



**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)**

**Evaluation de deux protéines MSH2 et MSH6 dans les  
glioblastomes**

**Présenté par : LAKRIMI Khaoula**

**Encadré par : Pr SEFRIOUI Samira (FST Fès)**

**Pr BENNIS Sanae (FMP FES)**

**Soutenu le : 5 juillet 2022**

**Devant le jury composé de :**

- **Pr SEFRIOUI Samira**
- **Dr MOUFID Fatima Zahrae**
- **Pr HARKI EL Houssaine**

**Stage effectué au Laboratoire de Biologie Moléculaire à la FMP de FES.**

**Année universitaire 2021-2022**

## *REMERCIEMENTS*

Mes premiers mots de remerciements seront à l'égard de Dieu, Le Tout Puissant, le Tout Miséricordieux, qui m'a donné la capacité d'achever ce travail et qui m'a aidé à dépasser toutes les difficultés que j'ai rencontrées. Je lui demande de guider mes pas dans le chemin qui méritera son approbation.

Au terme de mon stage que j'ai effectué à la FMP FES, j'aimerais remercier dans un premier temps Pr. HALOTI Said de m'avoir accordé la possibilité d'accéder à cet établissement pour la réalisation de ce projet de fin d'étude

J'adresse ma reconnaissance à Pr. BENNIS Sanae, de m'avoir accueilli au sein du laboratoire de Biologie moléculaire à la Faculté de Médecine et de pharmacie de Fès afin d'effectuer mon stage de fin d'études, pour son encouragement, ses conseils et son énorme soutien durant cette période.

Je tiens aussi à remercier très chaleureusement mon encadrant de stage Mme SEFRIOUI Samira pour son accueil, son aide, son attention et sa gentillesse tout au long du stage

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur HARKI El Houssaine d'avoir accepté juger ce travail

Je ne saurais terminer sans exprimer mes remerciements les plus sincères à Mlle LAMRABET Salma, Mlle SQUALLI HUSSAINI Asmae, et Mlle MOUFID Fatima Zahrae pour votre disponibilité, j'ai pu bénéficier de vos expériences et vos conseils lors de ces 2 mois de stage.

## *Dédicaces*

Je dédis le présent projet de fin d'étude à :

Mes très chers parents, qui ont toujours été là pour m'aider, m'encourager, que nulle dédicace ne puisse exprimer mes sincères sentiments,

Mon frère, ma cousine et tous mes amis pour leur conseil et leur encouragement,

Tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

## ***Listes des abréviations***

Ac : anticorps

ADN : acide désoxyribonucléique

Ag : antigène

BET : Bromure d'éthidium

BRAF: B-RAF-Proto-oncogène

CHU : centre hospitalier universitaire

DNTP : désoxyribonucléotide triphosphate

EEG : Electrocéphalogramme

FUBP1: Far upstream element Protein 1

GBM : glioblastome

HIC : immunohistochimie

HTIC : hypertension intracrânienne

IDH : isocitrate déshydrogénase

IRM : imagerie par résonance Magnetic

MDM2: mouse double minute 2

MLH1: MutL Homolog 1

MMR: system MisMatch Repair

MSH2: MutS Homolog2

MSH6: MutS Homolog 6

MSI: Microsatellite instability

OMS : organisation mondiales de la santé

PCR : Polymerase chain reaction

PMS2: postmeiotic segregation increased 2

SNC : système nerveux centrales

TERT: Telomerase reverse transcriptase

TGFBR2: Transforming Growth Factor Beta Receptor 2

## *Liste des figures*

Figure 1 : représentation des différents lobes du cerveau.....	2
Figure 2 : représentation externe du cerveau humain.....	2
Figure 3 : Schéma illustrant les différents partenaires gliaux du SNC.....	4
Figure 4 : Microtome .....	13
Figure 5 : Vue microscopique de la coloration Hématoxyline-éosine d'un GBM.....	14
Figure 6 : : Principe de l'immunohistochimie indirecte (enzymatique).....	15
Figure 7 : Protocole du dosage d'ADN sur Qubit Fluorometer.....	18
Figure8 : Sens de migration de l'ADN.....	21
Figure 9 : Répartition des cas de glioblastomes selon le sexe.....	22
Figure 10 : Histogramme représentant la répartition des glioblastomes selon les tranches d'âges.....	23
Figure 11 : Aspect histologique caractéristique d'un glioblastome .....	24

## ***Liste des tableaux***

Tableau 1 : Classification des gliomes selon l’OMS 2007.....	8
Tableau 2 : Classification des gliomes selon l’OMS 2016.....	9
Tableau 3 : Amorces utilisées pour la mise en évidence des mutations de gène BRAF.....	19
Tableau 4: Composition du milieu réactionnel pour la détection des mutations du gène BRAF.....	20
Tableau 5: Programme PCR de l’exon 4 du gène BRAF.....	20
Tableau 6 : liste des patients inclus dans cette étude.....	26

## *Présentation d'établissement d'accueil*

Mon stage s'est déroulé au sein du laboratoire de recherche de biologie moléculaire situé à la Faculté de Médecine et Pharmacie de Fès sous la direction du professeur BENNIS Sanae.

C'était un stage d'observation qui a duré deux mois, pendant cette période j'ai eu la chance d'enrichir mon savoir avec les différentes techniques de biologie moléculaire.



# Table des matières

<i>Introduction</i> .....	1
Partie I : Etude bibliographique.....	2
I. Généralités sur le cerveau.....	2
1. Anatomie .....	2
2. Histologie.....	3
a) Cellules nerveuses.....	3
b) Cellules gliales.....	3
II. Les tumeurs cérébrales .....	4
1. Définition.....	4
2. Les symptômes :.....	4
3. Diagnostic.....	5
a) Examen clinique .....	5
4. Traitement.....	6
5. Les gliomes .....	6
a) Epidémiologie.....	6
b) Les facteurs de risques .....	6
c) Classification des gliomes.....	7
Classification 2007 :.....	7
III. Les bases moléculaires .....	10
1. Mutation de l'isocitrate déshydrogénase 1 et 2 (IDH1 et IDH2).....	10
2. La co-délétion 1p/19q .....	10
3. Mutation du promoteur du gène de la télomérase reverse transcriptase TERT .....	11
4. Altération Du gène P53 .....	11
5. Altération du gène BRAF .....	11
6. Altération des instabilités des microsatellite « MSI » .....	12
Partie II : matériel et méthodes.....	13
I. Matériel biologique .....	13
II. Etude histologique.....	13
1. Préparation des échantillons .....	13
1. Coloration.....	13
III. Etude immunohistochimique (IHC) .....	15
1. Principe.....	15

<b>2. Protocole expérimental de l'IHC manuelle</b> .....	16
IV. Etude moléculaire des glioblastomes .....	17
<b>1. Extraction d'ADN génomique</b> .....	17
<b>2. Réaction de la chaîne polymérase (PCR)</b> .....	18
<b>3. Electrophorèse</b> .....	21
a) <b>Révélation et observation</b> .....	21
<b>4. Séquençage</b> .....	22
a. <b>Purification des produits de la PCR</b> .....	22
Partie III : Résultats et discussion .....	22
I. Epidémiologie descriptive des glioblastomes étudiés .....	22
<b>1. Répartition des cas des glioblastomes selon le sexe</b> .....	22
<b>2. Répartition des cas des glioblastomes selon d'âge</b> .....	23
II. Etude Histologique.....	24
Conclusion.....	28
Références bibliographiques .....	29
Références webographique.....	31

# *Introduction*

Les glioblastomes sont les tumeurs cérébrales malignes les plus fréquentes et les plus agressives avec 240 000 nouveaux cas diagnostiqués dans le monde entier, pour une médiane de survie inférieure à 15 mois [35].

Ils représentent 57% de tous les gliomes et 48% des tumeurs malignes du système nerveux central (SNC) [36]. Ils peuvent se manifester à tout âge mais affectent principalement les adultes ayant une incidence maximale entre 45 et 75 ans, et touchent plus souvent l'homme que la femme.

Les outils de diagnostic couramment utilisés sont d'abord la tomodensitométrie (TDM) et l'imagerie par résonance magnétique (IRM) suivies d'une confirmation anatomopathologique après biopsie ou résection chirurgicale. Cette biopsie fera l'objet de plusieurs interventions au sein du laboratoire de biologie moléculaire. Dont l'identification par immunohistochimie de la présence du phénotype MSI par la détection de l'expression de la protéine, pour déterminer une stratégie thérapeutique et des soins adaptés et spécifique pour le patient.

L'objectif de ce travail est de détecter la présence ou l'absence de deux protéines du système MMR qui est un système de réparation des erreurs de copie de l'ADN (MSH2 et MSH6) chez 17 patients par l'utilisation des techniques de la biologie moléculaire.

# Partie I : Etude bibliographique

## I. Généralités sur le cerveau

### 1. Anatomie

L'encéphale et la moelle épinière constituent le système nerveux central. La moelle épinière est le prolongement du cerveau comme elle est considérée le connecteur du cerveau avec le reste du corps, l'encéphale à son tour est constitué de trois grandes parties le cerveau, le cervelet et le tronc cérébrale. Commenant par le cerveau qui est le contrôleur d'ensemble d'organismes, il modifie le corps pour l'adapter aux conditions de l'environnement il dispose de deux hémisphères séparés par une scissure profonde et es formé d'une substance blanche et l'autre grise(figure 2), on distingue à chaque hémisphère quatre lobes qui sont : le lobe frontal, le lobe pariétal, le lobe occipital, le lobe temporal, (figure 1) et il est formé également diencéphale qui représente sa partie médiane constitué du thalamus et l'hypothalamus[1][2][3] .

