

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

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



Réf:.....

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

MASTER

Thème

**Etude biochimique et protéomique du
Liquide Céphalo-Rachidien de patients
atteints de tumeurs cérébrales**

Présenté par :

BOUTRID Linda & HAMMA Lilia

Soutenu le : **10 Juin 2015**

Devant le jury composé de :

M^{lle} AIT ALI

M^r GHIDOUCHE

M^{me} ATMANI

M^r TAKBOU.

MAB, A/MIRA BEJAIA

MCB, A/MIRA BEJAIA

MCA, A/MIRA BEJAIA

MAA, A/MIRA BEJAIA

President

Encadreur

Examinatrice

Invité

Année universitaire : 2014 / 2015

Remerciements

Avant toute chose, Ontient à remercier Dieu le tout puissant de nous avoir donné la force et la patience de mener à bien ce travail,

Nos familles et nos amis qui ont toujours étaientlàpour nous, et nous ont toujours soutenues,

On remercie Dr KHETTAL ainsi que les techniciennes de son laboratoire, spécialement : SAIDA et HABIBA, de nous avoir accepté dans le laboratoire et de mettre à notre disposition le matériel nécessaire pour nos Manipulations,

Mr HAMOUM et son équipe du laboratoire de biophysique qui nous ont donné l'occasion d'effectuer la méthode d'électrophorèse,

On remercie également le service de neurochirurgie du CHU de BEJAIA, de nous offrir les échantillons nécessaire pour la réalisation de cette étude, on cite alors ; PTLIBA, Dr TAKBOU, Dr KECHFOUD, Dr CHANA et M^{me} BELKHIR,

On tient également à remercier Dr AIT ALI, pour son aide et conseils précieux, pour sa disponibilité et sa gentillesse.

M^{lle} KHIRIEDDINE pour son aide et sa serviabilité.

Ce mémoire n'aurait sans doute jamais abouti si on n'avait pas eu la chance d'être encadrer par Dr GHIDOUCHE. Un grand MERCI à lui, pour sa disponibilité, pour ses conseils et encouragements, pour ses orientations et sa patience, il a toujours été compréhensif avec nous,

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

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à mes chers parents, **Rabah&Nacera**, dont le soutien morale ma marqué l'esprit, et qui m'ont encouragé à aller de l'avant. Je ne pourrais jamais les remercier assez pour tout les sacrifices qu'ont fait pour moi, que dieu les garde à mes cotés,

A mes sœurs **Naima**, **Sonia** et **Hanane**, merci pour leurs tendresse, complicité

Et leur présence,

A mon cher et unique frère **idir**, qui est toujours la pour moi, Merci à lui pour tout ce qu'il fait pour moi durant ma vie,

A mes beaux frères **Chaouki** et spécialement **Athmane**, merci à lui d'être gentille et serviable, et merci de répondre à mes besoin.

Je dédie ce travail à mes nièces adorées **Sawab** et **Lyna**, qui sont la que pour me remettre le sourire au visage. Elles représentent pour moi, la raison de mon bien être.

A toute ma famille maternelle et paternelle : grand mères et grand pères, tantes et oncles, cousins et cousines sans oublié personne.

Ce travail n'aurait sans doute pas achevé sans ma meilleure amie, mon binôme

Lilia HAMMA,

Un simple Merci à la famille HAMMA, plus spécialement tata Faiza qui a toujours été gentille, elle nous remontait toujours le morale avec ces belles paroles,

A **Mohamed**, Sans ton aide, tes conseils et le confort, je ne serais sans doute pas arrives là où j'en suis aujourd'hui, merci pour ton appui qui m'a apporté conseils et encouragements à travers ce travail,

A tous mes amis et toute la promotion Biochimie appliquée 2015, je citerais Asma, Nouna, Samia, Chahinez, Sihem, Khira, Celia, Sihem, Hafsa, Nawel, Souad, Thanina et Warda, ainsi je n'oublie pas de remercier Samira.

A mon Encadreur Dr GHIDOUCHE A, sans qui je n'aurais sans doute pas réalisé ce thème.

LINDA

Je dédie ce mémoire,

A la mémoire de mon **Papa** chéri, Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour lui. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de ces sacrifices qu'il a consentis pour mon éducation et ma formation. Que dieu lui procure son vaste paradis,

A ma très chère **maman**, tu représentes pour moi le symbole de la bonté, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur,

A mes deux chère frère **Fayçal** et **Fahim**, les mots ne suffisent guère pour exprimer, l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous. Mes fidèles compagnons dans les moments les plus délicats, mon soutien moral et matériel, sans vous je ne serais sans doute pas arrivés là où j'en suis aujourd'hui,

A mon très cher oncle **Zahir** qui a été pour moi le deuxième papa, tu as toujours été présent pour les bons conseils. Ton affection et ton soutien m'ont été d'un grand secours pour me permettre d'atteindre cette étape de ma vie. Veuillez trouver dans ce modeste travail ma reconnaissance pour tous vos efforts,

A mes belles sœurs **Rachida** et **Sonia**, votre soutien moral votre gentillesse et conseils m'ont été d'une grande aide. Et mes deux petites nièces **Massilya** et **Anièce** mes plus grande source de bonheur, j'espère que la vie leurs réserve le meilleure,

A mes cousines **Marina**, **Souad**, **Louiza**, **Amina** et **Safia** vous êtes pour moi des sœurs et des amis sur qui je peux compter. Je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur,

A tous les membres de ma famille, tantes et oncles, petits et grands. Veuillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection,

A mon binôme **Linda** ma confidente et à toute la famille **BOUTRID**, je vous remercie pour votre hospitalité sans égal et votre affection si sincère,

A mes chères ami(e)s **Sofiane**, ton soutien moral, ta gentillesse sans égal m'ont permis de réussir mes études. **Aimed** sans ton aide, tes conseils et le confort ce travail n'aurait vu le jour. **Amel**, **Camélia**, **Meryem**, **Nabila** et **Yasmine**. En témoignage de l'amitié qui nous uni et des souvenirs de tous les moments que nous avons passé ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur,

A mon Encadreur **Dr, Ghidouche** un profond respect et un remerciement particulier et sincère pour ces conseils et son suivi durant la réalisation de ce projet.

LILIA

Sommaire

Liste des Abréviations

Liste des Figures

Liste des tableaux

Introduction générale.....1

Chapitre I : Revue bibliographique

I.1. Généralité sur la Tumorigénèse 2

I.2. Cerveau 3

I.2.1. Anatomie..... 4

I.2.1.1. Télencéphale 4

I.2.1.2. Diencephale..... 5

I.2.2. Cellules du système nerveux..... 5

I.3. Mécanisme de la Neurogenèse 6

I.3.1. Neurogenèse embryonnaire 6

I.3.2. Neurogenèse Adulte..... 7

I.4. Tumeurs cérébrales 7

I.4.1. Signes cliniques 7

I.4.2. Classification..... 8

I.4.3. Différences entre tumeurs cérébrales adultes et enfants 8

I.4.4. Bases moléculaires des tumeurs cérébrales 8

I.5. Marqueurs tumoraux 10

I.6. Liquides Biologiques.....	12
I.6.1. Urines.....	12
I.6.1.1. Mécanisme de formation des urines (Diurèse)	12
I.6.2. Liquide Céphalo-rachidien.....	12
I.6.2.1. Physiologie du LCR.....	12
I.7. Facteurs protéiques influençant le développement du cerveau	13
I.7.1. BDNF : Brain-Driven Neurotrophic Factor	13
I.7.2. NGF : Nerve Growth Factor	14
I.7.3. BMP-2 : Bone Morphogenetic Protéin-2	14
I.7.4. Endotheline	15
I.7.5. FGF-2 : Fibroblast Growth Factor-2.....	15
I.7.6. Neureguline-1	16
I.7.7. GGF: Glial Growth Factor	17

Chapitre II: Méthodes ET Résultats

II.1. Méthodes d'analyses	18
II.1.1. Méthodes quantitatives	1
II.1.1.1. Méthode de Biuret	18
II.1.1.2. Méthode de Lowry.....	18
II.1.1.3. Méthode de Bradford.....	18
II.1.1.3.1. Dosage protéique des urines	20
II.1.1.3.2. Dosage protéique du Liquide Céphalo-Rachidien.....	25

II.1.2. Méthodes qualitatives	28
II.1.2.1. Méthode MALDI-TOF	28
II.1.2.2. Electrophorèse SDS-PAGE	28
II.1.2.2.1. Profil des échantillons urinaires	30
II.1.2.2.2. Profil des échantillons du Liquide Cérébro-spinal	32

Chapitre III : Discussion ET Conclusion

Discussions et Conclusions	35
Références Bibliographiques	39

Annexes

Résumé

Liste des Abréviations

ASP: Antigène Spécifique de la Prostate.

BDNF: Brain-Driven Neurotrophic Factor.

BHE : Barrière Hémato Encéphalique.

BLBP: BrainLipid-BindingProtein.

BMP-2: Bone Morphogenetic Protéin-2.

BMPR: Bone Morphogenetic Protéin Recepteur.

BSA : Bovin SerumAlbumin.

CEA: CarcinoEmbryonicAntigen

CGRP: Calcitonin Gene-Related Peptide.

CREB : C-AMP ResponseElement-BindingProtein.

CSN: Cellules Souches Neurales.

εCE: Enzyme de Conversion d'Endotheline.

EDTA : Ethylène Diamine Tétra-Acétique.

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor.

ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase.

Et: Endothelin.

FGF-2: Fibroblast Growth Factor-2.

FGFR: Fibroblast Growth Factor Receptor.

GD : Gyrus Denté.

GFAP: Glial Fibrillary Acidic Protein.

GGF: Glial Growth Factor.

LCR: Liquide Céphalo-Rachidien.

LCS: Liquide Cérébro-spinal.

MGMT: O6-Méthylguanine-Methyltransferase.

MT : Marqueurs Tumoraux.

NF2 : Neurofibromin 2.

NGF: Nerve Growth Factor.

NF-κB: Nuclear Factor-kappa B.

NRG: Neuregulin.

Olig: Oligodendrocytes Transcription Factor.

PI3K: Phosphatidylinositol 3-Kinase.

PLC: Phospholipase C.

PM: Poids Moléculaire.

P75NTR: Pan-Neurotrophin Receptor.

Ras-MAP: Mitogène-Activated Protéine kinase.

RSV: Région Sous-Ventriculaire.

SHH: Sonic Hedgehog.

SN: Système nerveux.

SP: Substance P.

TGF: Transforming Growth Factor.

TNFR: Tumor Necrosis Factor Receptor.

TNF: Tumoral Necrosis Factor.

Trk: Receptor Tyrosine Kinase.

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor.

Wnt : mutation de la bêta-caténine.

Liste des figures

Figure 1: Représentation schématique de la composition du cerveau selon Maclean.

Figure 2: Représentation schématique des différents lobes du cerveau.

Figure 3: Représentation schématique des cellules du système nerveux.

Figure 4: Représentation schématique des altérations génétiques impliquées dans les différentes voies de la progression des Gliomes.

Figure 5: La courbe d'étalonnage.

Figure 6: Les échantillons urinaires et le réactif de Bradford utilisé.

Figure 7 : Représentation graphique de la comparaison entre les concentrations protéique chez les patients tumoraux et non tumoraux.

Figure 8 : Représentation graphique de la comparaison entre les concentrations protéique chez les mâles et les femelles et selon leurs pathologies.

Figure 9: Représentation graphique de la comparaison entre les concentrations protéique selon les tranches d'âge et la pathologie.

Figure 10 : Les échantillons du Liquide Céphalo-Rachidien utilisés.

Figure 11: Représentation graphique de la comparaison entre les concentrations protéique selon la pathologie.

Figure 12: Représentation graphique de la comparaison entre les concentrations protéique selon les tranches d'âge.

Figure 13: Profil électrophorétique des échantillons urinaires sur le gel de 10% à concentration protéique de 120µg/ml.

Figure 14: Profil électrophorétique des échantillons d'urines sur gel de 15% à concentration protéique de 120µg/ml.

Figure 15: Profil électrophorétique des échantillons du LCR sur gel de 10% à concentration protéique de 100µg/ml.

Figure 16: Profil électrophorétique des échantillons du LCR sur gel de 15% à concentration de 120µg/ml.

Liste des Tableaux

Tableau 1: Tableau récapitulatif de différents marqueurs de tumeurs cérébrales déjà connu

Tableau II: Résultats d'absorbance de la gamme étalon.

Tableau III: Information et résultats de d'absorbance et de concentration de différents échantillons urinaires.

Tableau IV: Informations et résultats des Absorbances et de concentrations de chaque des échantillons du LCR.

Les données actuelles sur les pathologies cancéreuses dans le monde, révèlent que les tumeurs sont un problème de santé publique majeur, en effet d'après les statistiques de l'organisation mondiale de la santé (OMS), le nombre de nouveaux cas est d'environ 14 millions et 8 millions de décès par an. Les pathologies tumorales sont classées selon leurs types histologiques et leurs degrés d'évolution (grade); Les tumeurs pulmonaires par exemple, sont considérées comme les plus fréquentes des pathologies tumorales chez l'adulte, en effet elles représentent environ 30%; alors que chez l'enfant (de moins de 15 ans) les tumeurs cérébrales représentent à elles seules 25-30% de tumeurs pédiatriques.

Actuellement, les principales approches dans le traitement des tumeurs sont dites des thérapies classiques, qui englobent : la chirurgie, la radiothérapie et/ou la chimiothérapie, ces dernières semblent atteindre leurs limites, en vue des chiffres de survie donnés par l'OMS, quant au nombre de décès annuels cela a conduit les chercheurs à explorer non seulement de nouvelles approches thérapeutiques, mais aussi d'éventuelle identification de signature moléculaire et de facteurs pronostic nommés « marqueurs tumoraux » (MT). Il existe différents type de marqueurs dont ceux présents dans les liquides physiologiques tel ; les urines et le Liquide Céphalo-Rachidien (LCR), qui à présent considéré comme liquide biologique préférentielle pour une future stratégie de diagnostic des maladies atteignant le système nerveux central (SNC), au cour desquelles la composition et la concentration protéique du LCR se trouve fréquemment modifiée, notamment la concentration de: BDNF, NGF, GGF, FGF-2, Neuregulin-1, Endotheline ,et BMP-2. Car ils ont une action sur des récepteurs (erbB, FGFR, EGFR) connues comme étant des acteurs majeurs de la progression tumorale.

En vue de ce qui est cité précédemment, et l'état de développement des tumeurs cérébrales en Algérie particulièrement à Bejaia, comme le rapporte l'étude épidémiologique des tumeurs cérébrales : cas du CHU de Bejaia, (Ghidouche et *al.*, 2014). Nous nous sommes proposé de mener une étude biochimique et protéomique sur les tumeurs cérébrales, d'une cohorte de patients atteint de tumeurs cérébrales et des patients non tumoraux. Notamment par dosage colorimétrique des concentrations protéiques et l'identification du profil protéomique de ces liquides par électrophorèse SDS-PAGE, ceci va peut-être nous permettre d'identifier une signature moléculaire différentielle.

Synthèse Bibliographique

I.1. Généralité sur la Tumorigénèse

Une tumeur est par définition, un amas de cellules ayant perdu l'équilibre entre la division et l'apoptose. Cela est dû à l'accumulation de mutations. En effet, Knudson a suggéré que : « La cellule n'est capable d'initier une tumeur que si elle contient deux mutations successives des allèles d'un même gène dans des formes : soit héréditaire ou sporadique (acquise) » (Knudson, 1971). Toutefois, il existe une deuxième théorie, qui stipule qu'une tumeur peut être aussi déclenchée par des cellules souches cancéreuses, dont la capacité de prolifération est indéfinie et peuvent donner naissance à toutes les autres cellules de la masse tumorale (Ginestier *et al.*, 2007).

Selon un processus qui comporte quatre phases à savoir : l'initiation, la promotion, la progression et l'invasion. On distingue deux types de tumeurs : les tumeurs bénignes et les tumeurs malignes (Schalken, 1992).

- Les tumeurs bénignes : dont la croissance est lente, reste localisées aux niveaux de leur site d'origine, toutefois, dans certains cas elles peuvent dériver et devenir malignes.

