

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

Université BLIDA 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et de Physiologie Cellulaire



Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Master

Option : Bio-signalisation Cellulaire et Moléculaire : Génétique du cancer

Thème :

Astrocytome pilocytique de l'enfant
Impact du Ki-67 et de la β -caténine dans le diagnostic et les
récidives

Présenté par :

EL-BRAZZI Khaoula

ZOUAD Samia

Soutenu le : 02/07/2016

Membres de jury :

Mme BENAOUZ. F	Maitre assistante A	Université de Blida 1	Présidente
Mme HANNACHI. L	Maitre de conférences A	Faculté de médecine Alger	Examinatrice
Mme BAKHTI. S	Maitre de conférences A	Faculté de médecine Alger	Promotrice
Mme TERKMANI. F	Maitre de conférences B	Faculté de médecine Alger	Co-promotrice

Année universitaire : 2015/2016



Remerciements :

Toute notre gratitude à Dieu le tout puissant qui nous a ouvert les portes du savoir et qui nous à donné la force et la volonté pour réaliser et terminer ce modeste travail.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et nos sincères remerciements à:

***Pr BAKHTI. S,** notre promotrice, qui nous a fait l'honneur de bien vouloir encadrer et diriger notre travail et pour sa compréhension, ses orientations instructives, sa disponibilité tout au long de notre travail qui ont été à la base de la réalisation de ce projet et cela malgré ses nombreuses occupations.*

***Pr TERKMANI. F,** notre Co-promotrice, qui nous a orientés tout au long de notre stage, et pour sa disponibilité et sa compréhension malgré ses nombreuses occupations.*

Nos respectables membres de jury qui vont évaluer et noter notre modeste travail:

***Mme BENAZOUZ. F,** d'avoir acceptée de présider le jury de notre travail.*

***Pr HANNACHI. N,** d'avoir bien voulue accepter d'examiner notre travail.*

Nos familles qui nous ont soutenus et encouragés pour poursuivre nos études.

Sans oublier nos cher(e)s ami(e)s qui ont toujours été présents pour nous soutenir.

Merci à tous et à toutes.....

Résumé

L'astrocytome pilocytique (AP) de l'enfant est une tumeur bénigne de grade I (OMS) du système nerveux central, qui touche préférentiellement l'enfant et l'adulte jeune de 2 à 16 ans selon notre série, avec une prédominance masculine (60% versus 40%). La majorité des cas sont localisés au niveau de la fosse cérébrale postérieure (80%), suivi par les voies optiques (20%). La symptomatologie clinique est dominée par l'association d'un syndrome cérébelleux (37,5%) et un syndrome d'hypertension intracrânienne (31.25%), le diagnostic repose sur la tomodensitométrie (TDM) et surtout l'imagerie par résonance magnétique (IRM), qui montre un aspect radiologique hétérogène : kystique et charnu (50%) le plus fréquent.

Après cette étude rétrospective clinique réalisée sur les 10 cas d'astrocytomes pilocytiques, nous avons réalisé un examen histologique sur biopsies et pièces d'exérèses (totale, partielle, et large), qui a permis de confirmer le diagnostic afin d'envisager la stratégie des traitements complémentaires (chimiothérapie le plus souvent). Puis une étude d'immunohistochimie a été effectuée sur les 10 cas d'AP, dont 3 cas de reprise évolutive, 1 seul cas de récurrence, et 6 cas avaient une évolution favorable, dans le but d'élucider l'intérêt de l'utilisation des anticorps anti Ki-67 (marqueur nucléaire de prolifération cellulaire), et anti β -caténine (marqueur cytoplasmique) dans le diagnostic et la prédiction des récurrences de l'astrocytome pilocytique.

Ainsi, nous n'avons pas trouvé des différences quantitatives et significatives de l'expression de ki-67 et de la β -caténine entre les patients avec une récurrence tumorale ou reprise évolutive et les autres patients d'évolution favorable, qui ont tous présenté un marquage nucléaire positif du ki67 de l'ordre de 1 à 2% (90%). et un marquage cytoplasmique positif de β -caténine (100% des cas) avec des niveaux d'expressions différents.

Mots clés : Astrocytome pilocytique, Récurrence, Reprise évolutive, Ki-67, β -caténine.

Abstract

The pilocytic astrocytoma (PA) of the child is a benign tumor of the central nervous system classified as grade I (WHO), that affects preferentially children and young adults from 2 to 16 years according to our series, with a male predominance (60% versus 40%). The majority of cases are localized into the posterior fossa of the brain (80%), followed by the optical pathways (20%). The clinical symptomatology is dominated by the combination of a cerebellar syndrome (37.5%) and intracranial hypertension syndrome (31.25%). The diagnosis is based on the computed tomography (CT) and especially on the magnetic resonance imaging (MRI), which shows a heterogeneous radiological aspect: fleshy and cystic (50%) the most common.

After this retrospective clinical study on 10 cases of pilocytic astrocytomas, we performed a histological examination of biopsies and excisions parts (total, partial, and large), which confirmed the diagnosis in order to consider the strategy of the complementary treatments (chemotherapy most often). In order to clarify the advantage of using an anti Ki-67 (a nuclear marker of cell proliferation), and anti β -catenin (a cytoplasmic marker) in the diagnosis and prediction of recurrence of pilocytic astrocytoma, an immunohistochemical study was performed on 10 cases of PA, including 3 cases of evolutive recovery, only 1 case of recurrence, and 6 patients with favorable evolution.

Thus, we did not find significant quantitative differences in the expression of Ki-67 and β -catenin between patients with tumor recurrence or evolutive recovery and those with favorable evolution. All patients had a positive nuclear staining of Ki-67 in the order of 1 to 2% (90%), and a positive cytoplasmic staining of β -catenin (100% of cases) with different expressions levels.

Key words: Pilocytic astrocytome, Recurrence, Evolutive recovery, Ki-67, β -catenin.

ملخص

يعتبر الورم النجمي شعري الخلايا لدى الأطفال من الأورام الحميدة المصنفة في الدرجة الأولى (حسب منظمة الصحة العالمية) و التي غالبا ما تصيب الجهاز العصبي لدى الأطفال و المراهقين من 2 إلى 16 سنة مع سيادة ذكورية (60% ذكور مقابل 40% إناث)، حسب سلسلة بحثنا. في معظم الحالات تتواجد الأورام في القسم الخلفي من الدماغ (80%) وتليها المسارات البصرية (20%). اغلب الأعراض السريرية تظهر فيها متلازمة المخيخ (37.5%) مرفقة بمتلازمة ارتفاع ضغط الدم داخل الجمجمة (31.25%). يستند التشخيص على التصوير المقطعي و التصوير بالرنين المغناطيسي خاصة، و الذي يظهر جانبا إشعاعيا غير متجانس: كيسى و لبي غالبا

بعد الدراسة السريرية الاسترجاعية التي أجريت على 10 حالات، أجرينا فحصا نسيجيا لعينات و أجزاء مستأصلة (كلية، جزئيا أو إلى حد كبير) من الورم. سمح الفحص بتأكيد التشخيص من اجل النظر في إستراتيجية العلاجات التكميلية (العلاج الكيميائي في اغلب الأحيان). و من اجل توضيح الفائدة β -caténine و الأجسام المضادة ل، (علامة نووية لتكاثر الخلايا) Kمن استخدام الأجسام المضادة ل 67 في تشخيص الورم النجمي شعري الخلايا، أجرينا دراسة باستعمال تقنية الكيمياء (علامة هيولوية) النسيجية المناعية على 10 حالات مصابة و التي تتضمن : 3 حالات استرجاع تدريجي للورم، حالة واحدة انتكاس و 6 حالات تحسن ايجابي

بين المرضى الذين يعانون من عودة Kإلم نعثر على أي اختلافات كمية كبيرة في تعبير ال 67 ظهور الورم أو الاسترجاع التدريجي و غيرهم ممن عرفوا تحسنا ايجابيا. و قد اظهر الوسم المناعي لل فقد كان β -caténine نتائج ايجابية بنسبة 1 إلى 2 % (90% من الحالات). إما الوسم المناعي لل 67iK ايجابيا في كل الحالات (100%) مع اختلاف في نسب التعبير من حالة إلى أخرى

β -caténine، K الكلمات المفتاحية : الورم النجمي شعري الخلايا، انتكاس، استرجاع تدريجي، 67

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures et tableaux

Introduction

Chapitre I : Etude théorique

I. Généralités sur les gliomes.....	3
1. Rappel sur le système nerveux.....	3
1.1. Anatomie.....	3
1.2. Histologie.....	6
2. Classification des gliomes.....	9
II. Astrocytome pilocytique de l'enfant.....	10
1. Définition et localisation.....	10
2. Epidémiologie.....	11
3. Aspects cliniques.....	11
4. Imagerie.....	12
5. Anatomie pathologique.....	14
6. Traitement.....	15
6.1. Chirurgie.....	15
6.2. Chimiothérapie et radiothérapie.....	16
III. Principales altérations moléculaires des astrocytomes pilocytiques de l'enfant.....	17
1. La voie de signalisation des MAPKinases.....	17
1.1. Fonctions de la voie MAPKinase.....	17
1.2. Mécanismes de la voie RAS/RAF/MEK/ERK.....	17
2. Mutation du gène NF1.....	19
3. Altérations de la protéine B-RAF.....	21

3.1. Définition et structure.....	21
3.1. Fusion KIAA1549 ; B-RAF.....	22
3.2. Mutation BRAF V600E.....	25
4. Le marqueur de prolifération ki-67.....	26
4.1. Historique et définition.....	26
4.2. Structure et fonction.....	26
4.3. Expression.....	27
5. Le marqueur cytoplasmique β -caténine.....	28
5.1. Définition.....	28
5.2. Structure et fonction.....	29
5.3. La voie de signalisation wnt/ β caténine.....	31
5.4. Implication de la β -caténine dans la dérégulation des astrocytes.....	33

Chapitre II : Etude pratique

I. Population d'étude.....	37
II. Matériels.....	38
III. Méthodes.....	39
1. Technique histopathologique.....	39
2. Technique immuno-histochimique.....	42

Chapitre III : Résultats et discussion

I. Résultats.....	44
1. Répartition en fonction du sexe.....	44
2. Répartition en fonction de l'âge.....	45
3. Répartition selon la localisation.....	46
4. Symptomatologie de l'AP.....	47
5. Répartition de l'AP selon l'aspect radiologique.....	48

6. Chirurgie.....	49
7. Aspect microscopique.....	50
8. Résultats de l'immuno-histochimie.....	55
II. Discussion.....	61

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléotide

Akt : ou bien PKB : Protéine Kinase B

AP : Astrocytome Pilocytique

APC : Adenomatosis Polyposis Coli

ARNm : Acide Ribo Nucléique messenger

ATP : Adénosine Triphosphate

BAD : Bcl2-Associated Death promotor

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

BIM : Bcl2-like protein 11

BRAF : v-Raf murine sarcoma viral oncogne homolog B

CCND1 : Cyclin D1

CK1 : Caséine Kinase 1

CR : Région Conservée

CRD : Cystein Rich Domain

DAB : Di-Amino Benzidine

DVL : Dishevelled

EGFR : Epidermal Growth Factor Recptor

ERK : Extracellular Signal Regulated Kinase

FCP : Fosse Cérébrale Postérieure

FGF : Fibroblast Growth Factor

Fz : Frizzled

GAP : GTPase Activating Proteins

GDP : Guanosine Di-Phosphate

GEF : Guanine Nucleotide Exchange Factor

GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein

GSK3 : Glycogen Synthase Kinase 3

GTP : Guanosine Tri-Phosphate

HE : Hématoxyline Eosine

HES : Hématoxyline Eosine Safran

HIC : Hypertension Intracrânienne

IHC : Immunohistochime

JNK : Jun N-terminal Kinase

Kb : Kilo base

KDa : Kilo Dalton

Ki-67 : Ki « ville de Kiel » 67 « clone 67 »

LCR : Liquide Céphalorachidien

LDL : Low Density Lipoprotein

LEF : Lymphoid Enhancer binding Factor

LRP5/6 : LDL Receptor related Protein 5/6

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase

MEK : Mitogen activated Extracellular signal regulated protein Kinase

MIB-1 : Molecular Immunology Borstel-1

MITF : Microphthalmia-associated Transcription Factor

MMP : Matrix Metalloprotease

MYC : Myelocytose

NF1 : Neurobromatose type 1

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

Pb : Paire de base

PCP : Planar Cell Polarity

PDK1 : Phosphatidyl Inositol 3 Dependent Kinase 1

PI3K : Phosphatidyl Inositol 3 Kinase

PIP2 : Phosphatidyl Inositol 4-5 biphosphate

PIP3 : Phosphatidyl Inositol 3-4-5 biphosphate

PTEN : Phosphatase and Tensin homolog

RAF : Rapidly Accelerated Fibrosarcoma

RAS : Rat Sarcoma viral oncogene

RBD : Ras Binding Domain

SN : Système Nerveux

SNC : Système Nerveux Central

SNP : Système Nerveux Périphérique

SOS : Son Of Sevenless

TDM : Tomodensitométrie

TRCP : Transducing Repeat Containing Protein

TT : Tissu Tumoral

Ub : Ubiquitin-mediated proteolysis

WNT : Wingless Integration

WHO : World Health Organisation

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique du SNC.....	4
Figure 2 : Représentation schématique du SNP.....	5
Figure 3 : Représentation schématique des éléments structurels du neurone.....	6
Figure 4 : Représentation schématique des différents types cellulaires du SNC.....	8
Figure 5 : Représentation schématique des deux types des astrocytes.....	7
Figure 6 : Structure spatiale des gliomes : corrélation avec l'imagerie et correspondance avec les principales catégories des gliomes.....	13
Figure 7 : Aspect en IRM d'un astrocytome pilocytique à différentes localisations.....	14
Figure 8 : Caractéristiques histopathologiques typiques de l'astrocytome pilocytique (coloration par HES).....	15
Figure 9 : Représentation schématique de la voie de RAS/RAF/MEK/ERK.....	18
Figure 10 : Schéma d'activation des domaines RAS-GAP.....	20
Figure 11 : Représentation schématique de la structure conservée de la protéine Raf.....	22
Figure 12 : La voie de signalisation MAPK et la fusion KIAA1549,B-Raf.....	23
Figure 13 : Différents transcrits de fusion KIAA1549,B-Raf et leur fréquence.....	24
Figure 14 : Représentation schématique de la structure de l'antigène Ki-67.....	27
Figure 15 : Représentation schématique de la structure de la β -caténine et domaines d'interactions protéine/protéine.....	30
Figure 16 : Multilocalisation et multionctionnalité de la β -caténine.....	31
Figure 17 : Représentation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine.....	32
Figure 18 A : Représentation schématique de la chronologie des changements des astrocytes suite à la blessure	34
Figure 18 B : Implication de la β -caténine dans l'activation des astrocytes.....	35

Figure 19 : Principe de l'immuno-histochimie.....	42
Figure 20 : Répartition de l'astrocytome pilocytique en fonction du sexe.....	44
Figure 21 : Répartition selon l'âge.....	45
Figure 22 : Répartition selon la localisation	45
Figure 23 : Répartition selon la symptomatologie.....	46
Figure 24 : Localisation cérébelleuse gauche d'un AP	47
Figure 25 : Localisation suprasellaire d'un AP des voies optiques.....	48
Figure 26 : Localisation cérébelleuse droite d'un AP	49
Figure 27 : Aspect microscopique (HE, Gx10).....	51
Figure 28 : Aspect microscopique (HE, Gx40).....	52
Figure 29 : Aspect microscopique (HE, Gx10).....	52
Figure 30 : Aspect microscopique (HE, Gx400).....	53
Figure 31 : Aspect microscopique (HE, Gx100 avec huile d'immersion).....	53
Figure 32 : Aspect microscopique (HE, Gx40).....	54
Figure 33 : Aspect microscopique (HE, Gx10).....	54
Figure 34 : Immunomarquage nucléaire anticorps anti-Ki-67 (Gx40).....	56
Figure 35 : Immunomarquage nucléaire anticorps anti-Ki-67 (Gx40).....	56
Figure 36 : Immunomarquage nucléaire anticorps anti- β -caténine(Gx40).....	58
Figure 37 : Immunomarquage nucléaire anticorps anti- β -caténine(Gx100 avec huile d'immersion).....	59
Figure 38 : Immunomarquage nucléaire anticorps anti- β -caténine (Gx40).....	59

Liste des tableaux

Tableau I : Classification de l'OMS en 2007 des gliomes et des tumeurs neurogliales.....	10
Tableau II : Fréquences de fusion KIAA1549,B-Raf et la mutation B-Raf V600E dans les gliomes pédiatriques.....	24
Tableau III : Nature et fréquences des altérations de B-Raf en fonction du type de cancer..	25
Tableau IV : Résultats de l'imagerie de l'AP.....	47
Tableau V : Qualité d'exérèse.....	49
Tableau VI : Résultats de l'expression du marqueur de prolifération cellulaire Ki-67.....	55
Tableau VII : Corrélation entre l'expression de Ki-67 et l'évolution de l'AP	57
Tableau VIII : Résultats de l'immunomarquage cytoplasmique de la β -caténine.....	58
Tableau IX : Corrélation entre l'expression de la β -caténine et l'évolution de l'AP.....	60

Introduction

Introduction

L'astrocytome pilocytique est une tumeur gliale grade I selon la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé. Il touche essentiellement l'enfant et l'adulte jeune. Il est souvent localisé au niveau de la Fosse Cérébrale Postérieure, préférentiellement dans le cervelet. Il survient aussi au niveau supratentorial (voies optiques). Cette tumeur est exclue du groupe des astrocytomes infiltrant qui sont de grade II, III, ou IV. Il s'agit d'une tumeur bien limitée, bénigne, et dont la transformation maligne est exceptionnelle (39, 49).

En imagerie, les astrocytomes pilocytiques de l'enfant comportent fréquemment une double composante regroupant deux aspects à la fois : kystique et charnu. Parfois ils prennent un seul aspect soit kystique pur, soit charnu (9, 51). La forme histologique classique de l'astrocytome pilocytique est biphasique, cette architecture associe une composante cellulaire à longs prolongements cytoplasmiques riches en fibres de Rosenthal et de corps granuleux, et une composante microkystique constituée de cellules astrocytaires (32).

L'évolution clinique est favorable seulement par résection chirurgicale totale, par contre elle est parfois difficile voire impossible à cause de la localisation notamment au niveau de la région Hypothalamo-chiasmatique, dans ce cas l'exérèse est partielle, et ainsi une progression tumorale peut avoir lieu ; de ce fait il y'aura recours à la chimiothérapie ou la radiothérapie. La notion de récurrence tumorale est observée le plus souvent au cours des cinq années qui suivent la résection chirurgicale initiale (32).

Le diagnostic de l'astrocytome pilocytique intègre des données moléculaires, dont de récentes études ont permis de mettre la lumière sur des anomalies génétiques impliquant notamment, la voie de signalisation des MAPKinases, l'altération de la protéine BRAF le plus souvent dans les formes sporadiques, ainsi que la mutation du gène NF1 qui développe des gliomes des voies optiques dans le cadre de la neurofibromatose type 1 (32, 40).

Le marqueur de prolifération Ki-67 est utilisé en routine pour le diagnostic de nombreuses tumeurs, et il est actuellement considéré comme la méthode la plus fiable pour évaluer l'indice de prolifération des tumeurs cérébrales.

La β -caténine est connue comme étant une protéine multifonctionnelle impliquée dans l'adhérence cellulaire, et elle est la molécule clé de la voie de signalisation Wnt. Son altération a été identifiée dans le développement de plusieurs cancers.

Nous avons voulu mettre en évidence l'intérêt de l'index de prolifération Ki-67 et la β -caténine dans ces tumeurs à travers une étude de 10 astrocytomes pilocytiques de l'enfant.

« Quel est l'impact du Ki-67 et l'altération de la β -caténine dans le diagnostic et les récurrences des astrocytomes pilocytiques de l'enfant ? »

Chapitre I
Etude théorique

I. Généralité sur les gliomes

1. Rappel sur le système nerveux (SN)

1.1. Anatomie du SN

Le système nerveux est un système complexe qui tient sous sa dépendance toutes les fonctions de l'organisme, il se compose de centres nerveux qui sont chargés de recevoir, d'intégrer, et d'émettre des informations, et des voies nerveuses qui sont chargées de conduire ces informations.

Donc, les différentes structures anatomiques du SN peuvent être regroupées selon qu'elles appartiennent au système nerveux central (SNC) ou au système nerveux périphérique (SNP) : (43).

❖ **Le système nerveux central** a pour rôle de recevoir, enregistrer, et interpréter les signaux qui parviennent de la périphérie, et organiser la réponse à envoyer. Il est composé de l'encéphale et la moelle épinière (Figure 1) :

-L'encéphale : correspond au cerveau, le cervelet, et le tronc cérébral qui sont situés dans la boîte crânienne.

-La moelle épinière : qui est située dans le canal rachidien qui résulte de la superposition des vertèbres de la colonne vertébrale (37).

Le cerveau (coupe sagittale)

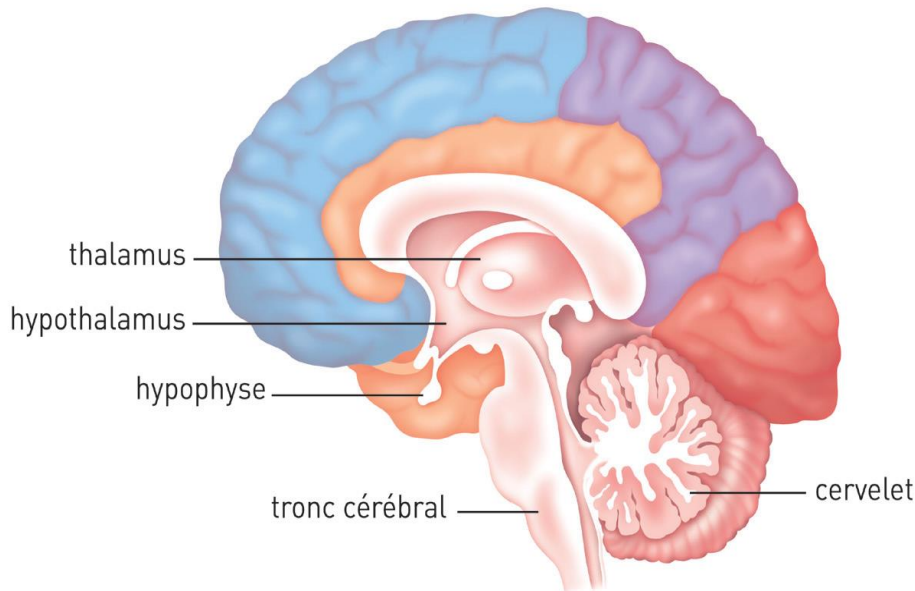


Figure 1: Représentation schématique du système nerveux central (43,14).

