

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Animale

N° d'ordre :83/D3C/2019

N° de série :09/BA/2019



Thèse de Doctorat
Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat 3^{ème} cycle
Domaine : Biologie Animale
Option : Génétique Moléculaire

Présentée et soutenue par :

Benenemissi Ikram Hana

Intitulé :

**Étude génétique des gliomes :
étude des polymorphismes C677T de la MTHFR et
I/D de l'ACE chez une population de l'Est algérien
atteinte de gliome**

Membres du jury :

Président :	Tebibel Soraya	Professeur	Université Frères Mentouri Constantine 1
Directrice de thèse :	Satta Dalila	Professeur	Université Frères Mentouri Constantine 1
Examineurs :	Abadi Nouredine	Professeur	Université Salah Boubnider Constantine 3
	Chaoui Naouel	MCA	Université Frères Mentouri, Constantine 1
	Sifi Karima	MCA	Université Salah Boubnider Constantine 3

Année Universitaire

2018-2019

REMERCIEMENTS

Mmes et Mrs les membres du jury : Pr Tebibel Soraya et Mme Chaoui Naouel de l'université Constantine 1, Pr Abadi Nouredine et Pr Sifi Karima de l'Université Constantine 3 :

Je vous remercie de m'avoir honoré en acceptant de juger ce modeste travail, de l'enrichir par vos remarques précieuses et de lui donner de potentielles perspectives grâce à vos appréciations constructives.

Madame la Professeure Dalila Satta, directrice de thèse, professeur à l'Université de Constantine 1 , Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Département de Biologie Animale :

Je vous remercie vivement d'avoir accepté de diriger ce travail. Pour vos apports considérables, conseils précieux et orientations avisées, mais aussi pour votre soutien, patience et indulgence, veuillez trouver ici, cher maître, l'expression de ma profonde gratitude, mon respect et ma reconnaissance.

Monsieur le Professeur Nourredine Abadi, Laboratoire de Biologie et Génétique Moléculaire, Université de Constantine 3, CHU Ben Badis Constantine :

Je vous remercie de m'avoir accueilli au sein du laboratoire de biologie et génétique moléculaire, CHU Ben Badis Constantine, et mis à ma disposition les moyens nécessaires afin que je puisse réaliser ce modeste travail et apporter ainsi ma contribution, aussi petite soit-elle, dans l'avancée de la recherche dans le domaine de recherche en cancérologie. Je vous remercie également pour votre modestie et encouragements.

Madame la professeure Karima Sifi, Laboratoire de Biologie et Génétique Moléculaire, Université de Constantine 3, CHU Ben Badis Constantine :

Je vous remercie infiniment pour les efforts immenses que vous avez fournis et qui m'ont guidé dans mes recherches, pour votre disponibilité avérée, vos conseils avisés, vos précieuses orientations ainsi que pour l'intérêt soutenu que vous n'avez cessé de manifester à l'égard de mon travail et ce tout le long de ma présence au niveau du laboratoire de biologie et génétique moléculaire, CHU Ben Badis Constantine.

Dr Sahli Mohamed Lakhdar, Service de Neurochirurgie HMRUC :

Je vous remercie de vous avoir fortement intéressé à mon travail et vous avoir pleinement impliqué dans sa réalisation en ne ménageant aucun effort pour mettre à ma disposition tous les moyens nécessaires. Je vous en suis très reconnaissante Docteur, de m'avoir apporté votre aide si précieuse au moment où j'en avais le plus besoin.

Dre Imene Deneche et Dr Chaib Mohamed, épidémiologues à l'Observatoire Régional de la Santé Est et Service Epidémiologie du CHU de Constantine :

Je vous remercie vivement pour votre aide si précieuse et votre collaboration fructueuse dans l'analyse statistique de la présente étude.

Dre Boudraa Bouchra et Dr Bougrara Walid médecins spécialistes en radiothérapie au niveau du service CAQ, CHU Constantine. Dr Amran Mohamed Hacene, service de neurochirurgie au CHU Batna. Dr Sahli Brahim, Oncologue et Radiothérapeute au niveau de la clinique Anti Cancer Athéna, Constantine :

Je vous remercie pour votre contribution et pour les facilitations que vous m'avez accordé pour la réalisation de ce travail.

Dr Mehdi Bouzid, Directeur de la clinique Anti Cancer Athéna, Constantine :

Je vous remercie vivement d'avoir accepté sans la moindre hésitation à mettre à ma disposition tous les moyens matériels et humains dont dispose la clinique.

Pre Ouahioune, Dr. Yousfi, Dr. Moulai et Dr. Guermi, Service Anatomie Pathologique du CHU Frantz Fanon, Blida :

Je vous remercie pour votre accueil, implication, engagement et en particulier, votre mobilisation pour mettre à ma disposition le matériel génétique (échantillons de tissus) de patients atteints de gliomes.

Mme Semmam Ouarda, enseignante à l'Université de Constantine, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Département de Biologie Animale :

Veillez trouver ici l'expression de ma gratitude et ma reconnaissance pour votre aide, votre disponibilité et vos encouragements.

Melle Belatreche Moufida, enseignante à l'Université de Constantine, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Département de Biologie Animale :

Je vous remercie amplement pour votre contribution matérielle dans la réalisation de ce travail.

Mr Dehimet L Doyen, Mr Rouabeh vice Doyen Responsable de la Recherche Scientifique et Mr Madaci B. chef de département de biologie animale, Université Constantine 1, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie :

Mes grands respects et remerciements quant aux efforts que vous ne cessez de fournir autant sur le plan facilitations administratives que sur le plan mise à la disposition des étudiants en poste graduation, des moyens matériels et humains pour qu'ils puissent mener à bien et à terme leurs travaux de recherches. Veuillez trouvez ici, Messieurs, ma reconnaissance et ma gratitude.

Mr Rezgoun, Professeur à l'Université Constantine, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie :

Mes remerciements pour votre mobilisation, disponibilité mais surtout pour vos encouragements que vous n'avez jamais cessé de formuler au profit de l'ensemble des étudiants.

Tous les enseignants de l'Université Constantine 1, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie:

Ma gratitude distinguée pour tous les efforts que vous avez fournies pour notre formation ainsi que pour tous les sacrifices que vous avez fait dans un seul objectif : nous inculquer le meilleur de vous-même.

À tout le personnel œuvrant au sein du laboratoire de biologie et génétique moléculaire, UC3, CHU Ben Badis Constantine et aussi le laboratoire de Chimie Hormonale, CHU Constantine, en particulier Mme Messaouda Bouchareb: je vous remercie pour votre aides et apports lors des manipulation effectuée au sein du laboratoire. Mme Yasmina Dadssi : je vous remercie pour votre implication dans les extractions d'ADN.

Au Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, UC1, et Laboratoire de Biologie et Génétique Moléculaire, UC3, CHU Ben Badis Constantine :

Mes profonds remerciements pour le financement de cette recherche.

A tous les patients atteints de Gliomes, qui ont contribué par leurs échantillons de sangs ou de tissus à cette étude :

Veillez trouvez ici ma gratitude et mon éternelle reconnaissance mais surtout mon admiration sans égale. En dépit de vos souffrances et vos lourds combats contre la maladie, vous continuez, par la donation de votre sang et votre tissu, non seulement à garder espoir dans la recherche scientifique, mais aussi et surtout, vous contribuez fortement à son avancée.

Enfin, je tiens à témoigner de ma profonde reconnaissance à tout ceux qui m'ont aidé durant la réalisation de ce travail et qui m'ont permis de renforcer mes fondamentaux sur les principes et l'éthique de la recherche scientifique, à ceux qui m'ont appris que la morale doit impérativement guider les pas de la recherche pour que la science, puisse veiller sur le bien être de l'Humanité, à ceux qui m'ont inculqué que la grandeur des Hommes est doublement appréciée quant, dans leurs plus durs combats de vie et de survie, ils n'hésitent pas à agir au service d'une noblesse suprême qui n'est rien d'autre que la généreuse Humanité.

A toutes ces personnes, merci.

A tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à réaliser ce travail, veuillez trouver ici ma reconnaissance, gratitude et mon humble remerciement.

DÉDICACES

À mon défunt Grand-père...

Qui a dorloté mon enfance et a inspiré ma jeunesse

Qui a dessiné par sa grande magie, mes passions et mes modestes prouesses

Pour qui, noblesse de l'esprit rime avec tant de sagesse.

À ma Grand-Mère...

Qui a déployé amour et affection pour m'éduquer, m'instruire et me guider dans la vie et qui continue toujours à le faire.

À mes chères tantes : Mouna, Sana et Soumeya, qui, par leurs amour, mobilisation, engagement et encouragement, mais surtout patience, m'ont appris que partager les soucis de notre parcours dans la vie, c'est multiplier les bonheurs des contours de celle-ci.

A mes oncles : Jamel, Hocine, Mohamed et Ahcene, qui ont su, par leurs modestie, gentillesse, dévouement, et leurs grande vertu, aiguïser mes sens et combler ma vie.

À ma fierté de frère... pour qui les mots restent éternel apprenti, émerveillés devant l'immensité de sa sagesse, la générosité de sa noblesse et la captivité de sa délicatesse.

À mes parents ... qui m'ont toujours encouragé.

À toute ma famille... dont le soutien est sans merci et l'implication est fort récit.

Qu'ils puissent trouver dans ce modeste travail, ma gratitude et mon éternelle reconnaissance.

TABLE DES MATIERES

Intitulé	Page
LISTE DES FIGURES	i
LISTES DES TABLEAUX.....	iv
LISTES DES ABRÉVIATIONS.....	vi
RÉSUMÉ FRANÇAIS.....	vii
RÉSUMÉ ARABE.....	viii
RÉSUMÉ ANGLAIS.....	ix
CHAPITRE 1	
INTRODUCTION – PROBLÉMATIQUE.....	1
CHAPITRE 2	
REVUE DE LA BIBLIOGRAPHIE	4
2.1 Les gliomes.....	4
2.1.1 Classification des gliomes.....	4
2.1.2 Epidémiologie.....	6
2.1.3 Altérations génétiques au cours de la gliomagénèse.....	15
2.1.4 Corrélations entre les altérations moléculaires et la classification histologique des gliomes.....	19
2.1.5 Facteurs de risque des gliomes	23
2.1.6 Prise en charge des gliomes.....	24
2.2 La Méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR).....	26
2.2.1 Les folates.....	26
2.2.2 L'homocystéine.....	30
2.2.3 La MTHFR.....	33

2.2.3.1 Le gène de la MTHFR.....	33
2.2.3.2 Le polymorphisme C677T de la MTHFR.....	34
2.2.3.3 Epidémiologie du polymorphisme C677T de la MTHFR.....	34
2.2.3.4 Association polymorphisme C677T de la MTHFR et pathologies	35
2.2.3.5 Association polymorphisme C677T de la MTHFR et cancers.....	36
2.3 L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE).....	38
2.3.1 Système rénine angiotensine.....	39
2.3.2 Structure et fonctions de l'ACE.....	43
2.3.3 Gène de l'ACE.....	43
2.2.4 Association polymorphisme I/D de l'ACE et cancers.....	44
 CHAPITRE 3	
MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	46
3.1 Populations étudiées	46
3.2 Prélèvements tissulaires	46
3.2.1 Coupes des échantillons	46
3.2.2 Vérification de la qualité des échantillons	47
3.3 Prélèvements sanguins	48
3.4 Protocole d'extraction d'ADN tissulaire	48
3.5 Protocole d'extraction d'ADN sanguin	52
3.6 Réaction de polymérase en chaîne	53
3.7 Détermination du polymorphisme C677T de la MTHFR.....	55
3.8 Détermination du polymorphisme I/D de l'ACE	58
3.9 Considérations éthiques.....	60
3.10 Étude statistique	60

CHAPITRE 4

RÉSULTATS	61
4.1 Caractéristiques épidémiologiques des cas de gliomes du CHU de Blida.....	61
4.2 Caractéristiques épidémiologiques des cas de gliomes du CHU de Constantine.....	67
4.3 Résultats d'extraction de l'ADN tissulaire	71
4.4 Résultats de l'analyse génétique	72
4.4.1 Étude du polymorphisme C677T de la MTHFR.....	72
4.4.2 Étude du polymorphisme I/D de l'ACE.....	79

CHAPITRE 5

DISCUSSION	85
5.1 Données épidémiologiques	85
5.2 Données génétiques	89
5.2.1 Techniques d'extraction d'ADN	89
5.2.2 Polymorphisme C677T de la MTHFR.....	90
5.2.3 Polymorphisme I/D de l'ACE.....	92

CHAPITRE 6

PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS.....	97
BIBLIOGRAPHIE.....	99
ANNEXES.....	112
Annexe 1 : Formulaire de Consentement	112
Annexe 2 : Questionnaire	113
Annexe 3 : Composition des réactifs utilisés	114
Annexe 4 : Préparation du gel d'agarose 3% pour contrôle de PCR	115

Annexe 5 : Article 1 :	
Apport de la biologie moléculaire dans la classification des gliomes	116
Annexe 6 : Article 2 :	
Le polymorphisme C677T de la MTHFR et le risque de gliome chez une population de l'Est Algérien	123
Annexe 7 : Article 3	
Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion gene polymorphisms and the risk of glioma in an Algerian population.....	128
GLOSSAIRE DES TERMES STATISTIQUES	134

LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	Page
Figure 1 :	Incidence annuelle moyenne ajustée selon l'âge de toutes les tumeurs cérébrales primaires et autres tumeurs du SNC comparé aux autres cancers courants chez les enfants âgés de 0-14 ans (A), adolescents et jeunes adultes âgés de 15-39 ans (B) et personnes âgées de plus de 40 ans (C), selon les estimations du CBTRUS 2011-2015.....	7
Figure 2 :	Distribution de toutes les tumeurs cérébrales primaires et autres tumeurs du SNC selon les groupes histologiques (N = 392 982) (A), et les cancers primitifs cérébraux et autres tumeurs malignes du SNC selon les groupes histologiques (N = 121 277) (B).....	8
Figure 3 :	Distribution des gliomes selon le type histologique (Données des 102,086 cas, CBTRUS 2011-2015).....	9
Figure 4 :	Localisation des différents cancers, Registre des cancers de la Wilaya de Constantine	14
Figure 5 :	Algorithme simplifié de la classification des gliomes diffus selon l'OMS 2016, basés sur les données histologiques et génétiques.....	22
Figure 6 :	Structure de l'acide folique et du 5-méthyltétrahydrofolate.....	27
Figure 7 :	Métabolisme des folates et de la Méthionine.....	28
Figure 8 :	Rôle des folates en cancérogenèse	29
Figure 9 :	Structure de la méthionine, homocystéine, homocystéine-thiolactone et N-/S-homocystéinylation des protéines.....	30
Figure 10 :	Métabolisme de l'homocystéine et son interaction avec l'acide folique et les vitamines.....	32
Figure 11	Localisation du gène de la MTHFR sur le chromosome 1	33
Figure 12 :	Système Rénine – Angiotensine - Aldostérone.....	40
Figure 13 :	Diagramme du gène de l'ACE avec localisation des 10 polymorphismes bi alléliques analysés par Keavney et les 7 polymorphismes bi alléliques analysé par Zhu	44
Figure 14 :	Actions oncogéniques de l'ACE dans le cancer et inhibition de ces effets par les inhibiteurs de l'ACE	45

Figure 15 :	Les étapes de la PCR-RFLP.....	53
Figure 16 :	Profil électro phorétique des fragments amplifiés par PCR du gène MTHFR sur un gel d'agarose 2%.....	57
Figure 17 :	Profil électro phorétique des fragments digérés par l'enzyme HinfI sur un gel d'agarose 3%.....	57
Figure 18 :	Profil électro phorétique des fragments amplifiés par PCR du polymorphisme ACE I/D sur un gel d'agarose 2%.....	59
Figure 19 :	Répartition selon les tranches d'âge des 59 cas de gliomes du CHU de Blida	62
Figure 20 :	Répartition selon le type histologique des 59 cas de gliomes du CHU de Blida	64
Figure 21 :	Répartition selon le sexe et le type histologique des 59 cas de gliomes du CHU de Blida	65
Figure 22 :	Répartition selon la moyenne d'âge et le type histologique des 59 cas de gliomes du CHU de Blida	66
Figure 23 :	Répartition des 36 cas de gliomes du CHU de Constantine selon leurs origines	69
Figure 24 :	Répartition selon le type histologique des 36 cas de gliomes du CHU de Constantine	70
Figure 25 :	Coupes histologiques après coloration HES observées au microscope	71
Figure 26 :	Répartition de la population de l'étude du polymorphisme C677T de la MTHFR selon le sexe	73
Figure 27 :	Pourcentage des fumeurs dans la population de l'étude du polymorphisme C677T de la MTHFR	74
Figure 28 :	Antécédents familiaux de gliome chez les 36 cas de patients et 136 témoins	75
Figure 29 :	Fréquence génotypique du polymorphisme C677T de la MTHFR chez les 36 cas de gliomes et leurs témoins	76
Figure 30 :	Fréquence de l'allèle T de la MTHFR chez les 36 cas de gliomes et leurs témoins	76
Figure 31 :	Fréquence de l'allèle C de la MTHFR chez les 36 cas de gliomes et leurs témoins	77

Figure 32 :	Répartition de la population de l'étude du polymorphisme I/D de l'ACE selon le sexe	80
Figure 33 :	Pourcentage des fumeurs dans la population de l'étude du polymorphisme I/D de l'ACE	80
Figure 34 :	Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme I/D de l'ACE chez une population de l'est Algérien atteinte de gliomes vs population saine	82
Figure 35 :	Fréquence de l'allèle D du polymorphisme I/D de l'ACE chez les 36 cas de gliomes et leurs témoins	83
Figure 36 :	Fréquence de l'allèle I du polymorphisme I/D de l'ACE chez les 36 cas de gliomes et leurs témoins	83
Figure 37 :	Distribution des gliomes selon le type histologique dans les séries Américaine et Algérienne	87

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titre	Page
Tableau 1 :	Classification des gliomes selon l’OMS	5
Tableau 2 :	Distribution des cas de gliomes selon la classification histologique de l’OMS des données du CBTRUS	10
Tableau 3 :	Taux de survie relative des gliomes selon le type histologique	11
Tableau 4 :	Intérêt des Marqueurs génétiques dans la prise en charge des gliomes ..	19
Tableau 5 :	Les différentes pathologies associées au polymorphisme C677T de la MTHFR.....	36
Tableau 6 :	Les différents cancers associés au polymorphisme C677T de la MTHFR	37
Tableau 7 :	Technique d’extraction d’ADN tissulaire au Phénol Chloroforme décrite par Pikor	49
Tableau 8 :	Technique d’extraction d’ADN tissulaire au Phénol Chloroforme décrite par Sengüven.....	50
Tableau 9 :	Technique d’extraction d’ADN tissulaire décrite par Vaziri-Gohar	51
Tableau 10 :	Technique d’extraction d’ADN leucocytaire	52
Tableau 11 :	Programme suivi pour la PCR afin d’identifier les polymorphismes de la MTHFR	56
Tableau 12 :	Programme suivi pour la PCR afin d’identifier les polymorphismes de l’ACE	58
Tableau 13 :	Caractéristiques épidémiologiques de 59 cas de gliomes du CHU de Blida	61
Tableau 14 :	Répartition selon le type histologique des 59 cas de gliomes du CHU de Blida	63
Tableau 15 :	Caractéristiques épidémiologiques des 36 cas de gliomes du CHU de Constantine	67
Tableau 16 :	Caractéristiques des deux populations patients et témoins de l’étude du polymorphisme C677T de la MTHFR	72

Tableau 17 :	Distribution allélique et génotypique du polymorphisme C677T de la MTHFR chez les cas de gliomes du CHU de Constantine vs population saine	74
Tableau 18 :	ORs et intervalles de confiance 95% de l'association entre le polymorphisme C677T de la MTHFR et le risque de gliome	78
Tableau 19 :	Caractéristiques des deux populations patients et témoins de l'étude du polymorphisme I/D de l'ACE	79
Tableau 20 :	Distribution des fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme I/D de l'ACE chez les cas de gliomes du CHU de Constantine vs population saine.....	80
Tableau 21 :	Odds Ratios et intervalles de confiance de l'association du polymorphisme I/D de l'ACE et le risque de gliome.....	84
Tableau 22 :	Comparaison entre les données épidémiologiques de la population Algérienne de gliomes et celle des données Américaines et Françaises	86

LISTE DES ABREVIATIONS

ACE	: Enzyme de conversion de l'angiotensine
ATRX	: alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked
CBTRUS	: <i>Central Brain Tumor Registry of the United States</i>
CIMP	: <i>CpG-island methylator phenotype</i>
EGFR	: <i>epidermal growth factor receptor</i>
GBM	: Glioblastome
IDH	: <i>isocitrate déshydrogénase</i>
IHC	: immunohistochimie
LOH	: <i>loss of heterozygosity</i>
MGMT	: méthyl-guanine-DNA-méthyl-transférase
MTHFR	: Méthylène Tétra Hydrofolate Réductase
OA	: oligodendrogliomes anaplasiques
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
PI3K	: phosphatidylinositol 3-kinase
PTEN	: <i>phosphatase and tensin homolog</i>
SNC	: Système Nerveux Central
TERT	: <i>telomerase reverse transcriptase</i>
TCGA	: <i>The cancer genome Atlas</i>
TP-53	: <i>tumor suppressor protein p53</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

Résumé

Les gliomes sont des tumeurs primitives du cerveau de pronostic sombre. Les glioblastomes représentant environ 56,6 % des gliomes avec une survie relative très faible, seulement 5,6% des patients survivent 5 ans après le diagnostic.

Plusieurs évidences ont démontré le rôle crucial que jouent les facteurs génétiques dans le développement des gliomes. Ces dernières décennies, l'évolution de la recherche en cytogénétique et en biologie moléculaire a pu élucider en grande partie, les mécanismes moléculaires de la gliomagenèse dont l'impact est multiple : diagnostic, pronostic, mais également thérapeutique permettant de prédire les réponses aux différentes thérapies ciblées proposées.

Notre étude de type cas/témoin a porté sur deux polymorphismes génétiques à savoir le polymorphisme C677T de la MTHFR et le polymorphisme I/D de l'ACE sur échantillon sanguin.

Les résultats obtenus ont montré que le génotype TT du polymorphisme C677T de la MTHFR est associé à un risque élevé de genèse d'un gliome chez la population étudiée de l'Est algérien. La présence de l'allèle T pourrait être un facteur de risque contribuant au développement des gliomes chez cette population.

Il a été également trouvé que le génotype DD de l'ACE est associé à un risque accru de gliome chez la même population.

Ces résultats nous permettent de proposer l'étude de ces gènes à visée thérapeutique en particulier par l'usage des inhibiteurs de l'ACE et la substitution en folate et méritent une confirmation par la réalisation d'autres études approfondies regroupant un échantillon plus important de patients atteints de gliomes.

Mot clés : gliomes, polymorphisme C677T de la MTHFR, polymorphisme I/D de l'ACE.

ملخص

تعتبر الأورام الدبقية (gliome) أورام بدائية للدماغ عتيمة التشخيص، وتمثل الأورام الأومية الدبقية (glioblastome) نسبة 56% من هذه الأورام مع بقاء نسبي على قيد الحياة بمستوى ضعيف جدا ، حيث 5.6% فقط من المرضى بإمكانهم بالكاد الحياة لمدة 5 سنوات بعد التشخيص.

وقد أثبتت عدة أدلة الدور الهام الذي تلعبه العوامل الوراثية في تطور الأورام الدبقية. فقد استطاع تقدم الأبحاث في السنوات الأخيرة في مجال علم الوراثة الخلوية والبيولوجية، أن يوضح إلى حد كبير الآليات الجزيئية لتكون الورم الدبقي (gliomagenese)، والتي لها آثار وتبعات متعددة من حيث التشخيص و العلاج، مما يسمح بالتنبؤ للاستجابات لمختلف العلاجات المستهدفة والمقترحة.

في هذا السياق، يتطرق بحثنا من نوع حالة/ شاهد، إلى دراسة نوعين من التعدادات الشكلية (polymorphismes): التعدد الشكلي MTHFR C677T والتعدد الشكلي ACE I/D وهذا لعينة دموية.

أوضحت النتائج المتحصل عليها على أن النوع الجيني TT للتعدد الشكلي MTHFR C677T مرتبط ارتباطا قويا وعاليا بخطر تكوين الورم الدبقي كما أن وجد الألال T ، قد يكون عامل خطر يساهم في تطور الورم الدبقي في مجتمع الدراسة المأخوذ من الشرق الجزائري . وأوضحت النتائج أيضا أن النوع الجيني ACE DD مرتبط هو الآخر بخطر متزايد لتكوين الورم الدبقي.

تسمح لنا هذه النتائج باقتراح هذه الجينات لغرض العلاج بإستعمال مثببات ACE والاستبدال بحمض الفوليك وتستحق التأكيد والتثبيت من خلال إجراء المزيد من الدراسات المعمقة التي تضم عينة أكبر من المرضى المصابين بالورم الدبقي

الكلمات المفتاحية : الأورام الدبقية ، التعدد الشكلي MTHFE C677T ، التعدد الشكلي ACEI/D ،

Abstract

Gliomas are the most common primary intraparenchymal tumors of the central nervous system with a very poor prognosis. Glioblastoma accounts for the majority of gliomas (56,6%). Relative survival estimates for glioblastoma are quite low; 5.6% of patients survived five years post diagnosis.

Several evidences demonstrate the importance role of genetic factors in glioma development. The evolution of cytogenetic and molecular biology researches, has largely elucidated the molecular mechanisms of gliomagenesis, which have a lot of impact in diagnosis, prognosis, and therapeutic to predict responses to different therapies proposed.

Our case-control study will focus on two genetic polymorphisms: The C677T polymorphism of MTHFR and the I / D polymorphism of ACE on blood sample.

The results obtained was:

- the genotype TT of C677T MTHFR polymorphim is highly associated with high genesis of glioma in East-Algerian population. The presence of T allele may contribute to development of glioma in this population.
- the DD genotype of I/D ACE polymorphism in associated with high risk to develop glioma in our population.

These results allow us to propose the study of these genes for therapeutic (use of ACE inhibitors and folate substitution) and deserve confirmation by the realization of other studies involving a larger sample of glioma patients.

Keywords: glioma, C677T polymorphism of MTHFR, I/D ACE polymorphism.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les gliomes sont les plus fréquentes des tumeurs primitives du cerveau [1-13]. Le dernier rapport du *Central Brain Tumor Registry of the United States (CBTRUS)* paru en 2018, répertoriant les données statistiques Américaines des tumeurs primitives du cerveau et les autres tumeurs cérébrales du système nerveux central (SNC) diagnostiquées entre 2011 et 2015, avait recensés durant cette période plus de 100 000 cas de gliomes. Ces cas représentaient 26% de l'ensemble des tumeurs primitives cérébrales et les autres tumeurs du SNC, et 81% des tumeurs malignes. Les glioblastomes (GBM) étaient le type histologique le plus fréquent (56,6 % de l'ensemble des gliomes). Ces derniers ont une survie relative très faible ; seulement 5,6% des patients survivent 5 ans après le diagnostic [9].

En Algérie, le registre national des cancers est en cours de constitution, et ce, selon le premier plan national quinquennal (2015-2019) anti cancer lancé par le Ministère de la Santé de la Population et de la Réforme Hospitalière (MSPRH) Algérien. Selon le registre des cancers de la Wilaya de Constantine, 1292 cas de cancers (497 hommes, 795 femmes) ont été recensés en 2016 dans la Wilaya avec une incidence standardisée de 111,7 cas et 161,6 cas/ 100 000 habitants chez les hommes et les femmes respectivement [14].

Chez les femmes Constantinoises, les localisations cérébrales se situent à la 7^{ème} position et représentant 2,3% de l'ensemble des cancers de la femme, avec une incidence standardisée de 2,1/10⁵. Chez les hommes Constantinois, les localisations cérébrales sont à la 8^{ème} position, représentant 3,8% de l'ensemble des cancers de l'homme, avec une incidence standardisée de 5,4/10⁵. Chez les enfants et les adolescents de la même région âgés de moins de 15 ans, les tumeurs du SNC représentaient 8,3% des cancers chez les filles et 4,5% des cancers chez les garçons en 2014[15].

Plusieurs évidences ont démontré le rôle crucial que jouent les facteurs génétiques dans le développement des gliomes. L'évolution de la recherche en cytogénétique et en biologie moléculaire a pu élucider en grande partie, ces dernières décennies, les mécanismes moléculaires de la gliogénèse dont l'impact est multiple : diagnostic, pronostic, mais également thérapeutique, permettant de prédire les réponses aux différentes thérapies ciblées proposées.

Ces nouvelles avancées dans la compréhension des mécanismes moléculaires et génétiques impliqués dans le développement des gliomes ont contraint l'Organisation Mondiale de la Santé à revoir sa classification des gliomes de 2007 basée sur les données histologiques et l'a enrichie en 2016 par les données de la biologie moléculaire [3, 4]. Parmi les anomalies géniques à rechercher **les mutations du gène codant pour l'isocitrate-déshydrogénase IDH 1 et 2**, enzymes impliquées dans un certain nombre de processus métaboliques tels que la transduction du signal, la synthèse des lipides, le stress oxydatif et la respiration oxydative, et la **perte d'hétérozygotie LOH 1p/19q** dont la conséquence est une inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs [16].

Par ailleurs d'autres gènes candidats impliqués dans la gliomagénèse sont en cours d'étude dont le gène méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) et le gène codant pour l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE). Le rôle exact de ces gènes et leurs impacts dans la prise en charge des gliomes restent à préciser.

En effet, le métabolisme du folate joue un rôle important dans la cancérogenèse en raison de son implication dans la méthylation de l'ADN et la synthèse des nucléotides. La MTHFR occupe une position charnière, en équilibrant l'homéostasie entre la synthèse d'ADN et la méthylation. Le polymorphisme C677T de la MTHFR a été lié à la progression de plusieurs cancers, mais les résultats restent peu concluants quant à son association avec les gliomes et ce, du fait de la rareté des études [17].

En outre, le polymorphisme insertion/délétion (I/D) de l'ACE a été associé à la pathogénie et la progression de plusieurs cancers dont les cancers du poumon, le sein, la prostate, le larynx, les cancers digestifs et récemment le cerveau [17]. Plusieurs études avaient démontré que les inhibiteurs de l'ACE réduisaient l'incidence du cancer et peuvent protéger contre le cancer. Leur effet sur les cellules tumorales pourrait être attribué à leur effet sur la réduction de la prolifération cellulaire et la migration, l'inflammation et l'angiogénèse. D'autres recherches

ont rapporté une inhibition de l'activité des métalloprotéases de la matrice cellulaire et une réduction de l'expression du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) par les inhibiteurs de l'ACE [18].

Les objectifs principaux de la présente étude sont :

- ✓ l'évaluation de la possibilité de l'association entre le polymorphisme C677T de la MTHFR et les gliomes chez une population de l'Est Algérien.
- ✓ l'évaluation de la possibilité de l'association entre le polymorphisme I/D de l'ACE et les gliomes chez une population de l'Est Algérien.
- ✓ la réalisation d'une étude prospective transversale et descriptive de deux populations atteintes de gliomes l'une résidant la wilaya de Blida et l'autre la wilaya de Constantine.

CHAPITRE 2

REVUE

DE LA BIBLIOGRAPHIE

2.1 Les gliomes

Les gliomes ou tumeurs gliales sont les tumeurs cérébrales primitives les plus fréquentes chez l'adulte. Elles sont développées à partir des cellules spécialisées qui constituent le cerveau : les cellules gliales, les astrocytes et les oligodendrocytes. Ces tumeurs sont à croissance lente, se développant généralement insidieusement en plusieurs années, contrairement aux lésions vasculaires qui s'installent brutalement.

Ces tumeurs gliales, réputées de mauvais pronostic, car se développant au niveau du cerveau, organe hautement fragile, doté d'un environnement immunologique privilégié et muni d'une barrière hémato-céphalique le rendant peu accessible aux agents administrés par voie générale, d'où la difficulté du traitement de ce type de tumeurs. En outre, les tumeurs gliales ont une très grande capacité à infiltrer le tissu cérébral avoisinant à de très grandes distances allant jusqu'à plusieurs centimètres de la masse principale, et d'autre part, développent des mécanismes de résistance à la radiothérapie et à la chimiothérapie [1, 2].

Les gliomes sont classés selon l'organisation mondiale de la santé (OMS) selon des critères morphologiques : phénotypes des cellules tumorales et grade de malignité [3]. Cette classification s'est enrichie récemment par l'apport des nouvelles données de biologie moléculaire dont l'objectif est d'avoir un impact diagnostique, thérapeutique et pronostic [4].

2.1.1 Classification des gliomes

L'OMS avait classé en 2007 les gliomes selon les phénotypes des cellules tumorales (astrocytaires, oligodendrocytaires, ou mixte) et le grade de malignité (du grade I au grade IV) (Tableau1). Ce dernier paramètre prend en compte la densité cellulaire, la présence de nécrose, de néovaisseaux, mitoses et atypies cellulaires. Les principaux types de gliomes individualisés sont: astrocytome de grade I à IV (astrocytome grade IV est aussi appelé glioblastome (GBM) et constitue la forme la plus fréquente des gliomes), oligodendrogliomes de grade II et III, les oligoastrocytomes ou gliomes mixtes de grade II et III [3].

Tableau 1: Classification des gliomes selon l'Organisation Mondiale de la Santé de 2007[3]

Type histologique	Grade de malignité
<ul style="list-style-type: none"> • Tumeurs astrocytaires <ul style="list-style-type: none"> ✓ Astrocytome à cellules géantes sous – épendymaire ✓ Astrocytome pilocytaire <ul style="list-style-type: none"> ○ Astrocytome pilocytaire, variant pilomyxoïde ✓ Astrocytome diffus ✓ Astrocytome anaplasique ✓ Xanthoastrocytome pleiomorphe ✓ Glioblastome <ul style="list-style-type: none"> ○ Glioblastome à cellules géantes ○ Gliosarcome ✓ Gliomatose • Tumeurs oligodendrogiales <ul style="list-style-type: none"> ✓ Oligodendrogliome ✓ Oligodendrogliome anaplasique • Tumeurs oligoastrocytaires <ul style="list-style-type: none"> ✓ Oligoastrocytome ✓ Oligoastrocytome anaplasique 	<p>Grade I</p> <p>Grade I</p> <p>Grade II</p> <p>Grade II</p> <p>Grade III</p> <p>Grade II</p> <p>Grade IV</p> <p>Grade IV</p> <p>Grade IV</p> <p>Grade III</p> <p>Grade II</p> <p>Grade III</p> <p>Grade II</p> <p>Grade III</p>

Cette classification est donc basée sur les critères purement histologiques, qui manquent de reproductibilité, avec 30% de variabilité inter-observateur et manquent aussi de précision pour

prédire la réponse aux différentes thérapeutiques. De plus, les tumeurs du même grade peuvent avoir différentes évolutions cliniques [5, 6].

Les difficultés à classer certaines tumeurs en astrocytomes, oligodendrogliomes ou gliomes mixtes, le manque de reproductibilité de la classification OMS de 2007 sont le reflet de l'incertitude quant à l'histogenèse de ces tumeurs : cellules souches neurales, précurseurs gliaux ou cellules différenciées, raison pour laquelle, l'OMS a reclassé en 2016 ces tumeurs en se basant sur les anomalies rencontrées aussi bien histologiques que moléculaires [4, 7, 8]. Cette nouvelle classification sera revue en détails dans le chapitre génétique des gliomes. En effet, l'évolution de la recherche en biologie moléculaire et cytogénétique ont pu enrichir l'ancienne classification de l'OMS et ce, en essayant d'élucider les mécanismes moléculaires de la gliomagenèse permettant ainsi de prédire la réponse au traitement, avoir un intérêt pronostic mais également diagnostique

2.1.2 Épidémiologie

Selon le dernier rapport du *Central Brain Tumor Registry of the United States* (CBTRUS) paru en 2018 et concernant les données statistiques Américaines des tumeurs primitives du cerveau et les autres tumeurs cérébrales du système nerveux central (SNC) diagnostiquées entre 2011 et 2015, et parmi tous types de cancers, le cerveau et d'autres tumeurs du SNC étaient le site de cancer le plus fréquent chez les enfants de 0 à 14 ans, avec un taux d'incidence annuel moyen ajusté selon l'âge de 5,65 pour 100 000 habitants (Figure 1) [9].

Les gliomes en représentent 26% de l'ensemble des tumeurs primitives cérébrales et les autres tumeurs du SNC (Figure 2A), et 81% des tumeurs malignes (Figure 2B) [9].

Le GBM représentait la majorité des gliomes (56,6%) (Figure 3, Tableau 2).

La majorité des gliomes ont eu lieu en supra-tentorial dans les lobes : frontal, temporal, pariétal et occipital combinés (61,2%). Seulement une très petite proportion de gliomes s'est produite dans le SNC en dehors du cerveau [9].

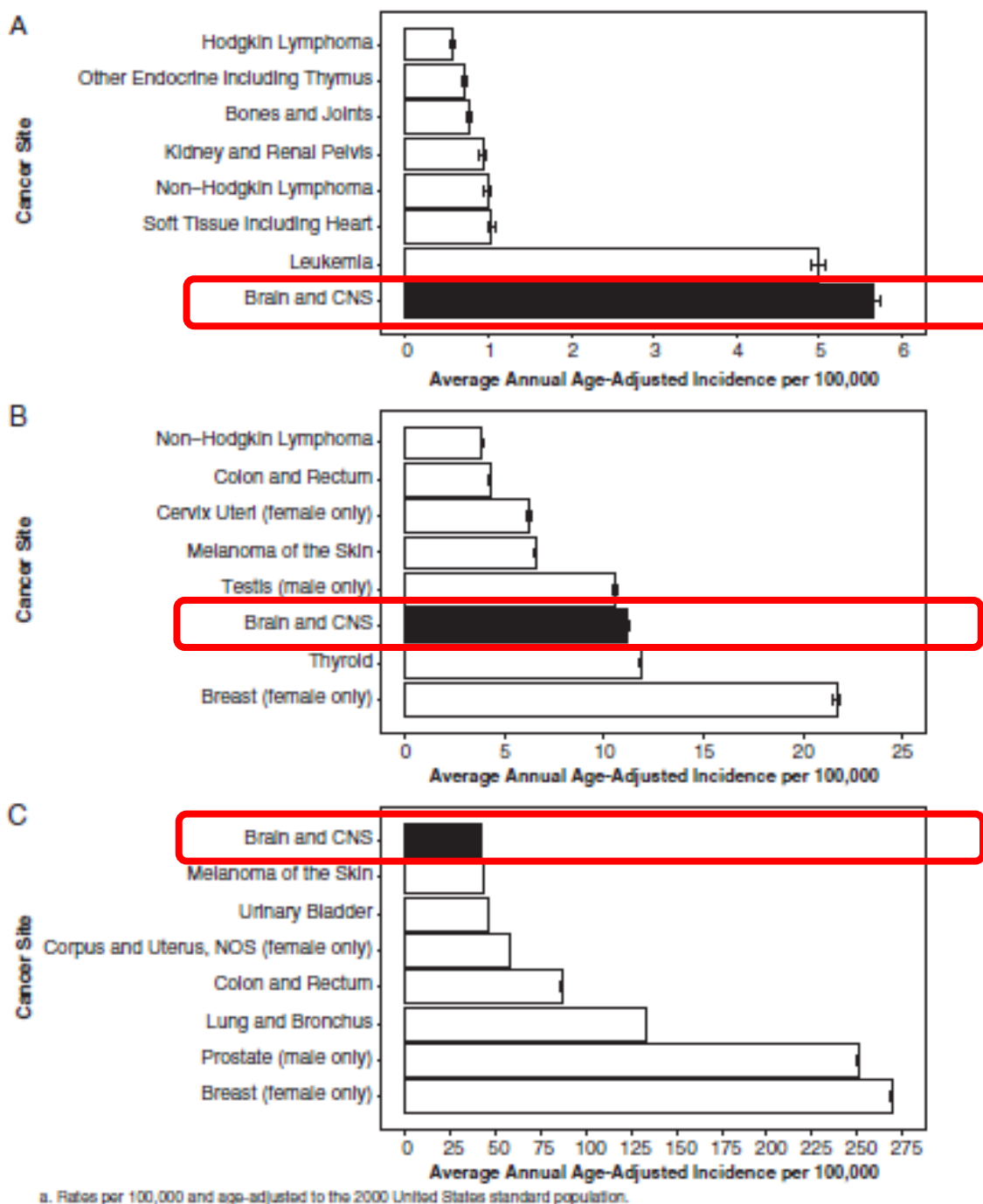


Figure 1 : Incidence annuelle moyenne ajustée selon l'âge de toutes les tumeurs cérébrales primaires et autres tumeurs du SNC comparé aux autres cancers courants chez les enfants âgés de 0-14 ans (A), adolescents et jeunes adultes âgés de 15-39 ans (B) et personnes âgées de plus de 40 ans (C), selon les estimations du CBTRUS 2011-2015 [9]

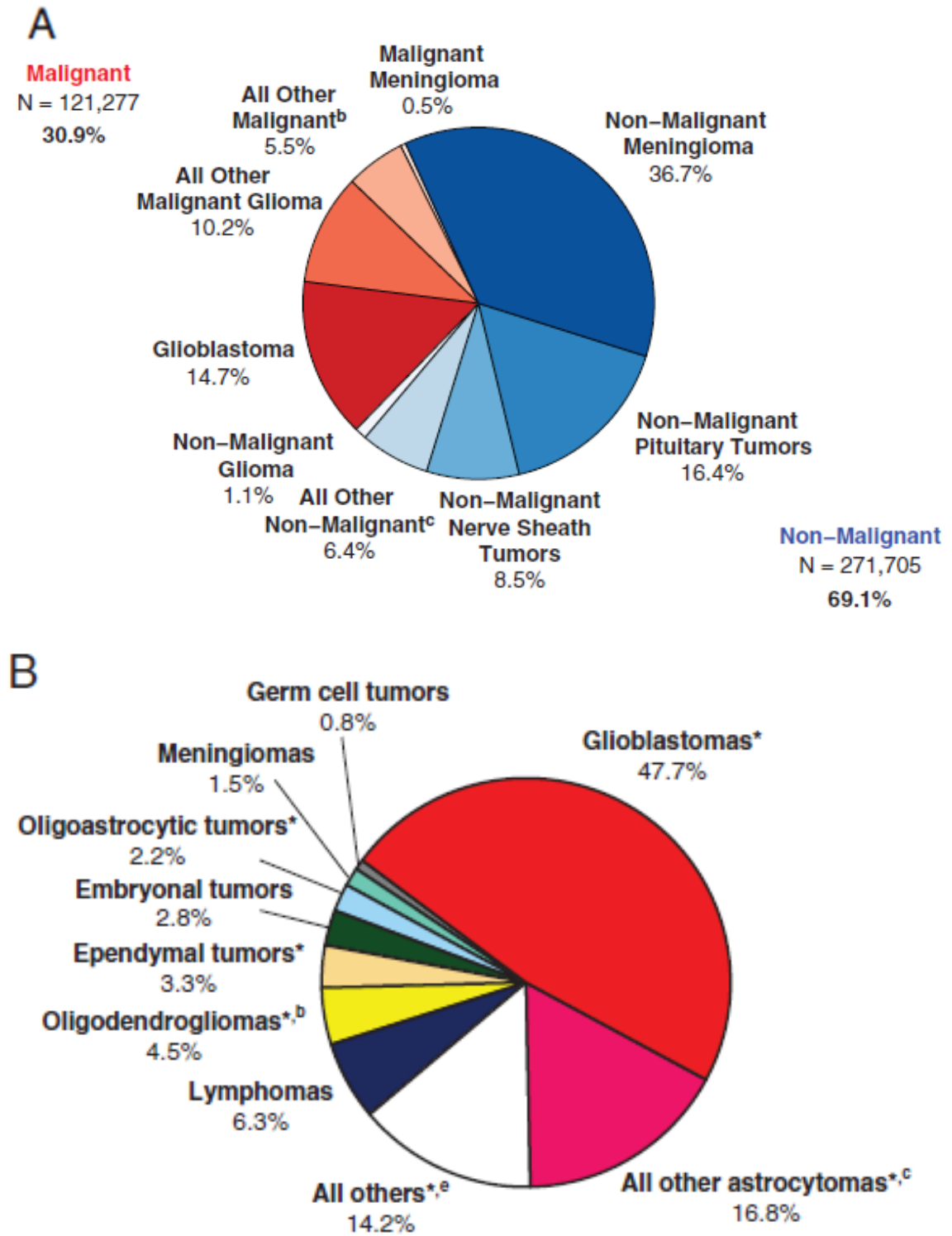


Figure 2 : Distribution de toutes les tumeurs cérébrales primaires et autres tumeurs du SNC selon les groupes histologiques (N = 392 982) (A), et les cancers primitifs cérébraux et autres tumeurs malignes du SNC selon les groupes histologiques (N = 121 277) (B) [9]

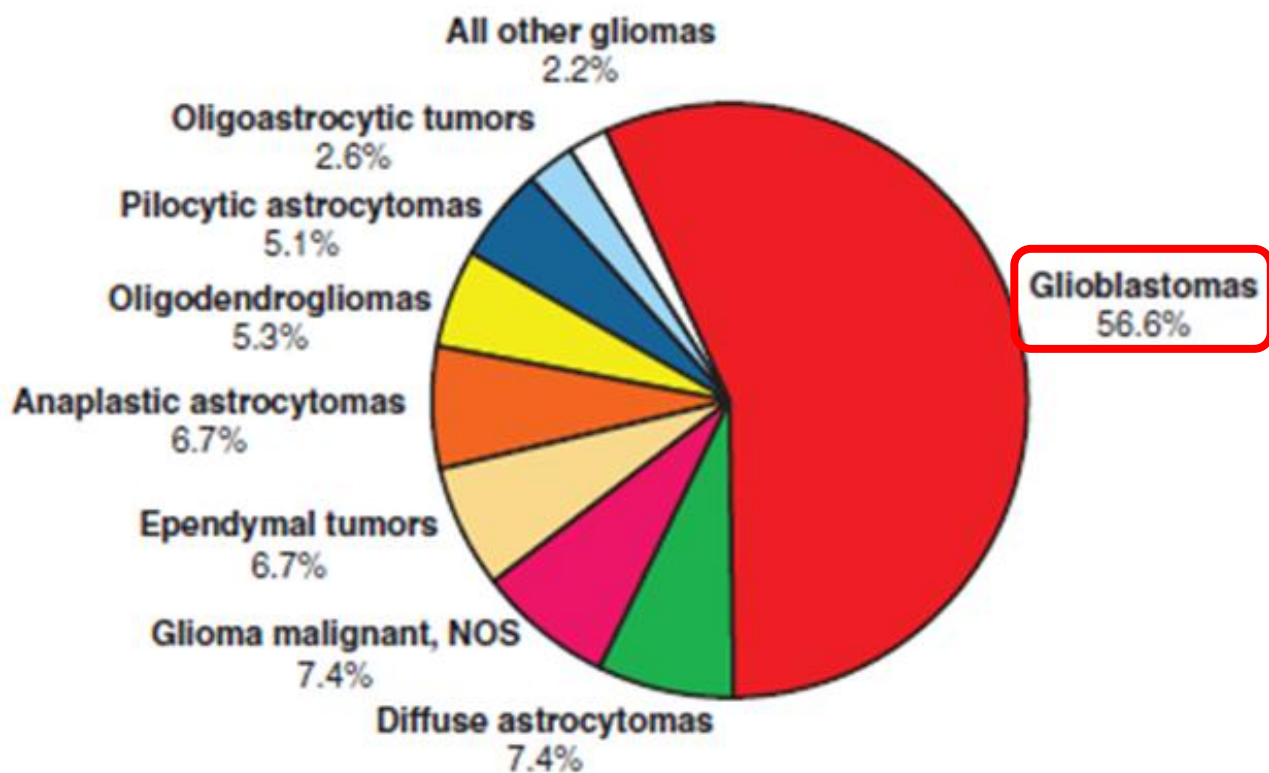


Figure 3 : Distribution des gliomes selon le type histologique (Données des 102.086 cas, CBTRUS 2011-2015) [9]

NB : Les pourcentages peuvent ne pas totaliser 100% en raison de l'arrondissement des chiffres.