- Les tumeurs malignes : leur croissance est rapide, et peuvent s'étendre dans les tissus avoisinant ou bien se disséminer vers les organes distants (Stevens *et al.*, 2004).

La cellule tumorale maligne représente une rupture de la balance de l'équilibre entre signaux prolifératifs et antiprolifératifs en faveur des signaux prolifératifs, ainsi elle échappe au système immunitaire et à l'apoptose, exprimant également quelques autres caractéristiques telles que :- Potentiel prolifératif illimité.

- Instabilité génomique et mutation.
- Activation de l'angiogenèse.
- Invasion et dissémination métastatique.

Ces différentes caractéristiques jouent un rôle fondamental dans le processus de formation d'une tumeur, notamment dans les tumeurs cérébrales (Hanahan et Weinberg, 2011).

I.2. Cerveau

Le cerveau, l'organe le plus complexe du corps humain, se forme à partir du tube neural, au cours de la quatrième semaine post-fécondation (Ross, 2014). Il est protégé contre les chocs par des cavités osseuses entourées du liquide céphalo-rachidiens et les méninges (la dure mère, l'arachnoïde et la pie mère) (Pearl *et al.*, 1981). Selon la théorie de Maclean, le cerveau humain est constitué de trois parties distinctes : le cerveau reptilien, le cerveau limbique et le néocortex (**Figure 1**) (MacLean, 2002).

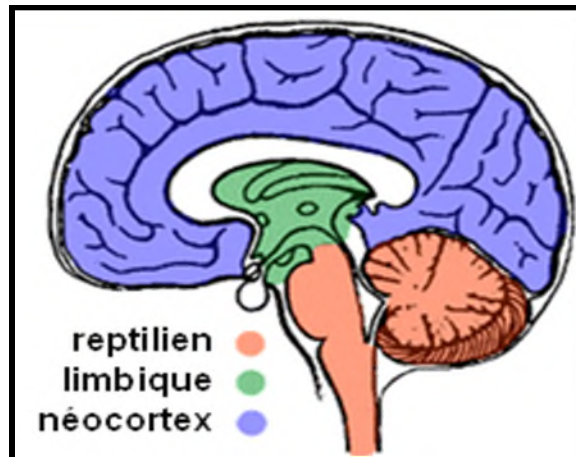


Figure 1: Représentation schématique de la composition du cerveau selon Maclean. (MacLean, 2002)

- Le cerveau reptilien : Chez l'homme, il correspond au tronc cérébral et le cervelet, il est le système de survie et d'expression des besoins.
- Le cerveau limbique : Responsable des émotions et de la sensation, influence le comportement. Il comprend principalement l'hippocampe, l'amygdale et l'hypothalamus.
- Le néocortex : Il est le résultat de la troisième et dernière phase de l'évolution de notre cerveau, et permet le raisonnement logique et le langage.

Afin que les cellules de l'encéphale puissent jouer leur rôle physiologique, il est important que l'environnement dans lequel elles se trouvent soit stable. La Barrière Hémato Encéphalique (BHE) qui se trouve entre la circulation sanguine et le système nerveux central (SNC), est un élément essentiel pour une homéostasie parfaite. (Marieb, 2008)

Dans le cas physiologique, la BHE est sélectivement imperméable à un certain poids moléculaire (600 Da). Les molécules liposolubles ayant un petit poids moléculaire traversent facilement la BHE, le glucose est un exemple de molécule qui utilise des transporteurs spécifiques (Ballabh *et al.*, 2004).

Dans des conditions physiopathologiques, notamment dans le cas d'une tumeur, l'activité des métalloprotéases augmente, induisant le clivage des protéines et par conséquent, elles participent à la pénétration de ces peptides vers le liquide cérébro-spinal à travers la BHE, dont la perméabilité augmente de 10 à 30 fois par rapport au cerveau sain (Marieb, 2008; Rousseau, 2007) (Bauer *et al.*, 2010).

I.2.1. Anatomie

La vision de l'organisation neuro-anatomique selon Maclean est aujourd'hui controversée. En effet, le cerveau est subdivisé en télencéphale et diencephale.

I.2.1.1. Télencéphale

Il constitue deux hémisphères cérébraux : gauche et droit, qui sont divisés en quatre lobes (le lobe frontal, pariétal, occipital et temporal) (**Figure 2**). Il est entouré du cortex cérébral. (Pearl, *et al.*, 1981) Chaque lobe comporte des aires cérébrales appelées aussi aires de Brodmann comportant 52 aires, dont chacune a une fonction bien propre telle que : l'aire auditive, l'aire motrice, et l'aire de Broca qui est la zone de production des mots, contrairement à l'aire de Wernicke dont le rôle est la compréhension de ces mots. (Brodmann K, 1909)

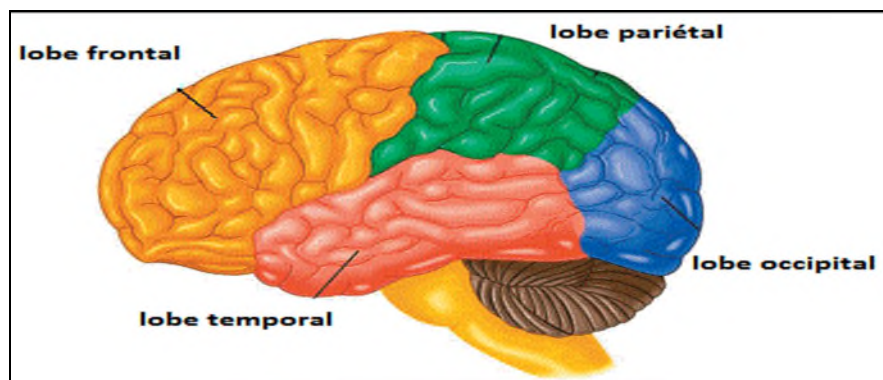


Figure 2: Représentation schématique des différents lobes du cerveau (Adapté de l'INC, 2010).

Le lobe frontal: contrôle la pensée, la mémoire, et le raisonnement. Le lobe pariétal: gère la lecture, l'équilibre, et la sensibilité. Le lobe occipital : responsable de la vision. Le lobe temporal : gère les émotions, la mémoire et le langage.

I.2.1.2. Diencephale

Les hémisphères cérébraux recouvrent une partie du cerveau qui constitue le thalamus, l'hypothalamus et l'épithalamus nommée le diencephale. (Marieb, 2008) son rôle est l'intégration des fonctions sensorimotrices, neurovégétatives et neuroendocriniennes. (Delaiey, 1953)

I.2.2. Cellules du système nerveux

Les cellules caractéristiques du système nerveux sont : Les neurones, les cellules gliales (les oligodendrocytes, les astrocytes, les cellules de Schwann, les cellules épendymaires), et les microglies. Voir **Figure 3**.

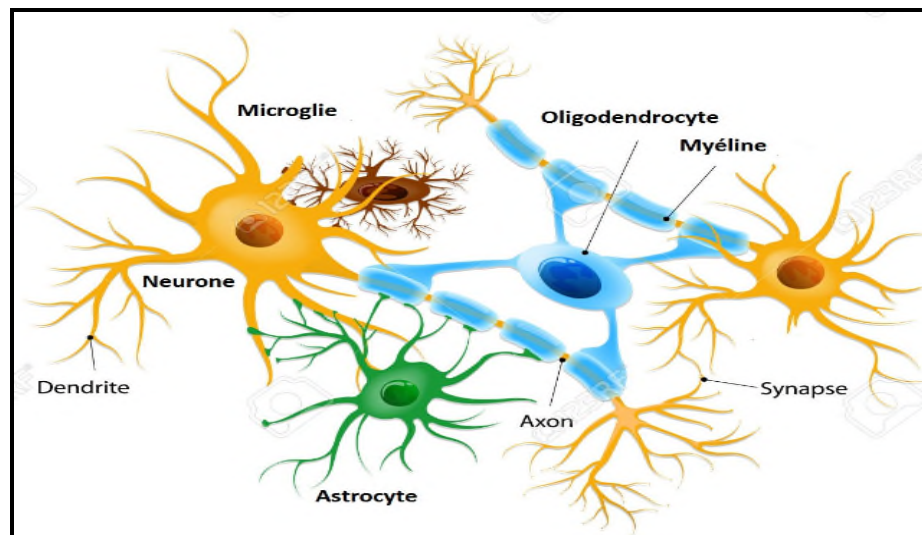


Figure 3: Représentation schématique des cellules du système nerveux. Modifier d'après

➤ Les neurones : Ce sont des cellules hautement différenciées et spécialisées dans la communication intercellulaire, constituées de trois compartiments : corps cellulaire, les dendrites et axone. (André *et al.*, 2008)

➤ Les cellules gliales : contrairement aux neurones qui ont la même architecture, elles représentent un large spectre de cellules notamment les astrocytes, les oligodendrocytes, les cellules de Schwann et les cellules épendymaires qui servent de soutien et de protection des neurones. (Stevens *et al.*, 2004)

- Les astrocytes : généralement de forme étoilée assure le maintien de la BHE.
- Les oligodendrocytes : sont des cellules de la névroglie interstitielle dont le rôle est la formation de myéline au niveau du SNC.

- Les cellules de Schwann : sont des cellules de soutien et assurent la myélinisation des neurones.
- Les cellules épendymaires : leurs fonction est d'assurer l'interface entre le SN et le LCS.

Les microglies, un type particulier des cellules gliales d'origine monocyttaire. Constitué de macrophage qui résident au niveau du cerveau et de la moelle épinière formant ainsi la principale défense immunitaire.(Stevens *et al.*, 2004)

I.3. Mécanisme de la Neurogenèse

La neurogenèse correspond à l'ensemble des processus de prolifération puis de différenciation cellulaires conduisant à la formation de neurones. Les cellules souches neurales prolifèrent puis se différencient en neuroblastes qui donnent naissance aux neurones et les cellules gliales. Dans le processus de formation du cerveau, les neurones sont des cellules post-mitotique qui perdent la capacité de se diviser, et sont les premières à apparaître, tandis que les cellules gliales qui ont la capacité de continuer à proliférer localement sont formées par des mécanismes différents, plus tardivement. (Alvarez-Buylla *et al.*, 2001).

On distingue :

I.3.1. Neurogenèse embryonnaire

Durant laquelle le cerveau se forme en plusieurs étapes (Lagercrantz, 2010).

- Formation de neurones à partir des cellules souches neurales
- Migration de neurones formés de la plaque neurale vers le tube neurale et formation de la crête neurale
- Formation des cellules gliales. Certaines cellules se transforment en neurones, d'autres en cellules gliales, qui composent une grande partie de la matière blanche du cerveau.
- Synaptogenèse
- La mort cellulaire programmée : les neurones fonctionnels continuent à se développer, les non fonctionnels sont éliminés par apoptose.
- Câblage et réorganisation. Les aires cérébrales se connectent et s'organisent en partie en fonction des activités du nourrisson (perception visuelle, toucher, audition...).

- Myélinisation. La myéline est une gaine de protéine qui enveloppe les nerfs. Elle permet une meilleure circulation de l'influx nerveux.

I.3.2. Neurogenèse adulte

Chez l'adulte la neurogenese est un processus de régénération et de plasticité neuronale se déroulant essentiellement dans deux régions du cerveau adulte, le gyrus denté (GD) de l'hippocampe et la partie antérieure de la région sous-ventriculaire (RSV). Elle est stimulée dans les maladies neurologiques, les accidents vasculaires cérébraux et les traumatismes crâniens, cela se produit à partir des cellules souches neurales (CSN) qui sont des cellules multipotentes, d'origine gliale ou de cellules progénitrices circulant dans le sang, capables de s'autorenouveler et de produire différentes cellules du système nerveux : neurones, astrocytes et oligodendrocytes (Philippe, 2005).

I.4. Tumeurs cérébrales

La tumeur cérébrale est le résultat d'une succession de divisions incontrôlées des neurones ou des cellules gliales dans le cerveau, et rarement dans les tissus lymphatiques, les vaisseaux sanguins, les nerfs crâniens, et les méninges. Les tumeurs qui sont principalement situées dans d'autres organes peuvent se propager vers le cerveau et créer des métastases cérébrales.

I.4.1. Signes cliniques

Les tumeurs cérébrales sont contraignantes, car elles représentent énormément de signes cliniques. Ces manifestations sont en corrélation avec la localisation topographique de la tumeur (Andon *et al.*, 2005).

- Le lobe frontal : Troubles du comportement.
- L'hypothalamus : Syndrome diencephalique, déficits endocriniens.
- Le thalamus : Douleurs, déficit moteur.

I.4.2. Classifications

Il est nécessaire de trouver une classification simple, utile, et mémorisable, de l'ensemble des tumeurs cérébrales. La topographie est un critère utile, mais l'histologie de la tumeur est le critère majeur de classement puisqu'il indique le pronostic global. La classification selon l'organisation mondiale de la santé (OMS) et actuellement la plus utilisée (Hablützel, 2009).

On distingue :

- Les tumeurs d'origine neuroépithéliale, les gliomes représentent la majorité de ces tumeurs, ils sont classées de I à IV selon leur degré de malignité.

- Les tumeurs des nerfs périphériques : sont celles qui se développent au dépens des nerfs crâniens et la plupart sont des schwannomes.

- Les tumeurs méningées primitives : le plus souvent sont des méningiomes.

- Les tumeurs germinales et les tumeurs de la région sellaire ainsi que les lymphomes primitifs du SNC.

I.4.3. Différences entre tumeurs cérébrales adultes et enfants

Selon l'étude épidémiologique de (Ghidouche *et al.*, 2014) effectuée sur des patients atteints de tumeurs cérébrales admis au CHU de Bejaia. Cette pathologie touche l'adulte cinq fois plus que l'enfant. Ce dernier représente le médulloblastome (13%) et l'Astrocytome (13%) comme type histologique prédominant, le neurinome et le glioblastome ont des pourcentages respectivement de (10%) et (7%). Par contre chez l'adulte, le méningiome occupe la proportion la plus importante (16%) suivis de (12%) de glioblastome et de (9%) d'Astrocytome.

I.4.4. Les bases moléculaires des tumeurs cérébrales

Comme nous l'avons cité précédemment, les tumeurs présentent une accumulation de mutations. En effet, certaines altérations sont observées dans les tumeurs cérébrales.

- Les gliomes par exemple, sont associés à l'altération de plusieurs voies de signalisation impliquant différentes protéines et la perte chromosomale 1p-19q, comme le démontre la figure 4. L'étude (Everhard *et al.*, 2006) a montré que l'enzyme MGMT (O6-méthylguanine-

méthyltransferase) qui participe à la réparation de l'ADN est trouvé phosphorylé dans 92,6% de patient atteints de tumeur gliale de bas grade.

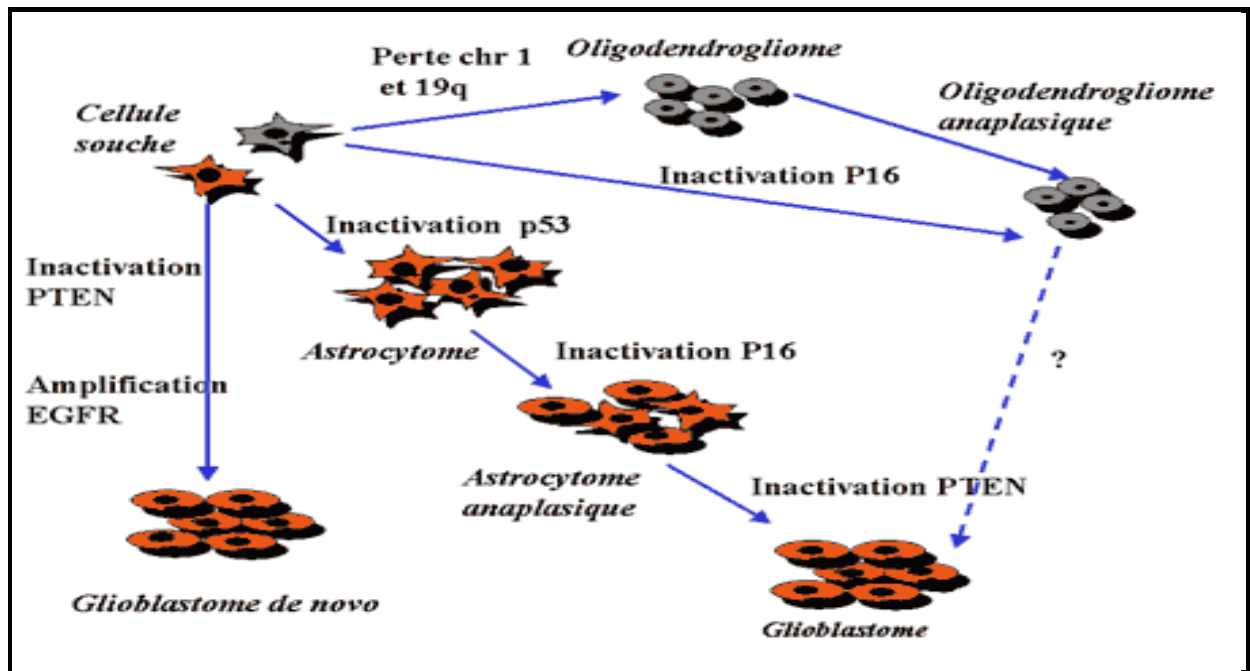


Figure 4: Représentation schématique des altérations génétiques impliquées dans les différentes voies de la progression des Gliomes. (Sanson et Taillibert, 2004).

