





## Table de matière

Introduction générale.....	1
Partie bibliographique .....	3
I. Rappel anatomique du système nerveux :.....	3
1. Histologie du SNC.....	4
II. Les tumeurs cérébrales: cas des gliomes .....	6
1. Définition.....	6
2. Epidémiologie .....	6
3. Facteurs de risques .....	8
4. Classification des gliomes .....	9
5. Les altérations génétiques .....	12
5.1. Les altérations de l'IDH.....	12
5.2. Co-suppression 1p / 19q.....	17
5.3. Méthylation du promoteur de la MGMT.....	17
5.4. Mutation du promoteur TERT.....	17
Matériel et Méthodes.....	18
I. Description de l'étude .....	18
II. Sélections des patients et collecte des prélèvements : .....	18
III. Extraction d'ADN .....	19
IV. Détermination du statut mutationnel du gène IDH 2 .....	20



**Université Sidi Mohamed Ben Abdellah**  
**Faculté des Sciences et Techniques**  
[www.fst-usmba.ac.ma](http://www.fst-usmba.ac.ma)

---

1. Amplification du gène IDH2 par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) ....	20
2. Electrophorèse .....	22
3. Séquençage .....	23
<b>3.1. Purification des produits de PCR.....</b>	<b>24</b>
<b>3.2. Réaction de séquence par le kit BigDye ® Terminator v 3.1.....</b>	<b>24</b>
<b>3.3. Purification des produits de séquençage par Le kit BigDye® Xterminator™...25</b>	
Résultats .....	26
I. Données cliniques et anatomopathologiques de la population étudiée : .....	26
1. Résultats cliniques : .....	26
2. Résultats anatomopathologiques : .....	27
II. Résultats de l'analyse mutationnelle.....	28
1. Résultats de l'amplification de l'exon 4 du gène IDH2 par PCR : .....	28
2. Résultats du séquençage.....	29
Discussion .....	33
Conclusion.....	35
Références bibliographiques .....	36



**Université Sidi Mohamed Ben Abdellah**  
**Faculté des Sciences et Techniques**  
[www.fst-usmba.ac.ma](http://www.fst-usmba.ac.ma)

---

## Liste des abréviations

- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- BLAST** : Basic Local Alignment Search Tool
- CBTRUS** : Central Brain Tumor Registry of the United States
- CHU** : Centre Hospitalier Universitaire
- CIRC** : Centre International de la Recherche sur le Cancer
- D2HG** : 2-D- hydroxyglutarate
- ddNTP** : Didésoxynucléotide
- dNTP** : Désoxynucléotide
- GBM** : Glioblastome
- GFAP** : Glial Fibrillary Acidic Protein
- IB** : Incidence Brute
- IDH1** : Isocitrate Déshydrogénase 1
- IDH2** : Isocitrate Déshydrogénase 2
- IgE** : Immunoglobuline E
- LAL** : Leucémie Aiguë lymphoblastique
- LCR** : Liquide Céphalo-Rachidien
- MGMT** : O-6-MéthylGuanine-ADN MéthylTransférase



**Université Sidi Mohamed Ben Abdellah**  
**Faculté des Sciences et Techniques**  
[www.fst-usmba.ac.ma](http://www.fst-usmba.ac.ma)

---

**MT** : Marqueur de Taille

**NAD** : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

**NADP** : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**Pb** : Paires de bases

**PBS** : Phosphate Buffer Saline

**PCR** : Polymerase Chain Reaction

**PK** : Protéinase K

**ROS** : espèces réactives à l'oxygène

**rpm** : rotation par minute

**SN** : Système Nerveux

**SNC** : Système Nerveux Central

**SNP** : Système Nerveux Périphérique

**TBE** : Tris Borate EDTA

**TE** : Tris EDTA

**TERT** : Telomerase Reverse Transcriptase

**TMZ** : Témazolomide

**UV** : Ultra-Violets

**$\alpha$ -KG** :  $\alpha$ -cétoglutarate



**Université Sidi Mohamed Ben Abdellah**  
**Faculté des Sciences et Techniques**  
[www.fst-usmba.ac.ma](http://www.fst-usmba.ac.ma)

## Liste des figures

Figure 1	<b>Anatomie du système nerveux</b>	3
Figure 2	<b>les cellules du système nerveux central</b>	6
Figure 3	<b>Distribution des gliomes selon le type histologique</b>	7
Figure 4	<b>Incidence des tumeurs primitives du système nerveux central ajustée par histologie et par groupe d'âge</b>	7
Figure 5	<b>Schéma simplifié de la classification des gliomes avec le diagnostic selon l'OMS 2016</b>	12
Figure 6	<b>les différents domaines avec les sites actifs de l'IDH1/2</b>	13
Figure 7	<b>Fonction d'IDH de type sauvage et d'IDH mutant</b>	14
Figure 8	<b>Effets cellulaires des taux élevés de D2HG dans les gliomes</b>	16
Figure 9	<b>Position de l'amorce sur le gène IDH2</b>	21
Figure 10	<b>Programme d'amplification de l'IDH 2 par PCR</b>	22
Figure 11	<b>La méthode de séquençage didésoxy de Sanger</b>	23
Figure 12	<b>Répartition des patients selon l'âge</b>	26
Figure 13	<b>Répartition des patients selon le sexe</b>	27
Figure 14	<b>Répartition des patients selon le tabagisme</b>	27
Figure 15	<b>Répartition des patients selon le type tumoral</b>	28
Figure 16	<b>Résultats de l'électrophorèse des produits PCR de l'exon 4 du gène IDH2</b>	28
Figure 17	<b>Résultat du BLAST d'une séquence d'IDH2 exon 4</b>	29
Figure 18	<b>Résultat de l'alignement de la séquence 35 avec la séquence de référence sur "BioEdit"</b>	30
Figure 19	<b>Partie de l'électrophorégramme de l'exon 4 de l'IDH 2 montrant le codon R140</b>	30



**Université Sidi Mohamed Ben Abdellah**  
**Faculté des Sciences et Techniques**  
[www.fst-usmba.ac.ma](http://www.fst-usmba.ac.ma)

Figure 20	Résultat de l'alignement de la séquence 9 avec la séquence de référence sur "BioEdit"	31
Figure 21	Partie de l'électrophorégramme de l'exon 4 de l'IDH 2 montrant le codon R172	31

### Liste des tableaux

Tableau 1	Classification de l'OMS 2016 des tumeurs gliales	10
Tableau 2	Mutations les plus fréquentes de l'IDH1 et l'IDH 2	15
Tableau 3	Les composants de la solution de lyse	19
Tableau 4	Séquence de l'amorce utilisée pour la réaction PCR de l'IDH2	21
Tableau 5	Volumes et concentrations des réactifs utilisés pour la PCR	21
Tableau 6	les volumes des réactifs de la réaction de séquence	24
Tableau 7	Programme de la réaction de séquence	24



**Université Sidi Mohamed Ben Abdellah**  
**Faculté des Sciences et Techniques**  
[www.fst-usmba.ac.ma](http://www.fst-usmba.ac.ma)

---

## ***Résumé***

Les gliomes sont les tumeurs primitives les plus courantes du système nerveux central et sont classés de I à IV en fonction de leur degré de malignité. Les mutations dans les gènes de l'isocitrate déshydrogénase 1 et 2 sont très fréquentes dans les gliomes et sont considérées comme un puissant marqueur pronostique et diagnostique.

Notre étude a été réalisée sur 37 patients (28 atteints de gliomes et 9 présentant des kystes et qui sont considérés comme des témoins) et qui ont été recrutés au niveau du service de neurochirurgie de CHU Fès, pour l'étude épidémiologique. Pour l'étude moléculaire, les biopsies ont été prélevées et l'ADN a été extrait. L'exon 4 du gène IDH2 a été amplifié par PCR en utilisant des amorces spécifiques, ensuite les produits de PCR ont été séquencés.

L'étude a montré que les gliomes sont plus fréquents chez le sexe masculin que chez le sexe féminin avec un sexe ratio H/F 1,05. Aucune relation entre le tabagisme et le risque de gliome n'a été révélée. La présence de mutation dans le gène IDH2 a été détectée dans 8,6% des échantillons de gliome.

Les données épidémiologiques ont été similaires à ceux reportés dans la littérature. La fréquence de mutation de l'IDH2 dans notre échantillon, a été plus élevée par rapport aux autres études. L'analyse de ces mutations devient importante en tant que facteur pronostique permettant d'améliorer la prise en charge des patients.



## *Dédicaces*

*Je dédie ce mémoire à :*

*Mes très **chers parents**. Merci pour votre amour, votre soutien  
inconditionnel, votre aide sur tous les plans durant toutes ces années*

*Mes sœurs adorées **Zineb, Amina, Oumaima** et la petite **Hafsa**. Merci pour  
votre soutien moral et encouragement*

*Mes **grands-parents**, je suis très reconnaissante pour votre affection et  
votre soutien. Trouvez ici le témoignage de mon respect*

*Toute ma **famille** qui m'a toujours soutenue*

*Mes chères amies **Assia** et **Wijdane**, je suis vraiment chanceuse d'avoir  
faire votre amitié durant ces cinq années*



# Remerciements

Après avoir rendu grâce à dieu le tout puissant et le miséricordieux, Je tiens à remercier **Mme Bennani Bahia**, Professeur et Directrice du laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire au sein de la faculté de médecine et de pharmacie de Fès, de m'avoir accueillis dans son laboratoire, je la remercie infiniment d'avoir acceptée la direction de ce modeste travail et pour le temps qu'elle a consacré malgré toutes ses occupations

Je tiens à exprimer ma gratitude à mon cher professeur **Mme Guissi Sanae** pour son encadrement, sa disponibilité, sa patience et sa gentillesse

Je remercie vivement **Mr Haggoud Abdellatif** pour les efforts qu'il n'a jamais cessé de fournir durant ces deux années en tant que chef de master de BM

J'adresse aussi mes vifs remerciements à **Mr Haggoud Abdellatif** et **Mr Tazi Abdelali** qui m'ont honoré par leur présence en tant que membres de jury. Je les remercie d'avoir bien voulu examiner et juger ce travail

Je remercie également toutes les doctorantes du laboratoire de microbiologie et de biologie moléculaire de la FMPF pour leur aide et leurs conseils pertinents

Je remercie toute l'équipe du laboratoire de génétique médicale du CHU de Fès pour leur aide et leur accueil

"Mes remerciements les plus sincères vont à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude"



# Introduction générale

---

Les tumeurs du système nerveux central (SNC) occupent le 17<sup>ième</sup> rang des cancers les plus fréquents chez l'Homme avec une incidence de plus de 296851 nouveaux cas enregistrés en 2018 dans le monde entier<sup>1</sup>. Au Maroc, la situation épidémiologique de ce cancer est levée à partir du registre des cancers de la région du grand Casablanca pour la période 2008-2012, qui indique que l'incidence de ce cancer est de 1,7 pour 100.000 (Registre des cancers de la région du grand Casablanca pour la période 2008 – 2012, 2016). Ces tumeurs sont caractérisées par une forte mortalité en raison de leur localisation et de leur caractère invasif (Weller et al., 2015). Les gliomes, ou tumeurs gliales, représentent les tumeurs primitives les plus fréquentes du SNC, ils représentent 27% des tumeurs cérébrales. Ils se développent à partir des cellules de soutien du système nerveux (les cellules gliales) (Ostrom et al., 2015). Ils sont classés selon l'organisation mondiale de santé de I à IV selon leur degré de malignité.

Cependant, leur comportement biologique, leur pronostic ainsi que leur réponse au traitement varient au sein de la même catégorie histologique, pour cela la nouvelle classification de l'OMS 2016 intègre les données histologiques aux données moléculaires afin de définir de nouvelles entités de gliomes. La connaissance de la biologie moléculaire des gliomes a permis de mieux préciser leur diagnostic et leur pronostic, et plus loin prédire l'efficacité du traitement, donc améliorer les plans thérapeutiques personnalisés des patients (Ricaurte et al., 2018)

Une amélioration majeure de la classification de l'OMS en 2016 des gliomes, est la distinction des différentes entités de gliomes en fonction du statut mutationnel du gène de l'isocitrate déshydrogénase 1 ou 2. La découverte des mutations IDH dans ces tumeurs a constitué une avancée dans la compréhension de la biologie de cette maladie (Davis, 2018).

Les mutations IDH ont été identifiées comme des mutations qui causent la perte de l'activité normale de l'IDH, enzyme engagée dans le processus de métabolisme cellulaire et la réponse contre le stress oxydatif, induisant à un phénotype d'hyperméthylation qui entraîne le développement des gliomes. (Brouland et Hottinger, 2017).

Le statut «*IDH*-muté» a été associé à un meilleur pronostic (meilleure survie globale) et une meilleure réponse à la chimiothérapie (Ricaurte et al., 2018). Cependant, au Maroc, aucune étude n'est encore faite pour rechercher ces mutations IDH dans les gliomes.

C'est dans ce cadre que s'inscrit l'objectif principal de ce travail. Il consiste d'une part, à réaliser une étude ayant un objectif épidémiologique afin de voir la prévalence de la maladie (selon le sexe, l'âge et la relation entre le tabagisme et le risque de gliome), et d'autre part, il vise à déterminer la fréquence des mutations dans le gène de l'IDH2 chez une série de patients marocains atteints de différents types de gliomes, et de comparer les résultats avec ceux de la littérature. Les résultats trouvés peuvent être exploités par les médecins traitants afin de mieux définir le pronostic et de prédire la réponse au traitement pour une meilleure prise en charge des patients.

# Partie bibliographique

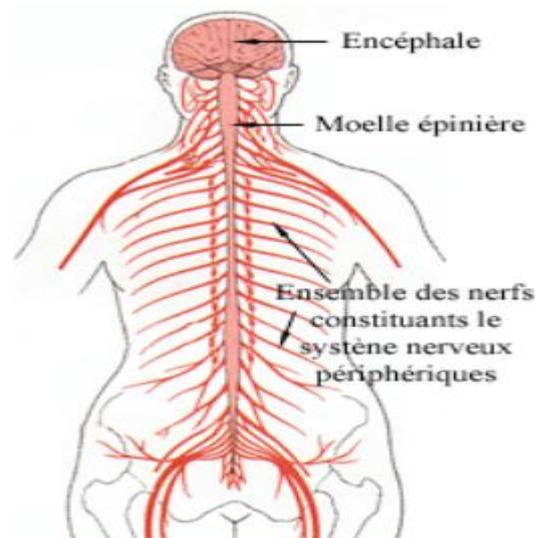
---

## I. Rappel anatomique du système nerveux :

Le système nerveux (SN) est responsable de la conduction, du traitement et de la transmission des informations de chaque partie du corps, il est ainsi subdivisé en deux parties: le système nerveux central (SNC) et le système nerveux périphérique (SNP) (Jürg., 2009).