❖ **Le système nerveux périphérique :** constitué de différents nerfs rattachés à l'encéphale ou à la moelle épinière, les nerfs qui se rattachent au tronc cérébral de l'encéphale sont appelés des nerfs crâniens, alors que ceux qui se rattachent à la moelle épinière sont appelés nerfs rachidiens. Ces nerfs irradient vers tous les points de l'organisme assurant l'acheminement (Figure 2) (43):

➤ Des informations sensibles vers le SNC (comme : la sensibilité de la peau, la vision, l'audition, le goût, et l'odorat) à travers les voies afférentes.

➤ Des ordres du SNC vers les effecteurs périphériques (par exemple : vers les muscles pour effectuer des mouvements volontaires) à travers les voies efférentes (ou motrices) (43).

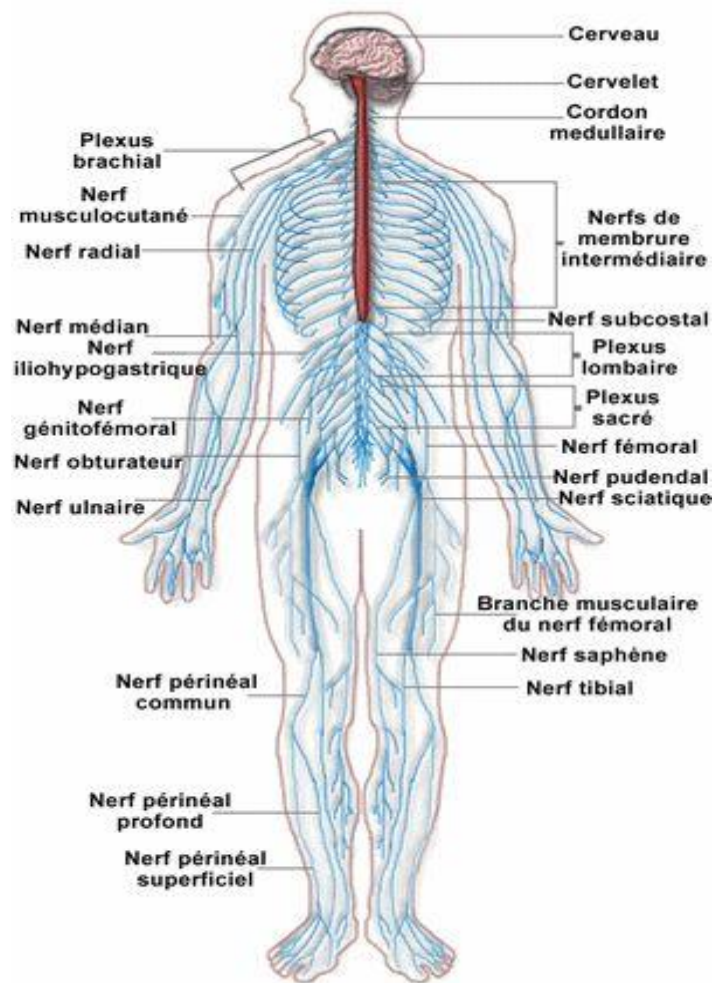


Figure 2 : Représentation schématique du système nerveux périphérique

<http://www.trikapalanet-fr.com/>

1.2. Histologie du SNC

Le système nerveux central est un tissu très dense, composé de deux grands types de cellules :

-Les neurones : unités fonctionnelles du SNC, ces cellules hautement différenciées et spécialisées dans la communication intercellulaire, produisent et transmettent des informations codées sous forme d'influx nerveux. Ils sont composés des parties suivantes (Figure 3) (33):

- **Un corps cellulaire** : le péricaryon ou encore soma, constitué d'une membrane qui entoure un cytoplasme à l'intérieur duquel est situé le noyau de la cellule.

- **Des dendrites** : prolongements qui se divisent comme les branches d'un arbre, recueillent l'information et l'acheminent vers le corps cellulaire.
- **L'axone** : un prolongement principal ou cylindraxe (de 0,1 mm à 3 m), qui conduit l'information du corps cellulaire vers d'autres neurones (avec lesquels il réalise des connexions, appelées synapses) ou d'autres types de cellules (comme celles des muscles ou des glandes) (33).

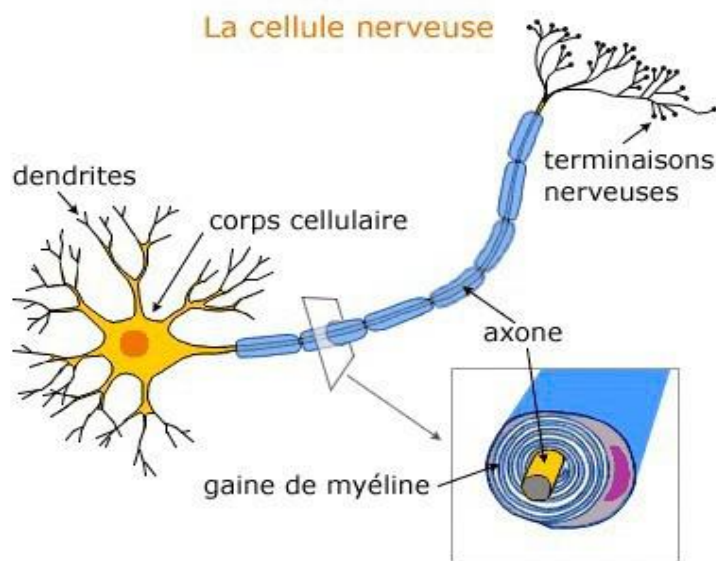


Figure 3 : Représentation schématique des éléments structurels du neurone (43).

-Les cellules gliales : qui sont des cellules de soutien du SNC, elles sont environ 10 fois plus nombreuses que les neurones. La conservation de leur capacité de division et de leur nombre élevé explique que ces cellules soient à l'origine de la majorité des tumeurs du SNC.

Ces cellules sont composées de quatre types cellulaires (Figure 5) :

➤ **Les astrocytes** : on distingue deux types (Figure 4) :

-Les astrocytes de types I : qui sont en contact avec les capillaires sanguins et leurs pieds forment une barrière hémato-encéphalique (BHE) autour des capillaires, et régulent les échanges entre les capillaires sanguins et les neurones. Ils jouent ainsi un rôle de soutien

métabolique des neurones, leur apportant les nutriments (glucose et oxygène) et évacuant leurs déchets métaboliques.

-Les astrocytes de types II : qui entourent les neurones et la fente synaptique, permettant d'une part de garantir l'homéostasie du milieu neuronal et d'autre part de réguler l'intensité de la transmission synaptique par recapture des neurotransmetteurs (5).

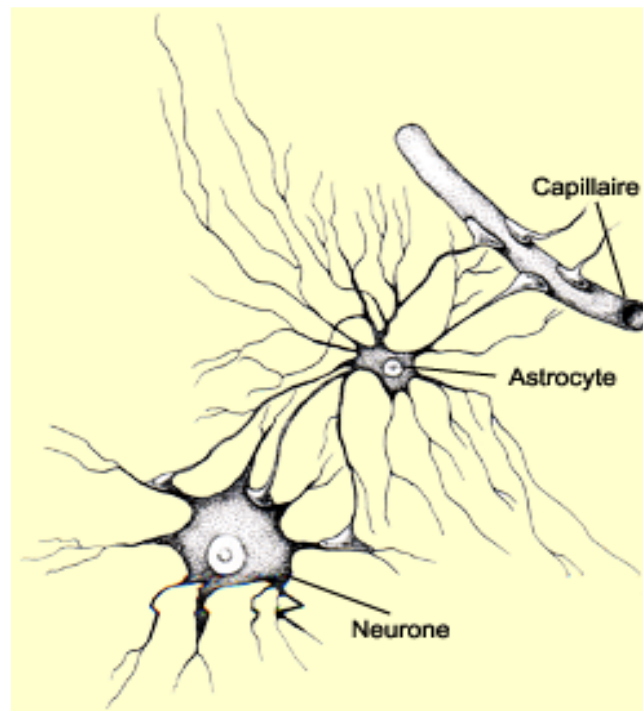


Figure 4 : Représentation schématique des deux types des astrocytes (43)

Des filaments intermédiaires composés principalement de la protéine gliofibrillaire acide (GFAP) sont présents au niveau du cytoplasme des deux types des astrocytes mais en grandes quantités dans les astrocytes de types II (5,12).

➤ **Les oligodendrocytes** : possèdent des prolongements qui enveloppent les axones des neurones. Ainsi ces cellules ont pour principale fonction d'assurer la myélinisation des axones (12).

➤ **Les épendymocytes** : permettent une séparation des tissus cérébraux du liquide Céphalorachidien contenu dans les ventricules (12).

➤ **Les cellules microgliales** : dérivent des monocytes, représentent les macrophages résidant du SNC et jouent un rôle de surveillance de protection et de nettoyage du tissu cérébral en repérant et détruisant les micro-organismes, les cellules mortes, et certaines molécules exogènes (5).

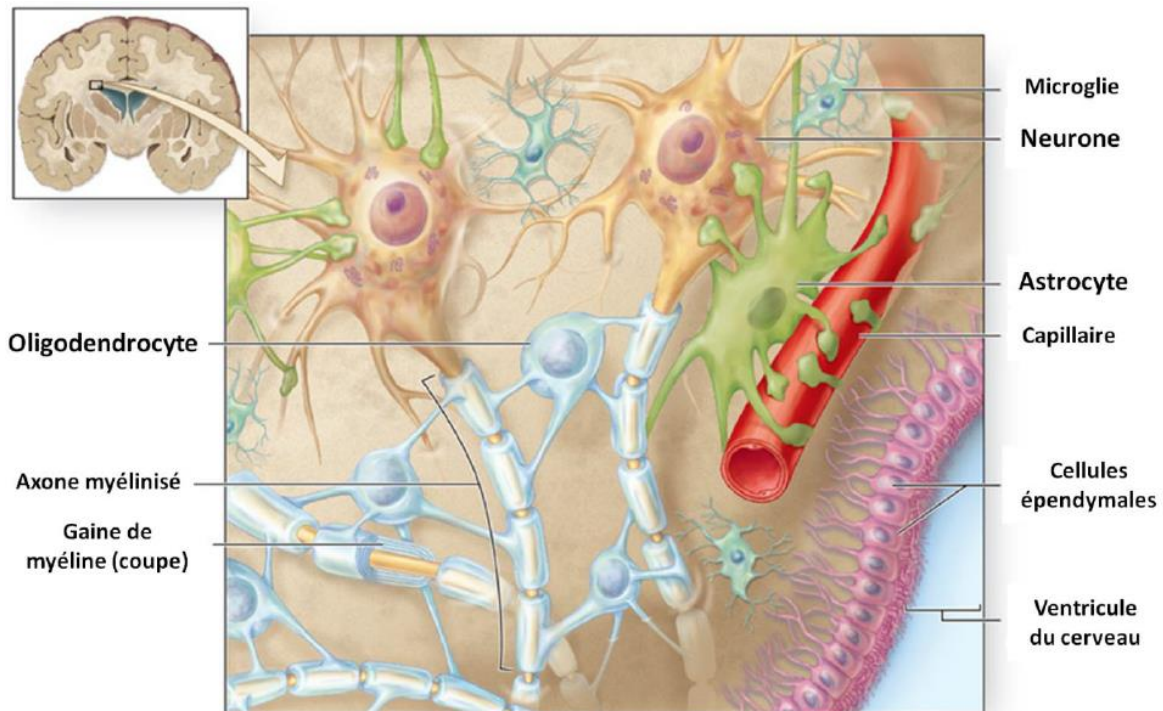


Figure 5: Représentation schématique des différents types cellulaires du système nerveux central (7).

2. Classification des gliomes

Le terme gliome englobe tous les types de tumeurs cérébrales ayant pour origine une cellule gliale (12). Ces tumeurs récidivent fréquemment et sont pour les plus part de mauvais pronostic, ils se subdivisent en deux grandes classes de tumeurs neuro-épithéliales : les tumeurs gliales, et glioneurales (32), qui se répartissent en plusieurs sous types chacun étant caractérisé par une structure histologique et une localisation topographique bien spécifique (17).

La classification de référence est celle de l'organisation mondiale de la santé (OMS)

(Tableau I), qui se base sur les principes suivants :

- Le type de cellule prédominant (cellule d'origine astrocytaire, oligodendrocytaire, ou mixtes).
- Signes histologiques d'anaplasie (densité cellulaire, atypie nucléaires, mitoses, prolifération endothélio-capillaire, et nécrose).
- Le potentiel d'agressivité (classé du grade I pour les tumeurs bénignes, jusqu'au grade IV pour les tumeurs malignes) (32).

- **Le grade I** correspond à des lésions bénignes, peu prolifératives, qui peuvent être traitées par résection chirurgicale seule.

- **Le grade II** inclue des lésions qui peuvent progresser vers des grades plus élevés avec une activité mitotique faible et une tendance à l'infiltration. Le traitement des tumeurs de grade II sont la résection chirurgicale ou la biopsie suivies ou non de radiothérapie en fonction de l'évolution de la maladie.

- **Les tumeurs du grade III** présentent quant à elles une grande activité mitotique, des anaplasies et un caractère infiltrant important. Pour ce type de tumeur, une résection chirurgicale est effectuée suivie d'une radiothérapie et chimiothérapie.

- Enfin, **le grade le plus malin (grade IV)** regroupe les tumeurs présentant des zones nécrotiques ainsi qu'une forte activité mitotique, associée à une évolution rapide de la maladie et une angiogenèse importante. Ces tumeurs très agressives sont traitées par une résection chirurgicale associée à une radiothérapie et chimiothérapie (7, 4).

1- Gliomes astrocytaires	
Astrocytome pilocytique	Grade I
Astrocytome pilocytique, variant pilomyxoïde	Grade II
Astrocytome à cellules géantes sous-épendymaire	Grade I
Xanthoastrocytome pléiomorphe	Grade II
Astrocytome diffus (fibrillaire, protoplasmique, gémistocytique)	Grade II
Astrocytome anaplasique	Grade III
Glioblastome	Grade IV
Variant : glioblastome à cellules géantes	Grade IV
Gliosarcome	Grade IV
Gliomatose cérébrale	Grade III
2-Gliomes oligodendrogliaux	
Oligodendrogliome	Grade II
Oligodendrogliome anaplasique	Grade III
3-Gliomes mixtes	
Oligoastrocytome	Grade II
Oligoastrocytome anaplasique	Grade III
Si nécrose (GBMO : glioblastome à composante oligodendrogliale)	Grade IV
4-Tumeurs glioneuronales	
Gangliogliome	Grade I
Gangliogliome anaplasique	Grade III
Astrocytome/gangliogliome desmoplasique infantile	Grade I
Tumeur neuroépithéliale dysembryoplasique	Grade I
Tumeur glioneuronale papillaire	Grade I
Tumeur glioneuronale à rosettes du IV ^e ventricule	Grade I

Tableau I : classification de l’OMS en 2007 des gliomes et des tumeurs neurogliales (32).

II. Astrocytome pilocytique de l’enfant

1. Définition

L’astrocytome pilocytique (AP) est une tumeur gliale dérivant de la lignée astrocytaire, généralement bien circonscrite, bénigne, classée en grade I par l’OMS (17). Cette tumeur s’observe typiquement chez l’enfant et le jeune adulte. Il survient au niveau :

- Infratentorial (fosse cérébrale postérieure) : le cervelet, le tronc cérébral, et la moelle épinière.
- Supratentorial, les régions les plus touchés sont le chiasma optique, et le thalamus (9).

2. Epidémiologie

L'AP représente environ 5 à 6% de l'ensemble des tumeurs gliales (32,53), et 20% des tumeurs cérébrales pédiatriques, touchant principalement l'enfant et le jeune adulte de 0 à 19 ans (32, 39,10) avec un pic de 3 à 9 ans, et une prédominance masculine (45,10).

- En Tunisie (2012), les sites préférentiels de l'AP sont : la région infratentorielle (74.9%), spécialement dans le cervelet (59.3%), suivie par les ventricules cérébraux (15.6%), la région supratentorielle (12.5%), et les voies optiques (3.12%) (49).

- En Allemagne (2015), l'AP survient particulièrement dans le cervelet (42%), suivi par le compartiment supratentoriel (36%), puis les voies optiques et l'hypothalamus (9%), le tronc cérébral (9%) et la moelle épinière (2%) (10).

- En Algérie (DESM 2015), l'AP les régions les plus touchées sont : la FCP (80%), l'intramédullaire (12%), et la région hypothalamo-chiasmatique (8%).

En général, cette tumeur se développe dans un contexte sporadique, mais le plus souvent l'AP des nerfs optiques est associé à une neurofibromatose de type 1 (dans 15% des cas) (45).

3. Aspects cliniques

➤ Astrocytomes de la fosse postérieure

Au niveau du cervelet, les astrocytomes se manifestent par des céphalées et des vomissements liés à l'hypertension intracrânienne consécutive à une hydrocéphalie par blocage des voies d'écoulement du LCR.

Chez le jeune enfant, les vomissements peuvent être rapportés à un syndrome abdominal.

Au niveau du tronc cérébral, l'association d'une atteinte des fibres longues, de troubles cérébelleux et d'une atteinte des nerfs crâniens conduit au diagnostic topographique et à la demande d'imagerie.

➤ **Astrocytomes supratentoriels**

L'épilepsie est le symptôme inaugural le plus fréquent. Les crises sont souvent partielles ou secondairement généralisées.

➤ **Astrocytomes des voies optiques**

Dans les formes pré-chiasmatiques, l'expression clinique est caractérisée par une baisse d'acuité visuelle unilatérale associée parfois à un scotome, une exophtalmie ou un ptosis. Dans les formes chiasmatiques, on retrouve une hémianopsie bitemporale. On recherchera toujours des signes cliniques de neurofibromatose (40).

Il faut néanmoins souligner que certains astrocytomes pilocytique présentent une évolution clinique moins favorable caractérisée par des récives tumorales. De rares cas de transformation maligne des astrocytomes pilocytiques ont été rapportés dans la littérature. Ils concernent majoritairement des patients ayant préalablement bénéficié d'une radiothérapie (10, 45).

4. Imagerie

L'imagerie a de nombreux objectifs :

- Détection de la lésion devant les premiers symptômes cliniques.
- Précision de topographie lésionnelle.
- Détermination de la nature de la lésion.
- Synthèse des informations topographiques morphologiques métaboliques et fonctionnelles utiles à fin d'approcher le type histologique et le grading de la lésion tumorale.
- Surveillance post-thérapeutique (24).

De façon générale dans les gliomes deux composantes peuvent être observées, dont la structure spatiale est schématisée dans la figure 6 :

- Le tissu tumoral solide, celui-ci n'est formé que de cellules tumorales avec microangiogenèse se traduisant à l'imagerie par une prise de contraste.

- Les cellules tumorales isolées, au sein de cette composante le parenchyme est morphologiquement et fonctionnellement intact, et il n'existe pas de vaisseaux néoformés (21).


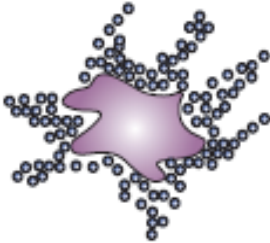
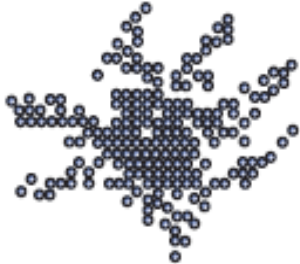
Structure spatiale	Tissu tumoral	Tissu tumoral et cellules tumorales isolées	Cellules tumorales isolées
			
Aspect à l'IRM	Prise de gadolinium	Prise de gadolinium (TT uniquement)	Pas de prise de gadolinium hypo-intense en T1 hypo-intense en T2
Principaux types tumoraux	Astrocytome pilocytique	Glioblastome Oligodendrogliome et oligoastrocytome	Oligodendrogliome et oligoastrocytome

Figure 6: Structure spatiale des gliomes : corrélation avec l'imagerie et correspondance avec les principales catégories des gliomes (21).

A l'imagerie, l'astrocytome pilocytique est bien délimité, il apparaît hypodense par rapport au parenchyme adjacent souvent kystique en particulier au niveau de la fosse cérébrale postérieure, et il est rehaussé par le produit de contraste iodé (Figure 7).

La prise de contraste d'un kyste ou d'un nodule solide intra-kystique est également un caractère évocateur de la tumeur. Plus rarement ces tumeurs se présentent sous la forme d'une tumeur non kystique pouvant alors poser des difficultés diagnostiques (17, 9).