- Le médulloblastome: Présente une dérégulation de la voie sonichedgehog (SHH), et des mutations des gènes patched et sufu, et la voie Wnt (mutation de la bêta-catenine) (Northcott et al., 2010).
- Le Schwannome (neurinome): Génétiquement, est caractérisé par une inactivation du gène NF2 sur le chromosome 22.
- Le méningiome: Fréquent chez la femme probablement à cause des facteurs hormonaux. en plus des pertes chromosomale de : 1p. 10q. 14p qui sont liées à la progression tumorale, les tumeurs des cellules méningées sont caractérisées par une inactivation du gène NF2.

I.5. Marqueurs tumoraux

Les marqueurs tumoraux sont des indicateurs biochimiques de la présence d'une tumeur. Ils représentent plusieurs types de classification, toutefois un marqueur tumoral n'est considéré idéal que s'il remplit certaines caractéristiques décrites ci-après (Sharma, 2009).

- la spécificité et la sensibilité : Il doit être sensible et spécifique pour un type de tumeur donnée.
- le pouvoir prédictif : il devrait fournir un temps d'avance sur le diagnostic clinique.
- l'évolutivité de la tumeur : Un marqueur tumoral doit refléter l'évolution tumorale c'est-à-dire la progression ou la régression tumorale (Sharma, 2009).

Les MT sont généralement des biomolécules de nature protéique ou glycoprotéique telle que le CEA (Carcino Embryonic Antigen) utilisés pour le dépistage précoce ou le diagnostic, ainsi que pour le suivi du traitement des tumeurs mammaires métastasées, et rarement des hormones comme la calcitonine, qui est utilisée pour le diagnostic des tumeurs thyroïdiennes, elle sert également à la détection précoce des récurrences. La thyroglobuline pour la surveillance et le traitement des adénocarcinomes thyroïdiens, ou des enzymes comme la PSA (ou ASP, Antigène Spécifique de la Prostate), son dosage sert principalement au diagnostic et au suivi d'évolution des cancers de la prostate (Zenhausern, 2011).

Ils correspondent à une néosynthèse par une tumeur elle-même, ou par une altération quantitative ou qualitative en condition précancéreuse ou cancéreuse. La détection de ces marqueurs peut être réalisée dans un tissu ou dans un liquide biologique tel que le sang, les urines et le liquide céphalo-rachidien. Ils peuvent être utilisés pour le dépistage, confirmer un diagnostic et prédire la réponse thérapeutique (Dubois, 2008).

Parmi les marqueurs de tumeurs cérébrales déjà connus : la protéine S-100, Olig 1 et Olig 2, GFAP, VEGF et EGFR, (tableau I) (Beaudeau, 2002).

Tableau I: Tableau récapitulatif de différents marqueurs de tumeurs cérébrales déjà connu.

Marqueurs tumoraux	Caractéristiques
S-100	- protéine synthétisée physiologiquement par les cellules astrogliales et les cellules de la gaine de Schwann. - rôle : la fixation du calcium intracytosolique. - Elle constitue un marqueur biologique de tumeurs cérébrales (Beaudeau, 2002).
Olig 1 et Olig 2 (Oligodendrocytes transcription factor)	- facteurs de transcription exprimés par l'oligodendrocytes.
GFAP(Glial Fibrillary Acidic Protein)	- Présent dans certaines cellules gliales du système nerveux central,notamment les astrocytes.
VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)	- Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire. - Rôle : dans l'angiogenèse, et dans le développement des tumeurs, notamment dans les tumeurs cérébrales.
EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)	- Récepteur de Facteur de croissance épidermique - protéine transmembranaire appartenant à la famille des récepteurs de type tyrosine kinase. - Rôle : Transduction du signal.

I.6. Liquides Biologiques

I.6.1. Urines

L'urine, est le résultat de la filtration du sang par le mécanisme de diurèse dans les reins, dont la fonction majeure est d'épurer l'organisme des déchets du métabolisme cellulaire, ainsi, le maintien du pH physiologique et l'équilibre électrolytique car son PH varie entre 4,6 et 8. L'urine constitue la majeure partie d'eau (95%), et le reste représentent des composés organiques tels que l'urée, et la créatinine, des composés minéraux comme le potassium et le calcium, ainsi que des protéines en trace. il est éliminé de l'organisme par le système urinaire (Aubron *et al.*, 2012).

I.6.1.1. Mécanisme de formation des urines (Diurèse)

L'élaboration de l'urine dépend de 3 processus: la filtration glomérulaire, la réabsorption tubulaire, et la sécrétion tubulaire. Toute modification de ces processus entraîne un changement dans la composition urinaire, notamment la protéinurie (Joseph, 2000).

➤ **Filtration glomérulaire** : Elle représente la première étape de formation des urines, aboutissant à la formation de l'urine primitive ayant la même caractéristique du plasma sanguin dépourvue de protéines plasmatiques (Klein, 2009).

➤ **La réabsorption tubulaire** : C'est le transfert du filtrat de la lumière tubulaire vers le tissu interstitiel et les capillaires péri-tubulaires.

➤ **La sécrétion tubulaire** : c'est le passage de substance telle que les ions des capillaires péri-tubulaires vers la lumière tubulaire.

I.6.2. Liquide Céphalo-rachidien

I.6.2.1. Physiologie du LCR

Le Liquide Cérébro-spinal est un liquide clair, Circulant autour du cerveau, le cervelet et la moelle épinière (Bendavid, 2007), il est produit par les plexus choroïdes situés dans les ventricules cérébraux. Sa formation et sa composition résultent simultanément de la filtration Plasmatique à travers des capillaires choroïdiens et d'une sécrétion nécessitant un transport actif (Cook et Nicola; 1988).

Il est sécrété par les plexus choroïdes des ventricules latéraux pour être libéré dans l'espace sub-arachnoïdien. La majeure partie du LCS est relâchée dans le sinus veineux et les veines cérébrales. Il est également absorbé, pour une faible quantité, par les vaisseaux veineux et lymphatiques. Il peut également pénétrer le parenchyme cérébral à travers des cellules épendymaires quand la pression intra ventriculaire est augmentée, le LCR est absorbé par les vaisseaux sanguins cérébraux (Abat *et al.*, 1988).

Dans les premiers stades de la vie embryonnaire, en l'absence de toute barrière hémato-méningée, le LCS a une importante fonction nutritionnelle (Kaneko, 1997).

Chez l'adulte, il a pour rôle de protéger, de maintenir et de réparer le SNC. Il permet de transporter les nutriments et les messagers chimiques et l'élimination des déchets hors du tissu neural. Il permet ainsi de maintenir l'homéostasie du SNC indispensable à son bon fonctionnement (Edsbadge *et al.*, 2004 ; Ledermann *et al.*, 2012).

I.7. Facteurs extracellulaires influençant le développement du cerveau

Dans le système nerveux en développement, plusieurs protéines jouent un rôle dans la mise en place des différents types de neurones (Guillemot, 2000).

I.7.1. BDNF : Brain-Driven Neurotrophic Factor

BDNF est une protéine neurotrophique de 30 KDa, ayant une séquence conservée chez différentes espèces. Son gène est localisé chez l'homme sur le chromosome 11p. Elle module différentes actions essentielles telle que : l'amélioration de neurogenèse, potentialisation synaptique, ainsi dans la neuroplasticité (Devin, Binder et Scharfman, 2004).

Cette protéine joue son rôle en se liant à deux types de récepteurs :

- Le récepteur de type tyrosine kinase TrkB active les voies de signalisation telle que : Ras-MAP (Mitogène-Activated Protein) kinase; la phosphorylation de la protéine liée à l'élément de réponse AMPc (CREB), induisant la croissance, le développement, et l'activation du calcium gliale (Devin, Binder et Scharfman, 2004).
- Le récepteur P75^{NTR} (Pan-Neurotrophin Receptor) lié aux protéines de nécrose tumorale (TNFR) active la voie NF-κB et la voie Jun kinase. Ce récepteur joue un rôle dans l'initiation de l'apoptose et la détermination de la spécificité de liaison de neurotrophine (Kermani, Hempstead, 2007).

I.7.2. NGF : Nerve Growth Factor

C'est une protéine à la fois pro-apoptotique et neurotrophique de 13 KDa, de séquence hautement conservée d'une homologie considérable chez différentes espèces. Son action biologique est essentielle pour le maintien du développement neuronal tels les neurones sensoriels stimulant l'expression de neuropeptides comme la substance P (SP) et Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) (Berry, 2012 ; Seidel, 2014).

Le facteur NGF médie son action via le récepteur de famille tyrosine kinase (TrkA), activant ainsi des voies de signalisation telle : Ras-MAP Kinase, La voie ERK, le phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), Akt et la phospholipase C (PLC) γ . NGF se lie également de faible affinité au récepteur P75^{NTR} qui régule la signalisation par TrkA, induisant une signalisation supplémentaires qui sont : La voie Jun Kinase et la voie NF- κ B. En absence de TrkA, ces récepteurs peuvent signaler l'apoptose des cellules.

I.7.3. BMP-2 : Bone Morphogenetic Protéin-2

BMP-2 est une glycoprotéine acide de 32KDa, de la famille TGF β à propriétés ostéoinductives, elle est impliquée dans la neurogenèse durant le développement embryonnaire et post natal, ainsi dans la plasticité neuronale chez l'adulte (Jiang Yang *et al.*, 2015). Elle module son action via un complexe hétéro-tétramérique formé d'une sous unité de récepteur type II (BMPRII) et une autre du récepteur type I (BMPRIA et BMPRIB) (Chalazonitis et Kessler, 2012)

L'inhibition de la signalisation de BMP par les protéines telle noggin et follistatine n'affecte pas le moment de neurogenèse et le taux de la mort cellulaire mais améliore la migration de cellules de la crête neurale vers l'épithélium. L'expression de BMP-2 peut être aussi régulé par le facteur de nécrose tumorale TNF- α en augmentant son expression surtout dans le cas de tumeur les plus invasif (Zheng-jie Yang *et al.*, 2013).

Cependant, la différenciation et la survie neuronale sont liées à la concentration de BMP c'est-à-dire à des concentrations élevées la protéine favorise l'apoptose dans des tumeurs par les protéines Smad et diminue la différenciation ainsi que la neurogenèse, contrairement au neurotrophine ce qui est stimulé par FGF-2.

Parmi les fonctions que BMP-2 peut moduler : la promotion, la régulation de la différenciation gliale dans le système nerveux central via l'expression du récepteur erbB3 en bloquant l'effet prolifératif du facteur GGF-2 (Meejung et Senyon, 2011).

I.7.4. Endotheline

Endotheline est un facteur vasoconstricteur constitué de PM (poids moléculaire) approximative à 24KDa, issu du clivage par la furine d'un précurseur appelé pré-proendotheline formant de big-Endotheline inactif, celle-ci clivée à son tour par une enzyme de conversion d'Endotheline (ϵce) afin de donner une Endotheline mature (Cazaubon, 2006).

Plusieurs modulateurs de l'expression d'Endotheline sont connus : Il existe des inhibiteurs de son expression telle que l'acide rétinoïque, d'autre qui stimule la synthèse et la sécrétion d'Endotheline comme la prostaglandine et la leptine (Pinet, 2004).

La surexpression de ce peptide et de son récepteur est en corrélation avec l'invasivité tumorale, surtout dans les cellules d'origine épithéliale telle que les astrocytes (Cazaubon, 2006).

Le système Endotheline comporte trois isopeptides qui exercent leurs effets (Annexe 1) par l'intermédiaire de deux récepteurs : Et-A et Et-B de réponses différentes selon le type cellulaire. Et-1 qui est l'isopeptide le plus étudié exprimé par les cellules endothéliales, les cellules épithéliales qui synthétise Et-2, et les neurones qui sont une source d'Et-3 (Pinet, 2004).

I.7.5. FGF-2 :Fibroblast Growth Factor-2

C'est une famille de protéines neurogène de poids moléculaire approximative à 14KDa, leur principale action est la prolifération, la migration et la différenciation neuronale (Giavazzi *et al.*, 2003). Selon des études, cette protéine ne contient pas de séquence signal et les voies de leurs libération reste encore floues, mais ils peuvent être transloqués par des protéines intégrales ou périphériques membranaires dont la pompe Na^+/K^+ ATPase, le facteur module son activité dans le système nerveux central via les récepteurs type tyrosine kinase, principalement le FGFR-1 (Woodbury et Ikezu, 2014).

➤ FGF-2 joue un rôle dans les maladies neurodégénératives en régénérant les neurones, par exemple dans la maladie de parkinson, le FGF-2 régule le développement de neurones Dopaminergiques (Woodbury et Ikezu, 2014).

➤ Le FGF-2 joue un rôle de neurotrophine dans la plasticité synaptique et la ramification axonale (Woodbury et Ikezu, 2014).

➤ (Giavazzi *et al.*, 2003) ont démontrés que le facteur est considéré mitogène et tumorigène et qu'il existe une corrélation entre la présence de FGF-2 et le stade tumorale dans les cellules cancéreuses, et il est surtout détectable dans les urines et le liquide céphalo-rachidien des patients atteint de tumeurs cérébrales.

I.7.6. Neureguline-1

Des études immunohistochimique et western blot ont montrés que la protéine neureguline a été détectée comme bandes d'isoformes d'environ 140, 110, 95 et 60 KDa, produit par l'épissage alternatif et parmi eux le GGF (Law *et al.*, 2004).

La Neureguline-1 est multifonctionnelles et polyvalente jouant un rôle via son récepteur erbB2/3, qui a été identifié pour son pouvoir oncogène en raison de leurs rôles important dans le cancer, en activant divers cascade de signalisation telle : Ras-MAP Kinase, La voie ERK, La phosphatidylinositol-3-kinase-Akt, La mobilisation de Ca⁺⁺, La régulation de la protéine dépendant kinase C et l'activité de N-FAT (Talmage, 2008). De nombreux aspects de la biologie des cellules de Schwann sont affectés par NRG-1 :

- Supprime la différenciation neuronale des cellules de la crête neurale, tout en favorisant ou permettant la différenciation gliale.
- Nécessaire pour la survie des progéniteurs de cellule de Schwann.
- Favorise la prolifération et la migration de ces cellules.
- Fournit des signaux essentiels pour la myélinisation.

I.7.7. GGF: Glial Growth Factor

C'est une protéine soluble, correspondant à une forme isomérique de Neureguline endogène et de GGF-2 exogène, il est produit par les neurones et les cellules gliales, ainsi par les neuroblastes du système nerveux central en développement. Il a été démontré que son expression diminue avec l'âge (Talmage, 2008 ; Anton *et al.*, 1997).

Le GGF joue un rôle vital via le récepteur erbB2 dans la croissance des cellules gliales, accompagné de la migration neuronale dans la paroi cérébrale en développement. Induisant la protéine BLBP (Brain Lipid-Binding Protein), qui est trouvée être un marqueur de tumeur cérébrales du SNC. GGF est considéré comme le facteur trophique spécifique aux cellules Schwann pouvant stimuler leurs proliférations (Retrosi *et al.*, 2011).