Le SNP est composé des organes du système nerveux situés à l'extérieur du système nerveux central. Ces organes correspondent aux différents nerfs rattachés à l'encéphale ou à la moelle épinière. Les nerfs qui se rattachent au cerveau sont appelés des nerfs crâniens, alors que ceux qui se rattachent à la moelle épinière sont des nerfs rachidiens car ils émergent du canal rachidien (Farley et al., 2014).

Le SNC est composé de l'encéphale et de la moelle épinière. L'encéphale comprend le cerveau, le cervelet et le tronc cérébral et est enfermé dans la boîte crânienne, et la moelle épinière est située dans le canal rachidien qui résulte de la superposition des vertèbres de la colonne vertébrale (Figure1).



**Figure 1 : Anatomie du système nerveux<sup>1</sup>**

## 1. Histologie du SNC

Le système nerveux central est constitué par deux types de cellules : les cellules nerveuses ou **neurones** et les **cellules gliales**. Ces dernières forment un tissu qui permet le soutien des cellules nerveuses (Guyton, 1989).

### 1.1. Les neurones

Les neurones (ou cellules nerveuses), sont chargées de conduire les signaux à l'intérieur du système nerveux. Leur nombre est estimé à  $10^{11}$  neurones (Guyton, 1989) et sont spécialisées dans la communication intra et intercellulaire. En général, les neurones sont composées de trois structures qui facilitent le transfert de l'information : les axones, les dendrites et les synapses (Kovacs, 2017).

### 1.2. Les cellules gliales

Les cellules gliales, appelées aussi glies ou névroglies, constituent la population dominante du tissu nerveux et représentent environ 50% des cellules du SNC (Allen et Lyons, 2018) et plus de 90% des cellules du cerveau humain. Ces cellules sont classées en deux grandes catégories (Kabba et al., 2018):

- la macroglie qui comprend les astrocytes, les oligodendrocytes, et les cellules épendymaires.
- la microglie qui regroupe les cellules immunitaires du système nerveux central.

#### 1.2.1. La macroglie :

##### a. les astrocytes

Les astrocytes ou les astroglioses constituent la population dominante des cellules gliales et sont cinq fois plus nombreux que les neurones. Elles sont nommés ainsi car ils possèdent un corps cellulaire qui présente des prolongements cytoplasmiques rayonnants qui s'entrelacent de façon complexe avec le corps des neurones (Jessen, 2004) (Figure 2). Ces cellules sont caractérisées par l'abondance d'une protéine cytoplasmique GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) et de grains de glycogène qui constituent une réserve énergétique pour le cerveau (Dinuzzo et al., 2012).

Les astrocytes constituent un véritable tissu de soutien, elles servent à maintenir un environnement chimique adéquat pour les neurones en maintenant des concentrations

appropriées d'ions et de neurotransmetteurs dans l'environnement neuronal. Ainsi, elles assurent le support nutritionnel en sécrétant des facteurs trophiques indispensable au bon fonctionnement des neurones (Kovacs, 2017). En plus, elles maintiennent l'homéostasie cérébrale grâce au métabolisme oxydatif du glucose (Dinuzzo et al., 2012) et régulent aussi la formation, la maturation et l'élimination des synapses (Vasile, Dossi et Rouach, 2017).

#### b. les oligodendrocytes :

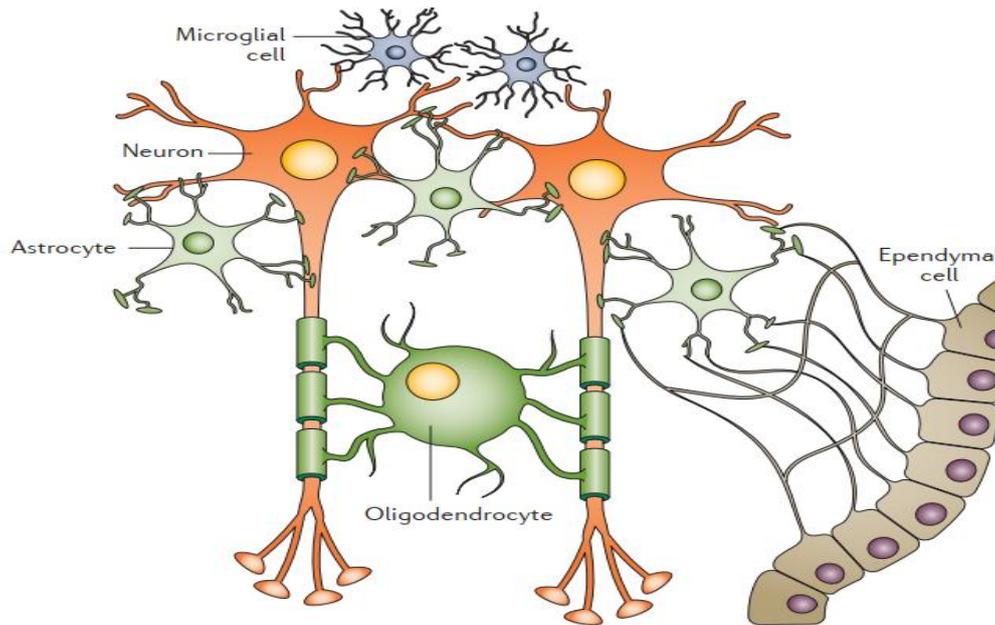
Les oligodendrocytes sont des cellules gliales responsables essentiellement de la formation de la myéline tout autour des axones des neurones (Figure 2). Cette gaine de myéline fournit une isolation électrique des axones améliorant ainsi la transmission des signaux électriques au niveau du système nerveux (Jessen, 2004).

#### c. les cellules épendymaires

Les cellules épendymaires (ou épendymocytes) constituent le revêtement des cavités ventriculaires du SNC, en raison de leur contact direct avec le liquide céphalo-rachidien (LCR), elles participent en l'homéostasie de ce dernier (Kovacs, 2017).

#### 1.2.2. La microglie :

Les cellules microgliales représentent 5 à 10% des cellules du SNC (Frost et Schafer, 2016). Elles servent de macrophages cérébraux. Et constituent la première ligne de défense immunitaire au niveau du SNC. En fait, elles sont impliquées dans la réparation des lésions, l'élimination des microbes et des cellules mortes, ainsi elles participent à la maintenance de l'homéostasie (Colonna et Butovsky, 2017). Des études récentes ont montrés que ces cellules ont la capacité de réguler la survie, la prolifération ainsi que la maturation de certaines cellules gliales et des neurones (Frost et Schafer, 2016).



**Figure 2 : les cellules du système nerveux central** (Weller et al., 2015)

## II. Les tumeurs cérébrales: cas des gliomes

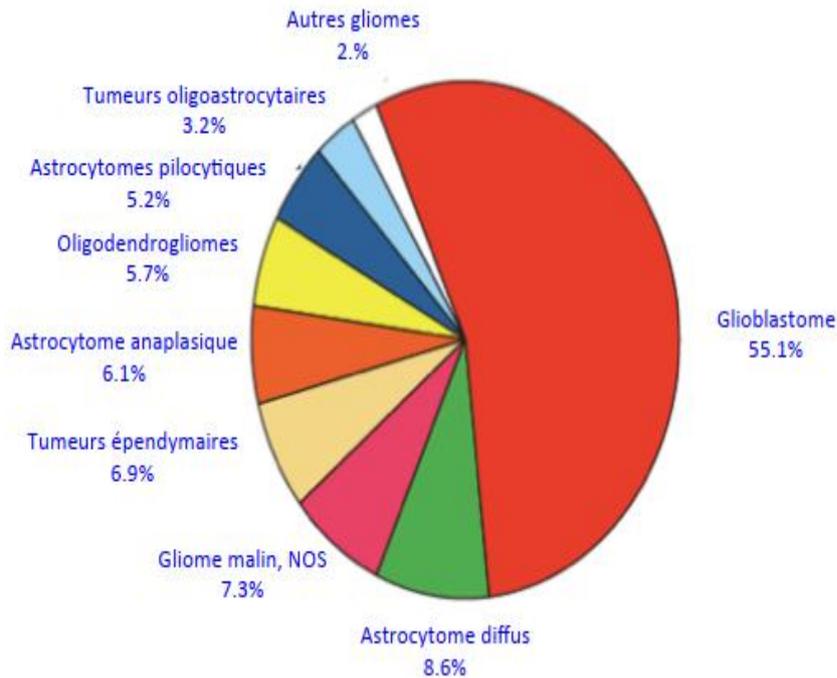
### 1. Définition

Les gliomes représentent les tumeurs primitives les plus fréquentes du système nerveux central chez l'adulte (Ducray, 2008). Ces tumeurs se développent à partir des cellules gliales et peuvent être classées en plusieurs types en fonction du type de la cellule lui ont donnée naissance. Ainsi, peuvent être distinguées les astrocytomes, les oligodendrogliomes et les tumeurs mixtes (issues de l'association de cellules dérivant d'astrocytes et d'oligodendrocytes) (Lenting et al., 2017).

### 2. Epidémiologie

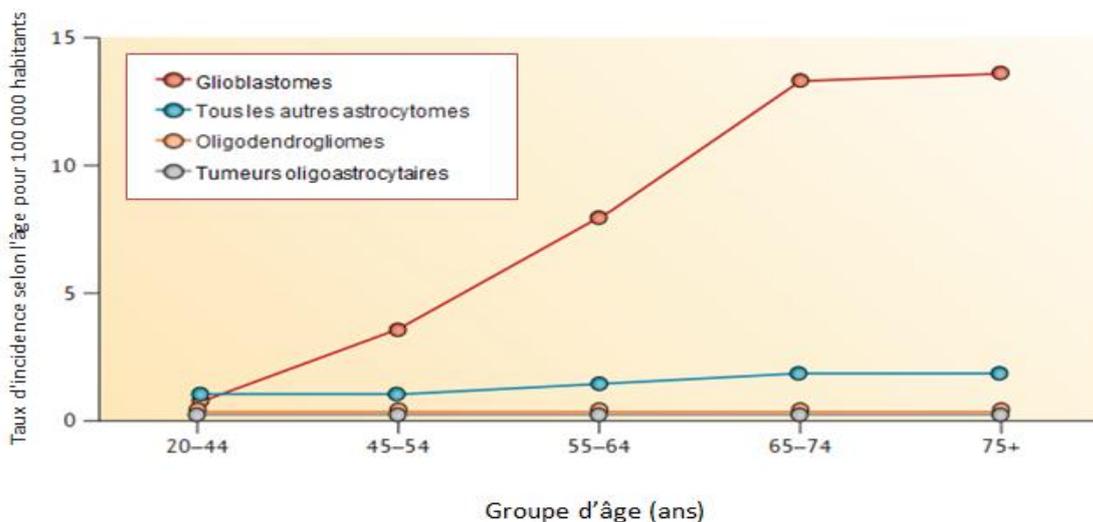
D'après les données du Centre International de Recherche sur le Cancer (*CIRC*) publiées en 2018, les tumeurs du SNC occupent le 17<sup>ième</sup> rang des cancers les plus fréquents chez les deux sexes (296851 cas). Elles représentent 1,6% de tous les types de cancers diagnostiqués au niveau mondial avec une mortalité estimée à 2,5% soit 240037 cas. Chez les enfants (de 0 à 19 ans), ces tumeurs viennent en seconde place après la leucémie avec une incidence de 11% (30106 cas) et une mortalité de 16,5% (16830 cas) (Globocan, 2018)<sup>2</sup>. Les gliomes représentent les tumeurs primitives les plus fréquentes du SNC, ils représentent 27% de tout type confondus de tumeurs cérébrales et 80% des tumeurs cérébrales malignes de l'adulte. Les glioblastomes sont les tumeurs malignes les plus fréquentes et représentent 55% de tous

les gliomes. Les astrocytomes, y compris les glioblastomes représentent à peu près 75% des gliomes (Ostrom et al., 2015) (Figure 3).



**Figure 3 : Distribution des gliomes selon le type histologique** ( adaptée de Ostrom et al., 2015)

Une étude portant sur l'incidence des gliomes, selon l'âge des patients et type histologique de la tumeur, a montré que ces dernières sont autant plus fréquents chez les sujets âgés que chez les jeunes spécifiquement pour les glioblastomes (Weller et al., 2015) (Figure 4).



**Figure 4 : Incidence des tumeurs primitives du système nerveux central ajustée par histologie et par groupe d'âge** (Weller et al., 2015)

Aux états Unis, le rapport CBTRUS (Central Brain Tumor Registry of the United States) estime que 20000 cas de gliomes sont diagnostiqués en 2015, en France 3000 nouveaux cas sont recensés par an (Psimaras et Delattre, 2008).

La survie varie en fonction de plusieurs critères est surtout en fonction du grade histologique de la tumeur. L'astrocytome pilocytique a la survie la plus élevée qui peut aller jusqu'à 10 ans avec un pourcentage de 90% (McNeill, 2016), alors que pour les glioblastomes la plupart des patients ne surviennent pas plus d'un an et environ 5% survivent jusqu'à 5 ans (Lapointe, Perry et Butowski, 2018).

Au Maroc, en 2012, le cancer du SNC représentait 2% des cas enregistrés chez les hommes avec une incidence brute (IB) de 2 pour 100 000, et 1,1% pour les femmes avec une IB de 1,4 pour 100 000.

Chez les enfants âgés entre 0 et 14 ans, les tumeurs du SNC sont les plus fréquents après la leucémie avec un pourcentage de 16% des cas enregistrés et une IB de 1,7 pour 100 000 (Registre des cancers de la Région du Grand Casablanca pour la période 2008 – 2012, 2016).