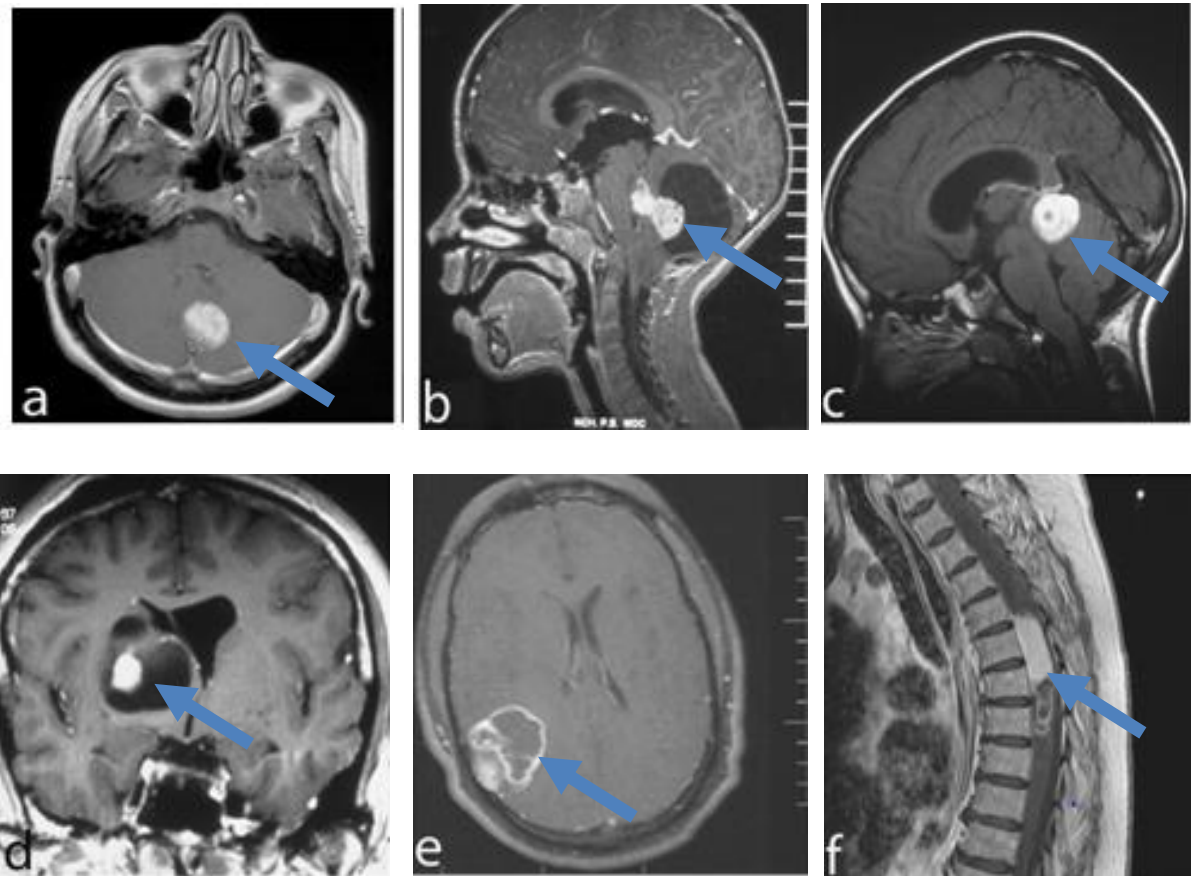


Figure 7 : Aspect en IRM d'un astrocytome pilocytique a différentes localisations (flèches bleus) (10).

5. Anatomie pathologique

Les astrocytomes pilocytiques se caractérisent typiquement par une architecture biphasique avec des cellules tumorales astrocytaires de forme bipolaire et des fibres de Rosenthal, des corps granuleux éosinophiles peuvent être présents ainsi que de microkystes formés de cellules rondes pseudo-oligodendrogiales (Figure 8).

Ces tumeurs ont un indice de prolifération cellulaire faible, les mitoses sont peu nombreuses, et il n'y a classiquement pas de nécrose, l'angiogenèse est présente et se caractérise par une vascularisation souvent anormale et parfois par une prolifération microvasculaire (17, 45).

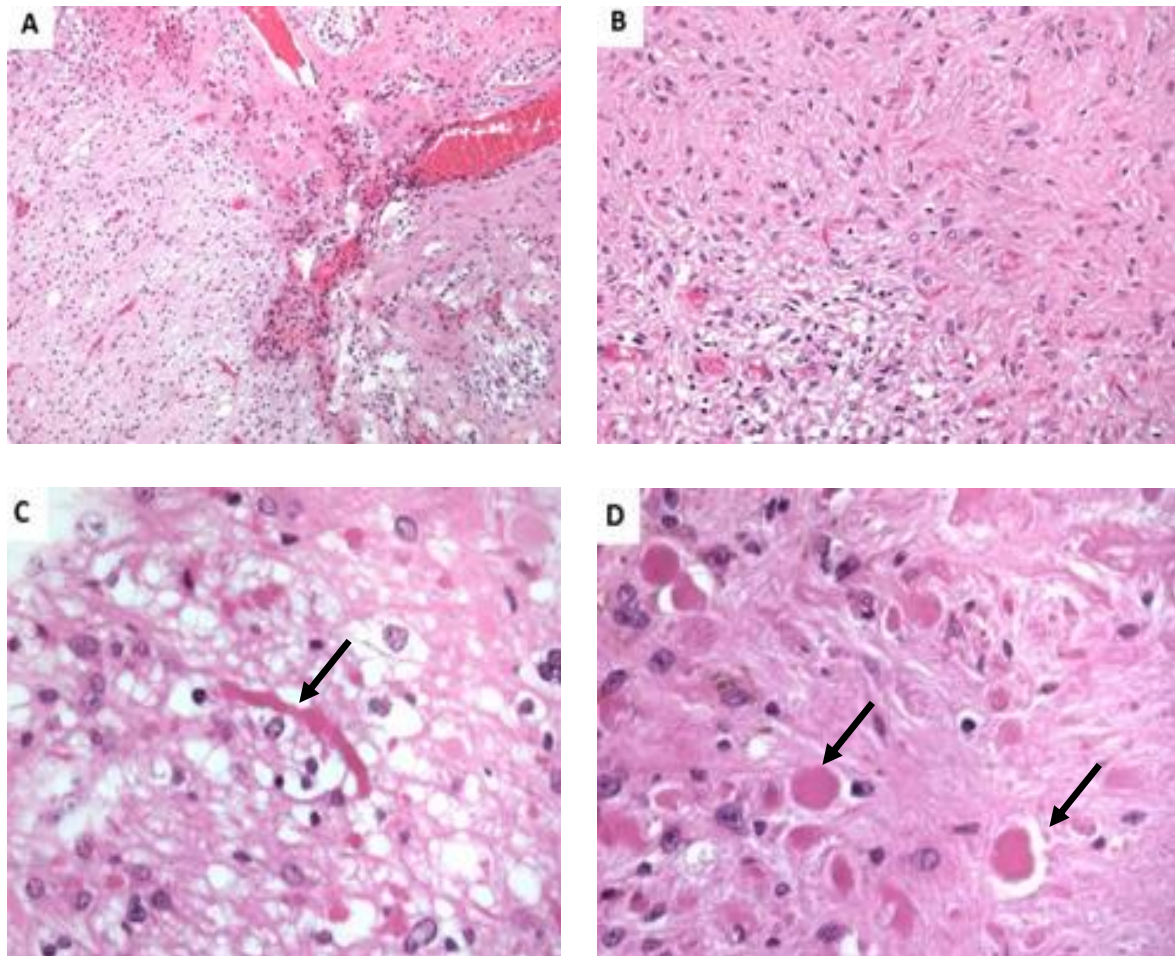


Figure 8 : Caractéristiques histopathologiques typiques de l'astrocytome pilocytaire (coloration par HES) : A (x100) et B (x200) : Architecture biphasique. A gauche, un contingent « oligo-like », à droite, un contingent plus fasciculé, fibrillaire. C. Fibre de Rosenthal (flèche noire) (x400) D. Corps granuleux éosinophiles (flèches noire) (x400) (9).

6. Traitement

6.1. Chirurgie

Au cours de la prise en charge d'une tumeur du cerveau, plusieurs interventions chirurgicales peuvent être proposées :

- Une biopsie, qui consiste à prélever un échantillon de la tumeur pour l'analyser.

- Une intervention « à ciel ouvert », qui vise à retirer la totalité de la tumeur. On parle d'exérèse complète.

Certaines tumeurs ne peuvent pas être retirées complètement, notamment lorsqu'elles sont étendues ou situées dans des zones vitales du cerveau. Le risque d'endommager le cerveau serait trop important. Dans ce cas, l'intervention à ciel ouvert a pour objectif de retirer la plus grosse partie possible de la tumeur. On parle alors d'exérèse partielle, qui permet de réduire le volume de la tumeur et de diminuer les symptômes, en particulier les céphalées et les vomissements (14).

- Une dérivation ou une ventriculo-cisterno-stomie qui consiste à rétablir la circulation du liquide céphalo-rachidien à l'intérieur du crâne.

La présence d'une tumeur dans le cerveau peut bloquer la circulation du liquide céphalo-rachidien. Au lieu de s'écouler normalement, le liquide s'accumule dans les ventricules du cerveau. Cette accumulation de liquide provoque une hypertension intracrânienne (14).

Le pronostic est bon, et la résection chirurgicale totale est curative avec un taux de survie à 10 ans de plus de 95% (51), mais les astrocytomes pilocytiques de la région hypothalamo-chiasmatique ont un pronostic moins bon, car, en partie en raison de leur localisation, la résection chirurgicale totale reste impossible. Leur progression lente s'accompagne de troubles visuels jusqu'à la cécité complète et de troubles endocriniens majeurs. et certaines tumeurs récidivent, disséminent *via* le liquide céphalorachidien et se développent dans d'autres structures du SNC pouvant entraîner ainsi le décès du patient (9, 17).

6.2. Chimiothérapie et radiothérapie

En premier, l'AP est traité par la chirurgie. La chimiothérapie peut être administrée dans certains cas où la tumeur progresse surtout si une nouvelle intervention chirurgicale est impossible. La radiothérapie n'est effectuée que dans les cas ne répondant pas à la chirurgie et à la chimiothérapie ; elle ne doit pas être envisagée avant l'âge de 10 ans (10).

III. Principales altérations moléculaires des astrocytomes pilocytiques (AP) de l'enfant

1. La voie de signalisation des MAPKinases

1.1. Fonctions de la voie MAPKinase

La voie MAPKinase est impliquée physiologiquement dans différentes fonctions cérébrales. Elle intervient dans le phénomène de la douleur, l'induction de la neurogénèse et le développement du diencéphale et du cervelet au cours de l'embryogénèse. C'est une voie de signalisation intracellulaire jouant un rôle important dans la régulation de la prolifération, de la survie, de la différenciation, de la migration cellulaire, et de l'angiogenèse. Il existe six groupes de MAPKinases : ERK1/2, ERK3/4, ERK5, ERK7/8, JNK et P38. La voie ERK1/2 implique la protéine Ras et est la plus étudiée dans les gliomes (32).

1.2. Mécanismes de la voie RAS/RAF/MEK/ERK

Les voies de signalisation des MAPKinases impliquent une série de kinases qui s'activent en cascade permettant la transduction du signal de la membrane plasmique de la cellule au noyau.

Lorsqu'un ligand extracellulaire, comme un facteur de croissance ou une cytokine, se fixe spécifiquement à un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase, ce complexe s'active en se dimérisant et en s'autophosphorylant, recrutant alors des facteurs d'échanges GEF (Guanine Nucleotide Exchange Factors), comme les protéines SOS. Ces dernières permettent l'échange du GDP (Guanosine DiPhosphate) par le GTP (Guanosine TriPhosphate) sur des protéines de la famille RAS, alors activées. Ce processus peut être inhibé par l'action de protéines GAP (GTPase Activating Proteins), comme la protéine neurofibromine (NF1), qui catalysent l'hydrolyse du GTP en GDP rendant alors les protéines RAS inactives (32).

La voie RAS/ERK est activée par l'interaction avec les protéines kinases RAF. Les protéines RAF sont constituées de 4 formes (BRAF, RAF-1, ARAF, CRAF), BRAF étant la plus connue. L'activation des protéines RAF induit alors l'activation des protéines MEK1 et MEK2 qui activent à leur tour ERK1 et ERK2. Ces dernières induisent l'activation de différents facteurs de transcription comme ETS-1, C-JUN, et C-MYC permettant la

prolifération cellulaire. En parallèle, la protéine PI3K activée catalyse la phosphorylation du phosphatidylinositol-2-biphosphate (PIP2) générant le phosphatidylinositol-3.4.5-triphosphate (PIP3). Ce processus peut être inhibé par l'action de la protéine PTEN qui déphosphoryle la protéine PIP3 en PIP2. L'accumulation de PIP3 permet le recrutement de PDK1 à la membrane où il phosphoryle la protéine AKT. La protéine AKT activée peut, tout comme ERK, phosphoryler un grand nombre de protéines impliquées dans la survie cellulaire comme la protéine BIM et BAD (Figure 9) (32, 9).

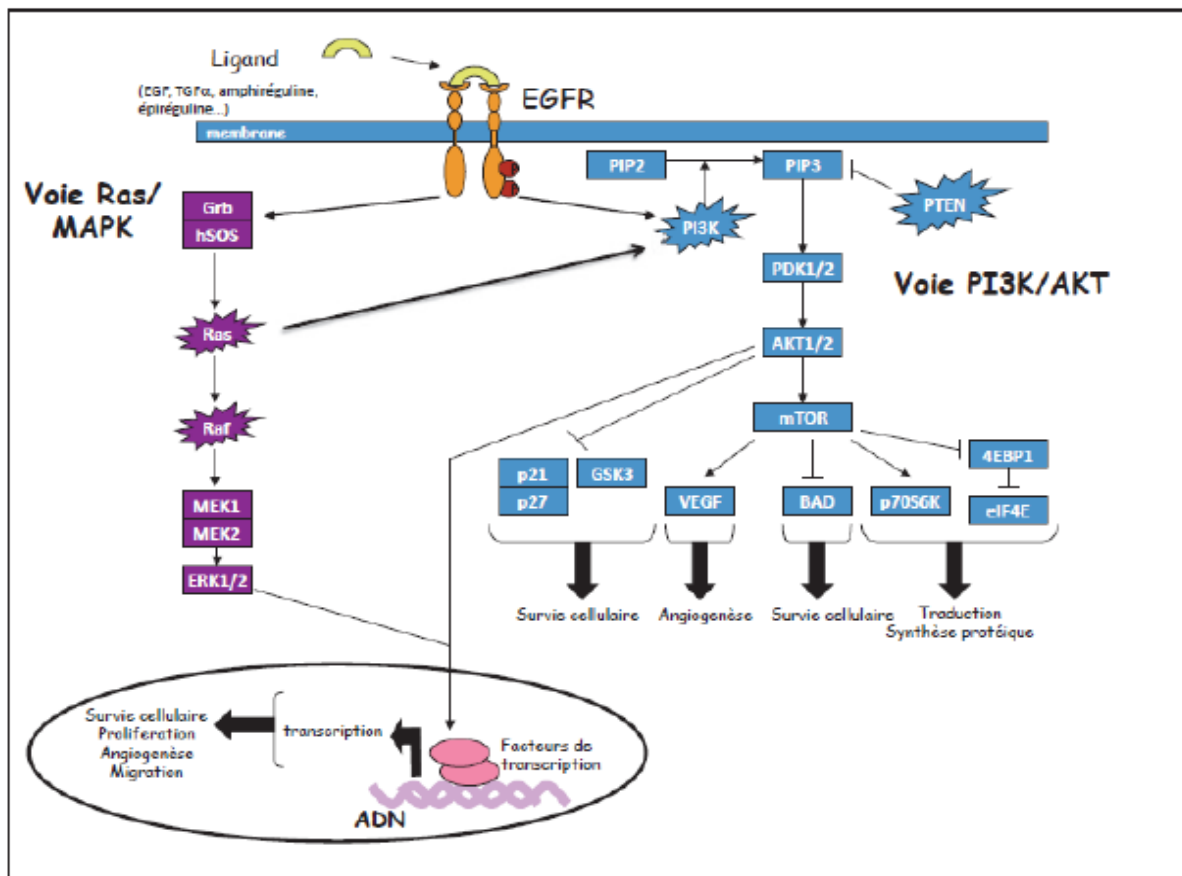


Figure 9 : Représentation schématique de la voie RAS/RAF/MEK/ERK (34)

➤ Ras et Cancer

Ras est le gène le plus étudié car c'est le premier proto-oncogène mis en évidence mais aussi le plus fréquemment muté dans les cancers. Il est muté dans 30% des cancers humains de toutes sortes. Ce qui représente une importante proportion. Ce sont des gènes extrêmement important pour compréhension et les traitements des tumeurs.

Les mutations de Ras sont essentiellement des mutations faux sens (changement d'un nucléotide qui entraîne un changement de codon et donc la synthèse d'un autre acide aminé). Elles sont ciblées et récurrentes quelque soit le type de cancer et le membre de la famille Ras touché. Ces mutations touchent les codons 12, 13 et 61. Elles vont modifier les capacités de Ras en gênant son retour à la forme inactive en (27) :

- Diminuant l'activité GTPasique intrinsèque de Ras. Ce qui constitue un premier rétrocontrôle.
- Empêchant la fixation des protéines GAP qui vont stimuler cette activité GTPase intrinsèque.

Ce qui va aboutir à une activation prolongée voir constitutive (indépendamment d'un signal pour être activé) de la protéine Ras. Ras va ensuite être un médiateur à des voies de survie qui pourront aboutir à une cancérisation.

La plupart du temps les mutations sont hétérozygotes car ce sont des mutations gain de fonction. Il suffit qu'un allèle soit touché pour avoir une modification du gène.

Les mutations peuvent toucher les trois gènes KRAS NRAS HRAS, même si KRAS est le plus impliqué dans les tumeurs. Ces trois gènes sont mutés pour les même codons mais pas pour les même tumeurs ; ce qui laisse penser qu'ils n'ont pas forcément les même fonctions (27).

2. Mutation de gène NF1

Le gène NF1 est situé sur le chromosome 17 (locus 17q11.2), sa structure est présentée dans la Figure 10. Il est de très grande taille (300 kb), ce qui favorise les mutations (plus de 300 mutations germinales délétères ont été décrites) (30).

La mutation de ce gène est une mutation autosomique dominante qui induit une neurofibromatose de type 1. Le gène NF1 est un gène suppresseur de tumeur et code pour une protéine appelée neurofibromine exprimée dans différentes cellules notamment les cellules gliales, les neurones et les cellules de Schwann. Cette protéine appartient à la famille des protéines GAP possédant un domaine GRD (GAP-related domain), homologue au domaine catalytique des protéines RAS-GTPase. Sa fonction est de réguler négativement RAS en

induisant la diminution de la prolifération de cellules astrocytaires et de la différenciation neuronale (32).

Une perte d'expression de la neurofibromine conduit donc à une activité anormale de RAS et ainsi à une forte prolifération des astrocytes via la voie MAPK/ERK. Par ailleurs, des travaux ont rapporté que, paradoxalement, la mutation du gène NF1 induisait également un phénomène de sénescence cellulaire en inhibant la voie RAS/PI3K (Figure10) (32).

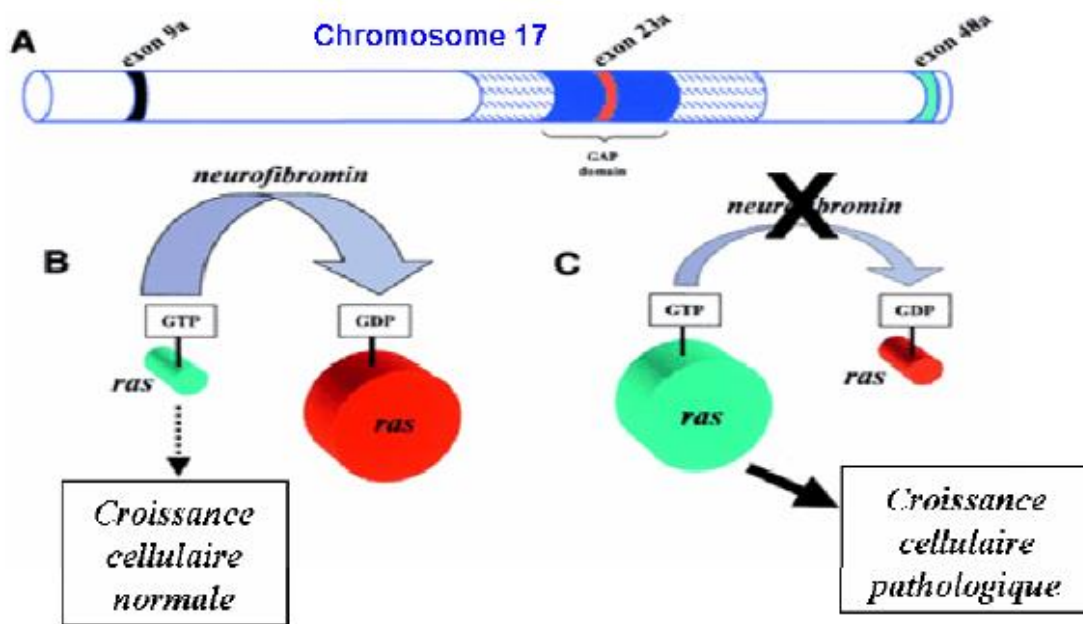


Figure 10 : Schéma d'activation des domaines Ras GAP. (A) La neurofibromine, produit du gène NF1, contient trois exons alternativement traduits (9a, 23a et 48a) et deux régions d'homologie aux protéines IRA de levures (zone hachurée) avec le domaine Ras GTP au milieu. (B) Le neurofibromine aide à la conversion de GTP-Ras actif vers GDP-Ras inactif. Si l'expression de NF1 est normale, Ras est moins actif et les signaux de prolifération cellulaire sont réduits. (C) L'inactivation fonctionnelle de NF1 trouvé chez les patients touchés par la neurofibromatose de type 1 conduit à la perte de l'activité RasGAP. L'altération de NF1 augmente l'activation de Ras ce qui entraîne une croissance cellulaire incontrôlée (30).

L'association entre la neurofibromatose de type 1 et les astrocytomes pilocytiques est connue de longue date (9).

3. Altération de protéine B-Raf

3.1. Définition et structure

La protéine Raf est une protéine effectrice importante de Ras, elle se situe au centre de la voie MAP kinase régulant principalement la prolifération cellulaire (47).

3 isoformes de protéine Raf, (Figure 11) A-Raf, B-Raf et Raf-1 ou C-Raf, Chaque isoforme possède 3 régions conservées (CR) en commun : CR1, CR2 et CR3. CR1 contient le domaine de liaison à Ras (RBD) et le domaine riche en cystéines (CRD), CR2 est le domaine de régulation et CR3 est le domaine kinase. Au niveau structural, la partie N-terminale est composée des domaines CR1 et CR2 qui forme la boucle d'activation. La partie C-terminale comprend le domaine kinase (46).

Les isoformes de Raf possèdent des localisations tissulaires et subcellulaires différentes suggérant des fonctions différentes de celles-ci (47). En particulier, B-Raf et C-Raf sont exprimées de façon ubiquitaire contrairement à A-Raf. De plus, A- et C-Raf sont localisées de façon stable ou transitoire dans les mitochondries ce qui suggère leur rôle dans la régulation de l'apoptose (31).