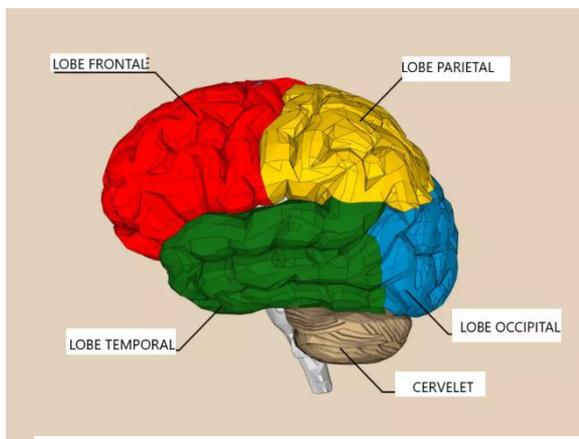


Figure 2: représentation des différents lobes du cerveau [5]

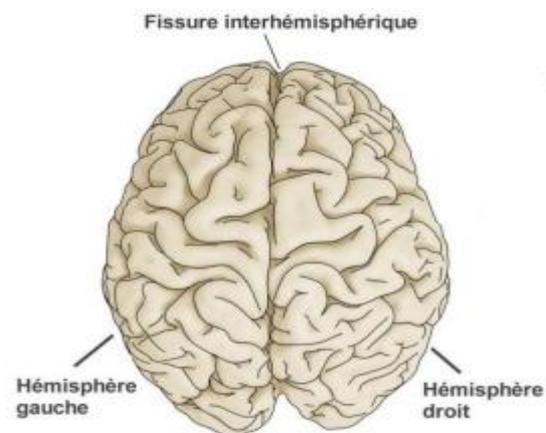


Figure 1: représentation externe du cerveau humain [4]

## 2. Histologie

### a) Cellules nerveuses

Le cerveau étant un élément très complexe, est constitué de deux types de cellules : cellules nerveuses et cellules gliales qui subsistent une différence sur les plans structuraux et fonctionaux. En effet les cellules nerveuses représentent la machinerie de base pour le cerveau, elles sont constituées de deux parties différentes, une partie centrale qui contient la corp et des prolongements qui se répartissent en deux catégories : les axones et les dendrites. Elles jouent un rôle important dans la réponse aux sensations du corps, le traitement de l'information cérébrale et elles se caractérisent par l'échange de l'information entre elles [6].

### b) Cellules gliales

Les cellules gliales représentent la majorité des cellules du cerveau avec un pourcentage de plus de 70% de la population cellulaire. Elles jouent le rôle de soutien puisqu'elles assurent la protection des neurones et les alimentent par les nutriments et l'oxygène. Plusieurs études antérieures ont démontré le rôle important que joue les cellules gliales dans le traitement de l'information de SNC et le contrôle de la fonction nerveuse (figure3) [7].

On distingue 4 types de cellules gliales :

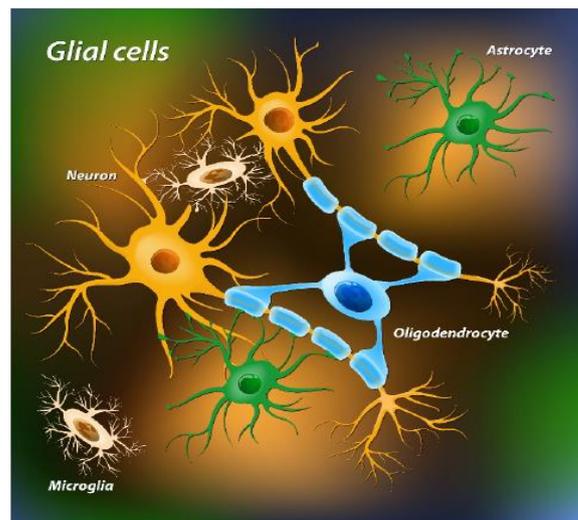
**Les astrocytes :** c'est la population cellulaire la plus abondante, ils représentent les intermédiaires entre les neurones et les vaisseaux sanguins. Ils ont une forme stellaire et sont constitués de plusieurs prolongements qui leur permettent d'interagir avec d'autres types de cellules. Ils exercent différentes fonctions vitales qui bénéficient l'organisation du cerveau, ils assurent le maintien de l'homéostasie et la migration des neurones lors du développement, et participent à la régulation des flux ioniques et particulièrement du potassium. En outre, leur organisation dans l'espace assure la communication des neurones puisqu'elles sont indispensables à la formation de la barrière hémato-cérébrale. Les cellules astrocytaires sont considérées comme un lieu de stockage de glucose dans le système nerveux et une source d'énergie des neurones [8].

**Les oligodendrocytes :** Ils participent principalement à la myélinisation d'axones des neurones cérébraux [7].

**Les microglies :** Il s'agit petites cellules ovoïdes qui contiennent des prolongements épineux relativement long et ils représentent les principales cellules capables de défendre contre un agent pathogène dans le cerveau. Ils expriment de nombreuses caractéristiques de monocytes

sont capables de répondre aux médiateurs de signalisation. Dans des conditions physiologiques normales, ces cellules sont inactives et ils exercent un rôle de surveillance immunitaire de SNC. Ils s'activent par des messages chimiques du système immunitaire et ils se transforment en macrophages [7].

**Les épendymocytes :** ils assurent les échanges entre le liquide céphalorachidien et le système nerveux central. Ils constituent un épithélium cubique qui maintient le revêtement des cavités ventriculaires du SNC [9].



**Figure 3: schéma illustrant les différents partenaires gliaux du SNC**

## **II. Les tumeurs cérébrales**

### **1. Définition**

C'est la croissance d'une masse des cellules anormales dans le cerveau d'une façon incontrôlée. Il existe 2 types des tumeurs cérébrales : Primitives provenant des cellules intracrâniennes ou des cellules de structure adjacente au cerveau, elles peuvent être bénignes (non cancéreuse) ou malignes (cancéreuse). Celles secondaires sont issues des métastases elles se développent dans une autre zone du corps avant qu'elles envahissent le cerveau [10].

### **2. Les symptômes :**

Les symptômes varient en fonction de l'emplacement et de la taille de la tumeur. Au fur et à mesure qu'une tumeur se développe, elle exerce une pression sur les structures cérébrales adjacentes, altérant leur fonction.

Parmi les symptômes les plus fréquentes :

- Des maux de tête inhabituels, fréquents et intenses ;
- Des nausées et vomissements ;
- Des troubles de la vision : vision embrouillée, vision double ou perte de la vision périphérique ;
- Des engourdissements ou une perte de sensibilité d'un côté du corps ;
- Une paralysie ou une faiblesse d'un bras ou d'une jambe, d'un seul côté du corps ;
- Des vertiges, des problèmes d'équilibre et de coordination ;
- Des problèmes d'élocution ;
- Des troubles de la mémoire et confusion ;
- Une modification des comportements de la personnalité, ou des changements d'humeur ;
- Des troubles d'audition (surtout en cas de neurinome acoustique, une tumeur du nerf auditif)
- Des crises d'épilepsie ;
- Une perte de conscience ;
- Une perte d'appétit [11].

### 3. Diagnostic

L'examen par imagerie est obligatoire dans le diagnostic des tumeurs cérébrales et le type d'examen est choisi en fonction de la situation du patient :

#### a) Examen clinique

Examen radiologique : l'IRM permet de préciser la localisation et le type de tumeur. Il est précédé d'un scanner qui peut être demandé secondairement pour avoir les informations que l'IRM ne permet pas de donner avec précision.

Examens électrophysiologiques : tels que l'électroencéphalogramme (EEG), permet d'analyser l'activité électrique du cerveau du patient, et les potentiels évoqués (PE), pour enregistrer la réponse des voies nerveuses et du cerveau suite à une stimulation.

Une biopsie peut déterminer la nature exacte de la tumeur avec certitude pour prescrire directement un traitement convenable, ceci concerne les tumeurs primitives qui sont situées dans des zones de cerveau dont la chirurgie est risquée [12].

## 4. Traitement

Le traitement des gliomes nécessite une approche multidisciplinaire comprenant une résection chirurgicale maximale de la tumeur suivit d'une radiothérapie associée à un traitement concomitant et adjuvant de chimiothérapie avec l'agent alkylant témozolomide [13].

## 5. Les gliomes

Parmi les tumeurs primitives malignes, il y a les gliomes qui sont les plus grave et elles représentent 65% des tumeurs cérébrales primitives.

Les gliomes sont des tumeurs primitives d'origine gliale qui affectent le SNC, ils peuvent se développer dans des différentes régions du cerveau mais sont fréquemment localisés dans les hémisphères cérébraux. Elles sont des tumeurs fatales car leur propriété d'extension rende impossible toute chirurgie complète et surtout que des zones fonctionnelles doivent être préservées.