### **3. Facteurs de risques**

Les résultats des recherches sur les gliomes ont montré que ces derniers sont plus fréquents chez le sexe masculin, les sujets âgés et la race blanche. En fait, une étude Américaine basée sur une analyse ethnique des patients affectés des tumeurs primaires du SNC au cours de la période 1971-1985, a montré que les gliomes sont deux fois plus fréquents chez les blancs que chez les noirs (Ohgaki et Kleihues, 2005). Cependant l'étiologie des gliomes reste encore mal identifiée, par contre différents facteurs de risque ont été déterminés et leur association avec le développement des gliomes a été démontrée :

- l'exposition aux rayonnements ionisants peut causer des cassures au niveau de l'ADN induisant des modifications génétiques pouvant mener au cancer (Ostrom et al., 2018). En effet, des études ont montré que les radiations thérapeutiques utilisées à forte dose pour le traitement des cancers surtout chez les enfants (même à des endroits autre que le cerveau) augmente le risque des gliomes (Schwartzbaum et al., 2006). Ces derniers peuvent apparaître 7 à 9 ans après l'irradiation (Ohgaki, 2009). Relling et coll. (1999) ont évalué l'incidence des tumeurs cérébrales dans une cohorte de 52 enfant ayant subi une irradiation crânienne prophylactique utilisée pour le traitement de la Leucémie Aiguë lymphoblastique (LAL) chez l'enfant, l'incidence des tumeurs cérébrales était

de 12,8% chez les enfants bénéficiés de la radiothérapie contre 0,08 % chez les patients non irradiés de la même étude.

- les allergies et les maladies atopiques : une étude menée en 2013 sur l'association des allergies avec les tumeurs cérébrales a rapporté que ces dernières réduisent le risque de développer des gliomes (Turner et al., 2013). le même résultat est obtenu pour les maladies atopiques avec une augmentation des niveaux de l'immunoglobuline IgE (Weller et al., 2015), cet effet est peut être attribué à une surveillance accrue du système immunitaire (Ostrom et al., 2018).
- Téléphones portables : plusieurs études ont suggéré qu'une exposition qui dépasse les 10 ans et une utilisation intensive d'une durée cumulée de plus de 897 h augmentent le risque de gliomes (Baan et al., 2011; Coureau et al., 2014).
- Exposition aux pesticides : Plusieurs études cas-témoins examinant l'association entre l'exposition aux pesticides et le développement des gliomes ont montré que le risque de développer un gliome était plus élevé chez les agriculteurs, suggérant l'exposition aux pesticides comme principal facteur inducteur de ces tumeurs (Fallahi et al., 2017).
- Tabagisme : Une méta-analyse d'études de cas-témoins et de cohortes, afin d'évaluer la relation entre le tabagisme et le risque de gliome, réalisée par Shao et ses collaborateurs suggère que le tabagisme n'est pas associé de manière significative au risque de développement des gliomes

#### 4. Classification des gliomes

selon l'OMS (2007), les gliomes sont classés (suivant les caractéristiques microscopiques des coupes histologiques des tumeurs) en oligodendrogliomes, astrocytomes ou oligoastrocytomes dont un grade pronostique allant de I jusqu'à IV est attribué à chaque tumeur en tenant compte de différents critères de malignité à savoir (Figarella-Branger et al., 2008) :

- la différenciation et la densité cellulaires,
- la présence d'atypies cytonucléaires,
- l'activité mitotique,
- l'aspect nécrotique,
- la prolifération microvasculaire,

Cependant cette classification présente toujours des défis, puisqu'elle repose sur l'analyse microscopique des coupes histologiques, elle est sujette à une variabilité inter-observateur significative. En fait, des études ont montré que la concordance entre un groupe de neuropathologistes pouvait atteindre 52% pour un cas de gliome. Aussi cette classification peut compliquer le diagnostic si le prélèvement tissulaire est insuffisant ou non représentatif (Chen et al., 2017).

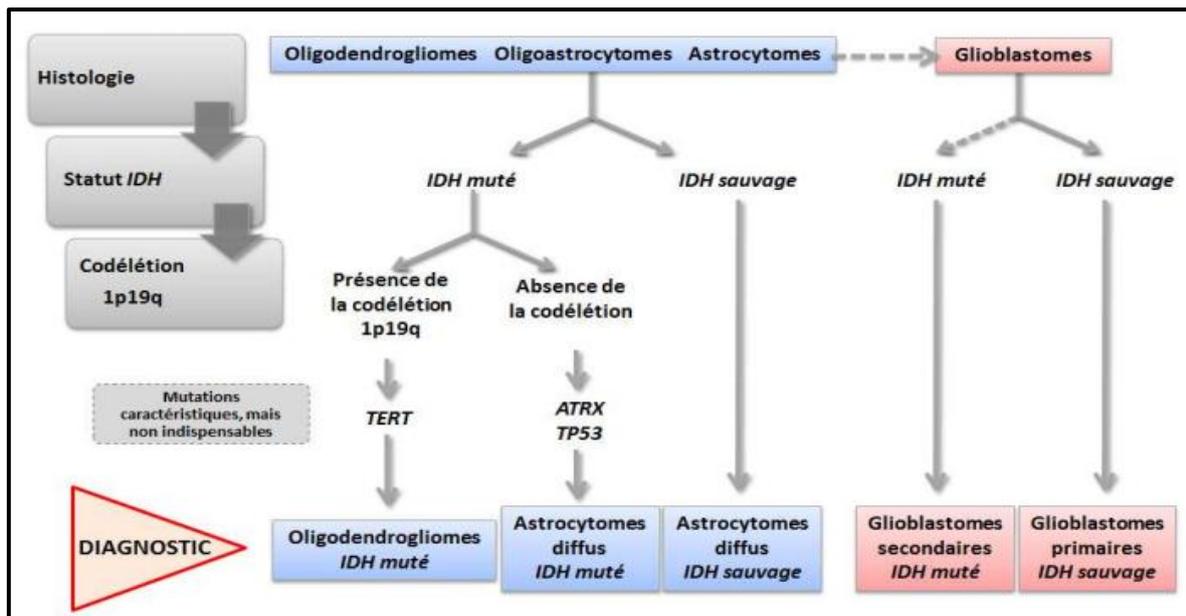
Cependant, la classification recommandée par l'OMS en 2016 (Tableau 1) et qui constitue une mise à jour de la 4<sup>ème</sup> édition de la classification de 2007, intègre pour la première fois des biomarqueurs moléculaires aux données histologiques (Figure 5) dans le but de définir des entités plus spécifiques de gliomes (Louis et al., 2016). La compréhension de ces paramètres moléculaires a permis d'affiner d'avantage les critères de diagnostic et de pronostic (Chen et al., 2017).

**Tableau 1 : Classification de l'OMS 2016 des tumeurs gliales (Louis et al., 2016) :**

<b>Grade</b>	<b>Tumeurs diffuses astrocytaires et oligodendrogiales</b>
II	Astrocytome diffus, IDH-muté Astrocytome gémissocytique, IDH-muté
II	Astrocytome diffus, IDH-non muté
II	Astrocytome diffus, NOS
III	Astrocytome anaplasique, IDH-muté
III	Astrocytome anaplasique, IDH-non muté
III	Astrocytome anaplasique, NOS
IV	Glioblastome, IDH-non muté Glioblastome à cellules géantes Gliosarcome Glioblastome épithélioïde
IV	Glioblastome, IDH-muté
IV	Glioblastome, NOS
IV	Gliome diffus de la ligne médiane, H3 K27M-muté
II	Oligodendrogliome, IDH-muté et codélétion 1p-19q
II	Oligodendrogliome, NOS
III	Oligodendrogliome anaplasique, IDH-muté et codélétion 1p-19q
III	Oligodendrogliome anaplasique, NOS

II	Oligoastrocytome, NOS
III	Oligoastrocytome anaplasique, NOS
<b>Autres tumeurs astrocytaires</b>	
I	Astrocytome pilocytaire Astrocytome pilomyxoïde
I	Astrocytome subépendymaire à cellules géantes
II	Xanthoastrocytome pléomorphe
III	Xanthoastrocytome pléomorphe anaplasique
<b>Tumeurs épendymaires</b>	
I	Subépendymome
I	Ependymome myxopapillaire
I	Ependymome Ependymome papillaire Ependymome à cellules claires Ependymome tanacytique
II ou III	Ependymome, RELA fusion-positif
III	Ependymome anaplasique
<b>Autres gliomes</b>	
II	Gliome chordoïde du 3 <sup>e</sup> ventricule
I	Gliome angiocentrique
-	Astroblastome

NOS : Not Otherwise Specified, cette désignation est attribuée aux tumeurs pour désigner que les tests moléculaires sont absents dans le diagnostic, ce qui implique que les informations sont insuffisantes pour attribuer un code plus spécifique (Reifenberger *et al.*, 2017).



**Figure 5 : Schéma simplifié de la classification des gliomes avec le diagnostic selon l'OMS 2016**

## 5. Les altérations génétiques

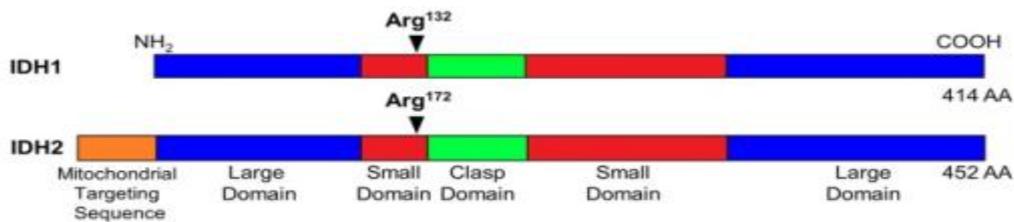
Le changement du paradigme de diagnostic des gliomes, en raison d'études de profilage moléculaire, a clarifié la base génétique des gliomes et a permis d'identifier un certain nombre d'altérations associées à des entités spécifiques de gliomes (Alfonso et al., 2017). Certaines altérations génétiques ont été révélées dans les gliomes, notamment: les mutations de l'isocitrate déshydrogénase 1 et 2 (IDH 1/2), la codélation des bras chromosomiques 1p et 19q, la méthylation du promoteur de la O -méthylguanine-ADN méthyltransférase (MGMT) et la méthylation du promoteur du TERT (Brat et al., 2015).

### 5-1. Les altérations de l'IDH :

#### 5.1.1 Structure de l'IDH

Dans les cellules humaines, les gènes IDH ou isocitrate déshydrogénase codent pour 3 isomères distincts IDH1, IDH2 et IDH3, l'isocitrate déshydrogénase 1 et 2 sont deux enzymes isoformes homodimériques contenant deux sites actifs par dimère, chaque unité de l'IDH étant composée d'un grand, et d'un petit domaine en plus d'un domaine fermoir, l'IDH2 possède en plus une petite séquence de ciblage mitochondrial (Figure 6), chaque site actif possède un domaine de liaison de NADP(H), de l'isocitrate et d'un cation bivalent : le calcium (Waitkus, Diplas et Yan, 2016), ces deux enzymes sont codées par deux gènes

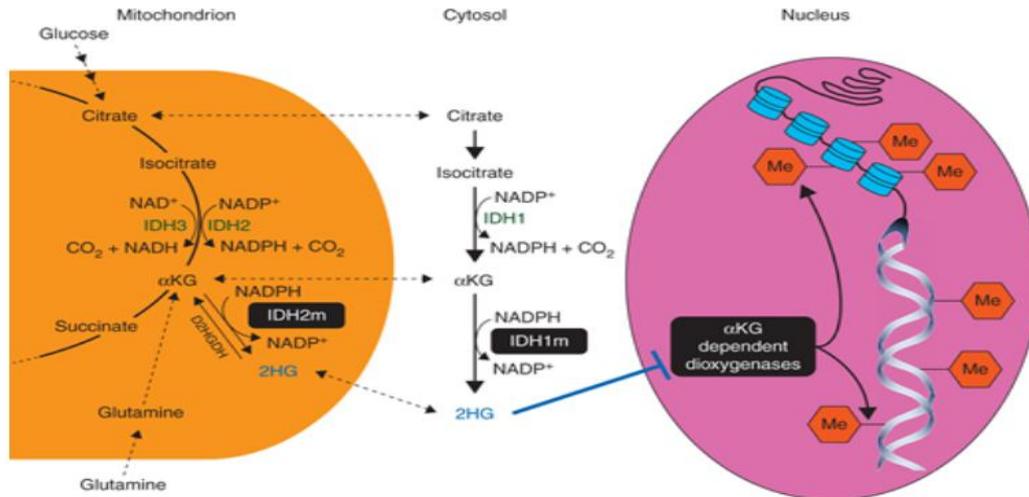
différents situés respectivement sur les chromosomes 2q33 et 15q26, ces enzymes présentent un degré de similarité de séquence très élevé (70%), l'IDH1 est abondant au niveau du cytoplasme et du peroxysomes alors que l'IDH 2 est spécifique des mitochondries (Dang et Su, 2017), ce sont des enzymes nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP<sup>+</sup>) dépendants jouant un rôle essentiel dans la production de l'énergie indispensable au métabolisme cellulaire (Kaminska et al., 2019), alors que l'IDH 3 est une enzyme mitochondrial sous la configuration hétérotétramérique utilisant le NAD<sup>+</sup> comme cofacteur pour la production de NADH (Huret et Dessen, 2017).



**Figure 6 : les différents domaines avec les sites actifs de l'IDH1/2 (Waitkus et al., 2016).**

### **5.1.2 Fonction de l'IDH :**

Les isocitrate déshydrogénases sont des enzymes métaboliques clés du cycle de Krebs, ils catalysent la décarboxylation oxydative de l'isocitrate en  $\alpha$ -cétoglutarate ( $\alpha$ -KG) utilisant le NADP<sup>+</sup> (pour l'IDH 1/2) ou le NAD<sup>+</sup> (pour l'IDH 3) comme cofacteurs, ainsi ils contribuent à la transmission d'électrons et l'échange de métabolites entre le mitochondrie et le cytosol (Figure 7) (Dang, Yen et Attar, 2016). Ces enzymes jouent un rôle primordial dans le métabolisme cellulaire, l'IDH 1 étant impliqué dans le métabolisme lipidique il assure la bêta oxydation des acides gras polyinsaturés dans le peroxysome en générant du NADPH qui contribue à la défense cellulaire contre les espèces réactives à l'oxygène (ROS) générées au cours de l'oxydation des lipides et d'autres processus, alors que l'IDH 2 intervient dans la régulation de la respiration oxydative (Reitman et Yan, 2010).



**Figure 7 : Fonction d'IDH de type sauvage et d'IDH mutant (Dang et al., 2016)**

Ces enzymes jouent un rôle primordial dans la protection des cellules contre le stress oxydative par la production de NADPH et de  $\alpha$ -KG (molécules à forte activité réductrice et ils préviennent les dommages d'ADN par l'interaction avec le système de production de glutathione et de thioredoxine (Waitkus, et al., 2016)). L'IDH 1 constitue la source principale du NADPH du cerveau humain (produit 65 % du NADPH du cerveau (Kaminska et al., 2019)), les mutations qui affecte donc ces deux gènes ont des conséquences grave sur la cellule.