Partie Pratique

II.1. Méthodes d'analyses

Le dosage des protéines se base sur les propriétés des acides aminés, et cela peut s'établir par des méthodes qualitatives et quantitatives (Forbes, 2010).

II.1.1. Méthodes quantitatives

Parmi les méthodes quantitatives les plus utilisées sont les méthodes colorimétriques car en plus d'être précises, elles sont rapides, automatisables, peu coûteuses et facile à mettre en œuvre. Les plus importantes sont la méthode de Lowry, de Biuret et celle de Bradford.

Remarque : il existe des méthodes beaucoup plus précises, c'est notamment le cas de la méthode d'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), qui est une méthode immuno-enzymatique dans laquelle le dosage des concentrations de protéines dans une solution est couplé à une réaction catalysée par une enzyme, qui libère un composant coloré suivi par une spectroscopie, mais l'inconvénient de cette technique, c'est que : une seule protéine est dosée à la fois.

II.1.1.1. Méthode de Biuret

C'est une méthode colorimétrique de protéines. En milieu alcalin, les protéines liées au réactif de Gornall forment un complexe coloré en bleu-violet en présence des sels de cuivre, dont l'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration en protéines. Cette coloration varie également en fonction de la nature des protéines à doser, de l'alcalinité du milieu, de la concentration en sulfate de cuivre et de la température. Un dosage colorimétrique est réalisé à 540 nm. Cette méthode présente une difficulté d'application à des solutions diluées en protéines telle le LCR et les Urines (Holme, Peck, 1998).

II.1.1.2. Méthode de Lowry

C'est une méthode de dosage colorimétrique de protéines. Elle est essentiellement basée sur la méthode du biuret, l'absorbance est mesurée à 745 nm, l'un des inconvénients de cette méthode est qu'il peut y avoir interférence de plusieurs substances tel : le saccharose l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) (Lowry, 1951).

II.1.1.3. Méthode de Bradford

C'est une méthode spectrophotométrique, elle est utilisée pour déterminer les concentrations de protéines en solution, il s'agit d'un dosage colorimétrique au Bleu de Coomassie G250, basé sur le changement d'absorbance se manifestant par le changement de la couleur du bleu de Coomassie après sa liaison avec les acides aminés basiques (Histidine, Arginine, Lysine) et les résidus hydrophobes de la protéine (Bradford, 1976).

➤ **Préparation des solutions**

-Le Réactif de Bradford : préparation de 570ml de réactif du bleu de Coomassie G250 en utilisant la composition dans (Annexe 2). Ce mélange est soumis à une agitation pendant environ 1h dans l'obscurité.

Après avoir laissé sédimenter 24h, le réactif est filtré suivie d'un balayage par spectrophotomètre afin d'avoir la longueur d'onde du travail. Les courbes obtenues sont représentées dans les annexes, et la longueur d'onde était de 595nm. (Annexe 3 et 4)

-La solution BSA (Bovin SerumAlbumin) : Préparation de 1mg/ml de solution BSA comme solution de référence. Elle est utilisée pour réaliser la courbe d'étalonnage par un spectrophotomètre UV/visible, après avoir dilué la solution de BSA à différentes concentrations à 1/30 du réactif. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau II et la figure

Tableau II: Résultats d'absorbance de la gamme étalon.

Concentrations (µg/ml)	0	10	25	50	100	200	500	1000
Δ Absorbances (nm)	0	0,4	0,433	0,424	0,459	0,588	0,93	1,554

Absorbance du Blanc : 0,349

Remarque : Le Δ Absorbance = Absorbance de l'échantillon - Absorbance du blanc

On mesure le Δ Absorbance car le blanc présente des absorbances variables.

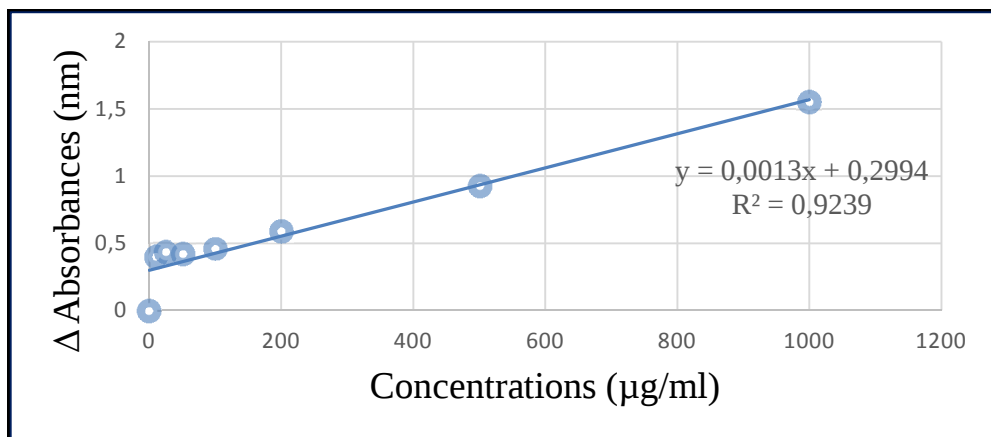


Figure 5: La courbe d'étalonnage.

La courbe d'étalonnage est réalisée par mesure du Δ Absorbance de différents échantillons de la solution BSA à concentrations variables (n=2)

II.1.1.3.1. Dosage protéique des urines

-Préparation des échantillons :

Les échantillons urinaires de 17 patients ont été récupérés, ensuite centrifugés à 1800 rpm à une durée de 10 min à 4°C. Le surnageant de chaque échantillon a été récupéré, et dilué à 1/30 du réactif de Bradford et mesurer les Δ Absorbances à 595nm, les résultats sont représentés dans le **Tableau III**

Les échantillons et le réactif du Bradford utilisés sont montrés dans la **Figure 6**

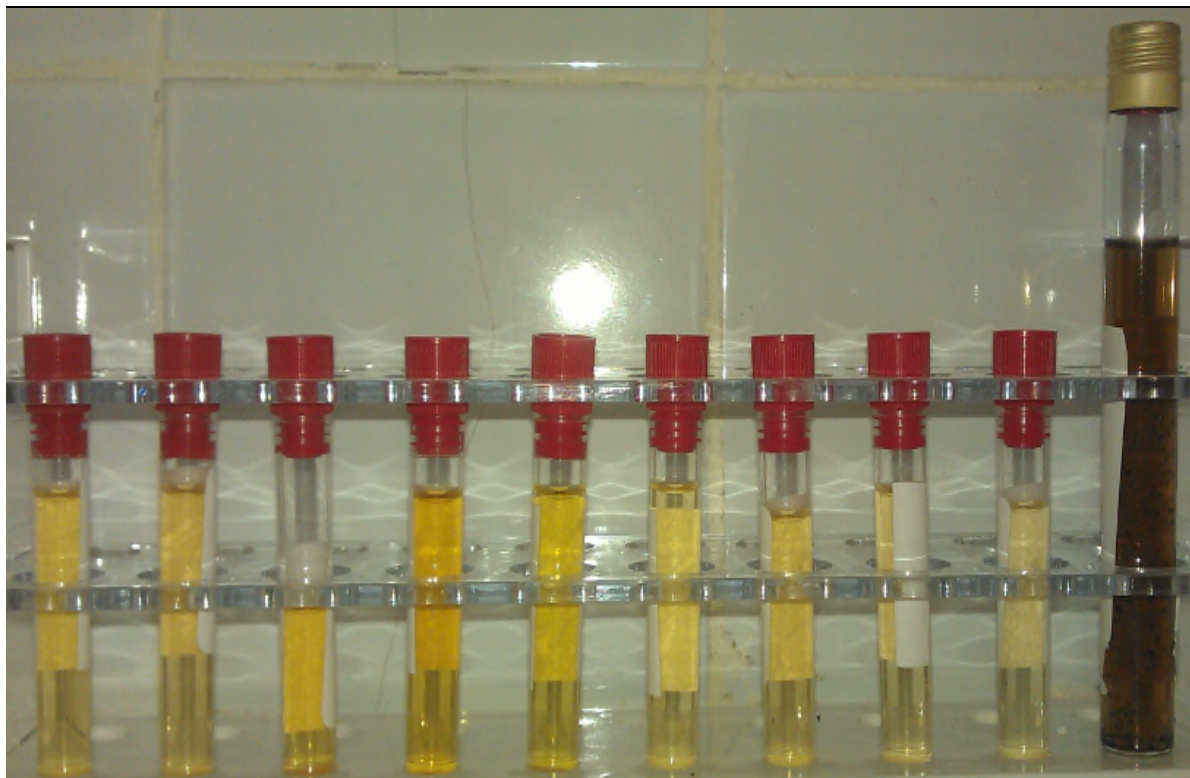


Figure 6: Les échantillons urinaires et le réactif de Bradford utilisé.

Les échantillons urinaires ont été dilués à 1/30 de la solution du bleu de Coomassie G 250 ; et l'absorbance est mesurée à 595nm.

Les concentrations ont été calculées en utilisant la fonction de la courbe d'étalonnage ($Y = 0,0013X + 0,2994$) sachant que, Y : Absorbance, X : Concentration. Les résultats sont représentés dans le tableau III.

Tableau III: Information et résultats de l'absorbance et de concentration de différents échantillons urinaires.

NT : Non Tumoraux, T : Tumoraux.

D'après les résultats obtenues, les échantillons ont été regroupés selon la pathologie

N° Echantillons	Ages (ans)	Sexe	Nature	Δ Absorbances (nm)	Concentrations ($\mu\text{g/ml}$)
170/15	34	Male	T	0,625	250,46
186/15	20	Male	T	0,483	141,23
210/15	60	Male	T	0,770	362
301/15	8	Male	T	0,454	237,85
306/15	23	Male	T	0,492	296,31
197/15	56	Femelle	T	0,765	358,15
209/15	73	Femelle	T	0.459	122,76
284/15	50	Femelle	T	0,541	371,69
201/15	52	Male	NT	1,232	717,39
205/15	68	Male	NT	0,838	414,31
303/15	15	Male	NT	0,541	371,69
58/H/2015	58	Male	NT	0,485	285,54
192/15	57	Femelle	NT	1,482	909,69
199/15	55	Femelle	NT	0,508	160,46
309/15	69	Femelle	NT	0,492	296,31
23/F/2015	23	Femelle	NT	0,535	181,23
9/F/2015	9	Femelle	NT	0,560	400,9

(tumoraux, non tumoraux), selon l'âge et selon le sexe, les statistiques sont réalisées avec le logiciel *GraphPadPrism 5.03*.

- Selon la pathologie

Selon la pathologie des sujets qu'il soit tumoraux ou non tumoraux, les résultats sont représentés dans la figure suivante.

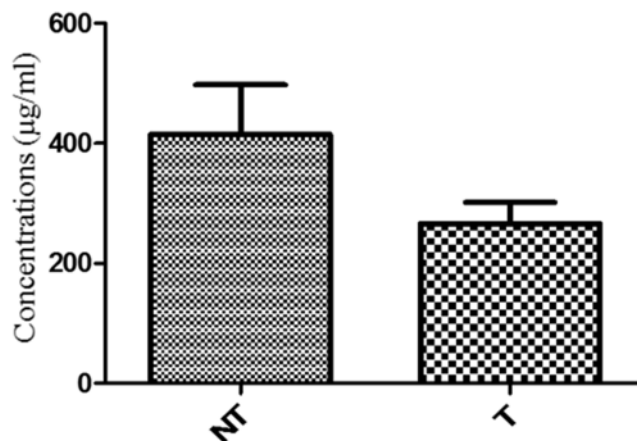


Figure 7: Représentation graphique de la comparaison entre les concentrations protéiques chez les patients tumoraux et non tumoraux.

Les résultats sont obtenus après quantification par la méthode de Bradford. Pour NT, n=9. Pour T, n=8. NT : Non Tumoraux. T : tumoraux

Ce graphique représente la comparaison des concentrations protéiques entre patients tumoraux et non tumoraux. On remarque que chez les non tumoraux la concentration protéique est plus élevée mais, selon le « t tests » le $p\text{value} = 0,0677$ ce qui nous renseigne que cette différence de concentration n'est pas significative.

- Selon le sexe et la pathologie

D'après les statistiques réalisées entre les mâles et les femelles et selon leurs pathologies, les résultats obtenus ont été que :

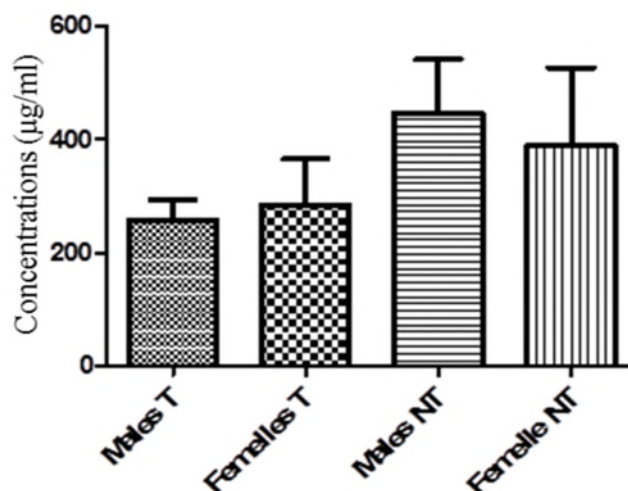


Figure 8: Représentation graphique de la comparaison entre les concentrations protéiques chez les mâles et les femelles et selon leurs pathologies.

Les résultats sont obtenus après quantification par la méthode de Bradford. NT: Non Tumoraux. T : tumoraux. Pour Males T, n=5, NT, n=4. Pour Femelles T, n=3. NT, n=5.

Selon le graphique, les femelles tumorales présentent une concentration protéique plus élevée par rapport aux mâles, contrairement au non tumoraux les mâles montrent une augmentation de concentration protéique vis-à-vis des femelles. Et par utilisation du test statistique « one-way ANOVA » la *p* value est supérieure à 0,005, ce qui suggère qu'il n'existe pas de différences significatives entre mâles et femelles et entre tumoraux et non tumoraux.

- Selon les tranches d'âges et la pathologie

Les données sont subdivisées en quatre groupes selon l'âge (inférieure ou égale à 20ans, supérieure à 20ans), et selon la pathologie qu'il soit tumoraux ou non tumoraux, les résultats de différentes concentrations sont représentés dans le graphique suivant.

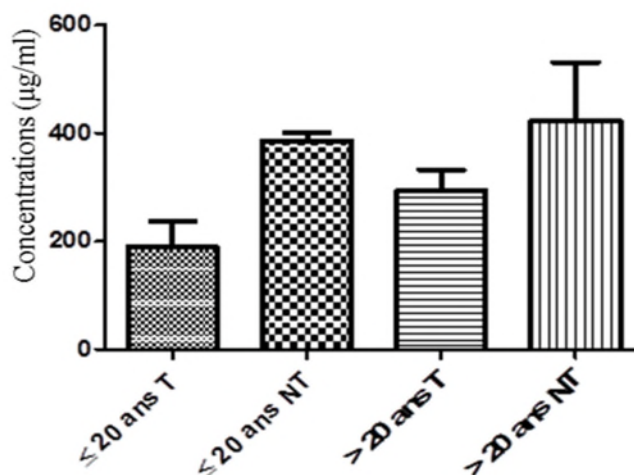


Figure 9: Représentation graphique de la comparaison entre les concentrations protéiques selon les tranches d'âge et la pathologie.

Les résultats sont obtenus après quantification par la méthode de Bradford. NT : Non Tumoraux. T : tumoraux. Pour ≤20ans NT, n=2. T, n=2, Pour >20ans NT, n=7, T, n=6.

On observe d'après ce graphique que la concentration protéique augmente avec l'âge. Les sujets de moins de 20 ans et supérieure à 20 ans tumoraux montrent une diminution de concentration protéique par rapport aux sujets non tumoraux, cette différence reste statistiquement non significative.

II.1.1.3.2. Dosage protéique du liquide céphalo-rachidien

Une fois le LCR est prélevé par un personnel habilité, récupérer et centrifuger à 1800 rpm pendant 10 min à 4°C. Le surnageant de chaque échantillon est récupérer, dilué à 1/30 du réactifde Bradfordet mesurer les Δ Absorbances à 595nm. Les résultats sont montrés dans le tableau IV.