Il existe 3 types de gliomes :

- Les astrocytomes provenant des astrocytes
- Les oligodendrogliomes provenant des oligodendrocytes
- Les tumeurs mixtes ou Oligo-astrocytomes

### a) Epidémiologie

Selon GLOBOCAN2020, chaque année le monde entier exprime 308102 nouveaux cas des cancers du cerveau et système nerveux et 251329 cas de décès. L'incidence de ces cancers est répartie d'une manière inéquitable entre les différents continents, mais en faveur des pays fortement industrialisés. En premier rang l'Asie qui a enregistré 54,2% des cas, ensuite l'Europe avec 21,8%, l'Amérique du Nord avec 8,9% des cas, l'Amérique de Sud et les caraïbes ont enregistré 8,4 des cas, puis l'Afrique avec 5,9% des cas et la dernière place est remportée par l'Océanie avec 0,8% des cas [14].

### b) Les facteurs de risques

Les gens plus de 60 ans sont plus susceptibles d'avoir des gliomes. D'autres facteurs augmentent le risque de survenue d'un glioblastome tels que l'appartenance ethnique, le sexe,

l'existence d'un syndrome de prédisposition Génétique, et la présence des polymorphismes génétiques.

### c) Classification des gliomes

Le but de la classification anatomopathologique est d'indiquer le type histologique du gliome, et son grade pour proposer un Protocol thérapeutique approprié. La classification la plus reconnue est celle de l'OMS.

#### Classification 2007 :

Cette classification était basée sur un concept histologique associé au phénotype des cellules tumorales (astrocytaires, Protocole, ou mixtes) et le grade de malignité (du grade I au grade IV).

#### Les astrocytomes

- **L'astrocytome pilocytique** est le seul figurant astrocytaire appartenant au **grade I**. Il s'agit d'une tumeur bénigne à croissance lente, un volume bien circonscrit et un néoplasie à faible potentiel prolifératif. C'est un gliome des voies optiques développé dans les régions hypothalamiques, chiasmatiques et sur les nerfs optiques. Il représente 5% des gliomes de l'enfant [15].
- **Les astrocytomes de grade II** sont principalement développés au niveau des lobes frontaux et temporaux, leur croissance reste lente mais leurs limites sont imprécises. Ils présentent un caractère infiltrant et une atypie cytologique. Ils se traduisent par une lésion infiltrante homogène, sans œdème péri tumoral ni hémorragie. Ils sont associés à un pronostic relativement bon avec une médiane de vie de 5ans dans 43% des cas, mais un grand risque d'évolution vers des grades supérieurs.
- **Les astrocytomes anaplasiques grade III** présentent les mêmes caractéristiques des gliomes de bas grade (GBG) accompagnés d'une anaplasie et d'une activité mitotique accélérée, leur pronostic n'est généralement pas bon avec un grand risque de transformation en grade IV.
- **Les astrocytomes de grade IV ou glioblastome (GBM)** présentent les signes de malignité (infiltration et mitose) et représentent la forme la plus fréquente et la plus

sévère, avec le plus pénible pronostic, une médiane de survie de 15 mois et un taux de survie de 5 ans pour 5% des cas.

## Les oligodendrogliomes

Les **oligodendrogliomes** sont des gliomes de **grade II et III**. Ceux du grade II représentent moins de 2,5% des tumeurs chez l'enfant et le même grade de malignité des astrocytomes chez les adultes. Néanmoins ils présentent une grande hétérogénéité de pronostic et de réponse aux traitements antitumoraux. Ils sont extrêmement difficiles à prévoir lors de la prise en charge initiale des patients, l'intervention de la biologie et la génétique en particulier ont permis de dégager des biomarqueurs permettant d'identifier des sous-catégories histomoléculaires au comportement clinique plus homogène [16].

## Les gliomes mixtes

- Les **Oligo astrocytomes** ou les **gliomes mixtes** sont les tumeurs à contenu cellulaire mixte entre les cellules astrocytaires et oligodendrogliales qui sont classées en **grade II ou III** en prenant en considération différents critères de malignité comme la densité cellulaire, les atypies nucléaires, l'activité mitotique et la prolifération vasculaire.

**Tableau 1: Classification des gliomes selon l'OMS 2007 [17].**

<b>Les tumeurs astrocytaires</b>	
* Astrocytome cellules géantes sous-épendymaire	Grade I
* Astrocytome pilocytique	Grade I
o Astrocytome pilocytique, variant pilomyxode	Grade II
* Astrocytome diffus	Grade II
o Astrocytome fibrillaire	
o Astrocytome protoplasmique	
o Astrocytome gemistocytiq	
* Astrocytome anaplasique	Grade III
* Xanthoastrocytome pléomorphe	Grade II/III
* Glioblastome	Grade IV
o Glioblastome à cellules géantes	Grade IV
o Gliosarcome	Grade III
* Gliomatose cérébrale	
<b>Les tumeurs oligodendrogliales</b>	
* Oligodendrogliome	Grade II
* Oligodendrogliome anaplasique	Grade III
<b>Les tumeurs mixtes oligo-astrocytaires</b>	
* Oligoastrocytome	Grade II
* Oligoastrocytome anaplasique	Grade III

## Classification 2016

Suite aux avancées majeures de la technologie qui ont influencé les techniques d'investigation et de diagnostic, la classification établie par l'OMS en 2007 a subi plusieurs changements en ce qui concerne les gliomes dans la version publiée en 2016. En plus du caractère histologique (la morphologie), ils ont incorporé des paramètres moléculaires (génétique) dans le but d'établir différentes catégories de tumeurs homogènes en termes de réponses aux traitements et pronostic. Cette classification est basée sur la séparation des tumeurs astrocytaires, oligodendrogiales et épendymaires ; cependant le classement histopronostique reste constant pour les tumeurs.

Ces résultats sont basés directement sur des essais à immunohistochimie (IHC) qui s'avèrent soit contributifs soit non contributifs ou même réalisables, les chercheurs lui ont attribué le terme « NOS » (not otherwise specified) [19]. A ce propos, ils ont pu identifier des marqueurs utiles à prédire la réponse à certains traitements, ainsi que leurs utilisations pour le diagnostic et le pronostic.

**Tableau 2 : classification des gliomes selon l'OMS 2016**

Grades	Tumeurs diffuses astrocytaires et oligodendrogiales		Autres tumeurs astrocytaires
II	Astrocytome diffus, IDH-muté Astrocytome gémistocytique, IDH-muté	I	Astrocytome pilocytique Astrocytome pilomyxoïde
II	Astrocytome diffus, IDH-non muté	I	Astrocytome subépendymaire à cellules géantes
II	Astrocytome diffus, NOS	II	Xanthoastrocytome pléomorphe
III	Astrocytome anaplasique, IDH-muté	III	Xanthoastrocytome pléomorphe anaplasique
III	Astrocytome anaplasique, IDH-non muté		<b>Tumeurs épendymaires</b>
III	Astrocytome anaplasique, NOS	I	Subépendymome
IV	Glioblastome, IDH-non muté Glioblastome à cellules géantes Gliosarcome Glioblastome épithélioïde	I	Ependymome myxopapillaire
IV	Glioblastome, IDH-muté	I	Ependymome Ependymome papillaire Ependymome à cellules claires Ependymome tanacytique
IV	Glioblastome, NOS	II ou III	Ependymome, RELA fusion-positif
IV	Gliome diffus de la ligne médiane, H3 K27M-muté	III	Ependymome anaplasique
II	Oligodendrogliome, IDH-muté et codélétion 1p-19q		<b>Autres gliomes</b>
II	Oligodendrogliome, NOS	II	Gliome choroïde du 3 <sup>e</sup> ventricule
III	Oligodendrogliome anaplasique, IDH-muté et codélétion 1p-19q	I	Gliome angiocentrique
III	Oligodendrogliome anaplasique, NOS	-	Astroblastome
II	Oligoastrocytome, NOS		
III	Oligoastrocytome anaplasique, NOS		

## Classification 2021

Dans cette dernière édition, de nouveaux types et sous-types sont introduits et les critères de diagnostic histomoléculaire et de grading sont affinés, notamment pour les gliomes diffus. L'identification des gliomes diffus « de sous-type pédiatrique » (de bas ou haut grade) représente une amélioration majeure de la classification. Le rôle des anomalies génétiques et épigénétiques dans le diagnostic intégré des tumeurs est plus important par rapport à l'édition 2016. Cette cinquième édition, tant attendue, devrait permettre une meilleure prise en charge des patients [19].

### III. Les bases moléculaires

#### 1. Mutation de l'isocitrate déshydrogénase 1 et 2 (IDH1 et IDH2)

La décarboxylation de l'isocitrate en alpha- kétoglutarate est réalisée à l'aide de l'enzyme isocitrate déshydrogénase codé par les gènes IDH1 et IDH2. La récurrence des mutations dans les gliomes affecte le codon R132 pour IDH1 et R172 pour IDH2, se résulte par l'altération d'un seul allèle et l'accumulation de 2-hydroxyglutarate et l'hyperméthylation de l'ADN (phénotype métylateur des îlots CpG) qui inhibe la différenciation cellulaire. Il existe une fréquence élevée des mutations IDH dans les gliomes infiltrants de grade II soit 87%, ou de grade III soit 83% et 85% pour les glioblastomes secondaires qui en dérivent. Une mutation IDH est considérée comme un facteur de bon pronostic dans les gliomes de grade II, III et IV [20].