### **5.1.3 Les mutations IDH :**

Les mutations de l'IDH 1/2 sont des aberrations génétiques précoces de la gliomagenèse. Elles sont détectées dans 70% des astrocytomes de stade II et III et des oligodendrogliomes, ainsi que dans la majorité des GBM secondaires, par contre ces mutations ne sont jamais retrouvées dans les GBM primaires (Ludwig et Kornblum, 2017). Jusqu'à aujourd'hui toutes les mutations avisées de l'IDH 1/2 sont des mutations faux sens hétérozygotes, les cellules cancéreuses gardent une copie du gène sauvage sur un des deux allèles (Rakheja et al., 2012) et les mutations affectent spécifiquement les résidus arginine du site actif de ces enzymes (Tableau 2). Pour l'IDH1, l'altération la plus fréquente est celle qui touche le résidu arginine en position 132, en le remplaçant par une histidine : R132H (c.395G>A). Cette mutation représente approximativement 90% des mutations de l'IDH, les autres mutations affectant le même codon 132 représentent 7% des mutations. Pour l'IDH 2, la mutation la plus fréquente est la R172K et est présente dans 3% des cas (substitution de l'arginine à la position 172 par la lysine) (Catteau et al., 2014).

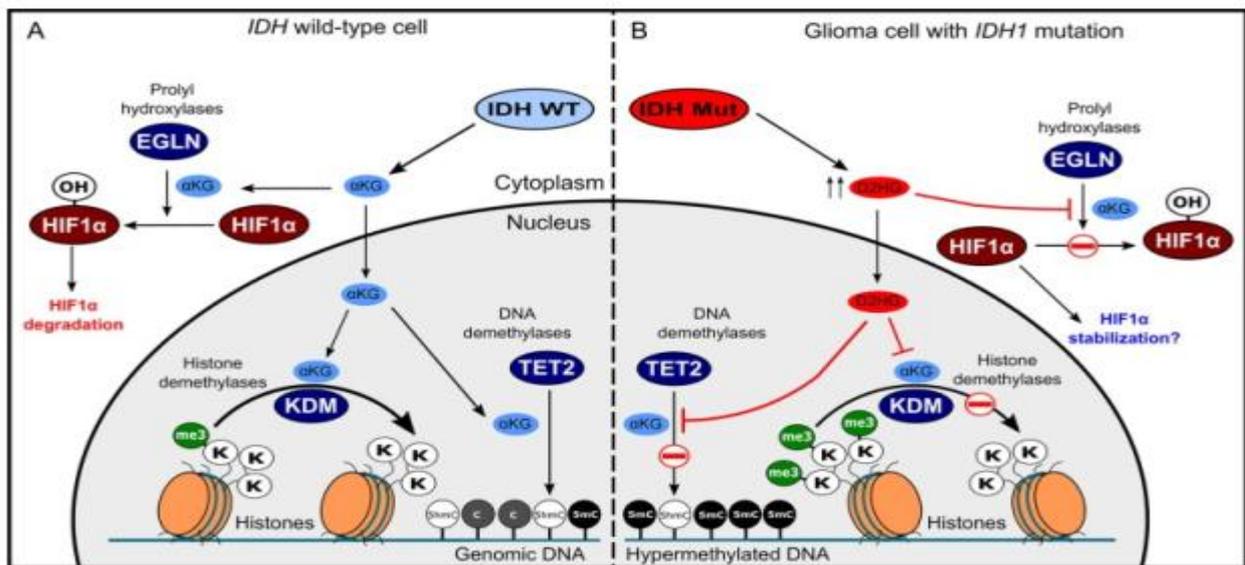
**Tableau 2 : Mutations les plus fréquentes de l'IDH1 et l'IDH 2** (Catteau et al., 2014; Marcucci et al., 2010)

Gène	Mutation	Changement de base
<b>IDH1</b>	Arg132His (R132H)	<b>395G&gt;A</b>
	Arg132Cys (R132C)	<b>394C&gt;A</b>
	Arg132Ser (R132S)	<b>394C&gt;G</b>
	Arg132Gly (R132G)	<b>394C&gt;T</b>
	Arg132Leu (R132L)	<b>395G&gt;T</b>
	Arg100Gln (R100Q)	<b>299G&gt;A</b>
<b>IDH2</b>	Arg172Lys (R172K)	<b>515G&gt;A</b>
	Arg172Trp (R172W)	<b>514A&gt;T</b>
	Arg172Gly (R172G)	<b>514A&gt;G</b>
	Arg140Gln (R140Q)	<b>419G&gt;A</b>
	Arg140Leu (R140L)	<b>419G&gt;T</b>

#### **5.1.4 Effets des mutations IDH**

Les mutations IDH entraînent la perte de l'activité normale de l'enzyme, avec diminution de la production du NADPH. Des études suggèrent que ces mutations cause aussi la diminution de l'affinité de l'enzyme à l'isocitrate (Yan et al., 2009). En fait, en 2009, Dang et coll. ont conclu que la mutation de l'IDH 1 confère le gain d'une nouvelle activité néomorphique qui permet la réduction de  $\alpha$ -KG avec production de D-2-hydroxyglutarate (D2HG) et consommation de NADPH (Figure 7). D'autres études ont confirmé ce résultat aussi pour l'IDH2 (Ward et al., 2010). Cette nouvelle activité qui est une caractéristique commune des mutations de l'IDH 1/2 montre qu'elles jouent un rôle important dans le processus de cancérogenèse, ce qui a conduit à considérer le D2HG comme un oncométabolite (Reitman et Yan, 2010). Le D2HG se produit au niveau des cellules normales à des niveaux très faibles à cause des erreurs de catalyse et il est rapidement converti en  $\alpha$ -KG par les 2-HG déshydrogénases, la nouvelle activité de l'IDH muté permet la production de D2HG dans les cellules à des niveaux très élevés (Rakheja et al., 2012). Le D2HG agit comme inhibiteur compétitifs des dioxygénases  $\alpha$ -KG dépendantes, il inhibe la cytosine hydroxylase TET (enzyme qui favorise la déméthylation de la 5-méthylcytosine) entraînant une hyperméthylation de l'ADN à l'échelle du génome. Il inhibe les histones déméthylases, ce

qui engendre la triméthylation des histones, et la prolyl hydroxylase induisant à la stabilisation du facteur HIF1 $\alpha$  (Waitkus et al., 2016) (Figure 8).



**Figure 8 : Effets cellulaires des taux élevés de D2HG dans les gliomes (Waitkus et al., 2016)**

### ***5.1.5 Impact des mutations IDH sur le traitement des gliomes***

La découverte des mutations IDH a permis aux scientifiques de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant les altérations qui affectent les gènes IDH. Parmi ces thérapies, l'utilisation des inhibiteurs sélectifs de l'IDH ou la réversion de l'IDH muté qui induit l'hyperméthylation par utilisation des inhibiteurs de l'ADN méthyltransférase (Rohle et al., 2013).

Plusieurs recherches ont été menées dernièrement dans le but d'étudier l'impact des mutations IDH sur le traitement des gliomes. En 2015, Molenaar et coll. ont montré que les gliomes mutants à l'IDH sont plus sensibles à la radiothérapie à cause des taux réduits de NADH et NADPH, qui entraîne l'accumulation des espèces réactives à l'oxygène et des cassures d'ADN par conséquent la mort cellulaire contrairement aux gliomes IDH sauvage (Molenaar et al., 2015). En plus, les tumeurs mutantes à l'IDH présentent une meilleure réponse à la chimiothérapie. Des études réalisées chez des patients (ayant un risque élevé des gliomes de grades II et III), bénéficiant d'un traitement par la radiothérapie ont prouvé que seuls les patients atteints des tumeurs IDH muté peuvent bénéficier de l'apport de la chimiothérapie au traitement. Ce résultat peut être accordé à l'expression réduite du gène MGMT (une enzyme de réparation de l'ADN) dans les gliomes. De plus, le D2HG inhibe les

dioxygénases  $\alpha$ -KG dépendantes responsables de la réparation d'ADN, ce qui rend les tumeurs plus sensibles aux agents alkylants (Picca et al., 2018).

### **5-2. *Co-suppression 1p / 19q***

La perte génétique au niveau des chromosomes 1p / 19q (perte du bras court du chromosome 1 et du bras long du chromosome 19) est un événement génétique précoce qui ne se rencontre jamais dans les tumeurs non gliales. Elle est retrouvée dans 80% des oligodendrogliomes (Ludwig et Kornblum, 2017) et est généralement associée à la mutation de l'IDH 1/2 dont elle considérée comme biomarqueur prédictif, la détection de cette altération peut se faire par différentes techniques telle que l'hybridation fluorescente in situ (Weller et al., 2015).

### **5-3. *Méthylation du promoteur de la MGMT***

La O-6-méthylguanine-ADN méthyltransférase est une protéine qui répare les dommages de l'ADN induits par les agents alkylants au cours de la réplication cellulaire et prévient l'apoptose. C'est une protéine qui supprime le groupe guanine-alkyle ajouté à la guanine, la MGMT rend les cellules plus résistantes aux agents alkylants de l'ADN. La perte de l'activité de cette protéine rend les tumeurs plus sensibles au traitement par le témozolimide (TMZ) qui méthyle les bases puriques en provoquant des dommages d'ADN, du côté, il amorce l'apoptose des cellules (Ludwig et Kornblum, 2017). La méthylation du promoteur de la MGMT a été identifiée comme un facteur prédictif /pronostique pour le diagnostic de GBM chez les patients traités par le TMZ, elle se retrouve dans 40% des GBM (Chen et al., 2017), et dans environ 80% des gliomes de bas grade IDH muté (Cohen et Colman, 2015).

### **5-4. *Mutation du promoteur TERT***

Le TERT (*Telomerase Reverse Transcriptase*) est un gène qui code pour la protéine télomérase, elle est responsable du maintien des télomères afin que les cellules tumorales évitent la sénescence et soutiennent une prolifération active (Chen et al., 2017). La mutation du promoteur TERT augmente l'expression de la protéine et par conséquent, la longueur des télomères induisant une intense prolifération des cellules tumorales. Cette altération sert de biomarqueur moléculaire important des sous-types de gliomes (Eckel-Passow et al., 2015), elle est observée dans plus de 90% des oligodendrogliomes présentant la mutation IDH et la codéletion 1p/19q, et 70% des GBM IDH non muté (Weller et al., 2015).

# Matériel et Méthodes

---

## I. Description de l'étude :

L'objectif de ce travail est d'analyser la fréquence de mutation au niveau du gène de l'IDH2 par la technique de séquençage de Sanger chez des patients marocains atteints des gliomes et de comparer les résultats avec ceux des patients présentant seulement des kystes.

L'étude est réalisée sur une période de 4 mois au sein du laboratoire de microbiologie et de biologie moléculaire de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Fès. Il s'agit d'une étude moléculaire dont le but est de déterminer le taux de mutation R172 et R140 pour l'IDH2. L'étude porte sur 37 patients, dont 28 sont atteints des gliomes et 9 présentant des kystes et qui ont été hospitalisés et suivis au niveau du service de neurochirurgie du Centre Hospitalier Universitaire Hassan II de Fès.

## II. Sélections des patients et collecte des prélèvements :

Le recrutement des patients atteints de gliomes a été réalisé pendant leur période d'hospitalisation au niveau du service de neurochirurgie de CHU Fès.

La collecte des données est faite en tenant compte des considérations éthiques en respectant le caractère anonyme des participants et la confidentialité de leurs informations. Les patients sélectionnés ont été contactés après l'intervention chirurgicale et pendant leur période d'hospitalisation et ont reçus une information claire sur le but de l'étude. Chaque patient a donné son accord par la signature d'un consentement et un questionnaire contenant les données suivantes a été rempli par entretien oral avec le patient :

- le sexe, l'âge, les habitudes toxiques

En consultant le dossier médical du patient les informations suivantes sont notées :

- Le type histologique de la tumeur, la localisation ainsi que le stade tumoral

Les échantillons tumoraux des patients sont collectés après intervention chirurgicale, et mis dans un liquide physiologique puis conservés à -20°C jusqu'à leur extraction.

### III. Extraction d'ADN

L'ADN a été extrait à partir d'échantillons de biopsie des tumeurs cérébrales en suivant un protocole de lyse cellulaire par la protéinase K (PK) et une purification par un traitement au phénol/chloroforme (El Khadir et al., 2018). Elle est réalisée comme suit:

Broyage de la biopsie : cette étape importante permet la lyse cellulaire. La biopsie est mise dans un tube eppendorf contenant 500µl de PBS 1X, puis à l'aide d'un bâtonnet en verre stérile des mouvements répétitifs de pilon-mortier sont réalisés afin d'éclater les cellules. Les tubes sont ensuite centrifugés à 13500 rpm pendant 15 min, le surnageant est éliminé et le culot est remis en suspension dans 120µl de PBS 1X.

Déprotéinisation : cette étape est réalisée en faisant agir une protéase (la PK), le culot repris dans le PBS est traité par 40µl de la solution de lyse (comprenant le Tris, le Triton et la PK à 20mg/ml) (Tableau 3) :

**Tableau 3 : Les composants de la solution de lyse**

Réactifs	Volumes (x1)
Tris	2,5 µl
Triton	0,6 µl
PK	0,4 µl
H <sub>2</sub> O	37,5 µl

Après homogénéisation, les tubes sont incubés à 37°C pendant une nuit. Après l'incubation, la réaction est arrêtée par échauffement à 92°C pendant 10 min afin d'inactiver la PK. L'extrait d'ADN est ainsi obtenu.

L'extrait d'ADN obtenu (160µl) sera divisé en deux fraction ; l'une sera conservée à -20°C pour servir d'extrait, et l'autre va subir une purification afin d'obtenir de l'ADN pur.

Purification d'ADN : cette étape permet d'éliminer les protéines et les lipides par un traitement au phénol/chloroforme, solvant organique qui dénature les protéines. Un volume (V:V) de phénol/chloroforme est ajouté au tube contenant l'extrait d'ADN. Après

centrifugation à 4000 rpm/5 min, 0,1V d'acétate de sodium et 2V d'éthanol à 100% sont ajoutés à la phase aqueuse et les tubes sont incubés à -20°C pendant une nuit. Après cette incubation, les tubes sont centrifugés à 14000 rpm pendant 20 min puis le culot est mis en suspension dans 1 ml d'éthanol à 70% et centrifugé à 14000 rpm pendant 2 min. Le culot est séché à température ambiante pendant 3 heures. Le culot séché est suspendu dans un volume de 70µl de TE est conservé à -20°C jusqu'à la PCR.

