



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Projet de Fin d'Etudes

Licence Sciences & Techniques
Sciences Biologiques Appliquées et Santé
(LST - SBAS)

**L'intérêt de la technique d'immunohistochimie dans
la détection du marquage de la p53**

Présentée par : KABOU Aïcha

Encadrée par : Pr GUISSI Sanae (FST Fès)

Pr BENNIS Sanae(FMPF)

Soutenu le : 06/07/2021

Devant le jury composé de :

. Pr GUISSI Sanae

. Pr BENNIS Sanae

. Pr BENCHEIKH Rachid

Stage effectué à : La faculté de Médecine et de Pharmacie de Fès au laboratoire de

Biologie moléculaire.

Année universitaire 2020-2021

Dédicaces

A mes très chers parents, merci pour vos sacrifices et vos prières pour moi

Je vous adore.

A mes très chers frères et sœurs : Fatima, Omar , Meryem, et Youssef , Je vous aime.

A mes très chers amis Meryeme, Chaymae, Meryem, Imane, Yasmine,

Pour les merveilleux moments qu'on a passé ensemble, notre travail et nos sorties. Je vous aime

A toute ma famille

A tous mes enseignants

A tous ceux que j'aime

A tous ceux qui m'aiment

A tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin

Je vous dédie cet humble travail.

Remerciements

Tout d'abord, louange à « Allah » qui m'a guidé sur le droit chemin tout au long du travail et m'a inspiré les bons pas et les justes réflexes.

Au terme de mon projet de fin d'études, j'exprime ma profonde gratitude à Monsieur le doyen de la Faculté des Sciences et Techniques de Fès et à tout le cadre administratif et professoral pour leurs efforts considérables, spécialement le département de Biologie et le Chef de ma filière SBAS Monsieur Haloti.

Ma gratitude s'adresse également à Mme. Le PROFESSEUR BENNIS SANAE pour m'avoir donnée l'opportunité de passer ce stage dans les meilleurs conditions de professionnalisme, matérielles et morales, aux Doctorants GHITA, ASSMAE, et BRAHIM, SALMA, et ILHAM, que j'ai eu le grand plaisir de connaître et qui m'ont aidé durant mon stage, et à préparer mon rapport de fin d'études.

J'adresse mes plus sincères remerciements à mon encadrante Mme. Le PROFESSEUR GUISSI SANAE pour son encadrement pédagogique, et les moyens qu'elle a mis à ma disposition pour la réussite de ce travail tout au long de ma période de projet.

J'adresse mes remerciements à Mr. LE PROFESSEUR BENCHEIKH RACHID d'avoir accepté de siéger parmi cet honorable jury. C'est pour moi un grand honneur.

Liste des abréviations

ARF	: Alternative Reading Frame
ATRX	: Alpha-Talassemia/mental Retardation syndrome X-linked
CDKN2A	: Cyclin Dependent Kinase
Chr	: Chromosome
CHU	: Centre Hospitalier Universitaire
EGF	: Epidermal Growth Factor
EGRF	: Epidermal Growth Factor Receptor
GBMI/GBMII	: Glioblastome Primaire /Glioblastome Secondaire
GFAP	: Glial Fibrillary Acidic Protein
H2O2	: Eau Oxygénée
H.E.S	: Hematoxyline-Eosine-Safran
IDH	: Isocitrate Déshydrogénase
IHC	: Immunohistochimie
IRM	: Imagerie par Résonance Magnétique
Ki67	: Kiel 67
MDM2	: Murine Double Minute 2
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
1P	: Bras court du chromosome 1
P14	: Protéine 14
P53	: Protéine 53
PBS	: Phosphate Buffer Saline
19q	: Bras long du chromosome 19
SNC	: Système Nerveux Central

TP53 : Tumor protein 53

TERT : Enzyme à activité Reverse Transcriptase.

Liste des figures

Figure 1 : Anatomie de cerveau

Figure 2 : Neurone

Figure 3 : Cellules gliales

Figure 4 : Schéma simplifié pour la classification des gliomes sur la base des caractéristiques
Histologiques et génétiques.

Figure 5 : Structure du gène suppresseur de tumeur p53

Figure 6 : Rôle de p53

Figure 7 : Rôle transcriptionnel et régulation du gène suppresseur de tumeur p53

Figure 8 : Histokinette

Figure 9 : Enrobage dans la paraffine

Figure 10 : Microtomie et étalement des coupes sur les lames

Figure 11 : La méthode immunoenzymatique

Figure 12 : Résumé du protocole de l'immunohistochimie

Figure 13 : Répartition des cas de glioblastome selon le sexe

Figure 14 : Répartition des cas de glioblastome en fonction de l'âge

Figure 15 : Localisation du glioblastome

Figure 16 ; 17;18 : Coloration HES, Grade IV (×40)

Figure 19 : Répartition des cas selon les résultats de l'immunohistochimie

Figure 20 : Immunohistochimie ; p53 (×20)

Liste des tableaux

Tableau 1 : Age, Sexe des patients et résultats de l'immunohistochimie (p53)	35
---	----

Lieu de stage

La partie principale de mon travail « Immunohistochimie manuelle » s'est déroulée au sein de laboratoire de la biologie moléculaire et cellulaire situé à la faculté de Médecine et de Pharmacie de Fès, qui travaille sur des tissus cancéreux apportés par le service d'anatomie pathologique de laboratoire central d'analyse médicale du CHU de Fès.



Table des matières

Dédicaces	
Remerciements	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Lieu de stage	
INTRODUCTION GENERALE	1
La partie bibliographique.....	3
1 Généralités sur le cerveau	4
1.1 Anatomie	4
1.2 HISTOLOGIE	5
1.2.1 Neurone	5
1.2.2 Cellules gliales	6
2 Les tumeurs cérébrales.....	7
2.1 Les tumeurs cérébrales secondaires ou métastases cérébrales	7
2.2 Les tumeurs cérébrales primaires	7
3 Les gliomes.....	8
3.1 Données générales	8
3.2 Classification des gliomes.....	8
3.3 Epidémiologie	10
3.4 Facteurs de risque	10
3.5 Signes et symptômes.....	11
3.6 Classification de l’OMS	11
3.6.1 Gliomes diffus et anaplasiques (grade II et III).....	12

3.6.2	Glioblastome (grade IV).....	13
4	Notions de base sur la génétique moléculaire des gliomes	13
4.1	Mutations des gènes <i>IHD1</i> et <i>IDH2</i>	13
4.2	L'amplification génique de l'EGFR	14
4.3	Mutations d' <i>ATRX</i> et du promoteur de <i>TERT</i>	14
4.4	Mutation du P53	15
4.4.1	.Structure de p53	15
4.4.2	.Le rôle du gène P53 :	16
5	Le glioblastome (GBM) : une unité particulière.....	18
6	Apport de l'immunohistochimie dans le diagnostic des glioblastomes	20
	Matériel Et Méthodes.....	22
6	Etude histologique	24
6.1	La fixation	24
6.2	L'inclusion	24
6.3	Microtomie	26
6.4	Coloration	27
6.5	Le montage	27
6.6	Observation	28
7	Etude immunohistochimique.....	28
7.1	Principe	28
8	Protocole expérimental d'immunohistochimie manuelle.....	29
	Résultats Et Discussion	32
9	Etude rétrospective.....	33
9.1	Répartition des cas de glioblastomes selon le sexe	33

9.2 Répartition des cas de glioblastome en fonction de l'âge	33
9.3 Etude macroscopique	34
10 Examen histologique de tissu fixé d'un glioblastome	35
11 Immunomarquage anti-p53.....	37
L'immunomarquage anti-p53 a été classé en 2 catégories semi-quantitatives :	37
Conclusion	43
Références bibliographique	

INTRODUCTION GENERALE

Malgré l'amélioration constante de leur diagnostic et de leurs traitements, les cancers sont une cause majeure de mortalité dans le monde. En effet, en 2020, on comptait près de 10 millions de décès d'après [Organisation Mondiale de la Santé \(OMS\)](#). Alors que les cancers du sein et des poumons représentent les tumeurs les plus prévalentes, d'autres tumeurs, moins connues, présentent un pronostic encore plus sombre. Parmi ces dernières, les tumeurs du système nerveux central et plus particulièrement les glioblastomes font partie des plus meurtrières. En effet, seulement (35%) des patients atteints de glioblastome survivent plus d'un an, ce chiffre n'atteignant pas (10%) pour les patients âgés de plus de 75ans [1]. Les glioblastomes sont la forme la plus agressive d'un grand groupe de tumeurs appelé « gliome ». Ces gliomes sont des tumeurs issues de la glie (astrocytes, oligodendrocytes, épendymocytes) [2]. De nombreuses classifications basées sur l'histologie se sont succédées afin de définir les différents types de gliomes [3;4;2]. Aujourd'hui, plusieurs études ont montré que des marqueurs moléculaires particuliers permettaient une classification plus pertinente de ces tumeurs [5,6].

Mon projet de fin d'étude s'inscrit dans ce cadre et a pour objectif d'aborder l'intérêt diagnostique/pronostique de certains marqueurs utilisés dans les glioblastomes. Notre intérêt portera particulièrement sur l'utilisation des anticorps anti p53 en Immunohistochimie.

Etude bibliographique

1 Généralités sur le cerveau

Le cerveau, siège de nos émotions, de nos pensées, de nos réflexions, de notre identité..., nous permet de percevoir et de découvrir le monde qui nous entoure. C'est le quartier général de système nerveux central.

Plus de 10 milliards de cellules transmettent et reçoivent des messages de différentes parties de l'organisme. Elles contrôlent toutes nos mouvements et pensées et bien que le cerveau ne représente que (2%) du poids du corps, il consomme (20%) de l'énergie produite [7].

1.1 Anatomie

Le cerveau est formé de deux hémisphères cérébraux symétriques, du cervelet, du bulbe rachidien, du mésencéphale et de la protubérance annulaire. Le bulbe a pour fonction de transmettre des influx nerveux entre la moelle épinière et les hémisphères cérébraux. Le cervelet sert de coordinateur des mouvements.

Le cerveau est un organe complexe formé de matière grise et blanche. On peut distinguer les deux hémisphères cérébraux, le cervelet situé dans la fosse postérieure et le tronc cérébral, qui la relie à la moelle épinière.

La matière grise contient les noyaux des neurones et se situe à la surface du cerveau, c'est le siège de toutes nos actions, pensées et sensations.

La matière blanche est formée des axones, qui sont des prolongations des neurones. Ses fibres sont entourés d'une couche de myéline, substance grasseuse formée de cellules gliales, celle-ci accélère la transmission des influx nerveux le long des axones [7].

Le cerveau est entouré de liquide céphalo rachidien, retrouvé également dans ses ventricules et ses citernes. Ce liquide sert d'amortisseur et de protecteur du cerveau. (Figure 1)

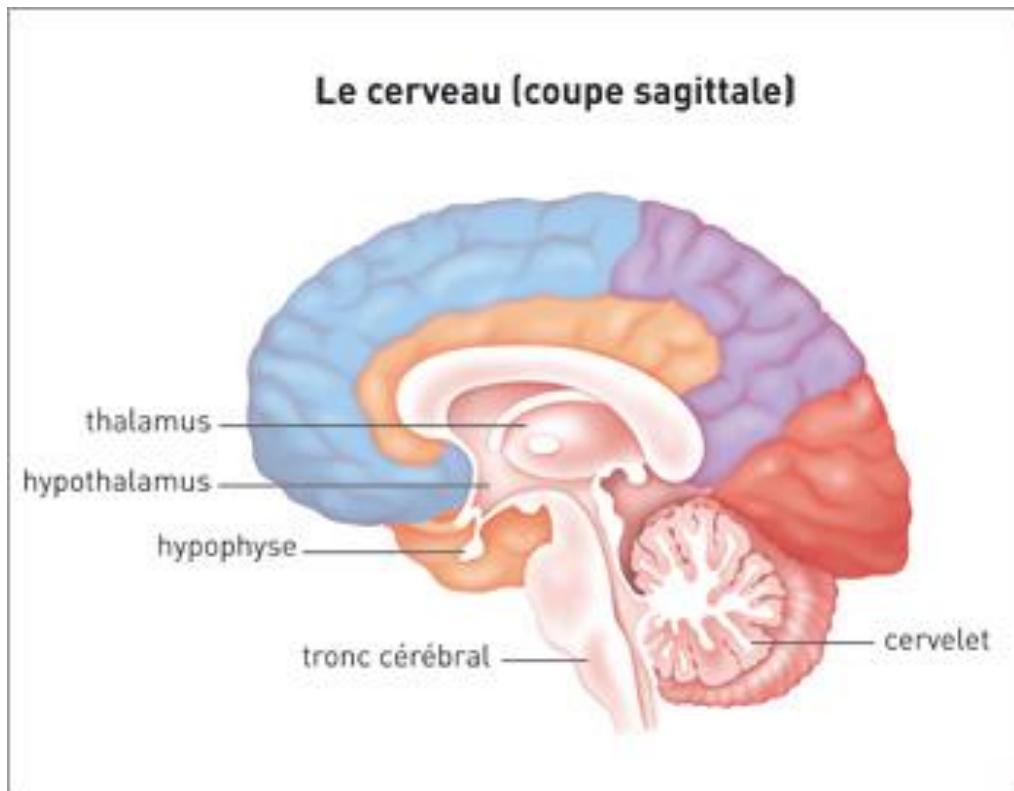


Figure 1 : Anatomie du cerveau [34]

1.2 HISTOLOGIE

Le tissu cérébral est un tissu complexe réparti en substance grise et blanche. Son unité fonctionnelle principale est le neurone, il est également constitué de cellules gliales, de capillaires sanguins et de matière extracellulaire (MEC).