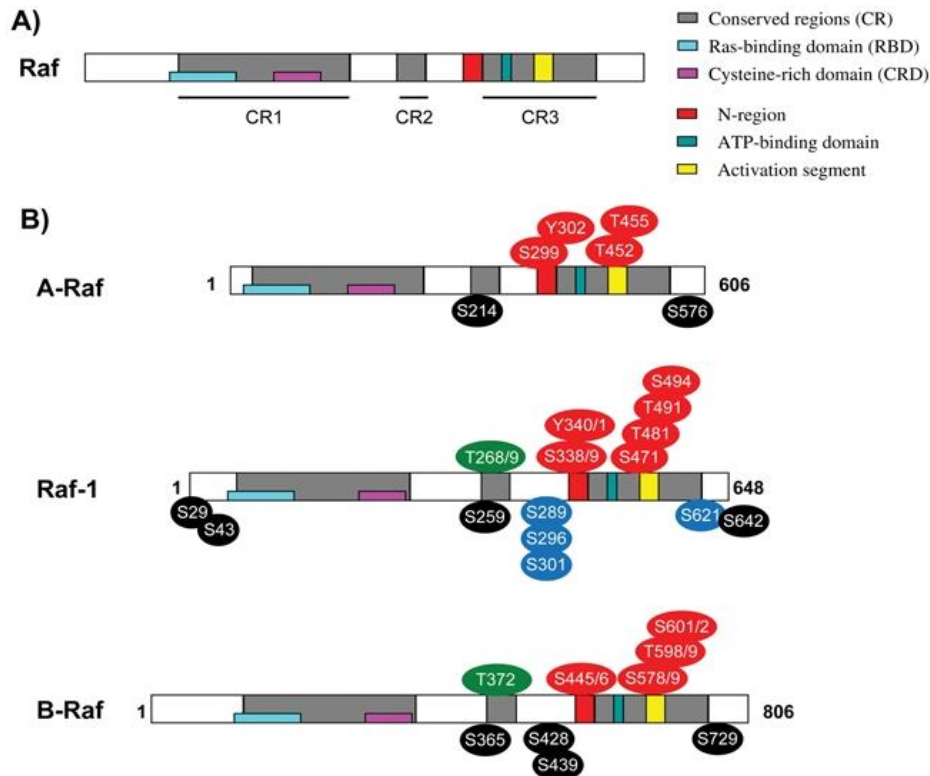


Figure 11: Représentation schématique de la structure conservée des protéines Raf (25) Les 3 isoformes de Raf : A-Raf, B-Raf et Raf-1 ou C-Raf partagent 3 régions conservées CR1, CR2 et CR3. CR1 contient le domaine de liaison à Ras (RBD) et le domaine riche en cystéines (CRD) indispensable au recrutement de Raf à la membrane. CR2 est un domaine riche en sérine/thréonine et CR3 est le domaine catalytique kinase. Les principaux sites de phosphorylations impliqués dans la régulation de Raf sont conservés et indiqués. Les autres sites de phosphorylations non conservés sont marqués d'un astérisque (47).

3.2. Fusion KIAA1549, B-Raf

La fusion des gènes KIAA1549 et B-Raf entraîne une perte du domaine N-terminal de B-Raf et conserve son domaine tyrosine kinase. L'expression du gène de fusion est conditionnée par son extrémité 3', identique aux premiers exons de KIAA1549. Le niveau d'expression de la protéine de fusion est faible et très proche de celui de la protéine KIAA1549. L'activité tyrosine kinase de la protéine de fusion devient indépendante des effecteurs et régulateurs de B-raf (9).

La voie des MAPK était activée dans 82% des cas soit par le gène de fusion KIAA1549:BRAF, soit par une mutation du gène NF1, soit par une mutation de BRAF (Figure 12) (17).

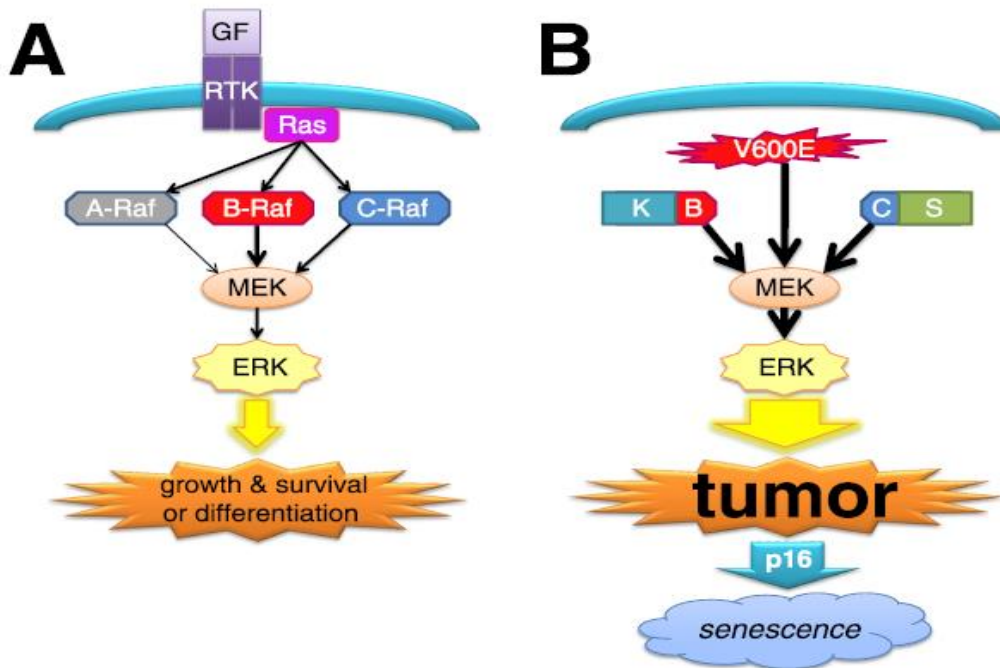


Figure 12: Représentation schématique de la voie de signalisation de MAPK et la fusion de KIAA1549, B-Raf (23).

Sept transcrits de fusion KIAA1549-B-Raf différents ont été décrits, impliquant les exons 15, 16, 18 ou 19 du gène KIAA1549 et les exons 9, 10 ou 11 du gène B-Raf. Le transcrit de fusion retrouvé avec la plus grande fréquence dans les astrocytomes pilocytiques implique les exons 1 à 16 du gène KIAA1549 et les exons 9 à 18 du gène B-Raf (KIAA1549-E16_E9-B-Raf) (transcrit de fusion nommé 16_9 (Figure13), Il représente, selon les séries, 49 à 62% des transcrits détectés. Les autres transcrits de fusion impliquant ces deux gènes sont, par ordre de fréquence, les transcrits 15_9 (22 à 35%), 16_11 (8 à 12%), 15_11 (6%), 18_10 (<1%), 17_10 (<1%), 19_9 (<1%) (47).

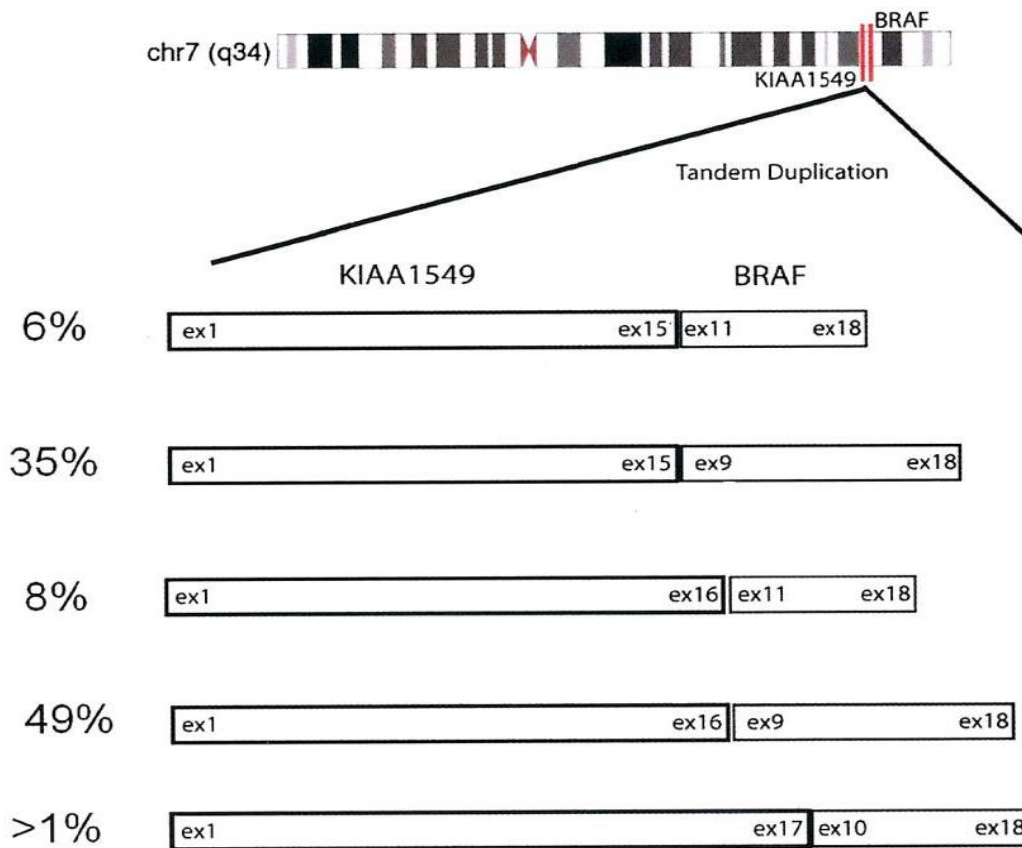


Figure 13 : Différents transcrits de fusion KIAA1549, B-Raf et leur fréquence (9).

La fusion KIAA1549-BRAF est la plus fréquente des altérations moléculaires rencontrées dans les astrocytomes pilocytiques (**Tableau II**)

BRF Alteration	BRF Location			
	Cerebellum	Supratentorial	Noncerebellar Infratentorial	Optic Nerve
B-K fusion	74.2%	33.2%	50.6%	54.2%
V600E	2.9%	17.9%	1.6%	15.0%

BRF Alteration	BRF Histology					
	PA	PMA	PXA	GG	DA	HGG
B-K fusion	66.6%	50.0%	0.0%	21.2%	11.9%	0.0%
V600E	5.7%	7.7%	73.8%	19.2%	9.7%	13.1%

Tableau II: Fréquences de Fusion KIAA1549, B-Raf et la mutation de B-Raf V600E dans les gliomes pédiatriques (23).

III.3.3. Mutation B-Raf V600E

La mutation V600E (nommée auparavant V599E) de B-Raf la plus fréquemment observée dans les cancers (**Tableau III**) se situe dans la boucle d'activation et induit une activation constitutive de B-Raf. Une fois activées, B-Raf et C-Raf phosphorylent les deux isoformes de MEK : MEK-1 et MEK-2 sur ses deux résidus sérines respectivement 218/222 et 222/226 tandis que A-Raf active seulement MEK-1 (47).

C'est une mutation de transversion d'une thymine en adénine au 1799^{ème} nucléotide conduisant au remplacement d'une valine (V) par un glutamate (E) au niveau du codon 600. La mutation est située entre les résidus T599 et S602 de la région CR3, où se produit la phosphorylation responsable de l'activité de BRAF. Ainsi, la mutation V600E induit une activation constitutive de la protéine conduisant ainsi à la phosphorylation des protéines de la cascade sous-jacente (32).

Type tumoral	Nature des altérations de BRAF	Fréquence des altérations (%)
Adénocarcinomes		
Papillaire thyroïde (3)	p.V600E (98%), autres	49,4
Colorectal (4, 5)	p.V600E (99%)	7,9; 6,5
Pulmonaire (6)	p.V600E (50%), G469A (39%), D594G (11%)	3
Tumeur séreuse borderline de l'ovaire (7)	p.V600E	30
Cancers non épithéliaux		
Mélanome (8)	p.V600E (85%), pV600K (9%), autres	41
Sarcome: GIST (9)	p.V600E	2-3*
Tumeurs du SNC		
Xanthoastrocytome pléomorphe (10)	p.V600E	66
Gangliogliome (10)	p.V600E	18
Astrocytomes pilocytiques (11)	Duplication en tandem 7q34 → fusion KIAA1549:BRAF	82
Hémopathies		
Leucémie à tricholeucocytes (12)	p.V600E	100
Histiocytose à cellules de Langerhans (13)	p.V600E	57
Myélome (14)	p.V600E, p.K601N, p.G469A	4

Tableau III : Nature et fréquence des altérations de B-Raf en fonction du type de cancer (19)

4. Marqueur de prolifération cellulaire Ki-67

4.1. Historique et définition

L'antigène Ki-67 a été découvert par « Johannes Gerdes et collègues » en 1983 (44), étudié à l'aide de l'anticorps anti-ki67/MIB-1 (15), dont le nom provient de l'association de "Ki", abréviation issue du nom de la ville où furent réalisés les travaux de Gerdes (Kiel) et du nombre "67", correspondant à la localisation du clone originel sur la plaque 96-puits dans laquelle il a été isolé (44)

La caractérisation du profil de marquage obtenu avec l'anticorps monoclonal Ki-67 (3) détecte un antigène nucléaire présent pendant tout le cycle cellulaire au cours des phases G1, S, G2, ainsi que durant la phase M de mitose, sauf la phase quiescente (G0) (26, 29).

4.2. Structure et fonction

Le gène Ki-67 est situé sur le chromosome 10q26.2 à partir de 128096659 Pb, jusqu'à 128126204 Pb, il est constitué de 15 exons et 14 introns (26).

L'antigène Ki-67 correspond à une molécule protéique non-histone, dont deux isoformes respectivement de 320 et 359 kDa ont été isolées. D'un point de vue structural, les deux isoformes protéiques posséderaient plusieurs sites potentiels de phosphorylation ainsi qu'un site de liaison éventuel au GTP (guanoside triphosphate) ou à l'ATP (adénoside triphosphate), à son extrémité carboxy-terminale. Par ailleurs la protéine porte également deux signaux de translocation nucléaire (26,3).

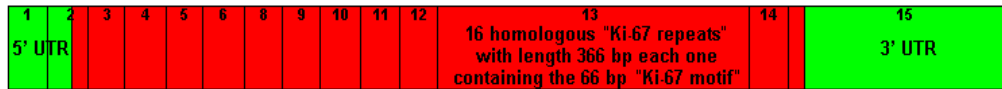
Les deux isoformes, différant par un segment d'environ 40 kDa, sont issues d'un épissage alternatif de l'ARNm issu du gène Ki-67. Toutes deux présentent également une partie centrale très grande, constituée d'un motif 16 fois répété, qui devrait pouvoir former une hélice de type α . Ces motifs sont riches en résidus aminés cystéine, responsables du caractère fortement basique de ces sites. La séquence de ce motif est phylogénétiquement très conservée dans les différentes espèces, témoin de l'importance de son rôle fonctionnel. Ce motif central correspond au site de reconnaissance de la plupart des anticorps reconnaissant spécifiquement le Ki-67 (Figure 14) (3).

MKI67 mRNA and Protein

Long type mRNA containing the 7th exon



Short type mRNA missing the 7th exon



MKI67 protein

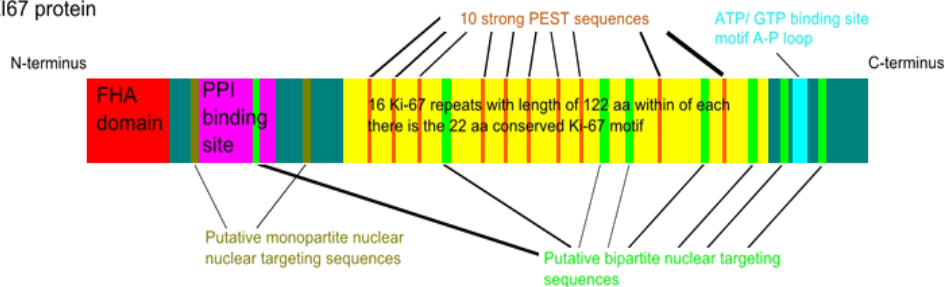


Figure 14: Représentation schématique de la structure de l'antigène Ki-67 (26)

La fonction précise de l'antigène Ki-67 n'est pas encore aujourd'hui totalement élucidée. Les premières études visant à préciser le rôle de cette protéine ont suggéré que l'antigène Ki-67, n'étant pas physiquement lié à l'ARN mais semblant associé à l'ADN et aux protéines non histones, pourrait faire partie de l'enveloppe chromosomique et serait impliqué dans la structuration des chromosomes (3, 26).

Il a été également suggéré que l'antigène Ki-67 pourrait être un facteur de régulation de l'activité transcriptionnelle des gènes liés à la prolifération, jouant un rôle de régulateur, mais pas d'initiateur, de la division cellulaire (3).

4.3. Expression

L'antigène Ki-67 n'est pas détecté dans des cellules quiescentes ou en phase G₀, mais sa présence peut être mise en évidence au cours des différentes phases du cycle cellulaire, Sa quantité est de toute façon maximale en début de mitose pour décroître ensuite (26), Sa demi-vie très brève, estimée à environ 20 minutes ; il est ainsi très vite et totalement catabolisé après la fin de la mitose. Cette demi-vie courte tient principalement à sa sensibilité aux

protéases, induisant sa dégradation métabolique rapide lorsque les cellules quittent le cycle (29,26).

La détermination de l'index de marquage Ki-67 a été généralement acceptée par la communauté des anatomo-pathologistes comme une technique fiable d'évaluation de la prolifération cellulaire tumorale (3).

L'antigène Ki-67 occupe une place importante dans l'évaluation pronostique des tumeurs humaines. Son intérêt a été ainsi étudié dans un grand nombre de types tumoraux différents (tumeurs mammaires, lymphomes malins, tumeurs cérébrales, hémopathies malignes, sarcomes des tissus mous, mélanomes, tumeurs pulmonaires, coliques, utérines, ovariennes, testiculaires, prostatiques, vésicales...)(3).

5. Le marqueur cytoplasmique β -caténine

5.1. Définition

Les caténines des jonctions d'adhérence : Il existe trois grandes familles de caténines:

- la sous-famille de β -caténine
- la sous-famille de l' α -caténine. Essentiels, ses composants ne s'associent pas directement aux cadhérines mais lient la β -caténine.
- la sous-famille de p120-caténine

Les plakophilines font aussi partie des caténines mais elles n'interagissent qu'avec les cadhérines desmosomales (41).

❖ La sous-famille de la β -caténine

Hormis la β -caténine, cette sous-famille comprend la plakoglobine ou γ -caténine, un homologue très proche de la β -caténine, principalement enrichie aux desmosomes mais pouvant se trouver parfois aux jonctions adhérentes. Les astrocytes expriment principalement la β -caténine mais également la plakoglobine, en moindre quantité. La β -caténine est une protéine cytoplasmique très conservée qui, contrairement aux cadhérines ou aux α -caténines,

n'est présente qu'en un seul exemplaire chez les vertébrés et les insectes. Elle n'a pas d'isoforme spécifique à certains tissus (41).

5.2. Structure et fonction

La β -caténine est une protéine d'environ 88 kDa chez l'homme. La structure primaire de cette protéine consiste en :

- ✓ **une région N-terminale** d'environ 130 acides aminés, région cruciale pour la régulation du niveau cytoplasmique de β -caténine,
- ✓ **une région centrale** de 550 acides aminés qui présente 12 répétitions du domaine ARM (Armadillo), assurant les interactions protéine-protéine et
- ✓ **une région C-terminale** de 100 acides aminés portant la fonction de transactivation (16).

- **La partie N-terminale de β -caténine** contient quatre résidus sérine et thréonine (Ser33, Ser37, Thr41 et Ser45 chez l'homme) hautement conservés entre les différentes espèces

- La kinase CK1 α (Casein Kinase 1 α) phosphoryle le résidu Ser45.
- La sérine/thréonine kinase GSK-3 phosphoryle les résidus Thr41, Ser37 et Ser33 de manière séquentielle.
- Les résidus Ser33 et Ser37 phosphorylés constituent le site de reconnaissance de β -caténine par la protéine β -Trcp, qui est un composant de la machinerie d'ubiquitination. Cette ubiquitination adresse β -caténine au protéasome pour sa dégradation (16).

-**La région centrale de β -caténine** présente 12 répétitions du domaine Armadillo

(ARM). Le domaine Armadillo est un type de motif répété de 42 acides aminés et replié en hélice α . Les différentes hélices sont elles-mêmes reliées par des boucles, ce qui confère à ce domaine une structure spatiale très allongée. Des mutants de délétion ont permis de montrer que la région de liaison de β -caténine aux cadhérines, à APC, aux facteurs Lef/Tcf, et à Mitf, entre autres, est localisée au niveau des domaines ARM (Figure 15).

- **La région C-terminale de β -caténine** porte la fonction de transactivation requise pour l'activation des gènes par le complexe β -caténine/Tcf (16).

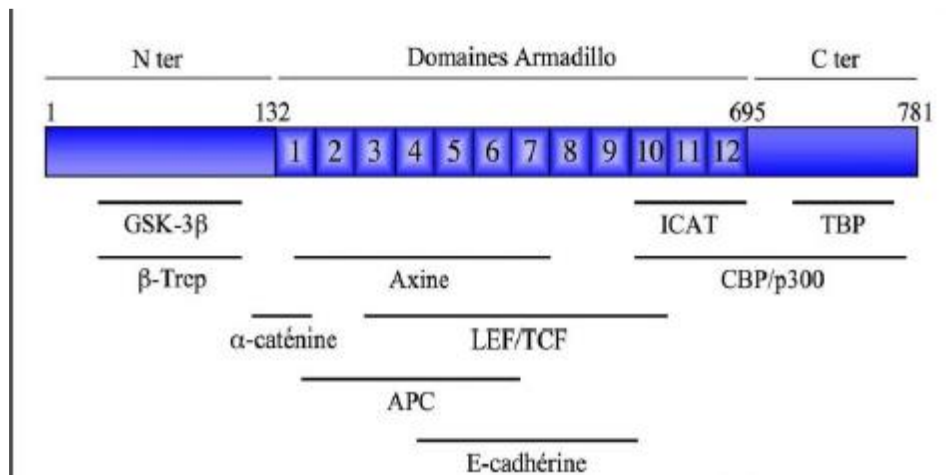


Figure 15: Structure de β -caténine et domaines d'interactions protéine/protéine.

Les 12 domaines Armadillo de la protéine β -caténine sont notés de 1 à 12. Les protéines interagissant avec β -caténine, ainsi que les domaines d'interaction sont indiquées par une ligne noire (16).

β -caténine ; une protéine multifonctionnelle

β -caténine est présente dans les différents compartiments de la cellule et joue des rôles différents en fonction de sa localisation subcellulaire (Figure 16).