#### IV. Détermination du statut mutationnel du gène IDH 2

Le statut mutationnel de l'IDH2 est déterminé en utilisant la technique de séquençage de Sanger, après amplification des séquences couvrant les mutations par PCR.

##### 1- Amplification du gène IDH2 par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) :

###### - Technique PCR :

La réaction PCR est une technique qui vise à amplifier un fragment d'ADN précis, la réaction se déroule en trois phases : la dénaturation d'ADN, l'hybridation des séquences d'amorces avec les deux extrémités des brins d'ADN dénaturé et puis l'élongation qui permet la synthèse des brins d'ADN complémentaires aux brins matrices grâce à une ADN polymérase, l'ensemble de ces étapes constitue un cycle de PCR qui pourra se faire jusqu'à 40 cycle.

La réaction PCR nécessite tout d'abord l'ADN génomique, un pair d'amorces oligonucléotidiques, des désoxyribonucléotides triphosphate libre (dNTP), une ADN polymérase, un tampon pour maintenir un pH idéal pour l'ADN polymérase.

Des fragments d'ADN de l'exon 4 du gène incluant le codon 140 et 172 de l'IDH2, ont été amplifiés en utilisant des séquences d'amorces illustrées dans le tableau 4.

**Tableau 4 : Séquence de l'amorce utilisée pour la réaction PCR de l'IDH2 :**

Gène	Exon	Amorces		Amplicon (pb)	Référence
IDH2	4	F	5'AATTTTAGGACCCCCGTCTG3'	345	Marcucci et al., 2010
		R	5'CTGCAGAGACAAGAGGATGG3'		

Les amorces se situent entre 18630 et 18974 (Figure 9) (à partir de la séquence de référence [NG\\_023302.1](#)) délimitant un fragment d'ADN de 345 pb.

```

18601 ctctagactc tactgccttc ctcatgaaga attttaggac ccccgctctgg ctgtgttgtt
18661 gcttgggggtt caaattctgg ttgaaagatg gcggctgcag tgggaccact attatctctg
18721 tcctcacaga gttcaagctg aagaagatgt ggaaaagtcc caatggaact atccggaaca
18781 tcctggggggg gactgtcttc cgggagccca tcatctgcaa aaacatccca cgctagtcc
18841 ctggctggac caagcccatc accattggca ggcacgcccc tggcgaccag gtaggccagg
18901 gtggagaggg gatccactga cctgggcacc ccccgactgg agctcctcgc ctagccatcc
18961 tcttgtctct gcagtacaag gccacagact ttgtggcaga ccgggcccgc actttcaaaa
    
```

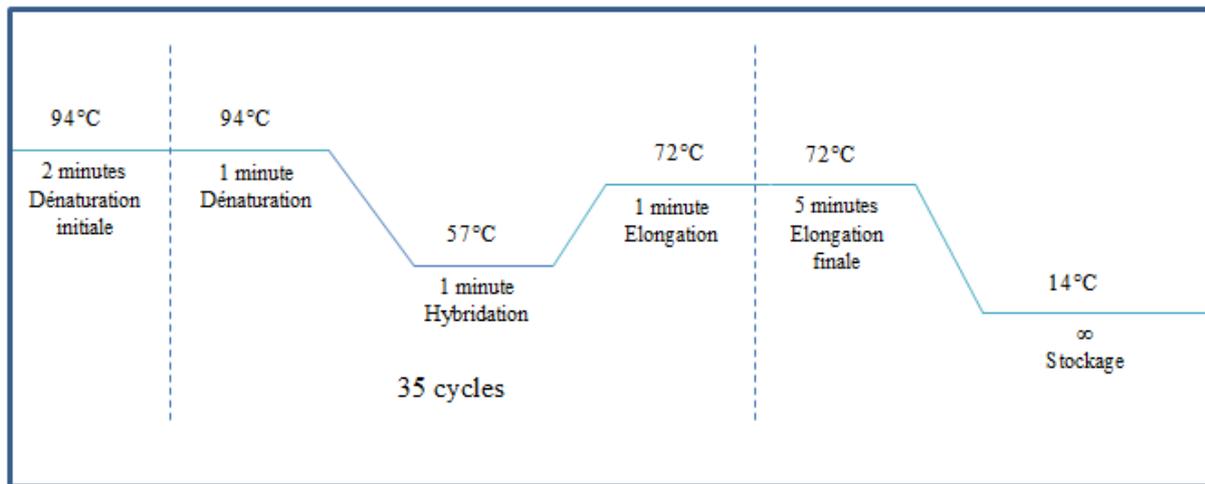
**Figure 9 : Position de l'amorce sur le gène IDH2**

Les conditions de PCR ont été adoptés en suivant le protocole élaboré par Marcucci (Marcucci *et al.*, 2010)

**Tableau 5 : Volumes et concentrations des réactifs utilisés pour la PCR :**

Les réactifs	Volume en µl/tube	Concentration
Dream Taq Buffer	2,5	25µM
dNTP	1	40mM
Amorce F	1	100 µM
Amorce R	1	100 µM
Dream Taq polymérase	0,125	5U/µl
ADN	5	-----
H <sub>2</sub> O	14,375	-----
Volume final	25	-----

La PCR est réalisée dans un volume réactionnel de 25µl contenant 5µl d'ADN (Tableau 5), le mélange réactionnel est préparé sous une hotte stérilisée par les UV, et afin d'éviter une éventuelle contamination des produits, l'addition de l'ADN est effectuée dans une salle séparée de la hotte. Ensuite, la PCR est effectuée dans un thermocycleur suivant les conditions illustrées dans les figures 10 :



**Figure 10 : Programme d'amplification de l'IDH 2 par PCR**

## 2- Electrophorèse

Après la réaction de PCR, et dans le but de déterminer s'il y'a eu une amplification ou non des gènes étudiés, une électrophorèse des produits de PCR est réalisée selon la procédure suivante :

### a. préparation des gels

1,5 g d'agar est ajouté à 100 ml de TBE 1X, le mélange est porté à ébullition pendant 3 min afin de solubiliser l'agarose, puis 2,5 µl de bromure d'éthidium sont ajoutés. Le mélange est coulé dans les portoirs des gels puis laissé jusqu'à solidification. Après, les gels sont conservés dans le TBE jusqu'à une éventuelle utilisation.

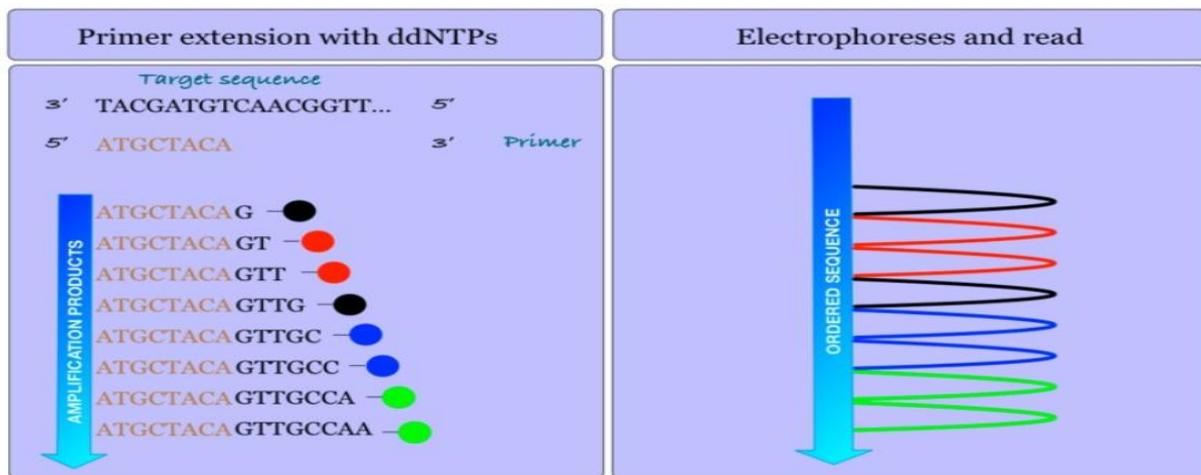
### b. migration

Le gel est mis dans la cuve d'électrophorèse remplie de tampon de migration (TBE à 1X), puis un volume de 9 µl de chaque produit de PCR additionné de 3 µl de bleu de bromophénol est placé au niveau des puits. Un témoin négatif est réalisé pour s'assurer de l'absence de contamination et un marqueur de poids moléculaire est également déposé dans le dernier

puits. La migration est réalisée à 100 V et à 50 mA pendant 90 min. Les fragments d'ADN amplifiés ont été visualisés sous lumière UV à l'aide de l'appareil *Fisher BioblocScientific*.

### 3- Séquençage

La technique de séquençage utilisée dans cette étude est celle inventée par Frederick Sanger en 1977, dont l'ADN amplifié est dénaturé par la chaleur puis, une amorce est hybridée à l'extrémité 5' de l'ADN matrice (Estrada-Rivadeneira, 2017). Le tube contient l'ADN polymérase, les quatre dNTP et des terminateurs ddNTPs marqués par des fluorochromes spécifiques (chaque nucléotide des ddNTPs est marqué par un fluorophore différent), l'ADN polymérase incorpore les dNTPs à la matrice d'ADN amorcée, et une fois un ddNTP est introduit, la polymérisation s'arrête à cause de l'absence du groupement hydroxyle sur le troisième carbone de la ribose des ddNTPs, cela se traduit par la formation des fragments d'ADN fluorescents de différentes longueurs, qui émettent un signal révélant le dernier nucléotide inséré (T, C, G ou A) (Garrido-Cardenas et al., 2017). Après l'amplification des produits, les brins néosynthétisés sont ainsi séparés par une électrophorèse qui se base sur la migration dans les capillaires du séquenceur automatique, la détection se fait in situ grâce à un faisceau laser qui excite le fluorochrome des ddNTP, (Poulain, 2016), chaque fragment est identifié par le fluorophore attaché au ddNTP qu'il porte (Figure 11).



**Figure 11 : La méthode de séquençage didésoxy de Sanger** (Garrido-Cardenas et al., 2017)

La technique du séquençage étant utilisée afin de détecter les mutations R140 et R172 au niveau du gène IDH2.

### 3.1. Purification des produits de PCR

Avant de séquencer les produits de PCR, il faudra les purifier afin d'éliminer l'excès d'amorces, des dNTPs et d'ADN polymérase non utilisés pendant la réaction de l'amplification. Pour ce faire, 1 µl de l'enzyme ExoSAP-IT est ajouté à 4 µl de produit de PCR, après homogénéisation, les tubes sont incubés dans un thermocycleur selon le programme suivant :

- 5 minutes à 37°C pour l'activation de l'enzyme
- 1 minute à 80°C pour l'inactivation de l'ExoSAP

### 3.2. Réaction de séquence par le kit BigDye® Terminator v 3.1

Après la purification, la réaction de séquence est réalisée en utilisant le kit BigDye® Terminator v 3.1 qui contient tous les réactifs indispensables au séquençage, la réaction est effectuée selon le protocole suivant (Tableau 6).

**Tableau 6 : Les volumes des réactifs de la réaction de séquence**

Réactifs	Volumes (µl)
Eau distillée stérile	4 µl
Amorce sens	1 µl
BigDye	1 µl
Produit de PCR purifié	4 µl

La réaction de séquence est réalisée dans un volume de 10 µl, le mélange réactionnel est incubé dans un thermocycleur réglé sur le programme suivant :

**Tableau 7 : Programme de la réaction de séquence :**

	Température	Durée
Dénaturation	96°C	10 secs
Hybridation	50°C	5 secs
Elongation	60°C	3 min
Nbre de cycles	25 cycles	

### ***3.3. Purification des produits de séquençage par Le kit BigDye® Xterminator™***

Cette étape permet d'éliminer les amorces, les dNTPs non incorporés, les sels et autres molécules chargées qui pourraient interférer au cours de la détection des bases par l'électrophorèse capillaire. Le kit contient un tampon « *SAM Solution* » et le « *X Terminator Solution* » (billes pour capter les impuretés). Un mix contenant 45 µl du SAM et 10 µl de X terminateur est ajoutés à chaque tube. Ensuite les tubes sont agités à une vitesse de 2200 rpm pendant 30 minutes afin que les billes se sédimentent. Après agitation les tubes sont centrifugés et un volume de 10µl de surnageant est déposé sur les puits de la plaque du séquenceur (séquenceur à 8 capillaires AppliedBiosystem).

La plaque est placée dans le séquenceur automatique, un flux électrique émis par ce dernier entraine la migration des fragments d'ADN à travers les capillaires du séquenceur. Les séquences d'ADN sont déterminées par le logiciel d'analyse des séquences.

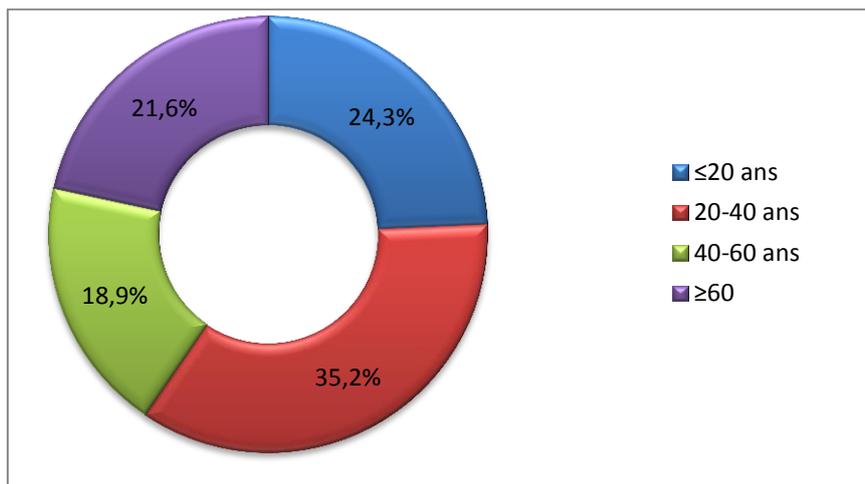
Les séquences étaient ensuite analysées et comparées avec la séquence d'ADNc de l'IDH 2 sauvage (GenBank: [NG\\_023302.1](#)).