#### 2. La co-délétion 1p/19q

La Codélétion 1p19q correspond à une perte totale du 1q et 19p et une translocation réciproque déséquilibrée (1 ;19) (q10 ; p10). Cette codélétion est associée à un bon pronostic et une meilleure réponse à la chimiothérapie. Les gliomes codélétés 1p/19q expriment la signature proneurale et des marqueurs neuronaux comme l'interneurine  $\alpha$  (7). Ils présentent des mutations fréquentes et non exclusives des gènes CIC (40-70%) et FUBP1 (15-30%) situés respectivement en 19q et 1p. Ces mutations et la codélétion 1p19q inactivent les allèles CIC qui est un antagoniste des récepteurs tyrosine kinase ou FUBP1 qui est un inhibiteur de l'oncogène MYC [20].

### **3. Mutation du promoteur du gène de la télomérase reverse transcriptase TERT**

La protéine TERT est une transcriptase reverse des télomères impliqués dans le maintien de la taille des télomères et à chaque division cellulaire le raccourcissement des télomères assure la senescence replicative en absence de TERT. Récemment des mutations du promoteur TERT ont été observée dans environ 80% des glioblastomes ces mutations assurent le maintien de façon anormale la longueur des télomères donc assurent l'échappement des cellules à la senescence et leur survie par conséquent, l'apparition de la tumeur [21].

### **4. Altération Du gène P53**

Parmi les gènes suppresseurs de tumeurs dont les pertes de fonctions sont le plus souvent impliquées dans le développement des tumeurs cérébrales est le gène TP53 qui code pour une protéine de 35 KD, il est localisé sur le bras court de chromosome 17 (17p13.1). La protéine P35 est impliqué à la fois dans : la stabilité du génome, le contrôle du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose. Elle joue aussi un rôle dans la réponse à de nombreux stimuli cellulaires, dont les lésions de l'ADN, l'hypoxie, l'activation d'oncogènes, la sous-expression de facteurs de croissance. Elle répond également aux stimuli, en effet, la protéine P35 peut interrompre le cycle cellulaire ce qui permet la protection de l'organisme soit par l'initiation de l'apoptose en éliminant les cellules défectueuses soit en réparant l'ADN avant la division cellulaire. En conséquence une mutation du gène P35 induit l'apparition d'une tumeur cérébrale. Lors de la gliomagenèse, deux gènes dont les produits contrôlent p53 sont p14/p19ARF et MDM2. P14ARF contrôle l'activité de MDM2, qui à son tour contrôle p53. La perte des deux copies du gène de p14ARF ou l'amplification ou la surexpression de MDM2 conduisent à un effondrement rapide de la protéine p53 sauvage, la cellule étant alors dépourvue de p53 sauvage, on observe l'absence de P35 sauvage dans la majorité des glioblastomes ou pas de p14ARF, ou surexprime MDM2 [22].

### **5. Altération du gène BRAF**

C'est un gène qui code pour la protéine BRAF serine/thréonine intracellulaire participant à la voie de signalisation et au processus tumoral. Plusieurs types d'altérations du gène BRAF, localisé sur le chromosome 7q34, ont été découvertes dans les astrocytomes pilocytiques : des mutations de type V600E transformant une valine en position 600 en un acide glutamique, des

insertions et des duplications en tandem-réarrangements de BRAF avec les gènes KIAA1549 [23].

## **6. Altération des instabilités des microsatellite « MSI »**

L'instabilité des microsatellites (MSI) est un phénotype tumoral relié à une déficience du système de réparation des mésappariements de l'ADN (MMR), et ce phénotype est retrouvé dans les tumeurs cérébrales.

Les microsatellites sont constitués d'une répétition continue en tandem d'un motif nucléotidique d'une à quelques bases, ils sont très nombreux et dispersés dans tout le génome dans des zones codantes ou non codantes, en cas de déficience du système MMR, qui reconnaît et répare les erreurs d'insertion de délétion ou de mésappariement de base qui survient lors de la réplication de l'ADN avec l'intervention d'un complexe protéique comprenant MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2 qui fonctionnent sous la forme d'hétérodimères (MLH1/PMS2, MSH2/MSH6), les erreurs de réplication des microsatellites ne se corrigent pas amenant à leur instabilité.

La perte de fonction du système MMR est acquise et reliée dans l'immense majorité des cas à une perte d'expression du gène MLH1 par hyperméthylation de son promoteur. Cet événement épigénétique s'inscrit généralement dans un contexte génétique plus large. D'hyperméthylation de l'ADN, dit phénotype hyperméthylateur ou CIMP (CpG Island Methylator Phenotype) [24].

## Partie II : matériel et méthodes

### I. Matériel biologique

Le glioblastome est une tumeur hétérogène caractérisée par plusieurs altérations génétiques et moléculaires. Afin de déterminer le grade et de collecter plus d'informations il faut cibler la biopsie qui doit être trompée dans une solution de fixation et transportée au laboratoire d'anatomopathologie pour réaliser l'acte chirurgicale par les neurochirurgiens

### II. Etude histologique

#### 1. Préparation des échantillons

##### a) Réalisation des coupes

Le bloc solide de paraffine contenant le tissu est coupé grâce à un microtome (Figure 4). Les coupes de 3 à 5 microns d'épaisseur sous forme de rubans mis dans un bain chaud, puis étalés sur des lames.

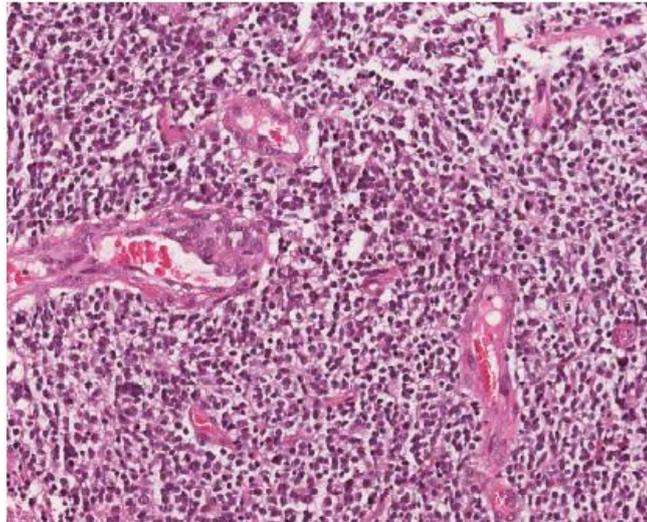


Figure 4 : Microtome

#### 1. Coloration

##### a) Principe

On utilise la coloration de type H.E (hématoxyline- éosine). L'hématoxyline colore le noyau en violet, l'éosine colore le cytoplasme en rose.



**Figure 5 : vue microscopique de la coloration Hématoxyline-éosine d'un GBM**

#### **b) Déparaffinage**

Dans cette étape on met les lames dans l'étuve pendant une nuit à 60°C, puis on les incube dans 2 bains de toluène (5min chacun) afin d'enlever la paraffine.

#### **c) Hydratation**

Elle consiste à enlever la lame de toluène et le remplacer par l'eau (toluène est non miscible dans l'eau). Puis l'incuber dans 3 bains d'alcool à titre décroissants 100°, 80° et 70° (5 min chacun), enfin les lames sont rincées à l'eau courante.

#### **d) Coloration**

Premièrement, on incube dans un bain d'hématoxyline pendant 5min, ensuite on rince à l'eau courante et on passe dans l'eau chlorhydrique, puis on rince à l'eau ammoniacale, et on élimine cette dernière par l'eau courante (voir les annexes). Les lames sont alors placées dans un bain d'éosine 2% pendant 5min. Enfin un dernier rinçage est effectué grâce à 3 bains d'alcool à titre croissant 70°, 80° et 100° une minute chacun.

#### **e) Montage entre lame et lamelles**

Cette opération est réalisée à l'aide d'un milieu de montage, une lamelle de verre qui protégera le tissu des frottements mécaniques ou des modifications induites par les colorants.

## f) Observation microscopique

C'est la dernière étape de la coloration est réalisée par le médecin anatomo-pathologiste pour identifier la zone contenant plus que 50% des cellules tumorales pour assurer la fiabilité des tests qui suivent, et éliminer les faux négatifs obtenus par des cellules saines interférentes.

## III. Etude immunohistochimique (IHC)

L'immunohistochimie est devenue une technique d'appoint indispensable en anatomie pathologique. Elle ne peut être interprétée qu'en fonction des orientations diagnostiques cliniques et morphologiques. Depuis plusieurs années, elle a permis de progresser dans le diagnostic morphologique, en particulier celui des maladies cancéreuses.

### 1. Principe

L'immunohistochimie a pour but de mettre en évidence, dans les tissus, des molécules (antigènes) membranaires, cytoplasmiques et/ou nucléaires visualisées grâce à la détection par un anticorps spécifique, couplé à un chromogène agissant sur un substrat.

La méthode immuno-enzymatique indirecte consiste à introduire l'Ac primaire au tissu puis révéler par un Ac secondaire couplé à une enzyme qui va donner un produit chromogène quand elle réagit avec son substrat. Les complexes Ag-Ac sont le site de fixation de la coloration (figure 6).