- ✓ Au niveau membranaire, β -caténine est impliquée dans l'adhérence cellulaire en reliant les cadhérines aux filaments d'actine (16).
- ✓ Au niveau cytoplasmique, elle intervient dans la voie de signalisation Wnt/ β -caténine. L'altération de la signalisation Wnt/ β -caténine constitue un facteur crucial dans le développement des cancers, y compris dans la progression des gliomes (41).
- ✓ Au niveau nucléaire, β -caténine agit comme facteur de transcription, en association avec les facteurs Lef/Tcf (Lymphoid Enhancer Factor/T Cell Factor). Ce complexe est capable de réguler la transcription de différents types de gènes (16).

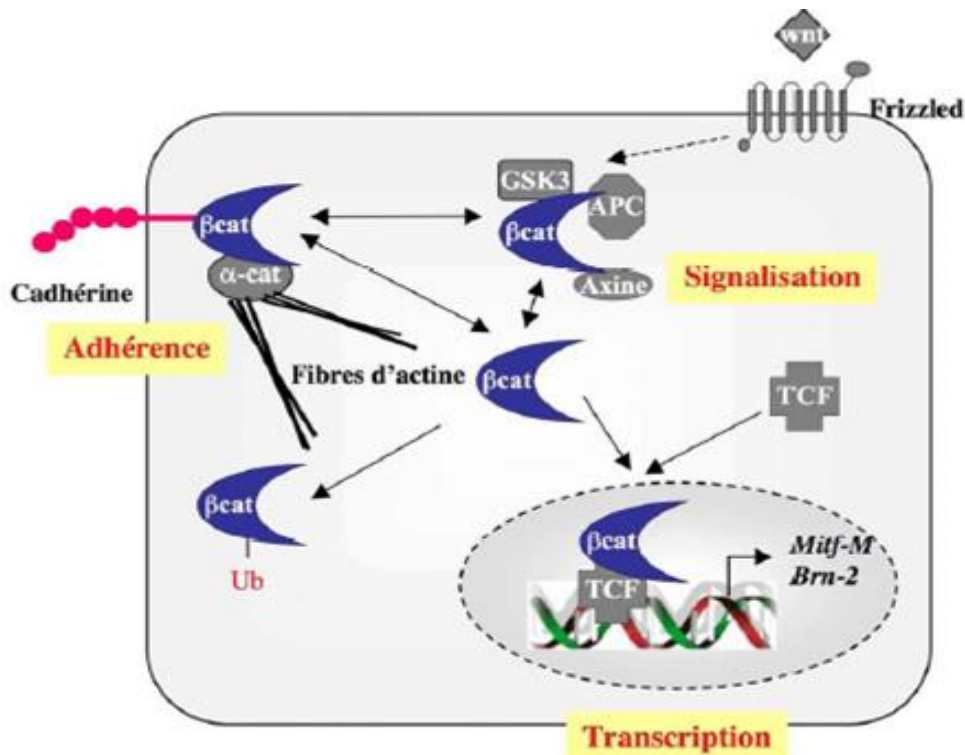


Figure 16: Multilocalisation et multifonctionnalité de β -caténine.

Les différentes fonctions de β -caténine dépendent de sa localisation subcellulaire. À la membrane, la β -caténine est associée aux cadhérines et est ainsi impliquée dans l'adhérence cellule-cellule. Dans le cytoplasme, elle est impliquée dans la voie Wnt, associée à GSK3 β /Axine et APC. Dans le noyau, elle interagit avec les facteurs Lef/Tcf pour réguler la transcription de ses gènes cibles (16).

5.3. La voie de signalisation wnt/ β -caténine

Plusieurs voies de signalisation sont activées par la famille des facteurs Wnt. Ces cascades de signalisation régulent de façon importante le devenir des cellules : la voie Wnt/Calcium régule l'adhésion cellulaire et la motilité, la voie PCP (Planar Cell Polarity) régule la polarité planaire et les mouvements morphogénétiques et la voie canonique (encore appelée voie Wnt/ β -caténine) régule la prolifération cellulaire et la différenciation (41).

Au sein de la voie canonique, en présence de ligands Wnts, le récepteur Fz se dimérise avec son co-récepteur LowDensity Lipoprotein (LDL) receptor -related protein 5/6 (LRP5/6) qui est phosphorylé par Dvl. Il recrute le complexe Axin à la membrane qui ainsi séquestré ne peut plus phosphoryler la β -caténine. Celle-ci peut désormais s'accumuler dans le cytoplasme

puis passer dans le noyau où elle se fixe aux facteurs de transcription T Cell Factor (TCF) et Lymphoid Enhancer binding Factor 1 (LEF) puis à leurs éléments de réponses sur l'ADN. La fixation sur les éléments de réponses TCF/LEF entraîne la transcription des gènes cibles de la voie telle la cycline D1 ou la connexine 43 (Figure 17 B).

En l'absence du ligand Wnt, le complexe Axin composé des protéines Axin, du suppresseur de tumeur adenomatous polyposis coli (APC), de la caséine kinase1(CK1) et de la sérine/thréonine kinase Glycogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β), phosphoryle la β -caténine. Cette phosphorylation qui a lieu dans la partie N-terminale entraîne la reconnaissance de la β -caténine par une ubiquitine ligase β -Transducing Repeat-Containing Protein (β -Trcp) et provoque son adressage et sa dégradation dans le protéasome (2) (Figure 17 A).

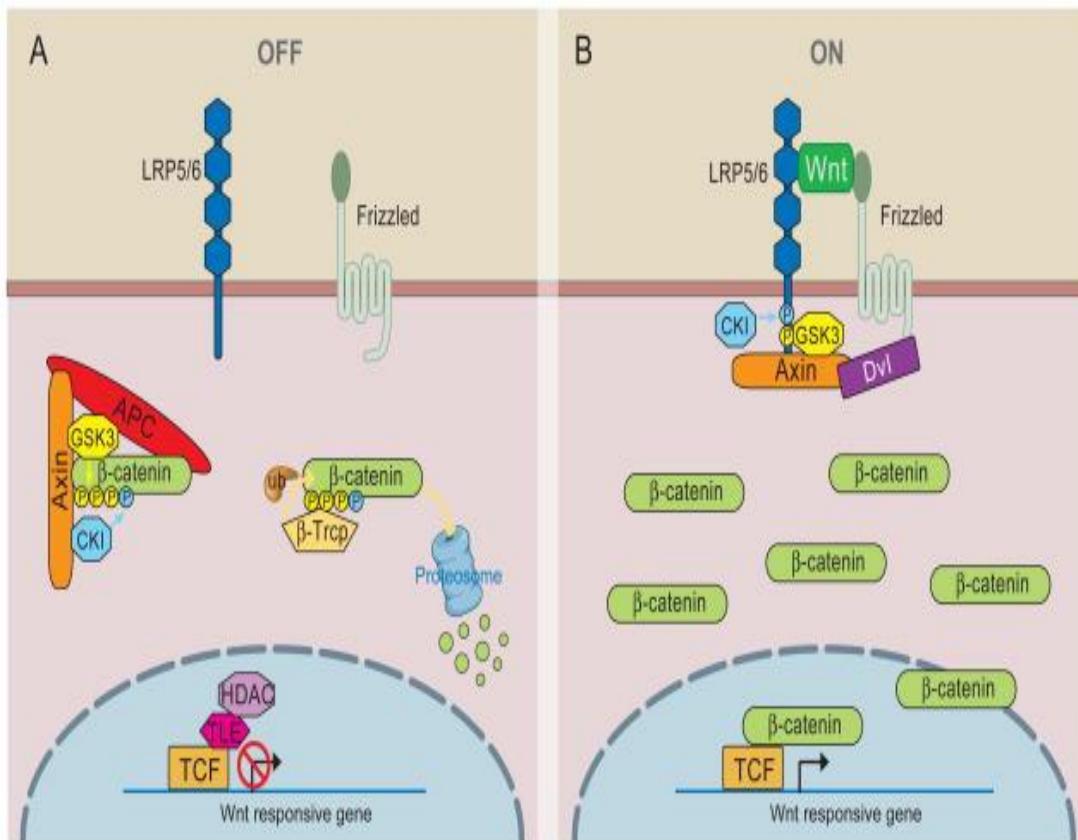


Figure 17 : Représentation de la voie de signalisation wnt/ β -caténine (6).

➤ La β -caténine dans les cancers

La β -caténine influence la progression tumorale via son rôle dans le complexe cadhérine/caténine, mais aussi, comme composant principal de la voie de signalisation Wnt. En présence de Wnt, la β -caténine est transloquée dans le noyau où elle active la transcription de nombreux gènes favorables au développement de la tumeur dont MYC, CCND1 et MMP7.

Les mutations, entraînant à la fois une perte de fonction et un gain de fonction de la β -caténine, sont des évènements fréquents dans les cancers humains. Elles ont pour conséquence d'altérer l'adhérence intercellulaire et d'activer la transcription de gènes oncogéniques, deux mécanismes favorables à la progression tumorale (41).

5.4. Implication de la β -caténine dans la dérégulation des astrocytes

L'activation des astrocytes

Suite à une lésion du SN, les astrocytes subissent une prolifération, et une différenciation significative ; c'est l'activation des astrocytes « astroglie ». Ce processus est étroitement régulé, rapidement initié et immédiatement fini quand la réparation est achevée (54,41).

L'induction de ce processus conduit à la production de trois populations des astrocytes, dont chacun contribue aux changements de prolifération, de migration, et de différenciation cellulaire :

- Le 1^{er} groupe est constitué de cellules migratrices réactives caractérisé par des changements impliquant leur différenciation et leur activation, et en particulier leur forte expression de GFAP, un marqueur bien connu des astrocytes réactifs.
- Le 2^{ème} groupe est constitué de cellules prolifératives avec des propriétés analogues à ceux des cellules souches.
- Le 3^{ème} groupe est constitué de cellules quiescentes situées le plus loin de la plaie, sans changements identifiables en réponse à la blessure (54).

Une fois que la réparation est terminée, les astrocytes réactifs reviennent à cet état de quiescence (Figure 18 A).

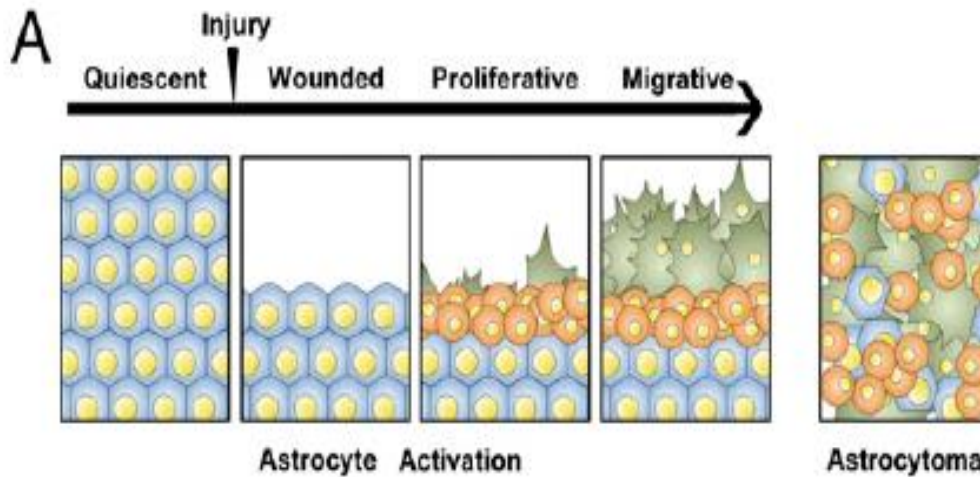


Figure 18 A : Représentation schématique de la chronologie des changements des astrocytes suite à la blessure : Après que les cellules quiescentes (cellules en bleu) sont blessées, ils réagissent par une prolifération (cellules rondes en orange), une différenciation et une migration dans l'espace créé par la blessure (cellules spiculés en vert). Dans les astrocytomes des changements similaires sont trouvés mais d'une manière dérégulée (54)

La β -caténine est la molécule initiatrice de l'activation des astrocytes

Dans la membrane cellulaire, il existe des complexes responsables de l'adhésion et la communication entre cellule-cellule tel que, le complexe cadhérine-caténine. Ainsi la déstabilisation de la membrane entraîne la déstabilisation de ces complexes (54).

La β -caténine a été reportée comme un important régulateur du phénotype migratoire des cellules épithéliales après une lésion.

D'après Yang et al. Le taux de la β -caténine est élevé à 1h et 4h après la blessure des astrocytes, et il est réduit dans les liaisons membranaires (54).

Ces résultats indiquent que la lésion des astrocytes provoque la déstabilisation et la phosphorylation de la β -caténine dans la membrane cellulaire, sa translocation nucléaire, et l'initiation de l'activation des astrocytes (Figure 18 B). En outre, la réduction de ses fonctions résulte en une diminution de la réponse à la blessure (54).

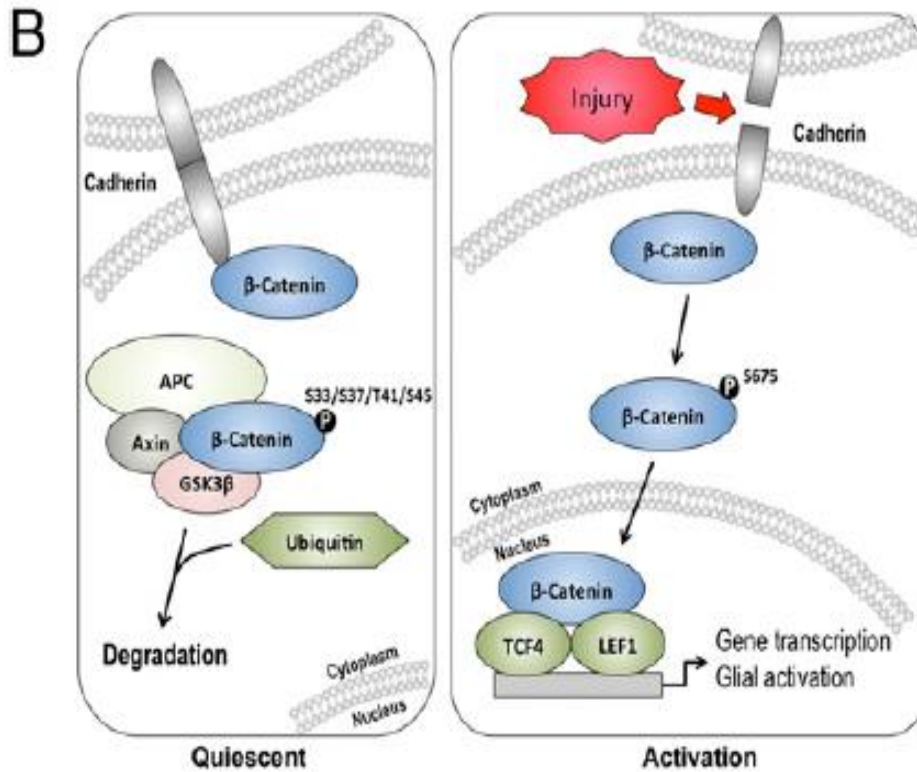


Figure 18 B : A gauche astrocytes au repos, la β -caténine est liée aux complexes d'interactions cadhérine-cadhérine à la surface de la membrane cellulaire entre les cellules adjacentes, la β -caténine est phosphorylée dans le cytoplasme au niveau des résidus spécifiques par des kinases tels que la GSK3, et ensuite dégradée par le protéasome.

A droite astrocytes après lésion mécanique, les interactions cadhérine-cadhérine sont interrompues et la β -caténine est dissociée de ces complexes membranaires, la phosphorylation de la β -caténine sur la ser-675 permet son éviction à la dégradation par le protéasome, et sa translocation de la membrane cellulaire vers le noyau où elle favorise la prolifération cellulaire par l'activation de gènes tels que TCF4 et LEF1(54)

La dérégulation de la signalisation médié par la β -caténine joue un rôle dans la pathogenèse des astrocytomes

La dérégulation des mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation des astrocytes pour la réparation tissulaire pourrait contribuer à la pathogenèse des astrocytomes, plus précisément la dérégulation de la voie de signalisation de la β -caténine impliquée dans l'activation des astrocytes pourrait entraîner la perte fonctionnelle de l'inhibition de contact ce qui résulte en un phénotype invasif dans les néoplasies

Donc, le processus de l'activation des astrocytes est étroitement lié au mécanisme de la pathogenèse et progression tumorale des astrocytomes (54).

Chapitre II
Etude pratique

I. Population d'étude

Notre étude a été effectuée au niveau du service de Neurochirurgie et du laboratoire d'Anatomie cytopathologie du CHU Mustapha Bacha à Alger de Janvier à Juin 2016.

Il s'agit d'une étude rétrospective portant sur 10 enfants atteints d'astrocytome pilocytique durant la période de 2006 jusqu'à 2014 (voir annexe I).

Les objectifs de cette étude sont de déterminer :

- ❖ Les éléments du diagnostic des AP.
- ❖ La place du marqueur de prolifération Ki-67 dans les récives des AP.
- ❖ Le rôle de la β -caténine dans le diagnostic différentiel des AP.

Les paramètres étudiés sont :

- ◆ L'âge du malade.
- ◆ Le sexe.
- ◆ Le siège anatomique.
- ◆ La symptomatologie de l'AP.
- ◆ L'étude histologique.
- ◆ L'étude Immuno-histochimique.

II.1. Matériel

Deux matériels ont été nécessaires. L'un biologique représentant les prélèvements tissulaires et l'autre est représenté par les instruments et les réactifs utiles.

1.1. Matériel non biologique (voir annexe II)

Appareillages	Autre matériel utilisé	Produits divers
Microscope photonique Appareil d'inclusion en paraffine Bain marie ou plaque chauffante Appareil de circulation Étuve thermostatif Microtome Plaque de refroidissement	Micropipettes réglables et cônes adéquats Minuterie Tubes à hémolyse Portes lames Bacs et paniers à coloration Lames + lames silanisées et lamelles	Fixateur : formaldéhyde à 10%. Eau, alcool, paraffine, xylène, Eukitt Colorants : Bain à l'hématéine, Bain à l'éosine Solutions de lavage Système de détection et chromogène Diluants pour anticorps Réactif de blocage du peroxyde Réactif de blocage de l'avidine

1.2. Matériel biologique

Représenté par des biopsies et des pièces d'exérèse tumorale. Ainsi le tissu tumoral prélevé est soumis aux techniques histologiques usuelles pour la confection des blocs d'inclusion en paraffine.

Les coupes effectuées sur des blocs sont colorées par l'hématéine /Eosine pour l'étude histologique de routine, puis imprégnés par des anticorps spécifiques pour l'étude immunohistochimique.

II.2.Méthodes

2.1. Technique histopathologique

➤ Principes de la technique

C'est le recueil de fragments tissulaires qui sont découpés pour permettre la réalisation de fines tranches colorées à l'HES pour analyse morphologique au microscope optique.

➤ **L'analyse morphologique** est l'étude de l'architecture des tissus, des contours des cellules, des noyaux pour permettre un diagnostic.

Le plus souvent, le matériel histologique est fixé, inclus, coupé et coloré afin de pouvoir l'observer au microscope. Le matériel peut être prélevé par biopsie ou provenir d'une pièce opératoire ou d'une autopsie

Examen macroscopique :

Première étape indispensable à l'étude de tout prélèvement

- Description, photographies, repérage des lésions.
- Préparation des prélèvements :
 - Repérage, orientation, étiquetage et identification
 - Choix du type de fixation ou de conservation.

La fixation :

Définition : immobiliser et conserver les cellules et l'architecture tissulaire, de façon aussi proche que possible de leur aspect à l'état vivant.

- ✓ Mise en œuvre rapide
- ✓ Durées adéquate (quelques heures à quelques jours).
- ✓ Choix du fixateur adéquat, fonction :
 - Technique complémentaires éventuelles
 - Taille du prélèvement
- ✓ En quantité suffisante pour la taille du fragment

Le fixateur (généralement le formaldéhyde= formol). La durée de la fixation varie selon le volume des prélèvements (de quelques heures pour un petit fragment biopsique à plusieurs semaines pour un cerveau humain entier).

Etapas après la fixation :

1- Préparation des blocs de paraffine

L'inclusion a pour but de permettre la réalisation de coupes fines et régulières. Le milieu d'inclusion le plus utilisé est la paraffine, Comme la paraffine est hydrophobe, le prélèvement doit d'abord subir une déshydratation.

❖ Déshydratation

C'est la première étape de circulation qui consiste à débarrasser le tissu de l'eau qu'il contient. Elle consiste à faire passer l'échantillon contenu dans les cassettes d'inclusion dans 7 (sept) bains d'alcool à concentration croissante 70°, 75°, 80°, 85°, 90°, 95° et 100° respectivement.

L'intérêt de la déshydratation est d'éliminer le fixateur.

Les échantillons sont par la suite passés dans deux bains de xylène pour subir l'éclaircissement.

La durée de chaque bain est de deux heures.

❖ Imprégnation

A cette étape l'espace qui était occupé par l'eau éliminée lors de la déshydratation va être remplacé par la paraffine liquéfiée ; donnant par conséquent une rigidité au tissu qui lui permet de garder sa forme interne au moment de la coupe.

L'imprégnation se fait par le passage des échantillons dans trois bains de paraffine liquéfiée à 54°C à une durée de deux heures pour chacun.

❖ Inclusion

L'enrobage du tissu imprégné permet la confection des coupes.

Une quantité de paraffine est versée dans le moule. L'échantillon imprégné est déposé délicatement puis la partie de la cassette qui va servir de support sur le microtome est déposée

au dessus par la suite une autre quantité de paraffine est rajouté a travers les grilles de la cassette .la paraffine une fois solidifiée après refroidissement sur la plaque; le bloc est démoulé.

Principe : fiche technique (voir annexe III).

2-Les coupes histologiques

Après avoir placé la cassette sur le support du microtome ; les blocs vont d'abord subir un dégrossissement afin d'éliminer le surplus de la paraffine (20µm). L'épaisseur de la coupe est réglée à 3µm pour obtenir un ruban de paraffine contenant le tissu.

3-Etalement et collage des coupes sur des lames de verre

Le ruban est par la suite étalé dans un bain marie à 37°C pour éviter les pliures. Les coupes dépliées sont récupérées du bain marie sur des lames ; ces dernières sont mises à sécher dans l'étuve à 66°C pendant 15 min.