# Résultats

## I. Données cliniques et anatomopathologiques de la population étudiée :

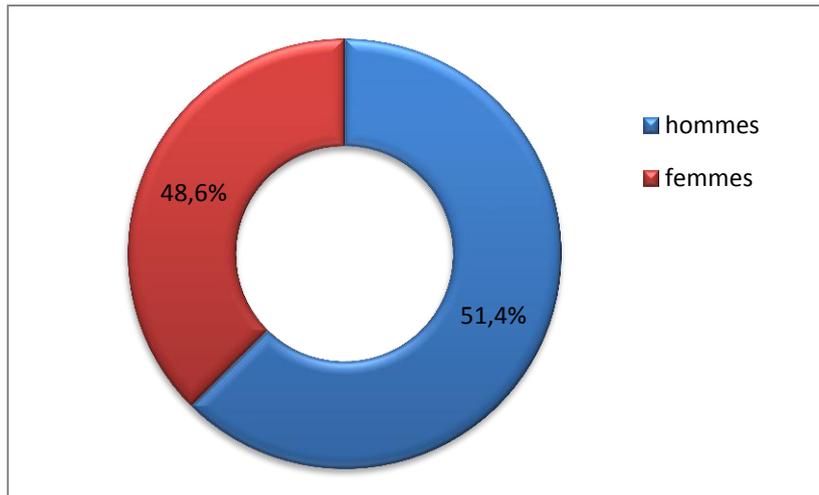
### 1. Résultats cliniques :

Dans cette étude, 37 patients ont été recueillis au niveau du service de neurochirurgie de CHU de Fès durant la période allant de 2016 à 2018, Les biopsies ont été pris au hasard à partir des échantillons présents au labo. 28 patients sont diagnostiqués pour une suspicion de gliomes, et 9 patients présentent seulement des kystes, ces derniers sont considérés comme des témoins. Leur âge varie entre 8 et 81 ans avec une moyenne d'âge de 39,7 ans. La répartition des patients en fonction de l'âge est illustrée sur la figure 12.



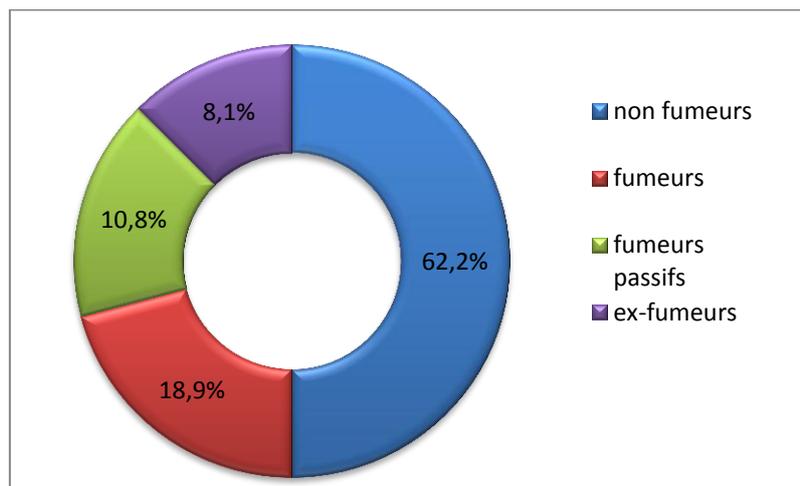
**Figure 12 : Répartition des patients selon l'âge**

51,4% des patients sont de sexe masculin, et 48,6% sont de sexe féminin (Figure 13) avec un sexe ratio H/F de 1,05.



**Figure 13 : Répartition des patients selon le sexe**

L'analyse du profil de tabagisme de la population étudiée, montre que 62,2% des patients sont des non-fumeurs et 18,9% sont des fumeurs. 10,8% sont des fumeurs passifs et 8,1% sont des ex-fumeurs (Figure 14).

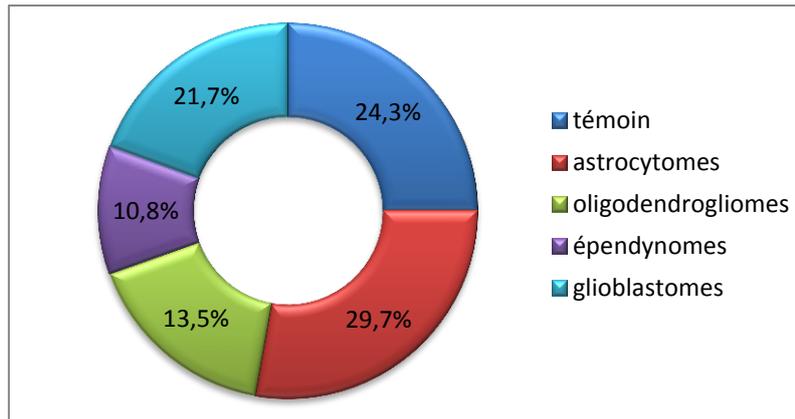


**Figure 14 : Répartition des patients selon le tabagisme**

## 2. Résultats anatomopathologiques :

### 2-1 Répartition selon le type tumoral

D'après l'OMS, les gliomes sont classés selon le type histologique. La répartition de la population étudiée selon le type tumoral, montre qu'il y a une prédominance des astrocytomes avec un pourcentage de 29,7% suivie des glioblastomes (21,7%), des oligodendrogliomes (13,5%) et enfin des épendynomes (10,8%). 24,3% représentent les témoins (Figure 15).

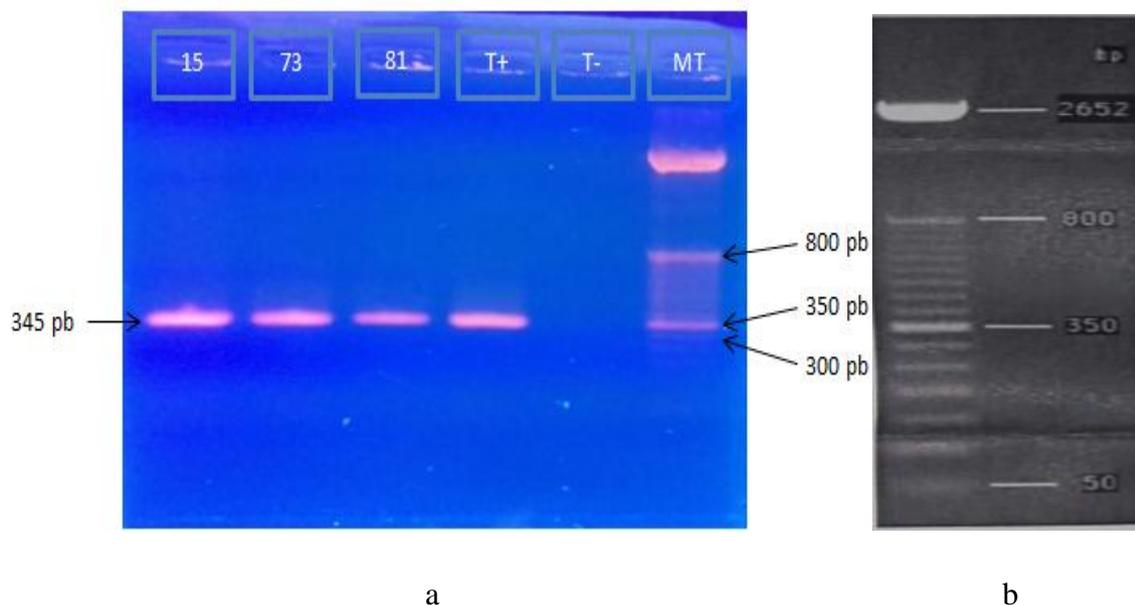


**Figure 15 : Répartition des patients selon le type tumoral**

## II. Résultats de l'analyse mutationnelle

### 1. Résultats de l'amplification de l'exon 4 du gène IDH2 par PCR :

Le résultat de l'électrophorèse des produits de PCR, a montré que tous les prélèvements collectés sont positifs pour le gène IDH2. Un exemple des résultats de la migration de quelques produits de PCR est illustré sur la figure 16.



**Figure 16 : a : Résultats de l'électrophorèse des produits PCR de l'exon 4 du gène IDH2, b : Profil électrophorétique du marqueur de taille utilisé (50 pb)**

La figure montre que les produits sont de bonne qualité et présentent la taille recherchée (345 pb) de l'exon 4 de l'IDH2.

## 2. Résultats du séquençage

A l'issue de la réaction de séquençage de l'exon 4 de l'IDH2, l'analyse des résultats était réalisée par le logiciel "*Dna Baser*". Les séquences sous forme FASTA ont été alignées sur "*BioEdit*" avec la séquence de référence [NG\\_023302.1](#) issue de la base de donnée NCBI (Figure 17).

Download ▾ GenBank Graphics				
Homo sapiens isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 2, mitochondrial (IDH2), RefSeqGene (LRG_611) on chromosome 15				
Sequence ID: <a href="#">NG_023302.1</a> Length: 25499 Number of Matches: 1				
Range 1: 18694 to 18974 GenBank Graphics				
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
520 bits(281)	5e-146	281/281(100%)	0/281(0%)	Plus/Plus
Query 16	GCTGCAGTGGGACCACTATTATCTGTCTCCTCACAGAGTTCAAGCTGAAGAAGATGTGGA			75
Sbjct 18694	GCTGCAGTGGGACCACTATTATCTGTCTCCTCACAGAGTTCAAGCTGAAGAAGATGTGGA			18753
Query 76	AAAGTCCCAATGGAACATATCCGGAAACATCCT <del>g</del> <del>g</del> <del>g</del> <del>g</del> <del>g</del> <del>g</del> ACTGTCTTCCGGGAGCCCATCA			135
Sbjct 18754	AAAGTCCCAATGGAACATATCCGGAAACATCCTGGGGGGACTGTCTTCCGGGAGCCCATCA			18813
Query 136	TCTGCAAAAACATCCCACGCCTAGTCCCTGGCTGGACCAAGCCCATCACCATTGGCAGGC			195
Sbjct 18814	TCTGCAAAAACATCCCACGCCTAGTCCCTGGCTGGACCAAGCCCATCACCATTGGCAGGC			18873
Query 196	ACGCCCATGGCGACCAAGGTAGGCCAGGGTGGAGAGGGGATCCAAGTACCTGGGCACCCCC			255
Sbjct 18874	ACGCCCATGGCGACCAAGGTAGGCCAGGGTGGAGAGGGGATCCAAGTACCTGGGCACCCCC			18933
Query 256	CGACTGGAGCTCCTCGCCTAGCCATCCTCTTGTCTCTGCAG		296	
Sbjct 18934	CGACTGGAGCTCCTCGCCTAGCCATCCTCTTGTCTCTGCAG		18974	

**Figure 17 : Résultat du BLAST d'une séquence d'IDH2 exon 4**

La visualisation des électrophorégrammes par le logiciel "*Dna Baser*" des séquences obtenues permet d'évaluer la qualité des séquences et d'analyser le statut mutationnel IDH2. Sur les 37 échantillons séquencés, seulement 31 ont donné des résultats exploitables (pour les 6 autres échantillons (5 appartiennent à des patients atteints de gliome et 1 seul cas témoin), il y a eu un mélange de séquences). Il s'agit probablement d'un problème qui a survécu lors de la réaction de séquence puisque pour l'amplification par PCR, tous les échantillons ont montré un résultat idéal lors de l'électrophorèse.

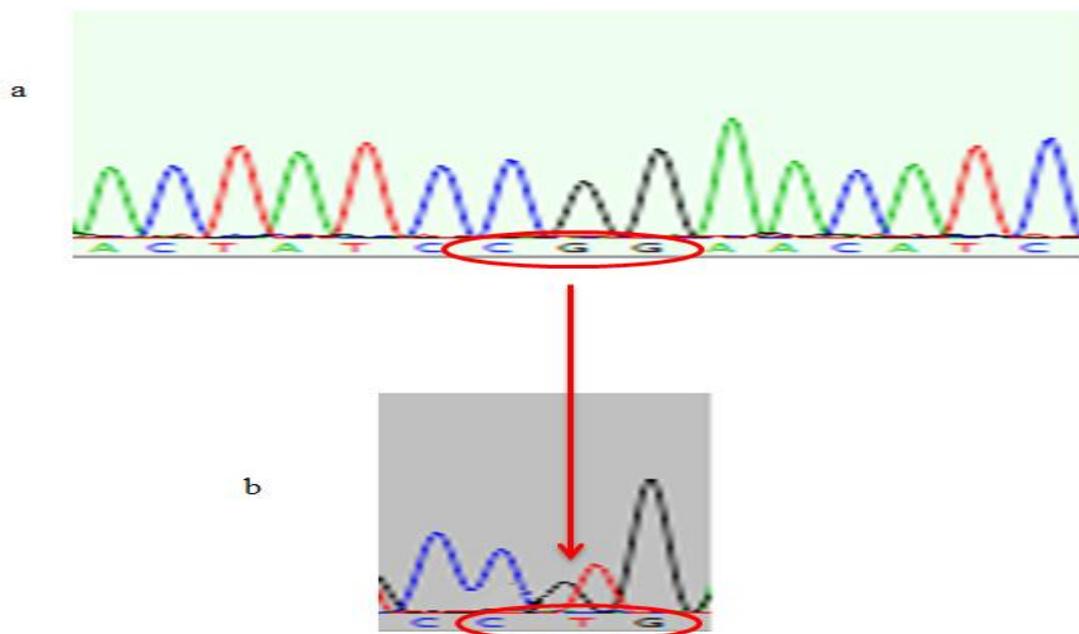
L'alignement des séquences avec la séquence de référence sur le logiciel "*BioEdit*", a montré que sur les 31 séquences obtenues, deux séquences présentent des mutations.

- Une des séquences mutées présente une mutation sur le nucléotide à la position 419 (G) qui est substitué par un T. Le résultat est montré sur la figure 18.

Codon	139	140	141
	.....		.....
		418	
RefSeq(IDH2)	CTAT	CGG	AAC
		↓	
35	CTAT	CTG	AAC

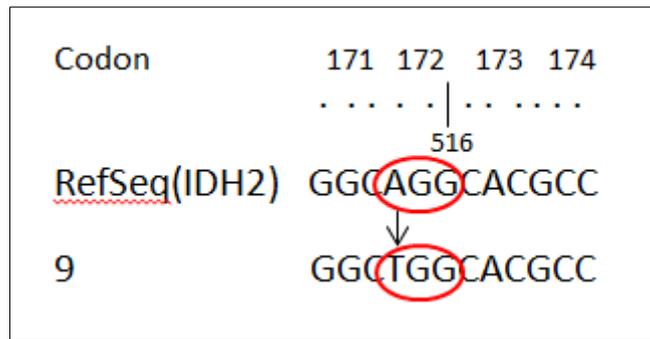
**Figure 18 : Résultat de l'alignement de la séquence 35 avec la séquence de référence sur "BioEdit"**

La substitution du G par un T sur la position 419 induit le remplacement de l'arginine (codon CGG) par la leucine (codon CTG). Il s'agit bien de la mutation R 140 L. La figure 19 montre une partie de l'électrophorégramme de la séquence sauvage sans mutation (a) et une partie de la séquence qui présente la mutation hétérozygote (b).