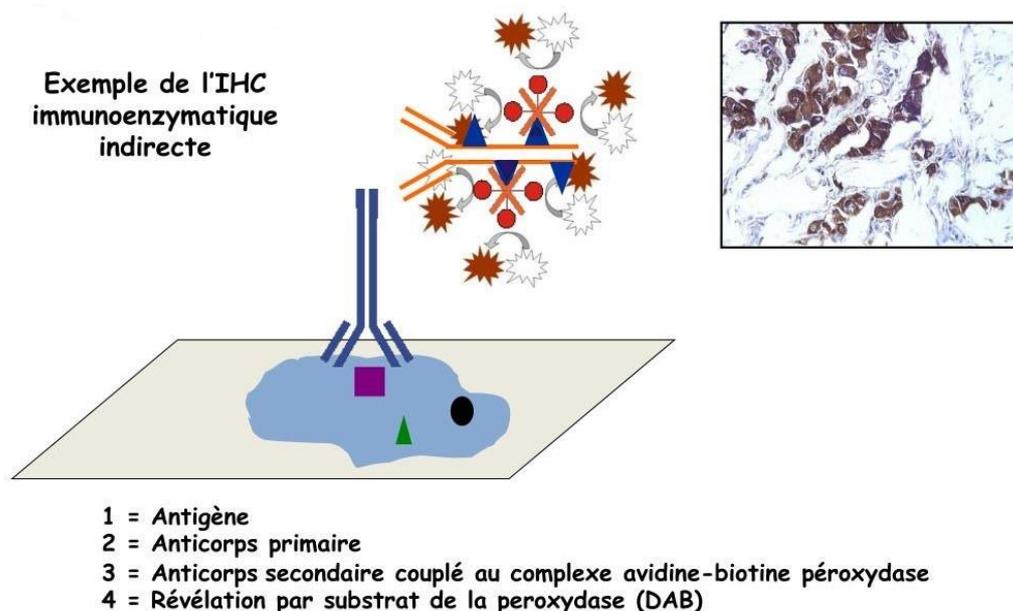


Figure 6 : Principe de l'immunohistochimie indirecte (enzymatique)

Les anticorps primaires utilisés dans la réalisation de ce travail sont :

- L'anticorps monoclonal anti- MSH2(FLEX Monoclonal Anti-human MutS Protein Homolog 2 Clone FE11) : cet anticorps reconnaît la protéine normale
- L'anticorps monoclonal anti-MSH6(FLEX Monoclonal Anti-humain MutS Protein Homolog 6 Clone EP49) : cet anticorps reconnaît la protéine normale.

## 2. Protocole expérimental de l'IHC manuelle

Les coupes du tissu tumoral obtenues des cassettes sont incubées pendant une nuit à 37°C. Après la récupération des lames, on commence par le déparaffinage qui se réalise par une solution de démasquage (En vision FLEX Target Retrieval solution High pH ×50) concentrée est diluée au  $\frac{1}{50}$ ème à l'eau distillée, où on incube les coupes pendant 20 min à une température de 65°C. Et après le démasquage des épitopes qui s'effectue aussi grâce à la même solution de démasquage, on incube les lames à une température de 98°C pendant 20 min, une fois le démasquage est terminé on laisse la solution refroidir jusqu'à 65°C pendant 20 min, après on place les lames dans une cuve contenant le tampon de lavage FLEX WASH BUFFER ×20 dilué pendant 20min, puis on égoutte les lames et on entoure les fragments par le PAP- PEN pour déposer la protéine bloquante des peroxydases endogènes (En vision FLEX peroxydase Reagent) pendant 5 min dans le but d'atteindre la saturation des épitopes contre les liaisons non spécifiques, puis on rince dans la même solution de tampon pendant 7 min, puis l'étape de dépôt d'anticorps primaire (antiMSH2/MSH6) les clones respectivement utilise EP49 et FE11 et on préserve les lames dans chambre humide.

Après 30 min on rince les lames dans la solution de tampon pendant 7 min après on ajoute MOUSE OU RABBET LINKER pour l'anticorps MSH2 Clone FE11 pour amplifier le signal et on l'incube pendant 20 min. puis on ajoute l'anticorps secondaires et on dispose les lames dans une chambre humide pendant 20 min.

Enfin, on effectue un rinçage avec le tampon et on incube les lames dans la solution de la DAB chromogène qui représente le substrat de l'enzyme. Le résultat se traduit par le dépôt de tâches visibles d'une teinte brune. Finalement, la contre coloration par l'hématoxyline.

## **IV. Etude moléculaire des glioblastomes**

L'extraction d'ADN tissulaire est l'étape initiale pour l'analyse moléculaire des tumeurs cérébrales, permet l'isolement de l'ADN à partir des cellules tumorales tissulaires en quantité suffisante pour permettre son analyse moléculaire.

### **1. Extraction d'ADN génomique**

Après la sélection des blocs de chaque patient, pour augmenter le nombre de cellules tumorales et éviter les faux positifs la détermination de la zone tumorale (contenant + de 50% des cellules tumorales) est obligatoire. Le protocole d'extraction d'ADN Kit Invitrogène se passe en 3 étapes :

#### **a. Déparaffinage**

On pose dans une tube Eppendorf de 1,5 ml, 10 coupes de 5  $\mu\text{m}$  réalisées à partir du bloc sélectionné et 1ml de xylène 100% pour éliminer la paraffine et on vortex brièvement pour mélanger après on centrifuge le mélange pendant 30s puis on chauffe l'échantillon pendant 5min à 50 °C et on centrifuge une autre fois pendant 2 min à une vitesse maximale et on jette le surnageant. On refait ces étapes 3 fois pour retirer toute la paraffine. Le culot obtenu contient des traces de xylène alors on les élimines par l'éthanol donc on ajoute 1ml d'éthanol 100% et on vortex après en centrifuge le mélange à vitesse maximale pendant 3 min et on jette l'éthanol en laissant le culot intact et on répète ces étapes 3 fois pour sécher toute trace d'éthanol ensuite une nouvelle centrifugation permet de collecter les gouttes d'éthanol et enlever le max puis on le culot à 40°C pendant 35 min.

#### **b. Digestion à la protéase**

Pour la digestion des protéines et des tissus et des membranes présente dans le culot on ajoute à ce dernier 200  $\mu\text{l}$  du tampon de digestion et 4  $\mu\text{l}$ , on agite délicatement et on incube tout à 65°C pendant une nuit.

#### **c. Isolation des acides nucléiques**

Premièrement on prépare un mélange de 240  $\mu\text{l}$  d'isolation additif + 550  $\mu\text{l}$  d'éthanol et on mélange avec la pipette puis on pipete 700  $\mu\text{l}$  du mélange et on dépose sur la cartouche du filtre puis on centrifuge à 10000 tour par minute pendant 30s et on jette les débris on refait ces

étapes 2 fois, après on ajoute 700 µl du Wash1 sur la cartouche et on incube 1min à une température ambiante puis on centrifuge pendant 30s à 12000 g et on jette les débris ensuite on ajoute 500 µl du Wash 2/3 sur la cartouche du filtre et on centrifuge pendant 30s à 12000 g et on jette les débris, on répète ces deux étapes 2 fois afin d'assurer un bon lavage.

#### d. Elution et quantification de l'ADN

On commence par le chauffage de la solution d'éluion à 95°C puis on dépose 60 µl de la solution sur l'échantillon et on le laisse à température ambiante pendant 1 min, après on centrifuge 1min à vitesse max, afin de précipiter l'ADN.

Enfin, l'ADN extrait est dosé par fluorimétrie sur Qubit. L'étape ci-après assure la quantification de l'ADN en suivant le protocole suivant (figure 7).

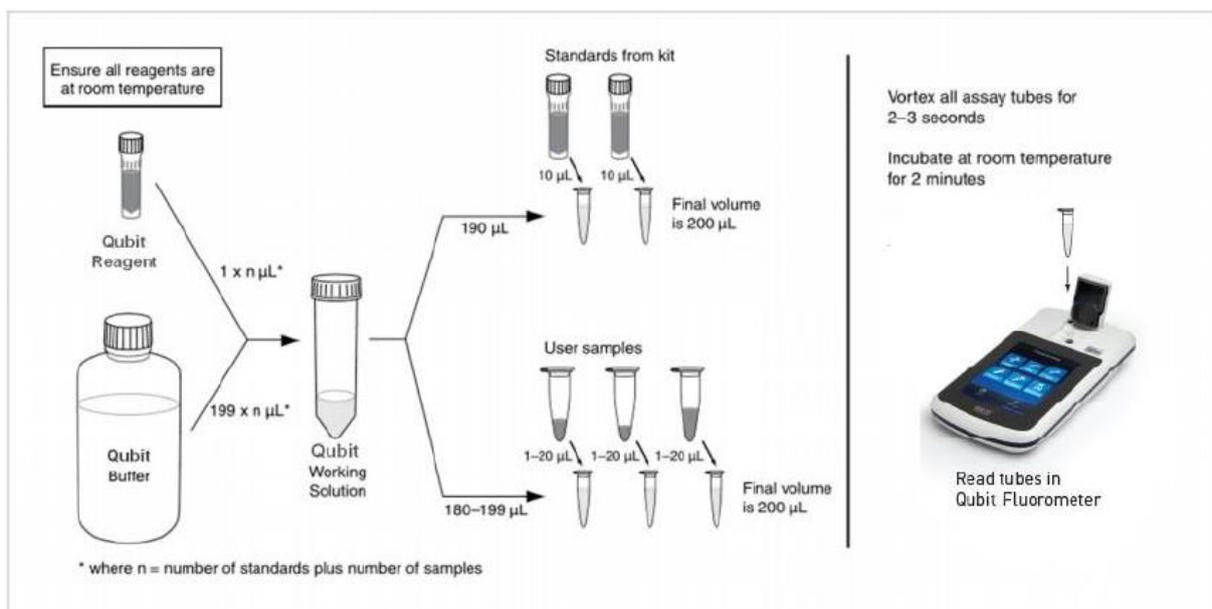


Figure 7 : Protocole du dosage d'ADN sur Qubit Fluorometer

## 2. Réaction de la chaîne polymérase (PCR)

La PCR, (*Polymerase Chain Reaction* ou réaction), est une technique d'amplification enzymatique qui s'effectue dans un thermocycleur, permettant d'obtenir un grand nombre de copies identiques d'un fragment d'ADN en utilisant des amorces spécifiques.

