultats des taux de protéines plasmatique obtenus chez les patients

NT : non tumoral T : tumoral.

N° d'échantillon	Nature	Δ absorbance	PROTEINEMIE (mg/ml)
202/16	NT	1,43	75,08
367/16	NT	1,42	76,78
291/16	NT	1,41	75,65
337/16	NT	1,44	76,21
305/16	T	1,11	58,77
301/16	NT	1,27	67,55
368/16	NT	1,44	77,93
205/16 (Témoin absolu)	NT	1,17	62,06

Blanc =1,09

Plusieurs paramètres sont étudiés afin de comparer nos échantillons et pour cela, nous avons utilisé le logiciel d'analyse GraphPad Prism.

Le résultat de cette analyse révèle une différence entre les taux des protéines dans le sérum des patients tumoraux et ceux des non tumoraux (Figure 14). Ceci est comparable à l'étude faite par Hamada et collaborateurs, avec toutefois des taux de protéines plus élevés chez les patients tumoraux (**Hamada et al., 2009**).

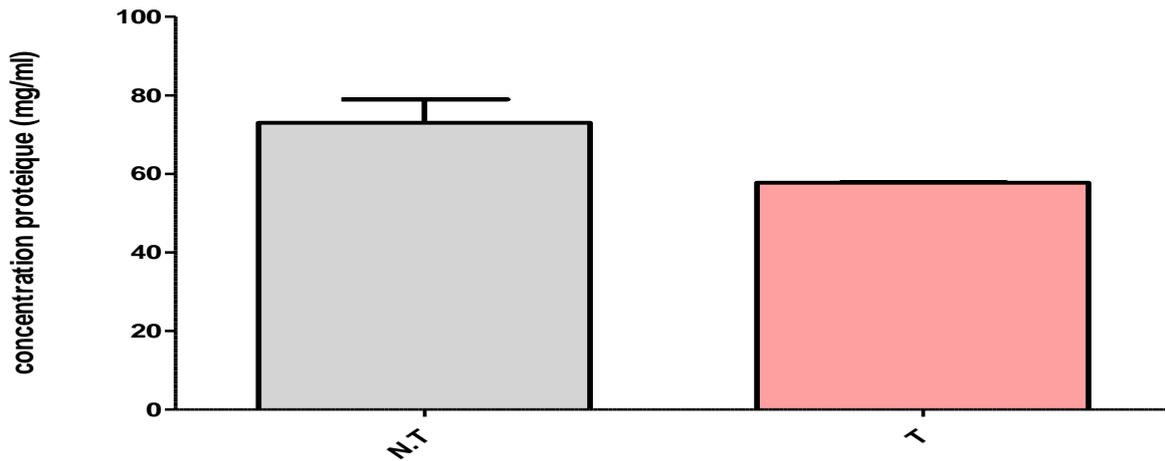


Figure 13 : comparaison des taux de protéines plasmatiques entre les échantillons tumoraux et non tumoraux.

Les patients tumoraux (T) n = 1. Les patients non tumoraux (NT) n = 7.

L'analyse des échantillons tumoraux et non tumoraux chez les femmes a montré qu'il y a une différence entre les taux des protéines dans le sang, avec une diminution du taux de protéines dans le cas tumoral (Figure 15). Les études de Hamada et son équipe ont certes trouvé une différence entre les femmes saines et les femmes atteintes de tumeurs cérébrales, mais avec une élévation chez ces dernières. La même étude a aussi montré qu'il n'existe pas de différence des concentrations protéiques entre les hommes et les femmes atteintes de tumeurs cérébrales. (Hamad *et al.*, 2009).