Tableau 2 : Distribution des cas de gliomes selon la classification histologique de l'OMS des données du CBTRUS 2011-2015 [9]

Histology	Number of newly diagnosed tumors	Histologically Confirmed	Complete WHO grade Information*	Assigned Grade			
				Grade I	Grade II	Grade III	Grade IV
<i>Tumors of Neuroepithelial Tissue</i>	87,651	89.4%	84.5%	10.9%	14.7%	13.8%	60.7%
Pilocytic astrocytoma	4,168	92.5%	85.3%	92.8%	6.1%	0.8%	0.4%
Diffuse astrocytoma	6,006	92.4%	85.9%	4.3%	60.1%	21.1%	14.6%
Anaplastic astrocytoma	5,310	99.4%	94.1%	0.1%	1.1%	90.0%	8.8%
Unique astrocytoma variants	908	77.5%	77.7%	25.4%	54.7%	15.5%	4.4%
<i>Malignant</i>	619	87.1%	78.7%	4.2%	70.0%	20.0%	5.7%
<i>Non-Malignant</i>	289	57.1%	74.5%	98.4%	1.6%	0.0%	0.0%
Glioblastoma	45,613	93.1%	86.3%	0.2%	0.2%	1.0%	98.7%
Oligodendroglioma	2,924	96.3%	92.8%	1.6%	85.3%	6.5%	6.5%
Anaplastic oligodendroglioma	1,394	99.2%	95.2%	0.2%	3.0%	87.8%	9.0%
Oligoastrocytic tumors	2,350	99.6%	95.4%	0.9%	51.3%	39.5%	8.4%
Ependymal tumors	5,421	90.4%	83.7%	35.0%	50.2%	14.1%	0.7%
<i>Malignant</i>	3,215	94.0%	87.6%	2.9%	74.3%	21.8%	1.0%
<i>Non-Malignant</i>	2,206	85.0%	77.4%	93.5%	6.3%	0.1%	0.1%
Glioma malignant, NOS	5,872	32.4%	49.9%	23.8%	27.4%	21.1%	27.7%

Les taux de survie relatifs, estimés à cinq et dix ans pour toutes les tumeurs cérébrales malignes et autres tumeurs du SNC, étaient respectivement de 35,0% et de 29,3%. Il y avait une grande variation dans les estimations de survie en fonction du type histologique: Les taux de survie à cinq ans étaient de 94,1% pour l'astrocytome pilocytique, mais de 5,6% pour le GBM (Tableau 3).

La survie diminue généralement avec l'âge au moment du diagnostic. Les enfants et les jeunes adultes avaient généralement de meilleurs résultats de survie pour la plupart des histologies.

Tableau 3 : Taux de survie relative à 1, 2, 3, 4, 5 et 10 ans des gliomes selon le type histologique [9]

Histology	N ^d	1-Year		2-Year		3-Year		4-Year		5-Year		10-Year	
		%	95% CI	%	95% CI	%	95% CI	%	95% CI	%	95% CI	%	95% CI
Pilocytic astrocytoma	3,896	97.9	97.3-98.3	96.5	95.8-97.0	95.4	94.6-96.1	94.6	93.8-95.4	94.1	93.2-94.9	92.2	91.0-93.3
Diffuse astrocytoma	6,144	74.7	73.5-75.8	63.9	62.7-65.2	57.6	56.3-58.9	53.3	51.9-54.6	50.1	48.7-51.5	39.3	37.8-40.9
Anaplastic astrocytoma	4,177	64.9	63.3-66.3	46.3	44.6-47.9	37.7	36.0-39.3	32.9	31.3-34.5	29.8	28.2-31.4	20.8	19.1-22.5
Glioblastoma	33,951	39.7	39.2-40.3	17.2	16.7-17.6	10.1	9.7-10.4	7.1	6.8-7.4	5.5	5.2-5.8	2.9	2.6-3.1
Oligodendroglioma	3,262	94.5	93.6-95.3	90.4	89.2-91.4	87.1	85.8-88.3	84.1	82.7-85.5	81.3	79.7-82.8	65.7	63.4-67.9
Anaplastic oligodendroglioma	1,397	83.9	81.7-85.8	71.5	68.9-73.9	64.9	62.1-67.6	60.3	57.4-63.1	56.6	53.6-59.5	42.6	39.1-46.0
Ependymal tumors	2,927	94.3	93.4-95.2	90.5	89.2-91.6	87.8	86.4-89.1	85.9	84.4-87.3	84.5	82.8-86.0	79.5	77.3-81.5
Oligoastrocytic tumors	2,154	88.8	87.3-90.1	79.0	77.1-80.8	73.1	71.0-75.1	67.8	65.6-69.9	63.7	61.3-65.9	49.0	46.1-51.9
Glioma malignant, NOS	4,806	65.9	64.4-67.2	55.7	54.2-57.2	52.5	51.0-54.0	50.8	49.3-52.4	49.6	48.0-51.1	44.6	42.8-46.3
Neuronal and mixed neuronal-glial tumors	567	91.5	88.6-93.6	85.4	81.8-88.3	80.7	76.6-84.1	78.2	73.9-81.9	77.7	73.2-81.6	64.3	57.7-70.0

Le GBM, type histologique majoritaire des gliomes (56,6%), a une incidence qui augmente avec l'âge. Les taux les plus élevés étant enregistrés entre 75 et 84 ans. Le glioblastome était 1,58 fois plus fréquent chez les hommes que chez les femmes, et environ 1,93 fois plus élevé chez les Blancs que chez les Noirs [9].

Le CBTRUS avait estimé le nombre de nouveaux cas de GBM aux états unis d'Amérique à 13 010 en 2018 et 13 310 en 2019 [9].

Les estimations de survie relative pour le GBM étaient assez faibles; 5,6% des patients ont survécu cinq ans après le diagnostic. Ces estimations de survie étaient un peu plus élevées pour le petit nombre de patients diagnostiqués avant l'âge de 20 ans [9].

Les statistiques des autres pays sont plus disparates et moins structurées que celle des états unis en l'absence de registres nationaux dans certains pays et devant les divergences de définitions des tumeurs primitives du cerveau.

Il faut signaler que même les données susmentionnées ne sont pas exhaustives et ne répondent pas toutes aux critères requis par l'OMS pour classer ces tumeurs, puisque certaines d'entre elles sont diagnostiquées radiologiquement seulement et aucune preuve histologique n'existe. Selon le rapport du CBTRUS, seulement 62,7% des tumeurs recensées disposent de tous les critères requis pour les classer selon l'OMS.

En France, sur les données du recensement national histologique des tumeurs primitives du SNC, le RnhTPSNC, plus de 43 929 cas ont été enregistrés de 2004 à 2009, dont 42,9% étaient des gliomes avec une prédominance masculine (Sex-Ratio 1,37) [10]. Parmi les gliomes, les âges médians des grades I, II, III et IV sont respectivement d'environ 13, 43, 56 et 63 ans.

Sur des données plus récentes publiées en 2017, 57 816 patients présentaient des tumeurs primitives du SNC entre 2006 et 2011 dont 22 642 cas de gliomes (39,16%) représentant ainsi les tumeurs primitives du SNC les plus fréquentes. Le sex Ratio était de 1.40 (13206 hommes et 9436 femmes). L'âge moyen de la découverte de la tumeur était de 58 ans. Les GBM représentaient les tumeurs gliales les plus fréquentes (54,81% de l'ensemble des gliomes) [11].

Au Maroc, il existe un registre global de la région de Casablanca pour la collecte de données des tumeurs du cerveau. L'incidence standardisée estimée des cancers du SNC est de 2,0/100.000 hommes/an et de 1,1 cas/100.000 femmes/an. Dans la région de Fès, sur une

étude rétrospective concernant 5532 cas de cancer collectés au CHU de Fès entre 2004 et 2010, 2,3% de cancer du SNC représentant 10 nouveaux cas/100.000 ont été signalés au cours de cette période [12, 13].

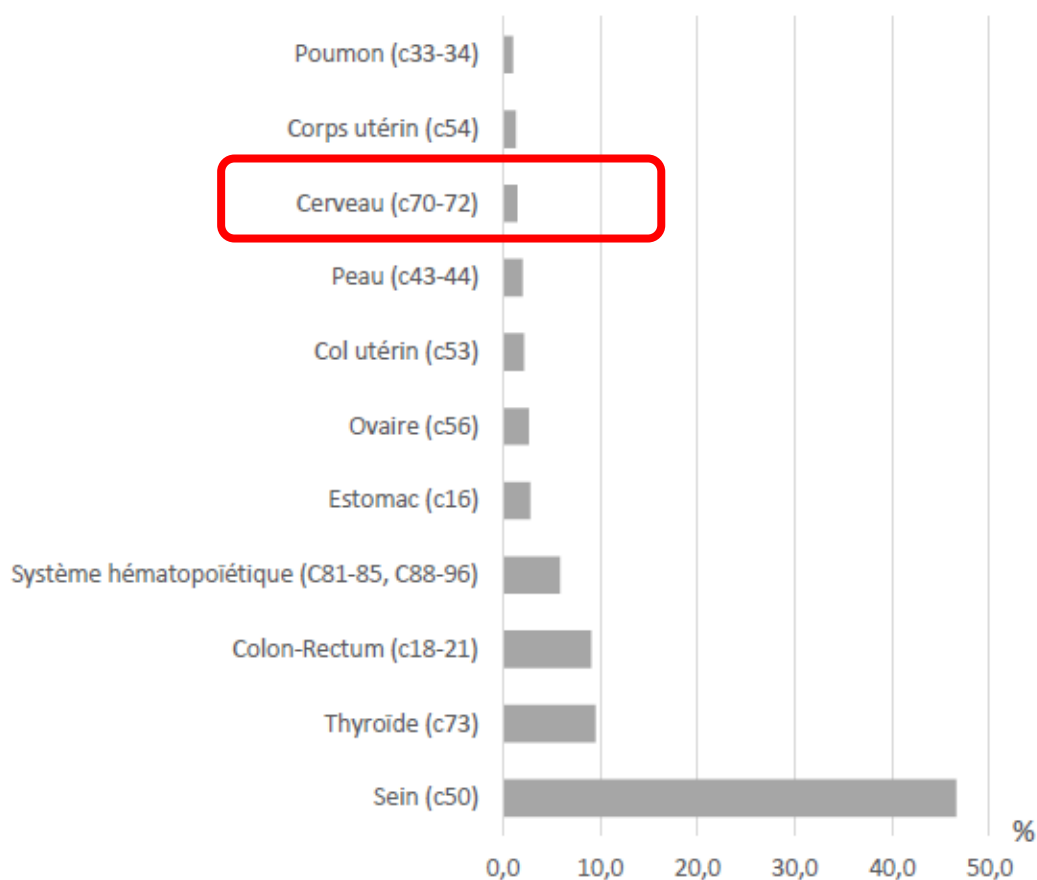
En Algérie, la collecte des données dans un registre national des cancers a été lancée suite au premier plan national quinquennal (2015-2019) anticancer lancé par le Ministère de la Santé de la Population et de la Réforme Hospitalière (MSPRH) Algérien. Selon l'arrêté N° 22 du 18 février 2014, émanant du MSPRH portant création, fonctionnement et organisation du registre de cancer de population dans chaque wilaya, un registre des cancers de la Wilaya de Constantine a été créé. Dans ce registre tenu par le Service d'Epidémiologie et de Médecine Préventive du CHU de Constantine, 1292 cas de cancers (497 hommes, 795 femmes) ont été recensés en 2016 dans la Wilaya avec une incidence standardisée de 111,7 cas et 161,6 cas/100 000 habitants chez les hommes et les femmes respectivement alors qu'en 2014, 1231 cas de cancers (533 hommes, 698 femmes, sex Ratio H/F 0,75) ont été recensés avec une incidence standardisée de 142,8 cas / 100 000 habitants [14, 15].

Chez les femmes, les localisations cérébrales venaient à la 9^{ème} position, représentant 1,6% de l'ensemble des cancers de la femme, avec une incidence standardisée de $2,1/10^5$ (Figure 4A) en 2014 passant à la 7^{ème} position en 2016 avec 2,3% de l'ensemble des cancers.

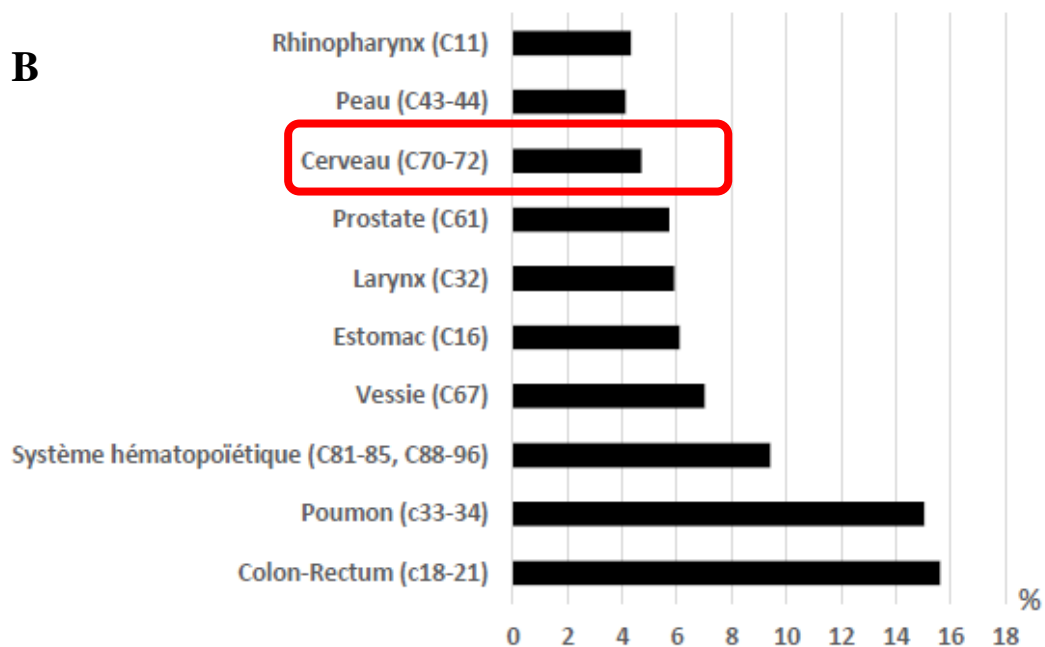
Chez les hommes, les localisations cérébrales étaient à la 8^{ème} position, représentant 4,7% de l'ensemble des cancers de l'homme, avec une incidence standardisée de $5,4/10^5$ (Figure 4B) en 2014, même position en 2016 avec 3,8% [14,15].

Chez les enfants et les adolescents âgés de moins de 15 ans, les tumeurs du SNC représentaient 8,3% des cancers chez les filles et 4,5% des cancers chez les garçons en 2014 [15].

A



B



**Figure 4 : Localisation des différents cancers chez la femme (A) et les hommes (B),
Registre des cancers de la Wilaya de Constantine de 2014 [15]**

2.1.3 Altérations génétiques au cours de la gliomagenèse

La gliomagenèse fait intervenir des altérations moléculaires telles que des amplifications, des mutations, des réarrangements ou des délétions chromosomiques.

Les altérations génétiques principalement rencontrées dans les gliomes activent certaines voies de transduction du signal ou entraînent une dérégulation du cycle cellulaire. Il s'agit surtout de surexpression de facteurs de croissance, des mutations « gain-de-fonction » des récepteurs à activité tyrosine kinase et des mutations « perte-de fonction » de gènes suppresseurs de tumeurs.

Par ailleurs, plusieurs types de pertes chromosomiques sont rapportés dans les gliomes, mais les gènes ne sont pas encore tous identifiés [16].

En moyenne, le nombre de mutations somatiques détectées par séquençage complet est estimé à ~ 16 dans les astrocytomes, 36 dans les astrocytomes anaplasiques et 46 à 50 dans les GBM. Parmi ces nombreuses altérations génétiques, quelques-unes seulement, détaillées plus bas, semblent être pertinentes pour la classification des gliomes du fait de : leurs fréquences, la technique de détection plus ou moins facile, et enfin, elles permettent de distinguer les différents sous-groupes des gliomes.

Les mutations de l'isocitrate-déshydrogénase (IDH) : L'IDH catalyse la conversion de l'isocitrate en α -kétooglutarate dans le cycle de l'acide citrique. IDH1 et IDH2 sont impliqués dans un certain nombre de processus métaboliques tels que la transduction du signal, la synthèse des lipides, le stress oxydatif et la respiration oxydative.

Les mutations des gènes de l'IDH 1 et 2 sont caractéristiques des gliomes de grade I et II. Les mutations se trouvent dans un codon et résultent en une nouvelle fonction enzymatique, induisant de fortes concentrations d'un métabolite normalement absent. La mutation Arg132His IDH1 représente plus de 90% des mutations. D'autres mutations sont décrites, moins fréquentes portant sur les codons 132 et 172 de l'IDH2. L'oncométabolite produit, inhibe des enzymes impliqués dans la régulation génique épigénétique, ce qui donne naissance à un *CpG-island methylator phenotype* (CIMP). Les mutations IDH1/2 et le CIMP

qui leur est associé sont typiques des gliomes malins secondaires, en l'occurrence les GBM et les astrocytomes anaplasiques qui se développent à partir de gliomes de bas grade [16].

La découverte de telles mutations au sein d'une tumeur gliale a un intérêt pronostic majeur indépendant puisque les gliomes de haut grade présentant des gènes mutés IDH1 ou IDH2 ont un meilleur pronostic.

De plus, leur intérêt peut être aussi diagnostique. En effet, ce type de mutation est quasiment absent dans les autres tumeurs solides constituant ainsi une piste diagnostique intéressante : le cas où les biopsies sont blanches ne ramenant pas de tissus gliaux rendant ainsi le diagnostic difficile mais également si elle n'est pas réalisable incitant à utiliser des marqueurs sanguins (ADN circulant éventuellement). En outre, la mutation IDH1 la plus fréquente (>90%) est mise en évidence à l'examen d'immunohistochimie IHC.

Par ailleurs, cette voie pourrait constituer une cible thérapeutique visant la voie des glutamines et ce, en développant l'inhibition de glutaminase.

Perte d'hétérozygotie LOH 1p/19q: La codélétion du bras court du chromosome 1 (1p) et du bras long du chromosome 19 (19q) a été identifiée comme le résultat d'une translocation 1;19 dont la conséquence possible est une inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs. La codélétion 1p/19q est caractéristique d'un sous-groupe d'oligodendrogliomes à évolution clinique plus lente, de meilleur pronostic et de bonne réponse à la chimiothérapie et la radiothérapie. La forte corrélation entre la codélétion de 1p/19q et les mutations dans les gènes IDH est aussi à souligner [16].

La méthylation du promoteur MGMT : Le gène MGMT (O⁶-méthyl-guanine-DNA-méthyl-transférase), localisé en 10q26, code pour une protéine clé de la réparation de l'ADN. Les produits de chimiothérapie alkylante, tels que les nitroso-urées ou le témozolomide, transfèrent des groupes alkyles sur différents sites du DNA, notamment la position O⁶ de la guanine. Ceci conduit à des erreurs d'appariement des bases lors de la réplication de l'ADN, entraînant des ruptures létales de la double hélice de DNA. La protéine MGMT répare cependant cette alkylation O⁶. Une lésion cellulaire létale survient uniquement si l'activité de la MGMT est insuffisante ou absente.

En somme, la protéine MGMT répare les lésions causées par les agents alkylants dans les cellules tumorales, favorise la survie de ces cellules, et confère à la tumeur une chimiorésistance. Une inhibition donc de MGMT, le plus souvent par méthylation de son promoteur, empêche la réparation de l'ADN et rend la tumeur plus chimiosensible.

Dans 40 à 45% des GBM, le gène codant pour la MGMT est épigénétiquement modifié par une méthylation de la région génique régulatrice, région promotrice, et donc mis au repos. [16].

Autres altérations moléculaires [19] :

***TP 53** (*tumor suppressor protein p53*): le gène codant pour la protéine p53 est parmi les gènes les plus connus et incriminés dans l'oncogenèse. La grande majorité des mutations sont de type faux-sens conduisant à un produit mutant dysfonctionnel p53 dont la recherche en pratique reste très laborieuse. De ce fait, l'IHC utilisant la protéine anti-p53 est considérée comme un marqueur de substitution raisonnable pour la recherche de la mutation TP53. En effet, la plupart des protéines mutantes présentent une demi-vie beaucoup plus longue et montrent une immunoposivité marquée, tandis que la protéine p53 de type sauvage a une demi-vie très courte et habituellement ne présente pas de forte coloration en IHC.

***TERT** (*telomerase reverse transcriptase*) : il constitue une unité essentielle du complexe télomérase dont l'augmentation de l'activité permet une extension indéfinie du télomère et donc l'immortalisation des cellules, essentielle pour les cellules cancéreuses. La mutation à la région promotrice de ce gène a été découverte en premier lieu dans le mélanome, puis dans les gliomes. La mutation se produit presque restrictivement à l'un des deux points chauds de C à T transition-C228T et C250T.

***ATRX** (Alpha-thalassemia/mental retardation syndrome X-linked) : c'est un gène situé en Xq13 et codant la protéine Atrx, un composant central du complexe de remodelage de la chromatine qui fonctionne aux télomères. En ce qui concerne le chromosome X, il n'y a qu'une seule copie chez l'homme et un allèle inactivé chez la femme. Une mutation d'inactivation unique de l'allèle actif est donc suffisante pour la perte de la fonction ATRX. La perte d'ATRX conduit à la déstabilisation des télomères et à l'allongement alternatif des télomères et probablement à l'instabilité génétique.

La mutation de l'ATRX a été détectée en premier lieu dans les tumeurs neuroendocrines puis dans les gliomes. Les mutations sont soit des mutations tronquante (3/4) soit des mutations faux-sens dans la région hautement conservée, principalement dans le domaine de l'hélicase (1/3) ; ces altérations sont fortement associées à une coloration négative en IHC. En pratique clinique, la coloration négative en IHC pour ATRX est utilisée comme marqueur de substitution indiquant la présence de la mutation ATRX.

***LOH 10q** : Les délétions alléliques englobant tout ou une partie du chromosome 10q ont été aussi signalées comme une altération génétique fréquente dans les GBM primaires et secondaires, témoignant que la perte d'un ou plusieurs gènes suppresseurs de tumeur sur 10q joue un rôle dans la formation de GBM.

L'un des gènes cibles de cette délétion est le gène suppresseur de tumeur PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), situé dans le locus 10q23 et codant pour une protéine phosphatase inactivant la voie de signalisation phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/ serine/thréonine kinase (Akt), jouant ainsi un rôle clé dans la régulation de la prolifération cellulaire, la croissance, l'apoptose et l'invasion tumorale. L'activation de cette voie est considérée comme essentielle pour le GBM. Le PTEN se présente actuellement comme un marqueur moléculaire pronostique car les patients ayant une perte de PTEN ont une survie diminuée mais aussi un biomarqueur prédictif possible de la réponse du gliome à des thérapies spécifiques.

EGFR (*epidermal growth factor receptor*): l'amplification du gène de l'EGFR en 7p12 est l'une des premières anomalies génétiques identifiées dans les GBM favorisant un signal pro-prolifératif. La surexpression d'EGFR est retrouvée dans 33 à 100% des GBM. La forme la plus fréquente est le variant III (EGFRvIII). L'intense expression d'EGFR en IHC a une valeur diagnostique importante pour les gliomes infiltrants, y compris de haut grade de malignité, avec une sensibilité de 95% et une spécificité de 100%. Quant au caractère pronostique de l'expression ou de l'amplification d'EGFR, elle a fait l'objet de plusieurs controverses. Les premières études étaient en faveur d'un plus mauvais pronostic pour les formes surexprimées. D'autres travaux plus récents ont démontré une relation entre l'âge et l'amplification d'EGFR. Elle serait un facteur de bon pronostic pour les patients de plus de 60 ans, et de mauvais pronostic pour les sujets jeunes (Tableau 4).

Tableau 4 : Intérêt des Marqueurs génétiques dans la prise en charge des gliomes

Intérêt	Marqueurs génétiques
Diagnostique	IDH1, IDH2, 1p19q, TP53, +/-TERTp
Pronostique	IDH1, IDH2, 1p19q , TERTp, MGMT-m, LOH10q, EGFR, PTEN
Théranostique	IDH1, IDH2, 1p19q, TERTp, MGMT-m

2.1.4 Corrélations entre les altérations moléculaires et la classification histologique des gliomes

Les gliomes de bas grades (grade II, OMS 2007) : Les gliomes de bas grades sont classés en trois types : astrocytomes, oligoastrocytomes, oligodendrogliomes (*Tableau 1*) [3]. Sur le plan génétique, 70-80% des gliomes de bas grades comportent la mutation IDH1, quant à la mutation de la TP-53 elle est présente dans 60% des astrocytomes, et 70% des oligodendrogliomes présentent la codélétion 1p/19q. Les mutations les plus abondantes dans les oligoastrocytomes mixtes sont la TP-53 et la co-délétion 1p/19 [20, 21].

Les astrocytomes anaplasiques et Oligodendrogliomes anaplasiques (OA) (grade III, OMS 2007) : Ce type de tumeur représente 6,7 % de la totalité des gliomes, la moyenne de survie des patients atteint de ce type de tumeurs, dans 30% des cas est de 5 ans, de plus à noter que certaines de ces tumeurs progressent en glioblastomes (grade IV) [22].

En outre, les astrocytomes ont un meilleur pronostic que les OA. Sur le plan génétique, les mutations les plus fréquentes des astrocytomes anaplasiques qui proviennent de la progression

des astrocytomes sont au niveau IDH 1/2, TP53, ATRX, l'amplification de l'EGFR et la délétion de PTEN [23, 24].

Les oligodendrogliomes qui ont progressé au stade III, présentent des mutations de nature gain de fonction au niveau du chromosome 7 et délétion au niveau du chromosome 10, avec présence d'amplification de l'EGFR et la perte de PTEN comme c'est le cas dans les glioblastomes [25-27].

Les Glioblastomes (gliome grade IV, OMS 2007): Les GBM, représentant 55% de la totalité des gliomes, sont les plus agressifs. La survie des patients varie entre 12 à 15 mois malgré les thérapies disponibles. Leur incidence est de 3.19/100 000 aux USA. En immunohistochimie, les anticorps les plus utilisés sont les anti: IDH1, ATRX et P53 [20, 28].

Les GBM se divisent sur des bases génétiques en deux sous-groupes. Les GBM primaires, qui sont les plus communs 90% du total des GBM et sont connus comme étant des lésions de novo sans progression. Ce type est fréquent chez des patients dont l'âge dépasse 60 ans. Le deuxième type est les GBM secondaires, intéressant des sujets plus jeunes et résultant de la progression de gliomes de bas grade (un grade II/III selon la classification OMS) [29-31].

L'analyse génomique des GBM, a pu mettre en évidence plusieurs oncogènes et suppresseurs de tumeurs dans les deux sous types de GBM. Trois grandes voies de signalisation sont ainsi identifiées : RTK-RAS-MAPK-PI3KA ; la voie P53 et la voie RB [32-36]. Dans les GBM primaires les mutations les plus communes sont : le gain de fonction sur le chromosome 7 et la délétion sur le chromosome 10 qui contribuent dans les mutations de l'EGFR et PTEN. Quant aux GBM secondaires les mutations les plus connues concernent les mutations de l'IDH, TP53, ATRX [21, 36].

TCGA (*The cancer genome Atlas*) est un projet lancé en 2005 qui utilise les technologies de microarray permettant ainsi d'identifier des sous-types moléculaires dans les différents types de cancer. Dans les GBM, les TCGA ont permis l'identification des trois sous types [37]: Proneural, mésenchymateux, tumeurs classiques et neurales.

Les GBM proneuraux représentent 10% du total des GBM et concernent surtout les populations jeunes. Sur le plan génétique ces tumeurs sont caractérisées par la présence de mutations de l'IDH, TP-53, méthylation du promoteur MGMT, mais une expression normale de EGFR/PTEN est retrouvée [17, 32, 37, 38]. Les GBM mésenchymateux, touchant

principalement les populations plus âgées, sont de très mauvais pronostic. Ils sont caractérisés sur le plan moléculaire par la présence d'anormalités dans la voie de signalisation AKT, une augmentation de l'expression des peptides angiogéniques, une surexpression de gènes régulateur de la motilité, de la matrice extracellulaire et de l'adhésion cellulaire.

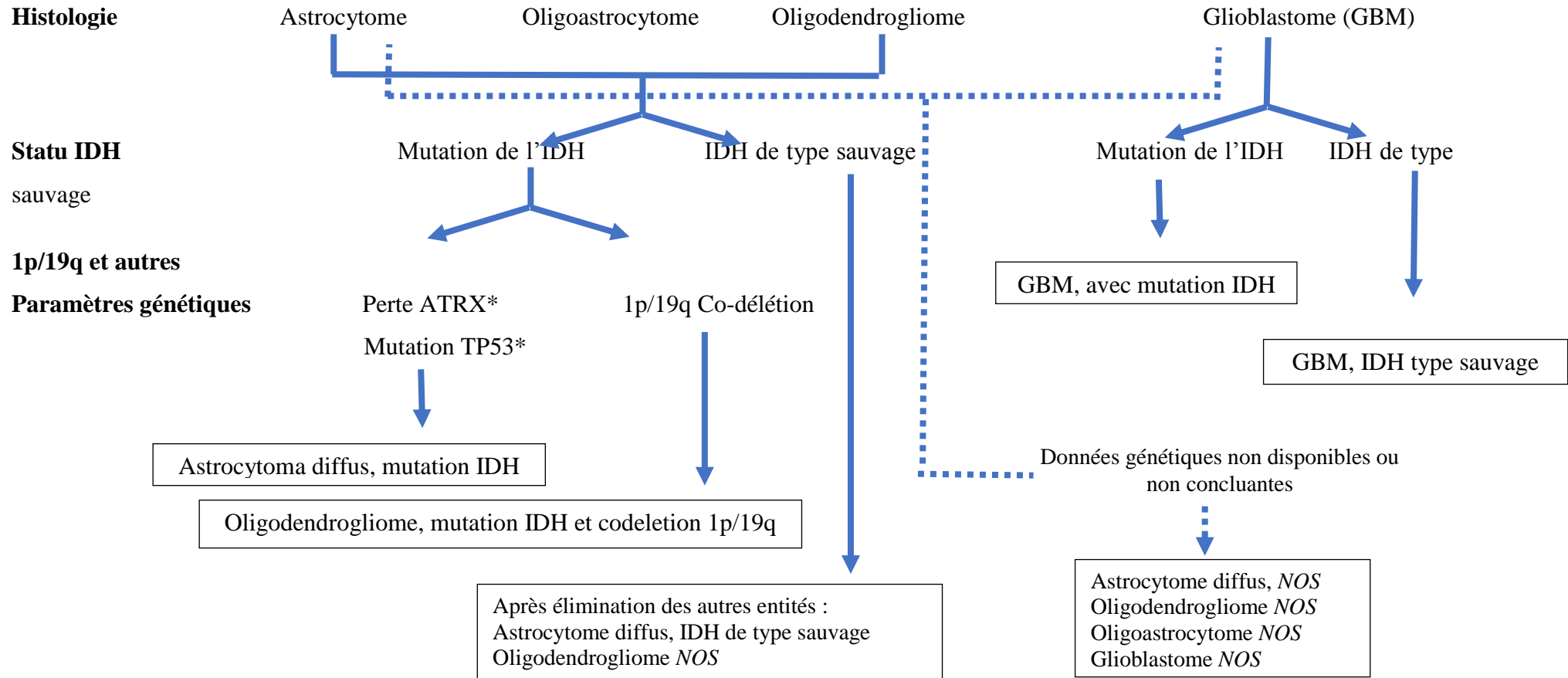
Les derniers sous type des GBM, sont les formes neuronales et classiques, représentant la majorité des glioblastomes. Ils sont associés à une perte de fonction du PTEN et une amplification de l'EGFR [17].

Par ailleurs, deux études récentes avaient retrouvé des mutations dans la région de promotion du TERT dans les formes avec très mauvais pronostic des GBM [39, 40].

Il faut signaler que l'OMS a intégré dans sa nouvelle classification de 2016 des tumeurs cérébrales primitives ces données de la biologie moléculaire et propose la réalisation d'étude génétique en plus des données histologiques pour classer les types de gliomes (Figure 5) [4].

Figure 5 : Algorithme simplifié de la classification des gliomes diffus selon l’OMS 2016, basés sur les données histologiques et génétiques

[4]



* Caractéristique mais non nécessaire au diagnostic, NOS : not otherwise specified (la désignation NOS implique qu'il n'y a pas suffisamment d'informations pour attribuer un code plus spécifique).

2.1.5 Facteurs de risque des gliomes [41-45]

En dehors des rayonnements ionisants, classé comme facteur cancérigène de catégorie 1 et les facteurs génétiques susmentionnés ayant montré les preuves suffisantes dans leur implication dans la gliomagénèse, les preuves restent peu concluantes et toujours sujet de débat pour les autres facteurs environnementaux suspectés : pesticides, métaux lourds (plomb, mercure), dérivés nitrés (utilisés comme additifs alimentaires, conservateurs et colorants), certaines infections virales (SV 40) et le tabagisme.

Quant aux preuves du rôle des rayonnements non ionisants (téléphone mobile, lignes électriques en particulier en milieu professionnel, appareils électriques tel que micro-ondes, sèche-cheveux, fer à friser, ordinateur...) dans le développement des gliomes, elles ne cessent de croître aussi bien sur les modèles animaux que sur les données épidémiologiques chez l'humain en particulier l'usage du téléphone mobile. L'exposition aux champs électromagnétiques à très basse fréquence (ELF-EMF) et les radiofréquences (RF-EMF) a été classée depuis 2002 comme « cancérigène possible pour l'homme » (groupe 2B), par le Centre International de Recherche sur le Cancer de l'OMS.

Dans une étude Suédoise cas-témoin récente (1346 cas de gliomes vs 3485 témoins sains), un risque accru de stade avancé (promotion / progression) de l'astrocytome de grade IV a été retrouvé en cas d'exposition aux champs électromagnétiques à très basse fréquence ELF-EMF (période d'exposition de 1-14 ans, OR : 1,9, intervalle de confiance IC 95% 1,4-2,6, $p < 0,001$) [43].

Dans une autre métaanalyse intéressante, Carlberg avait démontré la relation entre l'usage du téléphone mobile et gliome (analyse de 445 cas de gliomes vs 477 contrôles, exposition \geq 1640 h, OR : 1,90, IC95% : 1,31-2,76) [42]. Carlberg avait critiqué par la même occasion les conclusions des auteurs des études utilisées dans cette métaanalyse en particulier l'étude INTERPHONE qui étaient « élégantes » et avaient permis aux médias d'avoir des interprétations complètement opposées aux données de l'étude.

2.1.6 Prise en charge des gliomes

La prise en charge des gliomes est multidisciplinaire où la décision thérapeutique est prise lors de réunions de concertation pluridisciplinaire. Elle repose sur le traitement chirurgical, la radiothérapie, la chimiothérapie et le traitement symptomatique (antalgiques, corticoïdes, antiépileptiques...), et dépend aussi bien de l'état général du patient (âge, indice de Karnofsky, co-morbidités associées) que de l'imagerie (topographie, volume, caractéristiques radiologiques de la lésion, agressivité), ces deux critères conditionnant, l'opérabilité théorique. Les données de la biologie moléculaire sont aussi intégrées dans les décisions thérapeutiques en particulier dans le choix des thérapies ciblées.

La durée médiane de survie étant entre 12 et 15 mois pour les GBM, les facteurs de pronostic plus favorable sont : l'âge, un indice de Karnofsky supérieur à 80 %, la méthylation de la O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT), facteur prédictif de sensibilité au témozolamide et la qualité de l'exérèse chirurgicale [46].

La chirurgie : Dans la mesure où la chirurgie est possible, cette étape occupe une place prépondérante dans le traitement des gliomes. En effet, non seulement, elle permet d'établir un diagnostic anatomopathologique mais aussi elle assure une amélioration de la qualité de vie du patient par la levée du syndrome compressif. Cependant, et en dépit des progrès réalisés en neurochirurgie, l'exérèse reste le plus souvent subtotale. Les gliomes récidivent quasi systématiquement après chirurgie, notamment en raison des cellules tumorales qui envahissent le parenchyme cérébral normal, à distance de la lésion primitive. Si l'exérèse est impossible, une biopsie est réalisée afin de poser le diagnostic histologique [46].

La radiothérapie : Le traitement post-opératoire standard des gliomes de haut grade passe par la radiothérapie externe conventionnelle. Les modalités classiques d'irradiation consistent en une dose totale de 54 à 60 Gray (Gy), délivrée à raison de 1,8 à 2 Gy par fraction par jour et ce durant 5 jours par semaine pendant 6 semaines. La tolérance faible du tissu cérébral normal empêche l'utilisation de fortes doses susceptibles d'être curatives, et la radiothérapie est responsable de séquelles graves (démences, déficits intellectuels, neuropathies...), notamment chez l'enfant. Quant à la radiothérapie stéréotaxique, elle reste réservée dans les cas de récurrences [46].

La chimiothérapie : Dans le cadre des tumeurs cérébrales, la chimiothérapie n'est pas curative mais permet principalement de contrôler la croissance de la tumeur et de maintenir une qualité de vie correcte aussi longtemps que possible.

Depuis 2005, le témozolomide (TMZ) a obtenu une AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) européenne dans le traitement des glioblastomes nouvellement diagnostiqués en association concomitante avec la radiothérapie. Selon le protocole de Stupp, son administration se fait par voie orale de manière concomitante à la radiothérapie, soit une dose de 60 Gy fractionnée à 2 Gy x 5 jours sur 6 semaines et une dose de TMZ de 75 mg/m²/j pendant 7 jours par semaine pendant 6 semaines. Puis 6 cycles de façon adjuvante au traitement initial à une dose de 200 mg/m² x 5 jours tous les 28 jours [47]. La durée médiane de survie a été allongée de 2,5 mois avec l'ajout du témozolamide et la probabilité de survie à 5 ans était de 9,8 % contre 1,9 % en cas de traitement uniquement par radiothérapie [46].

Par ailleurs, les gliomes anaplasiques ayant une mutation 1p19q ont une sensibilité plus importante à la chimiothérapie par procarbazine, lomustine et vincristine. La chimioradiothérapie d'emblée chez ces patients est donc devenue le traitement standard [46].

Nouvelles approches chimiothérapiques : Le développement de nouvelles approches thérapeutiques plus ciblées sur les caractéristiques biologiques et moléculaires des gliomes de haut grade est justifié par la faible efficacité des thérapeutiques conventionnelles dans leurs traitements. Un des principaux axes de recherche concerne la surexpression du récepteur à l'EGF et l'activation des voies de transduction qui en découlent, notamment PI3K/Akt, et Ras/Raf/MAPK. Les agents anti-angiogéniques, également en cours d'investigation devraient probablement trouver leur place dans la thérapie puisque le degré de malignité et la croissance des tumeurs gliales sont dépendants de leur néovascularisation.

Le bévacicumab (Avastin[®]), anticorps monoclonal dirigé contre le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*) a été utilisé dans plusieurs essais cliniques. L'ajout du bévacicumab au protocole de Stupp a permis un allongement de la survie sans progression de 4 mois mais non la survie globale [48, 49]. Devant l'absence de bénéfice de survie globale et des résultats contradictoires sur la qualité de vie, ce traitement reste réservé aux essais thérapeutiques et n'est pas encore recommandé en pratique courante. Des études sont en cours pour préciser quelle sous-population de patient pourrait bénéficier d'un traitement antiangiogénique [46].

2.2 La Méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR)

Le métabolisme du folate joue un rôle important dans la cancérogenèse en raison de son implication dans la méthylation de l'ADN et la synthèse des nucléotides. L'enzyme méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) occupe une position charnière, en équilibrant l'homéostasie entre la synthèse d'ADN et la méthylation et ce, en catalysant la conversion irréversible du 5,10-méthylène tétrahydrofolate en 5-méthyl tétrahydrofolate. Le substrat de la MTHFR, le 5,10-méthylène tétrahydrofolate, est utilisé par la thymidylate synthase dans la méthylation du dUMP en dTMP, qui est la seule source de novo de thymidine nécessaire à la synthèse et à la réparation de l'ADN. Le gène de la MTHFR code pour une enzyme cytosolique ubiquitaire de 76,6 kDa. Plusieurs polymorphismes de la MTHFR sont bien connus dont le C677T qui rend l'enzyme MTHFR moins active. Ce polymorphisme a été lié à plusieurs pathologies et la progression de plusieurs cancers [50-54].

2.2.1 Les folates [50-57]

Les folates, terme dérivé du latin folium à cause de l'abondance de cette vitamine dans les végétaux foliacés, est un groupe de substances associant un noyau ptéridine et des glutamates reliés par un acide para-amino-benzoïque. Une grande partie des folates alimentaires est retrouvée dans les légumes verts, les fruits, les fromages affinés, le foie, et les graines.

L'acide folique (Figure 6), appelé aussi vitamine B9, pour être actif doit être transformé en dihydrofolate (DHF) puis en tétrahydrofolate (THF), sous l'action de la dihydrofolate réductase. Les dérivés du THF servent d'accepteurs et de donneurs d'unités monocarbonées dans un grand nombre de réactions du métabolisme des acides aminés et des nucléotides.

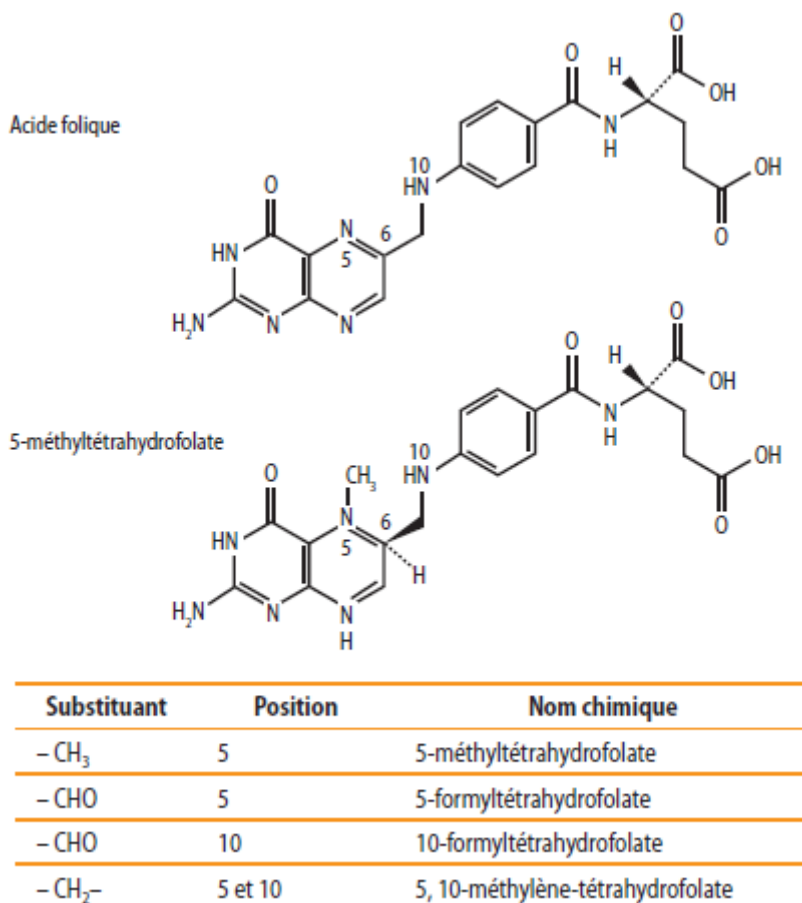


Figure 6 : Structure de l'acide folique et du 5-méthyltétrahydrofolate [56]

Les coenzymes foliques maintiennent la stabilité génomique en régulant la synthèse, la réparation et la méthylation de l'ADN.

Le 5-méthyl-THF reméthyle l'homocystéine en méthionine, qui est activée en S-adénosylméthionine (SAM) (Figure 7). La SAM est le principal donneur de méthyles. Il contrôle la transcription des gènes et l'expression des protéines en méthylant les îlots CpG de l'ADN jouant ainsi un rôle essentiel dans la régulation de l'expression génique.

Par ailleurs, les folates sont essentiels à la synthèse de 3 bases nucléotidiques essentielle à la synthèse et à la réparation de l'ADN : la thymidine, l'adénine et la guanine. Le désoxyuridine monophosphate (dUMP) est converti en désoxythymidine monophosphate (dTMP) dans une réaction impliquant la thymidilate synthase (TS) et le 5,10-méthylène THF. Ce dernier est le précurseur du 10-formyl-THF mis en jeu dans la synthèse de l'adénine et de la guanine.

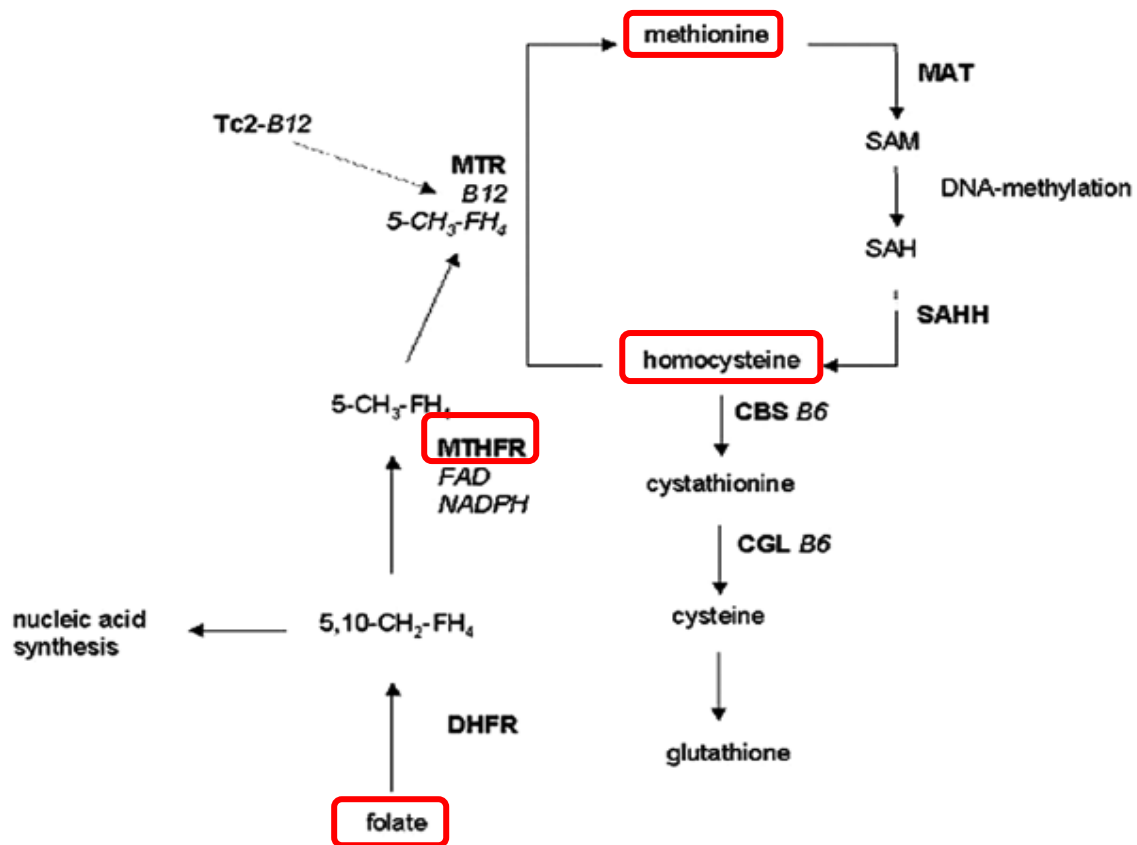


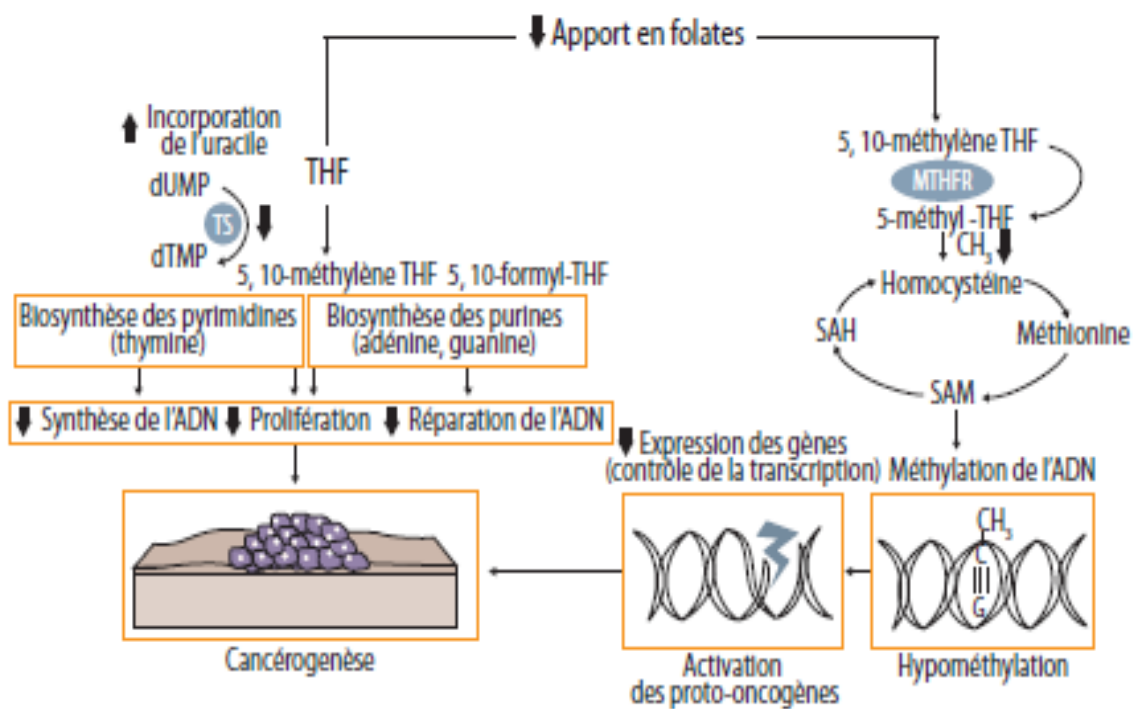
Figure 7 : Métabolisme de la méthionine et des folates [55]

La méthionine est activée en S-adenosylméthionine (SAM) par l'intermédiaire de la méthionine adényltransférase (MAT). SAM est un donneur de groupe méthyle omniprésent. Le produit de dégradation de SAM est la S-adenosylhomocystéine (SAH), qui est hydrolysée en homocystéine via l'homocystéine hydrolase (SAHH). L'homocystéine peut être transsulfurée en cystathionine et en cystéine par l'intermédiaire de la cystathionine bêta-synthase (CBS) dépendante de la vitamine B6 et de la cystathionine gamma-lyase (CGL); alternativement, l'homocystéine peut être reméthylée en méthionine via la 5-méthyltétrahydrofolate-homocystéine S-méthyltransférase (MTR, également appelée méthionine synthase), qui nécessite un dérivé de la vitamine B12 (méthylcobalamine) et un dérivé du folate (5-méthyltétrahydrofolate; 5-CH₃-FH₄) en tant que cofacteurs. La vitamine B12 est transportée par la transcobalamine 2 (Tc2) et le 5-CH₃-FH₄ est synthétisé par la 5,10-méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) dépendante de la flavine adénine dinucléotide (FAD) à partir du 5,10-méthylène tétrahydrofolate (5,10-CH₂-FH₄), qui est synthétisé à partir du folate par la dihydrofolate réductase (DHFR) dans deux étapes ultérieures.