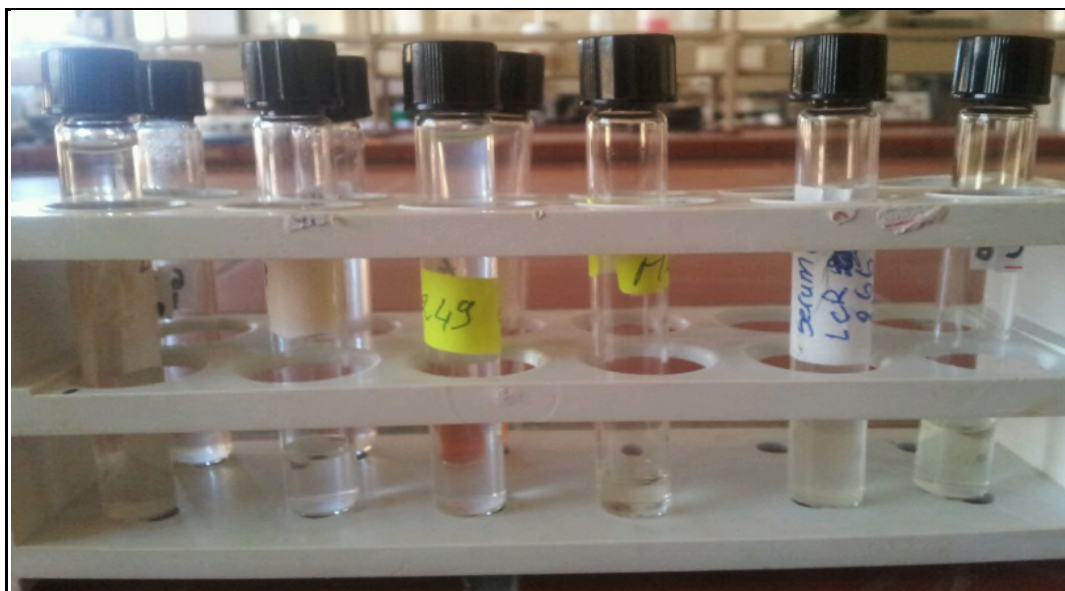


Figure 10 : Les échantillons du Liquide Céphalo-Rachidien utilisés.

Les échantillons du LCR ont été dilués à 1/30 de la solution du bleu de Coomassie G 250 ; et l'absorbance est mesurée à 595nm.

Tableau IV: Informations et résultats des Absorbances et de concentrations de chaque des échantillons du LCR. (T : Tumoral, NT : Non Tumoral)

N° Echantillon	Age (ans)	Sexe	Nature	Δ Absorbances	Concentrations ($\mu\text{g/ml}$)
306/15	23	Male	T	0,464	127,38
213/15	20	Femelle	T	1,522	4702
266/15	41	Male	NT	0,513	164,31
249/15	5	Male	NT	0,694	3035,38
182/15	40 Jours	Male	NT	0,546	5690,76
217/15	4	Femelle	NT	0,910	2348,46

- Selon la pathologie (tumorale ou non)

La figure suivante montre la comparaison des concentrations protéique dans le LCR entre les sujets tumoraux et non tumoraux.

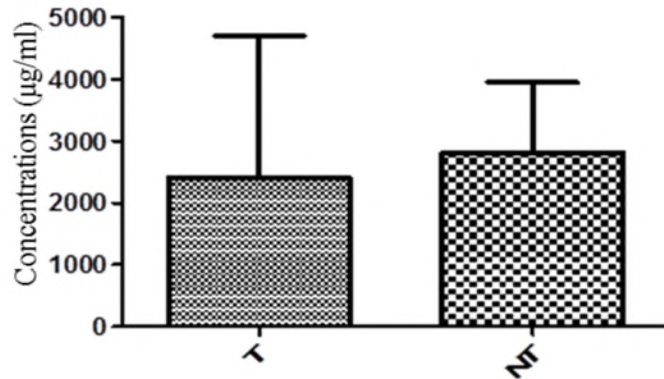


Figure 11: Représentation graphique de la comparaison entre les concentrations protéique selon la pathologie.

Les résultats sont obtenus après quantification par la méthode de Bradford. NT : Non Tumoraux. T : tumoraux. Pour NT, $n=4$. Pour T, $n=2$.

Le graphique montre que les sujets tumoraux ont une concentration légèrement basse par rapport aux sujets non tumoraux, et qu'il n'existe pas de différence statistiquement significative entre les deux groupes (p value = 0,8668).

- Selon Les tranches d'âges

Selon l'étude statistique, on a subdivisée nos patients en deux clusters, l'un représente ceux inférieure ou égale à 20ans, et l'autre les plus de 20ans.

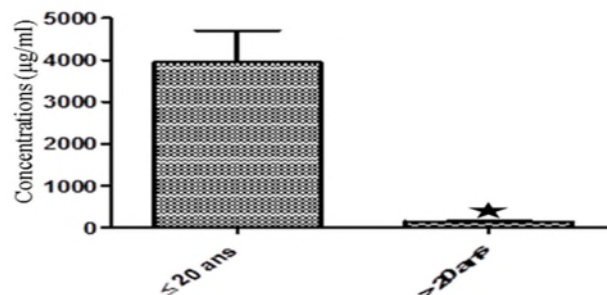


Figure 12: Représentation graphique de la comparaison entre les concentrations protéique selon les tranches d'âge.

Les résultats sont obtenus après quantification par la méthode de Bradford. Pour ≤ 20 ans, $n=4$, $n=2$, Pour > 20 ans $n=2$.

On observe une différence de concentration protéique entre les deux clusters, les sujets ayant un âge inférieure à 20ans présente la concentration la plus élevée, cette différence est statistiquement significative ($pvalue = 0,0295$).

En incluant la pathologie à cette comparaison, on remarque que les sujets supérieurs à 20ans tumoraux présentent une concentration plus élevée que les non tumoraux (ex: concentration de l'échantillon 213 est de $4702\mu\text{g/ml}$; est la concentration de l'échantillon 266 est de $164,31\mu\text{g/ml}$).

La quantification de concentration protéique dans les deux liquide biologique nous ont permis d'observer que :

Dans les urines, la concentration protéique est différente selon la pathologie, le sexe et l'âge, les non tumoraux ont présentés dans chaque cas une augmentation de concentration protéique, hormis, dans le cas d'une comparaison entre les femelles et males tumoraux, les femelles présentent la concentration la plus élevée, cela est peut être due à l'action des hormones. Toutefois ces différences de concentrations protéiques n'ont pas été significatives.

Dans les différents échantillons du LCR, nous avons remarqué que les concentrations protéiques sont différentes, mais aussi cette différence semble être significative que lorsqu'on scinde les sujets selon leurs âges (les moins de 20ans et plus de 20ans). En effet, lorsqu'on a des sujets jeunes, la production protéique dans le LCR semble plus importante chez les non tumoraux.

La méthode colorimétrique de Bradford nous a permis de quantifier les concentrations protéiques de différents échantillons, les résultats peuvent être confirmés par utilisation d'une technique qualitative tel que l'électrophorèse SDS-PAGE afin d'identifier la composition de ces deux liquides biologiques.

II.1.2. Méthodes qualitatives

Les méthodes qualitatives les plus utilisées sont: l'électrophorèse SDS-PAGE(Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) et les méthodes de spectrométrie de masse telle que le MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time-Of-Flight).

II.1.2.1. Méthode MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time-Of-Flight

Parmi les méthodes les plus utilisées en spectrométrie de masse est la MALDI-TOF, qui est une technique d'ionisation douce permettant l'analyse de peptides, de protéines (Karas et Hillenkamp, 1988).

Elle consiste à mélanger la substance à analyser à une solution de petites molécules organiques, appelé matrice. L'ionisation du mélange matrice/échantillon est provoquée par un faisceau laser. Les molécules de matrice absorbent l'énergie transmise par le laser sous forme de photon UV, s'excitent et s'ionisent et transfèrent leur charge à l'échantillon. L'échantillon ionisé est détecté en mesurant le temps que mettent les différentes particules à atteindre le détecteur. Une fois l'ion est arrivé à ce dernier, le signal est amplifié et envoyé à un ordinateur qui traite les données et donne le résultat sous forme de spectre (Karas et Hillenkamp, 1988).

II.1.2.2. Electrophorèse SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis).

Selon (Laemmli, 1970) ; L'électrophorèse SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) consiste à séparer les molécules par migration sous l'effet d'un champ électrique, selon leurs poids moléculaires dans un gel de polyacrylamide, et plus le pourcentage de celui-ci est élevé, moins les grosses protéines migrent. Cette séparation est réalisée dans des conditions dénaturantes par utilisation du tampon de dénaturation contenant le SDS, le β -mércaptoéthanol et du bleu de bromophénol.

- Le SDS ($\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{SO}_3^- \text{Na}^+$) : est un détergent anionique qui se fixe sur les protéines, masquant leurs charges propres, et confère donc aux protéines une charge négative, ainsi elles migreront selon leurs poids moléculaires.

- Le β -mércaptoéthanol ($\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SH}$): c'est un composé biochimique dont l'action est la rupture des ponts disulfure, ce qui désorganise la structure native de la protéine.

- Le Bleu de Bromophénol : Il est utilisé comme marqueurs de migration.

- Le polyacrylamide : Est un ensemble de macromolécules poreuses, résultant de la copolymérisation de 2 monomères : l'acrylamide ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CONH}_2$) et le N, N'- méthylène-bisacrylamide ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$). Il 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.

Les étapes de réalisation d'une électrophorèse SDS-PAGE sont les suivantes :

Préparation des gels

Une fois le montage et la vérification de l'appareil d'électrophorèse est réalisé les gels de séparations et de concentration sont préparés.

Gel de séparation

Pour un volume total de 10ml, le gel est constituée de : dH₂O, solution acrylamide bis acrylamide à 30% (Annexe 5), tris-HCL à PH=8.8 (Annexe 6), SDS à 10% (Annexe 7), APS à 10% (Annexe 8) et le TEMED. Les volumes des constituants sont représentés dans le tableau de l'annexe 9.

Remarque :

Le TEMED (N', N'-tétraméthyléthylènediamine) et APS (persulfate d'ammonium) sont des catalyseurs de la polymérisation, c'est pour cela qu'on les ajoute à la fin ; l'APS comme initiateur et le TEMED comme accélérateur de la réaction de polymérisation. Le gel est alors coulé entre les plaques, ensuite ajouté l'acétone pour égaliser la surface et laisser polymériser.

Gel de concentration

Le gel est préparé en utilisant les composants suivants : dH₂O, solution acrylamide bisacrylamide à 30%, tris-HCL à PH=6.8 (Annexe 10), SDS à 10%, APS à 10% et le TEMED. (Annexe 11) une fois le gel de séparation est polymérisé, enlever l'acétone avec un papier absorbant est faire couler le gel de concentration ensuite placer le gel et laisser polymériser.

Préparation des échantillons

Les échantillons urinaire et du LCR déjà récupérés sont centrifugés et dilués de manière à obtenir la même concentration ensuite dénaturer par un tampon de dénaturation (le SDS, le β -mércaptoéthanol et le bleu de bromophénol), puis incubé à 95°C pendant 5 min. La préparation du tampon est réalisée en suivant la composition du tableau annexe 12.

-Le dispositif est placé dans la cuve d'électrophorèse remplie du tampon de migration (Annexe 13) jusqu'à atteindre la limite (MAXFile) le gel est retiré doucement de manière à forer des puits

-Réaliser des dépôts de 10 à 20 μ l d'échantillon dénaturé à l'aide d'une pipette pasteur sur les puits déjà formés.

- La cuve portant des électrodes est liée à un générateur programmé à 120V pendant approximativement 1h. L'électrophorèse est arrêtée lorsque le colorant atteint la frontière inférieure du gel.

-Le gel est démouler, marquer la position du dépôt, et l'émerger dans la solution de coloration pendant 40min suivit de 3 bain de décoloration d'une durée de 15min. la solution de coloration et de décoloration sont préparer selon la composition du tableau annexe 14 et 15.

-La plaque peut être analysé et conserver.

Les résultats obtenus par électrophorèse SDS-PAGE sont les suivant :

II.1.2.2.1. Profils des échantillons urinaires

Le gel de polyacrylamide à 10% est réaliser pour les échantillons urinaire déjà récupérer a concentration de 100µg/ml, le résultat est représenté dans la **Figure 13**.

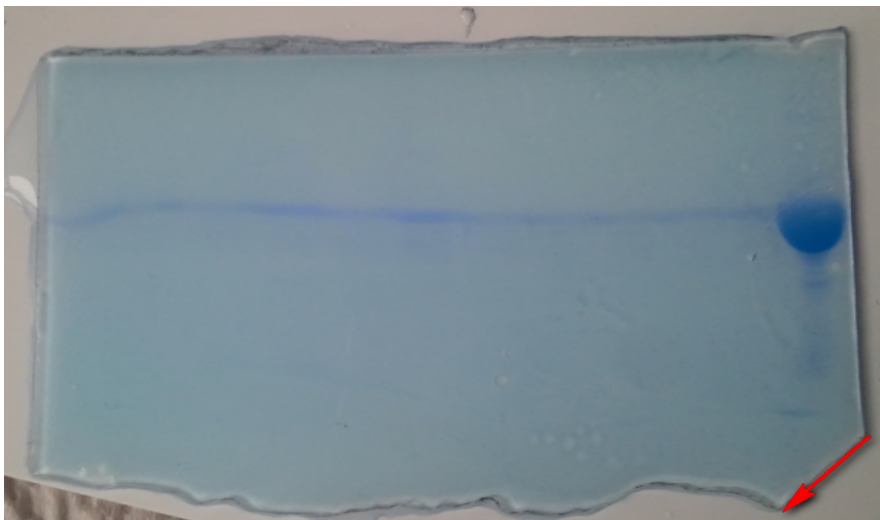


Figure 13: Profil électrophorétique des échantillons urinaires sur le gel de 10% à concentration protéique de 120µg/ml.

Le profil obtenu après séparation par électrophorèse SDS-PAGE de dix échantillons contenant cinq tumoraux et cinq non tumoraux.

On remarque une migration similaire pour tous les échantillons, et on observe une seule bande commune sur gel de polyacrylamide de 10%. Après recentrifugation et filtration des échantillons à 1800rpm à 4°C pendant 10min, et passer au gel de polyacrylamide de 15% pour augmenter la résolution. Les résultats sont présentés dans la figure suivante (**Figure 14**)

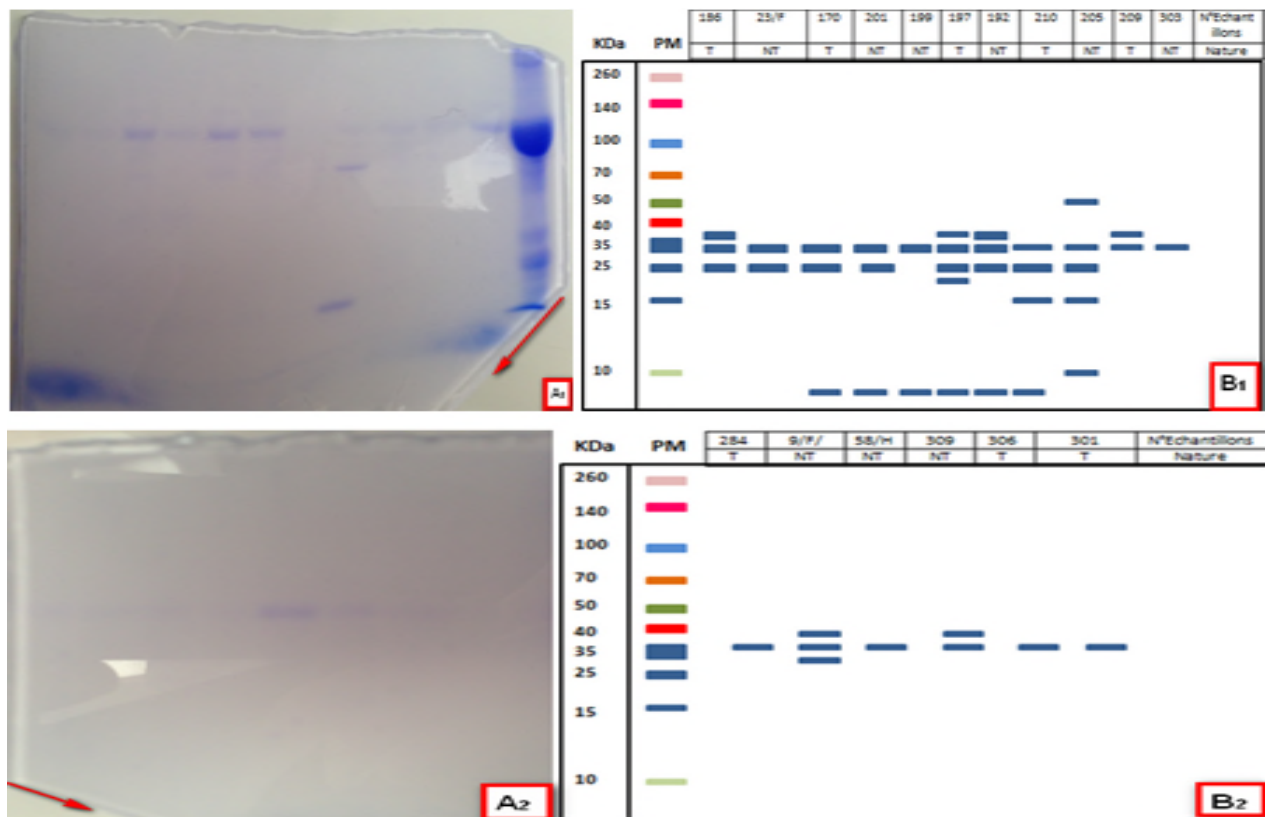


Figure 14: Profil électrophorétique des échantillons d'urines sur gel de 15% à concentration protéique de 120µg/ml.