4-Coloration des lames

Les colorations réalisées sur lames, accentuent les contrastes pour mieux reconnaître les différents éléments de la préparation. Comme les colorants sont en solution aqueuse, les coupes doivent d'abord subir une réhydratation. Celle-ci est effectuée après déparaffinage des coupes (par la chaleur et des bains de toluène) en immergeant les lames dans des bains d'alcool de degré décroissant puis dans l'eau distillée.

La coloration de routine est l'Hématéine-Eosine (H.E):

- **L'hématéine** qui colore les noyaux en violet
- **L'éosine** les cytoplasmes en rose.

Principe : fiche technique (voir annexe IV).

Le montage : les coupes colorées sont montées entre lame et lamelle avec utilisation d'une colle spéciale l'Eukitt.

2.2. Technique immuno-histochimique (IHC)

➤ Principes de la technique

L'immuno-histochimie (IHC) est une méthode de localisation des protéines (antigènes) dans les cellules d'une coupe de tissu ou d'un échantillon, par la détection d'antigènes au moyen d'anticorps. Cette technique exploite les liaisons spécifiques Antigène-Anticorps dans les tissus biologiques.

L'intérêt de cette technique est de repérer des antigènes (protéines le plus souvent) d'intérêt au niveau cellulaire ou extracellulaire à l'aide d'anticorps spécifiques.

- Un antigène est une molécule capable d'activer le système immunitaire et de conduire à la production d'anticorps.
- Un anticorps est une glycoprotéine, sécrétée par les plasmocytes, capable de se lier spécifiquement à l'antigène.

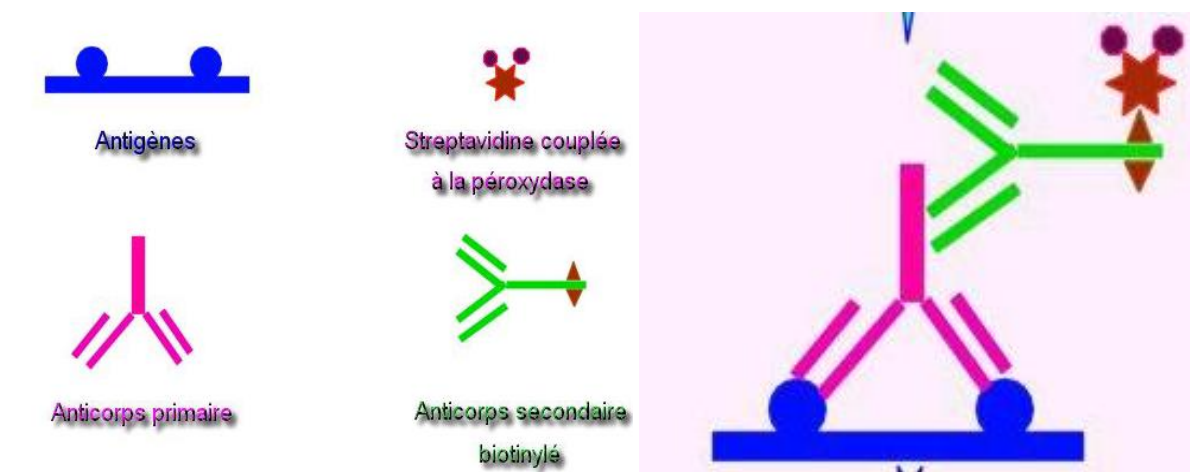


Figure 19 : Principe de l'immuno-histochimie.

Les antigènes recherchés :

- L'antigène Ki-67 est une protéine nucléaire, qui est définie par sa réactivité avec l'anticorps monoclonal provenant du clone MIB-1.
- la β -caténine est une protéine cytoplasmique reconnaît L'anti bêta-caténine, clone β -caténine-1

Les différentes étapes de la technique immuno-histochimie (IHC) : (voir annexe VI)

- 1- Déparaffinage et réhydratation dans 3 bains de xylène successifs de 10 minutes chacun suivi de 6 bains d'alcool absolu pendant 5 minutes chacun.
- 2- Blanchiment dans de l'eau distillée pendant 5 minutes
- 3- Démasquage des sites antigénique : son but est de remédier aux effets secondaires de la fixation formolée.
- 4- Blocage peroxydase endogènes en utilisant de l'eau oxygénée (H_2O_2) à 3% pendant 10 minutes puis rincer à l'eau distillée, puis plonger les lames dans un bain de tampon TBS pendant 5 minutes.
- 5- Application de l'anticorps primaire puis rinçage dans un bain de tampon TBS pendant 5 minutes.
- 6- Incubation avec l'anticorps secondaire biotinylé pendant 15 minutes, puis rincé dans un bain de tampon TBS pendant 5 minutes.
- 7- Systèmes d'amplification à la striptavidine biotine pendant 15 minutes, puis rincer dans un bain de tampon pendant 5 minute.
- 8- Révélation utilisant les chromogènes de peroxydase (l'AEC ou le DAB) pendant 2 à 10 minutes avec vérification des coupes au microscope puis rinçage à l'eau distillée.
- 9- Contre coloration à l'Hématéine de Mayer et montage avec lamelles.

- **Lecture :** (Annexe VII)

Chapitre III
Résultats et discussion

I. Résultats

Notre étude est portée sur 10 enfants âgés de 2 à 16 ans atteints d'astrocytome pilocytique, on a commencé par une étude clinique qui comporte : le sexe des malades, l'âge, la localisation de l'AP, les symptômes, les aspects radiologiques, et la chirurgie, suivi d'une étude anatomopathologique, ainsi qu'une étude immuno-histochimique dans le but de déterminer l'intérêt du marqueur de prolifération Ki-67 et la β -caténine dans le diagnostic et les récidives des AP.

1. Répartition en fonction du sexe

Notre série comporte 10 cas d'astrocytomes pilocytiques, avec une prédominance masculine : 6M / 4F.

Sexe ratio : M / F = 6/4= 1.5

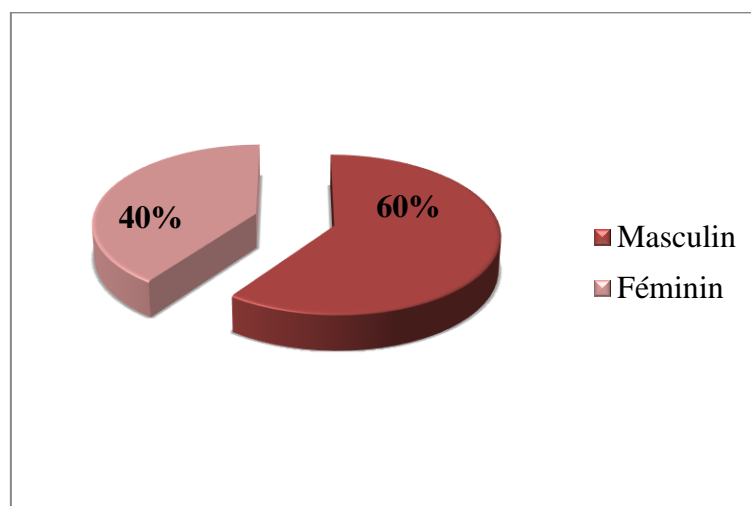


Figure 20 : Répartition de l'astrocytome pilocytique en fonction du sexe.

On remarque que l'AP est plus fréquent chez les garçons (60%) que chez les filles (40%).

2. Répartition en fonction de l'âge

Age médian de 6 ans avec un pic de fréquence entre 5 et 9 ans.

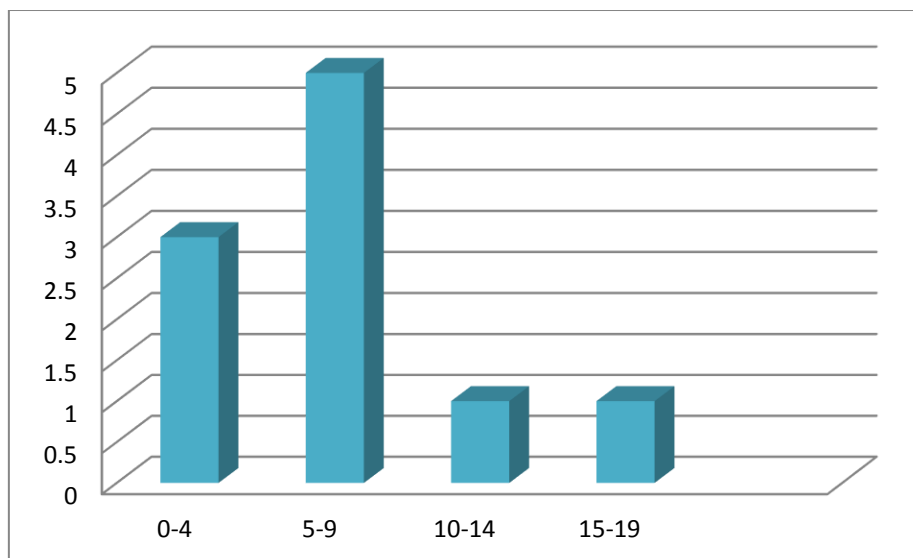


Figure 21 : Répartition selon l'âge.

L'âge des malades s'étend de 2 à 16 ans avec un âge médian de 6 ans et un pic de fréquence entre 5 et 9 ans.

3. Répartition selon la localisation

La majorité des astrocytomes pilocytiques (80%) de notre série se localisent au niveau de la Fosse Cérébrale Postérieure.

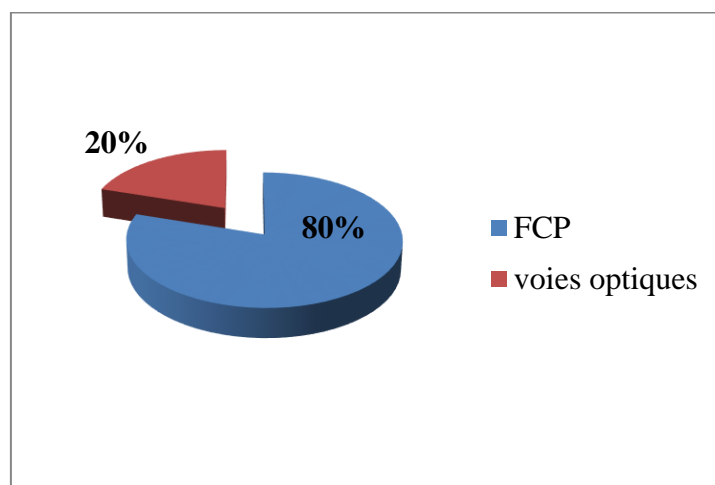


Figure 22 : Répartition selon la localisation.

L'AP de l'enfant est localisé préférentiellement au niveau de la FCP (80% des cas), et dans les voies optiques (20% des cas).

4. Symptomatologie de l'AP

L'association de plusieurs symptômes est observée chez la majorité des patients.

L'étude des symptômes montre que les signes de syndrome cérébelleux sont les plus fréquents (37.5%) ; ceci s'explique par la prédominance de la localisation de la FCP.

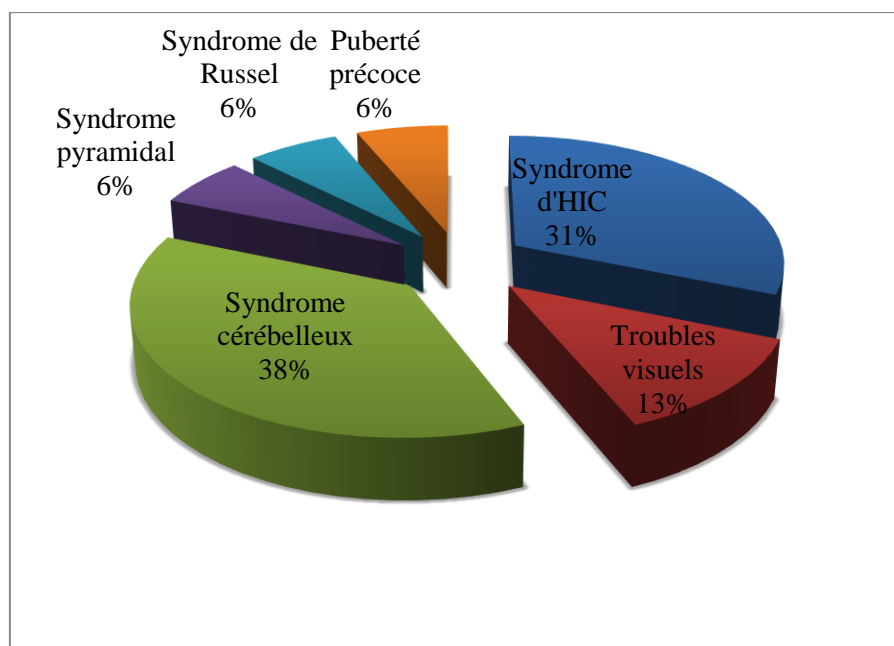


Figure 23 : Répartition selon la symptomatologie.

Les signes cliniques montrent que le syndrome cérébelleux représente 38%, le syndrome d'HIC 31%, les troubles visuels 13%, le syndrome pyramidal, le syndrome de Russel, et la puberté précoce 6%.

5. Répartition de l'AP selon l'aspect radiologique

Classiquement, l'astrocytome pilocytique se caractérise à l'imagerie par une image hétérogène : kystique et charnu (50%).

Tableau IV : Résultats de l'imagerie de l'AP.

Imagerie (IRM et/ou TDM)	Nombre de cas	Pourcentage
Hétérogène : kystique et charnu	5	50
Charnu	4	40
Kystique	1	10

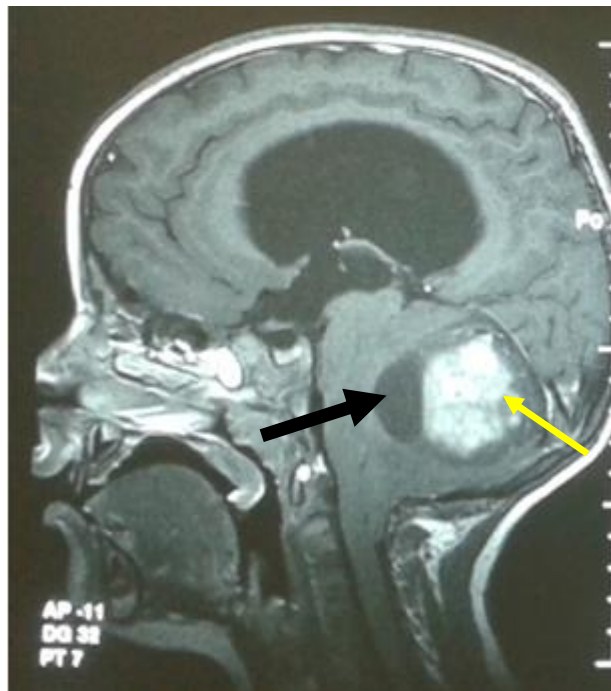


Figure 24 : Localisation cérébelleuse gauche d'un astrocytome pilocytique chez un patient âgé de 4 ans. Coupe IRM sagittale T1 après injection de gadolinium : Processus hétérogène à double composante kystique et charnu. **(Photo Originale)**.

La flèche noire indique la portion kystique et la flèche jaune montre la portion charnue

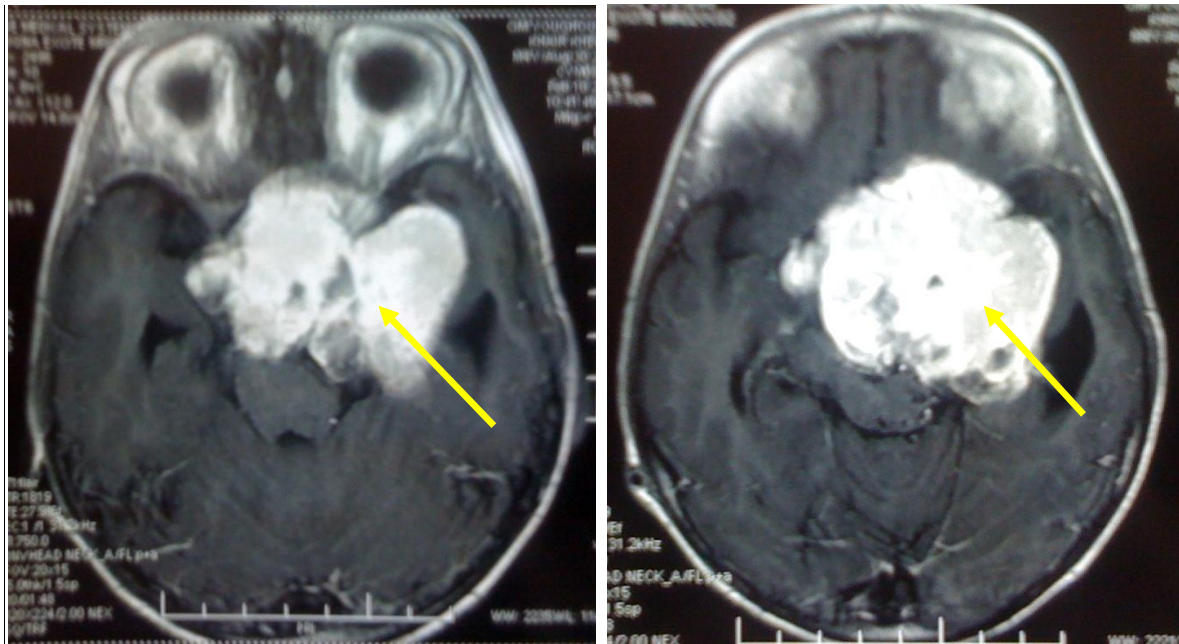


Figure 25: Localisation suprasellaire d'un astrocytome des voies optiques chez un patient âgé de 2 ans. Coupe IRM en T1 après injection de gadolinium : Volumineux processus charnu avec des foyers nécrotiques. **(Photo Originale)**

La flèche jaune indique le processus charnu.

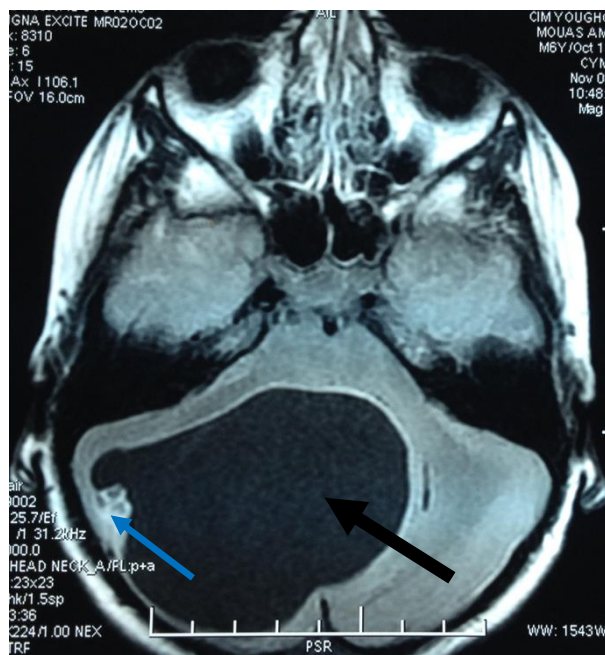


Figure 26: Localisation cérébelleuse droite d'un astrocytome pilocytique chez un patient âgé de 6 ans. Coupe IRM coronale T1 après injection de gadolinium : Processus expansif hémisphérique a composante kystique prédominante avec un bourgeon charnu. **(Photo Originale)**

La flèche noire montre la composante kystique, et la flèche bleue indique la présence d'un bourgeon charnu.

6. Chirurgie

Tableau V : Qualité d'exérèse (n : 10 cas)

Qualité d'exérèse	Nombre de cas	Pourcentage
Totale	7	58.33
Large	2	16.66
Partielle	2	16.66
Biopsie	1	8.33

❖ Evolution**1-Evolution favorable**

L'évolution a été favorable chez 6 patients soit 60%, marquée par l'amélioration de la symptomatologie initiale.

- ✓ 4 patients de localisation FCP ont bénéficié d'une exérèse totale sont vivant sans récurrence.
- ✓ 1 cas de localisation hypothalamo-chiasmatique dont la résection chirurgicale était partielle suivie de chimiothérapie.
- ✓ 1 cas de biopsie complété de chimiothérapie pratiquée sur une tumeur de siège voies optiques.

2-Récurrence

Parmi nos patients suivis, nous avons notés un seul cas de récurrence tumorale de localisation FCP soit 10%.

3-Reprise évolutive

La reprise évolutive a été notée chez 3 patients soit 30%.

- ✓ 2 cas de localisation FCP ayant bénéficié d'une exérèse large avec chimiothérapie adjuvante.
- ✓ 1 cas d'exérèse partielle pour la première chirurgie d'une tumeur de siège FCP.

7. Aspect microscopique

La prolifération néoplasique est d'architecture biphasique avec alternance :

➤ De zones plus ou moins denses faites de cellules allongées bipolaires, organisées en structures fasciculées parsemées de fibres de Rosenthal, formations ondulées fortement éosinophiles, et de corps granuleux.

➤ De zones lâches microkystiques, renfermant des cellules astrocytaires multipolaires, associées dans 2 cas à des proportions variables de cellules olig-like (20%).

La vascularisation est hyperplasique de type glomérulé, coexistant avec des vaisseaux à paroi hyalinisée.