Rôle des folates dans la cancérogénèse :

Une carence en folates induit et accélère la cancérogénèse en perturbant chacun des processus susmentionnés. Par ailleurs, l'incorporation de l'uracile à la place de la thymidine induit des lésions dans l'ADN, notamment des cassures de brins, à l'origine de la transformation cellulaire maligne. De même, la diminution de la disponibilité des radicaux méthyles conduit à une hypométhylation globale de l'ADN et/ou de gènes spécifiques et à l'activation inappropriée de proto-oncogènes (Figure 8).

Sur les données épidémiologiques et sur l'animal, un apport en folates légèrement supérieur à l'apport conseillé peut avoir un effet protecteur s'il est instauré avant le développement des lésions précancéreuses. À l'inverse, un apport excessif de folates ou une "supplémentation" par l'acide folique instaurée alors que les lésions précancéreuses sont déjà présentes pourrait favoriser la cancérogénèse colorectale [51].



THF : tétrahydrofolate ; dUMP : désoxyuridine monophosphate ; dTMP : désoxythymidine monophosphate ;
MTHFR : méthyltétrahydrofolate réductase ; SAH : S- adénosylhomocystéine ;
SAM : S- adénosylméthionine ; TS : thymidilate synthase.

Figure 8 : Rôle des folates et de la MTHFR en cancérogénèse [56]

2.2.2 L'homocystéine [58]

L'homocystéine (Hcy) est un acide aminé non essentiel, soufré et non protéinogène. Il est synthétisé par la transméthylation de l'acide aminé essentiel la méthionine (Met) (Figure 9) et représente la seule façon par laquelle Hcy est produite chez les humains. Cette conversion implique trois étapes, catalysées par les enzymes suivantes : SAM) synthétase / L-méthionine adénosyltransférase, méthyltransférase (MT) et S-adénosyl-L-homocystéine (SAH) hydrolase qui se produisent dans différents tissus.

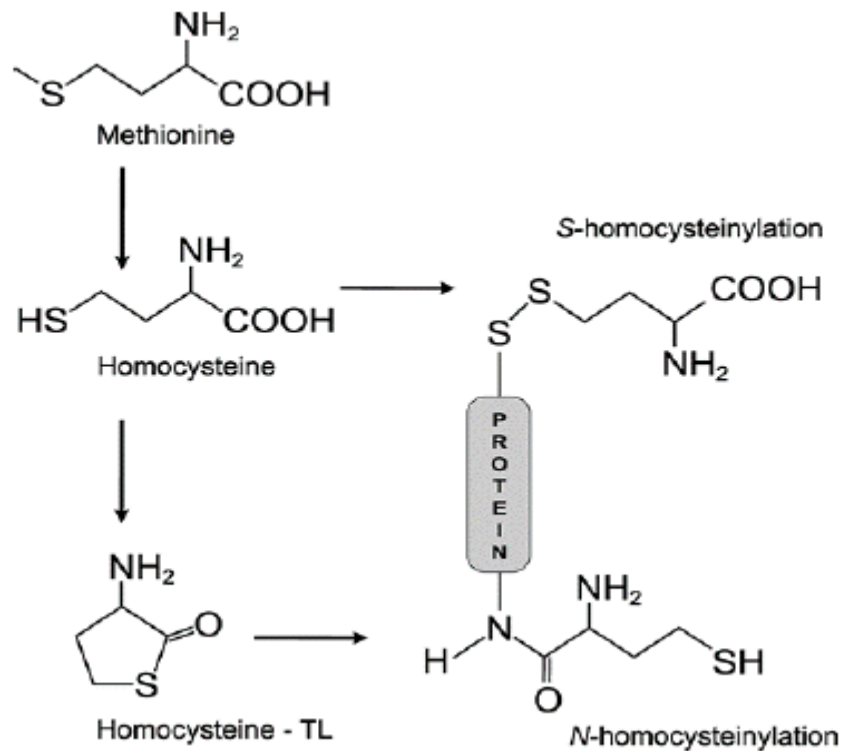


Figure 9 : Structure de la méthionine, homocystéine, homocystéine-thiolactone (homocystéine-TL, Hcy-TL) et N- / S-homocystéinylation des protéines [58]

La méthionine est métabolisée en homocystéine qui doit ensuite être catalysée en Hcy-TL par la méthionyl-t-ARN synthétase. Hcy-TL modifie les protéines par N-homocystéinylation. D'autre part, Hcy pourrait se lier aux résidus de cystéine d'une protéine pour que le disulfure se lie à la S-homocystéinylation des protéines.

La SAM synthétase active Met dans une réaction avec l'ATP conduisant à la synthèse de SAM. La SAM est utilisée comme donneur universel de méthyle non seulement dans une variété de biosynthèse cellulaire de différents composés (créatine, épinéphrine, carnitine, phospholipides, phospholipides, protéines, acides nucléiques et polyamines) mais également dans des modulations épigénétiques : régulation de la méthylation de l'ADN nucléaire et mitochondrial, remodelage de la chromatine, édition de l'ARN, ARN non codant, micro-ARN et modification post-traductionnelle des histones. SAH est le produit de toutes les réactions de transméthylation SAM-dépendantes.

Hcy se trouve à un point charnière de trois voies principales situées principalement dans le foie: Resynthèse en SAH par l'activité d'inversion de SAH hydrolase, la reméthylation en méthionine par des voies dépendantes/indépendantes des folates /B12; et la transsulfuration en cystathionine (Figure 10).

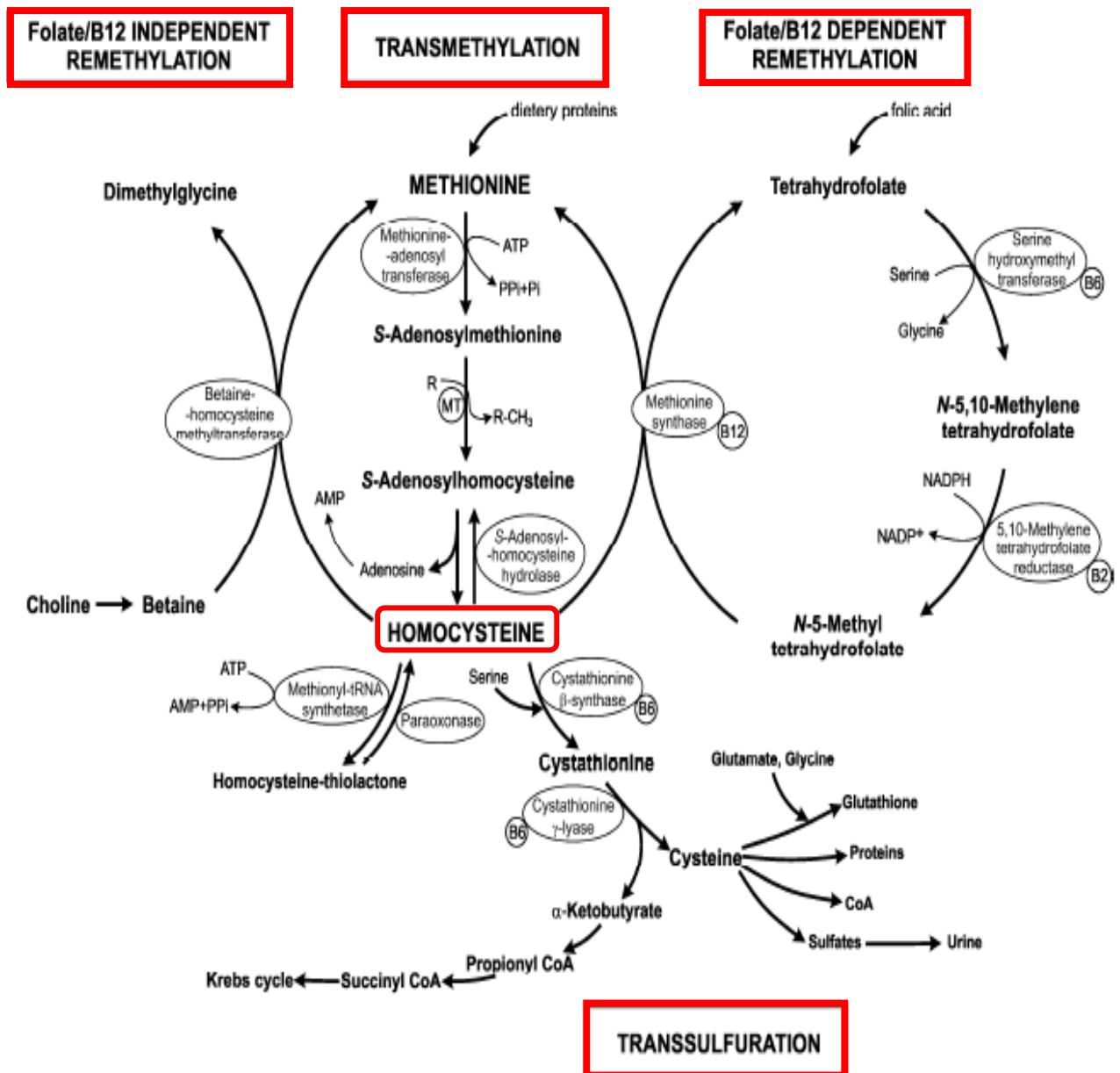


Figure 10 : Métabolisme de l'homocystéine et son interaction avec l'acide folique et les vitamines [58]

ATP: adenosine triphosphate; AMP: adenosine monophosphate; PPi: pyrophosphate; Pi: orthophosphate; B2/B6/B12: vitamins B2/B6/B12; CoA: coenzyme A; R: acceptor; R-CH₃: methylated product; MT: methyltransferases.

En cas d'apport protéique excessif, la voie de la transulfuration est favorisée par rétrocontrôle positif de la cystathionine bêta-synthase et rétro-contrôle négatif de la 5, 10-méthylène tétrahydrofolate réductase. Alors qu'en cas de déficit protéique, la voie de la reméthylation est favorisée et Hcy est recyclée afin de maintenir un pool cellulaire suffisant de méthionine.

De nos jours, la relation entre les déséquilibres du métabolisme de l'Hcy et de nombreuses pathologies n'est pas encore bien établit. Carson et Neil en 1962 étaient les premiers à avoir identifié des anomalies métaboliques provoquant un retard mental chez les patients ayant des taux élevés d'Hcy dans l'urine [59]. Ils avaient évoqué un nouveau trouble du métabolisme de la Met appelé homocystinurie. En 1969, McCully avait publié une étude montrant l'effet sur les pathologies vasculaires chez les patients atteints d'homocystinurie. C'était la première fois qu'un niveau élevé d'Hcy était lié à une maladie vasculaire prématurée [60]. Aujourd'hui, il est largement admis qu'un taux élevé d'Hcy (plus de 15 μM) est un facteur de risque indépendant de maladies cardio et cérébrovasculaires. Des études récentes ont démontré une forte corrélation entre les niveaux élevés d'Hcy et les troubles neurologiques, les maladies rénales chroniques, l'ostéoporose, les troubles gastro-intestinaux, le développement de malformations congénitales et le cancer [58, 61-65].

2.2.3 La MTHFR [66-72]

2.2.3.1 Le gène de la MTHFR : Il se situe sur le chromosome 1p36.3 (Figure 11). Il est constitué de 11 exons et 10 introns et code pour une enzyme cytosolique ubiquitaire de 76,6 kDa [67, 68].

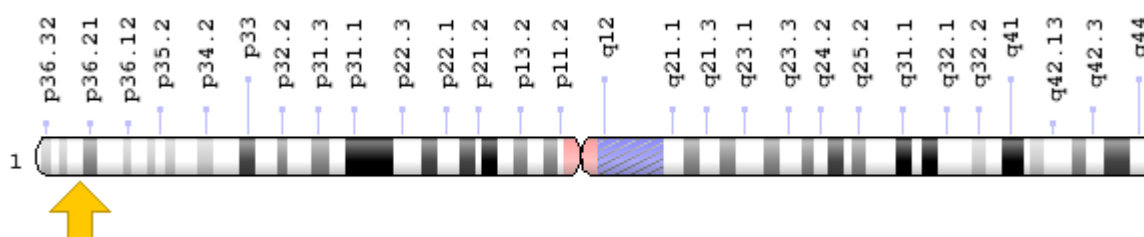


Figure 11 : Localisation du gène de la MTHFR sur le chromosome 1 [67]

Localisation moléculaire: paires de bases 11,785,730 à 11,806,103 sur le chromosome 1

Goyette et al. avaient rapporté que le gène MTHFR possède 14 mutations rares associées à un déficit enzymatique sévère et une mutation commune C677T associée à un déficit enzymatique bénin [68-71]. En 1995, sept mutations ont été signalées, six avec substitution d'un seul acide aminé et une mutation de 50 sites d'épissage. Les substitutions homozygotes découvertes comprennent la substitution de Pro à Leu à 764 pb, la substitution Thr à Met à 692 pb et le résidu Arg à Cys à 985 pb. Les autres mutations hétérozygotes composites rapportées aux exons 1, 5 et 6 étaient la substitution de Cys par Arg, Arg avec Glu et Arg avec Cys à 1015, 167 et 1081 pb respectivement. La mutation de 50 sites d'épissage a été identifiée comme une délétion de 59 pb entraînant l'élimination de 19 acides aminés entre 653 et 939 pb. En 1996, 5 nouvelles mutations du gène MTHFR ont été rapportées. Il y avait 4 mutations de mis-sens et une mutation de 30 sites d'épissage. La mutation de 30 sites d'épissage précédant 249 pb (249-1 pb) est une substitution dans le récepteur d'épissage dinucléotide (AG). Les mutations de mis-sens comprennent la substitution de Gly à Val, Leu à Pro, Arg à Pro et Arg à Cys à 458, 980, 164 et 1141 pb respectivement. Cependant, la substitution d'Ala à 677 bp pour le gène MTHFR est une mutation fréquente avec un effet délétère rapporté sur le métabolisme de l'homocystéine plasmatique, conduisant à une hyperhomocystéinémie et à un faible taux de folate [66, 68-71].

2.2.3.2 Le polymorphisme C677T de la MTHFR : Il s'agit d'une mutation ponctuelle à la position 677 sur le gène MTHFR avec la substitution de la cystéine au nucléotide thymine à cette position. Cette mutation ponctuelle provoque la substitution de l'alanine en valine dans l'enzyme MTHFR. Ce polymorphisme mononucléotidique de ce gène réduit la thermostabilité de l'enzyme MTHFR en raison de la diminution de l'activité de l'enzyme à 37 ° C ou plus. L'activité enzymatique de MTHFR chez les sujets homozygotes est inférieure de 50 à 60% à 37°C et inférieure de 65% à 46°C par rapport aux témoins normaux non mutés. L'incapacité de l'enzyme MTHFR à catalyser la conversion du 5,10-méthylènetétrahydrofolate en 5- méthyl tétrahydrofolate conduit à l'augmentation des taux plasmatiques d'homocystéine chez les sujets homozygotes mutés. Les sujets mutés homozygotes ont donc des taux d'Hcy plus élevés tandis que les sujets mutés hétérozygotes vont avoir un taux d'Hcy légèrement augmenté par rapport aux témoins normaux non mutés [66].

2.2.3.3 Epidémiologie du polymorphisme C677T de la MTHFR [66]: La prévalence de ce polymorphisme est variable selon l'origine ethnique et géographique. La

fréquence des allèles était plus élevée chez les Italiens et les Hispaniques (de 21% à 25%) et plus faible chez les Noirs américains (1-2%) et en Afrique subsaharienne (0%). Parmi les Européens, l'allèle homozygote était le plus élevé en Italie et le plus faible en Allemagne. En Grande-Bretagne, le pourcentage d'homozygotie dans la population était d'environ 13%, et de 10 à 14% dans au Canada, l'Amérique, le Brésil et l'Australie.

Pour la prévalence selon l'âge, une étude japonaise avait rapporté une fréquence plus faible de la mutation du gène MTHFR chez les plus de 80 ans (7%) comparativement aux sujetes plus jeunes: 55-79 ans (14%) et 14-55 ans (19%). Aucune différence selon le sexe n'a été retrouvée.

2.2.3.4 Association polymorphisme C677T de la MTHFR et différentes pathologies : Le polymorphisme C677T de la MTHFR a été associé a de nombreuses pathologies. Dans une méta-analyse datant de 2016, concernant 618 études, incluant 137 013 participant, le polymorphisme C677T de la MTHFR a été associé à 42 pathologies dont l'autisme, la schizophrénie, les maladies cardiovasculaires, métaboliques, endocriniennes, les malformations fœtales et le cancer (Tableau 5) [66, 72].

La réduction de l'activité de l'enzyme MTHFR entraîne une augmentation du pool de 5,10-méthylène-THF au détriment du pool de 5-méthyl-THF à l'origine de l'altération de la méthylation de l'ADN. Étant donné que la méthylation de l'ADN joue un rôle essentiel dans la régulation de l'expression des gènes et le maintien de la stabilité génomique, les aberrations dans les profils de méthylation normale causées par le polymorphisme MTHFR C677CT pourraient entraîner le développement du cancer.

Tableau 5 : Les différentes pathologies associées au polymorphisme C677T de la MTHFR**PATHOLOGIES ASSOCIÉES AU POLYMORPHISME C677T DE LA MTHFR**

- Maladies Vasculaires :
 - Accidents vasculaires cérébraux ischémiques et hémorragiques
 - Maladie des artères coronaires
 - Hypertension artérielle essentielle
 - Hyperlipidémie
 - Dissection de la carotide
 - Occlusion des veines rétiniennes
 - Thromboembolie veineuse

- Psoriasis

- Grossesse et Fertilité
 - Infertilité
 - Avortement A Répétition
 - Prééclampsie
 - Syndrome De Down
 - Spina Bifida

- Maladies Psychiatriques Et Neurologiques
 - Parkinson
 - Alzheimer
 - Migraine
 - Thrombose Des Veines Cérébrales
 - Désordres Psychiatriques Combinés
 - Schizophrénie

- Diabète
 - Néphropathie Diabétique

- Cancer

2.2.3.5 Association polymorphisme C677T de la MTHFR et cancers:

Des études avaient montré que les carences en folates peuvent augmenter l'incidence des cancers. Cette carence est à l'origine d'un épuisement croissant de la thymidine, la mauvaise incorporation en continue de l'uracile dans l'ADN entrainera un défaut de réparation de celui-ci. Cette déstabilisation de l'ADN peut entraîner des aberrations chromosomiques et une transformation maligne potentiellement. La réduction de la méthylation de la cytosine dans l'ADN en cas de déficience en folate pourrait également entraîner l'expression de pro-oncogène et la transformation potentielle de malignité. La MTHFR étant directement

impliquée dans le métabolisme du folate, le polymorphisme C677T de la MTHFR peut avoir de ce fait des conséquences directes sur l'incidence des cancers (Tableau 6) [66].

Tableau 6 : Les différents cancers associés au polymorphisme C677T de la MTHFR

DIFFERENTS CANCERS ASSOCIÉS AU POLYMORPHISME C677T DE LA MTHFR

- Sein
 - Col de l'utérus
 - Ovaires
 - Œsophage
 - Bouche
 - Pancréas
 - Prostate
 - Vessie
 - Poumon
 - Leucémie
 - Colorectal
 - Estomac
 - Cerveau
-

Cancer du sein : L'association des polymorphismes MTHFR avec le cancer du sein a été largement étudiée et a donné de nombreux résultats contradictoires. L'association entre l'apport alimentaire et le risque de cancer du sein pourrait être modifiée par le polymorphisme du gène MTHFR C677T [73]. Sangrajang et al. avaient rapporté dans la population thaïlandaise que le risque de cancer du sein pourrait être accru en raison du polymorphisme génétique impliqué dans la voie métabolique des folates et de l'alcool [74]. Dans la population chinoise, le polymorphisme MTHFR C677T était significativement associé au risque de cancer du sein [75, 76]. L'allèle MTHFR 677T s'est avéré significativement plus fréquent dans les cas de cancer du sein bilatéral ou en cas de cancer du sein et de l'ovaire dans la population juive [77].

Contrairement à ces études, Lajin et al. avait signalé l'absence d'association du polymorphisme MTHFR 677CT et le risque de cancer du sein dans la population syrienne [78]. De même, ce polymorphisme n'a pas été associé au cancer du sein dans d'autres études en Sibérie occidentale en Russie, et au Brésil chez les femmes de moins de 50 ans [79, 80]. La discordance entre ces résultats pourrait être due aux différences ethniques ainsi que la taille des échantillons [80].

Cancer du col de l'utérus et de l'ovaire : L'allele 677T de la MTHFR pourrait augmenter le risque de cancer du col chez les asiatiques et serait protecteur chez les femmes caucasiennes [81].

Concernant le cancer de l'ovaire, une méta-analyse a confirmé une association accrue entre le polymorphisme C677T de la MTHFR et le risque de cancer de l'ovaire chez les Asiatiques et non chez les Caucasiennes [82, 83].

Cancer de la bouche et de l'œsophage : Wen et al, avait retrouvé un risque de cancer de l'œsophage chez les individus ayant un génotype MTHFR CT/TT avec faible apport en folate [OR (95%) : 1,65 (1,1-2,49)] comparativement à ceux ayant un apport élevé en folate chez les individus porteurs du génotype MTHFR CT/TT [OR (95%) : 1,64 (0,82-3.26)] [84]. Une autre méta-analyse avait démontré que le polymorphisme 677CT/TT de la MTHFR pourrait contribuer au processus de développement du carcinome oesophagien avec des effets largement modifiés par le tabac et l'ethnie (les Chinois) [85]. D'autres études chez des populations caucasiennes au royaume unis avait au contraire suggéré que la mutation de la MTHFR en conjonction avec une faible absorption alimentaire de folate est un facteur mineur contribuant au carcinome de l'œsophage [86].

Par ailleurs, Jia et al. Avait montré dans une méta-analyse que ce polymorphisme pourrait jouer un rôle dans le processus de cancérogenèse en cas de cancer de la bouche chez les Asiatiques et les grands buveurs [87].

Cancer de la prostate : Dans une étude sur la population asiatique, une réduction significative du risque de cancer de la prostate a été associée au polymorphisme C677T de la MTHFR [88]. De même, aucune association n'a été observée entre ce polymorphisme et le risque de carcinome prostatique chez les mâles iraniens [89]. Alors que dans une population équatorienne ceux avec un polymorphisme C677T de la MTHFR aurait présenté un risque plus élevé de cancer de la prostate [90].

2.3 L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) [17, 18, 91-106]

L'ACE, enzyme clé du système rénine-angiotensine exprimée dans de nombreux tissus, est une métallopeptidase de zinc qui convertit l'angiotensine I, décapeptide inactif, en

angiotensine II vasoactive et inactive la bradykinine, peptide vasodilatateur qui est un agent angiogénique.

Par ailleurs, l'angiotensine II, le produit de l'ACE, possède des propriétés oncogènes et pro-prolifératives et plusieurs études avaient démontré que les inhibiteurs de l'ACE sont oncolytiques et oncopreventifs. Ils réduiraient l'incidence et protégeraient contre le cancer mais également le traite [18, 92, 93]. De mêmes ces agents augmenteraient l'efficacité de la chimiothérapie et de la radiothérapie ainsi que l'atténuation des dommages causés aux tissus sains par les schémas chimiothérapeutiques standards [18]. Leur effet sur les cellules tumorales pourrait être attribué à leur effet sur la réduction de la prolifération cellulaire et la migration, l'inflammation et l'angiogenèse [92-94]. D'autres recherches ont rapporté une inhibition de l'activité des métalloprotéases de la matrice cellulaire et une réduction de l'expression du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) par les inhibiteurs de l'ACE [93, 95].

2.3.1 Le système Rénine – Angiotensine (SRA)

Le lien entre le rein et l'hypertension artérielle (HTA) date de la fin du XIXe siècle où les physiologistes Tigerstedt et Bergman avaient démontré en 1898 en injectant des extraits de rein chez des lapins, l'augmentation de la pression artérielle. Quelques années plus tard, en 1934, l'anatomopathologiste Goldblatt (1891–1977) avait provoqué une HTA expérimentale en clampant les artères rénales de chien, alors qu'aucun effet sur la tension n'a été noté en cas de clampage d'autres artères (spléniques, fémorales). Il a repris l'hypothèse de Bergman sur l'existence d'une protéine soluble à l'origine de l'élévation tensionnelle appelée rénine.

Le SRA représente donc l'un des systèmes les plus importantes et majeurs dans la régulation de la pression artérielle et du métabolisme hydro-sodé (Figure 12). Il est composé d'enzymes protéolytiques (rénine et ACE) et des peptides avec ou sans potentiel vasoactif (angiotensinogène, l'angiotensine I et l'angiotensine II), ainsi que de deux types de récepteurs à sept domaines transmembranaire (ATR1 et ATR2).

Le SRA est stimulé suite à une activation des cellules spécialisées de l'appareil juxta-glomérulaire au niveau rénal en réponse à une baisse de la pression artérielle ou une diminution de l'osmolarité plasmatique. Les cellules myoépithélioïdes de l'arteriole afférente du glomérule renal, synthétisant et stockant la rénine, sécrètent celle-ci sous forme active dans la circulation. La rénine diffuse dans les compartiments plasmatique, lymphatique et

interstitiel et agit sur son substrat, l'angiotensinogène produite par le foie et la transforme en angiotensine I. Cette dernière est ensuite convertie en angiotensine II (Ang II) par l'ACE généralement présente sur le lit vasculaire endothelial des vaisseaux sanguins. L'Ang II, en se fixant à ses récepteurs régule la pression artérielle en induisant une vasoconstriction et en augmentant la volémie par l'intermédiaire de l'aldostérone.

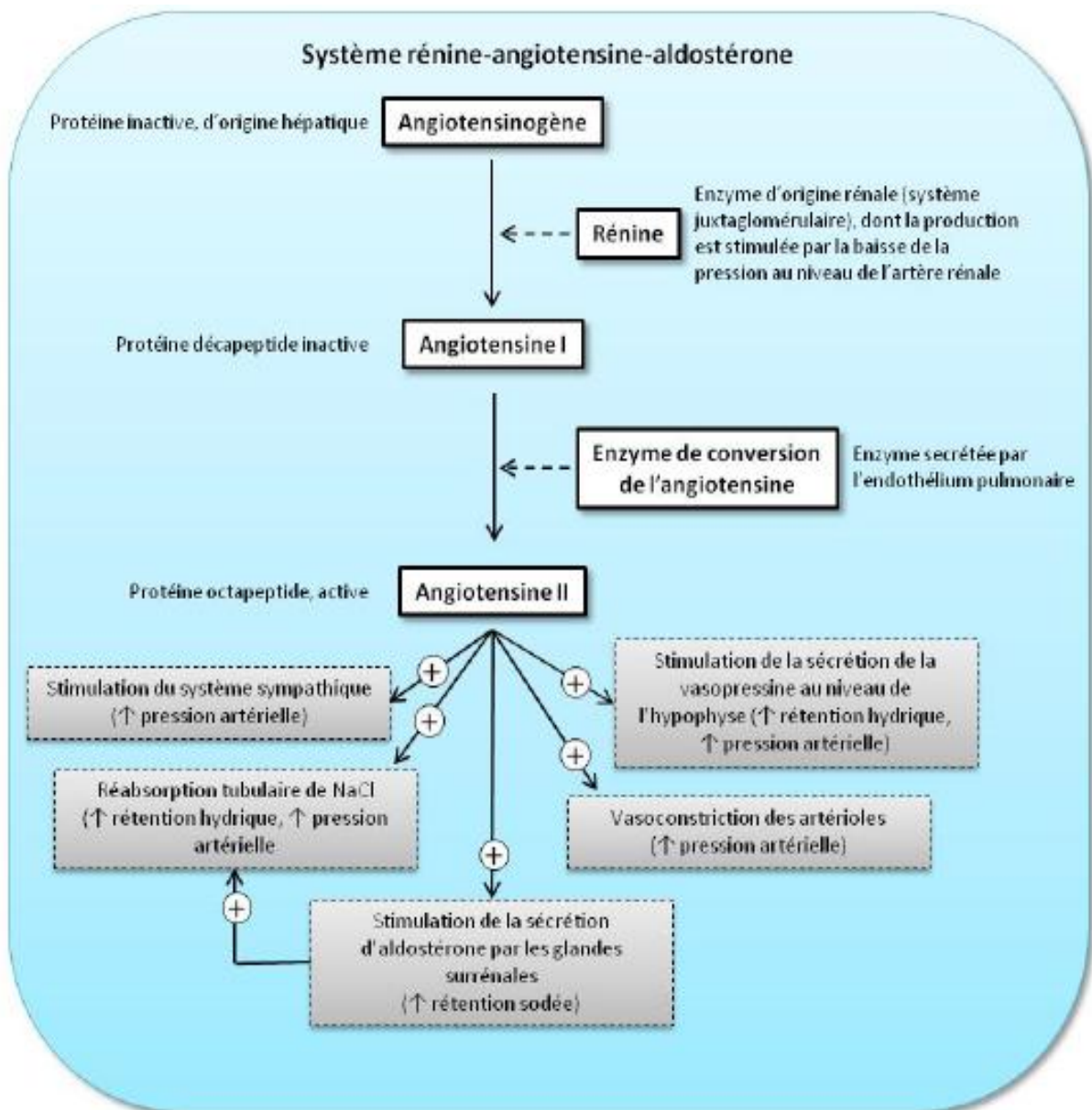


Figure 12 : Le système Rénine – Angiotensine

La rénine : C'est une aspartylprotéase de 40 kDA, sécrétée principalement sous forme de prorénine inactive (90%) par les cellules de l'appareil juxtaglomérulaire du rein. L'activation se fait au niveau des granules de sécrétion où la rénine est stockée et libérée dans la circulation suite à la stimulation. Les facteurs stimulant sont : une baisse de la pression de perfusion dans l'artériole afférente du glomérule, les agonistes B-adrénrgiques, la baisse du débit urinaire du chlorure de sodium dans le tubul distal en regard de la macula densa.

Le gène humain de la rénine est unique, s'étend sur 12 kpb, et localisé en 1q32. Son produit est la préprorenine, protéine de 400 acides aminés qui précède la rénine d'un peptide signal de 23 acides aminés.

L'angiotensinogène : C'est une glycoprotéine de 60 kDa, constituée de 452 acides aminés.

Les glucocorticoïdes, les œstrogènes, l'angiotensine II et les hormones thyroïdiennes peuvent stimuler la synthèse d'angiotensinogène. Alors qu'une hépatectomie totale entraîne une chute du taux d'angiotensinogène plasmatique. Jusqu'à ce jour, l'implication de la régulation des concentrations d'angiotensinogène sur le fonctionnement du SRA reste inconnue.

L'angiotensinogène est principalement synthétisé par le foie mais une synthèse locale par le rein dans le tube contourné proximal existerait également. Cette synthèse serait régulée par les cytokines inflammatoires (*tumor necrosis factor alpha* [TNF α], interleukine 6 [IL6]).

Le gène de l'angiotensinogène appartient à la superfamille des inhibiteurs des sérines protéases. Son clonage a montré que la séquence codante (1455 nucléotides) comprend 5 exons séparés par 4 introns et s'étend sur 13 kpb. Une seule copie existe de ce gène dans le génome, localisée sur le bras long du chromosome 1 en position 1q42-q43.

L'angiotensine I : C'est un décapeptide inactif qui est clivée en angiotensine II par l'ACE. Ce clivage du dipeptide C-terminal His-Leu de l'angiotensine I est une réaction rapide et n'est pas une étape limitante de la cascade. La quantité d'angiotensine II formée dépend de la quantité d'angiotensine I libérée lors de la première étape.

L'angiotensine II : Elle présente de nombreuses activités biologiques immédiates, liées en particulier à son action hémodynamique, et des effets à plus long terme, liés à la synthèse des constituants de la paroi vasculaire.

A court terme, l'angiotensine II permet de maintenir la PA et la volémie, via de nombreux mécanismes : action vasoconstrictrice sur les cellules musculaires lisses des vaisseaux, action

vasoconstrictrice rénale sur les artérioles efférentes et afférentes régulant le débit sanguin rénal et la filtration glomérulaire, stimulation de la production d'aldostérone par les cellules de la zone glomérulée de la corticosurrénale, stimulation de la réabsorption de sodium au niveau du tubule, proximal et au niveau du tubule distal, régulation centrale de la PA avec une augmentation de la soif et de la sécrétion de vasopressine, stimulation du système nerveux autonome sympathique conduisant à la libération de noradrénaline.

Les effets au long cours sont principalement sur le remodelage vasculaire. Elle favorise l'hypertrophie des cellules musculaires lisses et la production de matrice extracellulaire, conduisant à une diminution de la compliance des artères élastiques et une élévation des résistances périphériques. Elle favorise le dépôt de protéines matricielles ainsi que la stimulation de l'activité des métalloprotéases. L'angiotensine II est aussi responsable, au niveau vasculaire, d'une inflammation locale via l'augmentation des molécules d'adhésion, des chimiokines et cytokines, ainsi que par un état procoagulant lié à l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (PAI-1).

Les récepteurs de l'angiotensine II : L'action de l'angiotensine II est principalement médiée par ses récepteurs à sept hélices transmembranaires couplés à des protéines G. Il en existe deux formes ATR1 et ATR2 qui présentent une homologie de 34 %.

L'ATR1 est la forme retrouvée majoritairement chez l'homme, au niveau glomérulaire, tubulaire rénal, vasculaire, cardiaque, surrénalien, et cérébral hypophysaire. Son gène est situé sur le chromosome 3q22. L'ATR1 est constitué de 359 acides aminés. L'activation de ce récepteur est responsable de la majorité des effets à court terme attribués à l'angiotensine II (vasoconstriction, réabsorption rénale de sodium, libération d'aldostérone, effets centraux).

A plus long terme, son activation par l'angiotensine II et son couplage à une protéine Gq conduisent à l'activation de plusieurs voies de signalisation dont celle des phospholipases C, A2 et D ou des MAP-kinases, et ainsi à son action proliférative et profibrosante.

Le gène codant pour le récepteur ATR2 est situé sur le chromosome X. Il s'agit d'une protéine de 363 acides aminés. Il est principalement présent pendant la vie fœtale et chez le nouveau-né. Il persiste à un faible niveau d'expression dans l'endothélium vasculaire, dans le cœur et dans le rein. Le rôle de ce récepteur est beaucoup moins connu. Cependant, il semblerait avoir des effets opposés à ceux de ATR1. Son activation conduit à la libération de bradykinines responsable de la génération de monoxyde d'azote (NO) et de guanosine

monophosphate cyclique (GMPc), et donc interviendrait dans la vasodilatation et la diminution de la prolifération cellulaire.

ATR1 et ATR2 peuvent interagir puisque leur dimérisation, lorsqu'ils sont exprimés à la surface d'une même cellule, donne lieu à une inhibition de l'activité d'ATR1.

2.3.2 Structure et fonctions de l'ACE

L'ACE est une métalloprotéase à zinc qui possède un domaine extracellulaire, transmembranaire et cytosolique. Le domaine extracellulaire est composé de deux sites homologues, le domaine N et le domaine C, qui constituent les sites catalytiques de l'enzyme. Ces deux sites catalytiques possèdent des activités dipetidyl carboxypeptidase et endoprotéolytique qui pourraient ainsi expliquer la multitude de substrats potentiels de l'ACE. En effet, cette enzyme possède plusieurs substrats : l'angiotensine I, la substance P, la cholecystokinine (CCK), la protéine B amyloïde, l'angiotensine₁₋₉, la LH-RH, le tétrapeptide, N-Acétyl-Séryl-Aspartyl-Lysyl Proline (Ac-SDKP), impliqué dans le contrôle de la prolifération des cellules souches hématopoïétiques, et la bradykinine (BK), peptide vasodilatateur qu'elle dégrade en métabolite inactif (BK 1-7). L'effet vasodilatateur de la BK passe par la stimulation de la synthèse du monoxyde d'azote (NO) et de guanosine monophosphate cyclique (GMPc). La BK active aussi la libération d'autres vasodilatateurs : Prostaglandine E2 et prostacycline.

L'ACE est une ectoenzyme de 180 kDa existant sous 2 formes, une soluble dans le plasma, et une autre exprimée à la membrane plasmique de différents tissus : cellules de l'endothélium vasculaire, du tubule rénal proximal et neuroépithéliales. L'ACE est exprimée aussi dans de nombreuses régions du cerveau : endothélium du système vasculaire cérébral, du plexus choroïde et des astrocytes

2.2.3 Gène de l'ACE

Le gène de l'ACE, localisé sur la bande 17q23 sur le chromosome 17, est constitué de deux domaines homologues et s'étend sur 21 kpb [97]. Il existe deux transcrits de 4,3 kb et 3kb, issus respectivement des deux régions: la région 5' de l'exon 1 qui contient le promoteur

de la forme endothéliale et l'intron 12 qui contient le promoteur de la forme testiculaire exprimée dans les cellules germinales.

Le gène de l'ACE présente un polymorphisme fonctionnel insertion/délétion (I/D) d'une séquence Alu de 287 pb dans l'intron 16 (Figure 13) [97, 103-105]. Ce polymorphisme est associé de façon codominante à la concentration plasmatique de l'ACE. Chez les sujets avec génotype DD, le taux plasmatique de l'ACE est deux fois plus élevé que chez ceux avec génotype II. Les sujets avec génotype ID ont un taux d'ACE intermédiaire.

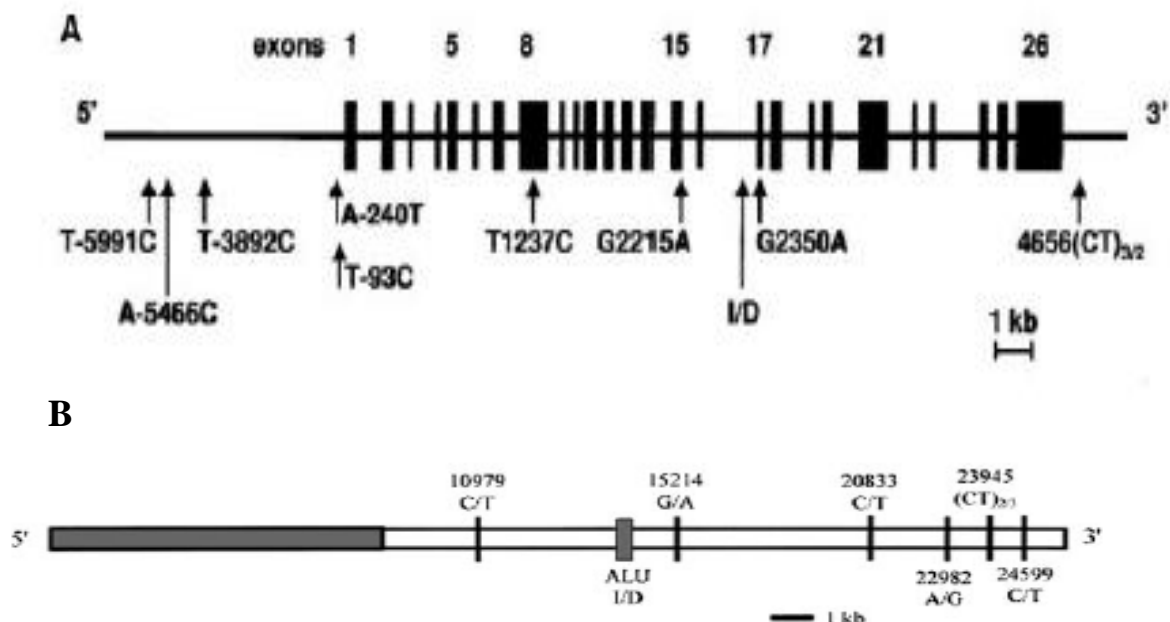


Figure 13 : Diagramme du gène de l'ACE avec localisation des 10 polymorphismes bi alléliques analysés par Keavney et les 7 polymorphismes bi alléliques analysés par Zhu [97]

2.2.4 Association du polymorphisme I/D de l'ACE et cancers : Le polymorphisme I/D de l'ACE a été associé à la pathogénie et la progression de plusieurs cancers dont les cancers du poumon, le sein, la prostate, le larynx, les cancers digestifs et récemment le cerveau [17, 104]. D'où l'idée de vérifier l'effet des inhibiteurs de l'ACE sur l'incidence de ces cancers ainsi que leurs possibles actions antitumorales. En effet, leur effet sur les cellules tumorales passerait par la réduction de la prolifération cellulaire et la migration,

l'inflammation, l'angiogenèse [92-94] ainsi que l'inhibition de l'activité des métalloprotéases de la matrice cellulaire et la réduction de l'expression du VEGF (Figure 14) [18, 92-95, 107].

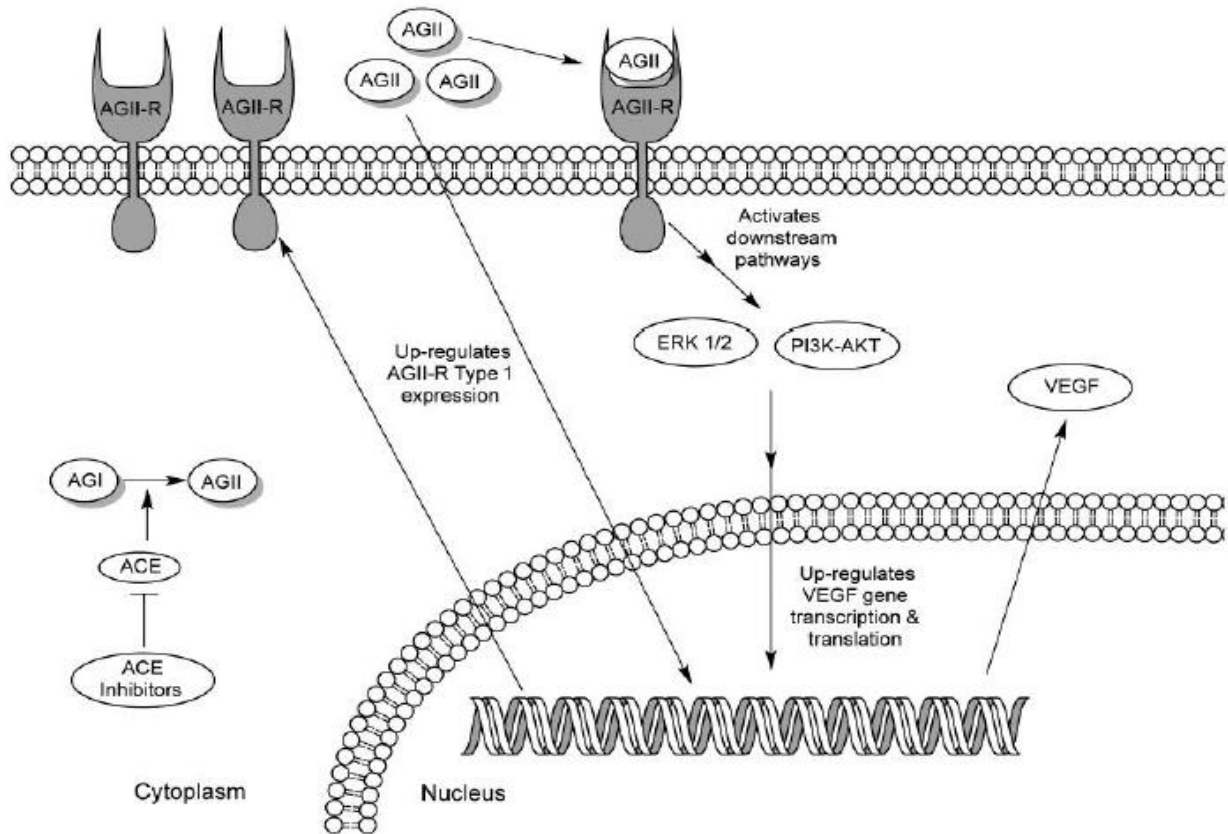


Figure 14: Actions oncogéniques de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) dans le cancer et inhibition de ces effets par les inhibiteurs de l'ACE [18]

La conversion de l'angiotensine I (AGI) en angiotensine II (AGII) et la liaison à son récepteur conjugué (AGII-R) initie une protéine extracellulaire apparentée au signal 1/2 (ERK1 / 2) et phosphatidylinositol 3-kinase / protéine kinase B (PI3K / AKT) qui entraîne une régulation positive du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire alpha (VEGFA). L'inhibition de la production d'angiotensine II entraîne une diminution de la production de VEGF et une production microvasculaire atténuée, entraînant donc une diminution de l'absorption des nutriments et une croissance tumorale retardée in vivo.