1.2.1 Neurone

Le neurone est une cellule anatomiquement et physiquement spécialisée dans la réception, l'intégralité et la transmission de l'information. Il est constitué d'un corps cellulaire, les dendrites, et l'axone [8]. (Figure 2)

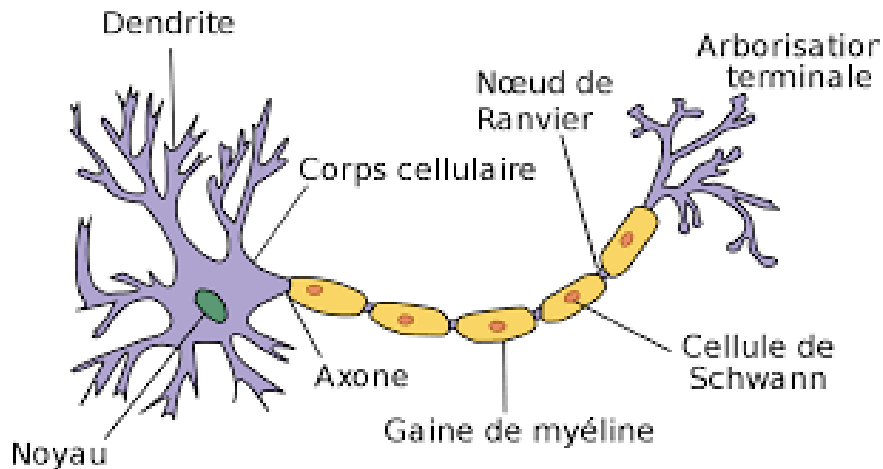


Figure 2 : Neurone [35]

1.2.2 Cellules gliales

Les cellules gliales constituent le tissu de soutien de système nerveux. Elles assurent le lien avec les vaisseaux sanguins et apportent les nutriments essentiels au fonctionnement métabolique du système nerveux. Contrairement aux cellules neuronales, les cellules gliales peuvent se multiplier, voire proliférer et devenir cancéreuse. On distingue plusieurs types de cellules gliales ; les astrocytes, les oligodendrocytes, la microglie, et les cellules épendymaires [8]. (Figure 3)

-**Les astrocytes** : ce sont les cellules les plus nombreuses de l'encéphale. Qui est un véritable tissu de soutien. Ces cellules assurent le support métabolique et la synthèse des principaux constituants du système nerveux. Elles n'ont pas de rôle direct dans la transmission de l'influx nerveux. Elles ont un aspect étoilé, ramifié autour d'un corps cellulaire volumineux et assurent aussi les contacts intracellulaire. (Figure 3)

-**Les oligodendrocytes** : ce sont des cellules plus petites et moins nombreuses que les astrocytes. Leur rôle principal est l'élaboration de la myéline qui entoure les axones.

-**La microglie** : elle est formée de petites cellules à cytoplasme peu abondant. Elle a des propriétés de phagocytose.

-**Les épendymaires** : ce sont des cellules cylindriques ou cubiques à noyau volumineux qui recouvrent et tapissent les cavités ventriculaires de l'encéphale et le canal central de la moelle épinière. Elles jouent un rôle important dans les échanges entre le liquide cérébro-spinal et le parenchyme cérébral.

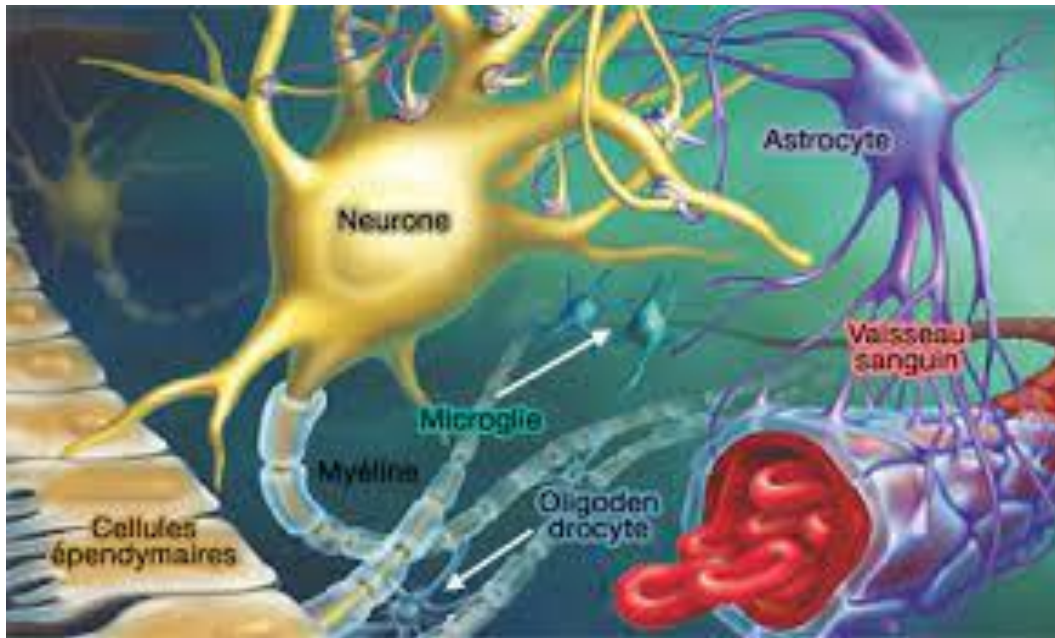


Figure 3 : Cellules gliales [36]

2 Les tumeurs cérébrales

2.1 Les tumeurs cérébrales secondaires ou métastases cérébrales

Des cancers qui se sont initialement développés dans des organes du corps (par exemple, dans le poumon ou le sein) peuvent se propager dans le cerveau. Dans ce cas, la tumeur cérébrale « secondaire » trouvée dans le cerveau est appelée « métastase ».

2.2 Les tumeurs cérébrales primaires

Sont celles qui prennent naissance dans le cerveau. Elles peuvent être bénignes « non cancéreuses » ou malignes « cancéreuses », leur dénomination provient du tissu cérébral dans lequel elles se développent.

Les tumeurs malignes les plus fréquentes sont :

-**Les gliomes**: Ce sont des tumeurs malignes, qui représentent (80%) de l'ensemble de tumeurs cérébrales [9]. Elles sont formées à partir de cellules gliales, cellules intervenant comme structure de soutien des cellules nerveuses (neurones).

-**Les médulloblastomes** : Ce sont des tumeurs malignes, qui se développent à partir de la moelle

épineière au stade embryonnaire. Ce sont les tumeurs cérébrales les plus courantes chez les enfants.

-Enfin, parmi les tumeurs primaires malignes, on retrouve les hémangioblastomes, les méningiomes, les adénomes hypophysaires, les ostéomes, les pinéalomes ...

3 Les gliomes

3.1 Données générales

Les gliomes constituent un groupe de tumeurs malignes, pouvant survenir n'importe où dans le SNC, c'est-à-dire, dans le cerveau ou moins fréquemment, dans la moelle épinière.

Ces tumeurs sont caractérisées par un modèle de croissance infiltrant et/ou une tendance à s'étendre localement dans le SNC. L'expansion de la tumeur à l'extérieur du cerveau n'intervient généralement pas.

3.2 Classification des gliomes

Après l'examen histochimique, les gliomes sont généralement nommés selon le type des cellules nerveuses dont ils dérivent (astrocytes, oligodendrocytes, ou cellules épendymaires).

La classification des gliomes s'effectue sur une échelle de I à IV qui reflète la vitesse de croissance de la tumeur ainsi que son agressivité.

Les tumeurs de grade I, qui surviennent principalement durant l'enfance, sont associées au meilleur pronostic intermédiaire. Par contre les tumeurs cérébrales de grade III (anaplasiques) et de grade IV (glioblastomes) sont considérées comme des gliomes de grade élevé, car elles sont agressives et présentent généralement un pronostic moins favorable.

***Les astrocytomes**

Ce sont les gliomes les plus fréquents. Parmi les astrocytes, tous les grades de malignité allant des astrocytomes pilocytiques (malignité la plus faible, Grade I) aux glioblastomes (malignité la plus élevée, Grade IV) sont trouvés.

L'astrocytome pilocytique : c'est une tumeur bénigne de grade I associée à un bon pronostic qui

affecte essentiellement les enfants et représente 1/3 des tumeurs gliales et pédiatriques. Il se trouve principalement au niveau du cervelet, du tronc cérébral, du chiasma, et du nerf optique.

L'astrocytome de grade II ou astrocytome diffus : c'est une tumeur diffuse se caractérisant par un degré élevé de différenciation astrocytaire, par des atypies cytonucléaires, une croissance lente et une infiltration diffuse des structures cérébrales adjacentes. L'astrocytome de grade II affecte typiquement les adultes jeunes et a tendance à progresser vers l'astrocytome anaplasique (Grade III) puis le glioblastome (Grade IV) .

L'astrocytome de grade III : ou astrocytome anaplasique: il est défini par une activité mitotique importante, une densité cellulaire élevée, des atypies nucléaires souvent franches et une évolution inévitable vers le glioblastome.

L'astrocytome de grade IV ou glioblastome : Le glioblastome représente la forme la plus fréquente et la plus maligne des gliomes avec un pronostic sombre (médiane de survie d'environ 15 mois). Il est caractérisé par la présence de nécrose ischémique et une prolifération endothélio-capillaire, en plus des autres critères d'anaplasie. La majorité des glioblastomes (90%) se manifeste d'emblée, chez les sujets âgés, sans aucune observation d'une lésion tumorale précoce de bas grade. Ils sont ainsi décrits comme glioblastomes primaires ou de novo. Les glioblastomes qui se développent suite à l'évolution d'un gliome préexistant de grade II et III, sont moins fréquents et touchent principalement les patients avant l'âge de 40 à 45ans. Ils se définissent comme glioblastomes secondaires [32].

***Les oligodendrogliomes** : Ils sont deux grades, le grade II diffus et le grade III anaplasique. Sur le plan histologique, les oligodendrogliomes sont modérément cellulaires et composés de cellules à noyau rond, à chromatine dense et inhomogène, localisée au centre d'un cytoplasme souvent clair.

***Les gliomes mixtes**

Les gliastrocytomes ou gliomes mixtes se définissent par la présence évidente de deux types cellulaires ressemblant morphologiquement aux cellules tumorales des astrocytomes et aux cellules tumorales des oligodendrogliomes. Les gliastrocytomes sont classées en grade II ou III en fonctions des différents critères de malignités : densité cellulaire, atypies nucléaires, activité

mitotique et prolifération vasculaire.

3.3 Epidémiologie

Incidence

Les gliomes sont considérés comme un cancer rare, car il affecte moins de 6 personnes sur 100.000 chaque année. D'après le CBTRUS 2013-2017 (Center Brain Tumor Registry of The United State), ils représentent (80%) de tumeurs cérébrales malignes [9]. Les gliomes peuvent toucher les personnes de tout âge, y compris les enfants, les adolescents, les jeunes adultes .Dans le monde entier, trois femmes et quatre hommes sur 100.000 sont diagnostiqués chaque année avec une tumeur touchant le système nerveux.

Au Maroc, les études concernant l'épidémiologie des gliomes sont en cours de réalisation. En France, leur incidence est de 7 à 8 cas/100000 habitants, avec 4000 nouveaux cas par an, selon le registre de Montpellier des tumeurs du système nerveux central [23].