Le processus de synthèse de l'ADN nécessite la succession de nombreux cycles. Chaque cycle de PCR se passe en trois étapes, effectuées à températures différentes :

- La dénaturation thermique de l'ADN à 95°C. Les 2 brins de l'ADN se séparent par rupture des liaisons hydrogènes. Nous obtenons alors des matrices simple brin.
- Hybridation des amorces à 50°C-65°C. Les deux amorces contenues en large excès s'hybrident lorsqu'elles rencontrent les séquences complémentaires. La température permet aux liaisons hydrogènes de se reformer. Les amorces s'hybrident plus facilement que les longs brins d'ADN ainsi, plus la température d'hybridation est élevée, plus l'hybridation est sélective et spécifique.
- Elongation à 72°C. La Taq polymérase (ADN polymérase) catalyse la réplication à partir des ADN monocaténaire amorcés donc de façon sélective (sélectivité qui découle du choix des amorces).

On va s'intéresser à la recherche des mutations du gène BRAF. Deux couples d'amorces sont ainsi utilisés et représentés dans le tableau 3.

**Tableau 3 : Amorces utilisées pour la mise en évidence des mutations de gène BRAF**

Nom de l'amorce	Séquence nucléotidique
BRAF – F	5'-TCTAAGAGGAAAGATGAAGTACTATG -3'
BRAF – R	5'-AGACCTTCAATGACTTTCTAGTAA -3'

Le milieu réactionnel est préparé à partir d'une concentration d'ADN de 100 ng/μl selon les indications du tableau 4. Les conditions de PCR sont résumées dans le tableau 5.

**Tableau 4: Composition du milieu réactionnel pour la détection des mutations du gène BRAF**

<b>Mix PCR</b>	<b>Concentration initiale</b>	<b>Volume pour une réaction</b>
Tampon PCR	10X	10 $\mu$ l
dNTP	10 mM	2 $\mu$ l
Amorce F	10 $\mu$ M	2 $\mu$ l
Amorce R	10 $\mu$ M	2 $\mu$ l
Taq polymérase		0,4 $\mu$ l
Eau pure (qsp 50 $\mu$ l)	---	28,6 $\mu$ l
ADN amplifié	100ng/ $\mu$ l	5 $\mu$ l

**Tableau 5: Programme PCR de l'exon 4 du gène BRAF**

<b>Cycles</b>	<b>Temps</b>	<b>Température</b>
Dénaturation	5 min	94°C
Dénaturation	30 sec	94°C
Hybridation <b>×40</b>	45 sec	60°C
Elongation	1 min	72°C
Elongation finale	10 min	72°C
Conservation	$\infty$	8°C

### 3. Electrophorèse

Pour l'électrophorèse on doit préparer un gel d'agarose 2% (Voir annexes), et pour chaque échantillon on mélange 5  $\mu$ l du produit PCR avec 2  $\mu$ l de tampon de charge (voir annexes), donc on aura une migration des fragments d'ADN à 100 V selon leur tailles et charge (figure 8).

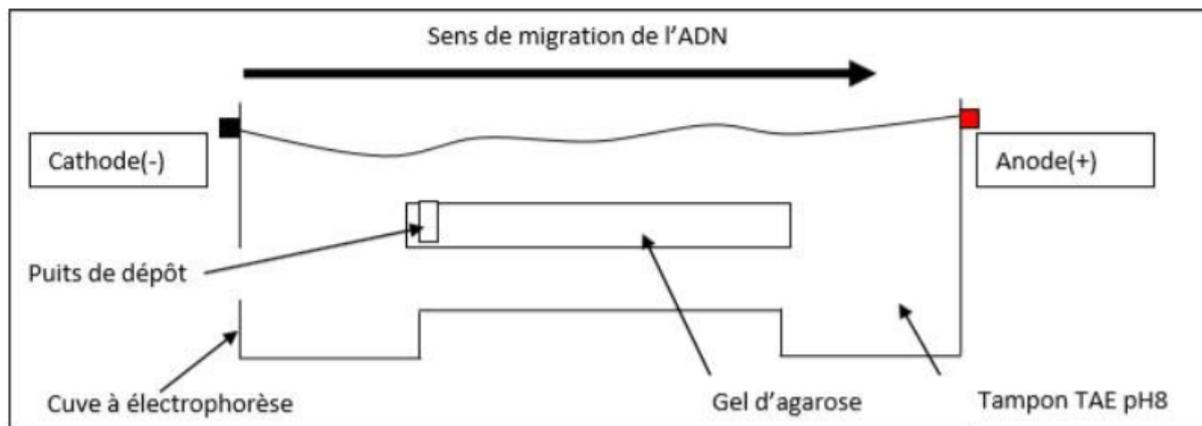


Figure 8 : sens de migration de l'ADN

#### a) Révélation et observation

Pour la révélation de l'ADN on va utiliser la méthode de révélation au bromure d'éthidium ou BET. Le bromure d'éthidium est généralement employé comme marqueur non radioactif pour identifier et visualiser des bandes d'acides nucléiques. Lorsqu'il est exposé à des rayonnements ultraviolets, il devient fluorescent avec une couleur rouge orangé, 20 fois plus intense lorsqu'il est lié à l'ADN.

Après la migration des bandes d'ADN, le gel est éclairé sous ultraviolet afin d'observer les bandes d'ADN fluorescentes.

Si la PCR est satisfaisante, on procède au séquençage dans le but de détecter les mutations du gène BRAF.

## 4. Séquençage

### a. Purification des produits de la PCR

Avant le séquençage, on doit purifier les produits PCR par un traitement à l'exo AP (Exonuclease and Shrimp alkaline phosphatase) en utilisant deux enzymes hydrolytiques, l'exonucléase I et la phosphatase alcaline. L'exonucléase I supprime les amorces simples brin résiduelles et tous les ADNs simple brin étrangers produits dans la PCR. La phosphatase alcaline supprime les dNTPs restant dans le mélange de la PCR. Donc on a ajouté, 2,5µl d'exoSAP directement à 5.5µl de produit PCR et on a incubé le tout était à 37°C pendant 30min. Le réactif ExoSAP était ensuite inactivé par un simple chauffage à 80°C pendant 30min.

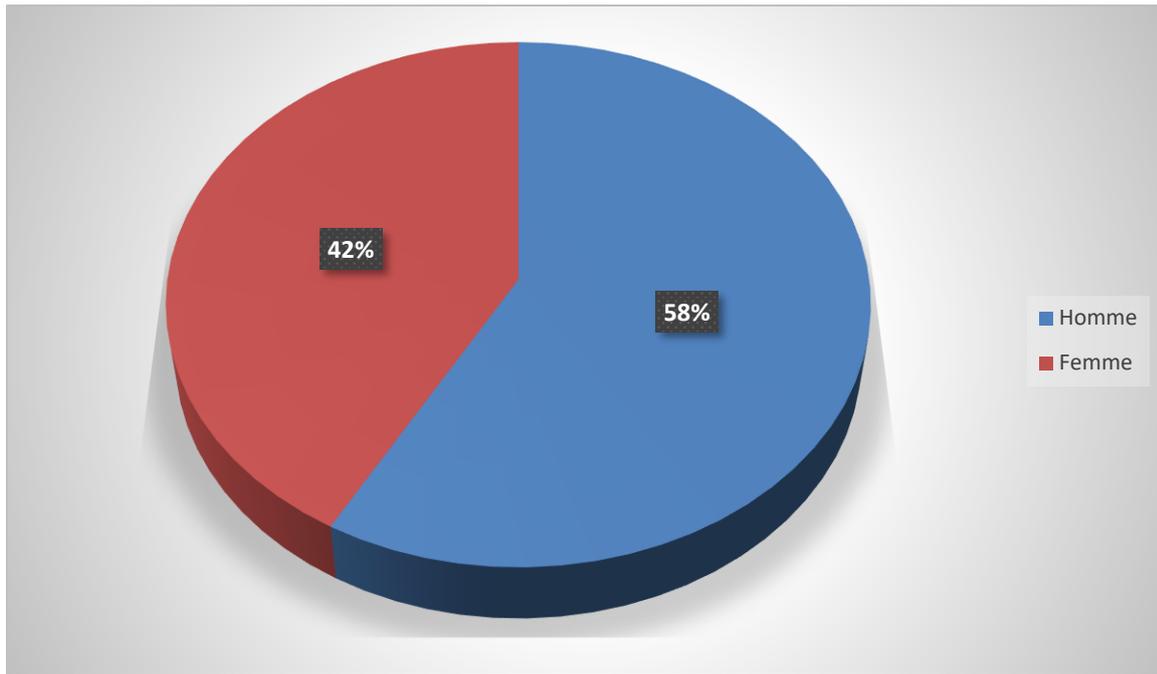
## Partie III : Résultats et discussion

### I. Epidémiologie descriptive des glioblastomes étudiés

Une étude prospective est menée sur 17 patients atteints de glioblastomes.