CHAPITRE 3

PATIENTS ET MÉTHODES

3.1. Populations étudiées

Notre travail est subdivisé en 2 parties :

- la première partie s'est déroulée au CHU Franz Fanon de **Blida**. Elle a consisté à l'analyse des gènes candidats à partir de **tissus de gliomes** récupérés de la banque des tissus du Laboratoire d'Anatomie Pathologique du CHU de Blida. Les patients étaient opérés au service de neurochirurgie du même hôpital pour tumeur cérébrale primitive du 1^{er} Janvier 2014 au 30 Juin 2016. Ils étaient au nombre de 59.
- la 2^{ème} étape était **une étude cas-témoins** et s'est déroulée du 1^{er} Septembre 2016 au 30 Juin 2017. Les ADN dans ce cas étaient extraits de **prélèvements sanguins** de patients atteints de gliomes et de témoins sains, indemnes de toute pathologie connue. Les patients sont recrutés ici des différents services de radiothérapie et de neurochirurgie du CHU de Constantine, Hôpital Militaire Régional Universitaire de la Nouvelle Ville Ali MENDJLI, le CHU de Batna et la clinique Athéna. Pour des raisons de simplification, tout ces patients dont on a utilisé des **prélèvements sanguins** sont recrutés au niveau du **CHU de Constantine**. Le nombre de cas de gliomes étudiés ici était de 36, versus 136 sujets sains pour l'étude du polymorphisme C677T de la MTHFR et 195 sujets sains pour l'étude du polymorphisme I/D de l'ACE. Ces témoins étaient appariés avec les cas de gliomes pour l'âge et le sexe et recrutés parmi des personnes volontaires consultant au service de médecine de travail ou bien parmi le personnel travaillant au CHU de Constantine. L'ensemble des témoins sélectionnés n'ont aucun antécédent personnel ou familial de cancer et n'ont aucune maladie connue pouvant être associée avec les polymorphismes étudiés de la MTHFR et de l'ACE (hypertension artérielle, maladies cardiovasculaires et maladies inflammatoires).

Tous les participants ont répondu à un questionnaire, présenté en annexe et rempli par le médecin traitant. Les différents items de ce questionnaire sont :

- ✓ identification du patient : nom et prénom, date de naissance, sexe, adresse, origine,
- ✓ profession et niveau d'étude,

- ✓ facteurs de risque du gliome : exposition au téléphone portable (fréquente, plus d'une heure par jour, modérée moins d'une heure par jour ou jamais d'utilisation de téléphone portable), cas similaire de gliomes dans la famille, exposition au tabac (tabagisme actif ou passif),
- ✓ caractéristiques du gliome : date de diagnostic, type histologique, traitement subi.

3.2 Prélèvements tissulaires

Les 59 échantillons tissulaires utilisés dans cette première partie sont issus de la banque de conservation (Tumorotheque) du Laboratoire d'Anatomie Pathologique du CHU Franz Fanon de Blida. A partir des fichiers informatiques, nous avons obtenues une liste des patients atteints de gliomes, opérés au service de la Neurochirurgie CHU de Blida, du 1^{er} /01/2014 au 30/06/2016. Par la suite, on a recherché les blocs de paraffines ; leur observation au microscope permet la réalisation d'une présélection des échantillons dont la zone tumorale ne contenant pas de nécrose.

3.2.1 Coupes des échantillons : on a réalisé 2 types de coupes :

- ✓ La première coupe (5µm d'épaisseur) a servi pour la coloration Hematoxyline-Eosine-Safran (HES).
- ✓ La deuxième, coupe consiste à faire 30 coupes de 50 µm pour chacune qui sont récupérées à l'aide d'une aiguille et placées dans un micro tube « RNase et DNase free » afin de réaliser l'extraction d'ADN.

3.2.2 Vérification de la qualité des échantillons : La vérification de la bonne qualité histologique de l'échantillon correspondant au tissu tumoral métabolique actif et non pas la nécrose, se fait par, une coloration Hematoxyline-Eosine-Safran (HES). Le protocole de coupe HES qui permet d'assurer la coloration extemporanée, passe par plusieurs étapes dont la première est la fixation à l'éthanol 96 % pendant 30 secondes. L'échantillon est ensuite rincé à l'eau distillée puis mis dans l'hématoxyline pendant 1 minute permettant ainsi, de colorer les noyaux en bleu. L'excès de l'hématoxyline est enlevé après rinçage à l'eau distillée.

L'échantillon ainsi obtenu, est mis dans l'alcool ammoniacal pendant 30 secondes puis rincé à l'eau distillée. Afin de procéder à la coloration des fibres musculaires et hématies, en rouge

vif, et le cytoplasme en rose, le produit est mis dans de l'éosine acétifiée puis rincé à l'eau distillée pour enlever les restes de l'éosine.

Par la suite, on précède à des lavages successifs avec de l'éthanol 96 % - 100%, et ce, pendant 3 secondes. Puis, coloration du collagène au Safran (30 secondes) ; enfin, on procède à un lavage avec de l'éthanol 100% pendant 3 secondes et placement de l'ensemble dans du toluène.

La lame est montée à L'Eukitt (*Grosseron*) afin de permettre une visualisation au microscope.

3.3 Prélèvements sanguins : La 2^{ème} partie de notre travail a consisté à la réalisation d'une étude cas-témoin. Les ADN dans ce cas étaient extraits de prélèvements sanguins de patients atteints de gliomes et de témoins sains, indemnes de toute pathologie connue. En somme, ont été prélevés 36 patients présentant un gliome, consultant entre 2016-2017 aux différentes structures susmentionnées (CHU Ibn BADIS de Constantine, HMRUC Nouvelle Ville Ali MENDJLI, CHU de Batna, clinique Athéna, et pour des raisons de simplification, tous ces patients seront identifiés dans tout le manuscrit comme patients du **CHU de Constantine**) et 136 sujets sains pour l'étude du polymorphisme C677T de la MTHFR et 195 sujets sains pour l'étude du polymorphisme I/D de l'ACE.

Les techniques de prélèvements sanguins pour étude génétique répondent aux standards internationaux. Le sang est prélevé sur 2 tubes stériles EDTA, sous vide avec le système Vacutainer, 7 ml à 10 ml chacun, et ce, dans des conditions d'hygiène et de sécurité. Les tubes sont étiquetés avec identification du nom et prénom du patient, conservés, sans centrifugation, à température ambiante en attente de l'extraction d'ADN qui est réalisée au plus tard dans les 3 – 4 jours suivant le prélèvement.

3.4 Protocole d'extraction d'ADN tissulaire : La technique d'extraction d'ADN tissulaire réalisée est celle au Phénol Chloroforme décrite par Pikor (Tableau 7) [108].

Deux autres protocoles ont aussi été essayés décrit par Sengüven et Vaziri-Gohar (Tableau 8, 9) [109, 110].

Des précautions sont à prendre dans la zone de travail, et toutes les pipettes utilisées sont nettoyées successivement de toutes RNase et DNase, et ce à l'aide du spray RNase away (*Molecular Bioproducts*), DNase away (*Mbp Bioproducts*).

A noter ici que nous avons réalisé l'ensemble de notre étude grâce au matériel mis à notre disposition par le service de biochimie, unité génétique du CHU de Constantine et le laboratoire de biologie et de génétique moléculaire de l'université Salah Boubnider, Constantine 3.

Tableau 7 : Technique d'extraction d'ADN tissulaire au Phénol Chloroforme décrite par Pikor [108]

Technique d'extraction d'ADN tissulaire

- Ajouter de 800 µL de Xylene
 - Balancer de 5 à 15 minutes
 - Centrifuger pendant 3 minutes à 14 000 rpm
 - Jeter le surnageant
 - Répéter les lavages de deux à trois fois
 - Jeter le surnageant et garder la pelote
 - Ajouter 800 µL ethanol 100 % vortexer, et centrifuger pendant 3 min à 14 000 rpm
 - Jeter le surnageant
 - Ajouter 800 µL d'éthanol 70% vortexer et centrifuger pendant 3 min à 14 000 rpm
 - Jeter le surnageant
 - Ajouter 800 µL d'éthanol 50% vortexer et centrifuger pendant 3 min à 14 000 rpm, enlever l'excès avec la pipette.
 - Laisser sécher pendant 5 minutes.
 - Ajouter 400 µL de toman de lyse et très bien suspendre en vortexant
 - Incubation à 56 C° toute la nuit.
 - Ajouter de 20 µL de proteinase K (20 mg/ml)
 - Répétition de cette étape 2 au 5 J jusqu'à ce que le tissu se dissout
 - Ajouter 700 µL de phénol saturé, inverser et centrifuger pendant 5 min à 14 000 rpm
 - Transférer la phase aqueuse dans un nouveau tube, inverser et centrifuger pendant 5 min à 14 000 rpm.
 - Répéter les deux précédentes étapes sur la phase aqueuse jusqu'à ce que l'interphase deviennent transparente
 - Ajouter le même volume de la phase aqueuse de phénol ; chloroforme ; isoamyl alcool, mixer et centrifuger pendant 5 minutes À 14 000 rpm.
 - Récupération de la phase aqueuse dans un nouveau tube
 - Estimer le volume de la phase aqueuse
 - Ajouter 1/10 le volume de 3M sodium Acetate PH=5,2 et un volume de 1005 isopropanol.
 - Bien mélanger et mette à -20° C
 - Centrifuger à 4° C pendant 10 minutes
 - Jeter le surnageant
 - Laver la pelote avec 70% éthanol froid, centrifuger à 4° C pendant 10 minutes et laisser sécher à l'air libre.
 - Resuspension dans l'eau distillée.
 - Quantification de la concentration de l'ADN à A 280 : A280= 1,8nano mètre.
-

Tableau 8 : Technique d'extraction d'ADN tissulaire au Phénol Chloroforme décrite par Sengüven [109]

Technique d'extraction d'ADN tissulaire

- Ajouter un volume égal de phénol et passer au vortex.
 - Centrifuger pendant 3 minutes à 14 000 rpm.
 - Transférer la couche aqueuse dans un nouveau tube.
 - Ajouter un volume égal de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25: 25: 1)
 - Le produit est vortexé puis centrifugé pendant 5 minutes à 14 000 rpm dans une microcentrifugeuse.
 - Transférer la couche aqueuse dans un nouveau tube.
 - Le volume estimé de la couche aqueuse et recueillie pour la précipitation de l'ADN est de 550 μ L, et 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M et 1 volume d'isopropanol ont été ajoutés.
 - Après un mélange complet, le tube est placé dans un congélateur pendant 30 minutes.
 - Centrifuger le tube à une vitesse maximale pendant 10 minutes à 4 ° C dans une microcentrifugeuse.
 - Jeter le surnageant.
 - Laver le culot avec 1 ml d'éthanol froid à 70%
 - Centrifuger à la vitesse maximale pendant 10 minutes à 4 ° C.
 - Jeter le surnageant
 - Sécher le culot sans que ce séchage ne soit excessif.
 - Remettre en suspension le culot avec une qualité biologique de 50 μ L de d'H₂O.
-

Tableau 9 : Technique d'extraction d'ADN tissulaire décrite par Vaziri-Gohar [110]

Déparaffinement des tissus

- Les tissus sont déparaffinés avec 500 microlitres 100% de xylène sous une hotte.
- Le contenu est ensuite passé au vortex pendant 1 minute et laissé dans un bain-marie à 65 °C pendant 15 minutes.
- Le solvant de xylène est décanté immédiatement et la procédure a été répétée deux fois de plus.

Élimination du xylène

Pour éliminer le xylène résiduel, les échantillons sont lavés cinq fois avec de l'éthanol :

- 1 ml d'éthanol absolu est ajouté et mélangé par vortex pendant 10 secondes et enlevé après 10 minutes.
- 1 ml d'éthanol absolu est ajouté et mélangé par vortex pendant 10 secondes et enlevé après 30 minutes.
- 1 ml d'éthanol à 90% est ajouté et mélangé par vortex pendant 10 secondes et après 20 minutes, le tube est centrifugé à 8000 rpm, puis l'éthanol est retiré.
- 1 ml d'éthanol à 70% est ajouté et mélangé par vortex pendant 10 secondes et après 20 minutes, le tube est centrifugé à 8000 rpm, puis l'éthanol est retiré.
- 1 ml d'éthanol à 50% est ajouté et mélangé par vortex pendant 10 secondes et après 20 minutes, le tube est centrifugé à 8000 rpm, puis l'éthanol est retiré.
- Les microtubes sont ensuite laissés dans un four à 40 °C pour sécher les tissus.

Lyse tissulaire

- Après séchage des tissus, une solution de lyse de 500 microlitres est ajoutée à chaque microtube (Tris 40 mM, EDTA 1 mM, Tween-20 0,5%, protéinase 0,5 µg / µL, PH 8)
- La protéinase k est ajoutée après ajustement du pH
- Les microtubes sont laissés dans un bain d'eau à 60 °C et retournés toutes les 30 minutes jusqu'à ce que le tissu soit complètement lysé ; des températures supérieures à 60 inactiveront rapidement l'enzyme.
- Le lysat cellulaire résultant est chauffé à 95 ° C pendant 8 minutes pour inactiver la protéinase k.

Méthode au phénol-cholorophorme

- Un volume égal de phénol Tris-saturé (pH 8) est ajouté
 - Les tubes sont laissés sur une roue en rotation pendant 10 minutes puis centrifugés à 12000 pendant 2 minutes.
 - 300 microlitres du surnageant sont transférés dans un nouveau microtube et un volume égal de mélange de phénol-cholestérol (1: 1), le contenu du tube est vortexé pendant 10 minutes et centrifugé à 12000 pendant 2 minutes.
 - La phase supérieure est transférée au nouveau microtube et 2,5 volumes d'éthanol absolu froid est ajouté et pour la précipitation de l'ADN, le microtube est laissé pendant toute la nuit à -20 ° C.
 - Les tubes sont centrifugés pendant 30 minutes à 4° C et l'éthanol est décanté.
 - Le culot d'ADN est lavé doucement deux fois avec de l'éthanol froid à 70%, puis le la pelote est complètement séchée à température ambiante.
 - Le culot est dissous dans 30 à 70 µL d'eau distillée stérile, en fonction de la taille.
 - Pour compléter la solubilisation, les microtubes sont placés dans un bain-marie à 40° C pendant une heure.
 - Pour vérifier l'ADN extrait, 5 µL de la solution sont passés sur un gel d'agarose à 1%.
-

3.5 Protocole d'extraction d'ADN sanguin : L'ADN génomique a été extrait à partir de 10 ml de sang périphérique avec la méthode du NaCl où l'ADN nucléaire est libéré dans le lysat et les protéines qui lui sont associées sont digérées et éliminées par précipitation au NaCl (Tableau 10).

Tableau 10 : Technique d'extraction d'ADN leucocytaire

Technique d'extraction d'ADN leucocytaire : Elle passe par trois phases

1- Préparation des Leucocytes

- Mettre le sang Dans un tube Falcon de 50 ml et compléter à 25 ml avec du TE 20 :5. Laisser le mélange pendant 10 minutes dans la glace.
- Centrifuger pendant 10 minutes à 3900 rpm, puis, à l'aide d'une trempe à vide, aspirer le surnageant.
- Ajouter au culot quelques ml de TE 20:5 et, à l'aide d'une pastette stérile, le remettre en suspension.
- Compléter à 25 ml avec du TE 20 : 5 et laisser pendant 10 mn dans la glace.
- Centrifuger pendant 10 minutes à 3900 rpm, puis aspirer le surnageant avec la trempe à vide: obtention d'un culot leucocytaire.

2- Extraction de l'ADN

- Transvaser le culot de leucocyte dans un tube falcon de 15ml.
- Ajouter 3 ml de tompon de lyse en dilacérant le culot avec une pastette stérile.
- Ajouter 200 µl de SDS à 10%.
- Ajouter 100 µl de protéinase K à 10%.
- Agiter le tube pendant une nuit sur une roue à 37 °C.
- Le lendemain, Refroidir sur la glace.
- Ajouter 1ml de NaCl 4M et agiter vigoureusement à la main.
- Remettre pendant 5mn dans la glace (précipitation des protéines).
- Centrifuger pendant 15 minutes à 2500 rpm.
- Transvaser le surnageant dans un tube falcon de 50 ml et ajouter le double de son volume en éthanol absolu, préalablement refroidi pendant 8 min. Agiter le tube plusieurs fois : La pelote d'ADN se forme.
- Si la pelote d'ADN ne se forme pas, laisser le tube pendant 30 minutes à – 20 °C.
- Avec une pipette pasteur, récupérer la pelote d'ADN et la rincer deux fois dans l'éthanol à 70°.
- Mettre la pelote dans un tube nune.

3- Solubilisation

- Selon la grosseur de la pelote d'ADN et la concentration souhaitée, ajouter entre 300 et 1000 µl de TE 10 :1.
 - Pendant une nuit, laisser sur agitateur rotateur à 37°C, puis à température ambiante de 1 à 7 jours, jusqu'à complète dissolution.
-

3.6 Réaction de polymérase en chaine (PCR) [111]

La PCR correspond à une amplification d'un fragment d'ADNc spécifique délimité par des amorces. A la fin de la réaction de PCR, la quantité d'ADNc de la séquence cible augmente d'un facteur 2^n (n étant le nombre de cycles effectués).

La technique PCR-RFLP (Polymorphism Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) est l'association entre les techniques d'amplification et d'observation de polymorphismes sur des fragments digérés par des enzymes de restriction. Ces dernières, appelées aussi endonucléases de restriction sont des enzymes qui découpent l'ADN prolongé en de courts fragments. Chaque endonucléase de restriction vise différentes séquences de nucléotides dans un brin d'ADN.

Les étapes de la PCR-RFLP sont représentées dans la figure 15.

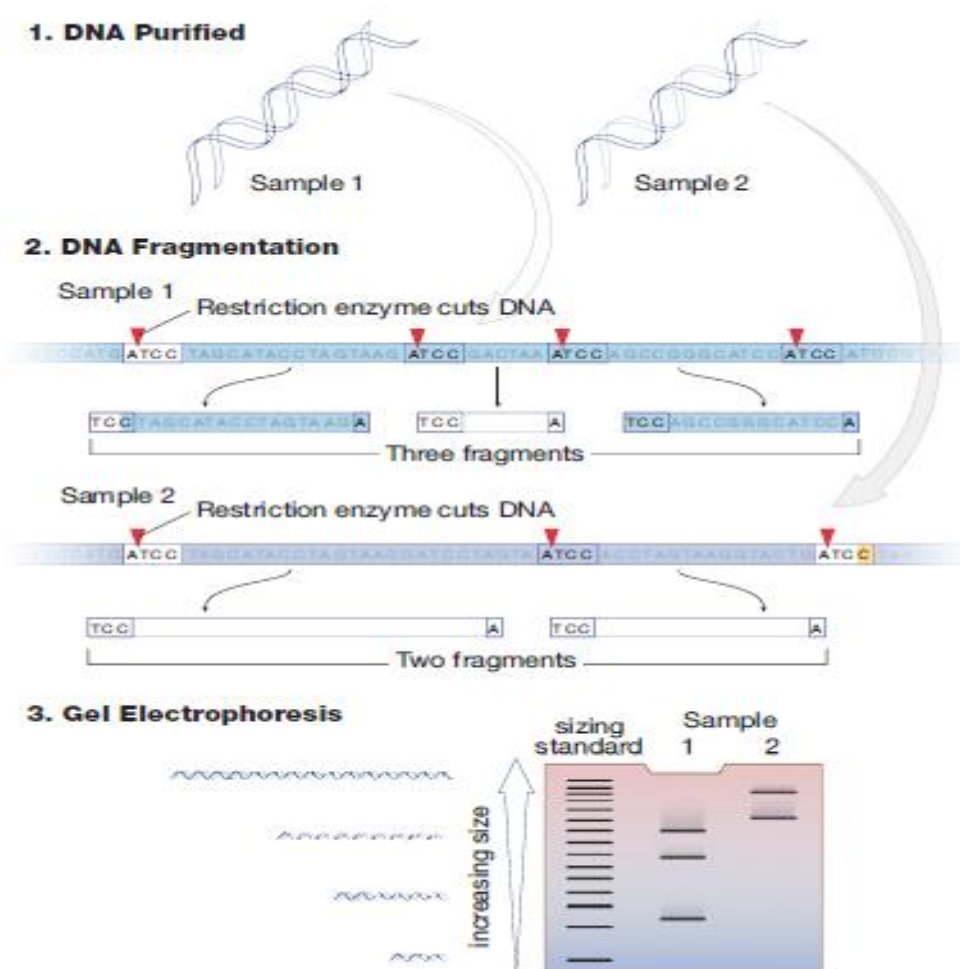


Figure 15 : Les étapes de la PCR-RFLP

(<https://www.nlm.nih.gov/visibleproofs/education/dna/rflp.pdf>)

La réaction de Polymérisation en chaîne : La quantification de l'ADN cible, se fait grâce à un agent fluorophore s'intercalant entre les deux brins d'ADNc: le *Syber Green*. La réaction de PCR se déroule en trois étapes : dénaturation, hybridation et élongation.

Au début de la réaction, le mélange réactionnel contient de l'ADN dénaturé. Les amorces d'oligonucléotides de 20 à 25pb (paire de base) se lient à l'ADNc double. Pendant l'étape d'élongation, le nombre de molécules de fluorophore (*Syber Green*) lié à l'ADN synthétisé augmente ce qui est traduit par l'augmentation de la fluorescence. Celle-ci est mesurée à la fin de l'étape d'élongation de chaque cycle.

La vérification : Le *Syber Green* étant un agent intercalant non spécifique, la spécificité des fragments d'ADNc obtenus après amplification (amplicon), est vérifiée en réalisant une courbe de fusion.

La température est progressivement augmentée de 60°C à 95 °C, avec une lecture continue de la fluorescence. Quand la température augmente, l'ADN double brin se dissocie et la fluorescence chute brutalement. Le point de température correspondant à la dissociation de 50% de l'ADN est la température de fusion du produit synthétisé.

Les instruments utilisés sont nettoyés de tous les ADNase grâce à la solution DNA away (*Molecular Bioproducts*).

Préparation des capillaires (Roche), puits de la plaque PCR 96 puits (Thermo Scientific) :

Le mélange réactionnel est déposé dans chaque capillaire (18 µl) ou puits (22,5 µl), puis selon les capillaire ou les puits, on y on y ajoute 2µl d'eau «DNase RNase Free» qui sert de témoin négatif, ou du mélange ADNc à analyser ou les points de gammes

Les capillaires pour Light Cycler 2.0 (*Roche*), de volume de 20 µl, sont préalablement placés dans un support refroidissant «cooling Block». Dans chaque capillaire, 18µl de mélange réactionnel est déposé, puis, selon les capillaires, on y ajoute 2µl soit d'eau « DNase RNase Free » qui sert de témoin négatif ,soit du mélange des ADNc à analyser(mélange des 42 cDNA)

Ensuite, Les capillaires doivent être fermés avec leurs bouchons, placés dans un carrousel adapté puis centrifugés pendant 3 secondes à 3000 rpm dans la centrifugeuse « LC Carousel

Centrifuge 2.0 » (*Roche*). Ceci permettra de faire descendre les réactifs de la zone de dépôt au fond des capillaires transparents.

De même les puits doivent être fermés par un film est cela afin d'empêcher l'évaporation de nos échantillons de ADNc, une centrifugation de 5 à 10 minutes à 1000 rpm

Déroulement de la PCR : Un run est lancé, d'une part, lors du dépôt du carrousel portant les capillaires dans l'automate (Light Cycler), et d'autre part, une fois que la plaque 96 puits est mise dans iCycler.

Le logiciel permet de déterminer le nombre de cycle appelé également: CP (Crossing Point) à partir duquel la fluorescence émise atteint une valeur seuil. La courbe d'étalonnage $CP = \log(C)$, est établie à partir des concentrations (C) des points de la gamme, et leur CP respectifs mesurés. Elle permet le calcul des concentrations initiales en ADN de chaque échantillon, ainsi que l'efficacité et l'erreur de la PCR.

De plus, le cycle appelé «Melting Curve» permet l'obtention des températures de fusion de chaque échantillon ainsi que la vérification de la qualité de chaque échantillon à travers la représentation graphique «Melting Peaks».

3.7 Détermination du polymorphisme C677T de la MTHFR

La PCR-RFLP (Polymorphism Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) a été effectuée afin de déterminer les polymorphismes CC, TT et CT de la MTHFR selon le programme mentionné dans le tableau 11.

Tableau 11 : Programme suivi pour la PCR afin d'identifier les polymorphismes de la MTHFR

Nom	Nombre de cycles	Temps	Température (°C)	Rôle
Activation	1	1 min	94	Dénaturation du ADN
Cycling	30	30 sec	94	Déshybridation des brins
		30 sec	65	Diminution rapide :-20 °C/s Hybridation des amorces.
		40 sec	72	Elongation du brin complémentaire
Elongation finale	1	10	72	Elongation finale des brins d'ADN

Les amorces utilisées pour cette étude ont été sélectionnées à partir de la banque de gènes, et les séquences sont les suivantes :

sens: Oligo F (forward primer) : 5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3'

anti-sens: OligoR (reverse primer) : 5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3'

Le mélange réactionnel de la PCR de volume final 50 µl, contient 20 pmol de chaque amorce, 25 pmol de dNTP, 1X du tampon 10X, 1,5mM de MgCl₂, et 0,5 U de taq polymérase.

L'amplification de l'ADN comprend trois étapes : dénaturation initiale pendant 1 min à 94° C suivie de 30 cycles : chacun comprend : une dénaturation à 94° C pendant 30 sec, une hybridation à 65°C pendant 30 sec et une élongation à 72° C pendant 40 sec. Une étape d'élongation finale pendant 10 min à 72° C. Les produits de la PCR ont été contrôlés sur un gel d'agarose 2% (Figure 16).



Figure 16 : Profil électrophorétique des fragments amplifiés par PCR du gène MTHFR sur un gel d'agarose 2%.

Digestion enzymatique des amplicons : Une fois la PCR contrôlée, les produits de la PCR subissent une digestion enzymatique avec 10 unités/ μ L de HinfI. Les produits de la digestion donnent 3 profils ; un à 175 pb pour les homozygotes, 198 pb pour les homozygotes CC et hétérozygote CT contient deux bandes 198 pb et 175 pb. Les produits de la digestion sont séparés sur un gel d'agarose 3% et visualisés sous UV (Figure 17).



Figure 17 : Profil électrophorétique des fragments digérés par l'enzyme HinfI sur un gel d'agarose 3%.

Le génotype CT est caractérisé par la présence de deux bandes de 198 et 175 pb. Le génotype homozygote CC est représenté par une seule bande à 198 pb. Le génotype TT est caractérisé par la présence de deux bandes une à 175 pb et l'autre à 23 pb (cette dernière n'est pas visible à cause de sa petite taille).

3.8 Détermination du polymorphisme I/D de l'ACE

La PCR-RFLP a été effectuée afin de déterminer les polymorphismes DD, ID et II du gène de l'ACE suivant le programme mentionné dans le tableau 12.

Tableau 12 : Programme suivi pour la PCR afin d'identifier les polymorphismes de l'ACE

Nom	Nombre de cycles	Temps	Température (°C)	Rôle
Activation	1	1 min	94	Dénaturation de l'ADN
Cycling	30	30 sec	94	Déshybridation des brins
		30 sec	64,5	Diminution rapide :-20 °C/s Hybridation des amorces.
		1 min	72	Elongation du brin complémentaire
Elongation finale	1	8	72	Elongation finale des brins d'ADN

Les amorces utilisées pour cette étude ont été sélectionnées à partir de la banque de gènes, et les séquences sont les suivantes :

Sens; forward-5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3'

Anti-sens: reverse-5'-GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT-3'.

Le mélange réactionnel de la PCR de volume final 50 μ l, contient 20 pmol de chaque amorce, 25 pmol de dNTP, 1X du tampon 10X, 1,5mM de $MgCl_2$, et 0,5 U de taq polymérase.

L'amplification de l'ADN comprend trois étapes : dénaturation initiale pendant 1 min à 94° C suivie de 30 cycles : chacun comprend : une dénaturation à 94° C pendant 30 sec, une hybridation à 65,8°C pendant 30 sec et une élongation à 72° C pendant 60 sec. Une étape d'élongation finale pendant 1 min à 72° C. Les produits de PCR donnent 2 profils ; un à 490 pb pour l'insertion et un à 190 bp pour la délétion (figure 18). Les produits de la digestion sont séparés sur un gel d'agarose 2% avec du bromure d'éthidium et visualisés sous UV.

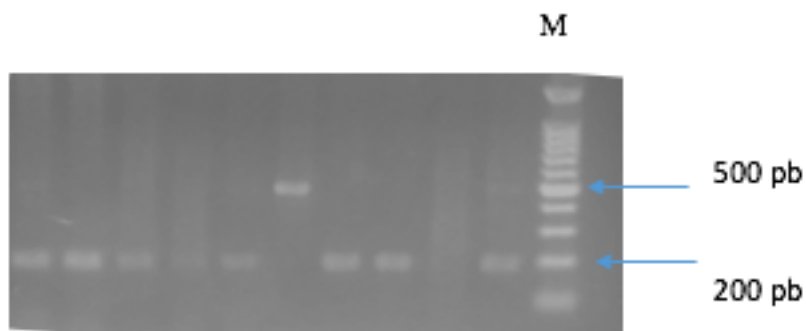


Figure 18 : Profil électrophorétique des fragments amplifiés par PCR du polymorphisme ACE I/D sur un gel d'agarose 2%.

Le génotype II été identifié par la présence d'une bande a 490 pb, le génotype DD a été identifié par la présence d'une bande de 190 pb et le génotype ID a été identifié par la présence de deux bandes : 490 pb et 190 pb.

Par ailleurs, la composition des réactifs utilisés et le procédé de préparation du gel d'agarose sont représentés en annexe.

3.9 Considérations éthiques : Toutes les personnes participant à cette étude ou leurs tuteurs ont signé un consentement éclairé avant toute analyse autorisant l'équipe à l'étude génétique ainsi que l'accès aux données du dossier médical.

3.10 Étude statistiques

L'étude statistique a été réalisée moyennant le logiciel Prism version 5,5.

Les résultats sont exprimés en moyennes et pourcentages. Une analyse bivariée en utilisant le test Chi- 2 a permis de comparer la distribution des génotypes entre les deux groupes.

L'odds ratio brut (OR) et l'intervalle de confiance (IC) 95 % ont été calculés ainsi que la valeur de p en utilisant le test exact de Fisher. Le P value est considéré significatif s'il est inférieur à 0,05.

CHAPITRE 4

RÉSULTATS

4.1. Caractéristiques épidémiologiques des cas de gliomes du CHU de Blida

La première partie de notre travail s'est intéressée à des prélèvements tissulaires de patients atteints de gliomes opérés au service de neurochirurgie du CHU de Blida. Nous avons colligés durant la période d'étude s'étalant du 1^{er} Janvier 2014 jusqu'au 30 Juin 2016, 59 cas de gliomes répertoriés au service d'anatomie pathologique du même CHU Franz Fanon de Blida. Il s'agissait de 31 femmes (52,54%) et 28 hommes (47,46%) (Tableau 13). L'âge moyen de l'ensemble des patients était de $44,98 \pm 18,87$ ans avec une prédominance des tranches d'âge de 40 à 70 ans (Figure 19). Le glioblastome est le type histologique le plus fréquent représentant 45,8% des cas (35,48% des femmes et 57,14% des hommes, $p=0,0017$). La répartition de ces cas selon le type histologique, le sexe et les moyennes d'âge est présentée dans le tableau 14 et les figures 20, 21, 22.

Tableau 13 : Caractéristiques épidémiologiques des 59 cas de gliomes du CHU de Blida

	Nombre (%)	Age Moyen (an) (moyenne \pm écart type)
Total de la population	59 (100%)	44,98 \pm 18,87
Femmes	31 (52,54%)	42,61 \pm 20,31
Hommes	28 (47,46%)	47,70 \pm 17,05

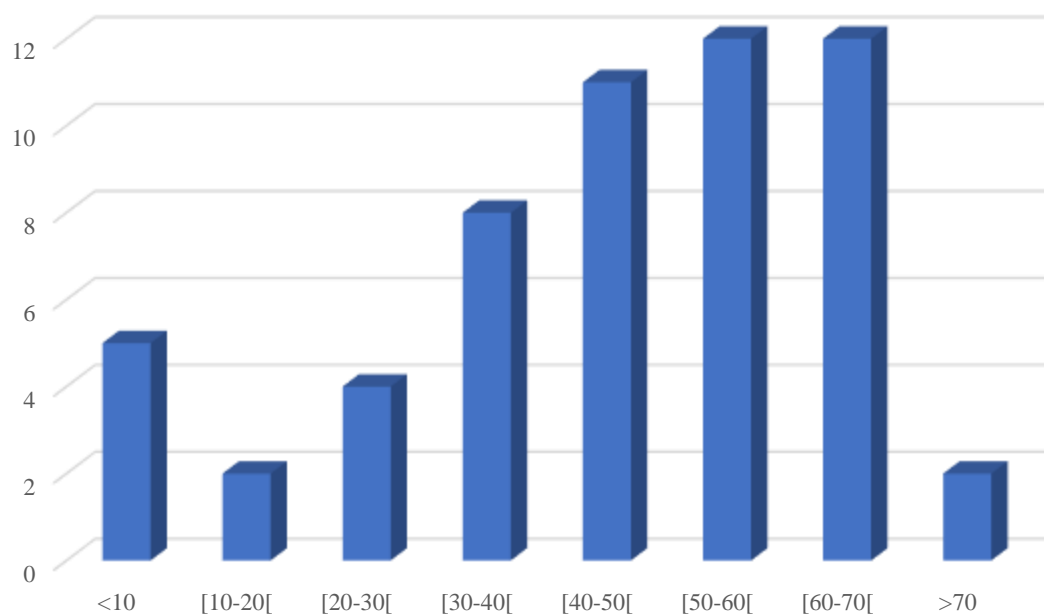


Figure 19 : Répartition selon les tranches d'âge des 59 cas de gliomes du CHU de Blida tout sexes confondus.

Tableau 14: Répartition selon le type histologique des 59 cas de gliomes du CHU de Blida (nombre(%))

Type histologique	Total n (%)	Femmes n (%)	Hommes n (%)	p
✓ Glioblastome	27 (45,80%)	11 (35,48%)	16 (57,14%)	0,0017
✓ Astrocytome pilocytaire	5 (6,78%)	2 (6,45%)	3 (10,71%)	0,14
✓ Astrocytome diffus	3 (5,08%)	2 (6,45%)	1 (3,57%)	0,34
✓ Astrocytome anaplasique	2 (3,39%)	0 (0%)	2 (7,14%)	0,0068
✓ Astrocytome de bas grade	1 (1,69%)	1 (3,23)	0 (0%)	0,08
✓ Astrocytome à cellules géantes sous – épendymaire	1 (1,69%)	1 (3,23)	0 (0%)	0,08
✓ Oligodendrogliome anaplasique	3 (5,08%)	3 (9,68%)	0 (0%)	0,002
✓ Oligodendrogliome grade III	3 (5,08%)	1 (3,23)	2 (7,14%)	0,19
✓ Oligoastrocytome anaplasique	2 (3,39%)	1 (3,23)	1 (3,57%)	1
✓ Ependymome (types : grade II, anaplasique, myxopapillaire GI)	10 (16,95%)	7 (22,58%)	3 (10,71%)	0,22
✓ Gliome de haut grade	2 (3,39%)	2 (6,45%)	0 (0%)	0,01

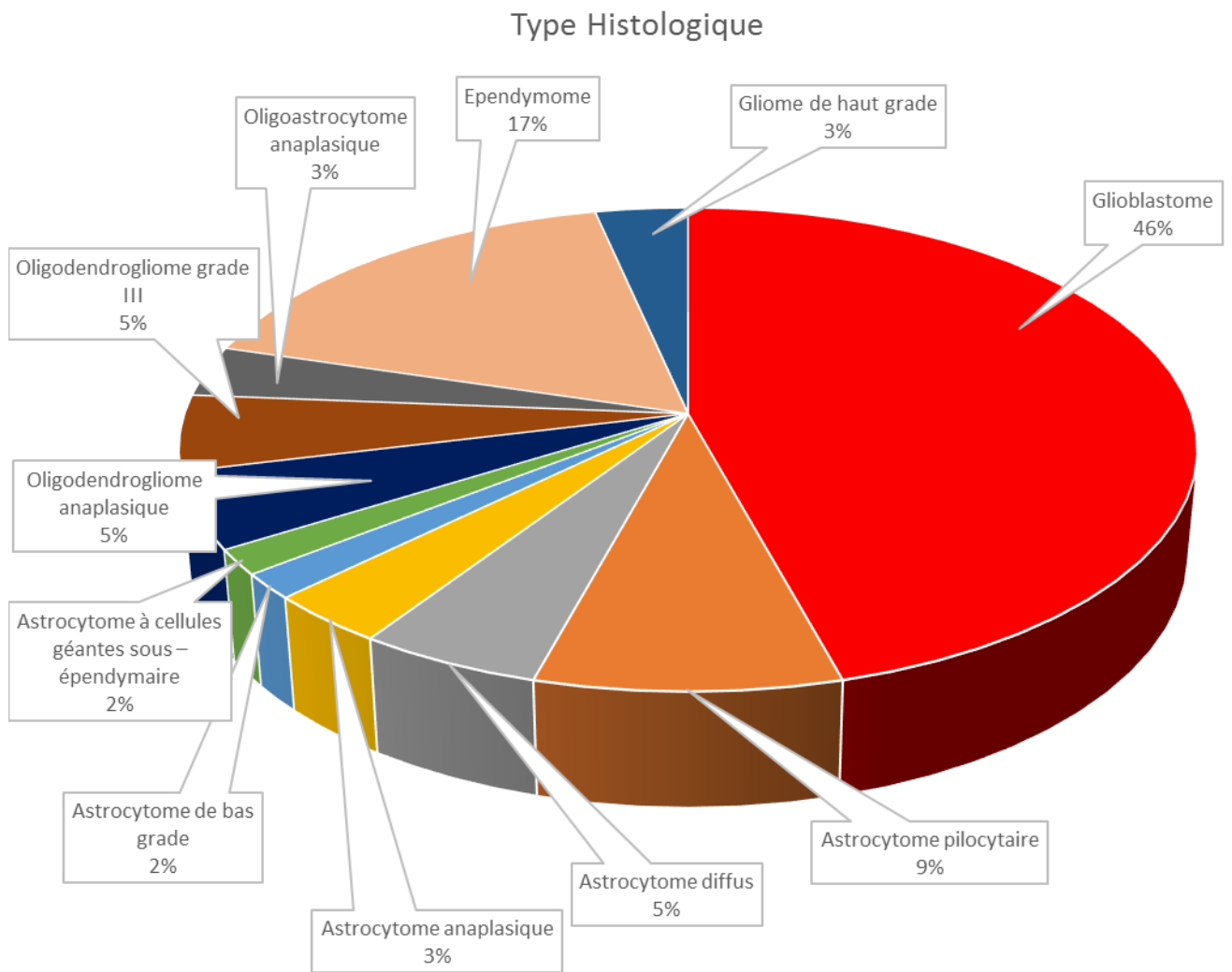


Figure 20 : Répartition selon le type histologique des 59 cas de gliomes du CHU de Blida

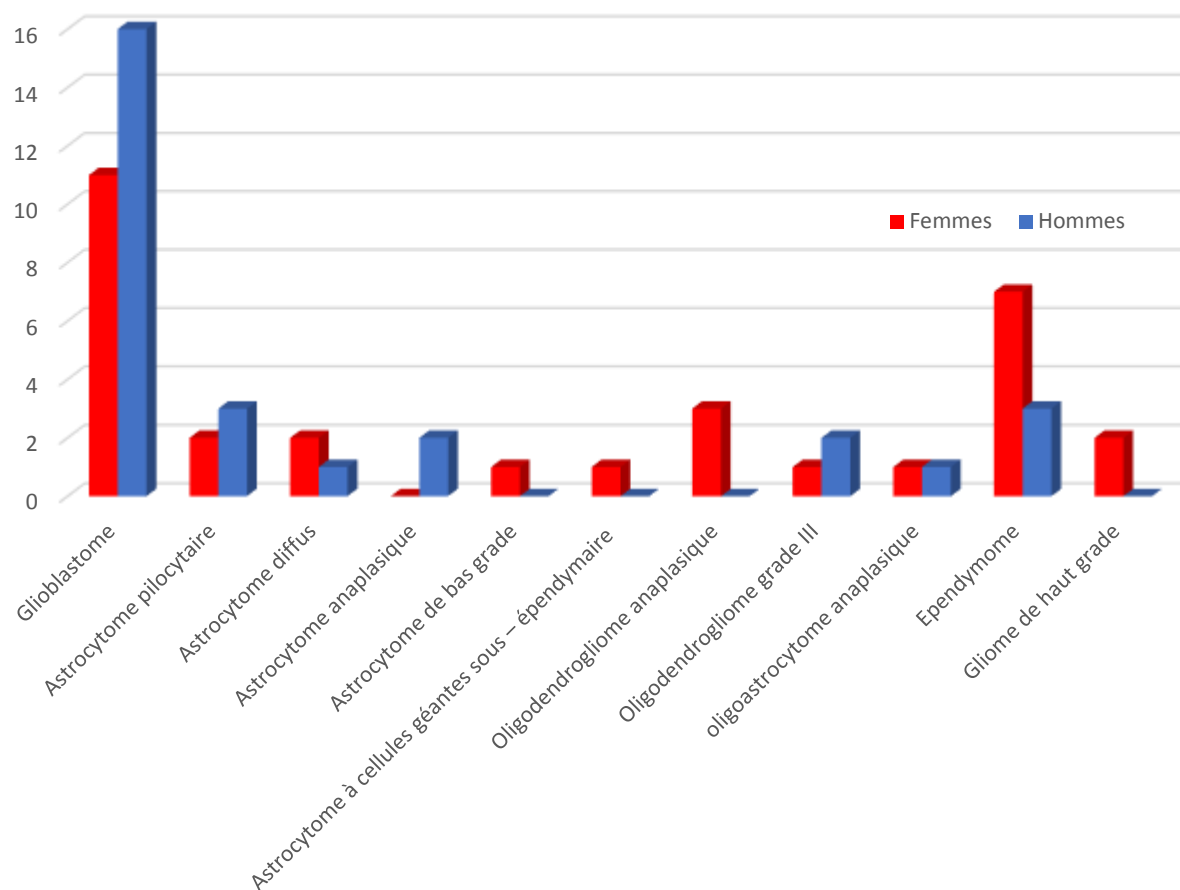


Figure 21 : Répartition selon le sexe et le type histologique des 59 cas de gliomes du CHU de Blida

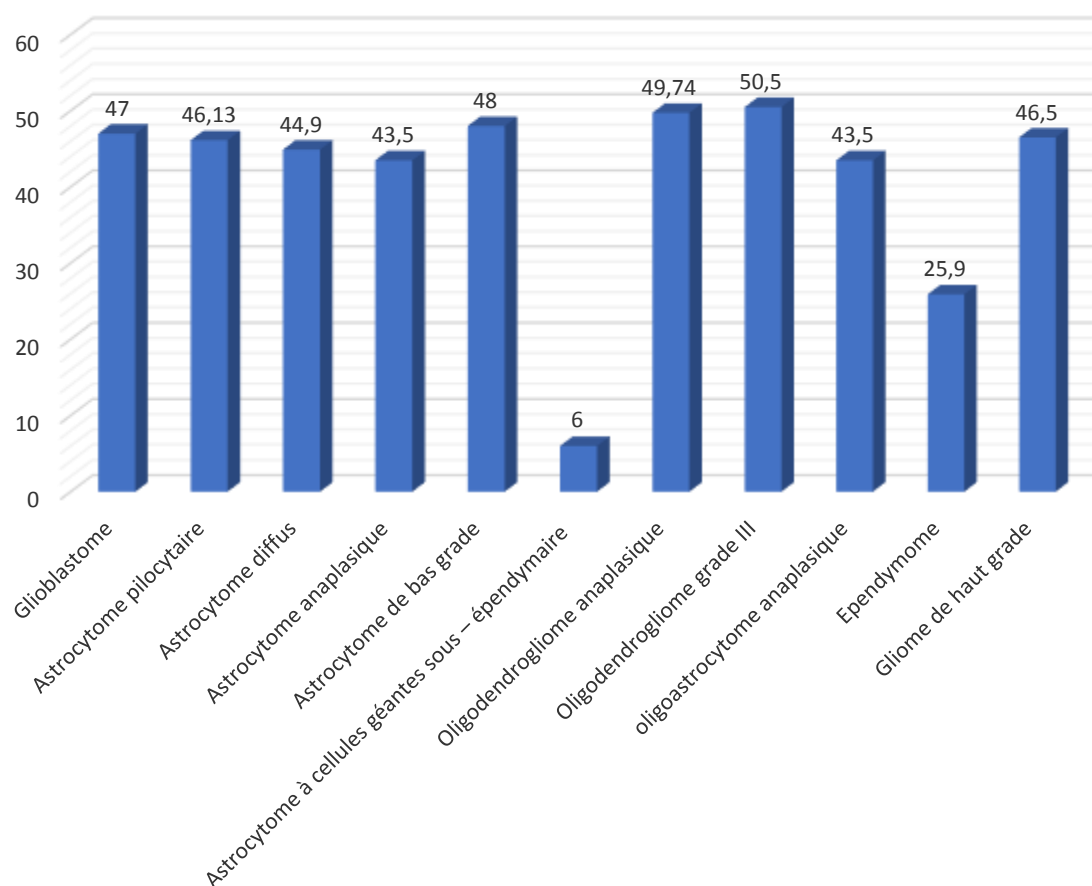


Figure 22 : Répartition selon la moyenne d'âge et le type histologique des 59 cas de gliomes du CHU de Blida

4.2 Caractéristiques épidémiologiques des cas de gliomes du CHU de Constantine

La deuxième partie de notre travail s'est déroulée au CHU Dr. Benbadis de Constantine, où nous avons colligé, du 1^{er} Septembre 2016 au 30 Juin 2017, 36 cas de gliomes : 13 femmes (36,11%) et 23 hommes (63,88%) et un sex ratio H/F de 1,77. Leur âge moyen était de 40,81 ans \pm 8,97 ans (36,15 \pm 2,22 ans d'âge moyen pour les femmes, 44,16 \pm 7,84 ans pour les hommes) (Tableau 15).

Les patients étaient pour l'ensemble originaire de l'Est Algérien, en dehors d'un seul patient originaire du Centre du pays, de la Wilaya de Boussaada, et recruté dans un centre d'oncologie privé. La plupart des Wilayas de l'Est étaient représentées avec une légère prédominance des wilayas de l'extrême Est (1/3 des patients) (Figure 23).

Une histoire familiale de tumeur gliale a été retrouvée chez 7 patients (21,21%). Le tabagisme actif était noté dans 13,9% des cas. Nous n'avons pas trouvé, par ailleurs, parmi les patients examinés, des cas exposés à des professions décrites comme potentiellement à risque.

Dans cette population de 36 cas de gliomes, nous retrouvons aussi une prédominance du type histologique glioblastome (44,44%) (6 femmes et 10 hommes) avec un sex ratio de 1,66 (Figure 24).

Nous rappelons que durant la même période entre 2016-2017 et au niveau du Centre Hospitalier Universitaire d'Ibn BADIS de Constantine, nous avons colligés 136 sujets sains pour l'étude du polymorphisme C677T de la MTHFR et 195 sujets sains pour l'étude du polymorphisme I/D de l'ACE, tous originaires de la Wilaya de Constantine. Une partie de ces témoins sains étaient recrutés par nos soins (35 cas), alors que le reste des cas était pris de la banque de sang de témoins du Laboratoire de génétique et biologie du CHU de Constantine. La description des sujets sains se fera dans les parties respectives de l'étude des gènes MTHFR et ACE.