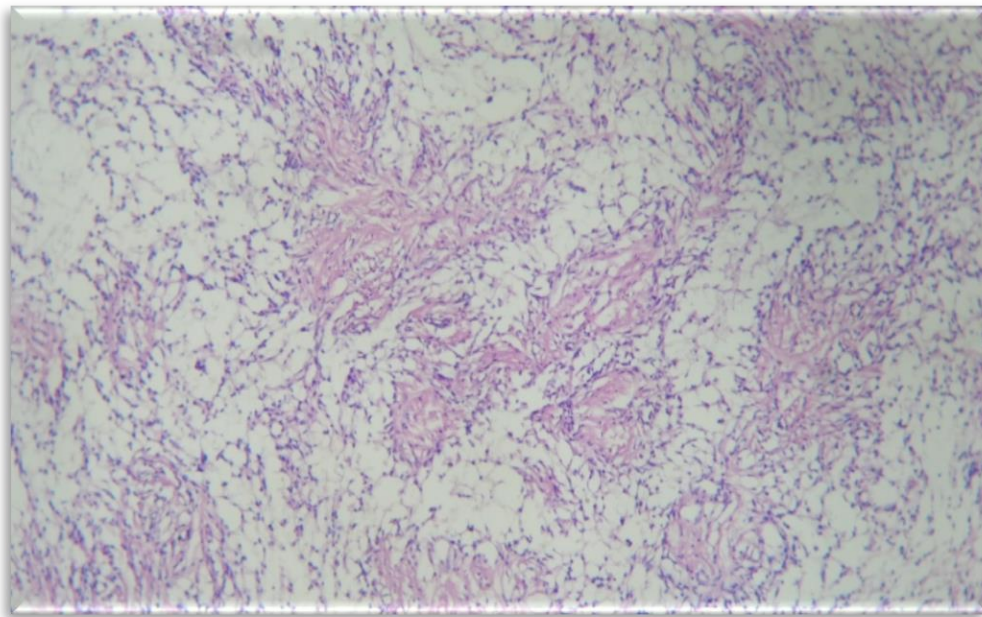


Figure 27 : Aspect microscopique (HE, Gx10) : Prolifération de nature gliale d'aspect biphasique alternant des zones compactes faite de cellules allongées bipolaires et des zones lâches microkystique. **(Photo Originale)**

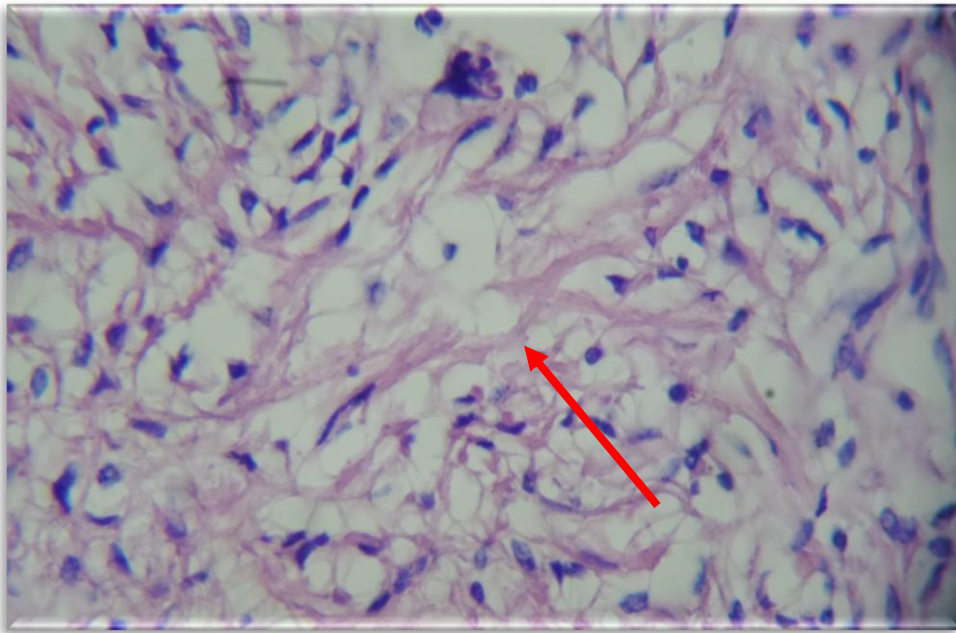


Figure 28 : Aspect microscopique (HE, Gx40) : Prolifération plus au moins dense de cellules allongées parsemées de formations ondulées fortement éosinophiles correspondant aux fibres de Rosenthal, et corps granulaires. **(Photo Originale)**

La flèche rouge indique les fibres de Rosenthal

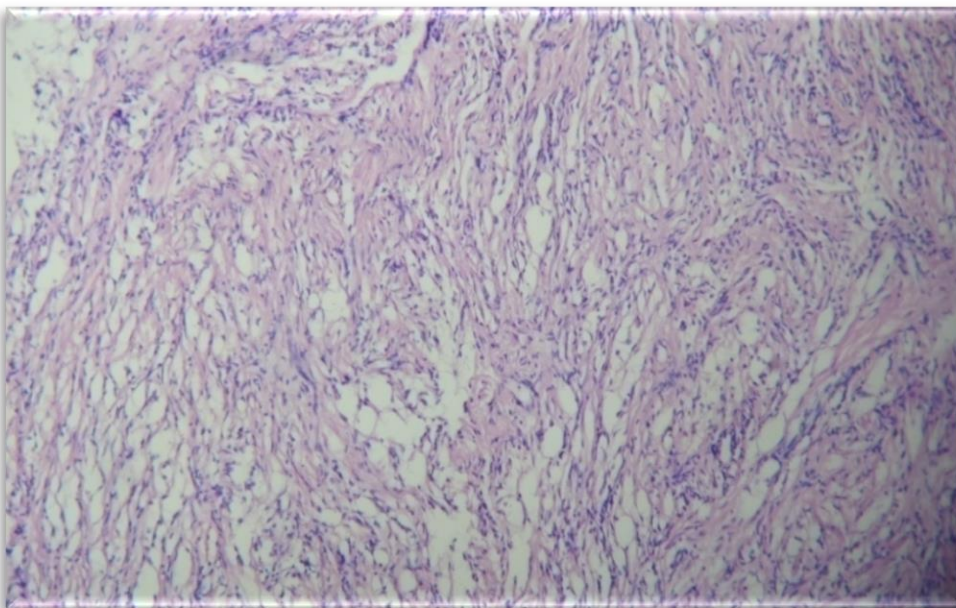


Figure 29 : Aspect microscopique (HE, Gx10) : Prolifération néoplasique faite de cellules allongées bipolaires, organisées en structures fasciculées. **(Photo Originale)**

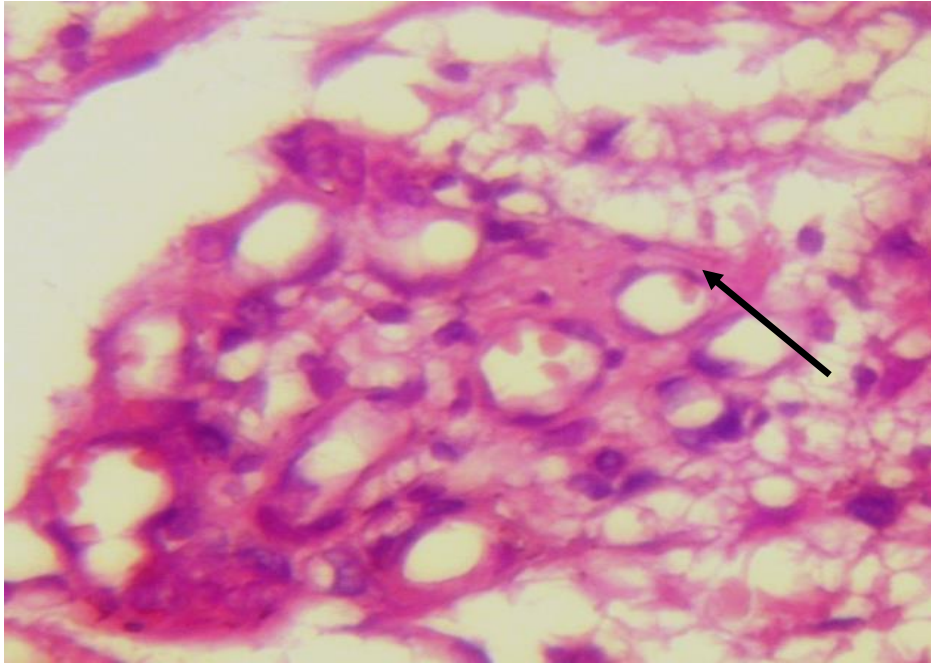


Figure 30 : Aspect microscopique (HE, Gx400) ; astrocytome pilocytique, vaisseaux glomérulés. (Photo Originale)

La flèche noire montre les vaisseaux glomérulés

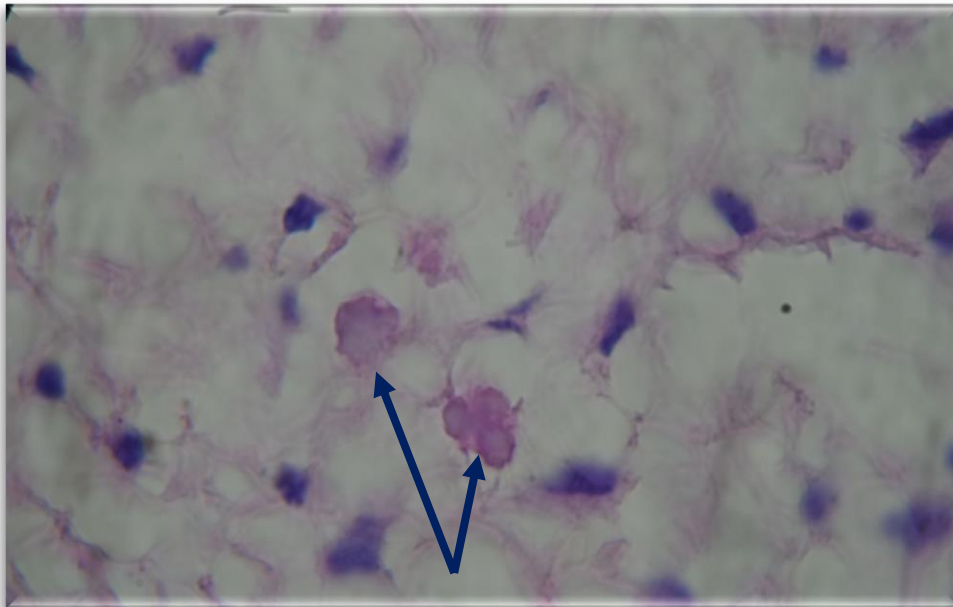


Figure 31: Aspect microscopique (HE, Gx100 avec huile d'immersion) : Corps granuleux éosinophiles. (Photo Originale)

Les flèches bleues montrent les corps granuleux.

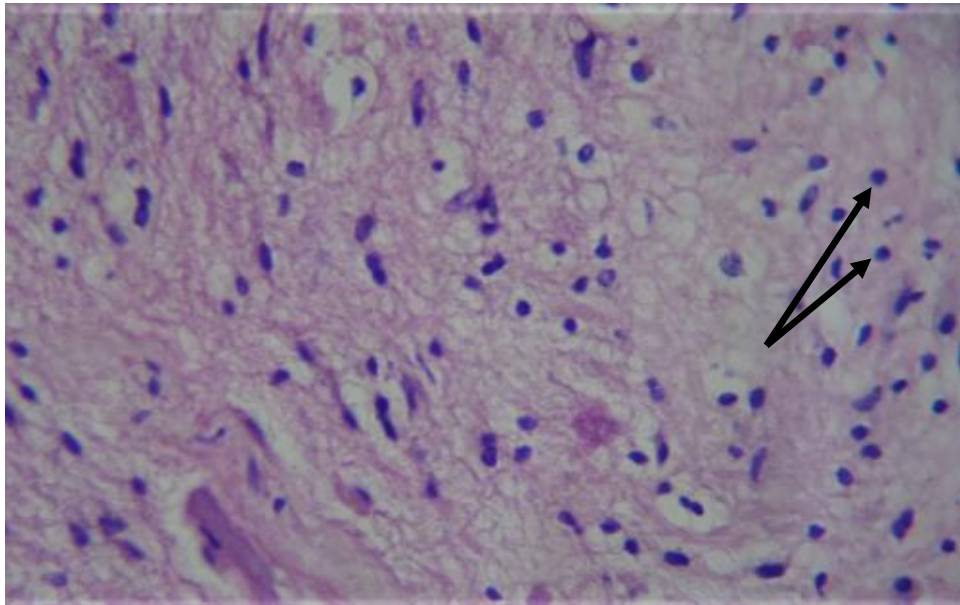


Figure 32: Aspect microscopique (HE, Gx40) : Prolifération tumorale biphasique composée d'un contingent astrocytaire, avec présence de Fibres de Rosenthal, et de corps granuleux, associé à une composante oligo-like. **(Photo Originale)**

Les flèches noires indiquent les cellules oligo-like.

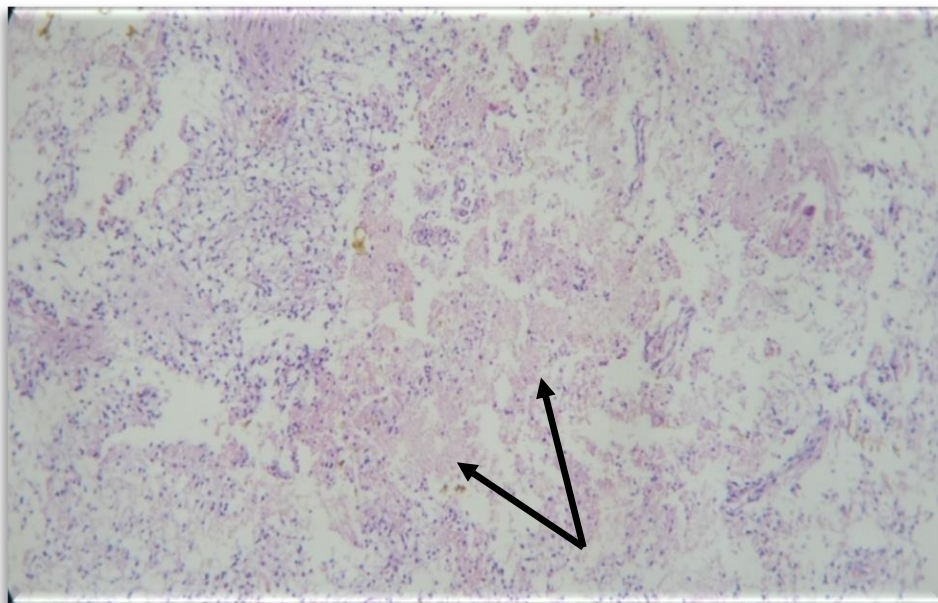


Figure 33 : Aspect microscopique (HE, Gx10) : Prolifération néoplasique présentant un aspect biphasique, associée à des zones de nécrose ischémique. **(Photo Originale)**

Les flèches noires montrent les zones de nécrose ischémique.

8. Résultats de l'immuno-histochimie

L'étude immuno-histochimique du Ki-67 et de la β -caténine a été réalisée sur les 10 cas après lecture histopathologique.

❖ Marqueur de prolifération cellulaire ki-67

L'immunomarquage nucléaire des cellules tumorales astrocytaires est dominé par une faible expression du Ki-67 (60% des cas), les résultats du Ki-67 sont considérés comme :

- ✓ 9 cas positifs entre 1% et 2%
- ✓ 1 cas négatif

Tableau VI: Résultats de l'expression du marqueur de prolifération cellulaire Ki-67

Ki-67	Nombre de cas	Pourcentage
Marquage faible : 1%	6	60
Marquage modérée : 2%	3	30
Négatif	1	10

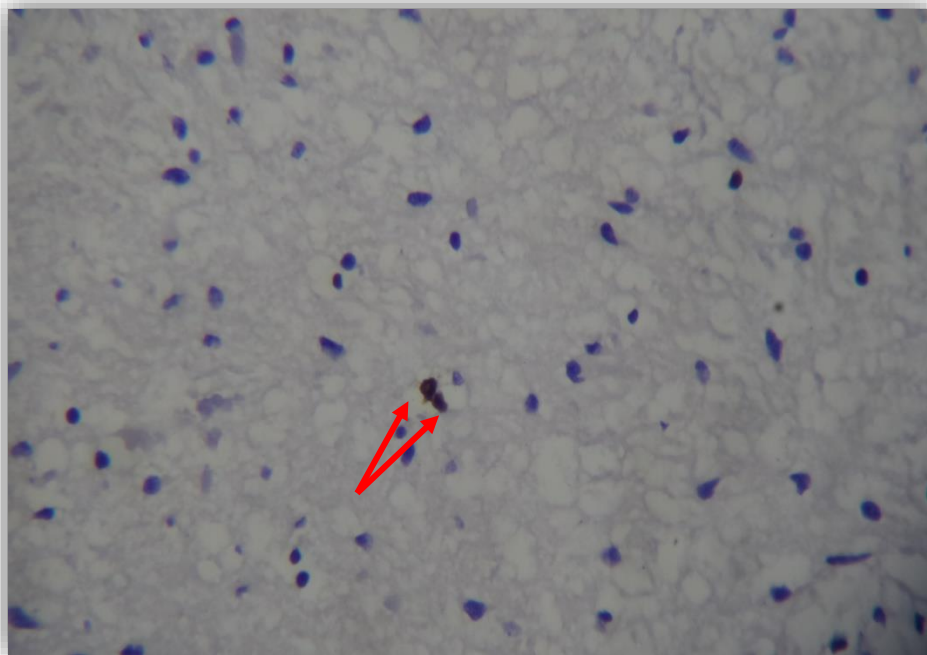


Figure 34 : Immunomarquage nucléaire anticorps anti Ki-67(Gx40) : Un index de prolifération modéré 2% des cellules tumorales. **(Photo Originale)**

Les flèches rouges montrent les cellules tumorales marquées par l'anticorps anti Ki-67

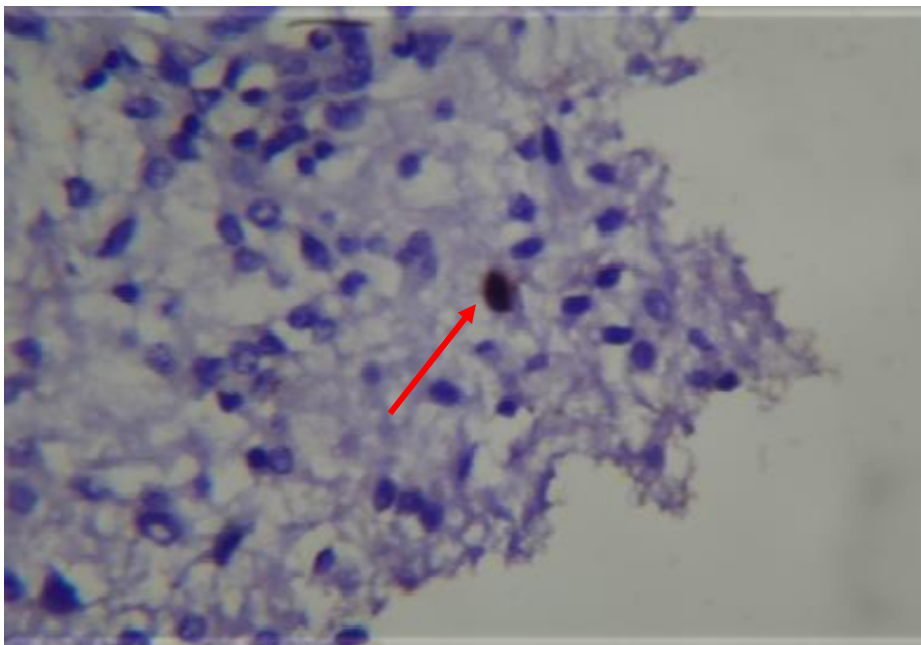


Figure 35 : Immunomarquage nucléaire anticorps anti Ki-67 (Gx40) : Un index de prolifération très faible 1%. **(Photo Originale)**

La flèche rouge montre les cellules tumorales marquées par l'anticorps anti Ki-67

Tableau VII: Corrélation entre l'expression du Ki-67 et l'évolution de l'astrocytome pilocytique

Ki-67	Récidive	Reprise évolutive	Pas de récurrence ni de reprise évolutive	Total
Faible : 1%	0	3	3	6
Modéré : 2%	1	0	2	3
Négatif	0	0	1	1
Total	1	3	6	10

Ces résultats indiquent que le taux faible (1%) du Ki-67 est identique pour les astrocytomes pilocytiques avec reprise évolutive (3 cas) et ceux sans reprise évolutive, ni récurrence (3 cas).

Il apparaît qu'il n'existe pas de corrélation entre l'intensité de l'expression du Ki-67 et la survenue de reprise évolutive et / ou de récurrence (d'après le test de Chi Deux).

❖ Marqueur cytoplasmique la β -caténine

L'immunomarquage de la β -caténine des cellules tumorales astrocytaires est dominé par une expression positive cytoplasmique diffuse modérée (70%).

Tableau VIII: Résultats de l'immunomarquage cytoplasmique de la β -caténine.