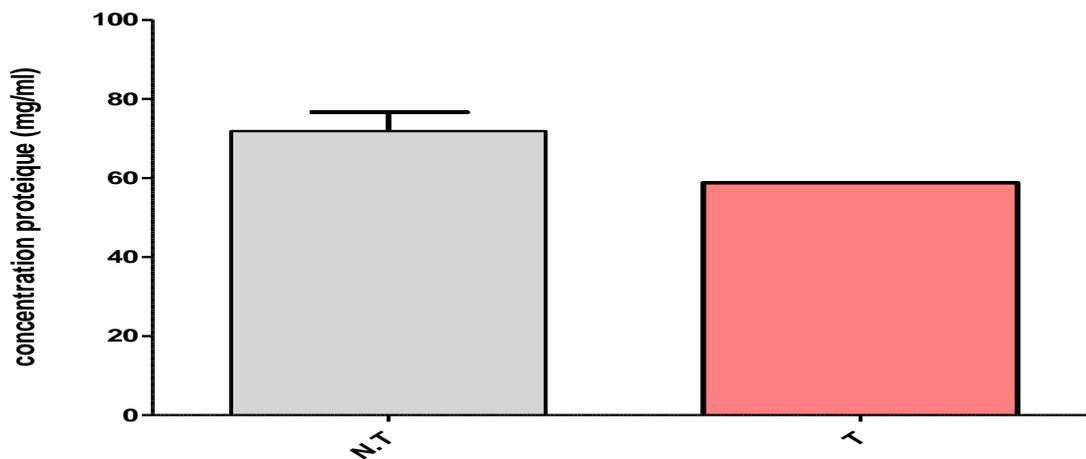


Figure 14 : Comparaison des concentrations protéiques entre les échantillons tumoraux et non tumoraux chez les femmes.

Les échantillons analysés appartiennent à des femmes atteintes de tumeurs cérébrales (T) n=1 et les autres non tumoraux (NT) n=2.

Etant donné que les échantillons tumoraux dont on dispose sont uniquement de sexe féminin, une comparaison entre les sexes ne peut pas être faite. Par ailleurs, la différence de résultats obtenue avec l'étude faite par Hamad, ne peut être expliquée que par le faible échantillonnage dont on dispose (8 patients), par rapport à l'étude de Hamad (160 patients).

De plus, le faible taux de protéines chez les patients tumoraux par rapport aux patients non tumoraux, est peut-être dû au fait que ces derniers présentent d'autres pathologies responsables de l'élévation du taux de protéines.

III.1.3- Dosage protéique dans le LCR

Nos résultats montrent que chez la totalité des individus analysés, les taux protéiques au niveau du LCR sont compris entre 1 et 1,71 mg/ml (Tableau XI). Ceci est supérieur aux valeurs référentielles qui sont comprise entre 0,2 et 0,5 mg/ml (Kalinbina *et al.*, 2011). A noter que nos résultats sont similaires avec ceux obtenus dans une analyse antérieure sur une dizaine d'échantillons de LCR collectés au CHU de Bejaia.

Tableau XI : dosage protéique dans le LCR

T : tumorale, NT : non tumorale

N° échantillon	Nature	D absorbance	PROTEINEMIE (mg/ml)
184/16	T	0,980	1
311/16	NT	1,638	1,77
302/16	T	1,583	1,71

Blanc = 1,015

Nous remarquons une différence des taux de protéines présents au niveau du LCR chez les patients tumoraux et non tumoraux (Figure 16). Par ailleurs, ce taux élevé comparé aux valeurs référentielles peut être dû à la présence de différentes pathologies chez les patients.

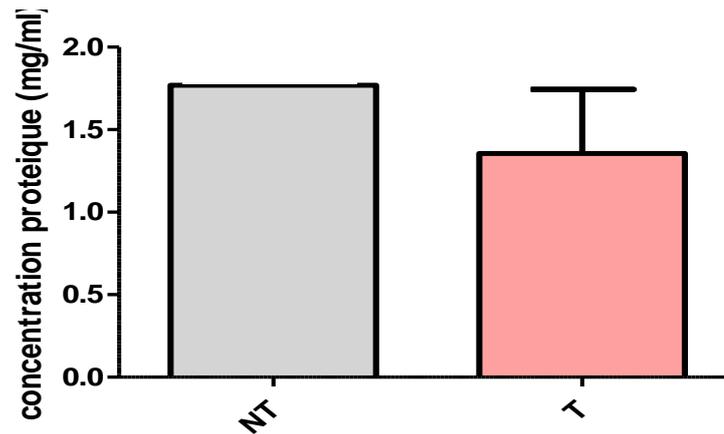


Figure 16: comparaison des taux de protéines dans les échantillons du LCR des patients tumoraux et non tumoraux.