Tableau 15 : Caractéristiques épidémiologiques de 36 cas de gliomes du CHU de Constantine

Moyenne \pm écart type, n(%)

	Population Totale	Femmes	Hommes
Nombre (%)	36 (100%)	13 (36,11)	23 (63,88)
Age (ans) (moyenne\pmSD)	44,70 \pm 3,33	42,15 \pm 2,22	46,16 \pm 4,84
Poids (kg)	68,32 \pm 27,82	69,62 \pm 33,09	66,73 \pm 21,55
Taille (cm)	152,00 \pm 34,35	148,08 \pm 32,14	157,22 \pm 38,41
BMI (kg/m²)	27,21 \pm 9,04	26,92 \pm 11,11	27,59 \pm 5,88
Situation familiale			
• Marié	24 (66,66%)	8 (61,53%)	16 (69,56%)
• Célibataire	12 (33,33)	5 (38,46%)	7 (30,43)
• Divorcé	0 (0%)	0 (%)	0 (%)
• Veuf	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Niveau d'étude			
• Sans	6 (16,66%)	4 (30,76%)	2 (8,69%)
• Primaire	4 (11,11)	1 (7,69%)	3 (13,04%)
• Secondaire	8 (22,22%)	1 (7,69%)	7 (30,43%)
• Lycée	1 (2,77%)	0 (0%)	1 (4,34%)
• Universitaire	2 (5,55)	1 (7,69%)	1 (4,34%)
• Non précisé	15 (41,66)	6 (46,15%)	9 (39,13%)
Exposition au Téléphone Portable			
• Jamais	9 (25,00%)	6 (46,15%)	3 (13,04%)
• Modérée	26 (72,22%)	6 (46,15%)	20 (86,95%)
• Fréquente	1 (2,77%)	1 (7,69%)	0 (0%)
Tabagisme			
• Actif	5 (13,88%)	0 (0%)	5 (21,73%)
• Passif	1 (2,77%)	1 (7,69%)	0 (0%)
• Pas de tabagisme	30 (83,33%)	12 (92,30%)	18 (78,23%)
Antécédents Familiaux de gliomes	7 (19,44%)	3 (23,07%)	4 (17,39%)
Traitement subi			
• Chirurgie	30 (83,33%)	11 (84,61%)	19 (82,60%)
• Radiothérapie	18 (50,00%)	6 (46,15%)	12 (52,17%)
• Chimiothérapie	9 (25,00%)	3 (23,07%)	6 (26,08%)
• Thérapie ciblée	7 (19,44%)	2 (15,38%)	5 (21,73%)

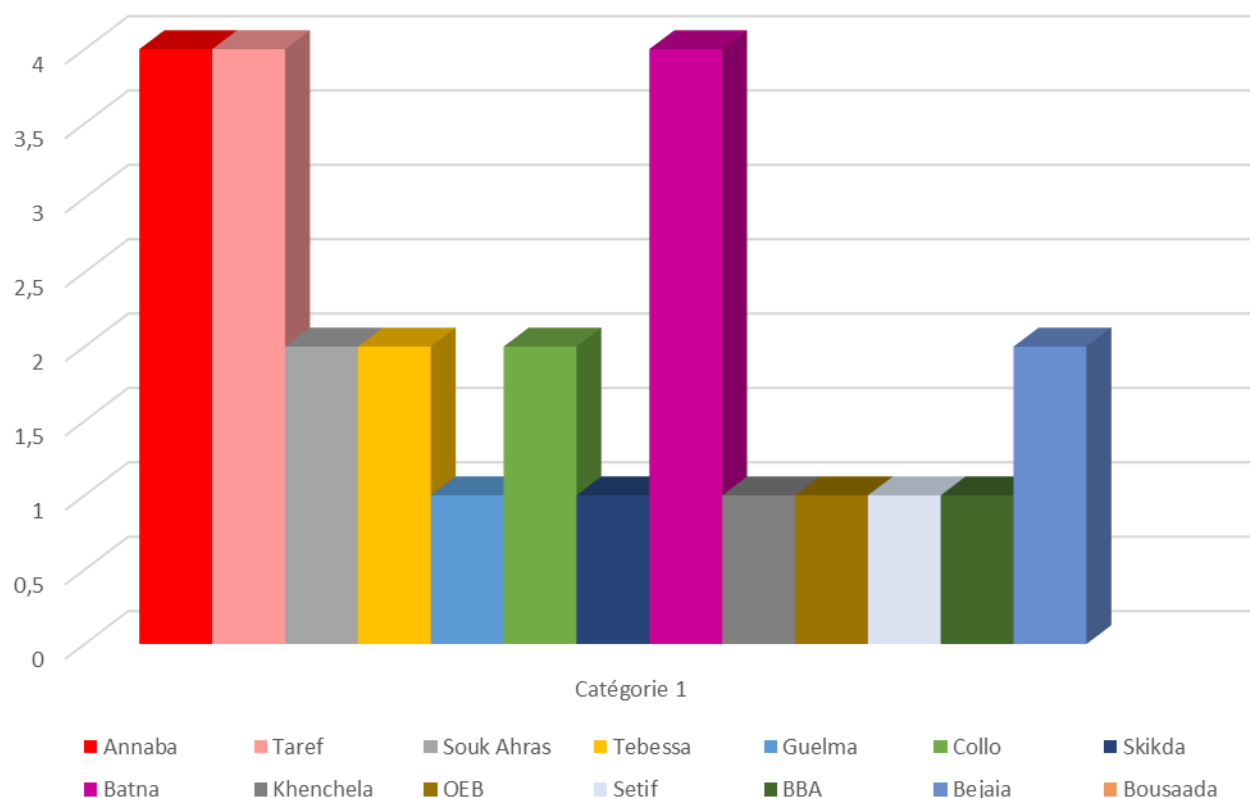


Figure 23 : Répartition des 36 cas de gliomes du CHU de Constantine selon leurs origines

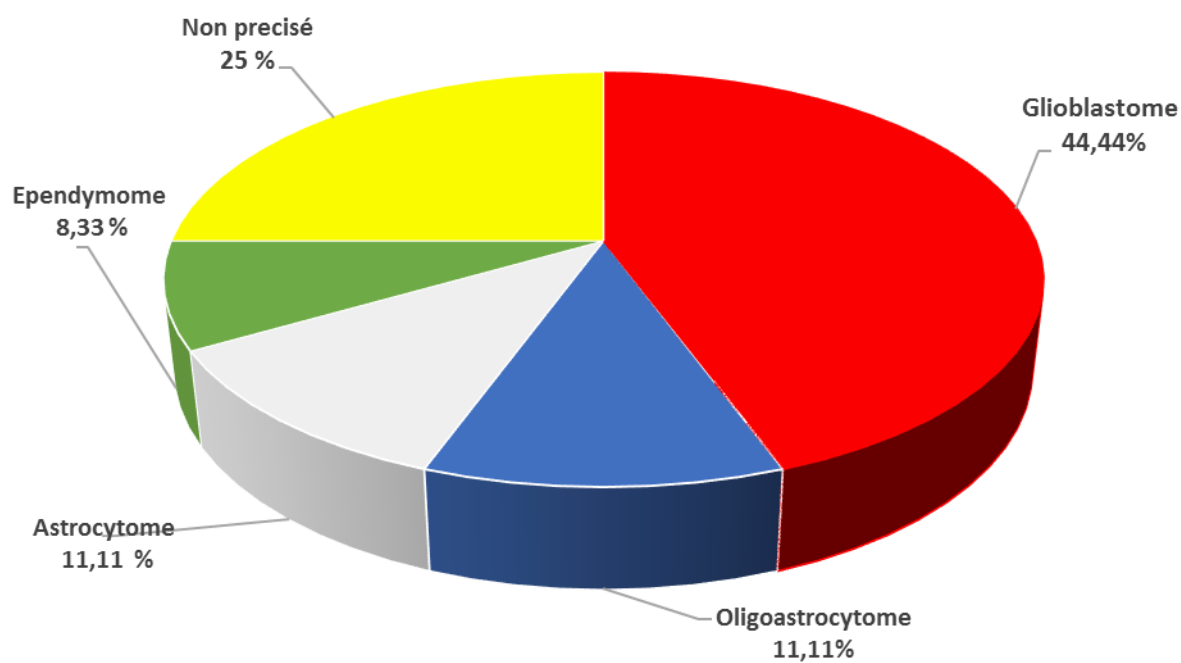


Figure 24 : Répartition selon le type histologique des 36 cas de gliomes du CHU de Constantine

4.3 Résultats d'extraction de l'ADN tissulaire : La totalité des échantillons de patients n'a pu être retenue pour l'analyse finale de l'expression des gènes. En effet, certains échantillons ont dû être écartés d'emblée de l'analyse car :

- la quantité de matériel biologique était insuffisante, voire nulle;
- le matériel biologique disponible ne correspondait pas à du tissu tumoral (Figure 25). Une partie des échantillons correspondaient à du tissu non tumoral (tissu sain: tissu homogène caractérisé par un faible nombre de noyaux ; glie réactionnelle, caractérisée par une prolifération et une hyperplasie des astrocytes en regard de la zone tumorale associée à une augmentation de la microglie (nombre de macrophages); ou d'autres tissus (dure-mère, peau) voire d'autres tumeurs cérébrales .

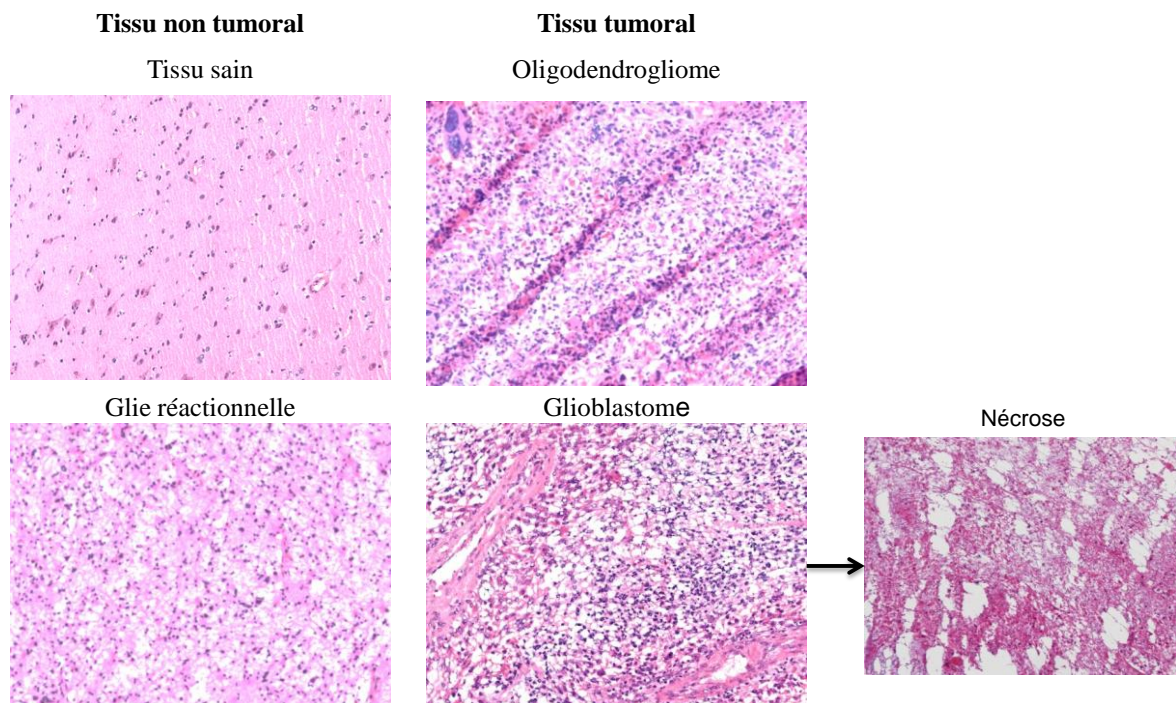


Figure 25: Coupes histologiques après coloration HES observées au microscope (x100)

Nous avons constaté aussi dans certains échantillons des zones de nécrose ou des zones hémorragiques. Ces prélèvements ont donc été aussi exclus.

Ensuite, les échantillons identifiés comme étant du tissu tumoral, ont été retenus pour l'extraction de l'ADN.

Cependant, celle-ci n'a pas aboutie et ce, du fait :

- De mauvaises conditions de conservation (délais entre le moment de l'exérèse et la conservation, température ambiante de la conservation),
- ou à une mauvaise pratique au cours de l'extraction.

Mais cette dernière hypothèse peut être exclue puisque au cours d'une expérimentation préalable, portant sur des échantillons de tumeurs humaines on a réussi à réaliser l'extraction d'ADN avec le même protocole.

4.4 Résultats de l'analyse génétique

Les techniques utilisées ici ont permis l'extraction de l'ensemble des ADN des 36 patients et leurs témoins. L'étude des polymorphismes C677T de la MTHFR et I/D de l'ACE a pu être ainsi faite.

4.4.1 Étude du polymorphisme C677T de la MTHFR

Nous avons comparé pour l'étude du polymorphisme C677T de la MTHFR entre les 36 cas de gliomes et 136 cas de témoins sains.

Les caractéristiques comparant cas et témoins sont résumées dans le tableau 16 et les figures 26, 27, 28. Il n'existe pas de différence entre les patients atteints de gliomes et les sujets sains selon le sexe ($p=0,55$) ou l'âge ($p=0,42$). L'âge moyen est similaire pour les deux populations : patients et contrôles ($44,70 \pm 3,33$ ans vs $43,44 \pm 1,16$).

Tableau 16 : Caractéristiques des deux populations malade et témoins de l'étude du polymorphisme C677T de la MTHFR (moyenne \pm SD ou %)

	Patients (%)	Controls (%)	P
Âge (ans)	44,70 \pm 3,33	43,44 \pm 1,16	0,42
Genre			
Hommes	23 (63.9 %)	94 (69,12 %)	0,55
Femmes	13 (36.1 %)	42 (30,88 %)	
Total	36 (100%)	136 (100%)	
Fumeurs (%)			
Non-fumeurs	30 (83,33%)	130 (95,59 %)	0,01
Fumeurs actifs	5 (13,88 %)	5 (3,68 %)	
Fumeurs passifs	1 (2,77 %)	1 (0,74 %)	
Histoire familiale de gliomes	7 (21,21%)	0 (0%)	0,0001

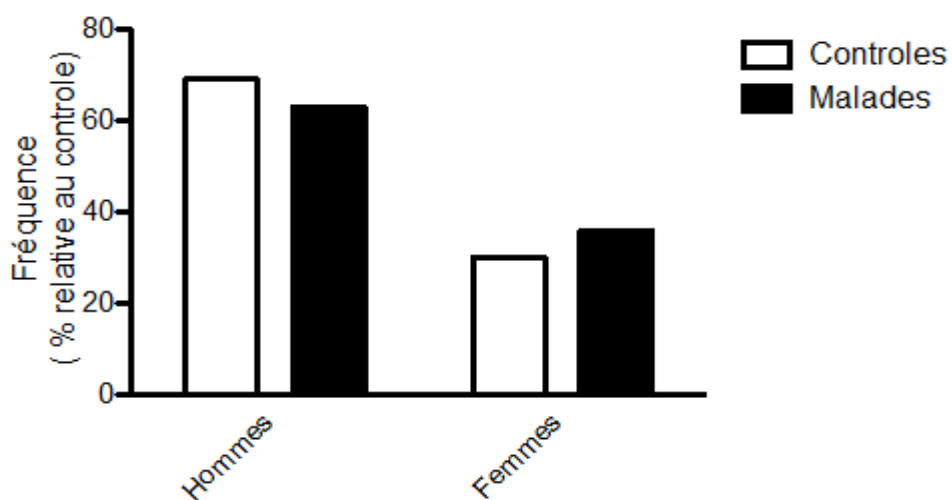


Figure 26 : Répartition de la population de l'étude du polymorphisme C677T de la MTHFR selon le sexe

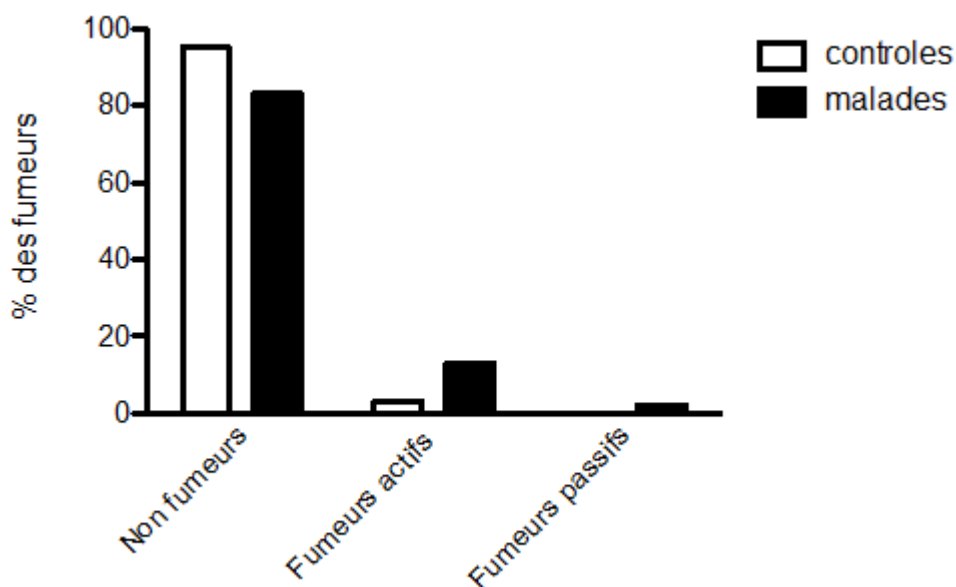


Figure 27 : Pourcentage des fumeurs dans la population de l'étude du polymorphisme C677T de la MTHFR

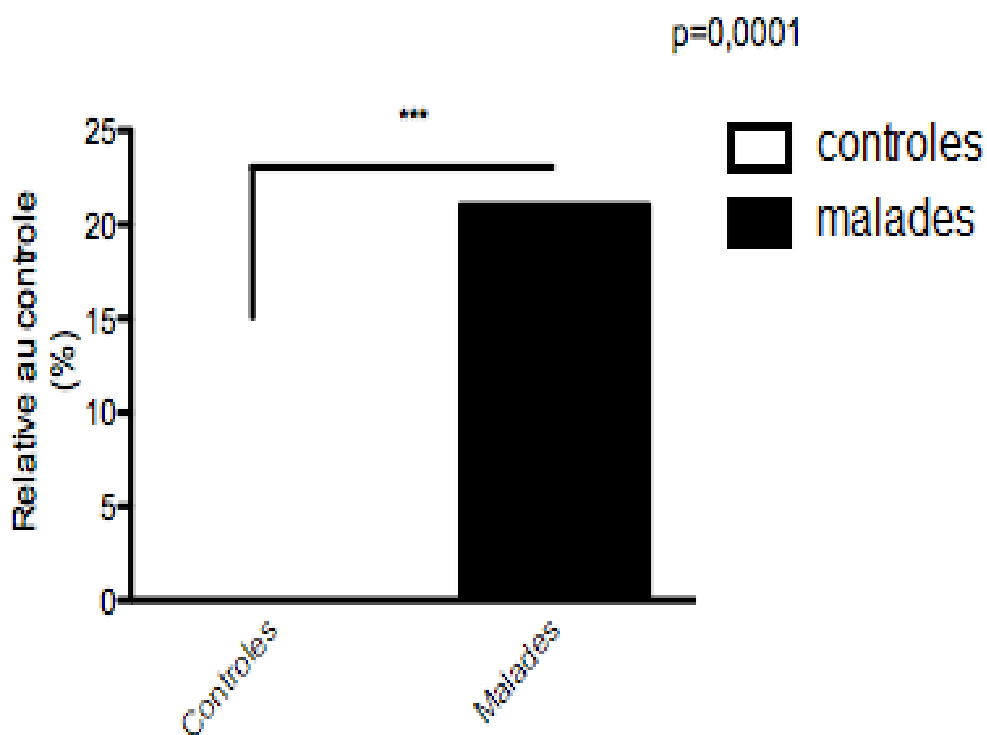


Figure 28 : Antécédents familiaux de gliome dans la population de l'étude du polymorphisme C677T de la MTHFR

Dans la population malade, la fréquence allélique et la distribution génotypique du polymorphisme C677T de la MTHFR sont différentes de celles des contrôles (Tableau 17, Figure 29). La fréquence du génotype TT est significativement plus grande chez les patients atteints de gliome (38,9%) que chez les individus sains (9,6%) ($p = 0,0001$, OR : 6,02, IC 95% : 2,5- 14,53), De même, la fréquence de l'allèle T est plus importante chez la population malade que chez la population saine (51,7 %, vs 31,3%; $p = 0,001$; OR : 2,38, IC 95% : 1,40- 4,04) (Figure 30).

En outre, la fréquence de l'allèle C est significativement plus importante chez la population saine que celle malade 68,8% vs 48,3%, $p = 0,001$, OR : 0,43, IC 95% : 0,25- 0,73) (Figure 31). Quant au génotype CT, il est retrouvé dans 25,0% des cas de la population malade vs 43,4% chez la population saine ($p = 0,04$ OR 0.44, IC 95% : 0.19- 0.99)

Le génotype CC est retrouvé dans 36,1% des patients atteints de gliomes et 47,1% des contrôles.

Tableau 17 : Distribution allélique et génotypique du polymorphisme C677T de la MTHFR chez les cas de gliomes du CHU de Constantine vs population saine

	Patients N (%)	Controls N (%)	OR (95% CL)	P
Génotype				
CC	13 (36,1)	64 (47,1)	0,64 (0.3- 1,36)	0.24
CT	9 (25,0)	59 (43,4)	0.44 (0.19- 0.99)	0.04
TT	14 (38,9)	13 (9,6)	6,02 (2,5- 14,53)	0,0001
Allèle				
C	35 (48,3)	187 (68,8)	0,43 (0,25- 0,73)	0.001
T	37 (51,7)	85 (31,3)	2,38 (1,40- 4,04)	0.001

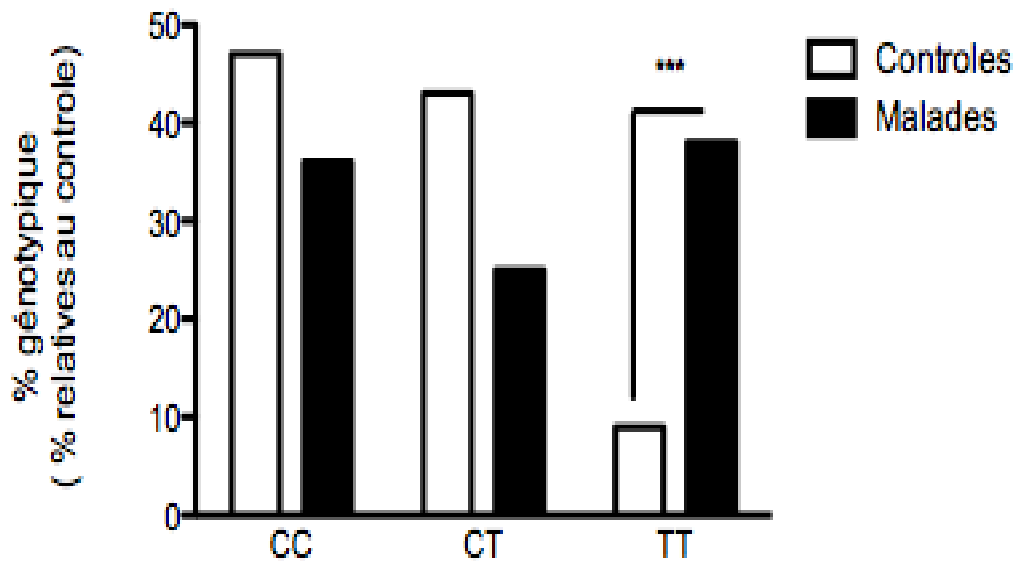


Figure 29: Fréquence génotypique du polymorphisme C677T de la MTHFR chez les 36 cas de gliomes et leurs témoins

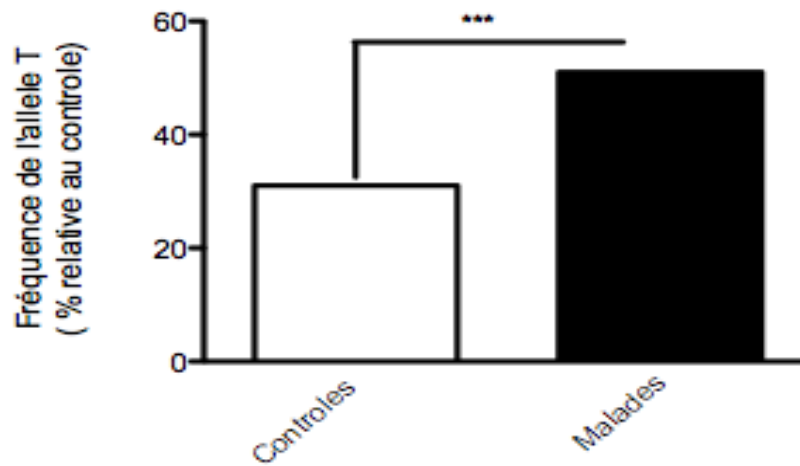


Figure 30 : Fréquence de l'allèle T de la MTHFR chez les 36 cas de gliomes et leurs témoins

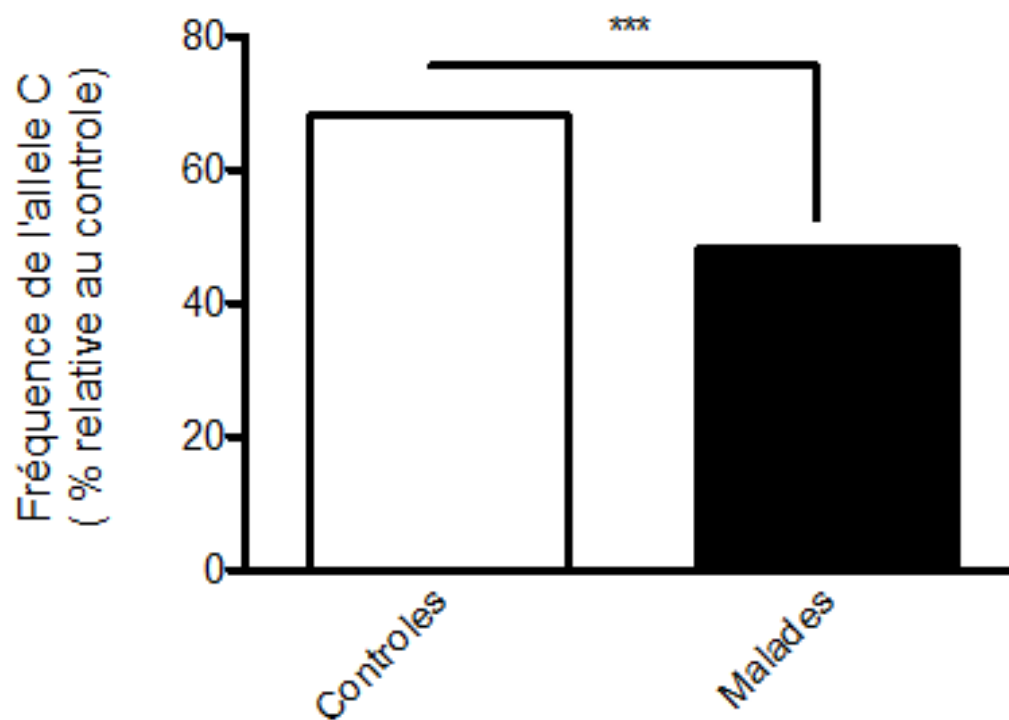


Figure 31 : Fréquence de l'allele C de la MTHFR chez les 36 cas de gliomes et leurs témoins

En outre, nous avons établi des modèles d'analyses bi-variées entre les polymorphismes C677T de la MTHFR, où nous avons trouvé en plus que le génotype CC était protecteur (OR 0,19, IC 95% : 0,07-0,49, $p = 0,00036$, ainsi que le modèle dominant CC+CT (OR : 0,17, IC 95% : 0,07-0,40, $p=0,000018$), et l'allele C (OR : 0,43, IC 95% 0,27-0,73, $p=0,0015$) (Tableau 18)

Tableau 18 : ORs et intervalles de confiance 95% de l'association entre le polymorphisme C677T de la MTHFR et le risque de gliome

Modèle	Patients (n)	Contrôles (n)	OR (IC) à 95%	<i>p</i>
Co-dominant homozygote: CC vs TT - CC - TT	13 14	64 13	OR: 0.19 0.07-0.49	0.00036*
Co-dominant heterozygote: CT vs TT - CT - TT	9 14	59 13	0.14 0,05-0,4	0,000075**
Co-dominant heterozygote: CC vs CT - CC - CT	13 9	64 59	1.33 0,53-3,34	0,54
Model dominant: (CC + CT) vs TT - CC + CT - TT	22 14	123 13	0.17 0,07-0,40	0,000018***
Model recessif: (TT + CT) vs CC - TT+ CT - CC	23 13	72 64	1,57 0,74-3,36	0,24
Allele Model - C - T	35 37	187 85	0,43 0,27-0,73	0,0015****

*CC est un Facteur protecteur

** *CT est un facteur protecteur*

*** *CC+CT = Facteur protecteur*

**** l'allele C, facteur protecteur

4.4.2 Étude du polymorphisme I/D de l'ACE

Les caractéristiques comparant cas et témoins sont résumées dans le tableau 19 et les figures 32, 33. La population saine et malade ne diffèrent pas selon le sexe ($p = 0.37$) ni selon l'âge $p = 0.83$. La moyenne d'âge entre les deux populations malade et saine est similaire ($44,70 \pm 3,33$ ans, vs 42.61 ± 5.36).

Tableau 19: Caractéristiques des deux populations patients et témoins de l'étude du polymorphisme I/D de l'ACE

	Patients n (%)	Controls	<i>p</i>
Âge (année)	44,70±3,33	42.61±5.36	0,83
Sexe			0.37
Hommes	23 (63.9 %)	109 (57.45 %)	
Femmes	13 (36.1 %)	86 (42.55 %)	
Fumeurs (%)			0.007
Non- Fumeurs	30 (83.33%)	189 (96.92%)	
Fumeurs actifs	5 (13.88 %)	5 (2.56%)	0.0022
Fumeurs passifs	1 (2.77 %)	1 (0.18%)	0.18
Histoire familiale des gliomes	7 (21.21%)	0 (0%)	0.0001

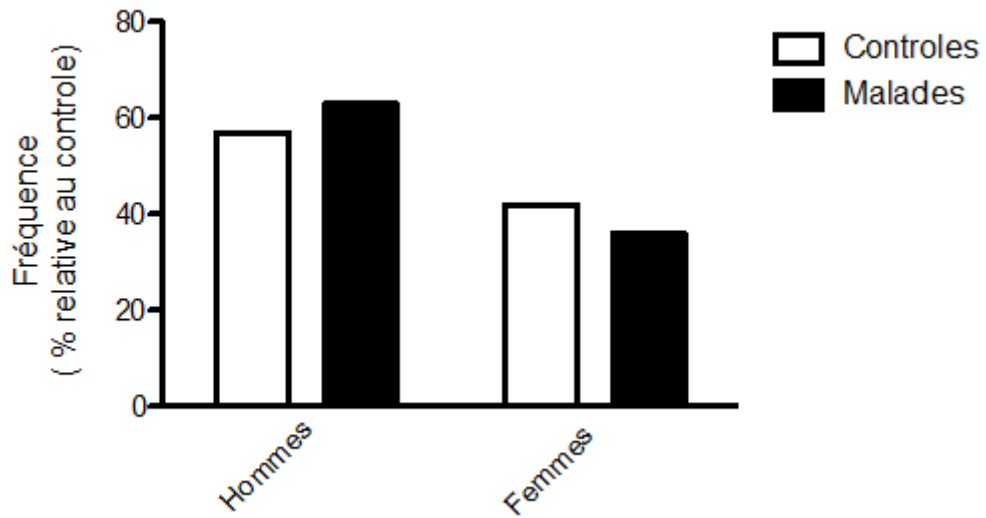


Figure 32 : Repartition de la population de l'étude du polymorphisme I/D de l'ACE selon le sexe

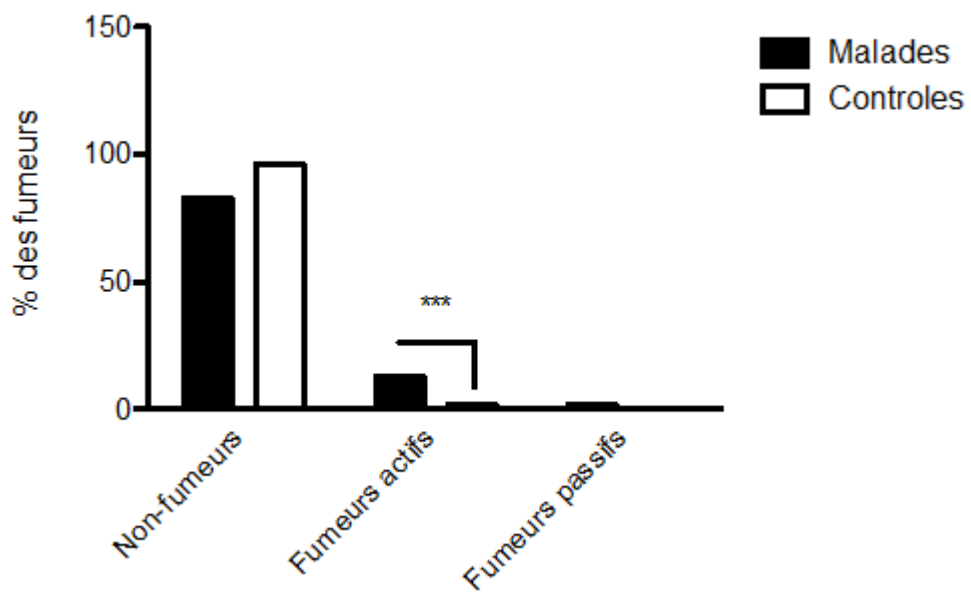


Figure 33: Pourcentage des fumeurs dans la population de l'étude du polymorphisme I/D de l'ACE

La distribution allélique et génotypique du polymorphisme ACE I/D est différente entre la population saine et malade (Tableau 20, Figure 34). La fréquence génotypique ACE DD est significativement plus importante chez les patients atteints de gliomes que chez les cas contrôles (63.9% vs 33.8 %, OR = 3.64, 95% IC (1.67 -7.94), $p = 0.0007$). De même, la fréquence de l'allèle D est plus importante chez les patients atteints de gliomes que chez les sains (79.2 % vs 63.3%, OR = 2.20, 95% IC (1.20 - 4.02), $p = 0.0093$) (Figure 35). Le génotype ID est retrouvé chez 30,6% des patients atteints de gliomes et 50,0% des cas témoins (OR= 0.31, 95% IC (0.14 - 0.66) $p = 0.0017$).

Le génotype II est retrouvé chez 5,6% des patients atteints de gliomes vs 7,2%. La fréquence de l'allèle I était retrouvée chez 20,8% des patients atteints de gliome et chez 36,7% des cas témoins, OR= 0.45, 95% CI (0.25-0.83) $p = 0.0093$ (Figure 36).

Table 20: Distribution des fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme I/D de l'ACE chez les cas de gliomes du CHU de Constantine vs population saine.

	Patients N (%)	Controls N (%)	OR (95% CL)	P
Génotype				
DD	23 (63.9)	66 (33.8)	3.64 (1.65-7.26)	0.0007
ID	11 (30.6)	115 (50.0)	0.31 (0.14 - 0.66)	0.0017
II	2 (5.6)	14 (7.2)	0.76 (0.16- 3.50)	1
Allèle				
D	57 (79.2)	247 (63.3)	2.20 (1.20- 4.03)	0.0093
I	15 (20.8)	143 (36.7)	0.45 (0.25-0.83)	0.0093

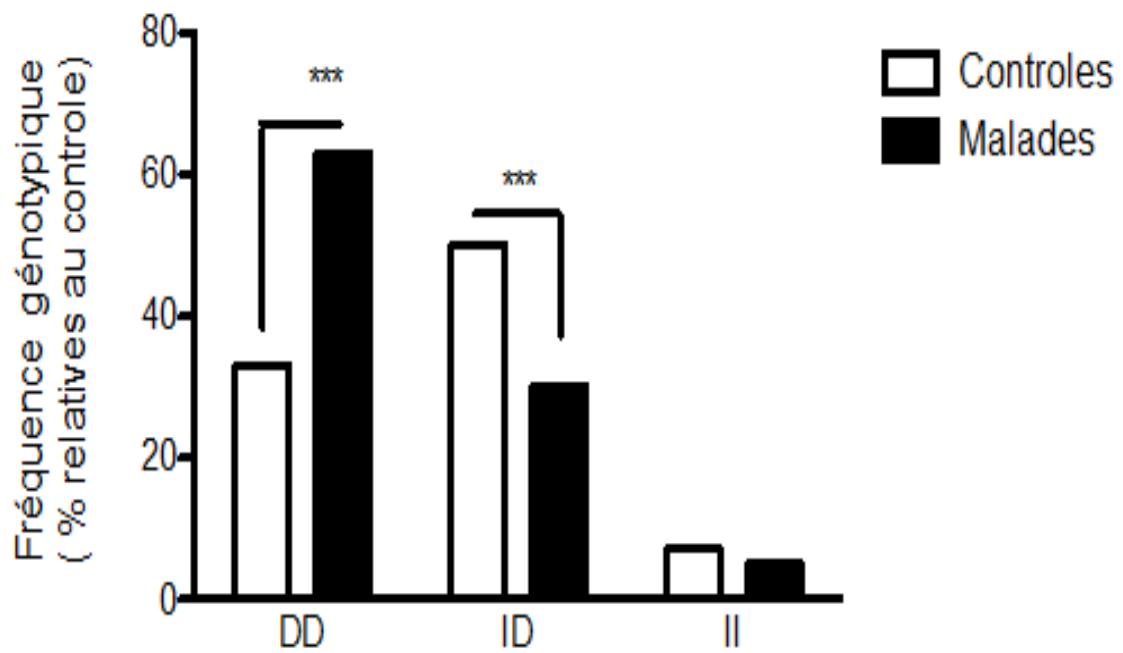


Figure 34 : Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme I/D de l'ACE chez une population de l'est Algérien atteinte de gliomes vs population saine

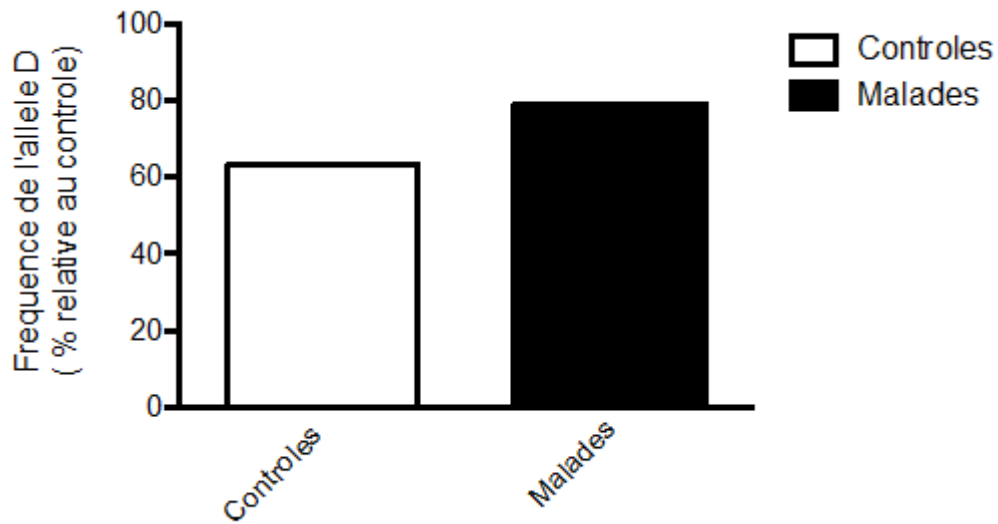


Figure 35: Fréquence de l'allèle D du polymorphisme I/D de l'ACE chez les 36 cas de gliomes et leurs témoins

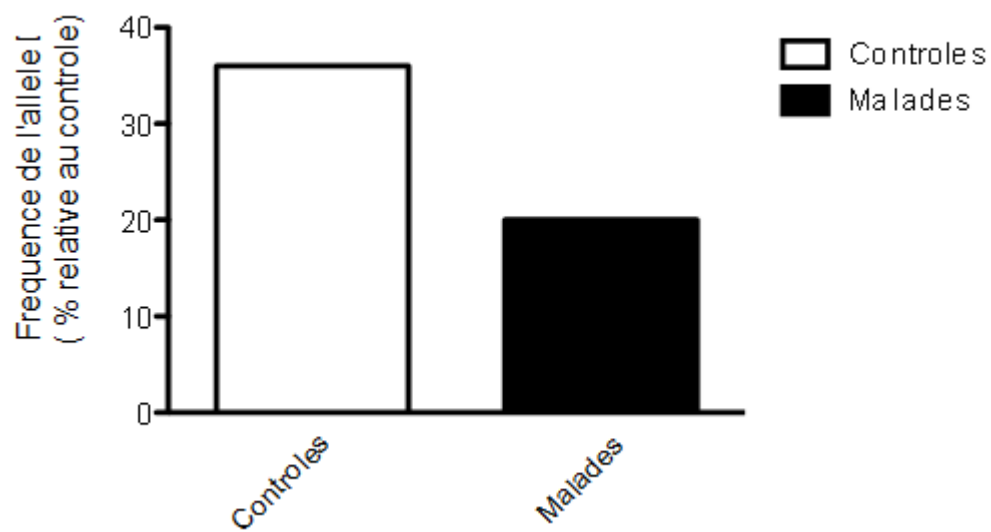


Figure 36: Fréquence de l'allèle I du polymorphisme I/D de l'ACE chez les 36 cas de gliomes et leurs témoins

Nous avons là aussi établi des modèles d'analyse bi-variées où nous avons confirmé que le genotype DD est associé au risque de gliome (OR : 3,64, IC 95% : 1,67-7,94, $p = 0,0007$), le modèle récessif (II + ID vs DD) était associé à un risque réduit de gliome de 72% (OR : 0,28, IC 95% : 0,13-0,60, $p = 0,0006$) (Tableau 21).

Table 21: Odds Ratios et intervalles de confiance de l'association du polymorphisme I/D de l'ACE et le risque de gliome.

Model	Cas (n)	Controls (n)	OR (IC 95%)	<i>p</i>
Homozygous co-dominant: DD vs II - DD - II	23 2	66 14	2,43 (0,51-11,55)	0,24
Heterozygous co-dominant: ID vs II - ID - II	11 2	115 14	0,66 (0,13 -3,33)	0,62
Heterozygous co-dominant: DD vs ID - DD - ID	23 11	66 115	3,64 (1,67-7,94)	0,0007
Dominant model: (DD + ID) vs II - DD + ID - II	34 2	181 14	1,31 (0,28-6,04)	0,7
Recessive model: (II + ID) vs DD - II + ID - DD	13 23	129 66	0.28 (0,13-0,60)	0,0006
Allele model - D - I	57 15	247 143	2,20 (1,2-4,02)	0,009

CHAPITRE 5

DISCUSSION

5.1 Données épidémiologiques

Les gliomes sont les tumeurs cérébrales primitives les plus fréquentes chez l'adulte, de pronostic assez sombre avec un taux de survie relatif à cinq ans d'environ 35% pour toutes les tumeurs cérébrales malignes, taux variable selon le type histologique : 94,1% pour l'astrocytome pilocytique et 5,6% pour le GBM [9].

Dans notre étude, nous avons colligé 95 cas de gliomes : 59 cas au CHU de Blida et 36 cas au CHU de Constantine. Dans cette population totale, il existait 51 hommes (53,68%) et 44 femmes (46,32%) soit un Sex Ratio de 1,16. L'âge moyen de l'ensemble des patients était de $43,53 \pm 18,58$ ans avec une prédominance des tranches d'âge de 40 à 70 ans. Le glioblastome est le type histologique le plus fréquent représentant 45,26% des cas de l'ensemble des 95 cas étudiés.

Bien que la population totale de nos deux séries ne soit pas très importante en nombre, mais nos résultats se rapprochent des données mondiales en particuliers les données de la plus grande cohorte Américaine du CBTRUS et les données Françaises, publiées toutes les 2 en 2017 et 2018 (Tableau 22, Figures 37) [9, 11].

Dans la cohorte Américaine, 102 086 cas de gliomes ont été recensés parmi 392 982 cas de tumeurs cérébrales primitives et autres tumeurs du SNC. Les gliomes en représentaient 26% de l'ensemble de ces tumeurs primitives cérébrales et les autres tumeurs du SNC, et 81% des tumeurs malignes. Le GBM était la tumeur gliale la plus fréquente (56,6% des gliomes et 47,7% de l'ensemble des tumeurs malignes du SNC), avec une estimation de 13 310 nouveaux cas en 2019 [9].

Sur des données Françaises, 57 816 patients présentaient des tumeurs primitives du SNC dont 22 642 cas de gliomes (39,16%) représentant ainsi les tumeurs primitives du SNC les plus fréquentes. Le sex Ratio était de 1.40 (13206 hommes et 9436 femmes). L'âge moyen de la découverte de la tumeur était de 58 ans. Les GBM représentaient les tumeurs gliales les plus fréquentes (54,81% de l'ensemble des gliomes) [11].

Tableau 22 : Comparaison entre les données épidémiologiques de la population Algérienne de gliomes et celle des données Américaines et Françaises [adapté des références 9 et 11]

	Série Américaine	Série Française	Série Algérienne
Nombre de tumeurs cérébrales	392 982	57 816	-
Nombre de gliomes	102 086	22 642	95
% de gliomes*	26%	39,16%	-
Age moyen gliome (ans)	57	58	43
Sex Ratio gliome	1,35	1.40	1,16
% de GBM**	56,6% ⁺	54,81%	45,26%
Age moyen GBM (ans)	64	-	47
Sex Ratio GBM	1,58	-	1,53

* : pourcentage de gliomes parmi les tumeurs primitives cérébrales et les autres tumeurs du SNC.

** : pourcentage de GBM parmi les tumeurs gliales.

⁺ : Le GBM représente dans cette série 56,6% des gliomes et 47,7% de l'ensemble des tumeurs malignes du SNC.

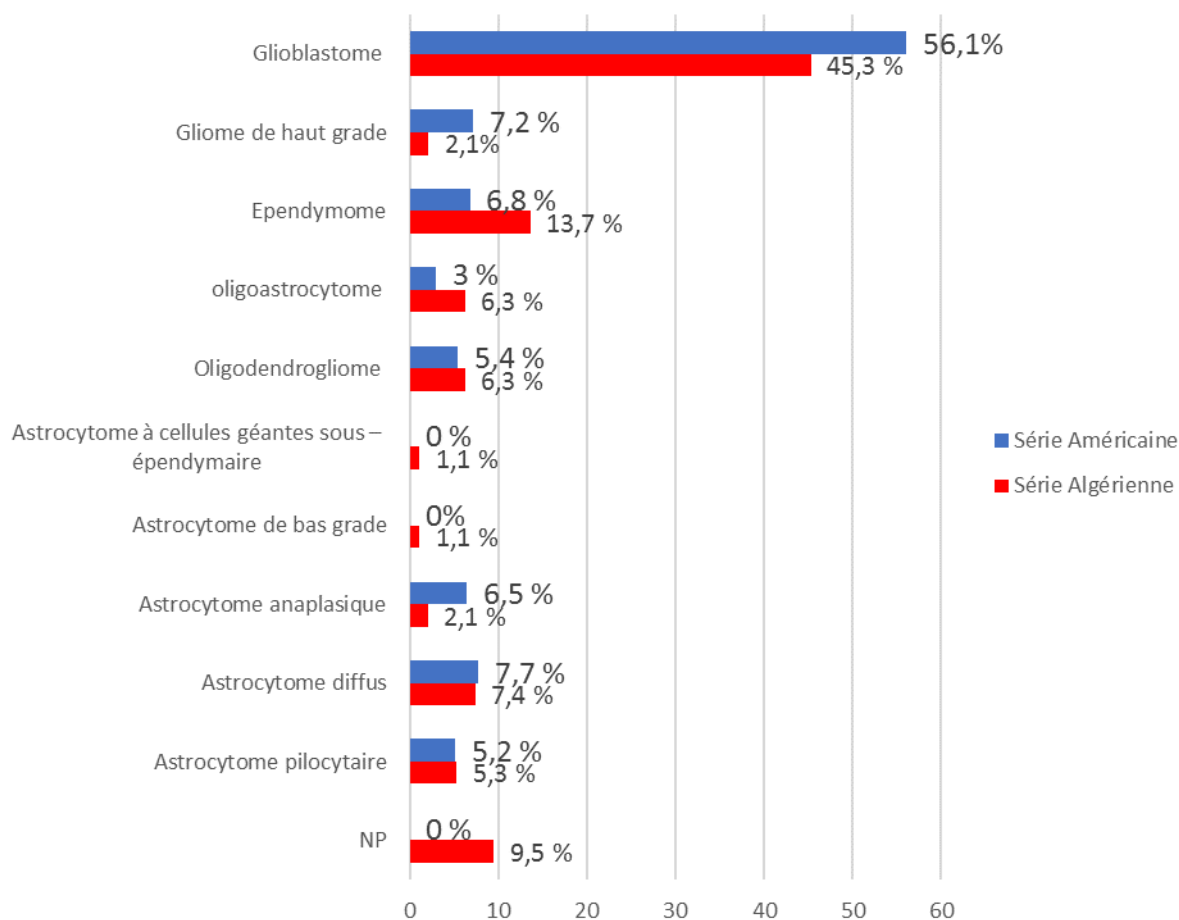


Figure 37 : Distribution des gliomes selon le type histologique dans les séries Américaine et Algérienne [adaptée de la référence 9]

Par ailleurs, il faut signaler que les statistiques des autres pays sont moins structurées que celle des états unis en l'absence de registres nationaux dans certains pays dont l'Algérie et surtout devant les divergences de définitions des tumeurs primitives du cerveau rendant ainsi difficile la comparaison entre ces données.