Le profil obtenu après séparation par électrophorèse SDS-PAGE de 18 échantillons. Pour NT, n =9, T, n=8.

A : Image d'origine, B : Schéma représentatif.

Dans le gel de 15%, les différents échantillons présentent un profil protéique en dessous de 40 KDa, une seule bande apparaît à 50 KDa, chez l'échantillon numéro 205.

Les urines ne présentent pas une différence dans les profils des échantillons tumoraux et non tumoraux, par exemple l'échantillon 170 qui correspond a un tumorale et l'échantillon 201 non tumorale présente tous les deux trois bande similaires avec une intensité différentes, le profil de l'échantillon tumorale correspondanta l'échantillon 284 est semblable à celui de l'échantillon 58/H non tumorale présentant la même intensité.

Selon l'âge, les bandes sont en abondances dans la majorité des profils protéomiques des sujets ayant plusde 20ans, et cela n'est pas dépendant de la pathologie c'est-à-dire qu'il soit tumoral ou non tumoral.

II.1.2.2.2. Profils des échantillons du liquide cérébro-spinal

La réalisation du gel de polyacrylamide de 10% à concentration de 100µg/ml nous a permis d'obtenir l'électrophoregramme si dessous.

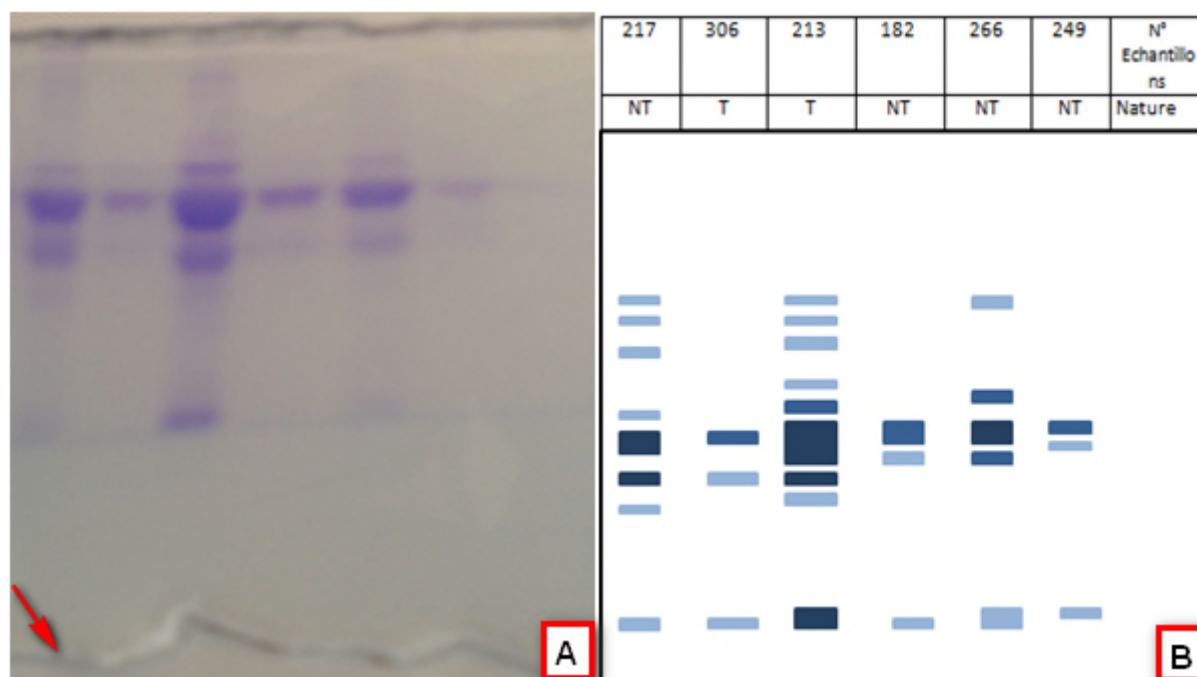


Figure 15: Profil électrophorétique des échantillons du LCR sur gel de 10% à concentration protéique de 100µg/ml.

Le profil obtenu après séparation par électrophorèse SDS-PAGE de 6 échantillons. Pour NT, n =4, T, n=2.

A : Image d'origine, B : Schéma représentatif

Le profil électrophorétique des échantillons du LCR sur gel de 10% nous renseigne, qu'il existe une variation de migration de protéines, avec trois bandes majoritaires dans tous les échantillons avec une intensité différente.

Les échantillons 306 et 266, présentent un profil protéique similaire de trois bandes dont le poids moléculaire est en dessous de 30 kDa.

Les échantillons 217 et 213, présentent un profil protéique analogue, avec une variation de migration et d'intensité, constitué de huit bandes, avec une bande de plus dans l'échantillon 213. Ce profile présente des proteines de large gamme de poids moléculaire.

Les échantillons 249 et 182, présentent un profil similaire de trois bandes, avec deux bandes de plus pour l'échantillon 249, dont l'une représente un type protéique de haut poids moléculaire.

On remarque dans le gel de 10%, existence de protéines à faible poids moléculaire, qui ont migrés vers le front. Afin de mettre en évidence ces petites molécules, un gel de 15% est réalisé pour augmenter la résolution. Le profil obtenue ne nous a pas permis de voir les bandes

correspondantes aux protéines observées lors de la réalisation du gel à 10% (Annexe 16). C'est pour cela qu'on augmente la concentration à 120µg/ml. La figure suivante montre le profil électrophorétique de différents échantillons du LCR sur gel de 15% à 120µg/ml.

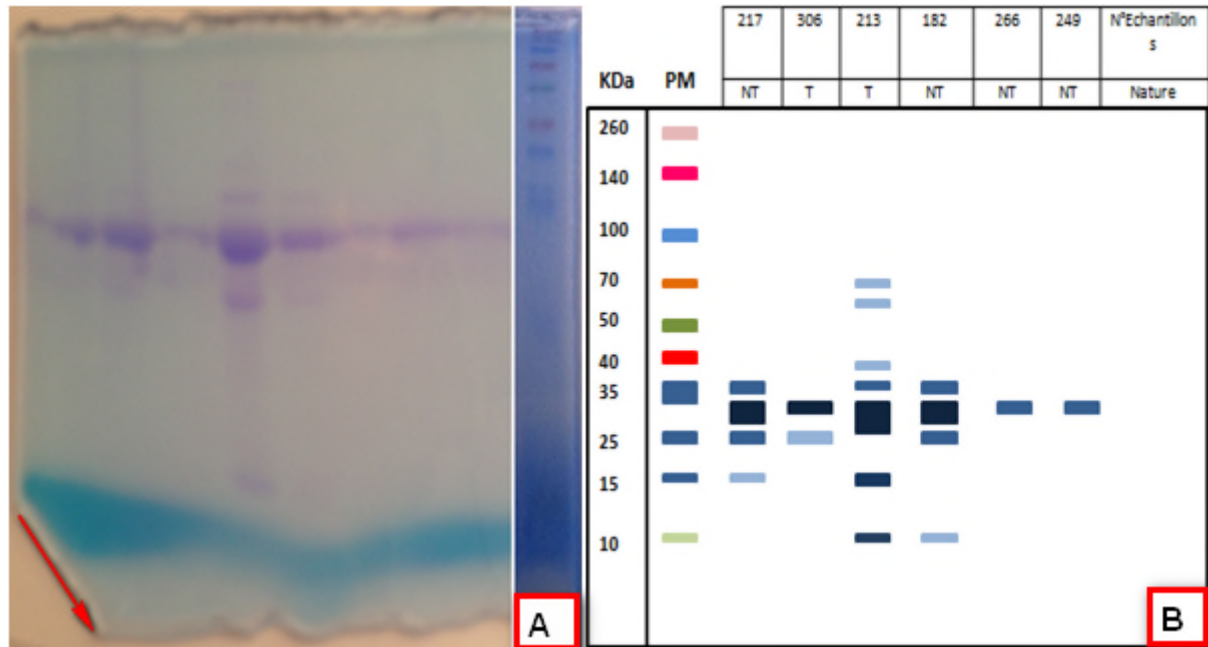


Figure 16: Profil électrophorétique des échantillons du LCR sur gel de 15% à concentration de 120µg/ml.

Le profil obtenu après séparation par électrophorèse SDS-PAGE de 6 échantillons. Pour NT, n =4, T, n=2.

A : Image d'origine, B : Schéma représentatif

Les échantillons du LCR présentent une bande en commun vers les 30 kDa, avec des profils électrophorétiques comme suite :

L'échantillon 217 et 182: comportent trois bandes à 25, 30 et 35 kDa, l'échantillon 217 présente un type protéique vers les 15 kDa. Une bande vers les 10 kDa est observée chez l'échantillon 182.

Une bande en plus de la bande majoritaire est remarquée vers les 25 kDa dans l'échantillon 306.

L'échantillon 213 tumorale comporte un profil le plus dense et le plus riche en protéine présentant des molécules de large gamme de poids moléculaire.

Les sujets ayant un âge inférieur à 20ans présente des profils riche en protéine par rapport à ceux supérieure à 20ans, du moins ceux que nous avons dans notre analyse, les sujets ayant un âge supérieur à 20ans tumorale présente plus de proteines que le non tumorale.

L'électrophorèse SDS-PAGE permet de déterminer la présence d'une protéine donnée dans un échantillon selon le poids moléculaire. Dans notre analyse, même si on a remarqué une certaine variation de migration. Il y'a réellement un profil différent entre les sujets, Néanmoins, cela n'est ni lié à la pathologie ni au sexe ni à l'âge dans les échantillons urinaires, ce profil présente des bandes inférieur à 50 kDa, ceci explique que la filtration glomérulaire n'est pas dysfonctionnante, cela veut dire que les concentrations protéiques élevés qu'on peut éventuellement retrouver dans les urines, notamment chez les patients tumoraux ne sont pas due à un dysfonctionnement rénale mais a une augmentation de la production protéique.

Toutefois, l'analyse électrophorétique des échantillons du LCS nous a permis d'observer des bandes différentiels à poids moléculaire inférieure à 30 kDa chez les tumoraux et les non tumoraux, on remarque ainsi que les sujet inférieur à 20ans présente une abondance de protéine vis-à-vis de ceux ayant plus de 20 ans. Car dans le cas non tumorale la production protéique diminue selon l'âge, contrairement dans le cas d'une tumeur cérébrale, la concentration protéique diminue avec l'âge jusqu'à atteindre l'âge adulte, on observe une augmentation de concentration protéique qui est certainement due à la tumeur ou à l'action de la tumeur c'est notamment l'augmentation de la production protéique.

Discussions et Conclusions

Les données actuelles sur les pathologies cancéreuses dans le monde, notamment celles enregistrées par l'organisation mondiale de la santé (OMS) révèlent que les pathologies tumorales touchent environ 14 millions de cas par an. En Algérie, particulièrement à Bejaïa les tumeurs cérébrale touchent l'adulte cinq fois plus que l'enfant, ce dernier représente le médulloblastome et l'astrocytome comme type histologique prédominant, par contre chez l'adulte, le méningiome occupe la proportion la plus importante. (Ghidouche et *al* 2014).

Le système nerveux central présente des pathologies qui modifient la composition de différents liquides biologiques tels que le sang, les urines et le LCR pouvant constituer des molécules caractéristiques de ces différentes pathologies notamment, les tumeurs cérébrale. Cette caractérisation moléculaire aboutirait à la mise en place d'une classification des tumeurs cérébrales, ce qui nous permettra d'identifier les profils protéomiques de différents types de tumeurs cérébrales en termes de marqueur tumoraux.

Notre étude consiste en une analyse quantitative et qualitative de dix-sept échantillons urinaires regroupés en 8 tumoraux et 9 non tumoraux, et de six échantillons du LCR dont 2 sont tumoraux et 4 non tumoraux, ces échantillons constituent des femelles et des mâles à différents âges. La récupération s'est effectuée au niveau du service neurochirurgie du CHU de Bejaïa.

Lors de la quantification de la concentration protéique par la méthode de Bradford, nous avons pu observer une différence de concentration protéique entre les sujets tumoraux et non tumoraux, entre mâles et femelles et entre les patients ayant un âge inférieure à 20ans et ceux supérieure à 20ans. Cette différence consiste en une légère augmentation de concentration chez les femelles ce qui peut être expliqué par l'action des hormones, la concentration protéique augmente avec l'augmentation d'âge qu'ils soient tumoraux ou non tumoraux, ce qui peut être interpréter par la perte de l'efficacité de la filtration glomérulaire. Toutefois, cette différence de concentration semble ne pas être significative.

Le dosage protéique des échantillons du LCR nous a montré que les concentrations obtenues sont supérieure à celle observée lors du dosage protéique des urines. Une légère

différence de concentration entre les sujets tumoraux et les non tumoraux est observé, cette différence reste non significative, car le P value supérieur à 0,05. Ces résultats permettent de supposé que l'apparition d'une tumeur cérébrale n'influence pas la filtration glomérulaire ni l'intégrité de la barrière hémato-Encéphalique, Car une étude mener en parallèle sur le sérum sanguin n'a pas montré une augmentation de concentration protéique dans le sang des sujets tumoraux. toutefois, nos résultats ne concordent pas avec la littérature (Bauer et *al.*, 2010). Dictant que la BHE peut être dérégulée lors des tumeurs cérébrale. Ce dysfonctionnement est probablement dû au type histologique et la localisation spécifique des tumeurs.

La concentration protéique diminue avec l'âge dans le cas non tumoral, néanmoins, comme nous avons remarqué que lors d'une tumeur la concentration protéique augmente chez des patients adultes, ceci s'explique par la surexpression de protéines due probablement à la tumeur elle-même ou à l'action de la tumeur.

Suite à ce que nous avons obtenue comme résultat, nous avons procéder à une identification de protéines par électrophorèse SDS-PAGE. Cette technique nous permet d'observé que l'augmentation de concentration protéique dans les urines est due non pas au dysfonctionnement glomérulaire mais, plutôt à une augmentation de la production protéique. En effet les résultats d'électrophorèse, montrent que lors d'utilisation d'un gel à 10% une bande majoritaire unique qui apparait à un poids moléculaire avoisinant les 40kDa. De ce fait, la filtration glomérulaire chez les patients atteint de tumeurs cérébrales du moins ceux que nous avons dans notre étude est toujours fonctionnelle. L'utilisation d'un gel permettant l'augmentation de la résolution (15%) a permis de faire apparaitre des molécules de faible poids moléculaire.