Les échantillons tumoraux (T) n = 2, les échantillons non tumoraux (NT) n= 1.

Cette étude a été faite uniquement selon la présence ou non de tumeurs, un échantillonnage plus important permettrait de faire des analyses plus conséquentes, afin de comparer entre l'âge et le sexe des patients.

L'utilisation des résultats obtenus pour le sang et le LCR sont insuffisants, pour permettre l'analyse clinique des tumeurs cérébrales. De ce fait, dans la continuité de notre travail, nous avons mesuré le taux d'hormones dans le sang et LCR chez des patients atteints de tumeurs cérébrales afin de dégager une signature moléculaire spécifique.

III.2 -RESULTAT DU DOSAGE HORMONAL

III.2.1- Dosage de l'insuline dans le sang

Le dosage immunologique des échantillons sanguins, a permis d'identifier et de quantifier l'insuline pour les échantillons tumoraux et non tumoraux, dans le but de trouver une relation entre l'expression de l'insuline et les tumeurs cérébrales.

L'insuline est une hormone impliquée dans la régulation du taux énergétique cellulaire, sa valeur plasmatique normale est comprise entre 3 et 17 μ U/ml.

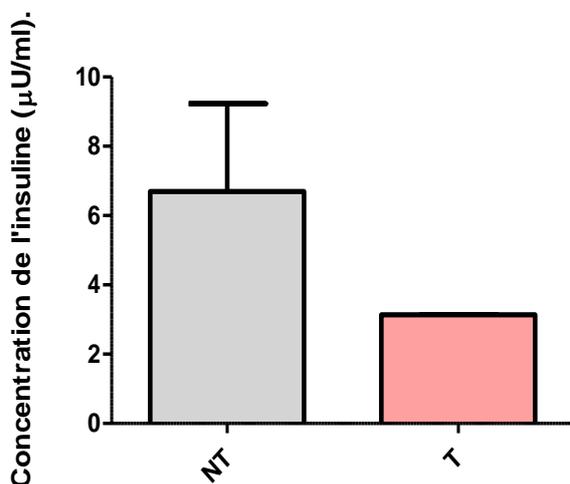
Le dosage de l'insuline dans le sang de huit patients a été réalisé au laboratoire d'analyses médicale LALAOUI de Bejaia, les résultats obtenus sont représentés dans le tableau XII.

Tableau XII : dosage de l'insuline dans le sang de patients tumoraux et non tumoraux.

NT : nos tumorale, T : tumoral

N° d'échantillon	Nature	Taux d'insuline
202/16	NT	5,08
367/16	NT	6,36
291/16	NT	5,20
337/16	NT	5,83
305/16	T	3,14
301/16	NT	7,39
368/16	NT	12,10
205/16 (Témoin absolu)	NT	4,90

A.



B.

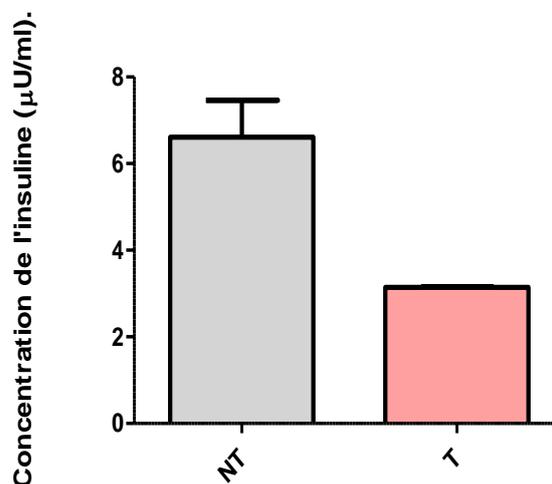


Figure 16 : Comparaison du taux d'insuline entre les patients. **A.** Comparaison du taux d'insuline entre les patients tumoraux et les non tumoraux. Non tumoraux (NT) n = 7, tumoraux (T) n=1. **B.** Comparaison du taux d'insuline entre les patients tumoraux et les non tumoraux chez les femmes. Non tumoraux (NT) n=2, tumoraux (T) n=1.