Ainsi, plusieurs de ces tumeurs ne répondent pas aux critères requis par l'OMS pour les classer, puisque certaines d'entre elles sont diagnostiquées radiologiquement seulement et aucune preuve histologique n'existe. Selon le rapport du CBTRUS de 2018, seulement 62,7% des tumeurs recensées disposent de tous les critères requis pour les classer selon l'OMS [9].

En Algérie, le registre national des cancers a été établi dans le cadre des directives du premier plan national quinquennal (2015-2019) anticancer lancé par le MSPRH Algérien. A Constantine, 1231 cas de cancers (533 hommes, 698 femmes, sex Ratio H/F 0,75) ont été recensés en 2014 dans la Wilaya avec une incidence standardisée de 142,8 cas / 100 000 habitants [15].

Chez les femmes, les localisations cérébrales venaient, en 2014, à la 9^{ème} position, représentant ainsi 1,6% de l'ensemble des cancers, avançant à la 7^{ème} position après 2 ans soit en 2016 la localisation cérébrale du cancer représentait 2,3% de l'ensemble des cancers ce qui est vraiment alarmant [14, 15].

Alors que chez les hommes, les localisations cérébrales étaient à la 8^{ème} position (4,7% de l'ensemble des cancers) tout en restant à la même position en 2016 (3,8% de l'ensemble des cancers) [14, 15].

Chez les enfants et les adolescents âgés de moins de 15 ans, les tumeurs du SNC représentaient en 2014, 8,3% des cancers chez les filles et 4,5% des cancers chez les garçons [15].

Facteurs de risque des gliomes :

Plusieurs facteurs de risque sont décrits, environnementaux et génétiques.

Parmi les facteurs environnementaux, les seuls validés sont l'exposition aux rayonnements ionisants (type de radiation générée par les bombes atomiques, radiothérapie, tomographie et rayons X) et le risque réduit de ces tumeurs (gliome en particulier) chez les personnes ayant des antécédents d'allergie ou d'autres maladies atopiques [9, 112].

Les preuves restent peu concluantes et toujours sujet de débat pour les autres facteurs environnementaux suspectés : pesticides, métaux lourds (plomb, mercure), dérivés nitrés (utilisés comme additifs alimentaires, conservateurs et colorants), certaines infections virales (SV 40) et le tabagisme.

Quant aux preuves du rôle des rayonnements non ionisants (téléphone mobile, lignes électriques en particulier en milieu professionnel, appareils électriques tel que micro-ondes, sèche-cheveux, fer à friser, ordinateur...) dans le développement des gliomes, elles ne cessent de croître. Dans une étude Suédoise cas-témoin récente (1346 cas de gliomes vs 3485 témoins sains), un risque accru de stade avancé (promotion / progression) de l'astrocytome de grade IV a été retrouvé en cas d'exposition aux champs électromagnétiques à très basse fréquence ELF-

EMF (période d'exposition de 1-14 ans, OR : 1,9, intervalle de confiance IC 95% 1,4-2,6, $p < 0,001$) [43]. Dans la méta-analyse de Carlberg, la relation entre l'usage du téléphone mobile et gliome a été bien notée (analyse de 445 cas de gliomes vs 477 contrôles, exposition ≥ 1640 heures, OR : 1,90, IC95% : 1,31-2,76) [42].

Dans notre série de 36 patients, nous avons étudié la relation entre gliome et l'exposition aux rayons du téléphone mobile ainsi que le tabagisme.

Nous avons trouvé une exposition importante à ce type de rayonnements non ionisants avec un usage modéré à fréquent du téléphone portable dans 75% des cas.

Cependant nous n'avons pas pu comparer avec la population témoin car cette donnée n'existait pas dans le questionnaire d'une bonne partie de cette population issue de la banque de donnée du Laboratoire de Biochimie du CHUC.

Nous avons trouvé aussi une relation avec le tabagisme où 13,88% des patients fumaient vs 3,68% des témoins ($p = 0,01$).

Par ailleurs, la présence de cas familiaux signant la possibilité d'intervention de facteurs génétiques a été retrouvée dans 21,21% des cas de gliome contre 0% chez les témoins ($p = 0,0001$).

5.2 Données Génétiques

La pathogenèse du gliome n'est pas encore clairement et totalement élucidée. Des preuves croissantes ont montré que les facteurs génétiques jouent également un rôle important et contribuent à la variation de la susceptibilité de l'hôte aux gliomes.

La gliomagenèse fait intervenir des altérations moléculaires telles que des amplifications, des mutations, des réarrangements ou des délétions chromosomiques.

Les altérations génétiques principalement rencontrées dans les gliomes sont des surexpressions de facteurs de croissance, des mutations « gain-de-fonction » des récepteurs à activité tyrosine kinase et des mutations « perte-de fonction » de gènes suppresseurs de tumeurs. Cependant, plusieurs types de pertes chromosomiques sont rapportés dans les gliomes, mais les gènes ne sont pas tous identifiés [16].

En moyenne, le nombre de mutations somatiques détectées par séquençage complet est estimé à ~ 16 dans les astrocytomes, 36 dans les astrocytomes anaplasiques et 46 à 50 dans les GBM [16].

Nous nous sommes intéressés dans notre étude à deux gènes codant pour la MTHFR et l'ACE dont le rôle exact et leurs impacts sur la prise en charge des gliomes restent à préciser.

La MTHFR est une enzyme clé du métabolisme des folates intervenant dans la méthylation de l'ADN et la synthèse des nucléotides.

Quant à l'ACE, c'est une enzyme clé du système rénine-angiotensine dont l'inhibition entrainerait la réduction de la prolifération cellulaire et la migration, l'inflammation, l'angiogenèse [92-94] ainsi que l'inhibition de l'activité des métalloprotéases de la matrice cellulaire et la réduction de l'expression du VEGF dans les cellules tumorales [91-95, 107].

5.2.1 Techniques d'extraction d'ADN

Pour réaliser notre étude nous avons utilisé des prélèvements sanguins et tissulaires. Cependant, l'extraction d'ADN tissulaire était infructueuse et ce, pour des raisons principalement liées aux stockage (tissu stocké non tumoral ou nécrosé, quantité de matériel biologique insuffisante ou nulle, délais entre le moment de l'exérèse et la conservation, température ambiante de la conservation, qualité de la paraffine utilisée...).

De ce fait, nous proposons, pour éviter de stocker des échantillons non tumoraux, de procéder au contrôle histologique avant l'étape de la conservation des échantillons dans la tumorothèque.

De même, afin de maintenir la bonne qualité des ADN, il faudrait revoir la qualité de la paraffine utilisée, la température de conservation des blocs ainsi que les circuits d'acheminement entre bloc opératoire et tumorothèque.

A noter que l'impossibilité d'extraction de l'ADN tissulaire n'était pas en relation avec la technique ou la mauvaise pratique au cours de l'extraction, car au cours d'une expérimentation préalable, portant sur des échantillons de tumeurs humaines on a réussi à réaliser l'extraction d'ADN avec le même protocole.

5.2.2 Le polymorphisme C677T de la MTHFR

Le métabolisme du folate joue un rôle important dans la cancérogenèse du fait de son implication dans la méthylation de l'ADN et la synthèse des nucléotides.

L'enzyme MTHFR régule le métabolisme du folate et assure un équilibre de l'homéostasie entre la synthèse de l'ADN et la méthylation et ce, en catalysant la conversion irréversible du 5,10-méthylène-tétrahydrofolate (THF) en 5-méthyl-THF [53,54].

A ce jour, plusieurs mutations génétiques sont identifiées, ainsi les variants hétérozygotes et homozygotes du polymorphisme C677T de la MTHFR ont une activité enzymatique MTHFR réduite par rapport au génotype homozygote normal de type sauvage.

La réduction de l'activité de l'enzyme MTHFR peut augmenter le pool de 5,10-méthylène-THF au détriment du pool de 5-méthyl-THF et altérer la méthylation de l'ADN.

Étant donné que la méthylation de l'ADN joue un rôle essentiel dans la régulation de l'expression des gènes et le maintien de la stabilité génomique, les aberrations dans les profils de méthylation normale causées par le polymorphisme MTHFR C677CT pourraient entraîner le développement du cancer [55].

Le métabolisme des folates avec le polymorphisme C677T de la MTHFR ont été incriminés et associés aussi à plusieurs autres pathologies. Dans une méta-analyse datant de 2016, concernant 618 études, incluant 137 013 participants, le polymorphisme C677T de la MTHFR a été associé à 42 pathologies dont l'autisme, la schizophrénie, les maladies cardiovasculaires, métaboliques, endocriniennes, les malformations fœtales et le cancer [72].

Les différents cancers associés à ce polymorphisme sont les cancers : du sein, des ovaires, du poumon, du foie, du pancréas, de l'estomac, de l'œsophage et de la vessie [52, 72, 113-116].

Quant à l'association du polymorphisme C677T de la MTHFR et les gliomes, les preuves disponibles jusqu'à l'heure actuelle sont faibles, du fait de la rareté des études et la discordance des résultats.

Nos résultats ont démontré que la fréquence du génotype TT est significativement plus élevée chez les patients atteints de gliome que chez les individus sains, ce génotype prédispose 6 fois plus au gliome (OR : 6,02, IC 95% : 2,5-14,53, $p=0,001$).

La fréquence de l'allèle T a été aussi plus importante chez la population malade que chez la population saine (0,001), alors que l'allèle C est plus fréquent chez les témoins sains que chez les malades ($p=0,001$).

Dans des modèles d'analyse logistique bivariées, nous avons trouvé que le génotype CC était protecteur (OR 0,19, IC 95% : 0,07-0,49, $p = 0,00036$) donc le risque de gliome est réduit de 81% en cas de génotype CC. De même que le modèle dominant CC+CT (OR : 0,17, IC 95% : 0,07-0,40, $p=0,00018$), et l'allèle C (OR : 0,43, IC 95% 0,27-0,73, $p=0,0015$) où le risque de gliome est réduit de 57% en cas de présence de l'allèle C.

Ces résultats concordent avec certaines données de la littérature et non pas avec d'autres.

Une méta-analyse incluant 10 études avec 1786 cas et 2076 contrôles n'avait pas montré d'association évidente entre le polymorphisme MTHFR C677T et le risque de gliomes dans les cinq modèles génétiques (T vs C, OR=1.00, 95 % CI 0.90–1.12, $P_{OR}=0.959$; TT vs CC, OR=1.02, 95 % CI 0.82–1.27, $P_{OR}=0.870$; CT vs CC, OR=1.02, 95 % CI 0.89–1.18, $P_{OR}=0.733$; TT+CT vs CC, OR=1.02, 95 % CI 0.90–1.16, $P_{OR}=0.781$; TT vs CT+CC, OR=0.99, 95 % CI 0.81–1.21, $P_{OR}=0.902$) [54].

Contrairement à cette étude, d'autres équipes avaient démontré la relation existante entre le polymorphisme C677T de la MTHFR et gliome. Dans une étude multicentrique incluant les pays Nordiques (Angleterre, Suède, Finlande, Danemark), où le génotypage de 1005 cas de gliomes et 631 méningiomes a été réalisé, la présence des deux polymorphismes du MTHFR (C 677 T et A1298C) était associé au développement de gliomes ($p = 0,02$) et méningiome ($p = 0,002$) chez ces populations [117]. Cadieux et al avaient démontré en outre que chez les patients Américains présentant un glioblastome, le variant C677T, est associé avec l'hypométhylation de l'ADN. Chez ces patients, il est enregistré un taux élevé de prolifération cellulaire [118].

Par ailleurs, Linnenbank et al avaient démontré que chez la population allemande, le variant C677T représentait un facteur de risque pour la survie de patients atteints de glioblastome. En effet, les patients porteurs du génotype TT, présentent une faible espérance de vie, puisque les patients porteurs du génotype CC avaient une espérance de vie de 12 mois ± 2 , et les patients porteurs du génotype CT avaient une espérance de vie de 11 mois ± 1 alors que l'espérance de vie des patients porteurs du génotype TT était de 10 mois ± 4 [55].

Par ailleurs, plusieurs études avaient démontré que la distribution du polymorphisme de la MTHFR diffère selon l'origine ethnique et selon un gradient géographique. Chez la population indienne et pakistanaise, européenne et nord-américaine et chez la population asiatique de l'est, la distribution de l'allèle T suit un gradient géographique. Plusieurs

hypothèses ont été émises pour expliquer ce gradient et l'origine de cette distribution dont: l'histoire génétique, la sélection environnementale, spécialement les radiations aux Ultraviolets ainsi que le régime alimentaire et la supplémentation en folate [119-122].

En outre, nous avons aussi retrouvé une fréquence moins élevée de l'allèle T chez la population saine (31,3%) comparativement à celle de la population malade (51,7%) ($p=0,001$) ce qui pourrait témoigner que l'allèle T est l'allèle mineur chez la population Algérienne saine.

Ces résultats concordent avec une étude réalisée en 2015 portant sur des patients atteints de leucémie myéloïde chronique au niveau de la région Ouest de l'Algérie, où l'allèle T était l'allèle mineur [123]. Ce même résultat était aussi observé dans une étude marocaine [124].

5.2.3 Le polymorphisme I/D de l'ACE

Classiquement, le SRA est considéré comme un élément fondamental et clé de l'homéostasie cardiovasculaire, l'équilibre entre l'eau et l'électrolytes et la prolifération cellulaire [125-127]. Cependant, ce système est exprimé dans différents tissus et organe tel que le foie, les reins, le pancréas, les gonades mais également le cerveau. Il est incriminé aussi dans la cancérogénèse et la gliomagénèse [125].

L'angiotensine II peut stimuler la néo vascularisation tumorale [128], et la sur expression de l'ACE et des récepteurs de l'angiotensine II type 1 (AT1R), ont été associés avec la prolifération, progression tumorale et les métastases [129-132].

Le polymorphisme I/D du gène de l'ACE a été associé à plusieurs cancers et très peu d'études se sont intéressées au gliome.

Les résultats principaux de notre étude qui a concerné une population de l'est Algérien ont démontré la relation forte entre le risque de gliome et ce polymorphisme du gène de l'ACE.

Le modèle récessif étudié était associé à un risque réduit de gliome de 72% ($p=0,0006$).

Le génotype ACE DD prédisposait au risque de gliome x 3,64 où il est retrouvé dans 63,9% des cas de gliome et 33,8% des témoins ($p=0,009$), indiquant que le polymorphisme I/D de l'ACE pourrait être un marqueur de risque de gliome.

En outre, le risque conféré par copie de l'allèle D est multiplié de 2,2 pour les cas de gliome ($p=0,009$).

Ces résultats concordent partiellement avec ceux du premier rapport décrivant la potentielle association entre le polymorphisme I/D du gène ACE et les gliomes chez la population chinoise.

Au niveau de cette étude, les patients atteints de gliomes avaient une fréquence élevée du génotype DD comparativement à la population saine (OR = 1.61, 95% CI = 1.12, 2.32; $p = 0.01$), mais la fréquence de l'allèle D était similaire entre les cas de gliome et les témoins (30,9% vs 28,3%, $p=0,1$) [133].

Dans une autre étude indienne récente, le génotype DD était plus fréquent chez la population atteinte de gliomes (26,8%) que chez la population contrôle (10,6%) ($p < 0.0001$). De plus, ce génotype DD augmentait de 5 fois, la prédisposition d'avoir un gliome et la fréquence de l'allèle D était plus importante chez la population malade comparativement à la population saine (54% versus 25% : $p < 0.0001$) [17].

Il n'existe par ailleurs, pas d'autres études s'intéressant à ce polymorphisme I/D de l'ACE dans les gliomes en Afrique ou dans la région MENA.

Les seules études que nous avons trouvées au Maghreb et s'intéressant à la génétique des gliomes, n'ont pas étudié ce gène [134-135].

Idrissi et al avait analysé 3 études Marocaines concernant 65, 62 et 35 patients avec glioblastome. Les altérations génétiques étudiées ici étaient IDH1/2, p53 et EGFR [134].

Quant à la seule étude Tunisienne que nous avons trouvée concernant la génétique des gliomes, elle a intéressé 110 cas. Les mutations les plus fréquentes, y étaient 10qLOH et PTEN [135].

Par ailleurs, le polymorphisme I/D de gène ACE est lié à d'autres types de cancers, cependant, les résultats ne sont pas forcément reproductibles. Cette divergence de résultats pourrait être liée à d'autres facteurs tels que les hétérogénéités génétiques entre les différentes populations.

Dans une étude prospective effectuée sur la population néerlandaise et incluant 6670 participants avec le génotype ACE, 730 cas de cancers étaient survenus au cours d'un suivi moyen de près de dix ans [136]. Les porteurs du génotype DD ayant un taux élevé de l'ACE, avaient un risque élevé d'avoir le cancer du sein, comparativement aux porteurs du génotype II/ID, hazard ratio [HR] = 1.47; 95% CI: 1.05-2.04). Cependant, cette association n'était pas présente pour les autres types de cancers (prostate, poumon et cancer colorectal). Les porteurs du génotype DD, exposés à des doses élevées d'inhibiteurs de la voie SRA pendant une longue période, présentaient un risque réduit d'atteinte au cancer (HR = 0.28; 95% CI: 0.10-0.79), alors que pour les porteurs du génotype II/ID, exposés à des doses élevées pendant une

courte durée, présentaient un risque d'atteinte du cancer colorectal (HR = 3.83; 95% CI: 1.67-8.79).

Dans une méta-analyse comprenant 6 études, les porteurs du génotype ACE II semblent être protégés du cancer gastrique (OR 0,54-0,63, $p = 0,01-0,02$), indépendamment de l'origine ethnique ou du type de tumeur gastrique [137]. Dans une étude allemande, 88 échantillons obtenus lors de chirurgies gastriques et provenant de patients atteints d'un cancer gastrique précoce, ont été comparés à 145 échantillons de sang provenant de témoins sains [138]. Le génotype DD a été significativement plus important chez la population malade que chez la population saine. Le génotype II a été associé à un faible risque d'atteinte d'un cancer gastrique comparativement aux porteurs du génotype DD (OR=0.20, 95% IC: 0.08 – 0.54). Cependant, il a été constaté dans d'autres études effectuées par la même équipe de recherche sur des patients atteints de cancer gastrique à un stade avancé, qu'aucune différence significative de la distribution du polymorphisme ACE I/D entre les malades et la population saine (respectivement 113 et 189 participants) n'a été relevée [139]. Toutefois, les porteurs du génotype DD ont été associés avec un risque élevé d'avoir des métastases ganglionnaires (OR 7.9, 95% CI 1.97 – 32) et un stade tumoral significativement plus élevé (OR 5.0, 95% CI 1.56–16) comparativement aux porteurs du génotype II.

L'impact de l'étude du polymorphisme I/D de l'ACE est aussi thérapeutique. En effet, dans une méta-analyse récente, évaluant l'effet des inhibiteurs de la voie SRA sur la récurrence, la métastase et la survie chez les patients cancéreux, a inclus cinquante-cinq études [132]. Les résultats ont montré une amélioration significative de la survie globale (HR = 0,82; IC 95%: 0,77-0,88; $P < 0,001$); survie sans progression (HR = 0,74; IC 95%: 0,66-0,84; $P < 0,001$), et la survie sans maladie (HR = 0,80, IC 95%: 0,67-0,95, $P = 0,01$) chez les utilisateurs d'inhibiteurs du SRA comparativement aux non-utilisateurs. L'analyse des sous-groupes a révélé que l'effet des inhibiteurs du SRA sur l'OS dépendait du type de cancer ou des différents inhibiteurs du SRA.

Un meilleur résultat a été observé pour la survie globale chez les utilisateurs d'inhibiteurs du SRA ayant un glioblastome (HR = 0,83, IC à 95%: 0,47-1,47, $p = 0,52$), cancer rectal / colorectal (HR = 0,86; IC à 95%: 0,68-1,08; 0,19), cancer du poumon (HR = 0,89, IC à 95%: 0,76-1,05, $p = 0,17$), cancer de la prostate (HR = 0,85, IC à 95%: 0,55-1,31, $p = 0,45$), carcinome épidermoïde de la tête et du cou (HR = 0,38, IC à 95%: 0,12-1,20, $P = 0,10$),

cancer de l'oropharynx (HR = 0,63, IC à 95%: 0,38-1,04, p = 0,07) et mélanome (HR = 0,41; IC à 95%: 0,10- 1,68, P = 0,22) [132].

Dans une autre étude, les avantages significatifs du blocage du système rénine-angiotensine observés dans les études cas-témoins et les études de cohorte, pourraient diminuer dans les essais contrôlés randomisés [140]. Cette étude comprenait 14 essais contrôlés randomisés et 17 études observationnelles de 3 957 725 participants (350 329 inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA) et utilisateurs de bloqueurs des récepteurs 1 de l'angiotensine II (ARA)). Les utilisateurs avaient une faible incidence de cancer dans les études d'observation (RR 0,82, IC à 95% 0,73-0,93) mais pas dans les essais contrôlés randomisés (RR 1,00, IC à 95% 0,92-1,08). La protection a persisté pour le cancer du poumon (RR 0,85, IC à 95% 0,75-0,97) mais pas pour d'autres sites de cancer. Le risque relatif de cancer associé au blocage du système rénine-angiotensine, a été réduit avec le temps de suivi. La réduction de la mortalité avec ARB / IECA était marginalement significative dans les études d'observation (RR 0,71, IC à 95% 0,55-0,93) mais pas dans les essais contrôlés randomisés (RR 0,99, IC à 95% 0,89-1,09).

Au final, il faut reconnaître le point fort de la présente étude. Elle est la seule au niveau de la région de l'Afrique du Nord et Moyen Orient (MENA) qui s'est intéressée à l'association des polymorphisme C677T de la MTHFR et I/D du gène de l'ACE et gliome en gardant à l'esprit les impacts principaux d'une telle étude : diagnostic et thérapeutique. Cependant, il faut en souligner les limites : la population étudiée issue de l'Est Algérien n'est pas représentative de l'ensemble de la population Algérienne. De même, la taille de notre échantillon qui est petite et expliquée par la rareté de ce cancer dans notre région, entre 1 et 4% selon le sexe. Cependant, ce nombre de patients est suffisant pour faire des analyses statistiques valides et constituer une base pour d'autres études sur des échantillons plus consistants.

CHAPITRE 6

PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS

Conclusion et Perspectives

Les gliomes sont des tumeurs primitives du cerveau de pronostic sombre. Les glioblastomes représentant environ 57 % des gliomes ont une survie relative très faible, seulement 5,6% des patients survivent 5 ans après le diagnostic.

Plusieurs évidences ont démontré le rôle crucial que jouent les facteurs génétiques dans le développement des gliomes. L'évolution de la recherche en cytogénétique et en biologie moléculaire a pu élucider en grande partie, ces dernières décennies, les mécanismes moléculaires de la gliomagenèse dont l'impact est multiple : diagnostique, pronostique, mais également thérapeutique permettant de prédire les réponses aux différentes thérapies ciblées proposées.

Nous nous sommes intéressés dans notre étude, la première au niveau de la région MENA, à deux gènes codant pour la MTHFR et l'ACE dont le rôle exact et leurs impacts sur la prise en charge des gliomes restent à préciser : La MTHFR, enzyme clé du métabolisme des folates intervenant dans la méthylation de l'ADN et la synthèse des nucléotides ; et l'ACE, dont l'inhibition entrainerait la réduction de la prolifération cellulaire et la migration, l'inflammation et l'angiogenèse dans les cellules tumorales.

Nous avons colligé 95 cas de gliomes (59 cas au CHU de Blida et 36 cas au CHU de Constantine) dont l'âge moyen était de $43,53 \pm 18,58$ ans. Le glioblastome était le type histologique le plus fréquent (45,26%). Bien que la population totale de nos deux séries ne soit pas très importante en nombre, mais nos résultats se rapprochaient bien aux données de la plus grande cohorte Américaine du CBTRUS et les données Françaises, publiées en 2017 et 2018.

L'étude génétique a pu être réalisée sur les 36 prélèvements sanguins effectués au CHU de Constantine. Les principaux résultats ont montré :

- Le génotype TT du polymorphisme C677T de la MTHFR est associé à un risque multiplié par 6 de genèse d'un gliome chez la population étudiée. La présence de l'allèle T pourrait être un facteur de risque contribuant au développement des gliomes chez cette population. Alors que la présence de l'allèle C confère une réduction de risque de gliome de 57%.
- Le génotype CC est, en contrepartie, protecteur avec un risque de gliome réduit de 82%.
- De même, le génotype DD de l'ACE est associé à un risque accru de gliome chez la même population (x 3,64).
- Le risque de gliome conféré par copie de l'allèle D est multiplié de 2,2.

En plus de l'usage de ces polymorphismes comme marqueurs du risque de gliome, ces résultats nous permettent aussi de proposer l'étude de ces gènes à visée thérapeutique, par l'usage des inhibiteurs de l'ACE et la substitution en folate ; et méritent une confirmation par la réalisation d'autres études approfondies regroupant un échantillon plus important et représentatif de patients Algériens atteints de gliomes.

Par ailleurs, dans l'objectif d'identifier les facteurs environnementaux pouvant être incriminés dans la genèse des gliomes, nous avons identifié l'exposition aux rayonnements non ionisants du téléphone mobile (usage modéré à fréquent du téléphone portable dans 75% des cas), le tabagisme (13,88% des patients fumaient vs 3,68% des témoins, $p=0,01$) et le facteur familial (présence de cas familiaux retrouvée dans 21,21% des cas de gliome, vs 0% chez les témoins, $p = 0,0001$).

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1. **Sampetean O, Saya H.** Modeling phenotypes of malignant gliomas. *Cancer Sci.* 2018;109(1):6-14.
2. **Masui K, Onizuka H, Cavenee WK, Mischel PS, Shibata N.** Metabolic reprogramming in the pathogenesis of glioma: Update. *Neuropathology.* 2019;39(1):3-13.
3. **Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al.** The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta neuropathologica.* 2007;114(2):97-109.
4. **Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al.** The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016;131(6):803-20.
5. **Erridge SC, Hart MG, Kerr GR, et al.** Trends in classification, referral and treatment and the effect on outcome of patients with glioma: a 20 year cohort. *J Neurooncol* 2011; 104:789-800.
6. **Van den Bent MJ.** Interobserver variation of the histopathological diagnosis in clinical trials on glioma: a clinician's perspective. *Acta Neuropathol* 2010; 120(3): 297–304
7. **Colin C, Baeza N, Tong S, Bouvier C, Quilichini B, Durbec P, et al.** In vitro identification and functional characterization of glial precursor cells in human gliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2006; 32:189–202.
8. **Figarella-Branger D, Colin C, Coulibaly B, et al.** Classification histologique et moléculaire des gliomes. *Revue neurologique* 2008; 164 : 505–515
9. **Ostrom QT, Gittleman H, Truitt G, Boscia A, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS.** CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011-2015. *Neuro Oncol.* 2018;20(suppl_4):iv1-iv86.
10. **Zouaoui S, Rigau V, Mathieu-Daudé H, Darlix A, Bessaoud F, Fabbro-Peray P, Bauchet F, Kerr C, Fabbro M, Figarella-Branger D, Taillandier L, Duffau H, Trétarre B, Bauchet L.** French brain tumor database: general results on 40,000 cases, main current applications and future prospects. *Neurochirurgie.* 2012 Feb;58(1):4-13.

11. **Darlix A, Zouaoui S, Rigau V, Bessaoud F, Figarella-Branger D, Mathieu-Daudé H, Trétarre B, Bauchet F, Duffau H, Taillandier L, Bauchet L.** Epidemiology for primary brain tumors: a nationwide population-based study. *J Neurooncol.* 2017 Feb;131(3):525-546.
12. **L. Chbani, I.Hafid, M. Berraho, O. Mesbahi, C. Nejjari, and A. Amarti,** “Epidemiological and pathological features of cancer in Fez Boulemane region, Morocco,” *Eastern Mediterranean. Health Journal*, 2013; vol. 19, no. 3, pp. 263–270.
13. **Senhaji N, Louati S, Chbani L, El Fatemi H, Hammas N, Mikou K, Maaroufi M, Benzagmout M, Boujraf S, et al.** *EGFR* Amplification and *IDH* Mutations in Glioblastoma. Patients of the Northeast of Morocco. *BioMed Research International* 2017 p7.
14. **Hamdi Cherif M.** Premier Atlas Cancer 2014-2016. Registres du Cancer Réseau Régional Est et Sud – Est, Algérie. Publication de l’ATRSS.
15. **Lakehal A et al.** Rapport du registre de cancer de la Wilaya de Constantine de 2014. Service d’épidémiologie et de médecine préventive. CHU Constantine. Publié en Avril 2017.
16. **Stupp R, Hottinger A. F, Hegi MA. E, Weller MH.** Diagnostic et traitement des gliomes. *Forum Med Suisse* 2013; 13(22):421–426
17. **Pandith A.A, Qasim I, Zahoor W, Shah P, Bhat A.R.** ACE I/D sequence variants but not MTHFR C677T, is strongly linked to malignant glioma risk and its variant DD genotype may act as a promising predictive biomarker for overall survival of glioma patients. *Gene.* 2018; 639: 62–68
18. **Radin DP, Krebs A, Maqsudlu A, Patel P.** Our ACE in the HOLE: Justifying the Use of Angiotensin-converting Enzyme Inhibitors as Adjuvants to Standard Chemotherapy. *Anticancer Res.* 2018 Jan;38(1):45-49.
19. **Mairéad G. McNamara, Solmaz Sahebjam, et al.** Emerging Biomarkers in Glioblastoma. *Cancers (Basel)* 2013; 5(3): 1103–1119.
20. **Jiao Y, Killela PJ, Reitman ZJ, et al.** Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas. *Oncotarget* 2012; 3:709-22.
21. **Bready D, Placantonakis DG.** Molecular Pathogenesis of Low-Grade Glioma. *Neurosurg Clin N Am.* 2019;30(1):17-25.

22. **Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, et al.** CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro Oncol.* 2013; 15 Suppl 2:ii1-56.
23. **Guan X, Vengoechea J, Zheng S, et al.** Molecular subtypes of glioblastoma are relevant to lower grade glioma. *PLoS One* 2014; 9:e91216.
24. **Neill SG, Fisher KE.** Section III: Molecular diagnostics in neuro-oncology. *Curr Probl Cancer* 2014; 38:175-9.
25. **Suzuki A, Nobusawa S, Natsume A, et al.** Olig2 labeling index is correlated with histological and molecular classifications in low-grade diffuse gliomas. *J Neurooncol* 2014; 120:283-91.
26. **Boots-Sprenger SH, Sijben A, Rijntjes J, et al.** Significance of complete 1p/19q co-deletion, IDH1 mutation and MGMT promoter methylation in gliomas: use with caution. *Mod Pathol* 2013; 26:922-9.
27. **Gupta K, Salunke P.** Molecular markers of glioma: an update on recent progress and perspectives. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012; 138:1971-81.
28. **Agarwal S, Sharma MC, Jha P, et al.** Comparative study of IDH1 mutations in gliomas by immunohistochemistry and DNA sequencing. *Neuro Oncol* 2013; 15:718-26.
29. **Huse JT, Wallace M, Aldape KD, et al.** Where are we now? And where are we going? A report from the Accelerate Brain Cancer Cure (ABC2) low-grade glioma research workshop. *Neuro Oncol* 2014; 16:173-8.
30. **Le Mercier M, Hastir D, Moles Lopez X, et al.** A simplified approach for the molecular classification of glioblastomas. *PLoS One* 2012; 7:e45475.
31. **Nicolaidis S.** Personalized medicine in neurosurgery. *Metabolism* 2013; 62 Suppl 1:S45-8.
32. **Olar A, Aldape KD.** Using the molecular classification of glioblastoma to inform personalized treatment. *J Pathol* 2014; 232:165-77.
33. **Theeler BJ, Yung WK, Fuller GN, et al.** Moving toward molecular classification of diffuse gliomas in adults. *Neurology* 2012; 79:1917-26.
34. **Masui K, Cloughesy TF, Mischel PS.** Review: molecular pathology in adult high-grade gliomas: from molecular diagnostics to target therapies. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2012; 38:271-91.

35. **Aldave G, Tejada S, Pay E, et al.** Prognostic value of residual fluorescent tissue in glioblastoma patients after gross total resection in 5-aminolevulinic Acid-guided surgery. *Neurosurgery* 2013; 72:915-20; discussion 920-1.
36. **Weller M, Pfister SM, Wick W, et al.** Molecular neurooncology in clinical practice: a new horizon. *Lancet Oncol* 2013;14:e370-9.
37. **Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, et al.** Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 2010; 17:98-110.
38. **Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, et al.** Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell* 2010; 17:510-22.
39. **Simon M, Hosen I, Gousias K, et al.** TERT promoter mutations: a novel independent prognostic factor in primary glioblastomas. *Neuro Oncol* 2015;17:45-52.
40. **Labussière M, Boisselier B, Mokhtari K, et al.** Combined analysis of TERT, EGFR, and IDH status defines distinct prognostic glioblastoma classes. *Neurology* 2014;83:1200-6.
41. **Pisapia D J.** The Updated World Health Organization Glioma Classification Cellular and Molecular Origins of Adult Infiltrating Gliomas. *Arch Pathol Lab Med—Vol 141*, December 2017 ; 1633-1645
42. **Carlberg M, Hardell L.** Evaluation of Mobile Phone and Cordless Phone Use and Glioma Risk Using the Bradford Hill Viewpoints from 1965 on Association or Causation. *Biomed Res Int.* 2017;2017:9218486.
43. **Carlberg M, Koppel T, Ahonen M, Hardell L.** Case-control study on occupational exposure to extremely low-frequency electromagnetic fields and glioma risk. *Am J Ind Med.* 2017; 60(5):494-503.
44. **Interphone Study Group,** “Brain tumour risk in relation to mobile telephone use: results of the INTERPHONE international case-control study,” *International Journal of Epidemiology*, 2010; vol. 390, 675–694.
45. **M. C. Turner, S. Sadetzki, C. E. Langer et al.,** “Investigation of bias related to differences between case and control interview dates in five INTERPHONE countries,” *Annals of Epidemiology*, 2016; vol. 26, no. 12, 827.e2–832.e2.
46. **Lévy S, Chapet S, Mazon J J .** Prise en charge des gliomes. *Cancer – Radiothérapie*, 2014 ; Vol 18, N 5-6, 461-467.

47. **Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, et al.** Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *New Engl J Med* 2005;352:987–96.
48. **Chinot OL, Wick W, Mason W, Henriksson R, Saran F, Nishikawa R, et al.** Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *New Engl J Med* 2014;370:709–22.
49. **Gilbert MR, Dignam JJ, Armstrong TS, Wefel JS, Blumenthal DT, Vogelbaum MA, et al.** A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *NEngl J Med* 2014; 370:699–708.
50. **Eichholzer M, Tonz O, Zimmermann R.** Folic acid: a public-health challenge. *Lancet.* 2006;367:1352–61.
51. **Holmes MV, Newcombe P, Hubacek JA, Sofat R, Ricketts SL, Cooper J, et al.** Effect modification by population dietary folate on the association between MTHFR genotype, homocysteine, and stroke risk: a meta-analysis of genetic studies and randomised trials. *Lancet.* 2011;378:584–94.
52. **Antoniades C, Shirodaria C, Leeson P, Baarholm OA, Van-Assche T, Cunnington C, et al.** MTHFR 677 C>T polymorphism reveals functional importance for 5-methyltetrahydrofolate, not homocysteine, in regulation of vascular redox state and endothelial function in human atherosclerosis. *Circulation.* 2009;119:2507–15.
53. **Fodinger M, Horl WH, Sunder-Plassmann G.** Molecular biology of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase. *J Nephrol.* 2000;13:20–33.
54. **Lu Q, Dai D, Zhao W, Wang L et al.** Association between MTHFR 677C>T polymorphism and risk of gliomas: evidence from a meta-analysis. *Tumor Biology,* 2013, 34 (5) : 2801–2807
55. **Linnebank M, Semmler A, Moskau S, Smulders Y, Blom H, Simon M.** the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) variant c.677C.T (A222V) in uences overall survival of patients with glioblastoma multiforme. *Neuro Oncol.* 2008; 10(4): 548–552.
56. **Guilland. J.C** Folate and Cancer. The right dose. *Correspondances en Métabolismes Hormones Diabètes et Nutrition* 2011, Vol. XV - n° 6 : 196-200
57. **Liu N, Jiang J, Song YJ, Zhao SG, Tong ZG, Song HS, Wu H, Zhu JY, Gu YH, Sun Y, Hua W, Qi JP.** Impact of MTHFR polymorphisms on methylation of MGMT

- in glioma patients from Northeast China with different folate levels. *Genet Mol Res.* 2013; 29;12(4):5160-71.
58. **Škovierová H, Vidomanová E, Mahmood S, Sopková J, Drgová A, Červeňová T, Halašová E, Lehotský J.** The Molecular and Cellular Effect of Homocysteine Metabolism Imbalance on Human Health. *Int J Mol Sci.* 2016;17(10): E1733.
59. **Carson, N.A.; Neil, D.W.** Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. *Arch. Dis. Child.* 1962, 37, 505–513.
60. **McCully, K.S.** Vascular pathology of homocysteine: Implications for pathogenesis of arteriosclerosis. *Am. J. Pathol.* 1969, 56, 111–128.
61. **Lehotsky, J.; Petras, M.; Kovalska, M.; Tothova, B.; Drgova, A.; Kaplan, P.** Mechanisms involved in the ischemic tolerance in brain: Effect of the homocysteine. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2015, 35, 7–15.
62. **Givvimani, S.; Munjal, C.; Narayanan, N.; Aqil, F.; Tyagi, G.; Metreveli, N.; Tyagi, S.C.** Hyperhomocysteinemia decreases intestinal motility leading to constipation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2012, 303, G281–G290.
63. **Iacobazzi, V.; Infantino, V.; Castegna, A.; Andria, G.** Hyperhomocysteinemia: Related genetic diseases and congenital defects, abnormal DNA methylation and newborn screening issues. *Mol. Genet. Metab.* 2014, 113, 27–33.
64. **Perna, A.F.; Ingrosso, D.** Atherosclerosis determinants in renal disease: How much is homocysteine involved? *Nephrol. Dial. Transplant.* 2015, 31, 860–863.
65. **Schalinske, K.L.; Smazal, A.L.** Homocysteine imbalance: A pathological metabolic marker. *Adv. Nutr.* 2012, 3, 755–762.
66. **Liew SC, Gupta ED.** Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated diseases. *Eur J Med Genet.* 2015 Jan;58(1):1-10.
67. **NIH.** Genetic Home References. MTHFR gene. Téléchargement en Mars 2018.
<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MTHFR#location>
68. **Goyette P, Sumner J, Milos R, Duncan A, Rosenblatt D, Matthews R, et al.** Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping, and mutation identification. *Nat Genet* 1994;7:195e200.
69. **Goyette P, Christensen B, Rosenblatt D, Rozen R.** Severe and mild mutations in cis for the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene, and description of five novel mutations in MTHFR. *Am J Hum Genet* 1996;59:1268e75.

70. **Goyette P, Frosst P, Rosenbalt D, Rozen R.** Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/phenotype correlations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Am J Hum Genet* 1995;56:1052e9.
71. **Goyette P, Pai A, Milos R, Frosst P, Tran P, Chen Z, et al.** Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mamm Genome* 1998;9: 652e6.
72. **Yanga B, Fan S, Zhi X, Xiac R et al.** Geographical and ethnic distribution of MTHFR gene polymorphisms and their associations with diseases among Chinese population. *Clin Genet* 2017; 92: 243–258
73. **Alshatwi AA.** Breast cancer risk, dietary intake, and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) single nucleotide polymorphisms. *Food Chem Toxicol* 2010;48:1881e5.
74. **Sangrajrang S, Sato Y, Sakamoto H, Ohnami S, Khuhaprema T, Yoshida T.** Genetic polymorphisms in folate and alcohol metabolism and breast cancer risk: a casecontrol study in Thai women. *Breast Cancer Res Treat* 2010;123:885e93.
75. **Liang H, Yan Y, Li T, Li R, Li M, Li S, et al.** Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and breast cancer risk in Chinese population: a meta-analysis of 22 case-control studies. *Tumour Biol* 2013;35:1695e701.
76. **Wang ZG, Cui W, Yang LF, Zhu YQ, Wei WH.** Association of dietary intake of folate and MTHFR genotype with breast cancer risk. *Genet Mol Res* 2014;24(13): 5446e51.
77. **Gershoni-Baruch R, Dagan E, Israeli D, Kasinetz L, Kadouri E, Friedman E.** Association of the C677T polymorphism in the MTHFR gene with breast and/or ovarian cancer risk in Jewish women. *Eur J Cancer* 2000;36:2313e6.
78. **Lajin B, Alhaj Sakur A, Ghabreau L, Alachkar A.** Association of polymorphisms in one-carbon metabolizing genes with breast cancer risk in Syrian women. *Tumour Biol* 2012;33:1133e9.
79. **Vañner AS, Boiarskikh UA, VSelezneva IA, Sinkina TV, Lazarev AF, et al.** Polymorphic variants of folate metabolizing genes (C677T and A1298C MTHFR, C1420T SHMT1 and G1958A MTHFD) are not associated with the risk of breast cancer in West Siberian Region of Russia. *Mol Biol* 2010;44:816e23.

80. **de Cássia Carvalho Barbosa R1, da Costa DM, Cordeiro DE, Vieira AP, Rabenhorst SH.** Interaction of MTHFR C677T and A1298C, and MTR A2756G gene polymorphisms in breast cancer risk in a population in Northeast Brazil. *Anticancer Res* 2012;32:4805e11.
81. **Zhu J, Wu L, Kohlmeier M, Ye F, Cai W.** Association between MTHFR C677T, MTHFR A1298C and MS A2756G polymorphisms and risk of cervical intraepithelial neoplasia II/III and cervical cancer: a meta-analysis. *Mol Med Rep* 2013;8:919e 27.
82. **Ma C, Liu Y, Zhang W, Liu P.** The association between MTHFR C677T polymorphism and ovarian cancer risk: a meta-analysis of 18,628 individuals. *Mol Biol Rep* 2013;40:2061e8
83. **Ding XP, Feng L, Ma L.** MTHFR C677T polymorphism and ovarian cancer risk: a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012;13:3937e42.
84. **Wen YY, Yang SJ, Zhang JX, Chen XY.** Methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms and esophageal squamous cell carcinoma susceptibility: a meta-analysis of case-control studies. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013;14:21e5.
85. **Fang Y, Xiao F, An Z, Hao L.** Systematic review on the relationship between genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and esophageal squamous cell carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev* 2011;12:1861e6.
86. **Keld R, Thian M, Hau C, Sajid J, Kumar N, Ang Y.** Polymorphisms of MTHFR and susceptibility to oesophageal adenocarcinoma in a Caucasian United Kingdom population. *World J Gastroenterol* 2014;20:12212e6.
87. **Jia J, Ma Z, Wu S.** Positive association between MTHFR C677T polymorphism and oral cancer risk: a meta-analysis. *Tumour Biol* 2014;35:4943e8.
88. **Zhang WB, Zhang JH, Pan ZQ, Yang QS, Liu B.** The MTHFR C677T polymorphism and prostate cancer risk: new findings from a meta-analysis of 7306 cases and 8062 controls. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012a;13:2597e604.
89. **Fard-Esfahani P, Mohammadi Torbati P, Hashemi Z, Fayaz S, Golkar M.** Analysis of relation between C677T genotype in MTHFR gene and prostatic cancer in Iranian males. *Acta Med Iran* 2012;50:657e63.
90. **López-Cortés A, Jaramillo-Koupermann G, Muñoz MJ, Cabrera A, Echeverría C, Rosales F, et al.** Genetic polymorphisms in MTHFR (C677T, A1298C), MTR (A2756G) and MTRR (A66G) genes associated with pathological characteristics of prostate cancer in the Ecuadorian population. *Am J Med Sci* 2013;346:447^e 54.

91. **Wzgarda A, Kleszcz R, Prokop M, Regulska K, Regulski M, Paluszczak J, Stanisz BJ.** Unknown face of known drugs - what else can we expect from angiotensin converting enzyme inhibitors? *Eur J Pharmacol.* 2017 ; 15;797:9-19.
92. **Lever AF, Hole DJ, Gillis CR, McCallum IR, McInnes GT, MacKinnon PL, et al.** Do inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme protect against risk of cancer? *Lancet (London, England).* 1998;352(9123):179-84.
93. **Ruiter R, Visser LE, Van Duijn CM, Stricker BH.** The ACE insertion/deletion polymorphism and risk of cancer, a review and meta-analysis of the literature. *Current cancer drug targets.* 2011;11(4):421-30.
94. **Kondo T.** Molecular mechanisms involved in gliomagenesis. *Brain tumor pathology.* 2017;34(1):1-7.
95. **Lindberg H, Nielsen D, Jensen BV, Eriksen J, Skovsgaard T.** Angiotensin converting enzyme inhibitors for cancer treatment? *Acta oncologica (Stockholm, Sweden).* 2004;43(2):142-52.
96. **Amar L, Baron S.** Physiologie et méthodes d'exploration du système Rénine-Angiotensine-Aldostérone. *EMC Endocrinologie – Nutrition,* 2016 :10-014-B-20
97. **F.A. Sayed-Tabatabaei, B.A. Oostra, A. Isaacs, C.M. van Duijn, J.C.M. Witteman.** ACE Polymorphisms. *Circ Res.* 2006; 98:1123-1133.
98. **Clancy P, Seto SW, Koblar SA, Golledge J.** Role of the angiotensin converting enzyme 1/angiotensin II/angiotensin receptor 1 axis in interstitial collagenase expression in human carotid atheroma. *Atherosclerosis* 2013;229:331–7.
99. **Mukoyama M, Nakajima M, Horiuchi M, Sasamura H, Pratt RE, Dzau VJ.** Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J Biol Chem* 1993;268:24539–42.
100. **Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Lyons PR, Lassegue B, Griendling KK.** Angiotensin II receptor coupling to phospholipase D is mediated by the betagamma subunits of heterotrimeric G proteins in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 1999;55:142–9.
101. **Shanmugam S, Sandberg K.** Ontogeny of angiotensin II receptors. *Cell Biol Int* 1996;20:169–76.
102. **Nakagawa P, Sigmund CD** How Is the Brain Renin-Angiotensin System Regulated? *Hypertension.* 2017 Jul;70(1):10-18.