L'électrophorèse des échantillons du LCR, nous a montré que les patients présentent une variation de migration protéique qui n'est pas liée à la pathologie. En effet, les échantillons présentent des bandes de bas poids moléculaire, constituant une en commun dans les environs de 30 kDa, on observe aussi des proteines à haut poids moléculaire. Mais aussi, des proteines inférieur à 30 kDa. Comme nous l'avons déjà décrit, plusieurs proteines dont le poids moléculaire avoisinant les 30 kDa son présentes dans le cerveau. Notamment, BDNF, NGF, BMP-2, Endotheline, FGF-2.

Cela nous a conduit à posé l'hypothèse suivante : les résultats obtenue, sont probablement la conséquence d'une surexpression de ces facteurs-là, qui sont impliqué dans

l'activation de la neurogenese. Ce dérèglement engendre positivement la réactivation de cellules souches ou des cellules ayant des caractéristiques souches. Le résultat obtenue concorde avec la littérature (Ginéstier et *al.*, 2007). Qui stipule qu'une tumeur peut être déclenchée par des cellules souches capable de donner naissance aux différentes cellules de la masse tumorale.

La migration protéique des échantillons correspondant à des sujets ayant un âge inférieur à 20 ans présente des profils riches en protéines par rapport à ceux supérieure à 20ans, le patient adulte tumoral présente plus de proteines que le non tumoral adulte. Un profil semblable est observé entre un patient de 40jours non tumoral et un autre de 23 ans tumoral, chez qui normalement la neurogenèse n'est plus activée, ce qui nous a menés à émettre l'hypothèse selon laquelle : le mécanisme de la neurogenèse ainsi que la plasticité neuronal est déclenché suite à un processus tumoral ou à l'action de la tumeur.

Les résultats d'électrophorèse nous ont permis de confirmé ceux obtenue lors du dosage protéiques. C'est-à-dire, la bande majoritaire au environ de 30 à 40 KDa dans le liquide urinaire est toujours présente, ainsi, au niveau du LCR, il existe des proteines de haut poids moléculaire (PM> 60kDa) qu'on ne retrouve pas dans les urines, ce qui confirme que la filtration glomérulaire n'est pas dysfonctionnante. La concentration protéique diminue avec l'âge, sauf dans le cas d'une tumeur ; à l'âge adulte, les tumoraux présentent plus de proteines, ce qui confirme l'augmentation de la production protéique due à la tumeur ou à l'action de la tumeur.

Des études de caractérisation des altérations géniques dans les gliomes malins récemment publiés dicte que, la théorie sur les changements moléculaires pendant la tumorigenèse est fondée sur l'idée qu'une seul cellule soit à l'origine de ce gliome, les cellules souche adulte serait donc à l'origine de la majorité des tumeurs cérébrales. Il serait donc intéressant de les caractériser (Tao, S et al 2012).

Après cette étude préliminaire mais néanmoins riche en résultats, On constate que, pour analyser les urines, les échantillons devront être bien centrifugé, filtrer, et analyser sur un gel de haute résolution (15%). De plus, la richesse de LCR et au vu des résultats obtenues, on suggère que les urines ne semble pas être le meilleure liquide biologique à analyser lors d'une étude sur la détection de marqueurs tumoraux de nature protéique concernant les tumeurs cérébrales, tandis que le liquide cérébro-spinal à révéler des résultats prometteurs.

L'utilisation d'un gel de 15% pour augmenter la résolution nous a permis de faire apparaître des bandes à $PM < 30$ KDa dans les deux liquides biologique, il se trouve que plusieurs protéine notamment, les facteurs influençant le développement du système nerveux central cités précédemment semble avoir des poids moléculaire au environ de 30KDa, donc ce que nous avons retrouvé peut effectivement s'agir de ces protéines. Ainsi il serait intéressant de poursuivre l'étude notamment, par l'identification de ces protéines par des méthodes plus sensibles et plus précises telle que la méthode d'ELISA et le Western Blot basés sur l'utilisation des anticorps monoclonaux, ce qui permettra ainsi d'établir une signature moléculaire différentielle entre les différentes tumeurs cérébrales.

De plus, lors de notre étude, il nous a été permis de réaliser une analyse quantitative chez le même patient pré & post-opératoire. Nous avons remarqué que la concentration protéique dans le LCR diminue après une ablation tumorale. Le patient numéro 213 dont la concentration protéique pré-opératoire est de 4702 $\mu\text{g/ml}$ présentant une concentration post-opératoire de 131,23 $\mu\text{g/ml}$.

Malgré les résultats préliminaires très intéressants que nous avons pu avoir, il est nécessaire toutefois d'augmenter la cohorte de patients impliqués dans l'étude, cela afin d'avoir des résultats statistiquement significatifs, mais aussi réaliser d'autres tests biochimiques notamment l'Elisa ou le western-blot afin d'identifier les molécules différentielles dans chaque échantillons, ainsi que leur concentrations. De ce fait, il est intéressant de suivre la concentration protéique chez les mêmes patients pré et post-opératoire dans le liquide cérébro-spinal.

Références Bibliographiques

Abate, O., Bollo, E., Lotti, D., Bo, S. (1998). Cytological, Immunocytochemical and Biochemical Cerebrospinal Fluid Investigations in Selected Central Nervous System Disorders of Dogs. *Journal of Veterinary Medicine*, 45: 73-85.

Alcmène, Chalazonitis., Kessler, J.A. (2013). Pleiotropic Effects of the Bone Morphogenetic Proteins on Development of the Enteric Nervous System. *Dev. Neurobiol.*; 72(6): 843–856.

Aloe, L., Rocco, M.L., Bianchi, P., Manni, L. (2012). Nerve growth factor: from the early discoveries to the potential clinical. *Journal of Translational Medicine*, 10:239

Alvarez-Buylla, A., Garcia-Verdugo, J.M., Tramontin, A.D. (2001). A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci* 2, 287-93.

André, J.M., Catala, M., Morère, J.J., Escudier, E., Katsanis, G., Poirier, J. (2008). *Histologie: les tissus*. Université Pierre et Marie Curie. faculté de médecine.

Anton, E.S., Marchionni, M.A., Lee, K.F., Rakic, P. (1997). Role of GGF/neuregulin signaling in interactions between migrating neurons and radial glia in the developing cerebral cortex. *Development*. Printed in Great Britain. The Company of Biologists Limited. DEV8429 Section of Neurobiology, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut 06510-8001, USA.

Bagley, R.S. (2003). How to obtain a CSF samples in dogs and cats; skills Laboratory, Part 1. *Veterinary Medicine*, 98 (6): 472-486.

Bailly L. (1995) Contribution à l'étude du diagnostic cytologique du liquide céphalorachidien chez les carnivores domestiques. Thèse vétérinaire. Lyon.

Bauer, A.T., Burgers, H.F., Rabi, T., Marti, H.H. (2010). Matrix metalloproteinase -9 Mediates hypoxia- induced vascular leakage in the brain via tight junction rearrangement. *J Cereb Blood Flow Metab.* 30,837-848.

Beaudeau, J.L., Soler, C., Foglietti, M.J. (2002). Physiopathologie de la protéine S-100 : intérêt de son dosage en biologie clinique. Service de biochimie, hôpital Pitié-Salpêtrière, Centre d'imagerie nucléaire (C.I.N.), Saint-Étienne, France Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS.

- Bellabeh, P., Braun, A., Nedergaard, M.** (2004). The Blood Brain Barrier: an overview: structur, regulation and clinical implication. *NeurobiolDis.* 16: 1-13.
- Bendavid.** (2007). Biochimie du liquide Céphalorachidien. Rôles physiologiques, Cours PCEM2
- Berry, A., Bindocci, A., Alleva, E.** (2012). NGF, Brain and Behavioral Plasticity Section of Behavioral Neurosciences, Department of Cell Biology and Neurosciences, Istituto Superiore di Sanit`a, Viale Regina Elena 299, 00161 Rome, Italy Neural Plasticity.
- Bouvier, C., Fernandez, C., Meyronet, D.,Figarella-Branger D.**(2005). Examens cytologique, histologique, immunohistochimie et genetique des tuemeurs du système nerveux central. *EMC-neurobiologie 2* : 557-558.
- Brodmann, K.** (1909).Vergleichen de Lokalisations lehre der Grosshirnrinde. Leipzig: Johann Ambrosius Bart,
- Calabrese, F., Rossetti, A.C., Racagni, G., Gass, P., Riva, M.A., Molteni, R.** (2014). Brain-derived neurotrophic factor: a bridge between inflammation and neuroplasticity mini review article published: 10.3389/fncel.00430 *Frontiers in Cellular Neuroscience.* V8 | A 430.
- Cazaubon, S., Deshayes, F., Couraud, P.O., Nahmias, C.** (2006). Endothéline-1, angiotensine II et cancer Institut Cochin, Département de Biologie cellulaire, Paris, France ; Université Paris Descartes, Faculté de Médecine René Descartes, Paris, France *MEDECINE/SCIENCES*; 22 : 416-22
- Cook, J.R.** (1988). De Nicola DB. Cerebrospinal fluid. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, , 18 (3): 475-499.
- Delaïy.**(1953). *PSYCHOL. Ortolang.* Centre National de Ressource Textuelles et Lexicales Med ; CNRS, 223p.
- Devin, K.,Binder.,Scharfman, H.E.**(2004).Brain-derived Neurotrophic Factor Growth Factors. *USA* ; 22(3): 123–131.
- El-jawahri, A., Patel, D., Zhng, M., Mladkova, N., Chakravarti, A.** (2008). Biomarkers of Clinical Responsiveness in Brain Tumor Patients. Progress and Potential. *Cancer Mol Diag Ther*; 12 (4): 199-208.

Edsbagge, M., Tisell, M., Jacobsson, L. & Wikkelso, C. (2004) Spinal CSF absorption in healthy individuals. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 287, R1450-145.

Eriksson, P.S., Perfelieva, E., Thomas BJork-eriksson, ann-marie Albörn, claesnordborg, daniel a. peterson et fred h. (1998). GAGE. Neurogenesis in adult human hippocampus. *Nature medicine*, vol.4, num11, 1313-1317p.

Giavazzi, R., Sennino, B., Coltrini, D., Garofalo, A., Dossi, R., Ronca, R., Maria Pia Molinari Tosatti., Presta, M. (2003). Distinct Role of Fibroblast Growth Factor-2 and Vascular Endothelial Growth Factor on Tumor Growth and Angiogenesis *American Journal of Pathology*, Vol. 162, No. 6. Copyright © American Society for Investigative Pathology.

Ginestier, C., Korkaya, H., Dontu, G., Birnbaum, D., Wicha, M.S., Charafe-Jauffret, E. (2007). La cellule souche cancéreuse Un pilote aux commandes du cancer du sein *Medecine / Sciences* ; 23 : 1133-9

Georges, G. (2013). Le diagnostic moderne du liquide céphalo-rachidien (LCR), Association des ATM, Amphi CHL1. Physiologie et aspects biochimiques

Guillemot, F. (2000). Signaux extracellulaires et programmes transrationnels contrôlant la neurogenese. Instituts de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire, Cnrs/ Inserm/ Université louis-pasteur, BP 163, 67404 Illkirch Cedex, France. 16: 159-63

Hablutzel, J. (2009). Les tumeurs cérébrales du système nerveux central. Ed. Ligue Suisse contre le cancer. Berne.

Hanahan, D., Weinberg, R. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Celle*. 144: 646-674.

Helth care S. D. (2009). Frequently asked questions about brain tumors. Neurotexas institute. Form 03-301 Rev 2. 3p.

Holme, D.J., Peck, H. (1998). *Analytical Biochemistry*, Edition 3.

Joseph, N. (2000). Contribution a la mise au point d'une technique simplifiée de mesure de la clairance de la créatine endogène pour l'évolution de la fonction glomérulaire chez le chien. Thèse. Doc. Ecole national vétérinaire. Lyon. 7p.

- Karas, M., Hillenkamp, F.** (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 Daltons. *Analchem.* 60.20: 2999-2301.
- Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L.** (1997). Cerebrospinal Fluid. In: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, fifth ed,: 785-827.
- Kermani, P., Hempstead, B.** (2007). BDNF: A Newly Described Mediator of Angiogenesis *Trends Cardiovasc Med.*; 17(4): 140–143.
- Kheirollahi, M., Dashti, S., Khalaj, Z., Nazemroaia, F., Mahzouni, P.** (2015). Brain tumors: Special characters for research and banking. *Advanced biomedical research*. Home brows instructions submit article.
- Klein, J.** (2009). Le recepteur B1 des kinines dans la fibrose rénale : des mecanismes au potential thérapeutique. Thèse. Doc. Université De Toulouse. 2-5p.
- Knudson, A.G.** (1971). Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma JR.Proc. Nat. Acad. Sci. USA Vol. 68, No. 4, pp. 820-823.
- Lagercrantz Hugo,** (2010). La fabrication du cerveau », *Sciences humaines* Ed.10/ (N°219), p. 8-8URL : www.cairn.info/magazine-sciences-humaines-2010-10-page-8.htm.
- Law, A.J., Weickert, C.S., Hyde, T.M., Kleinman, J.E., Harrison, P.J.** (2004). Neuregulin-1 (NRG-1) ARNm And Protein In The Adult Human Brain *Neuroscience* 127 125–136.
- Ledermann, J., Harter, P., Gourley, C., Friedlander, M., Vergote, I., Rustin, G., Scott, C., Meier, W., et al.** (2012). Olaparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive Relapsed Ovarian Cancer. *N Engl J Med*.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.** (1951).Protein measurement with the Folin phenol reagent. *JBiol Chem.*;193(1):265-75.
- Mac Lean P.D.** (2000). Les trois cerveaux de l’homme, Laffont, pari. Kolb Bryan, Whislaw Ina, cerveau et comportement, collection : neurosciences et cognitions, De Boeck, 2002.
- Mench, N.** (2006). *Anatomie Physiologie Biologie*. Ed. Maloine.paris. 181-193.

- Marieb, E.N.** (1999). Anatomie et physiologie humaine, De Boeck Université, (trad. de la 4e édition américaine par Jean-Pierre Artigau, France Boudreault, Annie Desbiens, Marie-Claude Désorcy, René Lachaine), 1194 p.
- Marieb E.N.**, (2008). Anatomie et physiologie humaine. Ed. Du Renouveau pédagogique Inc. De Boeck Université. Bruxelles.Paris.1204p.
- Maurer, M.H.** (2008). Proteomics of brain extracellular fluid (ECF) and cerebrospinal fluid (CSF), Mass Spectrometry Reviews.
- Northcott, P.A., Korshunov, A., Witt, H., Hieslscher, T., Eberhart, C.G., Mack, S., Bouffet, E., Clifford, S.C., Hawkins, C.E. et al.** (2010). Medulloblastome Comprises Four Distinct Molecular Variants. Journal of Clinical Oncology.
- Pearl, E., Davis, W.P., Cholette, C.** (1981). Anatomie et Physiologie Humaine. Mc Graw-Hill. Montréal Canada
- Pinet, F.** À quoi sert le système Endotheline. Inserm, rue du Professeur Calmette, Æ59019 Lille Cedex, France.
- Philippe Taupin.** (2005). Neurogenèse dans les pathologies du système nerveux. National Neuroscience Institute, 11 Jalan Tan TockSeng, 308433 Singapour. National University of Singapore, Nanyang Technological University. philippe.taupin@nni.com.sg obgpjt@nus.edu.sg M/S: médecine sciences, vol. 21, n° 8-9, 2005, p. 711-714.
- Retrosi, G., Sebire, N.J., Bishay, M., Kiely, E.M., Anderson, J., De Coppi, P., Resca, E., Rampling, D. et al.** (2011). Brain lipid-binding protein: a marker of differentiation in neuroblastic tumors. Journal of PediatricSurgery 46, 1197–1200
- Ross, L.** (2014). Le développement de l'embryon et du fœtus: 1er trimestre. Centre des naissances du CHUM. Équipe Naître et grandir.
- Rousseau, J.** (2007).Chimio-radiothérapie des tumeurs cérébrales : intérêt de l'injection intra tumorales de drogue anti néoplasique. Thèse. Doc. Université de Grenoble 1.9p
- Schalken J.A.** (1992). Les bases moléculaires de la progression tumorales dans le cancer de la prostate. Propret en urologie2 : 551-555.