Pour les deux analyses réalisées précédemment, nous avons remarqué qu'il existe une différence du taux d'insuline chez les patients. Par ailleurs, Alexandru et ses collaborateurs ont mesuré le taux d'insuline chez les patients atteints de tumeurs cérébrales et ont découvert que ce taux est élevé, et se situe entre 30 et 44 $\mu\text{U/ml}$ dans les astrocytomes comparés aux autres tumeurs. (Alexandru *et al.*, 2014).

Le taux de l'insuline compris entre les valeurs normales chez le patient atteint d'une tumeur, peut être dû à ce que ce dernier est atteint d'un type de tumeur cérébrale qui ne provoque pas la surexpression de cette hormone.

III.2.2- Dosage de la progestérone et de l'œstradiol dans le LCR des patients

Le dosage des hormones : progestérone et œstradiol au niveau du LCR de trois patients a été faite au niveau du laboratoire d'analyse médicale LALAOUI, et les résultats sont représentés dans le tableau XIII.

Tableau XIII : les taux de la progestérone et de l'œstradiol au niveau du LCR des patients

NT : non tumoral, T : tumoral

N° échantillon	Nature	Progestérone $\mu\text{g/ml}$	Œstradiol $\mu\text{g/ml}$
184/16	T	0,13	0,066
311/16	NT	2,60	0,071
302/16	T	0,03	0,093

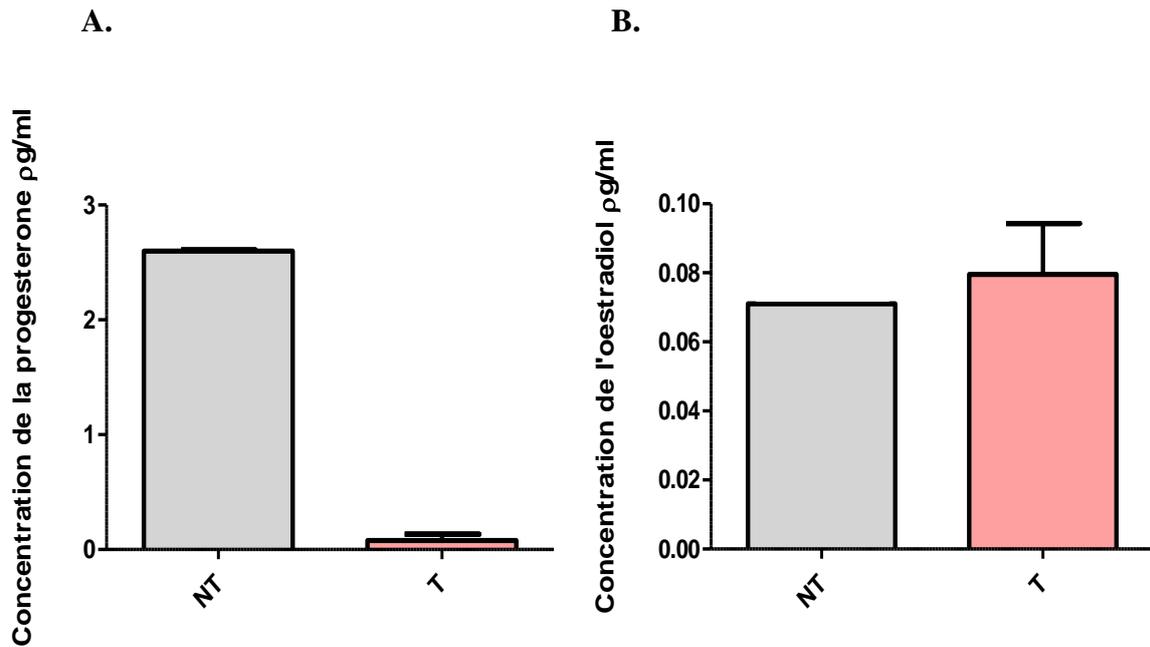


Figure 17 : comparaison des taux de la progestérone et de l'œstradiol entre les patients. **A.** comparaison des taux de progestérone entre les patients tumoraux et le non tumoraux. Non tumoraux (NT) n= 1, tumoraux (T) n=2. **B.** comparaison des taux de l'œstradiol entre les patients tumoraux et les non tumoraux. Non tumoraux (NT) n=1, Tumoraux (T) n=2.