103. **Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, et al.** An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990; 86: 1343–1346.
104. **Ruiter R, Visser LE, Van Duijn CM, Stricker BH.** The ACE insertion/deletion polymorphism and risk of cancer, a review and meta-analysis of the literature. *Current cancer drug targets*. 2011;11(4):421-30.
105. **Hubert C, Houot AM, Corvol P, Soubrier F.** Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. *The Journal of biological chemistry*. 1991;266(23):15377-83.
106. **Moreno-Muñoz D, de la Haba-Rodríguez JR, Conde F, López-Sánchez LM et al.** Genetic variants in the renin-angiotensin system predict response to bevacizumab in cancer patients. *Eur J Clin Invest*. 2015 Dec;45(12):1325-32.
107. **Li XY, Sun JF, Hu SQ.** The renin-angiotensin system blockers as adjunctive therapy for cancer: a meta-analysis of survival outcome. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017;21(6):1375-1383.
108. **Pikor LA, Enfield KS, Cameron H, Lam WL.** DNA extraction from paraffin embedded material for genetic and epigenetic analyses. *J Vis Exp*. 2011;(49).
109. **Sengüven B, Baris E, Oygur T, Berktaş M.** Comparison of Methods for the Extraction of DNA from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Archival Tissues. *nt J Med Sci*. 2014; 11(5): 494–499.
110. **Vaziri Gohar A, Mohammadi A.** A simple method for DNA extraction from formalin fixed, paraffin embedded tissue blocks. *Protocol Online*, 2009. Téléchargement en Mars 2018 <http://www.protocol-online.org/prot/Protocols/A-simple-method-for-DNA-extraction-from-formalin-fixed--paraffin-embedded-tissue-blocks-3969.html>
111. **Henrik Berg Rasmussen.** Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis – Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting. *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*, Dr. Sameh Magdeldin (Ed.), 2012 ISBN: 978-953-51-0458-2, InTech, Available from: <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/35104.pdf>
112. **Turner MC.** Epidemiology: allergy history, IgE, and cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2012;61(9):1493–1510.

113. **Zhang J, Qiu LX, Wang ZH, Wu XH, Liu XJ, Wang BY, et al.** MTHFR C677T polymorphism associated with breast cancer susceptibility: a meta-analysis involving 15,260 cases and 20,411 controls. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;123:549–55.
114. **Jin F, Qu LS, Shen XZ.** Association between the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and hepatocellular carcinoma risk: a meta-analysis. *Diagn Pathol.* 2009;4:39.
115. **Gonzales MC, Yu P, Shiao SP.** MTHFR Gene Polymorphism-Mutations and Air Pollution as Risk Factors for Breast Cancer: A Metaprediction Study. *Nurs Res.* 2017;66(2):152-163.
116. **Xia L, Liu Y, Xu X-Z, Peng-Cheng Jiang, et al.** Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and gastric cancer susceptibility. *World J Gastroenterol* 2014 August 28; 20(32): 11429-11438
117. **Bethke L, Webb E, Murray A, Schoemaker M, Feychting M et al.** Functional Polymorphisms in Folate Metabolism Genes Influence the Risk of Meningioma and Glioma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17(5) : 1195-1202
118. **Cadioux B, Ching TT, Vandenberg SR, Costello JF.** Genome-wide hypomethylation in human glioblastomas associated with specific copy number alteration, methylenetetrahydrofolate reductase allele status, and increased proliferation. *Cancer Res.* 2006;66:8469–8476.
119. **Wilcken B, Bamforth F, Li Z et al.** Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*): findings from over 7000 newborns from 16 areas worldwide. *J Med Genet* 2003: 40: 619-625.
120. **Pepe G, Camacho VO, Giusti B, et al.** Heterogeneity in world distribution of the thermolabile C677T mutation in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet* 1998: 63: 917-920.
121. **Saraswathy KN, Asghar M, Samtani R et al.** Spectrum of *MTHFR* gene SNPs C677T and A1298C: a study among 23 population groups of India. *Mol Biol Rep* 2012: 39: 5025-5031.

122. **Wang YF, Pei LJ, Wang JF, Zheng XY.** Is the prevalence of *MTHFR* C677T polymorphism associated with ultraviolet radiation in Eurasia? *J Hum Genet* 2014; 57: 780-786.
123. **Dorgham S, Aberkane M, Boughrara W et al.** Association des polymorphismes du gène méthylène-tetrahydrofolate reductase avec la leucémie myeloïde chronique. *Bulletin du cancer* 2014; 101:2014.
124. **Paluku They-They T, Hamzi K, Mazabraud A. et al.** Fréquence du polymorphisme 677C>T du gène de la méthylène tetrahydrofolate réductase (*MTHFR*) dans les populations arabe et berbère du Maroc. *Antropo* 2009 : 20 : 7.
125. **Perdomo-Pantoja A, Mejia-Perez SI, Gomez-Flores-Ramos L, Lara-Velazquez M, Orillac C, Gomez-Amador JL et al.** Renin angiotensin system and its role in biomarkers and treatment in gliomas. *J Neurooncol.* 2018; 138(1): 1-15.
126. **Herichova I, Szantoova K.** Renin-angiotensin system: upgrade of recent knowledge and perspectives. *Endocr Regul.* 2013;47(1):39-52.
127. **Carey RM.** The Intrarenal Renin-Angiotensin and Dopaminergic Systems. *Hypertension.* 2013;61(3):673-80.
128. **Egami K, Murohara T, Shimada T, Sasaki K-i, Shintani S, Sugaya T, et al.** Role of host angiotensin II type 1 receptor in tumor angiogenesis and growth. *Journal of Clinical Investigation.* 2003;112(1):67.
129. **Arrieta O, Pineda-Olvera B, Guevara-Salazar P, Hernandez-Pedro N, Morales-Espinosa D, Ceron-Lizarraga TL, et al.** Expression of AT1 and AT2 angiotensin receptors in astrocytomas is associated with poor prognosis. *British journal of cancer.* 2008;99(1):160-6.
130. **Arrieta O, Villarreal-Garza C, Vizcaino G, Pineda B, Hernandez-Pedro N, Guevara-Salazar P, et al.** Association between AT1 and AT2 angiotensin II receptor expression with cell proliferation and angiogenesis in operable breast cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine.* 2015;36(7):5627-34.
131. **Röcken C, Röhl F-W, Diebler E, Lendeckel U, Pross M, Carl-McGrath S, et al.** The angiotensin II/angiotensin II receptor system correlates with nodal spread in intestinal type gastric cancer. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers.* 2007;16(6):1206-12.

132. **Sun H, Li T, Zhuang R, Cai W, Zheng Y.** Do renin–angiotensin system inhibitors influence the recurrence, metastasis, and survival in cancer patients?: Evidence from a meta-analysis including 55 studies. *Medicine*. 2017;96(13).
133. **Lian M, Jiang H, Wang H, Guo S.** Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion gene polymorphisms is associated with risk of glioma in a Chinese population. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*. 2015;16(2):443-7.
134. **Idrissi HHE, Boujmia OKA, Nadifi S, Dehbi H.** Genetics of Glioblastoma in Moroccan population: Review of literature. *IBRO Rep*. 2018; 5: 133-6.
135. **Trabelsi S, Chabchoub I, Ksira I, Karmeni N, Mama N, Kanoun S et al.** Molecular diagnostic and prognostic subtyping of gliomas in tunisian population. *Mol Neurobiol*. 2017; 54(4): 2381-94.
136. **van der Knaap R, Siemes C, Coebergh JWW, van Duijn CM, Hofman A, Stricker BHC.** Renin-angiotensin system inhibitors, angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism, and cancer. *Cancer*. 2008;112(4):748-57.
137. **Pabalan N, Jarjanazi H, Ozcelik H.** Associations of the Insertion/Deletion Polymorphism in the ACE Gene and Risk of Gastric Cancer: A Meta-Analysis. *Journal of gastrointestinal cancer*. 2015;46(4):370-9.
138. **Ebert MP, Lendeckel U, Westphal S, Dierkes J, Glas J, Folwaczny C, et al.** The angiotensin I–converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism is linked to early gastric cancer. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 2005;14(12):2987-9.
139. **Röcken C, Lendeckel U, Dierkes J, Westphal S, Carl-McGrath S, Peters B, et al.** The number of lymph node metastases in gastric cancer correlates with the angiotensin I–converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism. *Clinical Cancer Research*. 2005;11(7):2526-30.
140. **Shen J, Huang Y-M, Wang M, Hong X-Z, Song X-N, Zou X, et al.** Renin–angiotensin system blockade for the risk of cancer and death. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*. 2016;17(3):1470320316656679.

ANNEXES

Formulaire de Consentement

Je soussigné (e), certifie, donner mon consentement éclairé pour participer à l'étude sur les tumeurs cérébrales, en autorisant les responsables de la présente étude : Pr. Satta Dalila et Mlle Benenemissi Ikram Hana à consulter mes données médicales et à effectuer des prélèvements sanguins dans le but de procéder à une étude génétique.

Patient:

Nom et prénom (en Majuscule) :

Tuteur légal du patient :

Signature : Date :

Médecin traitant :

Je soussigné (e), avoir expliqué (e) l'étude au patient ou à son représentant légal.

Nom et prénom (en Majuscule) :

Signature : Date :

Questionnaire gliomes

N° :

Date :

Nom : Prénom : Sexe : Féminin Masculin

Date de naissance : Age :

Adresse Actuelle :

Origine :

Poids :(Kg) Taille : (cm) poids de naissance :(kg)

Situation Familiale : Marié (e) Célibataire divorcé (e) Autres

Niveau d'étude : jamais d'étude Primaire Moyen Secondaire Universitaire

Profession :

Diagnostic positif de la maladie fait en: (mois) / (année)

Type histologique :

Traitements : chirurgie : oui non

Si oui, précisez le type de chirurgie.....

Chimiothérapie : oui non

Si oui précisez le protocole :

Radiothérapie: oui non

Si oui précisez le nombre de séances :

Autres traitement:.....

Usage du téléphone portable : fréquent modéré Jamais

Tabagisme actif : oui non si oui : nombre de paquet/an. :

Tabagisme passif : oui non

Antécédents personnels :

.....

.....

Antécédents familiaux : cas similaire dans la famille : oui non

Si oui précisez le membre de la famille atteint :

Autres tumeurs : oui non

Si oui, précisez les membres de la famille atteint :

.....

Autres antécédents familiaux :

.....

.....

Annexe 3: Composition des réactifs

Réactif	Composition
TE 20 :5 (Tris 20 mM, EDTA 5 mM, pH 7,5) auto clavé	Tris : 2,422 g/l. EDTA : 1,86 g/l. Ajuster le pH avec HCL 1 N.
TE 10 :1 (Tris 10mM, EDTA 1mM, Ph 7,4) auto clavé	Tris : 0,606 g. EDTA : 0,1869 g pour 500 ml. Ajuster le pH avec HCL 1 N.
Tompon de lyse	NaCl : 400 mM. EDTA : 2 mM. Tris :10 mM. pH 8,2.
Protéinase K	Protéinase K :10 mg/ml H ₂ O. Conservation aliquote de 1 ml à - 20°C, tube entamé à + 4°C.
Bleu de Bromophénol (BBP)	BBP : 20mg. Tris 0,5 M :2ml. Glycerol :5 ml. Qsp 10ml H ₂ O.
TBE 10X	Tris : 108G. Acide Borique : 55g. EDTA : 9,3 g. Qsp :1L H ₂ O.

Annexe 4 : Préparation du gel d'agarose 3% pour contrôle de PCR

Composition du gel d'agarose 3%	Quantité
Agarose	3g
TBE (1X)	100ml
BET(Bromure d'éthilium)	10 μ l

Apport de la biologie moléculaire dans la classification des gliomes

Benenemissi H.I.⁽¹⁾ ; Benmohammed K.⁽²⁾ ; Satta D.⁽¹⁾

1)- Département de Biologie animale, Faculté des sciences de la vie et de la nature Université Constantine 1, Algérie.

2)- Département d'Endocrinologie, Faculté de Médecine de Constantine, Université Constantine 3, Algérie

Email : benenemissi.hanaikram@yahoo.fr

Résumé

La classification habituelle de l'OMS des gliomes datant de 2007, basée sur des éléments purement histologiques, a beaucoup de limites. Elle est peu reproductible et ne peut prédire ni le pronostic ni la réponse aux différentes thérapeutiques.

L'apport de la biologie moléculaire a complètement bouleversé la situation depuis près de 10 ans déjà. La découverte de nouvelles mutations des gènes de l'isocitrate déshydrogénase (IDH1 et 2) a permis de mettre au point de nouveaux outils diagnostiques, pronostiques et prédictifs de réponse thérapeutique. Les gliomes exprimant le phénotype de méthylation du promoteur du gène MGMT (méthyl-guanine-DNA-méthyl-transférase) sont associés à une survie plus prolongée. De même, les difficultés rencontrées lors de la classification des tumeurs issues de la lignée oligodendrogliale peuvent être surmontées par la mise en évidence de la codélétion 1p/19q. Cette dernière représenterait un marqueur de chimiosensibilité des gliomes de grade II et III ainsi qu'un marqueur pronostic indépendant des traitements dans le même type histologique. Quant aux glioblastomes, antérieurement classés en primitifs et secondaires, ils sont actuellement subdivisés, sur la base de données de nouveaux profils d'expressions géniques, en 3 sous types : proneural, mésenchymateux et forme classique. La présence de mutations dans la région promotrice de la transcriptase reverse de la télomérase (TERTp ou telomerase reverse transcriptase) est corrélée aux formes de mauvais pronostic des glioblastomes.

Mots clés : gliomes, glioblastomes, oligodendrogliomes anaplasiques.

The WHO classification of gliomas dating from 2007, based on histological elements, has many limitations. It is not reproducible and cannot predict either the prognosis or the response to the different therapies. The contribution of molecular biology has completely changed the situation for almost 10 years. The discovery of new mutations in Isocitrate dehydrogenase (IDH1 and 2) has led to the development of new diagnostic, prognostic tools and predictors factors of therapeutic response. Gliomas expressing the methylation phenotype of the methyl-guanine-DNA-methyl-transferase (MGMT) gene are associated with more prolonged survival. Similarly, the difficulties encountered in the classification of tumors from the oligodendroglial line can be overcome by the demonstration of a 1p / 19q codertion which represent a chemosensitivity marker for grade II and III gliomas as well as a prognostic marker independent of treatments in the same histological type. For glioblastomas, previously classified as primitive and secondary, they are currently subdivided according to the expression of the genes expressed in 3 subtypes : proneural, mesenchymatous and classical. The presence of mutations in the telomerase reverse transcriptase (TERTp) promotion region correlates with forms of poor glioblastoma prognosis.

Key words : gliomas - glioblastomas - oligodendroglioma

Tirés à part : Benenemissi I.H., Département de Biologie animale, Université Constantine 1, Constantine - Algérie

Introduction

Les gliomes ou tumeurs gliales, tumeurs primitives du cerveau les plus fréquentes chez l'adulte, sont de pronostic sombre. Elles représentent 2 % de la mortalité par cancer et sont la seconde cause de mortalité tumorale chez les enfants de moins de 15 ans après les leucémies. Plus de 22 400 cas de gliomes sont diagnostiqués chaque année aux états unis dont plus de 50 % sont des glioblastomes [1-5] (Figure 1).

Abstract

Contribution of molecular biology in gliomas classification

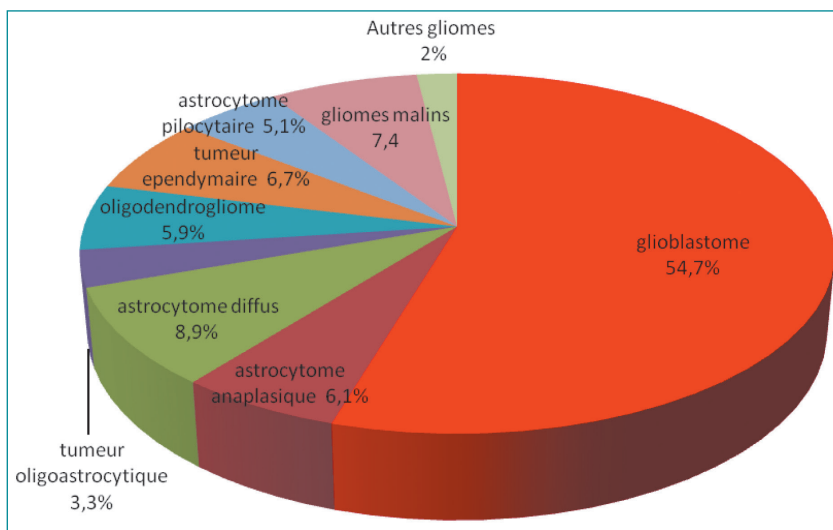


Figure 1 : Fréquence des différents types histologiques des tumeurs gliales du système nerveux central chez 95 564 patients tout âge confondus, Données issues du rapport Américain du CBTRUS 2007 - 2011 [adapté de la référence 1]

Tableau I : Classification des gliomes selon l'Organisation Mondiale de la Santé de 2007 [4].

Type histologique	Grade de malignité
• Tumeurs astrocytaires	
– Astrocytome à cellules géantes sous - épendymaire	Grade I
– Astrocytome pilocyttaire	Grade I
o Astrocytome pilocyttaire, variant pilomyxoïde	Grade II
– Astrocytome diffus	Grade II
– Astrocytome anaplasique	Grade III
– Xanthoastrocytome pleiomorphe	Grade II
– Glioblastome	Grade IV
o Glioblastome à cellules géantes	Grade IV
o Gliosarcome	Grade IV
– Gliomatose	Grade III
• Tumeurs oligodendrogiales	
– Oligodendrogliome	Grade II
– Oligodendrogliome anaplasique	Grade III
• Tumeurs oligoastrocytaires	
– Oligoastrocytome	Grade II
– Oligoastrocytome anaplasique	Grade III

Les gliomes sont développés au dépend des cellules spécialisées constituant le cerveau, en l'occurrence les cellules gliales, les astrocytes et les oligodendrocytes. Leurs particularités résident dans le fait qu'ils se développent au niveau du cerveau, organe doté d'un environnement immunologique spécifique et muni d'une barrière hémato-encéphalique le rendant peu accessible aux différents agents administrés, d'où la difficulté du traitement de ce type de tumeurs. En outre, les tumeurs gliales ont une très grande capacité à infiltrer le tissu cérébral avoisinant à des distances allant jusqu'à plusieurs centimètres de la masse principale, et d'autre part, développent des mécanismes de résistance à la radiothérapie et chimiothérapie [5].

L'organisation mondiale de la santé (OMS) a classé en 2007 les gliomes selon les phénotypes des cellules

tumorales (astrocytaires, oligodendrocytaires, ou mixtes) et le grade de malignité (du grade I au grade IV) (Tableau I). Ce dernier paramètre prend en compte la densité cellulaire, la présence de nécrose, de néovaisseaux, mitoses et atypies cellulaires. Les principaux types de gliomes individualisés sont : les astrocytomes de grade I à IV (astrocytome grade IV est aussi appelé glioblastome (GBM) et constitue la forme la plus fréquente des gliomes), les oligodendrogliomes de grade II et III et les oligoastrocytomes ou gliomes mixtes de grade II et III [4].

Cette classification est donc basée sur les critères purement histologiques, qui manquent de reproductibilité, avec une variabilité inter-observateur de 30 %, et de précision pour prédire la réponse aux différentes

thérapeutiques. De plus, les tumeurs du même grade peuvent avoir différentes évolutions cliniques [6, 7].

Les difficultés à classer certaines tumeurs en astrocytomes, oligodendrogliomes ou gliomes mixtes, le manque de reproductibilité de la classification OMS de 2007 sont le reflet de l'incertitude quant à l'histogénèse de ces tumeurs : cellules souches neurales, précurseurs gliaux ou cellules différenciées, raison pour laquelle, l'OMS a reclassé en 2016 ces tumeurs en se basant sur les anomalies rencontrées aussi bien histologiques que moléculaires (Figure 2) [8–10].

En effet, l'évolution de la recherche en cytogénétique et en biologie moléculaire a pu enrichir cette classification en essayant d'élucider les mécanismes moléculaires de la gliomagenèse permettant ainsi de prédire les réponses aux traitements, avoir un intérêt diagnostique mais également pronostique (Tableau II).

Principaux marqueurs moléculaires des gliomes

La gliomagenèse fait intervenir des altérations moléculaires du type mutation génique telles que les amplifications et les mutations ponctuelles, des réarrangements chromosomiques et des dérégulations épigénétiques de certains gènes.

Les altérations génétiques principalement rencontrées dans les gliomes activent certaines voies de transduction du signal ou entraînent une dérégulation du cycle cellulaire. Il s'agit surtout de surexpression de facteurs de croissance, de mutations « gain-de-fonction » de récepteurs à activité tyrosine kinase et de mutations « perte-de fonction » de gènes suppresseurs de tumeurs.

Par ailleurs, plusieurs types de pertes chromosomiques sont rapportés dans les gliomes, dont l'identification et

la fonction des gènes touchés ne sont pas encore tous identifiés [11].

En moyenne, le nombre de mutations somatiques détectées par séquençage complet est estimé à ~ 16 dans les astrocytomes, 36 dans les astrocytomes anaplasiques et 46 à 50 dans les GBM. Parmi ces nombreuses altérations génétiques, quelques-unes seulement, détaillées plus bas, semblent être pertinentes pour la classification des gliomes du fait de : leur fréquence, et la technique de détection plus ou moins facile. Elles permettent aussi de distinguer les différents sous-groupes des gliomes [12].

Les mutations de l'isocitrate-déshydrogénase (IDH)

L'IDH catalyse la conversion de l'isocitrate en α -céto-glutarate dans le cycle de l'acide citrique. IDH1 et IDH2 sont impliqués dans un certain nombre de processus métaboliques tels que la transduction du signal, la synthèse des lipides, le stress oxydatif et la respiration oxydative.

Les mutations des gènes de l'IDH 1 et 2 sont caractéristiques des gliomes de grade I et II. Ces mutations ponctuelles récurrentes codon spécifique sont à l'origine d'une nouvelle fonction enzymatique, induisant de fortes concentrations d'un métabolite (le 2-hydroxyglutarate), normalement absent. La mutation Arg132His de IDH1 représente plus de 90 % des mutations. D'autres mutations moins fréquentes portant sur les codons 132 et 172 du gène IDH2 sont aussi décrites [13]. L'oncométabolite produit, inhibe des enzymes impliqués dans la régulation épigénétique de certains gènes, ce qui crée un *CpG-island methylator phenotype* (CIMP). Les mutations de IDH1/2 et le CIMP qui leur est associé sont typiques des gliomes malins secondaires, en l'occurrence

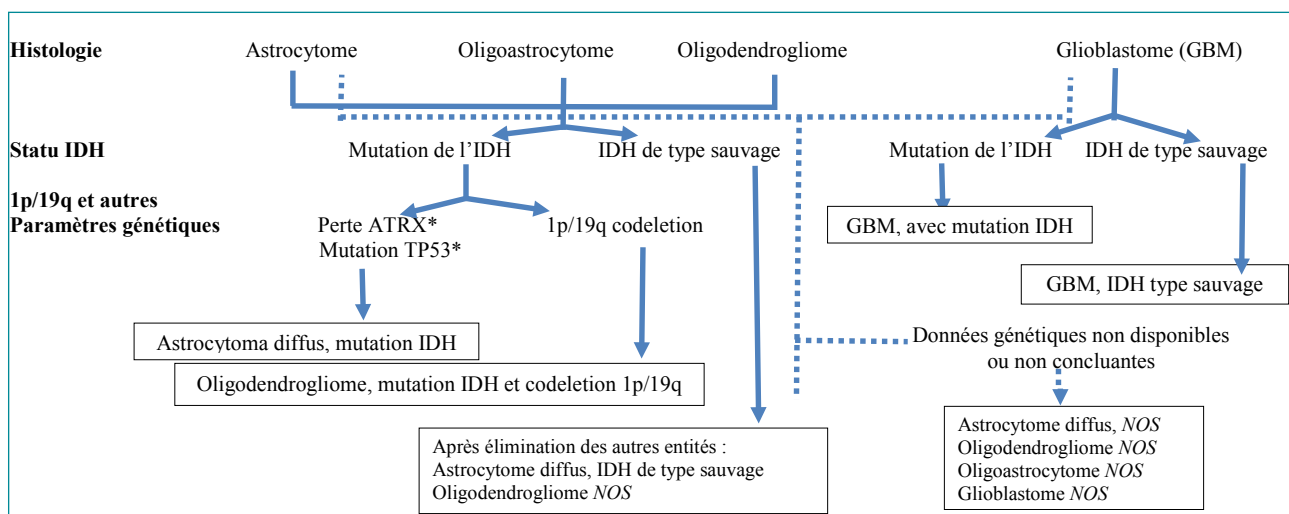


Figure 2 : Algorithme simplifié de la classification des gliomes diffus selon l'OMS 2016, basé sur les données histologiques et génétiques [10]

* Caractéristique mais non nécessaire au diagnostic, NOS : not otherwise specified (la désignation NOS implique qu'il n'y a pas suffisamment d'informations pour attribuer un code plus spécifique).

les GBM et les astrocytomes anaplasiques se développent à partir de gliomes de bas grade [11]. La découverte de telles mutations au sein d'une tumeur gliale a un intérêt pronostic majeur indépendant puisque les gliomes de haut grade présentant des mutations des gènes IDH1 ou IDH2 ont un meilleur pronostic. De plus, leur intérêt peut être aussi diagnostique. En effet, ce type de mutations est quasi absent dans les autres tumeurs solides constituant ainsi une piste diagnostique intéressante : dans le cas où les biopsies sont blanches, ne ramenant pas de tissu glial, rendant ainsi le diagnostic difficile mais également si elle n'est pas réalisable incitant à utiliser des marqueurs sanguins (ADN circulant éventuellement). En outre, la mutation du gène IDH1 R132H la plus fréquemment retrouvée (>90 %) est mise en évidence par immunohistochimie (IHC). Par ailleurs, cette voie pourrait constituer une cible thérapeutique visant la voie des glutamines et ce, en développant des inhibiteurs de la glutaminase (la dégradation de la glutamine permet de fournir, indirectement, un intermédiaire du cycle de Krebs, l' α -cétoglutarate).

Loss of Heterozygosity (LOH) 1p/19q

La codélétion du bras court du chromosome 1 (1p) et du bras long du chromosome 19 (19q) a été identifiée comme le résultat de la translocation réciproque (1 ; 19) (p10 ; q10) dont la conséquence possible est une inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs. La codélétion 1p/19q est caractéristique d'un sous-groupe d'oligodendrogliomes à évolution clinique plus lente, de meilleur pronostic et de bonne réponse à la chimiothérapie et radiothérapie. La forte corrélation entre la codélétion de 1p/19q et les mutations des gènes IDH est aussi à souligner [11].

La méthylation du promoteur MGMT

Le gène MGMT (O⁶-Méthyl-Guanine-DNA-Méthyl-Transférase), localisé en 10q26, code pour une protéine clé de la réparation de l'ADN après action des agents alkylants. Les produits de chimiothérapie alkylante, tels que les nitroso-urées ou le témozolomide, transfèrent des groupements alkyles sur différents sites de l'ADN, notamment la position O⁶ de la guanine. Ceci conduit à des erreurs d'appariement des bases lors de la réplication de l'ADN, entraînant des ruptures létales de la double hélice d'ADN. La protéine MGMT répare cependant cette alkylation O⁶. Une lésion cellulaire létale survient uniquement si l'activité de la MGMT est insuffisante ou absente.

En somme, la protéine MGMT répare les lésions causées par les agents alkylants dans les cellules tumorales, favorise la survie de ces cellules et confère à la tumeur une chimiorésistance. Une inhibition donc de MGMT, le plus souvent par une méthylation de son promoteur,

empêche la réparation de l'ADN et rend la tumeur plus chimiosensible.

Dans 40 à 45 % des GBM, le gène codant pour la MGMT est épigénétiquement modifié par une méthylation de sa région promotrice, ce qui le rend inactif [11].

Autres altérations moléculaires [14]

Les mutations du gène TP 53 (*tumor suppressor protein p53*) : le gène TP53 codant pour la protéine p53 est parmi les gènes les plus connus et incriminés dans l'oncogenèse. La grande majorité de ses mutations sont de type faux-sens conduisant à un produit mutant dysfonctionnel p53 dont la recherche en pratique reste très laborieuse. De ce fait, l'IHC utilisant la protéine anti-p53 est considérée comme un marqueur de substitution raisonnable pour la recherche de la mutation TP53. En effet, la plupart des protéines mutantes présentent une demi-vie beaucoup plus longue et montrent une immunopositivité marquée, tandis que la protéine p53 de type sauvage a une demi-vie très courte et habituellement ne présente pas de forte coloration en IHC.

Les mutations du gène TERT (*telomerase reverse transcriptase*) : Le gène TERT code pour la transcriptase reverse de la télomérase, une unité essentielle du complexe de la télomérase dont l'augmentation anormale de l'activité permet une extension indéfinie du télomère aboutissant à une l'immortalisation cellulaire.

Des mutations ponctuelles spécifiques ont été décrites dans la région promotrice du gène *TERT*. Ces mutations ont été rapportées d'abord dans le mélanome puis dans les gliomes. Les deux mutations ponctuelles les plus communes de TERT (C228T et C250T) conduisent à une transition cytosine/thymine aux positions 228 ou 250 en amont du codon d'initiation de *TERT* à l'origine d'une activité anormalement élevée de la télomérase.

Les mutations du gène ATRX (Alpha-Thalassemia/mental Retardation syndrome X-linked) : Le gène ATRX est localisé en Xq13. Il code pour la protéine ATRX, un composant central du complexe de remodelage de la chromatine qui fonctionne au niveau des télomères. Une mutation d'inactivation unique de l'allèle actif est donc suffisante pour la perte de la fonction ATRX. La perte d'ATRX conduit à la déstabilisation des télomères et à une élongation anormale des télomères et probablement à une instabilité génomique.

Les mutations du gène ATRX ont été détectées en premier lieu dans les tumeurs neuroendocrines puis dans les gliomes. Ces mutations sont soit des mutations entraînant l'apparition de protéines tronquées (3/4) soit des mutations faux-sens de la région hautement conservée de la protéine, principalement dans le

domaine de l'hélicase (1/3). Ces altérations sont fortement associées à une coloration négative en IHC.

En pratique clinique, la coloration négative en IHC pour ATRX est utilisée comme marqueur de substitution indiquant la présence de mutations ATRX (27).

LOH 10q (*Loss of heterozygosity on chromosome 10q*) : Les délétions alléliques englobant tout ou une partie du bras chromosomique 10q ont été aussi signalées comme une altération génétique fréquente dans les GBM primaires et secondaires, témoignant que la perte d'un ou plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs localisés dans cette région et jouant un rôle dans la formation de GBM.

L'un des gènes cibles de cette délétion est le gène suppresseur de tumeur PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), situé dans le locus 10q23 et codant pour une protéine phosphatase inactivant la voie de signalisation phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/ serine/thréonine kinase (Akt), jouant ainsi un rôle clé dans la régulation de la prolifération cellulaire, la croissance, l'apoptose et l'invasion tumorale. L'activation de cette voie est considérée comme essentielle pour le GBM. PTEN se présente actuellement comme un marqueur moléculaire pronostique car les patients ayant une perte de PTEN ont une survie diminuée. Il s'agit aussi d'un biomarqueur prédictif possible de la réponse du gliome à des thérapies spécifiques.

L'amplification du gène EGFR (*epidermal growth factor receptor*) : l'amplification du gène de l'EGFR en 7p12 est l'une des premières anomalies génétiques identifiées dans les GBM favorisant un signal pro-prolifératif. La surexpression de l'EGFR est retrouvée dans 33 à 100 % des GBM. La forme la plus fréquente est le variant III (EGFRvIII). L'intensité d'expression de l'EGFR en IHC a une valeur diagnostique importante pour les gliomes infiltrants, y compris de haut grade de malignité, avec une sensibilité de 95 % et une spécificité de 100 %. Quant au caractère pronostique de l'amplification de l'EGFR, il a fait l'objet de plusieurs controverses. Les premières études étaient en faveur d'un plus mauvais pronostic pour les formes surexprimées. D'autres travaux plus récents ont démontré une relation entre l'âge et le degré d'amplification de l'EGFR. Elle serait un facteur de bon pronostic pour les patients de plus de 60 ans, et de mauvais pronostic pour les sujets jeunes (Tableau II).

Corrélations entre les altérations moléculaires et les différentes classes histologiques des gliomes

Les gliomes de bas grades (grade II, OMS 2007) : les gliomes de bas grades sont classés en trois types : astrocytomes, oligoastrocytomes, oligodendrogliomes (Tableau I) [4]. Sur le plan génétique, 70–80 % des gliomes de bas grades comportent la mutation du gène IDH1, quant à la mutation de TP-53, elle est présente dans 60 % des astrocytomes et 70 % des oligodendrogliomes présentent la codélétion 1p/19q. Les anomalies les plus fréquemment rencontrées dans les oligoastrocytomes mixtes sont : la mutation de TP-53 et la codélétion 1p/19q [15, 16].

Les astrocytomes anaplasiques et oligodendrogliomes anaplasiques (OA) (grade III, OMS 2007) : Ce type de tumeur représente 6,7 % de la totalité des gliomes, la moyenne de survie des patients atteints de ce type de tumeurs, est de 5 ans dans 30 % des cas. Il est à noter que certaines de ces tumeurs progressent en glioblastomes (grade IV) [17].

En outre, les astrocytomes ont un meilleur pronostic que les OA. Sur le plan génétique, les mutations les plus fréquemment rencontrées dans les astrocytomes anaplasiques, qui proviennent de la progression des astrocytomes, sont localisées dans IDH 1/2, TP53, ATRX, EGFR et PTEN [18, 19].

Les oligodendrogliomes qui ont progressé au stade III, présentent des mutations de nature gain de fonction au niveau du chromosome 7 et des délétions au niveau du chromosome 10, avec une amplification du l'EGFR et une délétion de PTEN comme c'est le cas dans les glioblastomes [20–22].

Les glioblastomes (gliome grade IV, OMS 2007) : Les GBM, représentant 55 % de la totalité des gliomes, sont les plus agressifs. La survie des patients varie entre 12 et 15 mois malgré les thérapies disponibles. Leur incidence est de 3.19/100 000 aux USA. En IHC, les anticorps les plus utilisés sont les anti : IDH1, ATRX et P53 [15, 23].

Les GBM se divisent sur des bases génétiques en deux sous-groupes. Les GBM primaires, qui sont les plus communs sont 90 % du total des GBM. Ils sont connus comme étant des lésions de novo sans progression. Ce type est fréquent chez des patients dont l'âge dépasse 60 ans. Le deuxième type représente les GBM secondaires, intéressant des sujets plus jeunes et résultant de

Tableau II : Intérêt des Marqueurs génétiques dans la prise en charge des gliomes

Intérêt	Marqueurs génétiques
Diagnostique	IDH1, IDH2, 1p19q, TP53, +/-TERTp
Pronostique	IDH1, IDH2, 1p19q, TERTp, MGMT-m, LOH10q, EGFR, PTEN
Théranostique	IDH1, IDH2, 1p19q, TERTp, MGMT-m

la progression de gliomes de bas grade (un grade II/III selon la classification OMS) [24–26].

L'analyse génomique des GBM, a pu mettre en évidence plusieurs oncogènes et suppresseurs de tumeurs dans les deux sous types de GBM. Trois grandes voies de signalisation sont ainsi identifiées : RTK–RAS–MAPK–PI3KA ; la voie P53 et la voie RB [27–31]. Dans les GBM primaires, les mutations les plus communes sont : un gain de fonction sur le chromosome 7, une surexpression de l'EGFR, une délétion sur le chromosome 10 et des délétions dans le gène PTEN. Quant aux GBM secondaires, les mutations les plus connues sont portées par les gènes IDH, TP53 et ATRX [16, 31].

Le TCGA (Cancer Genome Atlas) a pour la première fois séquencé le génome des GBM.

Les études de caractérisation des altérations génétiques ayant porté sur l'ADN, les ARNm, les microARN et les profils épigénétiques ont permis l'identification des quatre sous types moléculaires [32, 33] : proneural, mésenchymateux, tumeurs classiques et neurales.

Les GBM proneuraux représentent 10 % du total des GBM et concernent surtout les populations jeunes. Sur le plan génétique, ces tumeurs sont caractérisées par la présence de mutations des gènes IDH, TP-53, une méthylation du promoteur MGMT contrastant avec une expression normale des gènes EGFR/PTEN [13, 28, 33, 34]. Les GBM mésenchymateux, touchant principalement les populations plus âgées, sont de très mauvais pronostic. Ils sont caractérisés sur le plan moléculaire par la présence d'anomalies dans la voie de signalisation AKT, une augmentation de l'expression des peptides angiogéniques, une surexpression de gènes régulateurs de la motilité, de la matrice extracellulaire et de l'adhésion cellulaire.

Les derniers sous type des GBM, sont les formes neuronales et classiques, représentant la majorité des glioblastomes. Ils sont associés à une perte de fonction du gène PTEN et une amplification du gène EGFR [13]. Par ailleurs, deux études récentes avaient retrouvé des mutations dans la région promotrice de TERT dans les formes avec très mauvais pronostic des GBM [35, 36].

Conclusion

Les gliomes font l'objet de recherches pointues dont l'objectif principal est d'éclaircir les mécanismes oncogéniques en jeu, et ce, afin de proposer des thérapies plus ciblées. Les défis lancés pour combattre cette maladie ne sont pas des moindres, du fait de la complexité de la pathologie et de la gravité de son pronostic. Les dernières recherches s'investissent, de ce fait, davantage dans la classification moléculaire pour l'exploiter

aussi comme outils diagnostiques, et pronostiques mais également comme moyens prédisant la réponse thérapeutique.

Références

- Ostrom Q T, Gittleman H, Liao P, *et al.* CBTRUS Statistical Report : Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2007–2011. *Neuro-Oncology* 2014 ; 16 :iv1–iv63.
- Ohgaki H, Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol* 2005 ; 109(1) :93–108.
- Wesseling P, Van den Bent M, Perry A. Oligodendroglioma : pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol* 2015 ; 129 :809–827.
- Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestel O.D., *et al.* The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathologica* 2007 ; 114 : 97–109.
- Behin, A., Hoang-Xuan, K., Carpentier, A. F., *et al.* Primary brain tumours in adults. *Lancet* 2003 ; 361(9354) : 323–31.
- Erridge SC, Hart MG, Kerr GR, *et al.* Trends in classification, referral and treatment and the effect on outcome of patients with glioma : a 20 year cohort. *J Neurooncol* 2011 ; 104 :789–800.
- Van den Bent MJ. Interobserver variation of the histopathological diagnosis in clinical trials on glioma : a clinician's perspective. *Acta Neuropathol* 2010 ; 120(3) : 297–304
- Colin C, Baeza N, Tong S, Bouvier C, Quilichini B, Durbec P, *et al.* In vitro identification and functional characterization of glial precursor cells in human gliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2006 ; 32 :189–202.
- Figarella-Branger D, Colin C, Coulibaly B, *et al.* Classification histologique et moléculaire des gliomes. *Revue neurologique* 2008 ; 164 : 505–515
- Louis DN, Perry A, Reifenberger G, *et al.* The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System : a summary. *Acta Neuropathol.* 2016 ;131(6) :803–20.
- Stupp R, Hottinger A. F, Hegi MA. E, Weller MH. Diagnostic et traitement des gliomes. *Forum Med Suisse* 2013 ; 13(22) :421–426
- Ryohei O, Takeo U, Keisuke U. Classification of adult diffuse gliomas by molecular markers—a short review with historical footnote. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 2016, 1–5
- Vignesswaran K, Neill S, Hadjipanayis CG. Beyond the World Health Organization grading of infiltrating gliomas : advances in the molecular genetics of glioma classification. *Ann Transl Med* 2015 ; 3(7) :95
- Mairéad G. McNamara, Solmaz Sahebjam, *et al.* Emerging Biomarkers in Glioblastoma. *Cancers (Basel)* 2013 ; 5(3) : 1103–1119.
- Jiao Y, Killela PJ, Reitman ZJ, *et al.* Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas. *Oncotarget* 2012 ; 3 :709–22.
- Sahm F, Reuss D, Koelsche C, *et al.* Farewell to oligoastrocytoma : in situ molecular genetics favor classification as either oligodendroglioma or astrocytoma. *Acta Neuropathol* 2014 ; 128 :551–9.
- Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, *et al.* CBTRUS statistical report : Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006–2010. *Neuro Oncol.* 2013 ; 15 Suppl 2 :ii1–56.
- Guan X, Vengoechea J, Zheng S, *et al.* Molecular subtypes of glioblastoma are relevant to lower grade glioma. *PLoS One* 2014 ; 9 :e91216.
- Neill SG, Fisher KE. Section III : Molecular diagnostics in neuro-oncology. *Curr Probl Cancer* 2014 ; 38 :175–9.
- Suzuki A, Nobusawa S, Natsume A, *et al.* Olig2 labeling index is correlated with histological and molecular classifications in low-grade diffuse gliomas. *J Neurooncol* 2014 ; 120 : 283–91.
- Boots-Sprenger SH, Sijben A, Rijntjes J, *et al.* Significance of complete 1p/19q co-deletion, IDH1 mutation and MGMT promoter methylation in gliomas : use with caution. *Mod Pathol* 2013 ; 26 :922–9.

22. Gupta K, Salunke P. Molecular markers of glioma : an update on recent progress and perspectives. J Cancer Res Clin Oncol 2012 ; 138 :1971-81.
23. Agarwal S, Sharma MC, Jha P, *et al.* Comparative study of IDH1 mutations in gliomas by immunohistochemistry and DNA sequencing. Neuro Oncol 2013 ; 15 : 718-26.
24. Huse JT, Wallace M, Aldape KD, *et al.* Where are we now ? And where are we going ? A report from the Accelerate Brain Cancer Cure (ABC2) low-grade glioma research workshop. Neuro Oncol 2014 ; 16 :173-8.
25. Le Mercier M, Hastir D, Moles Lopez X, *et al.* A simplified approach for the molecular classification of glioblastomas. PLoS One 2012 ; 7 :e45475.
26. Nicolaidis S. Personalized medicine in neurosurgery. Metabolism 2013 ; 62 Suppl 1 :S45-8.
27. Olar A, Aldape KD. Using the molecular classification of glioblastoma to inform personalized treatment. J Pathol 2014 ; 232 :165-77.
28. Theeler BJ, Yung WK, Fuller GN, *et al.* Moving toward molecular classification of diffuse gliomas in adults. Neurology 2012 ; 79 :1917-26.
29. Masui K, Cloughesy TF, Mischel PS. Review : molecular pathology in adult high-grade gliomas : from molecular diagnostics to target therapies. Neuropathol Appl Neurobiol 2012 ; 38 :271-91.
30. Aldave G, Tejada S, Pay E, *et al.* Prognostic value of residual fluorescent tissue in glioblastoma patients after gross total resection in 5-aminolevulinic Acid-guided surgery. Neurosurgery 2013 ; 72 : 915-20 ; discussion 920-1.
31. Weller M, Pfister SM, Wick W, *et al.* Molecular neurooncology in clinical practice : a new horizon. Lancet Oncol 2013 ; 14 : e370-9.
32. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, *et al.* Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. Cancer Cell 2006 ; 9 :157-73.
33. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, *et al.* Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. Cancer Cell 2010 ; 17 : 98-110.
34. Nushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, *et al.* Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. Cancer Cell 2010 ; 17 : 510-22.
35. Simon M, Hosen I, Gousias K, *et al.* TERT promoter mutations : a novel independent prognostic factor in primary glioblastomas. Neuro Oncol 2015 ;17 : 45-52.
36. Labussière M, Boisselier B, Mokhtari K, *et al.* Combined analysis of TERT, EGFR, and IDH status defines distinct prognostic glioblastoma classes. Neurology 2014 ; 83 : 1200-6.

Liste des abréviations

- ADN : Acide désoxyribonucléique
 ATRX : alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked
 CIMP : CpG-island methylator phenotype
 EGFR : epidermal growth factor receptor
 GBM : glioblastomes
 IDH : isocitrate déshydrogénase
 IHC : immunohistochimie
 LOH : loss of heterozygosity
 MGMT : méthyl-guanine-DNA-méthyl-transférase
 OA : oligodendrogliomes anaplasiques
 OMS : organisation mondiale de la santé
 PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase
 PTEN : phosphatase and tensin homolog
 TERT : telomerase reverse transcriptase
 TCGA : The cancer genome Atlas
 TP-53 : tumor suppressor protein p53

Le polymorphisme C677T de la MTHFR et le risque de gliome chez une population de l'Est Algérien

Benenemissi H.I.^(1,2) ; Sifi K.^(2,7) ; Sahli M. L.⁽³⁾ ; Boudra B.⁽⁴⁾ ; Boughrara W.⁽⁴⁾ ; Benlatreche M.⁽²⁾ ; Amran M.H.⁽⁵⁾ ; Bouzidi M.⁽⁶⁾ ; Benmbarek K.⁽⁷⁾ ; Benlatreche C.⁽⁷⁾ ; Abadi N.^(2,7) ; Satta D.^(1,2)

(1) Laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire Université Constantine 1 Algérie

(2) Laboratoire de biologie et génétique moléculaire Faculté de Médecine Université Constantine 3 Algérie

(3) Service de neurochirurgie HMRUC Constantine Algérie

(4) Service d'oncologie CHU Benbadis, laboratoire de recherche prévention des maladies chroniques Université Constantine 3, Algérie

(5) Service de neurochirurgie CHU Batna Algérie

(6) Clinique Athena, Constantine, Algérie

(7) Laboratoire Central de Biochimie CHU Benbadis, Constantine, Algérie

Résumé

Objectif : Le polymorphisme C677T de la Méthylentetrahydrofolate réductase (MTHFR) C677T a été lié à la progression de plusieurs cancers. Le but de la présente étude est d'investiguer la possibilité d'association entre l'apparition de gliome et le polymorphisme C677T de la MTHFR.

Méthode : L'expression du gène de la MTHFR a été détectée par la PCR-RFLP (Polymorphism Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism). L'étude a concerné 36 patients atteints de gliomes et 136 sujets sains.

Résultats : Chez les patients atteints de gliomes, la distribution allélique et la distribution génotypique était différente de celle des témoins : Le génotype TT était retrouvé chez 38,9 % des cas de gliomes vs 9,6 % chez les témoins (OR = 6,02, IC 95 % : 2,5 - 14,5, $p = 0,001$), le génotype CT : 25,0 % vs 43,4 % (OR = 0,44, IC 95 % : 0,19 - 0,99, $p = 0,04$), le génotype CC : 36,1 % vs 47,1 % (OR = 0,64, IC 95 % : 0,30 - 1,36, $p = 0,24$), l'allèle T : 51,7 % vs 31,3 % (OR = 2,38, IC95 % : 1,40 - 4,04, $p = 0,001$), l'allèle C : 48,3 % vs 68,8 % (OR = 0,43, IC 95 % : 0,25 - 0,73, $p = 0,001$).

Conclusion : Nos résultats démontrent que le génotype TT du polymorphisme C677T de la MTHFR est associé avec un haut risque de survenu d'un gliome chez la population de l'Est Algérien. La présence de l'allèle T peut être un facteur de risque contribuant au développement des gliomes dans notre population d'étude. D'autres études, avec un échantillon plus important, sont nécessaires pour confirmer ces résultats.

Mots clés : polymorphisme C677T de la MTHFR, Gliomes.

Abstract

The MTHFR C677T polymorphism and risk of glioma in Eastern Algerian population

Background : The Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism has been linked to the pathogenesis and progression of human cancers. We aimed to investigate a possible association between glioma and C677T MTHFR polymorphism.

Methods : The expression of MTHFR gene was detected by Polymerase Chain Reaction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) analysis in 36 Algerian patients with glioma and 136 Healthy controls.

Results : In glioma cases, allelic frequencies and genotypes distribution of the C677T MTHFR were different from controls : TT genotype : 38,9 % vs 9,6 %, (OR = 6,02, IC 95 % : 2,5 - 14,5, $p = 0,001$), CT : 25,0 % vs 43,4 % (OR = 0,44, IC 95 % : 0,19 - 0,99, $p = 0,04$), CC : 36,1 % vs 47,1 % (OR = 0,64, IC 95 % : 0,30 - 1,36, $p = 0,24$), MTHFR T allele : 51,7 % vs 31,3 % (OR = 2,38, IC95 % : 1,40 - 4,04, $p = 0,001$), C allele 48,3 % vs 68,8 % (OR = 0,43, IC 95 % : 0,25 - 0,73, $p = 0,001$).

Conclusion : Our data shows that MTHFR TT genotype was associated with higher glioma risk in Eastern Algerian population. The presence of T allele may be a risk factor for the development of glioma in our study popu-

Tirés à part : Benenemissikram H.I. Laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire Université Constantine 1, Algérie
E-mail du correspondant : benenemissi.hanaikram@yahoo.fr

lation. Additional studies with large sample are needed to confirm this finding.

Keywords : MTHFR C677T polymorphism, Glioma.