3.4 Facteurs de risque

Avant d'examiner les principaux facteurs de risque pouvant prédisposer au développement d'un gliome, il est important de préciser qu'un facteur de risque augmente le risque d'apparition d'un cancer, il n'est ni nécessaire ni suffisant pour causer la maladie. Un facteur de risque n'est pas une cause en soi, par conséquent, certaines personnes présentant les facteurs de risque ne développeront jamais de gliome, tandis que d'autres personnes ne présentant aucun de ces facteurs développeront tout de même cette maladie.

En tout état de cause, à l'heure actuelle, on ne peut expliquer précisément pourquoi un gliome survient et très peu de facteurs de risque ont été identifiés.

D'une manière générale, les gliomes sont légèrement fréquents chez l'homme que chez les femmes, et chez les populations blanches que les noires.

Les facteurs de risque reconnus des gliomes sont :

. Les rayonnements ionisants : il s'agit d'un facteur de risque environnemental établi. Les

personnes ayant reçu une irradiation crânienne comme traitement contre le cancer durant leur enfance présentent aussi un risque accru de développer un gliome plusieurs années, ou même plusieurs décennies plus tard [24].

.Les antécédents familiaux : (c'est-à-dire, un ou plusieurs cas de gliomes dans la même famille) sont associés à deux fois plus de risques de développer un gliome.

.Des syndromes génétiques : un certain nombre de syndromes héréditaires rares sont associés à un risque plus élevé de développer des cancers de manière générale, principalement en raison de la présence d'une ou de plusieurs mutations génétiques. De façon significative, certains de ces syndromes héréditaires peuvent présenter un risque accru de gliome, comme le syndrome de COWN, le TURCOT, le syndrome de LYNCH, le syndrome de Li-Fraumeni et le neurofibromatose de type 1 [12,24].

3.5 Signes et symptômes

On peut soupçonner un gliome en présence de différents symptômes. Cependant, il est important de savoir que ces symptômes dépendent en grande partie du type de gliome, ainsi que de son emplacement exact dans le système nerveux central. Parmi ces symptômes :

. Les convulsions apparaissent surtout chez les patients avec des tumeurs à évolution lente comme les gliomes de bas grade. Une crise de convulsions peut causer des tremblements ou des contractions musculaires dans une main, un bras ou une jambe...

.Des problèmes neurologiques (déficits) : ceux-ci dépendent largement du ou des lobes du cerveau qui sont affectés. Des problèmes de vue peuvent survenir si le lobe occipital est touché. Des difficultés à parler ou à comprendre ce qui est dit ainsi que la perte d'une fonction ou sensibilité d'une partie du corps apparaissent quand le lobe frontal ou le lobe pariétal sont atteints. Des changements de personnalité ou de comportement comme l'apathie, la perte du contrôle émotionnel peuvent aussi survenir.

3.6 Classification de l'OMS

La classification OMS 2007, des tumeurs de système nerveux central était essentiellement basée sur un concept histogénétique, c'est-à-dire sur la ressemblance microscopique des cellules tumorales avec un constituant du tissu cérébral normal et leur degré de différenciation .Cette

caractérisation était fondée sur des critères morphologiques en coloration standard (Hématoxyline-Eosine-HE), souvent complétés par des études immunohistochimiques (IHC), voire ultrastructurales. Suite aux avancées majeures de ces dernières années dans le domaine de la génétique des tumeurs, du système nerveux central. Une nouvelle classification OMS (2016) a été établie et qui ne se base plus seulement sur des critères morphologiques, mais incorpore également des paramètres moléculaires aboutissant à un diagnostic intégré [25]. (Figure 4)

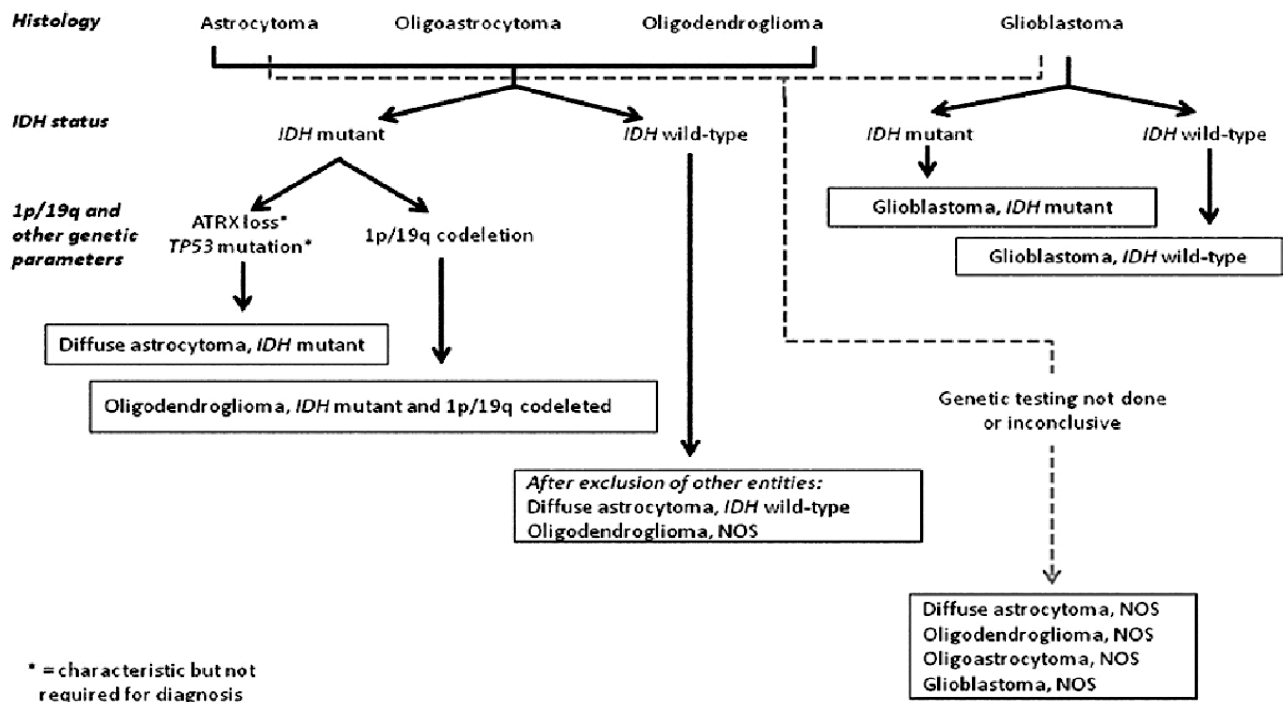


Figure 4 : un schéma simplifié pour la classification des gliomes sur la base de caractéristiques histologiques et génétiques de la classification de l’OMS 2016. [37]

3.6.1 Gliomes diffus et anaplasiques (grade II et III)

Ce sont les astrocytomes et les oligodendrogliomes de grade II et III qui se développent majoritairement au niveau des hémisphères cérébraux de jeunes adultes et possèdent une tendance inévitable vers la récurrence et la progression maligne. La mutation du gène IDH (L’isocitrate déshydrogénase) est l’altération moléculaire précoce et majeure caractérisant ce groupe de tumeurs.

Pour induire le développement des gliomes, d’autres altérations génétiques sont nécessaires telles que les mutations de gène TP53 (Tumor Protein 53) et ATRX (Alpha-thalassemia/mental

Retardation syndrome X-linked) dans les astrocytomes diffus et anaplasiques. La codélétion du chromosome 1p/19q ainsi que les mutations du promoteur du gène TERT (telomerase reverse transcriptase) caractérisant les oligodendrogliomes diffus et anaplasiques [25].

3.6.2 Glioblastome (grade IV)

Les glioblastomes sont subdivisés en deux grandes entités : les glioblastomes primaires avec IDH sauvage qui représentent plus de (90%) de tous les glioblastomes et ceux avec IDH muté qui ne dépassent pas (10%) des cas et représentent les glioblastomes secondaires. La catégorie glioblastomes NOS (Not Otherwise Specified) est réservée aux cas dont la détection moléculaire des mutations IDH est impossible.

La distinction de ces deux types de glioblastomes (IDH sauvage et IDH muté) est importante non seulement du fait qu'ils représentent des entités biologiques distinctes, mais également ils sont associés à une survie globale différente et qui est significativement plus longue chez les patients ayant un glioblastome avec IDH muté.

Plus de (70%) des glioblastomes IDH de type sauvage possèdent des mutations TERT, qui sont souvent associés à l'amplification du récepteur de facteur de croissance épidermique (EGFR) et ont liés à une mauvaise survie. [25]

4 Notions de base sur la génétique moléculaire des gliomes

Plusieurs marqueurs moléculaires sont connus de longue date en neuro-oncologie et ont été utilisés jusqu'à présent comme marqueurs pronostiques de survie ou prédictifs à la réponse à certains traitements. La classification OMS 2016 utilise ces marqueurs non pas comme marqueurs à l'intérieur d'une même catégorie de maladies, mais comme critères de définition des différentes catégories.

4.1 Mutations des gènes *IDH1* et *IDH2*

Une des nouveautés de la classification OMS 2016 est la distinction de différents types de gliomes, avec des comportements biologiques et cliniques différents, selon leur statut mutationnel de gènes. *IDH1* et *IDH2*, codant pour deux isoformes de l'enzyme isocitrate déshydrogénase (IDH). Ces mutations induisent la production d'alpha-cétoglutarate et aboutissent à un phénotype d'hyperméthylation. Il est postulé que ce phénotype inhibe des oncogènes suppresseurs de tumeurs, induisant le développement des gliomes. Dans la nouvelle classification, les gliomes mutés pour *IDH1* ou *IDH2* sont regroupés sous le terme de « *IDH*-muté ». Ces mutations sont fréquentes dans les gliomes diffus puisqu'elles surviennent

respectivement dans (87%) et (83%) des gliomes de grades II et III et dans (85 %) des glioblastomes secondaires. Le statut « *IDH*-muté » est un facteur de meilleur pronostic pour les gliomes de grades II, III et IV [10;14;25].

4.2 L'amplification génique de l'EGFR

La surexpression de facteur de croissance EGF « Epidermal Growth Factor » et de ces récepteurs comme (EGFR) joue un rôle dans la progression tumorale.

Des niveaux élevés d'EGFR peuvent être induits par une amplification de gène, une surexpression, ou des mutations activatrices. Ces niveaux élevés d'EGFR jouent un rôle dans la tumorigénicité et sont associés à un pronostic défavorable [10 ,14 ,25].

L'amplification l'EGFR est fréquente dans (40%) à (60%) des glioblastomes de novo [26] et s'observe dans 15 à 20% [26] des oligodendrogliomes et astrocytomes de grade III.

C'est une anomalie d'intensité variable, de quelques copies à des milliers pour chaque cellule. Il a été montré que dans les glioblastomes de novo, une forte expression de l'EGFR était fortement prédictive d'une amplification de gène.

Dans les glioblastomes secondaire, il n'y a pas d'amplification de l'EGFR, ni expression anormale de l'EGFR.

4.3 Mutations d'ATRX et du promoteur de TERT

Parmi les processus de survie des cellules tumorales, celles-ci peuvent notamment maintenir de façon anormale la longueur de leurs télomères et donc ainsi échapper à la sénescence répllicative habituelle, c'est-à-dire le raccourcissement des télomères à chaque mitose survenant à l'état normal. Dans l'oncogenèse des gliomes, deux mécanismes mutuellement exclusifs interviennent : les mutations du promoteur de TERT et les mutations d'ATRX (Alpha-Thalassemia / mental Retardation syndrome X-linked).

La protéine TERT est une enzyme à activité reverse transcriptase. En absence d'une TERT active, les télomères se raccourcissent à chaque division induisant une sénescence cellulaire.

Récemment, les mutations du promoteur du gène de la télomérase reverse transcriptase (TERT) ont été observées dans environ 80% des glioblastomes [25].

4.4 Mutation du P53

4.4.1 Structure de p53

La protéine P53 est une phosphoprotéine nucléaire, de 53KDa et 393 acides aminés, codée par un gène localisé sur le chromosome 17. La structure de cette protéine est répartie en 5 domaines dont les principaux sont :

°°Le domaine Nter : domaine transactivateur .

°°Le domaine central : domaine de fixation à l'ADN.