#### 1. Répartition des cas des glioblastomes selon le sexe

Dans la population étudiée, on trouve que le pourcentage des hommes atteints de glioblastomes est plus important 58,82% (10 patients) que celui des femmes 41,17% (7 patients).



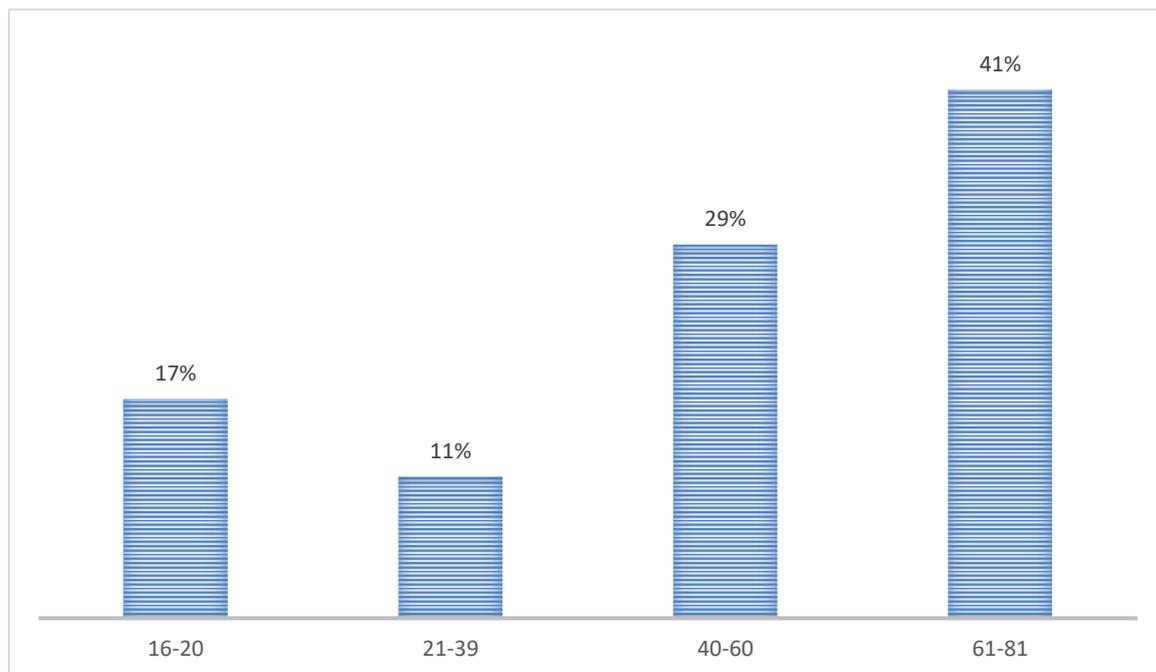
**Figure 9 : Répartition des cas de glioblastomes selon le sexe**

Ce résultat est compatible avec la plupart des études rapportant une prédominance masculine. Une équipe française a décrit un sexe ratio de 1,5 à 1,8 [25], alors que le service de neurochirurgie de l'Hôpital Universitaire Joseph Ravoahangy Andrianavalona à Madagascar a rapporté un sexe ratio de 1,2[26]. Une étude au Maroc a présenté une valeur de sexe ratio de 1,17 [27].

Alors on peut conclure que les hommes peuvent développer un glioblastome plus que les femmes. D'après The Journal of Clinical Investigation cette différence définit liée au sexe est dû à la présence de la protéine rétinoblastome qui participe au contrôle du cycle cellulaire, et réduit le risque de cancer, et qui est moins active dans les cellules du cerveau des hommes que dans les cellules du cerveau des femmes [28].

## **2. Répartition des cas des glioblastomes selon d'âge**

L'âge moyen des patients est 50,5 ans et 41% sont âgés de 61 à 81 ans (figure 10).



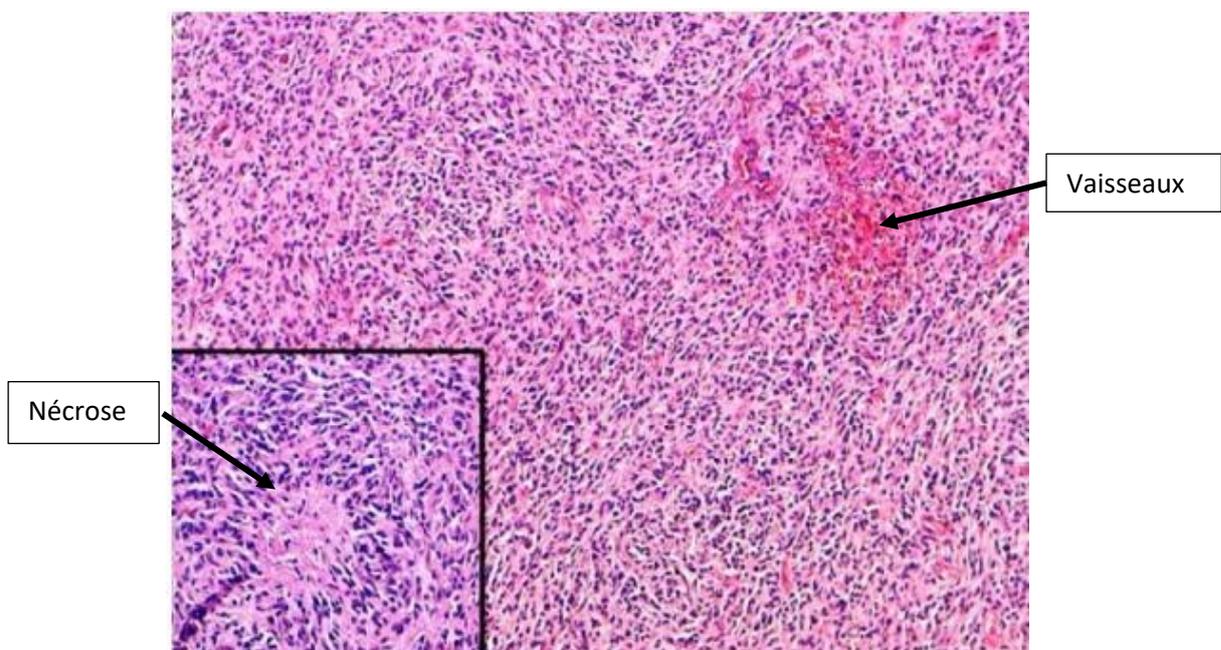
**Figure 10 : histogramme représentant la répartition des glioblastomes selon les tranches d'âges**

Notre étude montre que les glioblastomes peuvent se développer à tout âge et surtout chez les patients appartenant à la tranche d'âge [61-81], ce qui concorde avec la majorité des études, en effet les chercheurs Français Zouaoui et coll ont présenté un âge moyen de 52 ans [29], et une autre étude en Espagne a rapporté un âge moyen entre 59,5 ans [30], et au Maroc une étude a révélé un âge moyen de 52,4 ans avec un taux d'incidence élevé dans la tranche d'âge [50, 60 ans] [31].

## **II. Etude Histologique**

Sur le plan histologique, les glioblastomes sont caractérisés par une densité cellulaire élevée, des rapports cyto-nucléaires élevés et plusieurs mitoses atypiques. On peut détecter les phénomènes de nécrose et d'angiogenèse qui sont important à relever sur des coupes histologiques.

Dans cette étude une large discordance inter-observateurs a été notée qui donne un effet néfaste sur la prise en charge des patients, d'où l'intérêt de recourir à la recherche protéique par étude immunohistochimique. Ainsi, l'identification de nombreux biomarqueurs moléculaires a considérablement élargi l'utilisation de l'immunohistochimie et la biologie moléculaire et leur rôle capital dans la prise en charge des glioblastomes. En effet, elle est caractérisée par l'utilisation d'un large éventail d'anticorps associant des biomarqueurs spécifiques.



**Figure 11: Aspect histologique caractéristique d'un glioblastome**

### ***III. Etude Immunohistochimique***

Une étude immunohistochimique a été réalisée sur 17 cas.

**Tableau 6 : liste des patients inclus dans cette étude**

N° du patient	Sexe	Age	MSH2	MSH6
1	F	16	-	+
2	M	34	+	+
3	F	18	+	+
4	M	43	+	+
5	F	29	+	+
6	M	65	+	+
7	M	11	+	+
8	M	68	+	+
9	M	60	+	-
10	M	51	+	+
11	M	67	+	+
12	M	80	+	+
13	F	79	+	+
14	F	55	+	+
15	M	62	+	+
16	F	80	+	+
17	F	42	+	+



Résultat d'IHC négatif donc perte de la protéine



Résultat d'IHC positif donc la protéine est préservée

D'après ce tableau, on observe que la plupart des cas sont positifs avec un pourcentage de (88,23%), donc l'expression des deux protéines est conservée sauf chez le patient numéro 1

où on observe une perte d'expression de la protéine MSH2 et le patient numéro 9 qui présente une perte d'expression de la protéine MSH6 avec un pourcentage de (11,76%), et ces résultats concordent avec la majorité des études. D'après une étude française, le phénotype MSI est rarement présent dans une tumeur cérébrale avec un pourcentage de 1 à 5% [32], une autre étude a estimé l'incidence du phénotype MSI à 5,5% [33]. Alors Chrystelle Colas et al. ont rapporté un pourcentage de 32% de la présence du phénotype MSI dans les tumeurs cérébrales [34].