Sharma, S. (2009). Tumor markers in clinical practice: General principles and guidelines. Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology. V 30, P 1-8.

Schnider, A. (2008). Neurologie du comportement : la dimension neurologique de la neurophysiologie. Elsevier Masson S.A.S. 251p.

Seidel, M.F., Wise, B.L. (2014). Lane Nerve growth factor: an update on the science and therapy Osteoarthritis Cartilage.

Sender, E. (2010). Les 5 âges du cerveau, science et avenir, février 2010, 46p.

Stevens, A., Lowe, J.S; Young, B. (2004). ANATOMIE PATHOLOGIE. ATLAS DE WHEATER. Edition 4 De Boeck Université rue des Minimes 39, D-1000 Bruxelles.

Talmage, D.A. (2008). Mechanisms of neuregulin action Institute of Human Nutrition and Department of Pediatrics, Columbia University Medical Center, 630 West 168th Street, New York, NY 10024, USA Novartis Found Symp. ; 289: 74–93.

Tao, S., Warrington, N.M et Rubin, J.B. (2012). Why does Jack, and not Jill, break his crown ? Sex disparity in brain tumors. Biology of sex differences. Volume 10.1186/2042-6410-3-3

Terenghi, G. (1999). Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors J. Anat. 194, pp. 114 Printed in the United Kingdom 1 Review Blond McIndoe Centre, Queen Victoria Hospital, East Grinstead, Sussex, UK.

Urban, N., Guillemot, F. (2014). Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. Department of Molecular Neurobiology, MRC National Institute for Medical Research, London, uk. Cellular neuroscience.

Vibert, J.F. (2007). Le liquide céphalo-rachidien. Neurophysiologie. Faculté de Médecine P&M Curie, site Saint-Antoine. Département de Physiologie. 6p.

Woodbury, M.E., Ikezu, T. (2014). Fibroblast growth factor-2 signaling in neurogenesis and neurodegeneration. Neuroimmune Pharmacol; 9(2): 92–101. Doi:10.1007/s11481-013-9501-5.

Zenhausern, R.(2011). Utilisation des marqueurs tumoraux en pratique clinique. Caducues Expresse. Institut central (ICHV). SION. 13. 9. reinhard.zenhausern@hopitalvs.ch

Annexes

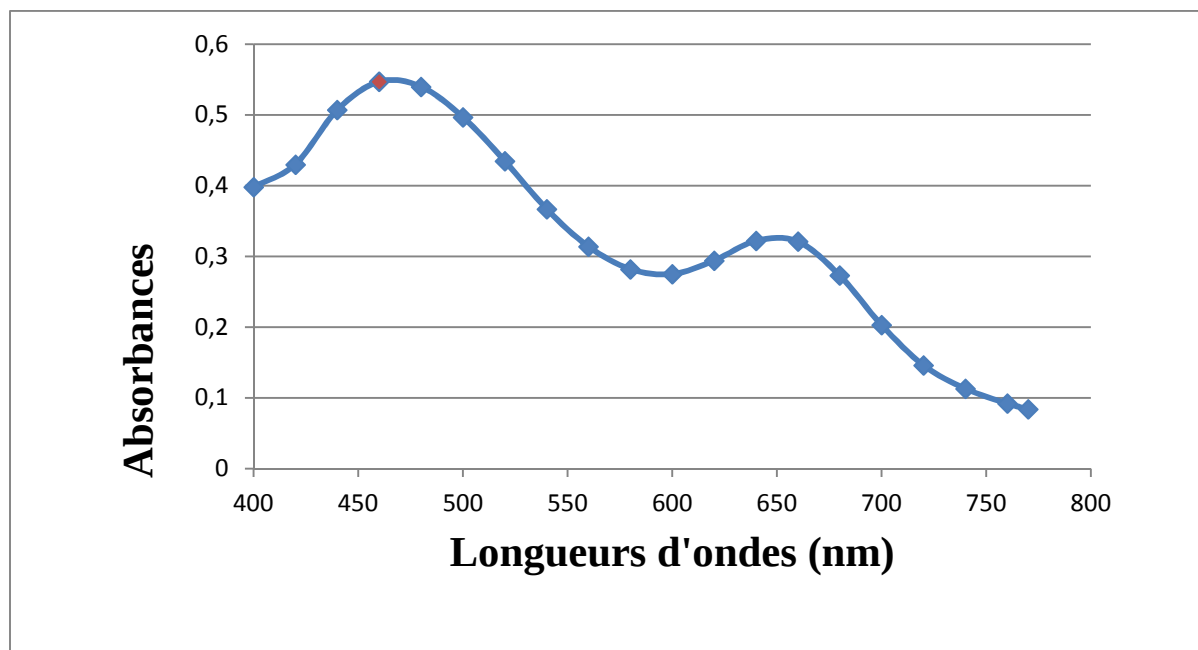
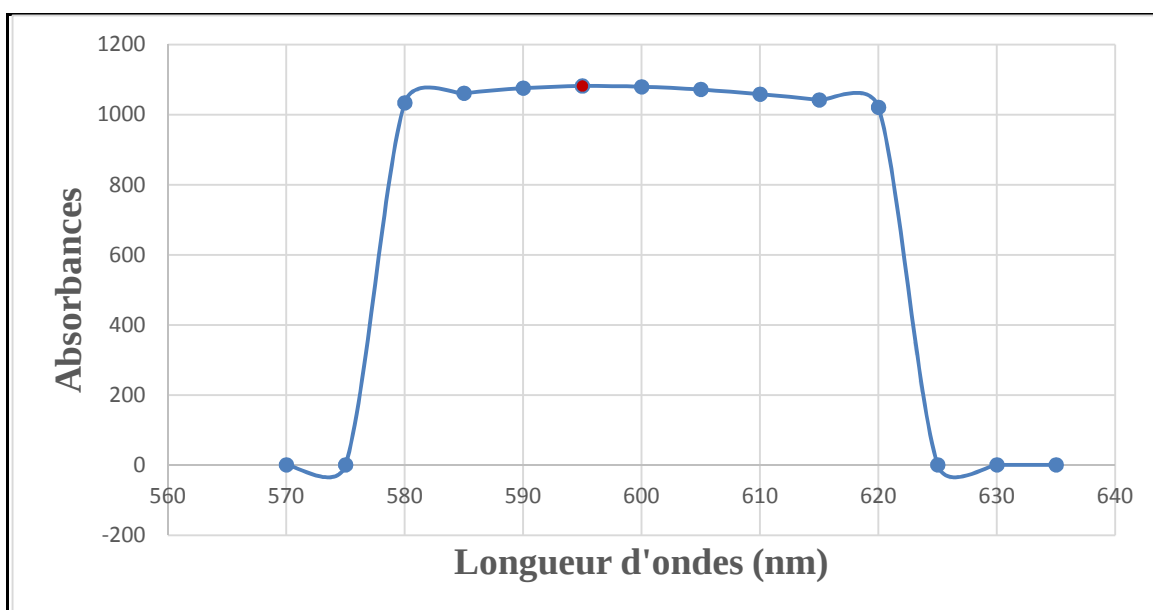
Annexe 1: Tableau des fonctions proposées pour les principaux constituants du système Endotheline.

Fonctions	Constituants impliqués
Rôles Bénéfiques :	
-Développement embryonnaire et néonatal	Et-1, ECE-1(?), Et-A
Crête neurale cardiaque et céphalique	Et-3, ECE-1(?), Et-B(?)
Croissance néonatale et fonction intestinales	Et-2, ECE-1, Et-A, Et-B
-Homéostasie Rénale	Et-1, ECE-1(?), Et-B
Homéostasie sodée	Et-1, ECE-1, Et-B
Equilibre acido-basique	Et-1, ECE-1(?), Et-A++
-Maintien du tonus vasculaire	Et-1, ECE-1(?), Et-A++
-Réparation du tissu cardiaque après ischémie	Et-1, ECE-1(?), Et-A++
	Et-1++, ECE-1 et ECE-2(?), Et-A+
-Régulation de la respiration	Et-1, ECE-1++, Et-A++
Rôles Déléteres : (Dans plusieurs tissus)	
-Condition physiopathologique impliquant un tonus vasculaire anormalement élevé.	Et-1, ECE-1++, Et-A et Et-B
-Tissu endommagés/ remodelage/ Réponse inflammatoire	

(La présence d'un point d'interrogation correspond : à un rôle possible. ++ Signifie : essentiellement) (Pinet, 2004)

Annexe 2: Tableau de la composition du Réactif de Bradford.

Composition	Volumes
Bleu de Coomassie G250	57mg
Méthanol	28,5ml
Acide phosphorique	57ml
dH2O	484,5ml

Annexe 3: Représentation graphique du spectre d'absorbance du Blanc**Annexe 4:** Représentation graphique du spectre d'absorbance du réactif de Bradford lié à la BSA.

Annexe 5: Protocole de préparation de solution d'acrylamide et de bisacrylamide (30%)

Dissoudre 30g du mélange Acrylamide, bisacrylamide dans 100ml de dH₂O, et agiter pendant 30min.

Annexe 6 : Protocole de préparation du Tris-HCL (PH 8,8 ; Vf = 50ml)

- 9,086g du Tris + 40ml dH₂O ; laisser agiter pendant 10mn et mesurer le PH.
- Ajout goutte à goutte du HCL (environ 1,07ml) et mesure du PH au fur et à mesure jusqu'à avoir un PH de 8,8.
- Ajout du dH₂O jusqu'à avoir un volume finale de 50ml.

Annexe 7: Protocole de préparation du Sodium Dodécyl sulfate S 10%

Donc, on fait dissoudre 10g de SDS dans 100 ml de dH₂O, sous agitation à 50 °C.

Annexe 8: Préparation de la solution de persulfate d'ammonium (10%).

Annexe 9: La composition du gel de séparation de 10% et de 15% pour un volume totale de 10ml.

Compositions	Volumes (ml) pour le 10%	Volumes (ml) pour le 15%
Acrylamide (10%) + Bis- Acrylamide (8%)	3,4	5
Tris-HCL (PH8, 8)	2,6	2,6
SDS (10%)	0,1	0,1
APS (10%)	0,1	0,1
TEMED	0,01	0,01
H ₂ O	3,8	2,2

Annexe 10: Protocole de préparation du Tris- HCL (PH 6,8 ; Vf = 50ml)

- 3,029g du Tris + 40ml dH₂O ; laisser agiter pendant 10mn et mesurer le PH.
- Ajout goutte à goutte du HCL (environ 2ml) et mesure du PH au fur et à mesure jusqu'à avoir un PH de 6,8.
- Ajout du dH₂O jusqu'à avoir un volume finale de 50ml.

Annexe 11: La composition du gel de concentration de 5% pour un volume totale de 5ml.

Compositions	Volume (ml)
Acrylamide (10%) + Bis- Acrylamide (8%)	0,67
Tris-HCL (PH 6, 8)	1,25
SDS (10%)	0,05
APS(10%)	0,05
TEMED	0,005
H2O	2,975

Annexe 12: La composition de solution de dénaturation (2X) pour un volume totale de 10ml.

Composition	Quantités
Tris-HCL (PH = 6,8)	1,25ml
SDS (10%)	4ml
Glycérol	2ml
Bleu de bromophénol	4mg
B-mércaptoéthanol	0,2ml
dH2O	2,55ml

Annexe 13: La composition de la solution de migration (10X) d'un volume totale de 250ml.

Compositions	Quantités
Tris-Base (PH =9)	7,56g
Glycine	36g
SDS(10%)	40ml
DH2O	210ml

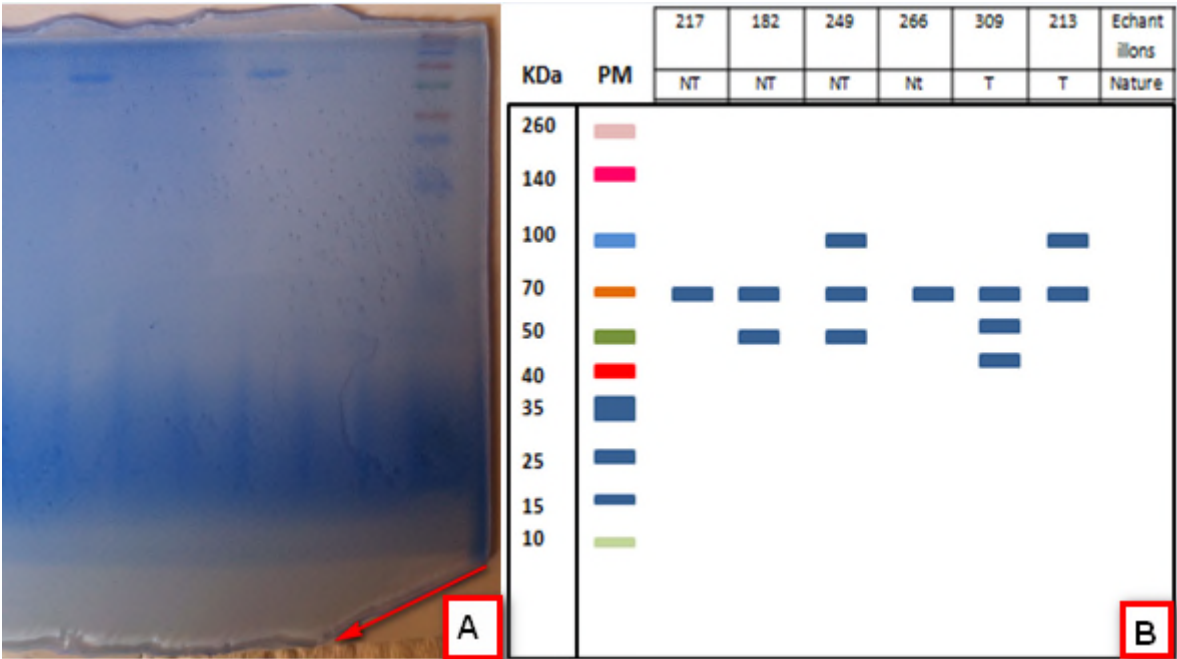
Annexe 14: La composition de la solution de coloration de volume totale de 250ml.

Composition	Quantités
Méthanol	30%
Acide acétique glacial	5%
d H2O	65%
Bleu de Coomassie R250	0,5g

Annexe 15: La composition de la solution de décoloration pour un volume totale de 500ml

Composition	Quantités
Méthanol	30%
Acide acétique glacial	5%
d H2O	65%

Annexe 16: Profil électrophorétique des échantillons du LCR sur gel de 15% à concentration de 100µg/ml



Résumé

La caractérisation moléculaire des pathologies tumorales, notamment des tumeurs cérébrales passe par l'identification de marqueurs tumoraux génomique et protéique présents dans différents liquides biologiques telle que les urines et le LCR. Cette identification va permettre non seulement, d'obtenir une signature moléculaire différentielle, mais aussi une classification de tumeurs cérébrales. Cela passe par la réalisation de dosage de concentrations protéiques dans les deux fluides notamment par la méthode colorimétrique de Bradford suivi d'électrophorèse SDS-PAGE les résultats obtenus ont permis d'identifier certaines signatures spécifiques aux tumeurs cérébrale, mais qui ne semblent pas liées aux sexe mais , à l'âge. A travers cette étude, nous pouvons conclure que contrairement aux urines, le LCR représente un meilleur liquide biologique candidat pour l'identification de marqueurs tumoraux.

Mots clés : Tumeur cérébrales, Marqueurs Tumoraux, Liquide biologique, LCR, Bradford, électrophorèse SDS-PAGE,

Abstract

Molecular characterization of tumor pathologies including brain tumors involves the identification of genomic and protein tumor markers present in various biological fluids such as urine and CSF. This identification will not only allow the obtainment of a differential molecular signature, but also a classification of brain tumors. This requires the realization of protein concentrations dosage in both fluids including by the colorimetric method of Bradford followed by SDS-PAGE electrophoresis, obtained results have identified some specific signatures to brain tumors, but that do not seem related to sex, but to age. Through this study, we can conclude that unlike urine, CSF represents a better candidate biological fluid for the identification of tumor markers.

Keywords: Brain Tumor, Cancer Markers, Biological Fluid, CSF, Bradford, SDS-PAGE electrophoresis.