°°Le domaine Cter (COOH) : domaine de la régulation de l'activité de la protéine.(Figure 5)

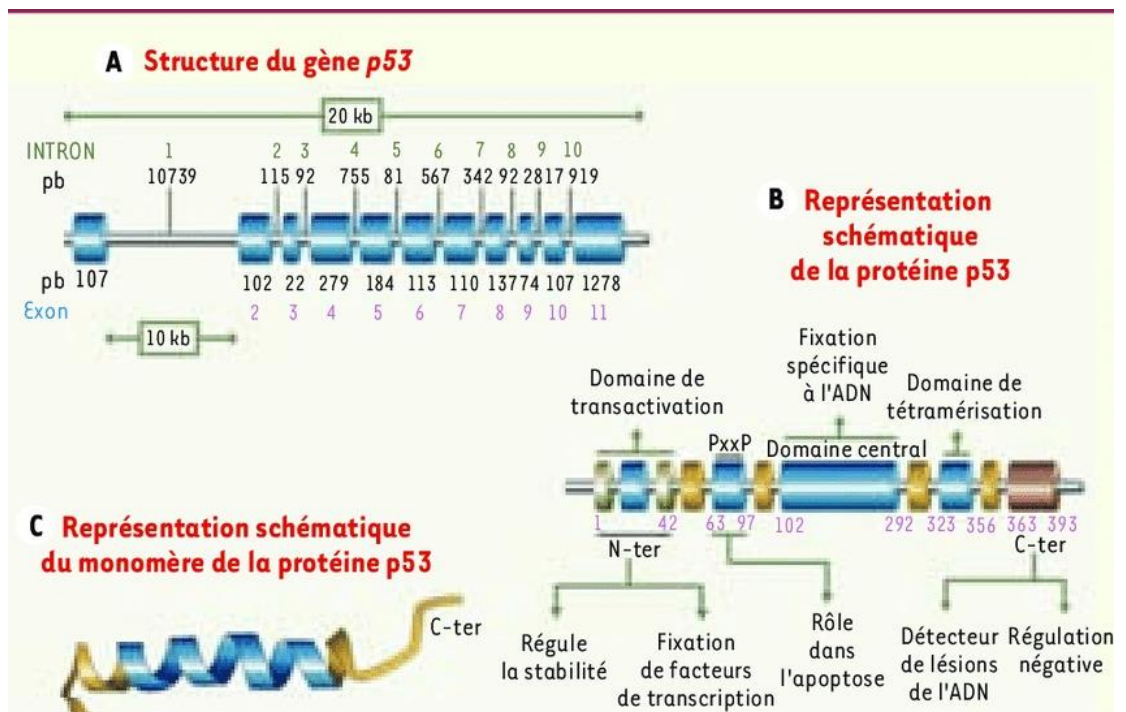


Figure 5 : structure du gène suppresseur de tumeur P53 [38]

4.4.2 .Le rôle du gène P53 :

Il s'agit d'un facteur transcriptionnel, qui a pour rôle de supprimer des cellules génétiquement anormales par apoptose ou à induire leur arrêt en G1 pour permettre la réparation de l'ADN. P53 est un censeur de proliférations cellulaires, un véritable gardien de l'intégrité du génome et le « chien de garde » des proliférations malignes [10,11,13] .

L'expression du gène p53 est activée à la suite d'un stress, de carence métabolique ou de dommage à l'ADN .Il code une protéine suppresseur de tumeur (la protéine P53) essentielle au contrôle de cycle cellulaire. En effet, elle induit la transcription du gène P21 inhibant ainsi la transcription G1/S. Ce blocage à la phase G1 doit permettre à la cellule de réparer de possibles dommages. Cependant, lorsque ces dommages sont trop importants et que les mécanismes de réparation de l'ADN sont dépassés (notamment dans les cas des cellules cancéreuses), P53 provoque l'apoptose des cellules concernées. (Figure 6;7)

D'autres part, la protéine P53 induit la transcription de gène Mousse Double Minute 2 (MDM2) qui exerce un rétrocontrôle négatif sur la voie P53. En effet, quand la protéine P53 dépasse un certain niveau cellulaire, MDM2 provoque son ubiquitination, responsable de la dégradation par la protéasome. Cette dégradation peut être inhibé à la suite de l'activation par des oncogènes, de la protéine P14 ARF, un produit du locus CDKN2A [10,11].

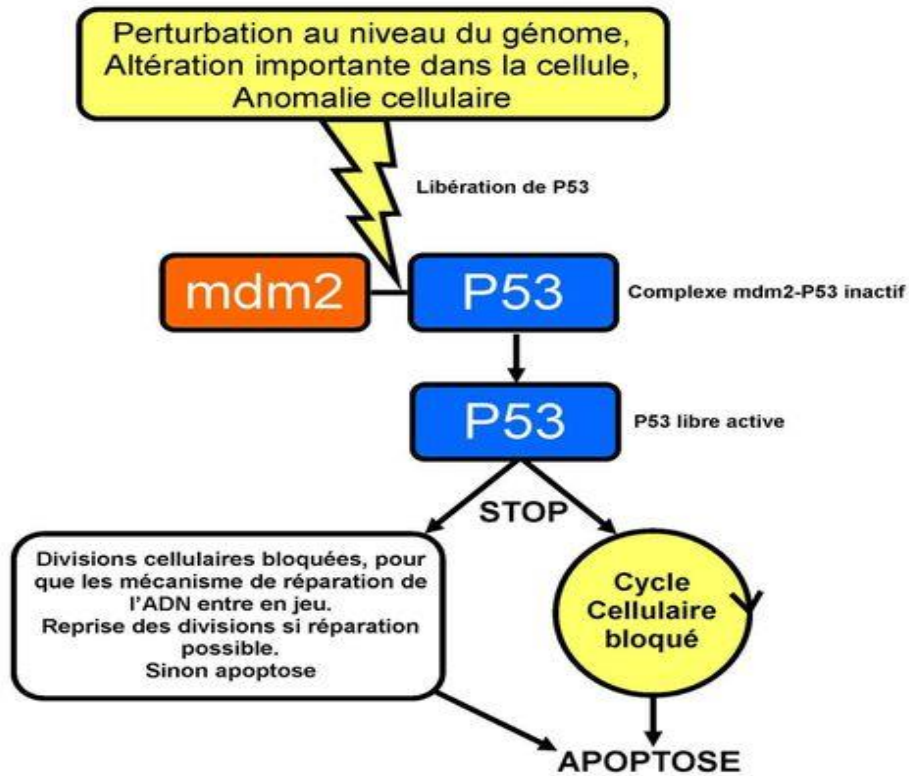


Figure 6 : Rôle de la protéine p53 [39]

Des altérations de la voie P53 sont observées dans 87% des glioblastomes à la suite de différents mécanismes. Les anomalies principales sont des délétions homozygotes, des mutations de gène P53 (35%) ou CDKN2A (49%) [13].

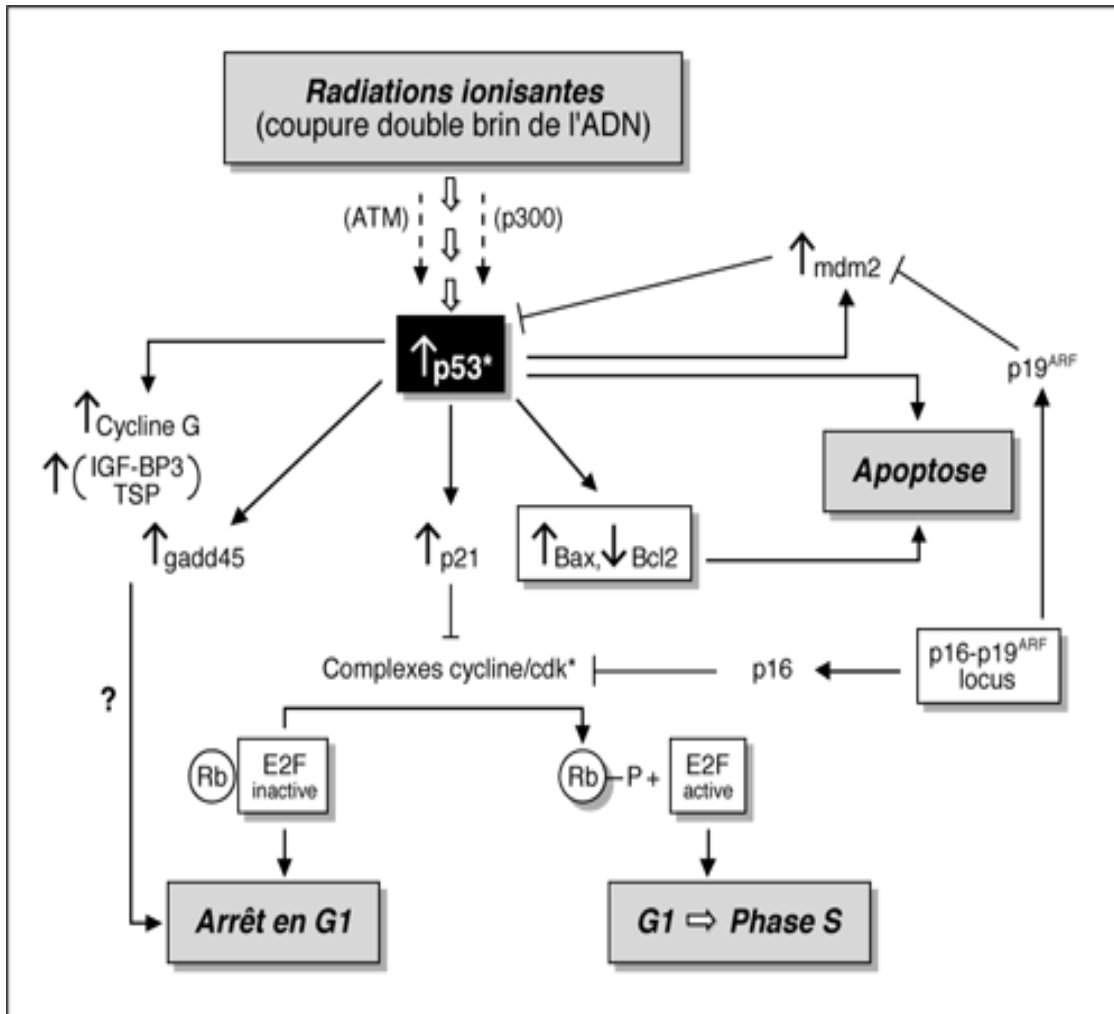


Figure 7 : Rôle transcriptionnel et régulation du gène suppresseur de tumeur P53.[40]

A la suite de dommage de l'ADN, en cas de stress ou de carences métaboliques, le gène suppresseur de tumeur P53 est activé, entraînant la transcription de gènes cibles impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire ou l'apoptose (P21, Bax). D'autre part, P53 activée permet la transcription du gène MDM2 qui exerce un rétrocontrôle négatif sur la voie P 53, en provoquant la dégradation de cette protéine lorsque son niveau cellulaire est trop important. Enfin, la protéine P14 ARF activée par des oncogènes, exerce un deuxième niveau de régulation en inhibant MDM2 et donc la régulation de P53 par la protéasome [10 ,14].

5 Le glioblastome (GBM) : une unité particulière

Les gliomes sont un ensemble de tumeurs dont la forme la plus sévère est le glioblastome qui fera l'objet de cette partie.

Généralités

Les glioblastomes sont les tumeurs primitives malignes du système nerveux central, les plus fréquentes et les plus agressives. Il existe également une différence de prévalence en fonction du sexe du patient ; les glioblastome apparaissent plus fréquemment chez les hommes que les femmes avec un ratio de 1,5 à 1,8/1. [29]

Le glioblastome peut survenir d'emblée ou résulter de l'évolution d'un astrocytome de bas grade. Dans environ la moitié des cas, il s'agit d'un glioblastome d'emblée ou glioblastome primaire [28]. L'âge moyen au diagnostic est de 65 ans avec un maximum entre 70 à 80 ans [29].

Des estimations font état d'au moins 2000 nouveaux cas de glioblastomes par an en France. Soit une incidence annuelle de 3 cas pour 100000 habitants [28].

Les hémisphères cérébraux sont plus régulièrement touchés par les GBM puisque (95%) se développent en région supratentoriale et sur le plan histologique, le glioblastome est caractérisé par la présence d'atypies nucléaire, un pléomorphisme cellulaire, une thrombose vasculaire et une prolifération endothélio-capillaire. (critères histologiques du grading selon la classification OMS) [17].

Selon leur mode d'apparition et le terrain sur lequel ils surviennent, deux types de GBM sont individualisées ; les GBM primaires ou de novo et les GBM secondaires [18].

Le glioblastome de novo ou glioblastome représente plus de (90%) des glioblastomes [32]. Il survient surtout à partir de 61 ans et possède une histoire clinique courte. Les anomalies génétiques rencontrées sont une amplification de l'*Epidermal growth factor receptor* (EGFR) (40%), une mutation du gène P53 (28%) [18, 32].