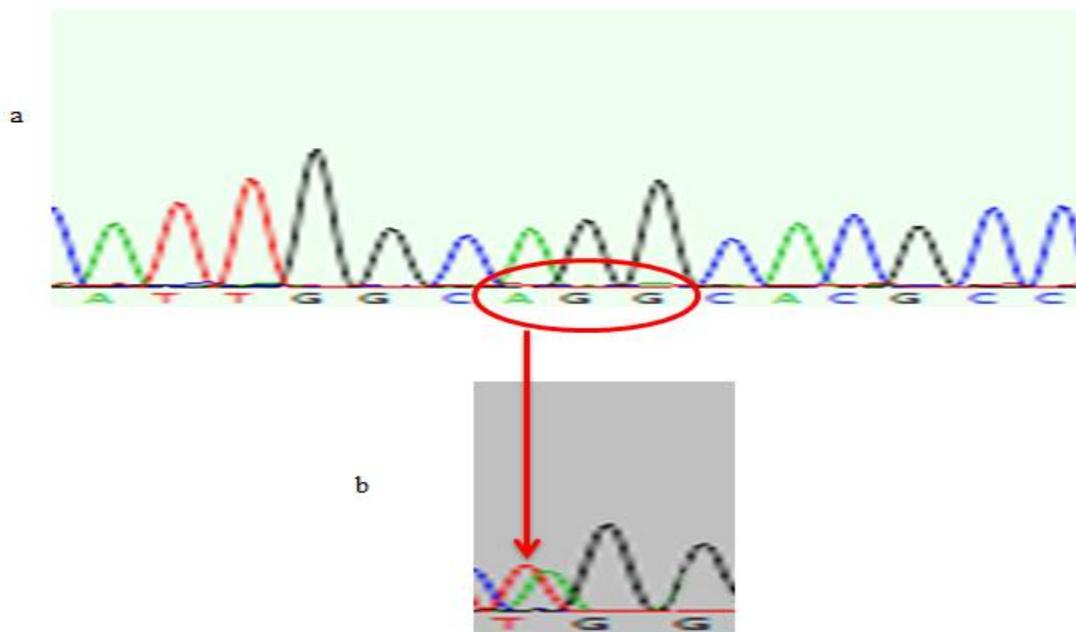
**Figure 19 : Partie de l'électrophorégramme de l'exon 4 de l'IDH 2 montrant le codon R140 (a : absence de mutation ; b : présence de la mutation hétérozygote 419G>T)**

- L'autre séquence présente une mutation sur le nucléotide 514 (A) qui est substitué par un T. Le résultat est montré sur la figure 20.



**Figure 20 : Résultat de l'alignement de la séquence 9 avec la séquence de référence sur "BioEdit"**

La mutation affecte le nucléotide A à la position 514 qui est substitué par T, entraînant le changement de l'acide aminé (AGG (arginine) → TGG (tryptophane)). Il s'agit de la mutation R172W. La partie de l'électrophorégramme montrant la mutation est illustrée sur la figure 21.



**Figure 21 : Partie de l'électrophorégramme de l'exon 4 de l'IDH 2 montrant le codon R172 (a : absence de mutation ; b : présence de la mutation hétérozygote 514 A>G)**

L'analyse mutationnelle de l'exon 4 du gène IDH2 a révélé la présence des mutations IDH 2 chez 8,6% des patients (soit 2 patients) atteints des gliomes. Aucune mutation n'a été détectée chez les témoins. 50% des mutations causent l'altération de la séquence d'acides aminés de l'IDH2 sur le codon R140 et 50% sur le codon R172.

Les deux mutations ont été détectées chez des patients de jeune âge (14 et 33 ans), tous atteints des glioblastomes.

# Discussion

---

Les gliomes constituent une menace considérable pour la santé humaine dans le monde entier et dans le Maroc, le pronostic des patients atteints des gliomes malins de haut grade reste de qualité médiocre. Etant donné que les mutations IDH sont généralement considérées comme un facteur pronostic pour les gliomes (Arita et al., 2015), l'évaluation de ces dernières permet de détecter les tumeurs associées soit à une IDH sauvage ou mutée. De cette manière, elles peuvent être utilisées comme marqueur pronostique dans le futur (Ricaurte et al., 2018). La détection de ces mutations dans les gliomes est d'une grande importance, afin d'améliorer le pronostic et la prise en charge de la maladie.

L'étude des caractéristiques cliniques de la population étudiée montre que les gliomes sont plus fréquents chez le sexe masculin, ce résultat est en accord avec la littérature qui montre que les gliomes sont plus fréquents chez le sexe masculin que chez le sexe féminin (Ostrom et al., 2018). Ce résultat peut être lié au milieu professionnel. En fait, des études ont montré une élévation de risque de gliomes dans certains secteurs d'activité comme l'agriculture (exposition aux pesticides), l'industrie du caoutchouc et du plastique, l'industrie textile, les activités de plomberie, les transports et autres activités exposant aux dérivés du pétrole (Zheng et al., 2001). Pour les habitudes toxiques, il apparaît qu'il n'y a pas de relation directe entre le tabagisme et le risque de développer des gliomes, puisque plus de 62% de la population étudiée sont des non-fumeurs. Ce résultat est en accord avec celui de Shao et ses coll. (2016), qui montrent que le tabagisme n'est pas associé de manière significative au risque des gliomes.

Dans notre étude, la présence des mutations qui affectent l'acide aminé 140 et 172 de l'IDH2 ont été bien identifiées. Il s'agit des mutations R140L et R172W. Ces mutations ont été détectées chez 8,6% des cas de gliomes. Cette fréquence de mutations est plus élevée par rapport à celle trouvée par d'autres études. En 2009, Yan et ses collaborateurs ainsi que Hartmann et ses coll. ont trouvé que la mutation IDH2 a été détectée dans 3% des tumeurs gliales. Koh et coll. en 2015 ont déclaré que les mutations IDH2 ont été identifiées dans 5,2% des cas de gliomes. Une étude plus récente en 2018 a signalé que ces mutations IDH2 sont détectées dans 6,06% des cas atteints de gliomes (Deng et al., 2018).

Les mutations détectées présentent une corrélation avec l'âge des patients, puisque toutes les mutations ont été détectées chez les patients de jeune âge (14 et 33 ans). Ce résultats est en accord avec d' autres études qui déclarent que les mutations de l'IDH sont souvent liées avec un âge plus jeune des patients (Gupta et al., 2013). Une autre étude a montré que les patients atteints des gliomes et qui présentent la mutation IDH sont toujours plus jeunes que les patients qui ne présentent pas de mutation (Hartmann et al., 2009).

L'IDH est une enzyme responsable de la conversion de l'isocitrate en  $\alpha$ -KG avec production de NADPH. Ces enzymes jouent un rôle primordial dans la protection des cellules contre le stress oxydatif (Arita et al., 2015).

Toutes les mutations détectées sont des mutations hétérozygotes faux sens, induisant des altérations de la séquence d'acides aminés de la protéine. Ceci entraîne la formation d'une protéine tronquée donc une enzyme défectueuse. En plus, 50% des mutations se produisent sur un résidu arginine du site actif de l'enzyme, hautement conservé, entraînant la perte de la capacité de la protéine à se lier à l'isocitrate et supprime son activité catalytique normale et l'acquisition d'une nouvelle activité néomorphique qui convertit l' $\alpha$ -KG en D2HG (Cohen et al., 2013). Ce nouveau produit est considéré comme un oncométabolite impliqué dans le processus de tumorigenèse puisqu'il inhibe des enzymes impliquées dans la régulation épigénétique (Moura et al., 2016). Plusieurs études ont montré que les mutations IDH sont des évènements précoces de la tumorigenèse (Lass et al., 2012) et lorsqu'elles sont examinées dans un gliome de haut grade, ces mutations suggèrent une transformation tumorale maligne (Moura et al., 2016). Ainsi, la détection de ces mutations dans les gliomes pourrait avoir une valeur prédictive dans le diagnostic de ces derniers. Ces mutations sont considérées comme des bio- marqueurs pronostiques positifs. Dans ce sens, une étude a montré que les patients atteints des gliomes avec des mutations IDH ont une survie plus longue et une meilleure réponse au traitement (Gupta et al., 2013).

La présente étude est préliminaire. Cependant, des études à échelle plus grande avec un échantillon de plus grande taille sont nécessaires pour valider avec précision les résultats obtenus.

# Conclusion et perspectives

---

En conclusion, dans la présente étude, La répartition des malades selon le sexe montre que les hommes sont les plus touchés avec un sexe ratio H/F de 1.05. Aucune corrélation n'a été trouvée entre le tabagisme et le risque des gliomes. Pour l'étude moléculaire, une fréquence de mutations dans l'IDH2 de 8,6% a été rapportée dans une série de 23 gliomes de patients marocains et qui est plus élevée à celle trouvée dans la bibliographie. Les études ont montré que ces mutations ont un rôle important en tant que facteur pronostique, en plus elles peuvent être prédictives de la réponse à la chimiothérapie. Donc, l'intégration du test de statut IDH en routine pour le diagnostic des gliomes devient de plus en plus important afin d'améliorer la prise en charge des patients.

Le ciblage de l'IDH mutant par le développement d'inhibiteurs est une approche thérapeutique en pleine émergence (Sharma, 2018), cependant cette alternative reste encore limitée à cause du manque de connaissances suffisantes sur la biologie des IDH mutants. Des recherches complémentaires sont nécessaires dans le but de clarifier l'impact précis de ces mutations sur les gliomes.

# Références bibliographiques

---

- Alfonso, J.C.L., Talkenberger, K., Seifert, M., Klink, B., Hawkins-Daarud, A., Swanson, K.R., Hatzikirou, H., Deutsch, A., 2017. The biology and mathematical modelling of glioma invasion: a review. *J R Soc Interface.* 14, 1–20. <https://doi.org/10.1098/rsif.2017.0490>
- Allen, N.J., Lyons, D.A., 2018. Glia as architects of central nervous system formation and function. *Science.* 362, 181–185. <https://doi.org/10.1126/science.aat0473>
- Arita, H., Narita, Y., Yoshida, A., Hashimoto, N., Yoshimine, T., Ichimura, K., 2015. IDH1/2 mutation detection in gliomas. *Brain Tumor Pathol.* 32, 79–89. <https://doi.org/10.1007/s10014-014-0197-x>
- Baan, R., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Islami, F., Galichet, L., Straif, K., 2011. Carcinogenicity of radiofrequency electromagnetic fields. *Lancet Oncol.* 12, 624–626. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70147-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70147-4)
- Brat, D., G.W. Verhaak, R., Aldape, K., Yung, W., R. Salama, S., Cooper, L., Rheinbay, E., Miller, M., PhD, C. Ryan, Vitucci, M., Morozova, O., Robertson, G., Noushmehr, H., Laird, P., Cherniack, A., Akbani, R., Huse, J., Ciriello, G., Poisson, L., S. Barnholtz Sloan, J., Zhang, J., 2015. Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *N Engl J Med.* 372, 2481–2498. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1402121>
- Brouland, J. P., Hottinger, A. F., 2017. Nouvelle classification OMS 2016 des gliomes : quels changements ?. *Rev Med Suisse.* 13, 1805-1809.
- Catteau, A., Girardi, H., Monville, F., Poggionovo, C., Carpentier, S., Frayssinet, V., Voss, J., Jenkins, R., Boisselier, B., Mokhtari, K., Sanson, M., Peyro-Saint-Paul, H., Giannini, C., 2014. A new sensitive PCR assay for one-step detection of 12 IDH1/2 mutations in glioma. *Acta Neuropathol Commun.* 2, 58. <https://doi.org/10.1186/2051-5960-2-58>
- Chen, R., Smith-Cohn, M., Cohen, A.L., Colman, H., 2017. Glioma Subclassifications and Their Clinical Significance. *Neurotherapeutics.* 14, 284–297. <https://doi.org/10.1007/s13311-017-0519-x>

- Cohen, A.L., Colman, H., 2015. Glioma biology and molecular markers. *Cancer Treat. Res.* 163, 15–30. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-12048-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-12048-5_2)
- Cohen, A.L., Holmen, S.L., Colman, H., 2013. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 13, 345. <https://doi.org/10.1007/s11910-013-0345-4>
- Colonna, M., Butovsky, O., 2017. Microglia function in the central nervous system during health and neurodegeneration. *Annu Rev Immunol.* 35, 441–468. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052358>
- Coureau, G., Bouvier, G., Lebailly, P., Fabbro-Peray, P., Gruber, A., Leffondre, K., Guillamo, J.-S., Loiseau, H., Mathoulin-Pélissier, S., Salamon, R., Baldi, I., 2014. Mobile phone use and brain tumours in the CERENAT case-control study. *Occup Environ Med.* 71, 514–522. <https://doi.org/10.1136/oemed-2013-101754>
- Dang, L., Su, S.-S.M., 2017. Isocitrate Dehydrogenase Mutation and (R)-2-Hydroxyglutarate: From Basic Discovery to Therapeutics Development. *Annu Rev Biochem.* 86, 305–331. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044732>
- Dang, L., White, D.W., Gross, S., Bennett, B.D., Bittinger, M.A., Driggers, E.M., Fantin, V.R., Jang, H.G., Jin, S., Keenan, M.C., Marks, K.M., Prins, R.M., Ward, P.S., Yen, K.E., Liao, L.M., Rabinowitz, J.D., Cantley, L.C., Thompson, C.B., Vander Heiden, M.G., Su, S.M., 2009. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature.* 462, 739–744. <https://doi.org/10.1038/nature08617>
- Dang, L., Yen, K., Attar, E.C., 2016. IDH mutations in cancer and progress toward development of targeted therapeutics. *Ann Oncol* 27, 599–608. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw013>
- Davis, M.E., 2018. Epidemiology and Overview of Gliomas. *Semin Oncol Nurs.* 34, 420–429. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2018.10.001>
- Deng, L., Xiong, P., Luo, Y., Bu, X., Qian, S., Zhong, W., Lv, S., 2018. Association between IDH1/2 mutations and brain glioma grade. *Oncol Lett.* 16, 5405–5409. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9317>
- Dinuzzo, M., Mangia, S., Maraviglia, B., Giove, F., 2012. The role of astrocytic glycogen in supporting the energetics of neuronal activity. *Neurochem Res.* 37, 2432–2438. <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0802-5>
- Ducray, F., 2008. Biologie des gliomes cérébraux. *Cancer. Radiother; 19e Congrès national de la Société Française de Radiothérapie Oncologique* 12, 663–668. <https://doi.org/10.1016/j.canrad.2008.09.001>