En comparant les taux de la progestérone et de l'œstradiol entre les patients tumoraux et les patients non tumoraux (Figure 18), on remarque la présence de taux similaires d'œstradiol. En outre, le dosage de la progestérone présente un taux élevé chez le patient non tumoral. Ceci peut être dû à la pathologie de ce dernier qui présente une contusion cérébrale. En effet, l'un des rôles de la progestérone dans le cerveau est son intervention dans la plasticité neuronale (**Inoue et al., 2002**), d'où son augmentation probable chez ce patient. Par ailleurs, selon cette différence de concentration de la progestérone, on pourrait être amené à penser que soit le processus de plasticité des neurones est différent entre le cas tumoral et le cas normal, ou que ce processus est le même dans les deux cas, sauf que les cellules tumorales sont plus sensibles à la progestérone donc elles auraient besoins d'une faible quantité de cette hormone. Enfin pour prouver nos théories, il faudrait avoir un plus grand échantillonnage qui permettrait non seulement de répondre à nos hypothèses mais aussi de continuer notre recherche sur une corrélation entre les tumeurs cérébrales et les hormones analysées dans cette étude ou avec d'autres hormones.

Conclusion

&

Perspectives

Conclusion et perspectives

Les tumeurs cérébrales présentent une très forte hétérogénéité et un sérieux problème de santé, par rapport aux autres tumeurs, vu les différentes cellules qu'elles peuvent toucher et leur localisation qui peut être au niveau d'une partie importante du cerveau. De plus, les méthodes utilisées en clinique afin de les diagnostiquer et de donner un pronostic aux patients restent très limitées, d'où notre recherche sur des molécules spécifiques qui permettraient de les étudier.

A cet effet, notre travail s'est intéressé dans un premier temps, à analyser les échantillons sanguins et LCR des patients, afin de chercher une corrélation entre les taux protéiques et les tumeurs cérébrales. Les résultats obtenus montrent une différence de concentration entre les patients tumoraux et les non tumoraux. Toutefois, cette différence obtenue est contradictoire comparée aux études faites précédemment, qui ont montré une similitude des taux protéiques. De plus, les patients non tumoraux présentent d'autres pathologies, ce qui peut amener à des taux élevés de protéines comparés à la normale. Par conséquent, le dosage colorimétrique des protéines plasmatiques et du LCR ne peut prédire la pathologie des patients atteints de tumeurs cérébrales.

Notre travail s'est porté par la suite sur le dosage hormonal dans le sang et le LCR des patients. Les résultats du taux d'insuline dans le sang se situaient entre les valeurs normales, ce qui nous amène à penser que dans notre cas, la tumeur cérébrale n'influence pas l'expression de cette hormone. De plus, le dosage de l'œstradiol dans le LCR n'a pas permis de déceler aucune différence entre les patients tumoraux et non tumoraux. Cependant, les résultats du dosage de la progestérone dans le LCR ont montré que ce taux chez les patients tumoraux était similaire, mais plus faible que celui du patient (311/16) non tumoral, ce dernier présente une contusion cérébrale et c'est la raison pour laquelle le taux de la progestérone est élevé vu son important rôle dans le cerveau.

Au final, dans l'optique de continuer notre étude, il faudrait disposer d'une plus grande cohorte. Ce nombre élevé d'échantillons en prenant en compte, l'âge et le sexe des patients, sera un avantage pour confirmer ou infirmer nos résultats. Ensuite, il serait intéressant de corréler les résultats de l'expression des hormones avec l'expression de leurs récepteurs spécifiques dans le cerveau, afin d'étudier leur possible implication dans le développement des tumeurs cérébrales

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

en utilisant différentes techniques telles que la QRT PCR et par les techniques de colocalisation et d'immunohistochimie.