Le glioblastome secondaire moins fréquent, se développe à partir d'un gliome de stade inférieur, chez des patient plus jeunes. Son histoire clinique est donc plus longue. Il se caractérise surtout par des mutations du gène P53 (65%) et mutations du gène IDH 1 et 2 (50% à 85%) [32].

6 Apport de l'immunohistochimie dans le diagnostic des glioblastomes

Le diagnostic est établi par rapport aux symptômes mais la preuve est apportée par l'imagerie, IRM ou scanner qui donne une image très précise de tumeurs très permettant d'apporter des preuves au diagnostic. Cependant, ce dernier ne peut être clairement établi que par une biopsie permettant l'examen des tissus de la tumeur. Il est aussi possible de faire appel à des colorations histochimiques, couplées à des tests immunohistochimiques qui peuvent être réalisés en routine [19].

Les marqueurs les plus souvent testés en immunohistochimie sont :

***GFAP**(glial fibrillary acidic protein) : est une protéine du cytosquelette exprimée par les cellules astrocytaires. Le marquage est cytoplasmique, sous forme d'un maillage dans les tumeurs astrocytaires. Le marquage est plus focal, et en mosaïque, dans les glioblastomes.

***ki 67** (marquage nucléaire) : marqueur de prolifération. Il s'agit d'une protéine nucléaire, présente à toutes les phases du cycle cellulaire sauf G0. Le marqueur est utilisé pour évaluer la fraction de croissance tumorale, mais il néglige une dimension importante, celle de la durée du cycle cellulaire [19].

***P53** (marquage nucléaire) : le gène codant pour cette protéine est localisé sur le chromosome 17. C'est un gène suppresseur de tumeur. Le facteur de transcription p53 normal a une durée de vie très courte. La protéine résultant d'une mutation de ce gène est inactive et stable. La diminution de sa dégradation provoque son accumulation dans le noyau. C'est ce qui est potentiellement détecté par immunohistochimie avec de bonnes sensibilités et spécificité. L'immunomarquage est considéré positif lorsqu'au moins (10%) des cellules tumorales présentent un marquage nucléaire intense [20].

Ce résultat est trouvé dans environ (60%) des astrocytomes de grade II et III, dans certains oligoastrocytomes, dans plus de (65%) des glioblastomes secondaires, et (28%) des glioblastomes de novo [21 ;22, 32] . La mutation de TP53 est une aide diagnostique pour différencier une tumeur oligodendrogliale d'une tumeur astrocytaire.

Matériel Et Méthodes

Matériel biologique

Dans le cas des glioblastomes, le matériel biologique correspond le plus souvent à une biopsie réalisée sur le nodule tumoral.

Les échantillons sont placés rapidement dans une solution de fixation et transportés au laboratoire d'anatomopathologie et de pathologie tumorale.

L'étude est réalisée sur 65 patients présentant un glioblastome, colligés au sein de l'Unité de Génétique Médicale et d'Oncogénétique du CHU de Fès.

Dans l'étude d'immunohistochimie, on a utilisé le nouveau kit « DAKO ENVISION FLEX », qui diffère des autres kits par un anticorps secondaire couplée à une enzyme (la peroxydase).

« DAKO ENVISION FLEX High pH » est un système de visualisation à haute sensibilité destiné à être utilisé en immunohistochimie. Le système à double liaison détecte les anticorps primaires de souris et de lapin et la réaction est visualisée par le chromogène DAB+. [41]

Le kit pratique « DAKO ENVISION FLEX High pH » comprend :

- Un réactif bloquant la peroxydase (la protéine bloquante), pour éliminer les liaisons aspécifiques, et minimiser au maximum le bruit de fond.
- EnVision/HRP (l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase),
- Un chromogène DAB+,
- Un tampon de substrat,
- Une solution de récupération des cibles,
- Un tampon à pH élevé (50x Tris/EDTA, pH 9) (la solution du démasquage antigénique)
- Un tampon de lavage (20x).

6 Etude histologique

Les prélèvements destinés au laboratoire pour un examen histologique, passent par une série

d'étapes avant qu'ils ne soient lus et interprétés par le responsable.

La technique est réalisée en cinq étapes.

6.1 La fixation

C'est une étape essentielle dans la préparation tissulaire qui permet de s'opposer à l'autolyse tissulaire et à la putréfaction, de garantir la conservation de structures et le durcissement des pièces, afin de garder le prélèvement dans un état aussi proche que possible de l'état vivant.

Toute fixation défectueuse rend l'étude anatomopathologique difficile voire impossible.

Le choix du fixateur dépend de la nature du tissu à couper, le laboratoire d'anatomie pathologique utilise le formol à (10%) dont la durée d'action et le volume sont proportionnels à la taille de la pièce (Généralement le volume du fixateur représente environ 10 fois le volume de la pièce).

Un examen macroscopique est d'abord effectué, au cours duquel un descriptif détaillé de la biopsie ou de la pièce est établi (taille mesurée dans les 3 dimensions, couleur, forme, aspect de la coupe,...).

Après cet examen macroscopique, le pathologiste incube les fragments dans des cassettes identifiées à l'aide d'un crayon pour subir par la suite une inclusion dans la paraffine.

6.2 L'inclusion

Elle a pour but d'enfermer le prélèvement dans une substance qui le pénètre et l'infiltré.

Les tissus acquièrent ainsi une consistance permettant d'obtenir des coupes minces au microtome. La substance d'inclusion, généralement la paraffine, est une substance liquide à chaud, solide à température ambiante et insoluble dans l'eau et dans l'alcool.

Comme cette substance est hydrophobe, la pièce anatomique doit être entièrement déshydratée avant son inclusion dans la paraffine. Vu qu'elle est aussi non soluble dans l'alcool utilisé pour la déshydratation ; une double substitution doit être réalisée. L'eau est remplacée par l'alcool (déshydratation) et l'alcool par le toluène (substitution).

Pour réaliser cette étape, un automate d'inclusion appelé histokinette est utilisé. Il peut se charger de toutes les phases conduisant à la mise à disposition d'un bloc de paraffine prêt à être microtomé. (figure 8)



Figure 8 : Histokinette

L'étape de circulation consiste à faire séjourner les pièces dans une série de liquides intermédiaires.

.Fixation dans 2 bains de formol 10%(30min x2)

.Déshydratation par l'alcool : consiste à débarrasser le tissu de l'eau qu'il contient, tenant compte que l'agent déshydratant doit être miscible en même temps à l'eau et à la paraffine. La déshydratation se fait dans 5 bains d'alcool de degré croissant 75%, 80%, 90%, 95%, et absolu (1h x 3, 1h30 et 2h).

.Eclaircissement par le toluène : cette étape est destinée à remplacer l'alcool par un solvant de la paraffine et à chasser l'alcool par 3 bains successifs de toluène. En remplaçant l'agent

déshydratant, le toluène rend le tissu transparent d'où le nom d'éclaircissement. Cette opération se déroule dans 3 bains de Toluène (1h, 1h30 et 2h).

.Enrobage dans la paraffine : c'est l'étape terminale de la circulation, réalisée par passage du tissu dans la paraffine liquide. 2 bains de paraffine (2h et 3h) sont utilisés. L'inclusion ne se fera de façon satisfaisante que si la pièce à couper ne contient ni eau ni solvant intermédiaire (alcool). (figure 9)

Le bloc devient plus facile à manipuler que le tissu seul et il peut s'attacher à la pince porte-objet du microtome sans briser la pièce (tissu).

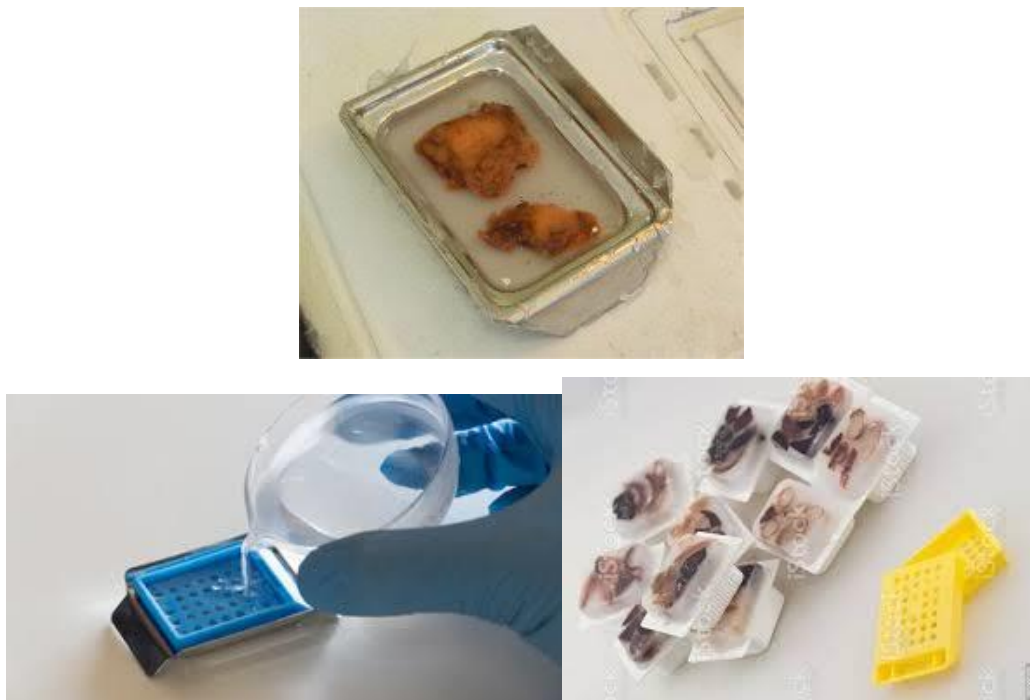


Figure 9 : Enrobage du tissu dans la paraffine

6.3 Microtomie

Après Montage du bloc dans le porte-bloc du microtome destiné à produire des fines tranches (3-5 μ m), la réalisation des rubans est effectuée. Ces coupes sont immergées dans des bains d'alcool, puis étalées en les dépliant sur la lame par flottation à la surface d'un bain chaud. (figure 10)



Figure 10 : Microtomie et étalement des coupes sur les lames

6.4 Coloration

La coloration histologique permet de différencier finement tous les éléments d'un tissu. Elle consiste à accentuer les contrastes pour mieux reconnaître les différents éléments de la préparation.

La coloration utilisée est de type H.E.S (hématoxyline-éosine-safran). Elle a pour but de permettre la mise en évidence des noyaux et du cytoplasme des cellules, ainsi que des fibres de collagène. L'hématoxyline colore le noyau en violet, l'éosine colore le cytoplasme en rose et le safran se charge de colorer les fibres de collagène en jaune.

Les lames doivent être préparées afin de pouvoir recevoir les colorants.

*Déparaffinage :

Cette étape consiste à enlever la paraffine de la coupe tissulaire pour que les colorants (préparés en phase aqueuse) puissent pénétrer le tissu et le colorer.

Ce déparaffinage consiste à mettre des lames dans l'étuve à 60°C pendant une nuit (ou à 90°C pendant une heure) et ensuite de les faire plonger dans deux bains de toluène (5min chacun) afin d'enlever la paraffine.

*Hydratation

Elle a pour objet de retirer le toluène du tissu et le remplacer par de l'eau ; n'étant pas miscible, le toluène est d'abord remplacé par l'alcool, puis les lames sont passées dans un bain d'eau courante permettant de remplacer l'alcool par l'eau.

6.5 Le montage

Cette opération consiste, une fois la coloration terminée, à fixer à l'aide d'un milieu de montage, une lamelle de verre sur la coupe tissulaire.

Le montage permet une protection mécanique des coupes, ainsi qu'une protection chimique des colorants.

6.6 Observation

La lame colorée est ensuite transmise au médecin anatomopathologiste de la plateforme pour identifier une zone contenant plus de (50%) de cellules tumorales.

La zone d'intérêt est cerclée avec un marqueur et séparée du reste de l'échantillon par macro-dissection afin de s'assurer d'une proportion de cellules tumorales supérieure à (50%) et de réduire ainsi la contamination par les cellules normales. S'il y a plus de (50%) de cellules tumorales, le test est considéré comme fiable. Dans le cas contraire, les cellules saines peuvent interférer et il y a un risque de conclure à un résultat faux négatif.

Les lames préparées sont ensuite étudiées par l'immunohistochimie.