Le phénotype MSI est un puissant biomarqueur de l'efficacité de l'immunothérapie. En effet, il a été démontré récemment que le statut MSI+ (présence d'une instabilité microsatellitaire) est un critère indépendant de réponse à l'immunothérapie, quelque soit le type de cancer.

## Conclusion

Malgré les progrès actuels, les glioblastomes restent un problème majeur de santé publique vu leur gravité et les difficultés de traitement.

Leur diagnostic fait intervenir la radiologie pour assurer une bonne chirurgie et l'anatomopathologie basée sur les techniques histologique et immunohistochimique pour confirmer le diagnostic clinique. Mais la biologie moléculaire reste nécessaire pour la prise en charge du patient.

A travers notre étude nous nous sommes intéressés à la détermination du profil histologique, immunohistochimique des glioblastomes en utilisant un panel d'anticorps spécifiques (anti-MSH6 et anti-MSH2) pour révéler l'expression des deux protéines MSH6 et MSH2. En effet la perte d'expression de ces deux protéines caractérise le lignage tumoral.

Il est actuellement recommandé par les sociétés savantes de documenter une inactivation du système de réparation de l'ADN en biologie moléculaire par immuno-histochimie car la détection du phénotype MSI est un enjeu majeur dans l'immunothérapie et un facteur pronostic dans certains cas.

# Références bibliographiques

1. **Maillot**, *Encéphale et moelle épinière: Anatomie macroscopique et fonctionnelle* (2002),  
Maison d'addition : Springer Science & Business Media
2. **Jeannerod**, *Cerveau intime (Le)*. (2002), Maison d'édition : Odile Jacob
3. **Kolb, Whishaw, et Teskey**, *Cerveau et comportement*. (2019), Maison d'édition : De Boeck Supérieur.
  
6. **Ouedraogo Adama** « Maintenance de la myéline périphérique : physiologie et physiopathologie » (2015).
7. **Yves Agid, Xue Fan** « L'autre moitié du cerveau les cellules gliales » (2019).
8. **Chneiweiss Hervé** « Les astrocytes contrôlent la neurogenèse dans le système nerveux central adulte » (2002)
9. **S. Haberer ; A. Assouline ; J.-J. Mazeron** « Dose de tolérance à l'irradiation des tissus sains : encéphale et hypophyse » (7/2010).
10. **Steven A. Goldman** « Présentation des tumeurs cérébrales » (2021)
11. **Dr Daniel Gloaguen** « Une tumeur cérébrale (cancer du cerveau) » (2021)
13. **R. Djedid, O. Tomasi, A. Haidara 1, M. Rynkowski et F. Lefranc** « Traitement des glioblastomes à l'aube de 2010 »
14. **Ostrom, Q. T., Patil, N., Cioffi, G., Waite, K., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2020)**. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2013–2017
15. **koob, meriam, & girard, nadine. (2014)**. *Cerebral tumors: Specific features in children—ScienceDirect*
16. **Alentorn, A., Labussière, M., Sanson, M., Delattre, J.-Y., Hoang-Xuan, K., & Idbaih, A. (2013)**. Génétique et gliomes cérébraux. *La Presse Médicale*, 42
17. **Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvét A, Scheithauer BW, Kleihues P.** The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007
18. **Drs JEAN PHILIPPE BROULAND et ANDREAS F. HOTTINGER** Nouvelle classification OMS 2016 des gliomes : quels changements ? (2017)
19. **Pr Dominique FIGARELLA-BRANGER ; Pr Pascale VARLET ; Pr Franck BIELLE** LA CLASSIFICATION OMS 2021 DES TUMEURS DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL (2021)

- 20.C. Larsen** Anomalies génétiques et moléculaires des glioblastomes (GBM) (2010)
- 21.Marc Sanson** Marqueurs tumoraux des gliomes (2016)
- 22. Sophie Grandjouan** « p53, gène suppresseur de tumeur »
- 23.Agusti Alentorn, Marianne Labussière, Marc Sanson<sup>1</sup>, Jean-Yves Delattre, Khê Hoang-Xuan, Ahmed Idbaih** Génétique et gliomes cérébraux (2012)
- 24.Ada Collura<sup>1</sup>, Jérémie H. Lefevr, Magali Svrcek, David Tougeron, Aziz Zaanani, Alex Duval** Instabilité des microsatellites et cancer De l'instabilité du génome à la médecine personnalisée (2019)
- 25.H. Loiseau, A. Huchet, M. Rue, A. Cowppli-Bony, I. Baldi** Épidémiologie des tumeurs cérébrales primitives (2009)
- 26.RAKOTONDRAIBE Willy Francis, REFENO Valéry, BEMORA Synèse Joseph, RAMAROKOTO Mijoro, RATOVONDRAINNY Willy, RABARIJAONA Mamiarisoa, RAFARAMINO Florine, ANDRIAMAMONJY Clément** LES TUMEURS CEREBRALES OPEREES AU SERVICE DE NEUROCHIRURGIE DE L'HOPITAL UNIVERSITAIRE JOSEPH RAVOAHANGY ANDRIANAVALONA (2018)
- 27.L. EL-HAMRI, S.AIT BEN ALI, K. ANIBA** Prise en charge chirurgicale des tumeurs cérébrales Expérience de dix ans au service de neurochirurgie du CHU Mohammed VI de Marrakech (2014)
- 28. Robert Boston** The Journal of Clinical Investigation Aug. 1, 2014 Sexually dimorphic RB inactivation underlies mesenchymal glioblastoma prevalence in males
- 29. ZOUAOUI, RIGEAU V, MATHIEU-DAUDE H, DARLIX A, BESSAOUD F, FABBRO-PERAY P.** Recensement national histologique des tumeurs primitives du système nerveux central : résultats généraux sur 40 000 cas, principales applications actuelles et perspectives. France: Maloine (2012)
- 30.J Etxeberria , E San Román , R Burgui , M Guevara , C Moreno-Iribas , M J Urbina , E Ardanaz** Brain and Central Nervous System Cancer Incidence in Navarre (Spain), 1973-2008 and Projections for 2014 (2015)
- 31.Moulay Yassine Belghali, Saadia Ba-M'hamed, Brahim Admou, Maroua Brahimi, Mouna Khouchan** Caractéristiques épidémiologiques, cliniques, thérapeutiques et évolutives des patients atteints de glioblastome cérébral : série de cas pris en charge au centre d'oncologie du Centre Hospitalier Universitaire Mohammed VI de Marrakech en 2016 et 2017 (2021)
- 32.Ada Collura, Jérémie H. Lefevre, Magali Svrcek, David Tougeron, Aziz Zaanani, Alex Duval** Instabilité des microsatellites et cancer (2019)

**33. Clémentine Bouchez, Emmanuelle Kempf, Christophe Tournigand** Traitement des autres tumeurs solides métastatiques MSI/dMMR (2019)

**34. Bruno Buecher, Marine Le Mentec, François Doz, Franck Bourdeaut, Marion Gauthier-Villars, Dominique Stoppa-Lyonnet, Chrystelle Colas** Syndrome CMMRD (déficiency constitutionnelle des gènes MMR) : bases génétiques et aspects cliniques (2018)

**35. Bradshaw Amy, Wickremsekera Agadha, Tan, Peng Lifeng, Davis Paul F, Itinteang Tinte** Cancer Stem Cell Hierarchy in Glioblastoma Multiforme (2016)

**36. Tan, A. C., Ashley, D. M., López, G. Y., Malinzak, M., Friedman, H. S., & Khasraw, M.** Management of glioblastoma: State of the art and future directions (2020)

## Références webographique

4. <https://sante.journaldesfemmes.fr/fiches-anatomie-et-examens/2709448-cerveau-anatomie-role-fonctionschema-maladies-probleme-examens-medecin-specialiste/>

5. [https://www.scienceshumaines.com/atlas-du-cerveau\\_fr\\_28021.html](https://www.scienceshumaines.com/atlas-du-cerveau_fr_28021.html)

## *Annexes*

### **Annexe 1 : Préparation des solutions pour l'étude histologique**

### **Eau chlorhydrique 0.5%**

- On ajoute 0.5 ml de Hcl dans 100 ml de H<sub>2</sub>O distillée.

### **Eau ammoniacale**

- On ajoute 10 gouttes de solution d'ammoniac dans 100ml de H<sub>2</sub>O distillée.

## **Annexe 2 : Préparations pour la PCR**

### **Gel d'agarose à 2%**

- 1 g d'agarose.
- 50 ml de T.A.E (1X).  
Chauffage sous agitation jusqu'à ébullition et obtention d'un liquide transparent.
- Ajouter 2µl de B.E.T.

Couler dans un moule muni d'un peigne dont les empreintes formeront des puits au sein du gel servant au dépôt des échantillons à tester (produits PCR).

Après refroidissement (environ 30min), la moule est ensuite installée dans une cuve remplie du tampon de migration (TAE 1X).

### **Tampon de migration TAE 1X**

- Tris base 2,42g.
- Acide acétique glacial 5,71 ml.
- EDTA (0,5 M) 10 ml.

Pour préparer TAE 1X : 50 ml du TAE 10X et compléter jusqu'à 500 ml avec de l'eau distillée.

### **Solution de charge**

2 µl de Bleu de Bromophénol. C'est un colorant de charge qui permet de suivre visuellement l'avancée de la migration. Une fois mélangé à l'ADN, il densifie le mélange pour éviter l'échappement de l'ADN par les puits.