Introduction

Les gliomes sont des tumeurs primitives du cerveau de pronostic sombre. Plus de 22 400 cas de gliomes sont diagnostiqués chaque année aux états unis dont environ 50 % sont des glioblastomes. Ces derniers ont une survie relative très faible où seulement 5,5 % des patients survivent 5 ans après le diagnostic [1].

Plusieurs évidences ont démontré le rôle crucial que jouent les facteurs génétiques dans le développement des gliomes. L'évolution de la recherche en cytogénétique et en biologie moléculaire a pu élucider en grande partie, ces dernières décennies, les mécanismes moléculaires de la gliogénèse dont l'impact est multiple : diagnostique, pronostique, mais également thérapeutique, permettant de prédire les réponses aux différentes thérapies ciblées proposées.

Le métabolisme du folate joue un rôle important dans la cancérogenèse en raison de son implication dans la méthylation de l'ADN et la synthèse des nucléotides. L'enzyme méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) occupe une position charnière, en équilibrant l'homéostasie entre la synthèse d'ADN et la méthylation et ce, en catalysant la conversion irréversible du 5,10-méthylène tétrahydrofolate en 5-méthyl tétrahydrofolate. Le substrat de la MTHFR, le 5,10-méthylène tétrahydrofolate, est utilisé par la thymidylate synthase dans la méthylation du dUMP en dTMP, qui est la seule source de novo de thymidine nécessaire à la synthèse et à la réparation de l'ADN [2-6].

Le gène de la MTHFR se situe sur le chromosome 1p36.3. Il est constitué de 11 exons et 10 introns et code pour une enzyme cytosolique ubiquitaire de 76,6 kDa. Plusieurs polymorphismes de la MTHFR sont bien connus. Les plus importants sont le C1298A et le C677T. Ce dernier, modifie l'acide aminé de l'alanine en valine et rend l'enzyme MTHFR moins active. Le polymorphisme C677T de la MTHFR a été lié à la progression de plusieurs cancers, mais les résultats restent peu concluants quant à son association avec les gliomes et ce, du fait de la rareté des études [6].

L'objectif principal de la présente étude est donc d'évaluer la possibilité de l'association entre le polymorphisme C677T de la MTHFR et les gliomes chez une population de l'Est Algérien.

Matériel et Méthodes

Sujets

Il s'agit d'une étude cas-témoins. Elle a concerné 36 patients présentant un gliome, consultant entre 2016-2017 au niveau du Centre Hospitalier Universitaire d'Ibn BADIS de Constantine et 136 sujets sains appariés avec les cas de gliomes pour l'âge et le sexe. L'ensemble des témoins sélectionnés n'ont aucun antécédent personnel ou familial de cancer et n'ont aucune maladie connue pouvant être associée avec le polymorphisme du MTHFR (hypertension artérielle, maladies cardiovasculaires et maladies inflammatoires). Toutes les personnes participant à cette étude ou leurs tuteurs ont signé un consentement éclairé.

Extraction d'ADN et détermination du polymorphisme de la MTHFR :

L'ADN génomique a été extrait à partir de 10ml de sang périphérique avec la méthode du NaCl où l'ADN nucléaire est libéré dans le lysat et les protéines qui lui sont associées sont digérées et éliminées par précipitation au NaCl.

La PCR-RFLP a été effectuée afin de déterminer les polymorphismes CC, TT et CT de la MTHFR.

Les amorces utilisées pour cette étude ont été sélectionnées à partir de la banque de gènes, et les séquences sont les suivantes :

sens : Oligo F (forward primer) : 5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3'

anti-sens : Oligo R (reverse primer) : 5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3'

Le mélange réactionnel de la PCR de volume final 50 µl, contient 20 pmol de chaque amorce, 25pmol de dNTP, 1X du tampon 10X, 1,5mM de MgCl₂, et 0,5 U de taq polymérase.

L'amplification de l'ADN comprend trois étapes : dénaturation initiale pendant 5min à 94° C suivie de 30 cycles : chacun comprend : une dénaturation à 94° C pendant 30 sec, une hybridation à 65° C pendant 30 sec et une élongation à 72° C pendant 40 sec. Une étape d'élongation finale pendant 10 min à 72° C. Les produits de la PCR ont subi une digestion enzymatique avec 1U de HinfI. Les produits de la digestion donnent 3 profils ; un à 175 pb pour les hétérozygotes, 198 pb pour les homozygotes CC et hétérozygote CT contient deux bandes 198 pb et 175 pb. Les produits de la digestion sont séparés sur un gel d'agarose 3 % et visualisés sous UV.

Statistiques

L'étude statistique a été réalisée grâce au logiciel Prism version 5,5. Le test Chi-2 permet de comparer la distribution des génotypes entre les deux groupes. L'odds ratio

(OR) et l'intervalle de confiance (IC) 95 % ont été calculés en utilisant un modèle de régression linéaire. Le P value est considéré significatif s'il est inférieur à 0,05.

Le génotype CC est retrouvé dans 36,1 % des patients atteints de gliomes et 47,1 % des contrôles ($p = 0,24$, OR : 0,64, IC 95 % : 0,3 – 1,36).

Résultats

Les caractéristiques de la population étudiée sont résumées dans le tableau I. Il n'existe pas de différence entre les cas de gliomes et les témoins selon le sexe ($p = 0,55$) ou l'âge ($p = 0,42$). L'âge moyen est similaire pour les deux populations : patients et contrôles ($44,70 \pm 3,33$ ans vs $43,44 \pm 1,16$, $p = 0,42$).

Dans la population malade, la fréquence allélique et la distribution génotypique du polymorphisme C677T de la MTHFR sont différentes de celles des contrôles (Tableau II). La fréquence du génotype TT est significativement plus grande chez les patients atteints de gliome (38,9 %) que chez les individus sains (9,6 %) ($p = 0,0001$, OR : 6,02, IC 95 % : 2,5 – 14,53). De même, la fréquence de l'allèle T est plus importante chez la population malade que chez la population saine (51,7 %, vs 31,3 % ; $p = 0,001$; OR : 2,38, IC 95 % : 1,40 – 4,04),

En outre, la fréquence de l'allèle C est significativement plus importante chez la population saine que celle malade 68,8 % vs 48,3 %, $p = 0,001$, OR : 0,43, IC 95 % : 0,25 – 0,73). Quant au génotype CT, il est retrouvé dans 25,0 % des cas de la population malade vs 43,4 % chez la population saine ($p = 0,04$ OR 0,44, IC 95 % : 0,19 – 0,99)

Discussion

Malgré les progrès considérables dans la compréhension de la pathogenèse du gliome, ce dernier reste de pronostic sombre et engendre un taux élevé de mortalité [1].

En outre, la pathogenèse du gliome n'est pas encore claire et totalement élucidée. Des preuves croissantes ont montré que les facteurs génétiques jouent également un rôle important et contribuent à la variation de la susceptibilité de l'hôte aux gliomes. Plusieurs mutations génétiques sont identifiées jusqu'à ce jour.

Par ailleurs, le métabolisme du folate joue un rôle important dans la cancérogenèse du fait de son implication dans la méthylation de l'ADN et la synthèse des nucléotides.

L'enzyme MTHFR régule le métabolisme du folate, et représente un facteur important dans la méthylation et la synthèse de l'ADN. Elle assure en effet, un équilibre de l'homéostasie entre la synthèse de l'ADN et la méthylation et ce, en catalysant la conversion irréversible du 5,10-méthylène-tétrahydrofolate (THF) en 5-méthyl THF [4, 5]. A ce jour, plusieurs mutations génétiques sont identifiées, ainsi les variants hétérozygotes et homozygotes du polymorphisme C677T de la MTHFR ont une activité enzymatique

Tableau I : Caractéristiques de la population étudiée des cas de gliomes et sujets sains (moyenne \pm SD ou %)

	Patients (%)	Controls (%)	P
Âge (ans)	44,70 3,33	43,44 1,16	0,42
Genre			
Hommes	23 (63,9 %)	94 (69,12 %)	0,55
Femmes	13 (36,1 %)	42 (30,88 %)	0,55
Fumeurs (%)			
Non-fumeurs	30 (83,33 %)	130 (95,59 %)	0,01
Fumeurs actifs	5 (13,88 %)	5 (3,68 %)	0,02
Fumeurs passifs	1 (2,77 %)	1 (0,74 %)	0,31
Histoire familiale de gliomes	7 (21,21 %)	0	0,0001

Tableau II : Distribution allélique et génotypique du polymorphisme C677T de la MTHFR chez les patients atteints de gliome et les sujets sains

	Patients N (%)	Controls N (%)	OR (95 % CL)	P
Génotype				
CC	13 (36,1)	64 (47,1)	0,64 (0,3 – 1,36)	0,24
CT	9 (25,0)	59 (43,4)	0,44 (0,19 – 0,99)	0,04
TT	14 (38,9)	13 (9,6)	6,02 (2,5 – 14,53)	0,0001
Allèle				
C	35 (48,3)	187 (68,8)	0,43 (0,25 – 0,73)	0,001
T	37 (51,7)	85 (31,3)	2,38 (1,40 – 4,04)	0,001

MTHFR réduite par rapport au génotype homozygote normal de type sauvage. La réduction de l'activité de l'enzyme MTHFR peut augmenter le pool de 5,10-méthylène-THF au détriment du pool de 5-méthyl-THF et altérer la méthylation de l'ADN. Étant donné que la méthylation de l'ADN joue un rôle essentiel dans la régulation de l'expression des gènes et le maintien de la stabilité génomique, les aberrations dans les profils de méthylation normale causées par le polymorphisme MTHFR C677CT pourraient entraîner le développement du cancer [6].

Le métabolisme des folates avec le polymorphisme C677T de la MTHFR ont été incriminés et associés aussi à plusieurs autres pathologies. Dans une méta-analyse datant de 2016, concernant 618 études, incluant 137 013 participant, le polymorphisme C677T de la MTHFR a été associé à 42 pathologies dont l'autisme, la schizophrénie, les maladies cardiovasculaires, métaboliques, endocriniennes, les malformations fœtales et le cancer [7].

Les différents cancers associés à ce polymorphisme sont les cancers : du sein, des ovaires, du poumon, du foie, du pancréas, de l'estomac, de l'œsophage et de la vessie [6–11].

Quant à l'association du polymorphisme C677T de la MTHFR et les gliomes, les preuves disponibles jusqu'à l'heure actuelle sont faibles, du fait de la rareté des études et la discordance des résultats.

Nos résultats ont démontré que la fréquence du génotype TT est significativement plus élevée chez les patients atteints de gliome que chez les individus sains ($p = 0,001$). La différence entre les deux populations n'est pas significative pour les génotypes CC ($p = 0,24$) et à la limite de la signification pour le génotype CT ($p = 0,04$). La fréquence de l'allèle T a été aussi plus importante chez la population malade que chez la population saine (0,001), alors que l'allèle C est plus fréquent chez les témoins sains que chez les malades ($p = 0,001$).

Ces résultats concordent avec certaines données de la littérature et non pas avec d'autres.

Une méta-analyse incluant 10 études avec 1786 cas et 2076 contrôles n'avait pas montré d'association évidente entre le polymorphisme MTHFR C677T et le risque de gliomes dans les cinq modèles génétiques (T vs C, OR = 1.00, 95 % CI 0.90–1.12, POR = 0.959 ; TT vs CC, OR = 1.02, 95 % CI 0.82–1.27, POR = 0.870 ; CT vs CC, OR = 1.02, 95 % CI 0.89–1.18, POR = 0.733 ; TT+CT vs CC, OR = 1.02, 95 % CI 0.90–1.16, POR = 0.781 ; TT vs CT+CC, OR = 0.99, 95 % CI 0.81–1.21, POR = 0.902) [6].

Contrairement à cette étude, d'autres équipes avaient démontré la relation existante entre le polymorphisme C677T de la MTHFR et gliome. Dans une

étude multicentrique incluant les pays Nordiques (Angleterre, Suède, Finlande, Danemark), où le génotypage de 1005 cas de gliomes et 631 méningiomes a été réalisé, la présence des deux polymorphismes du MTHFR (C 677 T et A1298C) était associé au développement de gliomes ($p = 0,02$) et méningiome ($p = 0,002$) chez ces populations [12]. Cadieux et al avaient démontré en outre que chez les patients Américains présentant un glioblastome, le variant C677T, est associé avec l'hypométhylation de l'ADN. Chez ces patients, il est enregistré un taux élevé de prolifération cellulaire [13].

Par ailleurs, Linnenbank *et al.*, avaient démontré que chez la population allemande, le variant C677T représentait un facteur de risque pour la survie de patients atteints de glioblastome. En effet, les patients porteurs du génotype TT, présentent une faible espérance de vie, puisque les patients porteurs du génotype CC avaient une espérance de vie de 12 mois \pm 2, et les patients porteurs du génotype CT avaient une espérance de vie de 11 mois \pm 1 alors que l'espérance de vie des patients porteurs du génotype TT était de 10 mois \pm 4 [14].

Par ailleurs, plusieurs études avaient démontré que la distribution du polymorphisme de la MTHFR diffère selon l'origine ethnique et selon un gradient géographique. Chez la population indienne et pakistanaise, européenne et nord américaine et chez la population asiatique de l'est, la distribution de l'allèle T suit un gradient géographique. Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer ce gradient et l'origine de cette distribution : l'histoire génétique, la sélection environnementale, spécialement les radiations aux Ultraviolets ainsi que le régime alimentaire et la supplémentation en folate [15–20].

En outre, nous avons aussi retrouvé une fréquence moins élevée de l'allèle T chez la population saine (31,3 %) comparativement à celle de la population malade (51,7 %) ($p = 0,001$) ce qui pourrait témoigner que l'allèle T est l'allèle mineur chez la population Algérienne saine et de ce fait, aurait probablement un effet protecteur.

Ces résultats concordent avec une étude réalisée en 2015 portant sur des patients atteints de leucémie-myéloïde chronique au niveau de la région Ouest de l'Algérie, où l'allèle T était l'allèle mineur [21]. Ce même résultat était aussi observé dans une étude marocaine [22].

Conclusion

Le génotype TT du polymorphisme C677T de la MTHFR est associé à un risque élevé de genèse d'un gliome chez la population étudiée de l'Est algérien. La présence de l'allèle T pourrait être un facteur de risque

contribuant au développement des gliomes chez cette population. Ces résultats méritent une confirmation par la réalisation d'autres études approfondies regroupant un échantillon plus important de patients atteints de gliomes.

Remerciements : M^{me} Yasmina Dadsi, M^{me} Messaouda Bouchereb, les médecins traitants et les patients pour leurs participations à cette étude.

Financement : Laboratoire de recherche en Biologie et génétique moléculaire, Université Constantine 3.

Conflit d'intérêt : Aucun

Références

- Ostrom QT, Gittleman H, Xu J, Kromer C, Wolinsky Y, Kruchko C, et al. CBTRUS Statistical Report : Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2009–2013. *Neuro-oncology*. 2016 ; 18(suppl_5) : v1–v75.
- Eichholzer M, Tonz O, Zimmermann R. Folic acid : a public-health challenge. *Lancet*. 2006 ; 367 : 1352–61.
- Holmes MV, Newcombe P, Hubacek JA, Sofat R, Ricketts SL, Cooper J, et al. Effect modification by population dietary folate on the association between MTHFR genotype, homocysteine, and stroke risk : a meta-analysis of genetic studies and randomised trials. *Lancet*. 2011 ; 378 : 584–94.
- Antoniades C, Shirodaria C, Leeson P, Baarholm OA, Van-Assche T, Cunnington C, et al. MTHFR 677 C>T polymorphism reveals functional importance for 5-methyltetrahydrofolate, not homocysteine, in regulation of vascular redox state and endothelial function in human atherosclerosis. *Circulation*. 2009 ; 119 : 2507–15.
- Fodinger M, Horl WH, Sunder-Plassmann G. Molecular biology of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase. *J Nephrol*. 2000 ; 13 : 20–33.
- Lu Q, Dai D, Zhao W, Wang L et al. Association between MTHFR 677C>T polymorphism and risk of gliomas : evidence from a meta-analysis. *Tumor Biology*, 2013, 34 (5) : 2801–2807
- Yanga B, Fan S, Zhi X, Xiac R et al. Geographical and ethnic distribution of MTHFR gene polymorphisms and their associations with diseases among Chinese population. *Clin Genet* 2017 ; 92 : 243–258
- Zhang J, Qiu LX, Wang ZH, Wu XH, Liu XJ, Wang BY, et al. MTHFR C677T polymorphism associated with breast cancer susceptibility : a meta-analysis involving 15,260 cases and 20,411 controls. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 ; 123 : 549–55.
- Jin F, Qu LS, Shen XZ. Association between the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and hepatocellular carcinoma risk : a meta-analysis. *Diagn Pathol*. 2009 ; 4 : 39.
- Gonzales MC, Yu P, Shiao SP MTHFR Gene Polymorphism–Mutations and Air Pollution as Risk Factors for Breast Cancer : A Meta-prediction Study. *NursRes*. 2017 ; 66(2) : 152–163.
- Xia L, Liu Y, Xu X–Z, Peng–Cheng Jiang, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and gastric cancer susceptibility. *World J Gastroenterol* 2014 August 28 ; 20(32) : 11429–11438
- Bethke L, Webb E, Murray A, Schoemaker M, Feychting M et al. Functional Polymorphisms in Folate Metabolism Genes Influence the Risk of Meningioma and Glioma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008 ; 17(5) : 1195–1202
- Cadioux B, Ching TT, Vandenberg SR, Costello JF. Genome-wide hypomethylation in human glioblastomas associated with specific copy number alteration, methylenetetrahydrofolate reductase allele status, and increased proliferation. *Cancer Res*. 2006 ; 66 : 8469–8476.
- Linnebank M, Semmler A, Moskau S, Smulders Y, Blom H, Simon M. the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) variant c.677C.T (A222V) in uences overall survival of patients with glioblastoma multiforme. *Neuro Oncol*. 2008 Aug ; 10(4) : 548–552.
- Wilcken B, Bamforth F, Li Z et al. Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) : findings from over 7000 newborns from 16 areas worldwide. *J Med Genet* 2003 ; 40 : 619–625.
- Pepe G, Camacho VO, Giusti B, et al. Heterogeneity in world distribution of the thermolabile C677T mutation in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet* 1998 ; 63 : 917–920.
- Saraswathy KN, Asghar M, Samtani R et al. Spectrum of MTHFR gene SNPs C677T and A1298C : a study among 23 population groups of India. *Mol Biol Rep* 2012 ; 39 : 5025–5031.
- Wang YF, Pei LJ, Wang JF, Zheng XY. Is the prevalence of MTHFR C677T polymorphism associated with ultraviolet radiation in Eurasia ? *J Hum Genet* 2014 ; 57 : 780–786.
- Mansoor A, Mazhar K, Ali L et al. Prevalence of the C677T single-nucleotide polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene among Pakistani ethnic groups. *Genet Test Mol Biomarkers* 2009 ; 13 : 521–526.
- Wang YF, Pei LJ, Wang JF, Zheng XY. Is the prevalence of MTHFR C677T polymorphism associated with ultraviolet radiation in Eurasia ? *J Hum Genet* 2014 ; 57 : 780–786.
- Dorgham S, Aberkane M, Boughrara W et al. Association des polymorphismes du gèneméthylène-tetrahydrofolate reductase avec la leucémie myeloïde chronique. *Bulletin du cancer* 2014 ; 101 : 2014.
- Paluku They–They T, Hamzi K, Mazabraud A. et al. Fréquence du polymorphisme 677C>T du gène de la méthylène tetrahydrofolate réductase (MTHFR) dans les populations arabe et berbère du Maroc. *Antropo* 2009 ; 20 : 7.

Research

Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion gene polymorphisms and the risk of glioma in an Algerian population



Ikram Hana Benenemissi^{1,&}, Karima Sifi², Lakhder Khalil Sahli³, Ouarda Semmam¹, Noureddine Abadi², Dalila Satta¹

¹Department of Animal Biology, Faculty of Life and Natural Sciences, Molecular and Cellular Biology Laboratory, University of Constantine 1, Constantine, Algeria, ²Department of Biochemistry, Ben Badis University Hospital, Biology and Genetics Research Laboratory, Faculty of Medicine, University of Constantine 3, Constantine, Algeria, ³Department of Neurosurgery, Regional Military Hospital of Constantine (HMRUC), Constantine, Algeria

[&]Corresponding author: Ikram Hana Benenemissi, Department of Animal Biology, Faculty of Life and Natural Sciences, University of Constantine 1, Constantine, Algeria

Key words: Angiotensin-converting enzyme, gene polymorphism, insertion/deletion, Glioma

Received: 11/02/2018 - Accepted: 12/04/2019 - Published: 23/04/2019

Abstract

Introduction: just recently, it has been established that the angiotensin-converting enzyme (ACE) insertion/deletion (I/D) polymorphism is linked to the pathogenesis and to the evolution of human cancers. Therefore, the present study was concerned with the investigation of an eventual association between glioma and I/D polymorphism of the ACE gene. **Methods:** the expression of ACE gene was detected by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis in 36 Algerian patients with glioma and 195 healthy controls. **Results:** in glioma cases, allelic frequencies and genotypes distribution of the ACE I/D polymorphism were different from controls cases. ACE DD genotype were highly presented in glioma cases (63.9%) than controls (33.8%) and conferred 3.64-fold risk for predisposition in glioma cases (vs ID genotype, $p < 0.001$). Recessive model (ACE II + ID genotypes vs DD) was associated with a 72% reduced risk of glioma (OR = 0.28, 95% CI: 0.13-0.60, $p < 0.001$). Per copy D allele frequency was found higher in glioma cases (79.2%) than in controls (63.3 %), OR = 2.20, 95% CI: 1.20 - 4.03, $p = 0.009$. **Conclusion:** the obtained data showed that the presence of the D allele might be a risk factor for the development of glioma. Further studies considering different ethnic groups with large samples are required to confirm this finding.

The Pan African Medical Journal. 2019;32:197. doi:10.11604/pamj.2019.32.197.15129

This article is available online at: <http://www.panafrican-med-journal.com/content/article/32/197/full/>

© Ikram Hana Benenemissi et al. The Pan African Medical Journal - ISSN 1937-8688. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Introduction

Gliomas are the most common primary intraparenchymal tumors of the central nervous system (CNS) with a very poor prognosis. They represent approximately 26% of all primary brain and other CNS tumors and 81% of the malignant tumors. Glioblastoma accounts for the majority of gliomas (56.6%). Relative survival estimates for glioblastoma are quite low with only 5.6% of patients who survived five years post diagnosis [1]. Historically gliomas have been classified according to the World Health Organization (WHO) criteria that are determined by histopathological examinations such as nuclear atypia, cellular pleomorphism, mitotic activity, vascular thrombosis, microvascular proliferation and necrosis [2]. Recently, in May 2016, a WHO reclassification of CNS tumors was established where the main change was the use of molecular parameters for diagnosis. Major restructuring of diffuse gliomas with incorporation of genetically defined entities was proposed [3]. This new classification is appropriate and makes a significant advance, because therapeutic targets are greatly dependent on the molecular mechanisms of gliomas, and tumors diagnosed in the same group have different gene expression profiles identified by large-scale genomic DNA analyses, including gene expression profiling, genome-wide association studies and single-nucleotide polymorphism analysis [4]. Furthermore, several environmental factors such as therapeutic ionising radiation, electrical or electronics jobs, long-term use of wireless phones, etc. have been correlated with an increased risk of developing gliomas. Genetic factors, using three signaling pathways: p53, retinoblastoma (RB), and receptor tyrosine kinase (RTK) play crucial roles in glioma development, particularly mutations in isocitrate dehydrogenase 1 and 2, 1p and 19q co-deletion [5-7]. The identification of genetic, epigenetic and transcriptional abnormalities in the various types of gliomas helps understanding the pathogenesis, predicts prognosis and response to therapy and may serve as diagnostic markers. Angiotensin-converting enzyme (ACE) is a zinc metallopeptidase that converts the inactive decapeptide angiotensin I to the vasoactive angiotensin II while inactivating an angiogenic agent, namely the vasodilator peptide bradykinin.

ACE is a member of the renin-angiotensin system (RAS) expressed in many tissues. Several findings have shown that the ACE inhibitors may possibly reduce the incidence of cancer and may protect against it [8, 9]. Their effect on tumor cells can be attributed to their reducing cell proliferation and migration, inflammation and angiogenesis [8, 9]. Other research works reported an inhibition of the cellular matrix

metalloprotease activity and a reduced expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) by ACE inhibitors [9, 10]. The ACE gene is located on the band 17q23 of the 17th chromosome in humans. It is characterized by a major polymorphism exhibiting presence (I allele, insertion) or absence (D allele, deletion) of a 287-base pair Alu repeat sequence in intron 16 of this gene [9-11]. The ACE I/D polymorphism is correlated to the ACE plasma concentrations. In patients with DD genotype, ACE's plasma and tissue levels are about twofold higher compared to those with II genotype, whereas the ID genotype indicates an intermediate level [9-12]. Recently, the ACE I/D polymorphism was linked to the pathogenesis and progression of several cancers such as lung, digestive, breast, laryngeal, prostate cancers and last in glioma [9, 13, 14]. However, the results were not often reproducible, due to a genetic heterogeneity factor between different populations. In a Dutch population based prospective cohort study that included 6670 participants with ACE genotype, 730 incident cancer cases occurred during a mean follow-up time of nearly ten years [15]. Carriers of the high-activity genotype DD, with higher levels of ACE, had an increased risk of breast cancer compared with low-activity II/ID genotype carriers (hazard ratio (HR) = 1.47; 95% CI: 1.05-2.04), but no association was demonstrated for other cancers (prostate, lung and colorectal cancer). DD carriers who were exposed to long-term and high-dose of RAS inhibitors were at lower risk for cancer (HR = 0.28; 95% CI: 0.10-0.79). Short-term, high-dose users were at risk for colorectal cancer progression in the II/ID stratum (HR = 3.83; 95% CI: 1.67-8.79). In a meta-analysis including 6 studies, carriers of the ACE II genotype appeared to be protected from gastric cancer (OR 0.54-0.63, p = 0.01-0.02), regardless of ethnicity or gastric tumor type [16]. In a German study 88 samples from patients with early gastric cancer, which were obtained during gastric surgery, were compared with 145 blood samples from healthy controls [17]. The DD genotype was found significantly more often in the cancer group than in the healthy participants. The II genotype was associated with a significantly lower risk of gastric cancer than the DD genotype (OR=0.20, 95% CI: 0.08-0.54). Therefore, the aim of the present study was to evaluate the potential association between ACE I/D polymorphism and glioma in Algerian population and consequently on its potential role for developing therapeutic drug targets for this cancer.

Methods

Subjects: the study was carried out in Constantine Ben Badis Hospital, involving 36 patients who were diagnosed as having glioma during 2016-2017 as well as 195 healthy controls which were matched with the glioma cases for age and sex. The controls were selected randomly from healthy individuals without any cancer history and any diseases that might have an association with the ACE I/D polymorphism, such as hypertension, coronary artery disease, diabetes mellitus and inflammatory diseases.

DNA extraction and determination of the ACE I/D polymorphism: a volume of 10 ml of peripheral venous blood was extracted from all subjects and the collected samples were put into BD Vacutainer spray-coated K2 EDTA. Standard methods were followed for extraction of genomic DNA from leukocytes [18]. A polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) assay was applied to assess the ACE I/D genotypes which was classified as II, ID and DD. Based on the GenBank reference sequence, the PCR primers were as follows: forward-5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTCT-3' and reverse-5'-GATGTGGCCATCACATTCGTGAT-3'. PCR reactions were performed in 50 μ l reaction volumes with 80 pmol of each primer, 25 pmol of dNTP (Biomatigue), 1X of 10X buffer (Biomatigue), 1.5 mmol of MgCl₂ (Biomatigue), 0.5 U of DNA taq polymerase (Biomatigue). DNA amplification was performed as follows: initial denaturation step for 1min at 94°C, followed by 30 cycles of denaturation; each step contained denaturation step at 95°C for 30 seconds, annealing step at 65.8°C for 30 sec and final extension at 72°C for 1 min. Finally, DNA underwent a final extension step at 72°C for 1 min. The PCR products had two weights of 490 and 190 bp for insertion and deletion, respectively. The products were first visualized by electrophoresis in a 2% agarose gel with ethidium bromide and finally in UV.

Statistics: descriptive statistics were performed in terms of means and percentages. The bivariate analysis used contingency tables and chi-square test to compare the genotype distribution between the two groups and crude odds ratio were calculated within a 95% confidence interval while p-value was calculated by Fisher's exact test. P values were considered statistically significant if they were below 0.05. Statistical analysis was performed using PRISM software, version 5.5.

Ethical considerations: the study was approved by an official review board and a declared consent was signed by patients themselves, their parents or legal tutors before blood sampling.

Results

Characteristics of the considered population are shown in Table 1. Glioma cases and controls did not differ regarding gender ($p = 0.37$) or age ($p = 0.83$). Mean age was similar among patients and controls with 44.70 ± 3.33 and 42.61 ± 5.36 years, respectively. In glioma cases, allelic frequencies and genotype distribution of the ACE I/D polymorphism were different from controls cases as shown in Table 2. The frequency of the ACE DD genotype was higher in glioma patients than in controls with 63.9% and 33.8%, respectively and conferred 3.64-fold risk for predisposition in glioma cases (vs ID genotype, $p < 0.001$). ID genotype was found with 30.6% and 59.0% in gliomas and in controls, respectively, II genotype with 5.6% and 7.2%, in gliomas and in controls, respectively. Recessive model (ACE II + ID genotypes vs DD) was associated with a 72% reduced risk of glioma (OR = 0.28, 95% CI: 0.13-0.60, $p < 0.001$) (Table 2). Likewise, the frequency of the allele D was higher in glioma cases than in controls with 79.2% and 63.3%, respectively, OR = 2.20, 95% CI: 1.20 - 4.03, $p = 0.009$. The frequency of ACE I allele was 20.8% and 36.7 % in patients and in healthy controls, respectively.

Discussion

As mentioned above glioma is the most common malignant tumor in the central nervous system which may be caused by many environmental, genetic or other factors. Multiple genetic and cytogenetic alterations have been identified in gliomas with a regularly increasing number. Several major molecular alterations have been found, such as IDH1/IDH2 (Isocitrate dehydrogenase) mutations in diffusely infiltrating gliomas, mutations of TP53 (tumor suppressor protein 53) and ATRX (Alpha-thalassemia/mental retardation syndrome X-linked) in astrocytomas, 1p/19q co-deletion in oligodendrogliomas, mutations of TERT (telomerase reverse transcriptase) promoter in oligodendrogliomas and IDH wild-type glioblastomas, and mutations or fusions of BRAF in circumscribed astrocytomas [19]. Identification of those and several other genetic abnormalities is very important and may help to determine

appropriate treatment and to predict prognosis. Otherwise, recently, many mechanisms to explain tumorigenesis known as the "hallmarks" of cancer have been proposed [20] and they are connected to many biochemical pathways including the RAS whose role in CNS tumors has led to an increasing interest among researchers. Classically, the RAS has been studied as a fundamental component of cardiovascular homeostasis, playing a critical role in cardiovascular system, balance of water and electrolytes and cell growth [8, 21, 22]. However, RAS also is expressed in several tissues and organs (liver, kidneys, pancreas, reproductive organs, and brain). Some of these local effects are related to carcinogenesis and gliomagenesis [8]. The perturbation of RAS components plays a significant role in the proliferation, angiogenesis, and invasion of these tumors. Angiotensin II can stimulate tumor neovascularization [23], and over expressions of ACE and angiotensin II type 1 receptor have been associated with tumor growth, metastasis, and progression [24-26]. The ACE gene I/D polymorphism has been linked to many cancers with a very few researches on glioma. The present study was interested in potential association between ACE I/D polymorphism and glioma in Algerian population. The main result indicated a strong association between this polymorphism and the risk of glioma. A recessive model was associated with a 72% reduced risk of glioma ($p < 0.001$). Likewise, the DD genotype predisposed risk of glioma by more than 3-fold i.e. 63.9 and 33.8% in glioma cases and controls, respectively ($p < 0.001$), indicating the potential of ACE I/D polymorphism as a predictive marker in glioma. We also found that the risk conferred by a per copy allele D is 2.2-fold for glioma cases. Frequency of D allele was higher in glioma cases than in controls (79.2% and 63.3%, respectively, $p = 0.009$). Those results are supported partly by the first report describing the potential association between ACE I/D polymorphism and glioma in Chinese population. In this study, glioma cases had a significantly higher frequency of DD genotype (OR = 1.61, 95% CI = 1.12, 2.32; $p = 0.01$) than controls [13]. But the frequency of D allele was similar in glioma cases and in controls (30.9% vs 28.3%, $p = 0.1$)

In another recent study in Indian population: ACE DD genotypes were highly presented in glioma cases compared to controls with 26.8% and 10.6%, respectively ($p < 0.0001$) and conferred 5-fold risk for predisposition in glioma cases. Per copy D allele frequency was found higher in glioma cases than in controls (54% and 25%, respectively, $p < 0.0001$) [14]. No similar studies were found in North Africa. For instance, a Moroccan study summarized 3 research works with 65, 62 and 34 patients, on the frequency of altered genes in patients with glioblastoma, where only alteration of IDH1/2, p53 and EGFR

expression were analysed [27]. The frequency of these gene mutation in Moroccan population was similar to those reported from other populations. In Tunisian population with glioma, genetic analysis in 110 cases of glioma assessed 10q LOH including PTEN as the most frequent chromosome alteration [28]. Moreover, the impact of studies on ACE I/D polymorphism in glioma was also therapeutic. The results in the Rotterdam study concerning a prospective cohort with 7983 participants, showed that RAS inhibitors seemed to protect against cancer in patients with the ACE DD genotype [15]. Indeed, ACE's plasma and tissue levels were higher in subjects with DD genotype, compared to those with II or ID genotypes and its activity can be blocked by ACE inhibitors [9, 12]. Their effect on tumor cells could be attributed to their reducing cell proliferation and migration, inflammation and angiogenesis, inhibition of the cellular matrix metalloprotease activity and a reduced expression of VEGF (8-10). Finally, it should be recognized that the current study was the first one in the middle east and north Africa (MENA) region, that had investigated the association between ACE I/D polymorphism and glioma, bearing in mind the potential application of the RAS components as biomarkers or treatment targets in glioma. However, it should be precised that only the Eastern population of Algeria was concerned by the present study which then cannot be considered as fully representative of the entire country population. Although the size of the population was small due to the fact that this pathology is relatively rare in Algeria, with about 1 percent only of all cancers (unpublished data from the Constantine University Hospital), the number of cases was consistent for a statistical analysis to obtain useful results and to define the orientation to be given to further studies. Nevertheless, a study with a large sample and a follow-up study to analyze glioma overall survival by ACE I/D genotype are necessary.

Conclusion

The obtained data suggest that the ACE I/D polymorphism could be a risk factor for glioma. However, this has to be confirmed with additional studies considering large samples of different ethnical groups.

What is known about this topic

- The ACE gene I/D polymorphism has been linked to many cancers;

- Recently, only 2 reports had shown the relationship between this polymorphism and glioma.

What this study adds

- The ACE I/D polymorphism could be a risk factor for glioma or predictive marker;
- Renin-angiotensin system blockade may be used in a future as treatment or preventing glioma.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Authors' contributions

Ikram Hana Benenemissi, Karima Sifi, Lakhder Khalil Sahli, Nouredine Abadi, Ouarda Semmam, and Dalila Satta participated to data analysis and interpretation, revising the paper and approving the final version to be published.

Acknowledgments

Ms Yasmina Dadssi, Ms Messaouda Bouchereb for blood test analysis, Dr Imene Deneche for her assistance in the statistical analysis, Pr Meniai Abdeslam for language assistance in addition to all the participating doctors: Dr Boudraa Bouchra, Dr Boughrara Walid, Dr Amrane MH, Dr Bouzid Mehdi, the patients and their parents for accepting to participate to this study. Funding: Ikram Hana Benenemissi's work has been funded by Biology and genetics research laboratory, University of Constantine 3, Algeria.

Tables

Table 1: characteristics of Algerian population with glioma and healthy controls

Table 2: ORs and 95% CIs of the association between ACE I/D polymorphism and glioma risk

References

1. Ostrom QT, Gittleman H, Truitt G, Boscia A, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2011-2015. *Neuro Oncol.* 2018; 20(suppl_4): iv1-iv86. **PubMed | Google Scholar**
2. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A *et al.* The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta neuropathol.* 2007; 114(2): 97-109. **PubMed | Google Scholar**
3. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK *et al.* The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta neuropathol.* 2016; 131(6): 803-20. **PubMed | Google Scholar**
4. Masui K, Onizuka H, Cavenee WK, Mischel PS, Shibata N. Metabolic reprogramming in the pathogenesis of glioma: Update. *Neuropathology.* 2019; 39(1): 3-13. **PubMed | Google Scholar**
5. Bready D, Placantonakis DG. Molecular pathogenesis of low-grade Glioma. *Neurosurg Clin N Am.* 2019; 30(1): 17-25. **PubMed | Google Scholar**
6. Darlix A, Gozé C, Rigau V, Bauchet L, Taillandier L, Duffau H. The etiopathogenesis of diffuse low-grade gliomas. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2017; 109: 51-62. **PubMed | Google Scholar**
7. Reni M, Mazza E, Zanon S, Gatta G, Vecht CJ. Central nervous system gliomas. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2017; 113: 213-34. **PubMed | Google Scholar**
8. Perdomo-Pantoja A, Mejia-Perez SI, Gomez-Flores-Ramos L, Lara-Velazquez M, Orillac C, Gomez-Amador JL *et al.* Renin angiotensin system and its role in biomarkers and treatment in gliomas. *J Neurooncol.* 2018; 138(1): 1-15. **PubMed | Google Scholar**

9. Ruiter R, Visser LE, Van Duijn CM, Stricker BH. The ACE insertion/deletion polymorphism and risk of cancer, a review and meta-analysis of the literature. *Curr Cancer Drug Targets*. 2011; 11(4): 421-30. **PubMed | Google Scholar**
10. Lindberg H, Nielsen D, Jensen BV, Eriksen J, Skovsgaard T. Angiotensin converting enzyme inhibitors for cancer treatment. *Acta oncol*. 2004; 43(2): 142-52. **PubMed | Google Scholar**
11. Hubert C, Houot A-M, Corvol P, Soubrier F. Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene: two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. *J Biol Chem*. 1991; 266(23): 15377-83. **PubMed | Google Scholar**
12. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest*. 1990; 86(4): 1343-6. **PubMed | Google Scholar**
13. Lian M, Jiang H, Wang H, Guo S. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion gene polymorphisms is associated with risk of glioma in a Chinese population. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2015; 16(2): 443-7. **PubMed | Google Scholar**
14. Pandith AA, Qasim I, Zahoor W, Shah P, Bhat AR. ACE I/D sequence variants but not MTHFR C677T, is strongly linked to malignant glioma risk and its variant DD genotype may act as a promising predictive biomarker for overall survival of glioma patients. *Gene*. 2018; 639: 62-8. **PubMed | Google Scholar**
15. van der Knaap R, Siemes C, Coebergh JWW, van Duijn CM, Hofman A, Stricker BHC. Renin-angiotensin system inhibitors, angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism, and cancer: the Rotterdam Study. *Cancer*. 2008; 112(4): 748-57. **PubMed | Google Scholar**
16. Pabalan N, Jarjanazi H, Ozcelik H. Associations of the Insertion/Deletion Polymorphism in the ACE Gene and Risk of Gastric Cancer: a meta-analysis. *J Gastrointest Cancer*. 2015; 46(4): 370-9. **Google Scholar**
17. Ebert MP, Lendeckel U, Westphal S, Dierkes J, Glas J, Folwaczny C *et al*. The angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism is linked to early gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005; 14(12): 2987-9. **PubMed | Google Scholar**
18. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988; 16(3): 1215. **PubMed | Google Scholar**
19. Komori T, Muragaki Y, Chernov MF. Pathology and Genetics of Gliomas. *Prog Neurol Surg*. 2018; 31: 1-37. **PubMed | Google Scholar**
20. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144(5): 646-74. **PubMed | Google Scholar**
21. Herichova I, Szantoova K. Renin-angiotensin system: upgrade of recent knowledge and perspectives. *Endoc Regul*. 2013; 47(1): 39-52. **PubMed | Google Scholar**
22. Carey RM. The intrarenal renin-angiotensin and dopaminergic systems: control of renal sodium excretion and blood pressure. *Hypertension*. 2013; 61(3): 673-80. **PubMed | Google Scholar**
23. Egami K, Murohara T, Shimada T, Sasaki K, Shintani S, Sugaya T *et al*. Role of host angiotensin II type 1 receptor in tumor angiogenesis and growth. *J Clin Invest*. 2003; 112(1): 67-75. **PubMed | Google Scholar**
24. Arrieta O, Pineda-Olvera B, Guevara-Salazar P, Hernández-Pedro N, Morales-Espinosa D, Cerón-Lizarraga TL *et al*. Expression of AT1 and AT2 angiotensin receptors in astrocytomas is associated with poor prognosis. *Br J Cancer*. 2008; 99(1): 160-6. **PubMed | Google Scholar**
25. Arrieta O, Villarreal-Garza C, Vizcaino G, Pineda B, Hernandez-Pedro N, Guevara-Salazar P *et al*. Association between AT1 and AT2 angiotensin II receptor expression with cell proliferation and angiogenesis in operable breast cancer. *Tumour biol*. 2015; 36(7): 5627-34. **PubMed | Google Scholar**

26. Rocken C, Rohl FW, Diebler E, Lendeckel U, Pross M, Carl-McGrath S *et al.* The angiotensin II/angiotensin II receptor system correlates with nodal spread in intestinal type gastric cancer. *Cancer Epidemiol biomarkers Prev.* 2007; 16(6): 1206-12. **PubMed | Google Scholar**
27. Idrissi HHE, Boujmia OKA, Nadifi S, Dehbi H. Genetics of Glioblastoma in Moroccan population: Review of literature. *IBRO Rep.* 2018; 5: 133-6. **PubMed | Google Scholar**
28. Trabelsi S, Chabchoub I, Ksira I, Karmeni N, Mama N, Kanoun S *et al.* Molecular diagnostic and prognostic subtyping of gliomas in tunisian population. *Mol Neurobiol.* 2017; 54(4): 2381-94. **PubMed | Google Scholar**

Table 1: characteristics (mean ± SD or %) of Algerian population with glioma and healthy controls

	Cases n (%)	Controls n (%)	p
Total	36 (100)	195 (100)	
Age (years)	44.70 ± 3.33	42.61 ± 5.36	0,83
Gender			
Males	23 (63.9)	109 (55.9)	0.37
Females	13 (36.1)	86 (44.1)	
Smoking status			
Non-smoking	30 (83.3)	189	0.007
Active smoking	5 (13.9)	5	0.002
Passive smoking	1 (2.8)	1	0.18
Family history of glioma	7 (19.4)	0 (0)	< 0.001

Table 2: ORs and 95% CIs of the association between ACE I/D polymorphism and glioma risk

Model	Cases (n)	Controls (n)	OR	p
Homozygous co-dominant: DD vs II				
DD	23	66	2.43 (0.51-11.55)	0.24
II	2	14		
Heterozygous co-dominant: ID vs II				
ID	11	115	0.66 (0.13 -3.33)	0.62
II	2	14		
Heterozygous co-dominant: DD vs ID				
DD	23	66	3.64 (1.67-7.94)	<0.001
ID	11	115		
Dominant model: (DD + ID) vs II				
DD + ID	34	181	1.31 (0.28-6.04)	0.7
II	2	14		
Recessive model: (II + ID) vs DD				
II + ID	13	129	0.28 (0.13-0.60)	<0.001
DD	23	66		
Allele model				
D	57	247	2.20 (1.20-4.02)	0.009
I	15	143		

GLOSSAIRE DES TERMES STATISTIQUES

Taux d'incidence

Rapport entre le nombre de nouveaux cas survenus dans une population dans une période définie et le nombre total de personnes-temps. Il est souvent calculé en divisant le nombre de cas survenant dans l'année par le nombre de personnes dans la population au milieu de l'année.

Le taux d'incidence peut être total (taux brut) ou estimé dans des sous-groupes d'une population (taux spécifiques) par exemple par classes d'âge ou par catégorie socioprofessionnelle. Ces taux spécifiques permettent de mettre en évidence des facteurs liés à la survenue du cancer. Il est habituel par exemple de trouver une augmentation des taux d'incidence spécifiques avec l'âge pour la plupart des cancers.

Pour comparer l'incidence dans différentes populations ; on ne peut pas utiliser le taux brut car il ne tient pas compte des différences de structures d'âge dans ces populations. Pour éliminer cet effet de l'âge ; on utilise les taux standardisés.

Standardisation

Il existe deux méthodes de standardisation : Directe ou méthode de la population type (calcul de taux comparatif) et Indirecte (calcul de rapport entre nombre observé et nombre attendu dans la population étudiée).

Dans la méthode de standardisation directe, les taux peuvent ainsi être ajustés à une population type dite « standard Monde » ou « standard Europe ». Il s'agit donc des taux que l'on observerait dans la population d'étude si elle avait la structure d'âge de la population standard utilisée.

Prévalence

Proportion de cas (nouveaux et cas déjà diagnostiqués) dans la population à un moment donné. A noter que les cancers ayant une mortalité faible ont une prévalence élevée.

Odds Ratio

L'odds ratio (OR) est une mesure d'effet relatif calculée comme un rapport « d'odds ». Il est utilisé en régression logistique et permet de mesurer l'effet d'un facteur.

L'OR est appelé aussi **rapport des cotes** et exprime le degré de dépendance entre des variables aléatoires qualitatives.

Il exprime donc le rapport de la cote d'un événement arrivant à un groupe A d'individus, telle qu'une maladie, avec celle du même événement arrivant à un groupe B.

Sur le plan statistique :

« L'odd » (ou la cote) est le rapport de deux probabilités complémentaires: la probabilité p de survenue d'un événement (« risque ») divisée par la probabilité $(1-p)$ que cet événement ne survienne pas (« non risque », c'est-à-dire survie sans l'événement).

$$\text{Odds} = \text{risque/survie} = p/1-p$$

Si la probabilité qu'un événement arrive dans le groupe A est p , et q dans le groupe B, le rapport des cotes est :

$$\frac{p/(1-p)}{q/(1-q)} = \frac{p/(1-q)}{q/(1-p)}$$

Année universitaire : 2018-2019

Présentée par : Benenemissi Iram Hana

Intitulé

Étude Génétique des Gliomes :
Étude des Polymorphismes C677T de la MTHFR et I/D de l'ACE chez une Population de l'Est Algérien Atteinte de Gliome

Thèse en Vue de l'Obtention du Diplôme de Doctorat

Résumé

Les gliomes sont des tumeurs primitives du cerveau de pronostic sombre. Les glioblastomes représentant environ 56,6% des gliomes avec une survie relative très faible, seulement 5,6% des patients survivent 5 ans après le diagnostic.

Plusieurs évidences ont démontré le rôle crucial que jouent les facteurs génétiques dans le développement des gliomes. Ces dernières décennies, l'évolution de la recherche en cytogénétique et en biologie moléculaire a pu élucider en grande partie, les mécanismes moléculaires de la gliomagenèse dont l'impact est multiple : diagnostic, pronostic, mais également thérapeutique permettant de prédire les réponses aux différentes thérapies ciblées proposées.

Notre étude de type cas/témoin a porté sur deux polymorphismes génétiques à savoir le polymorphisme C677T de la MTHFR et le polymorphisme I/D de l'ACE sur échantillon sanguin.

Les résultats obtenus ont montré que le génotype TT du polymorphisme C677T de la MTHFR est associé à un risque élevé de genèse d'un gliome chez la population étudiée de l'Est algérien. La présence de l'allèle T pourrait être un facteur de risque contribuant au développement des gliomes chez cette population. Il a été également trouvé que le génotype DD de l'ACE est associé à un risque accru de gliome chez la même population.

Ces résultats nous permettent de proposer l'étude de ces gènes à visée thérapeutique, par l'usage des inhibiteurs de l'ACE et la substitution en folate, et méritent une confirmation par la réalisation d'autres études approfondies regroupant un échantillon plus important de patients atteints de gliomes.

Mots clés : gliomes, polymorphisme C677T de la MTHFR, polymorphisme I/D de l'ACE.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, UC1
Laboratoire de Biologie et Génétique Moléculaire, UC3