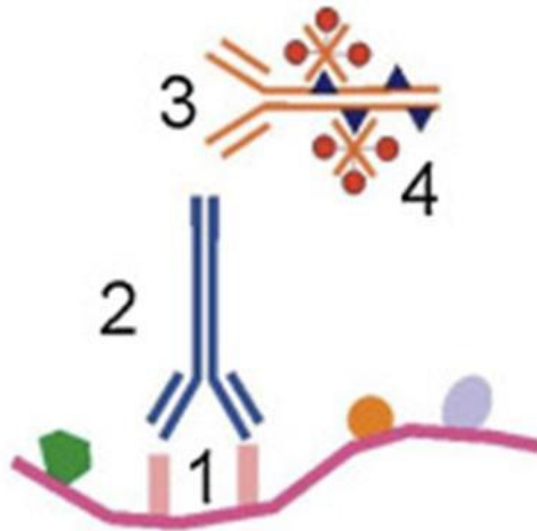
7 Etude immunohistochimique

7.1 Principe

Les techniques d'immunohistochimies permettent de localiser des antigènes dans des tissus, cellules, organites cellulaires, bactéries, virus, etc. Le réactif principal est un anticorps dirigé contre l'antigène à marquer. Des traceurs (molécules fluorescentes, enzymes ect), fixés directement ou indirectement sur cet anticorps permettent de voir la réaction.

Dans les méthodes immunoenzymatiques indirectes, l'anticorps spécifique primaire est déposé sur le tissu, puis il est révélé par un deuxième anticorps couplé à une enzyme à laquelle on fournit son substrat. Le produit coloré de la réaction enzymatique apparaît au niveau du site des complexes Ag-Ac. L'intensité du signal obtenu après marquage d'une réaction antigène-anticorps dépend du nombre de molécules colorées visibles.

Immunohistochimie



- 1 = Antigène
- 2 = Anticorps primaire
- 3 = Anticorps secondaire couplé au complexe avidine-biotine peroxydase
- 4 = Révélation par substrat de la peroxydase

Figure 11 : La méthode immunoenzymatique indirect

L'immunohistochimie est largement utilisée pour le diagnostic et/ou le suivi des cancers par détection de cellules anormales telles que celles trouvées dans les tumeurs cancéreuses.

L'anticorps primaire utilisé dans la réalisation de ce travail est :

Anti p53 : marquage nucléaire

8 Protocole expérimental d'immunohistochimie manuelle

La préparation des lames pour l'IHC commence par le déparaffinage. Cette opération nécessite le passage des lames une nuit à l'étuve à 60°C. Les lames sont déparaffinées grâce à 2 bains de

toluène absolue (5-10min chacun) et 2 bains d'alcool absolu (5-10 min chacun). Un rinçage à l'eau courante est effectué pendant 10min.

Ensuite, après avoir égoutté les lames, elles sont passées dans H₂O₂ à (3%) pendant 10min.

Plusieurs tissus contiennent des peroxydases endogènes qui peuvent donner des réactions non spécifiques, les tissus sont donc traités par H₂O₂ puis rincés avec l'eau courante. Après cette opération, ils sont placés dans un tampon à pH élevé (au lieu du tampon citrate) bouillant à 95°C pendant 20 min. Le démasquage antigénique permet aux anticorps d'accéder aux antigènes en rompant les liaisons covalentes et intramoléculaires entre les protéines, les glycoprotéines, les polysaccharides et les acides nucléiques.

Les lames sont à nouveau rincées avec PBS (Phosphate Bufferd Salien) pendant 5 min. Elles sont par la suite égouttées et les fragments sont entourés par le PAP-PEN.

La protéine bloquante est déposée sur le fragment pendant 15 min dans une chambre humide, le surplus du bloquant est enlevé en secouant la lame. L'anticorps primaire P53 est appliqué pendant 45 min. Les lames sont rincées 2 fois pendant 10 min par PBS.

L'anticorps secondaire couplé à la peroxydase est appliqué pendant 15 min et les lames sont ensuite rincées dans 2 bains de PBS, 5 min chacun.

Le substrat chromogène fraîchement préparer (1goutte du chromogène + 1ml du substrat DAB) est appliqué pendant 15 min. Un rinçage à l'eau courante est effectué suivi par un égouttage des lames.

L'hématoxyline est appliqué sur chaque lame pendant 4min afin de colorer les noyaux. Les lames sont rincées à l'eau courante pendant 10 min. Le montage des lames se fait finalement dans un milieu de montage (2 à 3 gouttes) avant d'être lues par les anatomopathologistes à l'aide d'un microscope optique.

Résumé du protocole



Déparaffinage



Démasquage



Crayon hydrophobe



Eau oxygénée



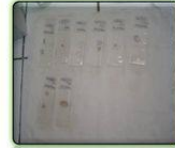
Anticorps primaire
puis AC secondaire



Révélation



coloration



Montage des lames

Figure 12 : Protocole de l'immunohistochimie.

Résultats Et Discussion

A. Résultats

9 Etude rétrospective

Notre étude a été réalisée sur 65 patients atteints de glioblastome. La répartition de ces patients a été réalisée selon le sexe et l'âge.

9.1 Répartition des cas de glioblastomes selon le sexe

Notre étude montre qu'il y a une prédominance de sexe masculin avec (63,07%) des hommes (41cas) et (36,9%) des femmes (24 cas). Le sexe ratio= Hommes /Femmes= 41/24= 1,7. (Figure 13)

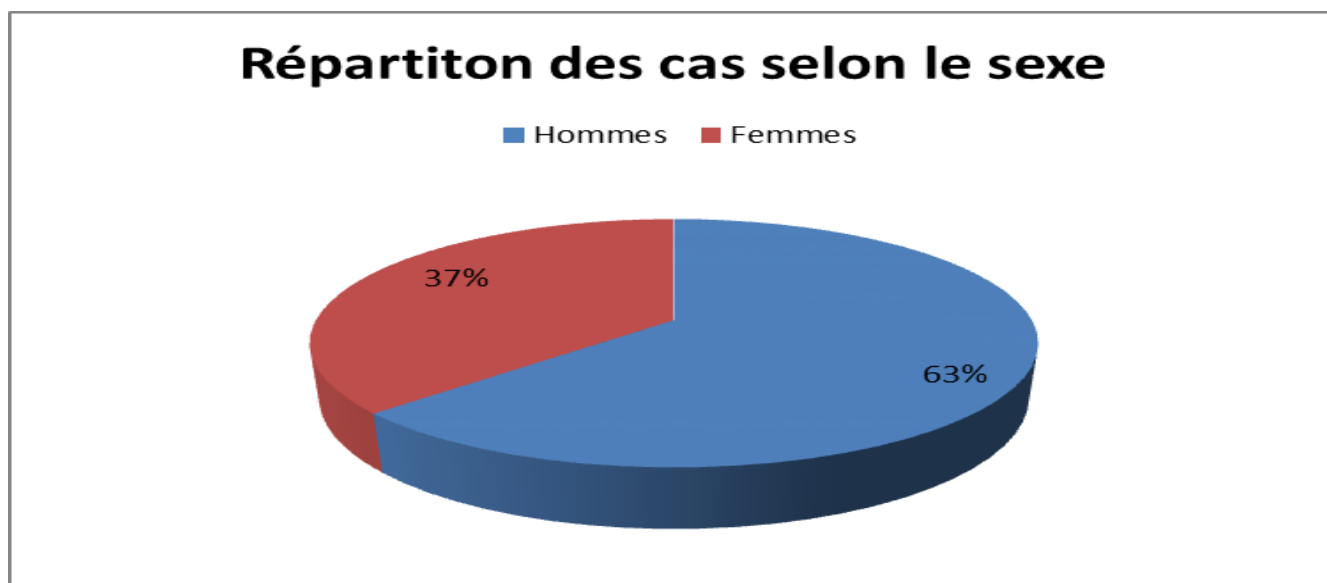


Figure 13 : Répartition des cas de glioblastomes selon le sexe

9.2 Répartition des cas de glioblastome en fonction de l'âge

Dans notre série d'étude, l'âge moyen des patients présentant un glioblastome est de 46,33 ans.

L'âge moyen chez les hommes est 49,19 ans.

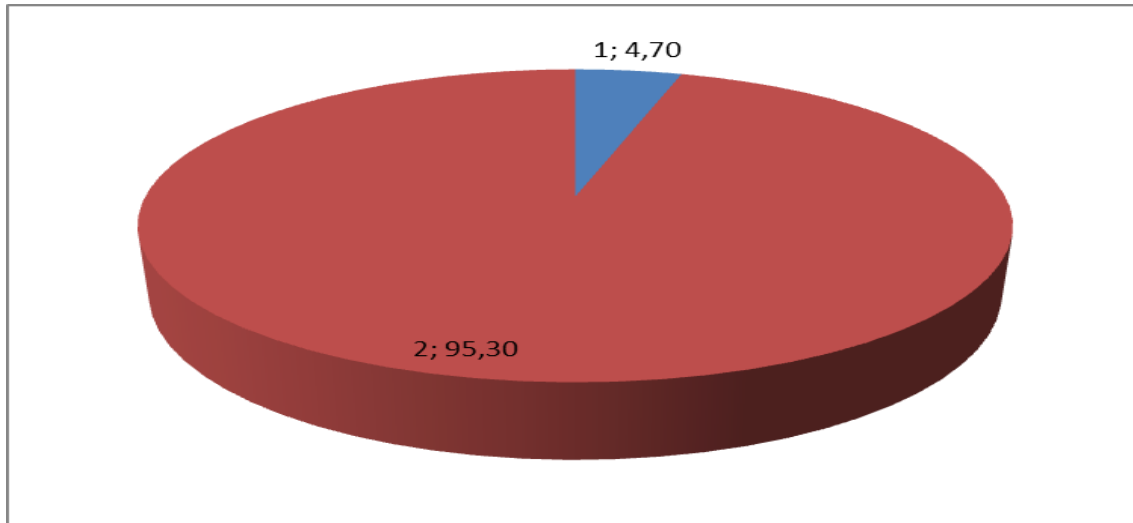
L'âge moyen chez les femmes est 49,89 ans.

Les limites d'âge sont de 8 ans et 81 ans.

L'âge n'a pas été communiqué pour 1 cas (données manquantes)

La répartition selon l'âge des patients va intéresser 2 tranches d'âge. La première correspondra aux patients dont l'âge est inférieur à 18 ans et la deuxième, aux patients dont l'âge est supérieur à 18 ans. (Figure 14)

L'étude de cette répartition a montré que le pourcentage des adultes (95,3%) dépasse largement celui des patients ayant moins de 18 ans (4,7%).



1: Mineurs 2: Majeurs

Figure 14 : Répartition des cas de glioblastome en fonction de l'âge.

9.3 Etude macroscopique

Macroscopiquement, les tumeurs constituent des masses tissulaires nécrotiques et hémorragiques situées principalement dans les hémisphères cérébraux, moins fréquemment dans le bulbe et plus rarement dans le cervelet ou la moelle.

Un volumineux glioblastome prend naissance dans un des hémisphères cérébraux et envahit le système ventriculaire. Ce type de tumeur est associé à des lésions nécrotiques et hémorragiques. (Figure 15)



Figure 15 : Localisation de glioblastome

10 Examen histologique de tissu fixé d'un glioblastome

Les glioblastomes sont des tumeurs très agressives, apparaissant soit au cours de l'évolution d'un astrocytome ou oligoastrocytomes (glioblastome secondaire), soit de novo (glioblastomes primaires). Histologiquement, ils sont caractérisés par une tumeur de densité cellulaire élevée, dont les cellules présentent des atypies cytonucléaires marquées et de très nombreuses mitoses. Il existe aussi des proliférations endothéliocapillaires marquées et de la nécrose. (Figure 16 ;17;18).