- Eckel-Passow, J.E., Lachance, D.H., Molinaro, A.M., Walsh, K.M., Decker, P.A., Sicotte, H., Pekmezci, M., Rice, T., Kosel, M.L., Smirnov, I.V., Sarkar, G., Caron, A.A., Kollmeyer, T.M., Praska, C.E., Chada, A.R., Halder, C., Hansen, H.M., McCoy, L.S., Bracci, P.M., Marshall, R., Zheng, S., Reis, G.F., Pico, A.R., O'Neill, B.P., Buckner, J.C., Giannini, C., Huse, J.T., Perry, A., Tihan, T., Berger, M.S., Chang, S.M., Prados, M.D., Wiemels, J., Wiencke, J.K., Wrensch, M.R., Jenkins, R.B., 2015. Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors. *N Engl J Med.* 372, 2499–2508. <https://doi.org/10.1056/NEJMoA1407279>
- El Khadir, M., Alaoui Boukhris, S., Benajah, D.-A., Ibrahim, S.A., Chbani, L., Bouguenouch, L., El Rhazi, K., El Abkari, M., Nejjari, C., Mahmoud, M., Bennani, B., 2018. Helicobacter pylori CagA EPIYA-C motifs and gastric diseases in Moroccan patients. *Infect Genet Evol.* 66, 120–129. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.09.015>
- Estrada-Rivadeneira, D., 2017. Sanger sequencing. *FEBS J.* 284, 4174. <https://doi.org/10.1111/febs.14319>
- Fallahi, P., Foddis, R., Cristaudo, A., Antonelli, A., 2017. High risk of brain tumors in farmers: a mini-review of the literature, and report of the results of a case control study. *Clin Ter.* 168, e290–e292. <https://doi.org/10.7417/T.2017.2022>
- Farley, A., McLafferty, E., Johnstone, C., Hendry, C., 2014. Nervous system: part 3. *Nurs Stand.* 28, 46–50. <https://doi.org/10.7748/ns2014.04.28.33.46.e8187>
- Figarella-Branger, D., Colin, C., Coulibaly, B., Quilichini, B., Maues De Paula, A., Fernandez, C., Bouvier, C., 2008. Histological and molecular classification of gliomas. *Rev Neurol.* 164, 505–515. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2008.03.011>
- Frost, J.L., Schafer, D.P., 2016. Microglia: Architects of the Developing Nervous System. *Trends Cell Biol.* 26, 587–597. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.02.006>
- Garrido-Cardenas, J.A., Garcia-Maroto, F., Alvarez-Bermejo, J.A., Manzano-Agugliaro, F., 2017. DNA Sequencing Sensors: An Overview. *Sensors.* 17, 588. <https://doi.org/10.3390/s17030588>
- Gupta, R., Flanagan, S., Li, C.C.Y., Lee, M., Shivalingham, B., Maleki, S., Wheeler, H.R., Buckland, M.E., 2013. Expanding the spectrum of IDH1 mutations in gliomas. *Mod. Pathol.* 26, 619–625. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2012.210>
- Guyton, C., 1989. Anatomie et physiologie du système nerveux. *Vigot*, Paris.
- Hartmann, C., Meyer, J., Balss, J., Capper, D., Mueller, W., Christians, A., Felsberg, J., Wolter, M., Mawrin, C., Wick, W., Weller, M., Herold-Mende, C., Unterberg, A.,

- Jeuken, J.W.M., Wesseling, P., Reifenberger, G., von Deimling, A., 2009. Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta Neuropathol.* 118, 469–474. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0561-9>
- Huret, J.L., Dessen, P., 2017. IDH2 (isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+) mitochondrial). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* 18.
  - Jessen, K.R., 2004. Glial cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 36, 1861–1867. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.02.023>
  - Jürg, H., 2009. Les tumeurs cérébrales du système nerveux central. *Ligue suisse contre le cancer.* Berne.
  - Kabba, J.A., Xu, Y., Christian, H., Ruan, W., Chenai, K., Xiang, Y., Zhang, L., Saavedra, J.M., Pang, T., 2018. Microglia: Housekeeper of the Central Nervous System. *Cell Mol Neurobiol.* 38, 53–71. <https://doi.org/10.1007/s10571-017-0504-2>
  - Kaminska, B., Czapski, B., Guzik, R., Król, S.K., Gielniewski, B., 2019. Consequences of IDH1/2 Mutations in Gliomas and an Assessment of Inhibitors Targeting Mutated IDH Proteins. *Molecules.* 24. <https://doi.org/10.3390/molecules24050968>
  - Koh, J., Cho, H., Kim, H., Kim, S.I., Yun, S., Park, C.-K., Lee, S.-H., Choi, S.H., Park, S.-H., 2015. IDH2 mutation in gliomas including novel mutation. *Neuropathology* 35, 236–244. <https://doi.org/10.1111/neup.12187>
  - Kovacs, G.G., 2017. Cellular reactions of the central nervous system. *Handb Clin Neurol.* 145, 13–23. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802395-2.00003-1>
  - Lapointe, S., Perry, A., Butowski, N.A., 2018. Primary brain tumours in adults. *Lancet.* 392, 432–446. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30990-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30990-5)
  - Lass, U., Nümann, A., von Eckardstein, K., Kiwit, J., Stockhammer, F., Horaczek, J.A., Veelken, J., Herold-Mende, C., Jeuken, J., von Deimling, A., Mueller, W., 2012. Clonal analysis in recurrent astrocytic, oligoastrocytic and oligodendroglial tumors implicates IDH1- mutation as common tumor initiating event. *PLoS ONE* 7, e41298. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041298>
  - Lenting, K., Verhaak, R., Ter Laan, M., Wesseling, P., Leenders, W., 2017. Glioma: experimental models and reality. *Acta Neuropathol.* 133, 263–282. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1671-4>
  - Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Kleihues, P., Ellison, D.W., 2016. The 2016

World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 131, 803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>

- Ludwig, K., Kornblum, H.I., 2017. Molecular markers in glioma. *J Neurooncol.* 134, 505–512. <https://doi.org/10.1007/s11060-017-2379-y>
- Marcucci, G., Maharry, K., Wu, Y.-Z., Radmacher, M.D., Mrózek, K., Margeson, D., Holland, K.B., Whitman, S.P., Becker, H., Schwind, S., Metzeler, K.H., Powell, B.L., Carter, T.H., Kolitz, J.E., Wetzler, M., Carroll, A.J., Baer, M.R., Caligiuri, M.A., Larson, R.A., Bloomfield, C.D., 2010. IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol.* 28, 2348–2355. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.27.3730>
- McNeill, K.A., 2016. Epidemiology of Brain Tumors. *Neurol Clin.* 34, 981–998. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2016.06.014>
- Molenaar, R.J., Botman, D., Smits, M.A., Hira, V.V., van Lith, S.A., Stap, J., Henneman, P., Khurshed, M., Lenting, K., Mul, A.N., Dimitrakopoulou, D., van Drunen, C.M., Hoebe, R.A., Radivoyevitch, T., Wilmink, J.W., Maciejewski, J.P., Vandertop, W.P., Leenders, W.P., Bleeker, F.E., van Noorden, C.J., 2015. Radioprotection of IDH1-Mutated Cancer Cells by the IDH1-Mutant Inhibitor AGI-5198. *Cancer Res.* 75, 4790–4802. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3603>
- Moura, B., Migliorin, D., Bourhis, J., Daniel, R., Levivier, M., Hottinger, A.F., 2016. Prise en charge des tumeurs cérébrales primaires : une approche multidisciplinaire. *Rev Med Suisse.* 12. 821-825.
- Ohgaki, H., 2009. Epidemiology of brain tumors. *Methods Mol Biol.* 472, 323–342. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-492-0\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-492-0_14)
- Ohgaki, H., Kleihues, P., 2005. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol.* 109, 93–108. <https://doi.org/10.1007/s00401-005-0991-y>
- Ostrom, Q.T., Gittleman, H., Fulop, J., Liu, M., Blanda, R., Kromer, C., Wolinsky, Y., Kruchko, C., Barnholtz-Sloan, J.S., 2015. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro oncol.* 17. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov189>
- Ostrom, Q.T., Gittleman, H., Stetson, L., Virk, S., Barnholtz-Sloan, J.S., 2018. Epidemiology of Intracranial Gliomas. *Prog Neurol Surg* 30, 1–11. <https://doi.org/10.1159/000464374>

- Picca, A., Berzero, G., Di Stefano, A.L., Sanson, M., 2018. The clinical use of IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *Expert Rev Mol Diagn.* 1–11. <https://doi.org/10.1080/14737159.2018.1548935>
- Poulain, S., 2016. caractérisation génomique des mutations du gène CXCR4 dans la maladie de WALDENSTRÖM. thèse de doctorat, Hématologie, *Université de droit et santé de Lille II*, France 197
- Psimaras, D., Delattre, J.-Y., 2008. Perspectives in diagnosis and management of malignant gliomas. *Cancer Radiother.* 12, 695–700. <https://doi.org/10.1016/j.canrad.2008.09.006>
- Rakheja, D., Konoplev, S., Medeiros, L.J., Chen, W., 2012. IDH mutations in acute myeloid leukemia. *Hum Pathol.* 43, 1541–1551. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2012.05.003>
- Registre des cancers de la Région du Grand Casablanca pour la période 2008 – 2012, Édition 2016
- Reifenberger, G., Wirsching, H.-G., Knobbe-Thomsen, C.B., Weller, M., 2017. Advances in the molecular genetics of gliomas — implications for classification and therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 14, 434–452. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.204>
- Reitman, Z.J., Yan, H., 2010. Isocitrate Dehydrogenase 1 and 2 Mutations in Cancer: Alterations at a Crossroads of Cellular Metabolism. *J Natl Cancer Inst.* 102, 932–941. <https://doi.org/10.1093/jnci/djq187>
- Relling, M.V., Rubnitz, J.E., Rivera, G.K., Boyett, J.M., Hancock, M.L., Felix, C.A., Kun, L.E., Walter, A.W., Evans, W.E., Pui, C.-H., 1999. High incidence of secondary brain tumours after radiotherapy and antimetabolites. *Lancet.* 354, 34–39. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)11079-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)11079-6)
- Ricaurte, O., Neita, K., Valero, D., Ortega-Rojas, J., Arboleda-Bustos, C.E., Zubieta, C., Penagos, J., Arboleda, G., 2018. Estudio de mutaciones en los genes IDH1 e IDH2 en una muestra de gliomas de población colombiana. *Biomédicat.* 1 38, 86–92. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i0.3708>
- Rohle, D., Popovici-Muller, J., Palaskas, N., Turcan, S., Grommes, C., Campos, C., Tsoi, J., Clark, O., Oldrini, B., Komisopoulou, E., Kunii, K., Pedraza, A., Schalm, S., Silverman, L., Miller, A., Wang, F., Yang, H., Chen, Y., Kernytsky, A., Rosenblum, M.K., Liu, W., Biller, S.A., Su, S.M., Brennan, C.W., Chan, T.A., Graeber, T.G., Yen, K.E., Mellinghoff, I.K., 2013. An inhibitor of mutant IDH1 delays growth and promotes

differentiation of glioma cells. *Science*. 340, 626–630.  
<https://doi.org/10.1126/science.1236062>

- Schwartzbaum, J.A., Fisher, J.L., Aldape, K.D., Wrensch, M., 2006. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat Clin Pract Neurol*. 2, 494–503.  
<https://doi.org/10.1038/ncpneuro0289>
- Shao, C., Zhao, W., Qi, Z., He, J., 2016. Smoking and Glioma Risk: Evidence From a Meta-Analysis of 25 Observational Studies. *Medicine (Baltimore)* 95, e2447.  
<https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002447>
- Sharma, H., 2018. Development of Novel Therapeutics Targeting Isocitrate Dehydrogenase Mutations in Cancer. *Curr Top Med Chem*. 18, 505–524.  
<https://doi.org/10.2174/1568026618666180518091144>
- Turner, M.C., Krewski, D., Armstrong, B.K., Chetrit, A., Giles, G.G., Hours, M., McBride, M.L., Parent, M.-É., Sadetzki, S., Siemiatycki, J., Woodward, A., Cardis, E., 2013. Allergy and brain tumors in the INTERPHONE study: pooled results from Australia, Canada, France, Israel, and New Zealand. *Cancer Causes Control*. 24, 949–960. <https://doi.org/10.1007/s10552-013-0171-7>
- Vasile, F., Dossi, E., Rouach, N., 2017. Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. *Brain Struct Funct*. 222, 2017–2029. <https://doi.org/10.1007/s00429-017-1383-5>
- Waitkus, M.S., Diplas, B.H., Yan, H., 2016. Isocitrate dehydrogenase mutations in gliomas. *Neuro Oncol*. 18, 16–26. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov136>
- Ward, P.S., Patel, J., Wise, D.R., Abdel-Wahab, O., Bennett, B.D., Collier, H.A., Cross, J.R., Fantin, V.R., Hedvat, C.V., Perl, A.E., Rabinowitz, J.D., Carroll, M., Su, S.M., Sharp, K.A., Levine, R.L., Thompson, C.B., 2010. The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell*. 17, 225–234.  
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.01.020>
- Weller, M., Wick, W., Aldape, K., Brada, M., Berger, M., Pfister, S.M., Nishikawa, R., Rosenthal, M., Wen, P.Y., Stupp, R., Reifenberger, G., 2015. Glioma. *Nat Rev Dis Primers*. 1, 15017. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.17>
- Yan, H., Parsons, D.W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B.A., Yuan, W., Kos, I., Batinic-Haberle, I., Jones, S., Riggins, G.J., Friedman, H., Friedman, A., Reardon, D., Herndon, J., Kinzler, K.W., Velculescu, V.E., Vogelstein, B., Bigner, D.D., 2009. IDH1

and IDH2 Mutations in Gliomas. *N Engl J Med.* 360, 765–773.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808710>

- Zheng, T., Cantor, K.P., Zhang, Y., Keim, S., Lynch, C.F., 2001. Occupational risk factors for brain cancer: a population-based case-control study in Iowa. *J. Occup. Environ. Med.* 43, 317–324.

## Webographie

- 1- [https://lecerveau.mcgill.ca/flash/capsules/articles\\_pdf/parties\\_systeme\\_nerveux.pdf](https://lecerveau.mcgill.ca/flash/capsules/articles_pdf/parties_systeme_nerveux.pdf) consulté le 08-02-2019
- 2- <http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table> consulté le 30-04-2019