Des études ont été réalisées sur l'approche du métabolome en analysant les métabolites mitochondriaux afin de les identifier comme marqueurs tumoraux, comme le cas par exemple du 2 Hydroxyglutarate qui est utilisé dans le domaine clinique comme marqueur de diagnostic et de bon pronostic dans les tumeurs cérébrales et qui reflète le plus souvent l'état mutationnel des gènes IDH. Pour cela, il est nécessaire d'établir un profilage des métabolites dans une perspective intégrative du métabolome, en utilisant des techniques d'HPLC, de RMN ou de spectroscopie de masse qui permettent de qualifier et de quantifier les différents métabolites cellulaires.

Annexes 1

Tableau : les fonctions de chaque lobe constituant le cerveau (Inca,2010)

Lobes	Principales fonctions
Lobes frontaux	Parole et langage, raisonnement, mémoire, prise de décision, personnalité, jugement, mouvements. Le lobe frontal droit gère les mouvements du côté gauche du corps, et inversement, le lobe frontal gauche gère les mouvements du côté droit
Lobes pariétaux	Lecture, repérage dans l'espace, sensibilité. Là aussi, le lobe pariétal droit gère la sensibilité du côté gauche du corps et réciproquement
Lobes occipitaux	Vision
Lobes temporaux	Langage, mémoire, émotions

Annexe 2

Tableau : Classification histologique simplifiée des tumeurs intracrâniennes(Louis et al 2007)

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

Annexes 3

Tableau 06 : Estimation de l'incidence des tumeurs du cerveau et du système nerveux dans le monde, les pays plus développés et les pays moins développés (OMS - globocan, 2012).

POPULATION	*Quality	Numbers	Crude Rate	ASR (W)	Cumulative risk
World		256213	3.6	3.4	0.34
More developed regions		88967	7.1	5.1	0.50
Less developed regions		167246	2.9	3.0	0.30
WHO Africa region (AFRO)		6440	0.7	1.0	0.10
WHO Americas region (PAHO)		51730	5.4	4.8	0.47
WHO East Mediterranean region (EMRO)		19572	3.1	3.9	0.39
WHO Europe region (EURO)		66487	7.4	5.5	0.54
WHO South-East Asia region (SEARO)		29763	1.6	1.7	0.17
WHO Western Pacific region (WPRO)		82184	4.5	3.7	0.36