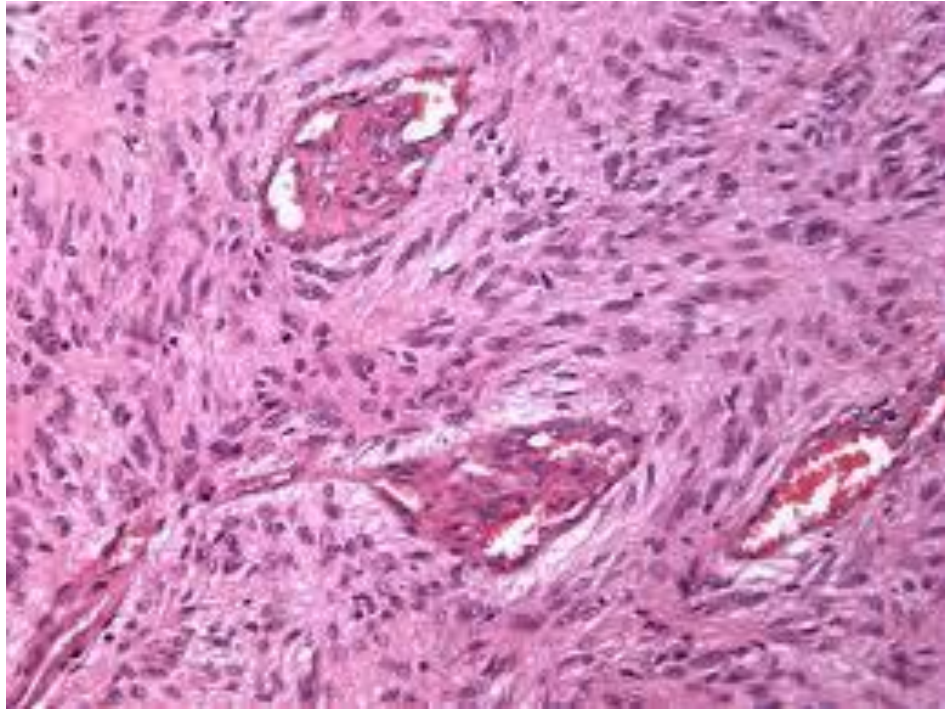


Figure 16: Glioblastome, HES (×40) : Hématoxyline-Eosine-Safran .

Commentaire : Cette figure montre une Tumeur présentant une prolifération des cellules endothéliales dans la lumière des vaisseaux (prolifération endothéliocapillaire).

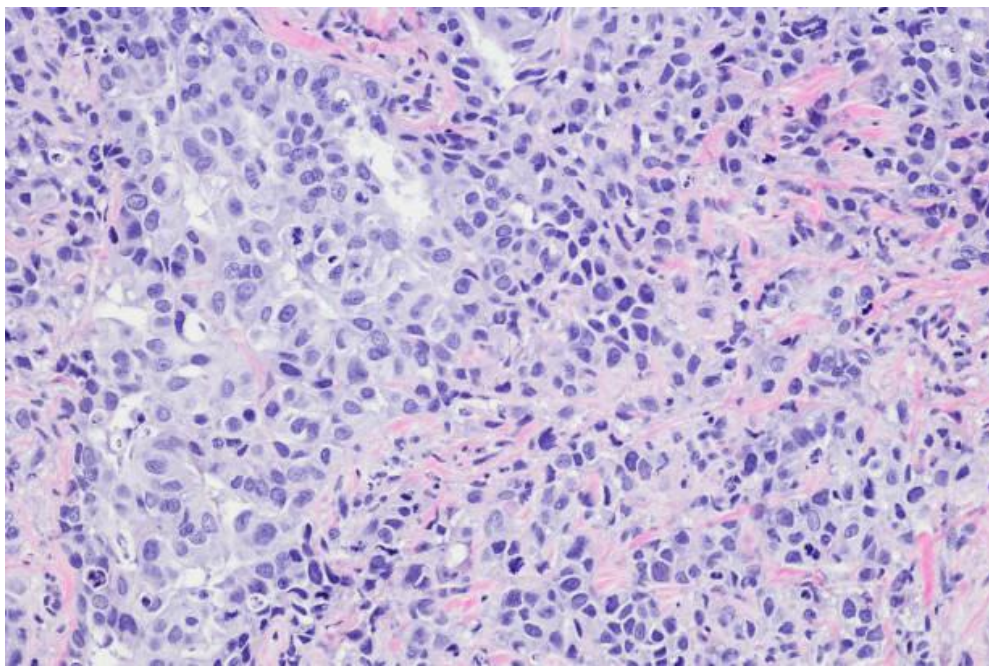


Figure 17: Glioblastome (HES×40) :

Commentaire : Cette figure montre une tumeur comportant de nombreux atypies et mitoses.

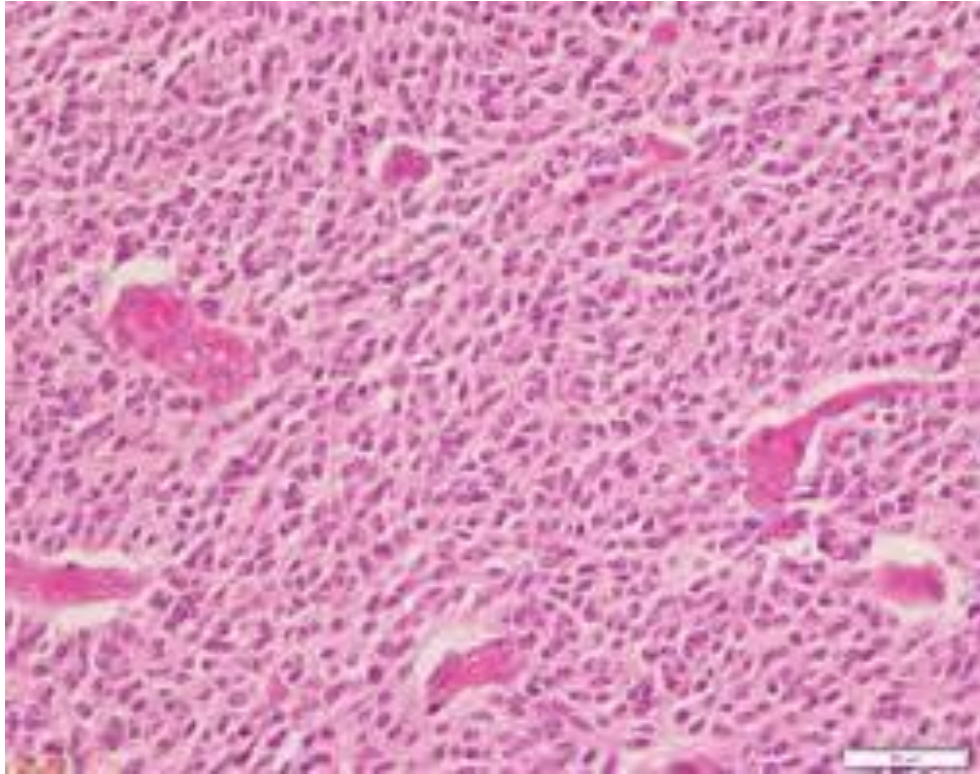


Figure 18 : Glioblastome (HES× 40)

Commentaire : Cette figure montre un foyer de nécrose tumorale avec disposition palissadique des éléments cellulaires autour.

11 Immunomarquage anti-p53

L'immunomarquage anti-p53 a été classé en 2 catégories semi-quantitatives :

- 1/ positif s'il existe une immunopositivité nucléaire intense intéressant plus de (10%) des cellules tumorales.
- 2/ négatif en l'absence de marquage ou si l'immunopositivité intéresse moins de (10%) des cellules tumorales ou si le marquage est d'intensité faible à modérée.

Une mutation du gène TP53 entraîne un allongement de la demi-vie de la protéine p53 et donc son accumulation nucléaire. Il est couramment admis que l'IHC anti-p53 est un reflet suffisamment fidèle du statut du gène TP53.

- L'étude immunohistochimique anti-p53 a été réalisée sur 65 cas de glioblastome ([Tableau1](#)).

- Le tableau ci-dessous présente l'âge, le sexe des patients ainsi que les résultats obtenus après l'utilisation des tests immunohistochimiques (P53).

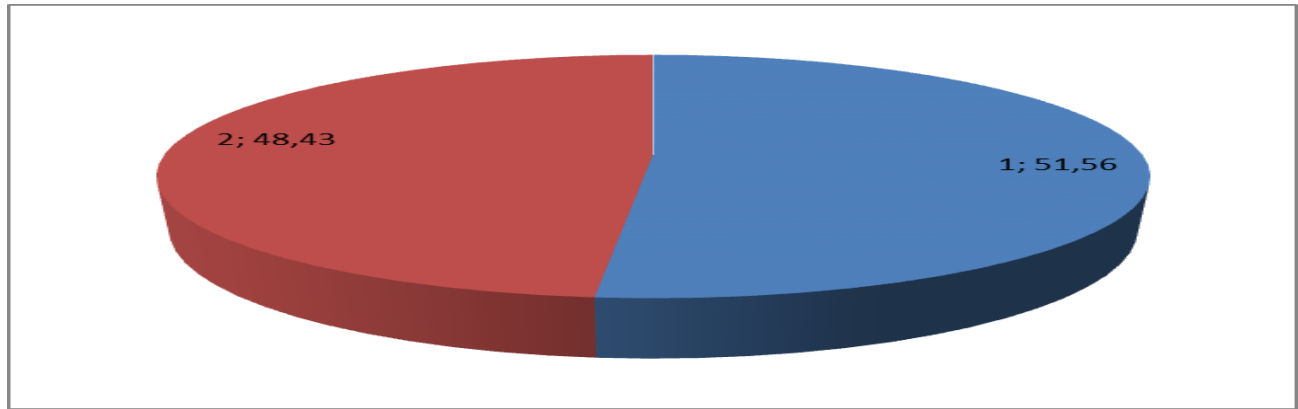
Tableau 1 : Age, sexe des patients et résultats de l'immunohistochimie(P53)

N° du patient	Sexe	Age	P53
1	F	35	Négatif
2	M	30	Négatif
3	M	30	Négatif
4	F	49	Positif
5	F	32	Positif (15%)
6	M	47	Négatif
7	M	45	Positif (50%)
8	M	55	Positif
9	M	56	Négatif
10	F	62	Négatif
11	F	62	Positif (70%)
12	M	53	Positif
13	F	54	Négatif
14	M	48	Positif (80%)
15	M	42	Négatif
16	M	61	Positif (90%)
17	M	66	Positif (30%)
18	M	24ou34	Positif
19	F	53	Positif (90%)
20	M	?	Positif (60%)
21	M	46	Positif
22	F	43	Négatif
23	F	51	Négatif
24	M	42	Positif (30%)
25	M	70	Positif(70%)
26	F	59	Positif (60%)
27	M	56	Positif (90%)
28	M	63	Négatif
29	M	41	Positif
30	F	46	Positif (60%)
31	M	8	Négatif
32	F	81	Positif
33	M	65	Négatif
34	F	31	Positif
35	M	16	Négatif
36	F	34	Positif 70%-80%
37	M	18	Négatif
38	F	43	Positif
39	F	29	Positif

40	M	65	Positif 40-50%
41	M	11	Négatif
42	M	68	Négatif
43	M	60	Négatif
44	M	51	Positif
45	M	67	Négatif
46	M	80	Négatif
47	F	67 ou 79	Négatif
48	F	55	Positif
49	F	62	Négatif
50	F	80	?
51	M	30ou42	Négatif
52	M	65	Négatif
53	M	48	Négatif
54	M	60 ou 66	Positif
55	M	49	Négatif
56	F	69	Positif
57	M	52	Positif
58	F	54	Négatif
59	F	54	Négatif
60	M	70	Positif
61	M	68	Positif
62	M	48	Négatif
63	M	50	Négatif
64	M	28	Positif
65	M	40	Négatif

•Concernant l'anticorps P53, un marquage négatif a été enregistré chez 31cas (48,43%), et un marquage positif chez 33 cas (51,56%).

•Le marquage n'a pas été visible pour un cas (femme de 80 ans).



1 : Marquage positif

2 : Marquage négatif

Figure 19 : Répartition des cas selon les résultats de l'immunohistochimie (P53)

•La figure ci-dessous (figure 20) présente l'aspect anatomopathologique d'un glioblastome chez un homme de 48 ans (patients 14).

•La figure montre une immunopositivité nucléaire pour le p53 (coloration des noyaux en marron).

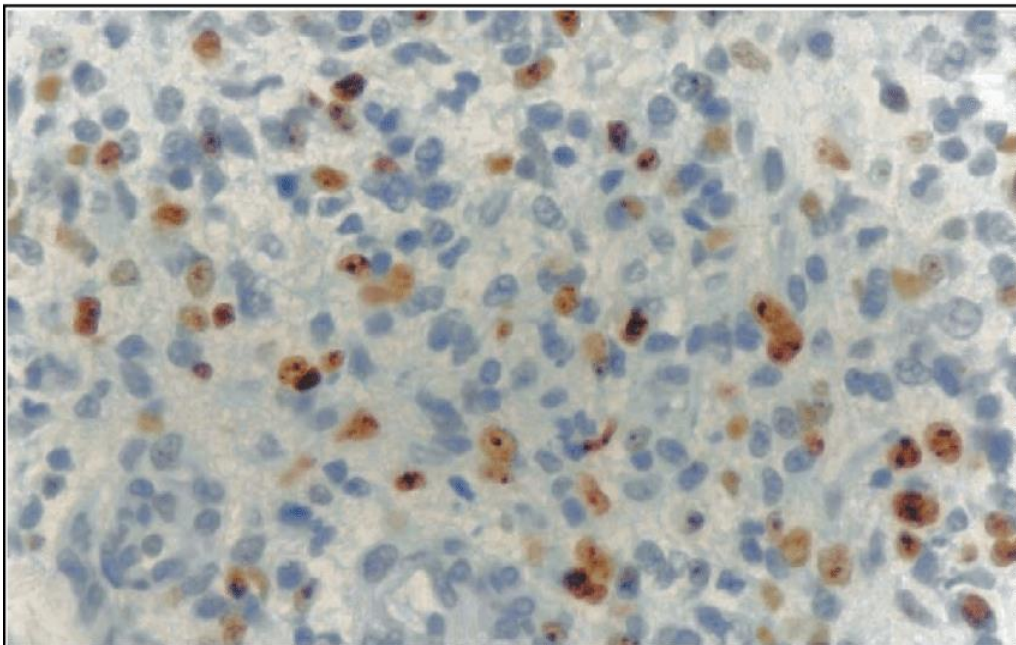


Figure 20 : IHC. anti p53 dans un glioblastome du patient 14 âgé de 48 ans (×20)

B. DISCUSSION

Les glioblastomes représentent (60%) de toutes les tumeurs du système nerveux et (60 à 70%) de toutes les tumeurs gliales [29].

Notre étude rétrospective a porté sur 65 patients recrutés et diagnostiqués au CHU Hassan II de Fés.

D'après la répartition des glioblastomes en fonction du sexe, une prédominance masculine a été notée. Le sexe ratio est de 1,7. Notre résultat montre qu'il y a une concordance avec ceux d'une étude rétrospective du [CHU Mohammed V de marrakech](#), portant sur une série consécutive de 60 cas de glioblastome. Cette étude montre aussi une prédominance masculine: 45 patients de cette série d'étude de sexe masculin (75%) et 15 malades de sexe féminin (25%) [30].

Concernant l'âge des patients, le pourcentage des patients adultes (95,3%) dépasse largement celui des patients ayant moins de 18 ans (4,7%). La comparaison de nos résultats avec ceux du [CHU Mohammed V de marrakech](#) montre une concordance. Car dans cette étude, le pourcentage des patients adultes est (94,99%), alors que le pourcentage des patients ayant moins de 18 ans ne dépasse pas (5%) [30].

Cette différence d'âge peut être également corrélée au type de glioblastome ; puisque le glioblastome primaire présente la forme la plus commune et survient généralement chez les personnes âgées (généralement plus de 40 ans) alors que le glioblastome secondaire est le résultat de progression des astrocytomes ou oligodendrogliomes de bas grade chez les jeunes patients.

Macroscopiquement, les glioblastomes sont de grande taille à la présentation et peuvent occuper plus d'un lobe. Les glioblastomes se présentent comme une tumeur infiltrante, mal limitée, comportant une partie charnue et une zone centrale nécrotique. En comparant ces critères avec ceux précédemment cités [33], une concordance a été observée. Ces critères sont mis en évidence par la coloration HES qui n'est pas suffisante pour confirmer s'il s'agit d'un glioblastome ; d'où l'intérêt de recourir à l'immunohistochimie.

Après avoir réalisé l'immunohistochimie à l'aide de l'anticorps P53, le marquage était positif pour 33 cas parmi 65 sachant que l'immunomarquage est considéré positif lorsqu'au moins 10% de cellules tumorales présentent un marquage nucléaire intense.

Dans notre série d'étude, le marquage varie entre 10% et 90%, mais il n'est pas corrélé à l'âge du patient car il a été observé que des patients adultes représentant des glioblastomes primaires peuvent présenter une différence de marquage entre 15% (patient 5) et 90% (patient16). Ce qui est discordant avec la littérature qui montre que le pourcentage des mutations du gène TP53 dans un glioblastome de novo ne dépasse pas (28%) [32]. Cette discordance peut être expliquée par l'intervention des facteurs génétiques pouvant induire un glioblastome, d'où l'intérêt de recourir

à des techniques moléculaires pour rechercher la mutation IDH ou l'amplification du EGFR qui peuvent différencier ente les 2 types de glioblastome [32].

Le marquage est négatif pour 31 cas, ce qui confirme que la mutation du gène codant pour la protéine p53 n'est pas la cause du glioblastome. Ces résultats sont concordants avec ceux de la littérature (la mutation de p53 est rencontrée chez < 28% des GBMI et 65% des GBMII) [32].

Conclusion

Les glioblastomes ou astrocytomes de grade IV, sont les tumeurs cérébrales les plus fréquentes et les plus agressives. Ces dernières années, de nombreux progrès ont été réalisés, notamment dans la caractérisation des tumeurs dans le monde moléculaire. Un grand nombre des altérations moléculaires présente une valeur diagnostique, pronostique ou prédictive de la réponse aux traitements anti-tumoraux.

Il est remarquable de voir la vitesse à laquelle l'épidémiologie moléculaire évolue au cours de la dernière décennie.

Il ne fait plus de doute maintenant que les glioblastomes sont provoqués par des mutations induites par des carcinogènes exogènes. L'analyse des mutations du gène p53 est un exemple de cette archéologie moléculaire qui nous permet de définir l'origine des mutations pour les glioblastomes, mais elle ne constitue pas un facteur de pronostic pertinent, il y a d'autres mutations des gènes qui présentent des facteurs importants de bon pronostic comme IDH mutée ou la surexpression d'EGFR [32].

Références bibliographiques

- [1]: **Doleck, T.A., Propp, J.M., Stroup, N.E., and Kruchko, C. (2012).** CBTRUS Statistical report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro-oncol.* 14, v1-v49.
- [2]: **Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvett, A., Scheithauer, B. W., and Kleihues, P. (2007).** The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 114, 97-109.
- [3]: **Bailey, O.T. (1985).** Genesis of the Percival Bailey-Cushing classification of gliomas. *Pediatr. Neurosci.* 12, 261-265.
- [4]: **Kleihues, P., Louis, D.N., Scheithauer, B.W., Rorke, L.B., Reifenberger, G., Burger, P.C., and Cavenee, W.K. (2002).** The WHO classification of tumors of the nervous system. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 61, 215-225; discussion 226-229.
- [5]: **Bastien, J.I.L., McNeill, K.A., and Fine, H.A. (2015).** Molecular characterizations of glioblastoma, targeted therapy, and clinical results to date. *Cancer* 121, 502-516.
- [6]: **Cancer Genome Atlas Research Network (2008).** Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455, 1061-1068.
- [7]: **Sophia Gray, Brice Obadia, Hedi Haddada (Mars 16, 2007) : France Science, Le cerveau généralités et dérèglement .**
- [8]: **www.Unilim.fr/Compus-neurochirurgie/IMG.Le système nerveux central.**
- [9]: **Quinn Tostrom, Nirav Patil, Gino Cioffi Kristin Waite, (Octobre 2020) CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2013-2017, Neuro-oncology, Volume 22, Supplement 1.**
- [10]: **Laetitia Chezeau (2015). Cellules souches cancéreuses du Glioblastome: Etude du mode d'action d'un composé actif, hal_01734235, version 1.**
- [11]: **E. Brambilla, (avril 1999), Service de pathologie cellulaire, hôpital Albert-Michallon, Grenoble. Le gène et la protéine p53 . La lettre du pneumologue - Vol. II - n°2.**
- [12]: **Georges NOEL, Luc TAILLANDIER, Emilie LERHUN, ANOCEF, Version de (01/01/2018), Référentiel Glioblastome (grade IV OMS).**
- [13]: **Thierry Soussi, Karim Dehouche, Christophe Beroud, (décembre 2000), L'analyse de mutations du gène p53 dans les cancers humains ; le lien entre l'épidémiologie et la carcinogène m15 n°12, vol. 16.**

[14] :D.Fontaine, P.Paquis, (2010) : Glioblastome : clinical,radiological,and biological pronostic factors, Service de neurochirurgie, hospital Pasteur,CHU de Nice,30,Avenue de la voie Romaine,06000 Nice, France.

[15] : Brandes AA, Tosoni A, Franceshi E, Reni M, Gatta G, et al. Glioblastoma.

[16] : Vigneswaran, K.,Neill,S., and Hadjipanayis , C.G,(2016). Beyond the world health organization grading of infiltrating gliomas : advances in the molecular genetics of glioma classification .Ann.Transl.Med.3,95.

[17]: Ironside JW, Moss TH, Louis DN, Lowe JS, Weller RO,(2002). Diagnostic pathology of nervous system tumours. Londres: Churchill Livingston.

[18]: Kleihues P. and Ohgaki H.,(1999) ;Primary and secondary glioblastomas. From concept to clinical diagnosis.Neuro Oncol., 1, 44-51.

[19]: Dabbs DJ,(2002), Diagnostic immunohistochemistry, Philadelphia:Churchill Livingston,650.

[20]: Figarella- Branger, Mokhtari, Capron.(2011). Neuropathologie tumorale.

[21] : Riemenschneider MJ, Reifenberg G.(janv 2009) Molecular neuropathology of gliomas. Int J Mol Sci.10(1): 184-212.

[22]: Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, et al.(Octobre 2004) Genetic pathway to glioblastoma: a population –based study. Cancer Res; 64:6892-6899.

[23]: Rigau V,Zouaoui S,Mathieui-Daudé H,Darlix A,Maran A,Trétarre B,et al.(2011).French Brain Tumor DataBase :5-Year Histological Results on 25756 Cases.Brzin Pathology.21(6) :633-44.

[24]: Luc Bauchet,Département de Neurochirurgie,CHU Montpellier, Facteurs de risqué et épidémiologie des tumeurs cérébrales.

[25]: Jean Philippe Brouland,(2017),Département de pathologie, Institut universitaire de pathologie CHUV,1011 Lausanne. Revue Médical Suisse.Nouvelle Classification OMS 2016 des gliomes.

[26] :INESS le savoir prend forme, (28 avril 2017) Détection du transcrit EGFRvIII (EGFR :Epidermal growth factor receptor)

[27]: Mme céline Boulay-Espéronnier (Paris-les Républicains) publiées dans le JO Sénat du (26/11/2020):Evolution de la prévalence du glioblastome et amélioration du parcours de soins des patients qui ont sont atteints, Page 5558

[28]: **Pépin P, (2019)**, Investigation d'une suspicion d'agrégat de glioblastomes dans une commune de l'Isère, mars 2017. Saint-Maurice : Santé publique France, 23 p.

[29]: **Site Info cancer.**

[30]: **Thèse, Représentée par Mostapha Habib Allah (2008)**, Les glioblastomes: Aspect pathologiques Anatomopathologiques et Evolutifs, Université Cadi AYYAD, Faculté de Médecine et Pharmacie Marrakech. Thèse 75°.

[31]: **F.Frest,C,Bouvier,A.Manes de Paula,D.Figarella-Branger.(Juillet 2013)** Examen cytologique et génétique des tumeurs du Système nerveux Central .vol 10 n° 3.

[32]:**Fabien ALMAIRAC,Philippe Paquis,(lundi 12 janvier 2015)** ; L'encyclopédie neurochirurgicale :Glioblastome .

[33]: **Site Futura Santé.Com.**

[34]: <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Tumeurs-du-cerveau/Le-cerveau/Les-differentes-parties>

[35]: <https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.futura-sciences.com%2Fsante%2Fdefinitions%2Fbiologie-neurone-209%2F&psig=AOvVaw3vGjXB--2BO1x6diO440Li&ust=1625255130314000&source=images&cd=vfe&ved=0CAoQjRxqFwoTCLici6vRwvECFQAAAAAdAAAAABAD>

[36]: <http://www.vetopsy.fr/neurophysiologie/cellules-gliales-nevroglie/nevroglie-cellules-gliales.php>

[37]: <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02083858/document>

[38]: https://www.researchgate.net/figure/Structure-du-gene-et-de-la-proteine-p53-humains-A-Le-gene-codant-la-proteine-p53_fig1_237691227

[39]: <http://goji-bio.over-blog.com/article-goji-bio-et-interet-dans-le-cancer-du-col-de-l-uterus-59882337.html>

[40]: https://www.jle.com/fr/revues/vir/e-docs/proteine_p53_de_linteraction_avec_les_proteines_virales_a_la_pathogenie_des_cancers_humains_260007/article.phtml

[41]: [https://www.agilent.com/en/product/immunohistochemistry/visualization-systems/envision-flex-systems/envision-flex-high-ph-\(link\)-76774](https://www.agilent.com/en/product/immunohistochemistry/visualization-systems/envision-flex-systems/envision-flex-high-ph-(link)-76774).