Annexe 4

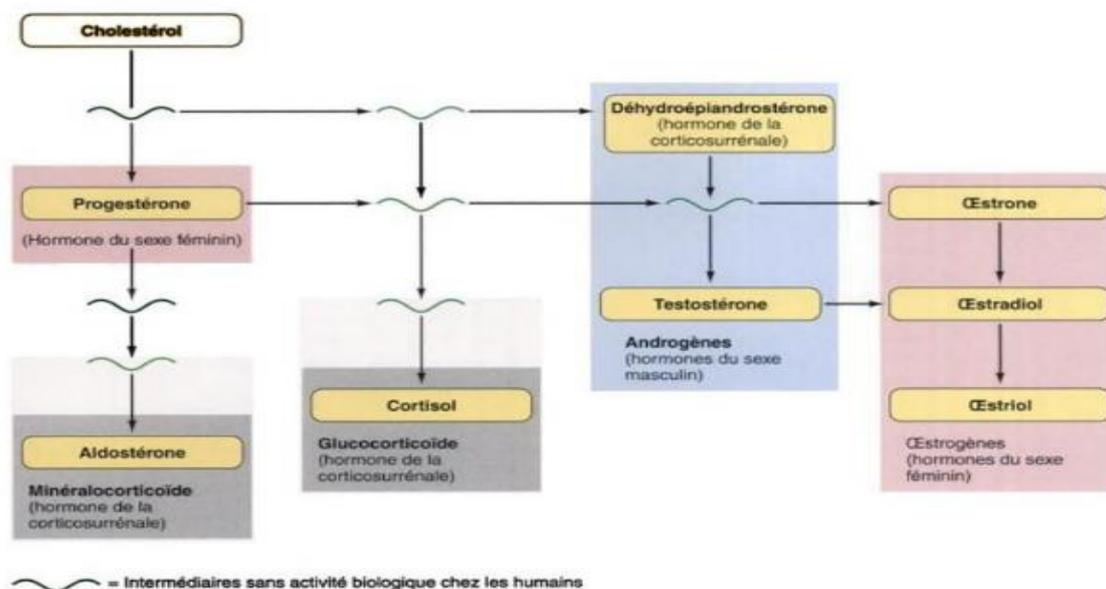


Figure : voie de synthèse des différentes hormones stéroïdiennes (Sherwood, 2006). Toutes les hormones stéroïdiennes sont produites par des réactions enzymatiques en série qui modifient la molécule de cholestérol en modifiant les chaînes latérales.

Annexes 5

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

1- Matériel utilisé

Balance ;
Centrifugeuse ;
PH-mètre ;
Spectrophotomètre à balayage;
Vortex ;

2- Produits utilisés

BSA (Bovin Sérum Albumin) ;
Bleu de coomassie G250 ;
Ethanol ;
Méthanol ;
Acide phosphorique ;
Eau distillée ;

Résumé

Les tumeurs cérébrales représentent malgré leur rareté relative, un problème de santé publique majeure à cause de la mortalité. Cet état de fait nécessite une meilleure approche diagnostic et thérapeutique par la recherche de marqueurs tumoraux spécifiques. Le but de notre étude est de déterminer les concentrations protéiques totales et hormonales présentes dans le LCR et le sérum de patients atteints de tumeurs cérébrales en les comparant avec ceux des non tumoraux. Les hormones prises en compte dans ce travail sont l'insuline, la progestérone et l'œstradiol et les résultats obtenus montrent qu'il existe une différence entre les concentrations protéiques totales ainsi que les taux d'hormones entre les échantillons tumoraux et non tumoraux. Enfin, notre approche expérimentale s'avère être intéressante pour l'identification d'une bio signature hormonale caractéristique des tumeurs cérébrales. Ceci permettra dans le futur de poser un diagnostic et un pronostic précoce, précis et peu coûteux de ces pathologies.

Mots clés : tumeurs cérébrales, marqueurs tumoraux, liquide biologique, métabolome, hormone.

Abstract

Brain tumors represent a major public health problem, which leads to the death of several people around the world. This fact requires a better diagnostic and therapeutic approach by researching for specific tumor markers. The aim of our study is to compare the total protein and hormone concentration in CSF and serum of patient with brain tumor and those of non-tumoral patients. In this study, the measured hormones were progesterone, estradiol and insulin. The results show that there is a difference in the previous measure between the tumor and non tumor samples. Finally, our experimental approach proves to be useful for identifying a characteristic hormonal signature in brain tumors. This will allow us in the future to have an earliest, accurate and inexpensive diagnostic and prognostic of these diseases.

Key words : brain tumor, tumor markers, biological fluid, metabolome, hormone.

الملخص

تمثل أورام المخ على الرغم من ندرتها النسبية، مشكلة صحية رئيسية التي تؤدي إلى الوفاة، الأمر الذي يتطلب البحث عن علامات محددة لتشخيص وعلاج هذا الورم. الهدف من دراستنا هو تحديد تركيز الهرمونات والبروتينات الكلية الموجودة في السائل النخاعي والدم لدى المرضى الذين يعانون من أورام الدماغ ومقارنتها مع الأشخاص الذين يعانون من أمراض أخرى. الهرمونات التي اتخذت حيز التنفيذ في هذا العمل هي الأنسولين، البروجسترون والإسترايول. وأظهرت النتائج أن هناك فرقا بين مجموع تركيز البروتينات ومستويات الهرمونات لدى العينات المصابة بالورم وغير المصابة. هذا المنهج التجريبي يبرز أهمية مهمة ومفيدة في المستقبل للتعرف على مركبات هرمونية جديدة مميزة لعلاج وللتشخيص المبكر والدقيق لأورام المخ.

كلمات مفتاحية : ورم في المخ- علامة بيولوجية- هرمون-السائل البيولوجي-الا. ضات