β -caténine	Nombre de cas	Pourcentage
Positivité intense	2	20
Positivité diffuse modérée	7	70
Positivité faible	1	10

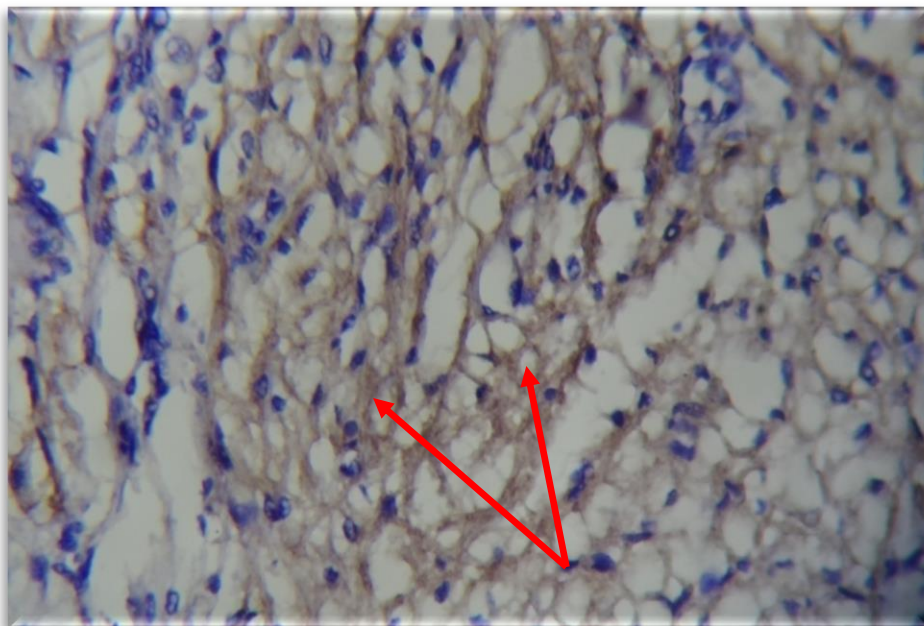


Figure 36 : Immunomarquage anticorps anti β -caténine (Gx40) : Positivité cytoplasmique diffuse modérée des cellules tumorale. **(Photo Originale)**

Les flèches rouges montrent les cellules tumorales marquées par l'anticorps anti β -caténine

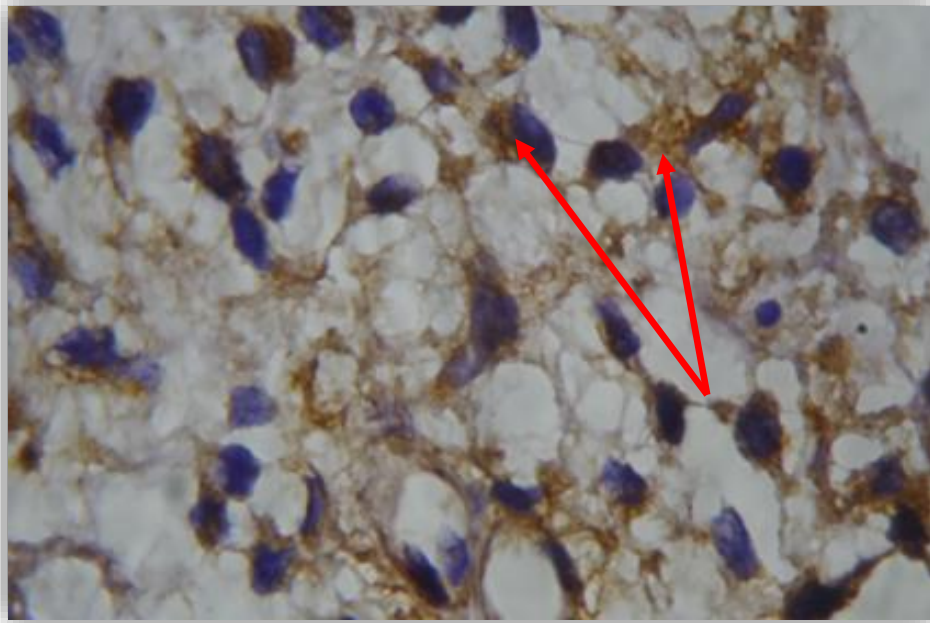


Figure 37: Immunomarquage anticorps anti β -caténine (Gx100 avec huile d'immersion) : Positivité cytoplasmique intense des cellules tumorales. (**Photo Originale**)

La flèche rouge montre les cellules tumorales marquées par l'anticorps anti β -caténine

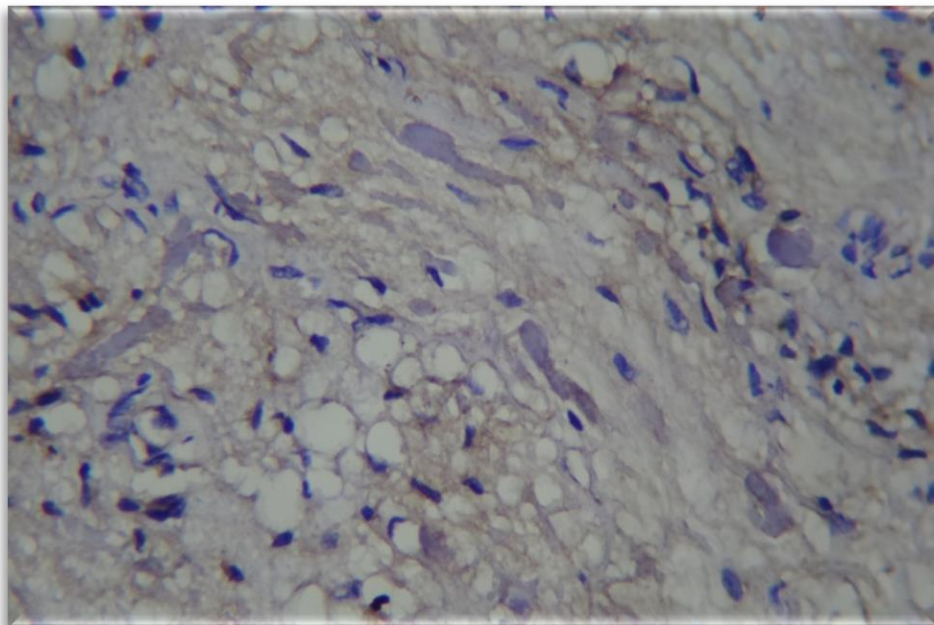


Figure 38: Immunomarquage anticorps anti β -caténine (Gx40) : Positivité faible cytoplasmique des cellules tumorales. (**Photo Originale**)

Tableau IX: Corrélation entre l'expression de la β -caténine et l'évolution de l'astrocytome pilocytique.

β -caténine	Récidive	Reprise évolutive	Pas de récurrence ni de reprise évolutive	Total
Positivité intense	1	0	1	2
Positivité diffuse modérée	0	3	4	7
Positivité faible	0	0	1	1
Total	1	3	6	10

L'expression cytoplasmique diffuse modérée de la β -caténine dans les formes des astrocytomes pilocytiques sans reprise évolutive et sans récurrence (4 cas) est presque égale aux formes avec reprise évolutive (3 cas).

Il apparaît qu'il n'existe pas de différence significative, et de ce fait l'expression de la β -caténine n'est pas corrélée à la survenue de reprise évolutive et/ ou de récurrence (d'après le test de Chi deux).

II. Discussion

L'astrocytome pilocytique est une tumeur bénigne classé en grade I par l'OMS, et elle est la plus fréquente des tumeurs du SNC observé chez l'enfant et le jeune adulte de 2 à 16 ans avec un pic situé entre 5 et 9 ans et un âge médian de 6 ans, ainsi qu'une prédominance masculine. Ces résultats sont proches des résultats de la série (10) dans la quelle les astrocytomes pilocytiques se situent dans une tranche d'âge de 0 à 19 ans, avec un pic de fréquence de 3 à 9 ans et une prédominance masculine.

La majorité des astrocytomes pilocytiques de notre étude se localisent au niveau de la Fosse Cérébral Postérieure (80%), puis les voies optiques (20%). Ces résultats sont supérieurs aux résultats de littérature (49,10), dans les quelles la Fosse Cérébral Postérieure représente (59.3%), et les voies optiques (3.12%) ; cependant notre série comporte peu de cas.

Le syndrome d'HIC représente le mode de révélation le plus fréquent (88%) alors que le syndrome cérébelleux vient en 2^{ème} (37.5%) selon certains auteurs (16). Par contre les résultats de notre étude montrent que le syndrome cérébelleux est le plus fréquent (37.5%), suivi du syndrome d'HIC (31.25%) ceci est probablement expliqué par la nette prédominance de la localisation de la FCP.

Sur le plan radiologique, les astrocytomes pilocytiques sont en règle générale des tumeurs bien limitées, présentant le plus souvent un aspect hétérogène comportant une portion kystique avec une portion charnue rehaussée par le produit de contraste (40, 32), ou bien ils peuvent être purement kystiques ou purement solides (9, 13).

La majorité des astrocytomes pilocytiques de notre étude présentent une composante hétérogène : kystique et charnue (50%) ce qui est comparable aux résultats de la littérature (8).

Du point de vue anatomopathologique, l'astrocytome pilocytique de l'enfant (ne diffère pas de l'adulte) se caractérise histologiquement par une architecture biphasique : des foyers tumoraux compacts constitués de cellules tumorales allongées et dotées de longs prolongements ondulés et sont parsemés de fibres de Rosenthal, alternant avec des foyers microkystiques comprenant des cellules astrocytaires associées à des cellules olig-like (20%), la vascularisation est riche faite de vaisseaux à paroi hyalinisée de type glomérulée ; une nécrose de type ischémique peut s'observer (53, 10).

Nos résultats se rapprochent de ceux de la littérature. La nécrose ischémique a été objectivée dans un seul cas.

L'activité mitotique et proliférative est l'un des éléments clés permettant de faire la part des choses entre les astrocytomes diffus de bas grade et les astrocytomes anaplasiques, mais dans l'astrocytome pilocytique de l'enfant elle est typique, elle n'augmente que si une transformation maligne est observée, le Ki-67 est un antigène nucléaire exprimé pendant toutes les phases du cycle cellulaire sauf la phase G₀ (40, 26). Une étude immunohistochimique du Ki-67 réalisée sur 14 cas d'astrocytomes pilocytiques de l'enfant a montré un marquage nucléaire positif dans 12 cas (85.71%) de l'ordre de 0.5 à 1.5%, et deux cas négatifs ki-67=0% (14.28%) (50). Nos résultats ont révélé un marquage nucléaire positif de l'ordre de 1 à 2% dans 9 cas (90%), parmi eux un cas de récurrence et trois cas de reprise évolutive, et un seul cas négatif (10%) Ki-67=0% ce qui concorde avec la série citée (50).

L'analyse statistique de notre étude montre une absence totale de corrélation entre l'augmentation de l'expression du Ki-67 et la forme clinique (récurrence ou reprise évolutive) de l'astrocytome pilocytique de l'enfant, ce qui est prouvé dans les études de la littérature (52).

Certains auteurs considèrent que le marquage nucléaire du Ki-67 peut être un facteur prédictif de la survie impliqué dans le pronostic et le diagnostic différentiel des astrocytomes pilocytiques et les tumeurs astrocytaires de haut grade (52, 35, 50) ; ceci n'a pu être vérifié dans notre série.

La β -caténine est impliquée dans l'adhérence cellulaire, et joue un rôle important dans la voie de signalisation canonique Wnt intervenant dans la prolifération. De ce fait son altération est impliquée dans la progression tumorale de plusieurs types de cancer.

Nous avons observé un marquage cytoplasmique positif de la β -caténine dans les 10 cas (100%) avec des expressions variables entre : diffuse modérée (70%), intense (20%), et faible (10%). Ces données sont proches des résultats de la littérature (49), qui ont montré une accumulation cytoplasmique par la surexpression de la β -caténine dans les astrocytomes pilocytiques de l'enfant.

L'analyse statistique de notre étude montre une absence de corrélation entre le niveau de l'expression de la β -caténine et la forme évolutive (récurrence et reprise évolutive) des astrocytomes pilocytiques de l'enfant. Il n'y a aucune donnée de la littérature actuellement pouvant référencier nos résultats.

Une faible expression de la β -caténine est associée à un bon pronostic des astrocytomes pilocytiques, par contre l'expression élevée est associée à un mauvais pronostic (49). Ceci n'a pas pu être vérifié dans notre série, il est possible que cela soit lié au faible nombre de cas.

Conclusion

Conclusion et Perspectives

Au cours des travaux présentés dans cette étude, deux principaux objectifs ont été abordés : 1/le rôle du Ki-67 dans les récurrences des AP. 2/ L'intérêt de la β -caténine dans le diagnostic différentiel de ces tumeurs.

Nous n'avons pas trouvé des différences quantitatives de l'expression du ki-67 entre les patients avec une récurrence tumorale ou reprise évolutive et ceux avec évolution favorable. En effet le marquage nucléaire du Ki-67 était positif de l'ordre de 1 à 2% dans 90% des cas, ce qui montre que le taux du Ki-67 ne change pas dans l'astrocytome pilocytique de grade I, sans spécificité pour les formes évolutives ; probablement à cause de la progression lente de cette tumeur.

Le marquage de la β -caténine était positif dans 100% des cas avec des niveaux d'expression différents, ce qui indique que l'augmentation de son expression cytoplasmique n'est pas associée aux formes évolutives. Suggérant que la translocation cytoplasmique de la β -caténine vers le noyau et l'activation des gènes de prolifération ne sont pas impliqués dans l'état évolutif de l'AP.

L'immunomarquage du Ki-67 et de la β -caténine confirme donc le diagnostic de l'astrocytome pilocytique, mais il ne semble pas prédictif du comportement agressif de ces tumeurs.

D'après les données de nos résultats il semble que l'on s'oriente vers la distinction entre les récurrences et les reprises évolutives de l'astrocytome pilocytique de l'enfant. Il sera intéressant de poursuivre cette étude à fin de mieux comprendre l'implication de ces deux marqueurs dans les formes évolutives de l'AP ou bien de proposer de nouvelles molécules visant à améliorer nos connaissances sur le comportement de cette tumeur tant sur le plan clinique que sur le plan biologique.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

- 1) Belard A. , Boulanger A., (2015). Gliomes de bas grade et fonctions executives verbales et non verbales : Evaluation pré- et postoperatoire. Universite paris VI Pierre et Marie Curie: 152p.
- 2) Belle M., (2012). Rôle des voies Wnt dans la régulation des gènes de la myéline et le cytosquelette des cellules de Schwann. Université Paris XI: 189p.
- 3) Booth D G., Masatoshi T., Sanchez-Pulido L. , Petfalski E., Vargiu G., Samejima K., Imamoto N., Ponting Ch P., Tollervey D., Earnshaw W C., Vagnarelli P., (2014). Ki-67 is a PP1-interacting protein that organises the mitotic chromosome periphery. Elife 3: 1-22.
- 4) Bouchet A., (2013). Réponse transcriptomique des tissus cérébraux sains et tumoraux a la radiothérapie par microfaisceaux synchrotron. Université de Grenoble: 225p.
- 5) Boukhari A., (2012). Rôle des mastocytes dans le développement des astrocytomes humains: Implication du récepteur CD47. Université de Strasbourg: 317p.
- 6) Bryan T. MacDonald K. T., (2009). Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. Dev Cell 17(1): 9-26.
- 7) Cheray M., (2011). Définition d'une glyco-signature spécifique des cellules souches tumorales de glioblastome et développement d'outils pour la caractérisation cellulaire. Universite de Limoges: 206p.
- 8) Chourmouzi D., Papadopoulo E., Konstantinidis M. , Syrris., Kouskouras K. ,Haritanti A.,Karkavelas G.,Drevelgas., (2014). Manifestations of pilocytic astrocytoma: A pictorial review." Insights Imaging 5(3): 387–402.
- 9) Cockenpot V., (2015). Evaluation de la valeur diagnostique et pronostique de l'identification des transcrits de fusion KIAA1549-BRAF chez les patients atteints d'un astrocytome pilocytique. Faculte de medecine Henri Warembourg: 114p.

- 10) Collins P V., Jones D T W., Giannini C., (2015). Pilocytic astrocytoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol (PubMed)*129: 775–788.
- 11) Combaz X., Girard N., Scavada D., Chapon F., Pineau S., Levrier O., Viout P., Confort-Gouny S., (2010). Imagerie des tumeurs cérébrales de l'enfant. *Journal of Neuroradiology* 35: 261-267.
- 12) Cosset E., (2010). Implication de la cavéoline-1 dans le phénotype des glioblastomes. Université de Strasbourg: 345p.
- 13) Couanet D, Adamsbaum C., (2010). Imagerie des tumeurs cérébrales de l'enfant. *Journal Radiologie* 87: 732-747.
- 14) Déchelette M., Delavigne V., Chatel M., Frappaz D., Menei Ph., (2010). Les tumeurs du cerveau. Institut National du Cancer: 88p.
- 15) Duffau H., (2014). Gliomes de grade II. *EMC-Neurologie* 11(4): 1-12.
- 16) Eguether T., (2010). Rôle de la protéine beta-caténine dans la prolifération du lignage mélanocytaire. Université Nancy I – Henri Poincaré: 72p.
- 17) El-Ayachi I., (2010). KIAA 0510, Ténascine R, et astrocytomes pilocytiques. Université de la Méditerranée Marseille: 178p.
- 18) Elie M., Siaka Ch L., Djientcheu V P., Nguefack S., Chimi P C M., Chiabi A., Awa H M., Sando Z., Fotsin J G., (2011). Aspects cliniques, scanographiques et histologiques des tumeurs cérébrales de l'enfant à Yaoundé, Cameroun. *Schweizer Archiv for Neurologie and Psychiatrie* 162(7): 284-287.
- 19) Emile J F., (2012). Détection des mutations de BRAF dans les tumeurs humaines : Méthodes, indications et perspectives. *Onco-Théranostic* I(1): 21-23.
- 20) Feve M., (2012). Utilisation d'une approche de chimie biologique intégrative dans la recherche de nouvelles molécules actives sur la prolifération et la différenciation des cellules souches cancéreuses. Université de Strasbourg: 302p.

- 21) Forest F., Bouvier C., Maues de Paula A., Figarelle-Branger D., (2013). Examens cytologique, histologique, immunohistochimique, et génétique des tumeurs du système nerveux central. EMC Neurologie: 10(3): 1-28.
- 22) Galant Ch, Berlière M., Leconte I., Marbaix E., (2010). Nouveautés dans les facteurs histopronostiques des cancers du sein. Elsevier Masson: 20: 9-17.
- 23) Horbinski C., (2013). To BRAF or Not to BRAF: Is That Even a Question Anymore? Neuropathol Exp Neurol: 72(1): 2-7.
- 24) Iben Khayat S., Moumna K., Belhoussine F., Ait Oussous S., Kamaoui I., Boubbou M., Sqalli H N., Tizniti S., Maaroufi M., (2013). Corrélation radio-anatomopathologique des tumeurs cérébrales. 148p.
- 25) Iness (2014). Recherche de mutations ciblées dans les tumeurs cérébrales pédiatriques (K27M et G34V/R dans H3.3, K27M dans H3.1 et V600E dans BRAF). Institut national d'excellence en santé et en service sociaux Québec 22p.
- 26) Konstantinos N., Stanier Ph., Mazis D., Kritikos N., Rozis Meletios., Anesidis E., Chrisoula A., Stamatakos M., (2014). MKI67 (marker of proliferation Ki-67).Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology (PubMed)8: 1-31.
- 27) Leicht D T., Balan V., Kaplun A., Singh-Gupta V., Kaplun L., Dobson M., Tzivion G., (2010). Raf kinases: Function, regulation and role in human cancer. Biochimica et Biophysica Acta 1773: 1196-1212.
- 28) Li-Ying Z, Jiang L N., Fan-Fan L., Hang L., Fang L., Yue S., Feng Z., Jing Y., Qing L., (2010). Reduced β -catenin Expression is Associated with Good Prognosis in Astrocytoma. Pathol. Oncol. Res. 16: 253-257.
- 29) Lian T., Guan J., Qian Ch., Jun N., (2015). Ki-67 is a promising molecular target in diagnosis of cancer. Molecular medicine reports 11: 1566-1572.
- 30) Marcinkova-Bencokova Z., (2010). Signalisation et réparation des cassures double-brin de l'ADN dans les gliomes : Modulation de la réponse aux traitements chimio-radiothérapeutiques. Université Joseph-Fourier - Grenoble I: 292.

- 31) Matallanas D., Birtwistle M., Romano D., Armin Z., Jens R., von Kriegsheim A., Walter K., (2011). Raf Family Kinases. *Genes Cancer* 2(3): 232–260.
- 32) Mercurio S., (2013). Mise en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques dans les tumeurs gliales et glioneuronales de l'enfant. Université Aix-Marseille: 117p.
- 33) Messé A., (2010). Caractérisation de la relation structure-fonction dans le cerveau humain à partir de données d'IRM fonctionnelle et de diffusion: Méthodes et applications cognitive et clinique. Université de Nice - Sophia Antipolis: 236p.
- 34) Mesturoux L., (2013). Etude de l'EGFR et de marqueurs moléculaires dans des gliomes infiltrants et non infiltrants. Université de Limoges: 101p.
- 35) Moses A M, Khosla Ch., Ghosh M., Mallikarjuna V S., Annapurneswari S., (2011). Practical value of MIB-1 index in predicting behavior of astrocytomas. *Pathol Oncol Res* 54(3): 520-525.
- 36) Moumna K., (2012). Tumeurs intracrâniennes : Correlations anatomo-radiologiques (A propos de 109 cas). Université Sidi Mohammed Ben Abdellah Fès: 265p.
- 37) Nguyen A., (2014). Mécanismes de résistance à la chimiothérapie dans les gliomes de haut grade de l'enfant: Implication des systèmes de réparation de l'ADN et de l'hypoxie intra-tumorale. université de Strasbourg: 228p.
- 38) O'Brien W T., (2013). Imaging of Primary Posterior Fossa Brain Tumors in Children. *American Osteopathic College of Radiology* 2(3): 1-12.
- 39) Paixao B A., Scpilatempo N C., Neder L., Chimelli L., Reis R M., (2013). Pilocytic Astrocytoma: Anatomic, Pathological and Molecular Aspects. Clinical Management and Evolving Novel Therapeutic Strategies for Patients with Brain Tumors: 127-143.
- 40) Paquis Ph., Chatel M., Lebrun-Frenay Ch., Michiels J F., Fauchon F., (2015). Astrocytomes de bas grade. *EMC Neurologie* 17: 301-319.
- 41) Peglion F., (2013). Mécanismes moléculaires responsables des propriétés migratoires des gliomes : rôle et dynamique des jonctions adhérentes dans la migration des astrocytes sains et tumoraux. Université Pierre et Marie Curie: 226p.

- 42) Pereira R D A., (2010). Etude des médiateurs lipidiques dans la pathologie des méningiomes et des gliomes. Université de Limoges: 129p.
- 43) Poirier J., Le système nerveux, Central et périphérique : Formation, fonction et rôle. Paris: 20p.
- 44) Ronell B M., Mosqueda-Taylor A., Molina-Frechero N., Mori-Estevez A., Sánchez-Acuña G., (2013). Comparison of the value of PCNA and Ki-67 as markers of cell proliferation in ameloblastic tumor. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 18(2): 174–179.
- 45) Rorive S., (2010). Les astrocytomes de bas-grade : Caractérisation moléculaire et implications cliniques. Université libre de Bruxelles: 122p.
- 46) Roskoski J R., (2010). RAF protein-serine/threonine kinases: Structure and regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 399: 313-317.
- 47) Saab F., (2011). Inhibiteurs de la voie Raf/MEK/ERK : Synthèse de composés à structure 4-azaindole et évaluation de leur efficacité par la mise au point de tests TR-FRET. Université d'Orléans: 277.
- 48) Sabri A., (2013). Prise en charge neurochirurgicale des gliomes de bas grade de la fosse cérébrale postérieure de l'enfant. Université Cadi Ayyad Marrakech: 139p.
- 49) Sareddy G R., Geeviman K., Panigrahi M., Challa S., Mahadevan A., Babu Ph P., (2012). Increased β -Catenin/Tcf Signaling in Pilocytic Astrocytomas: A comparative study to distinguish pilocytic astrocytomas from low-grade diffuse astrocytomas." *Neurochem Res (Springer)*37: 96-104.
- 50) Sengupta S., Chatterjee U., Banerjee U., Ghosh S., Chatterjee S., Ghosh A K., (2012). A study of histopathological spectrum and expression of Ki-67, TP53 in primary brain tumors of pediatric age group. *Indian J Med Paediatr Oncol* 33(1): 25-31.
- 51) Souki C., Ziadi S., Trimeche M., Sriha B., Tlili K., Krifa H., Mokni M., (2013). Pilocytic astrocytoma: A retrospective study of 32 cases. *Clinical Neurology and Neurosurgery* 115(Elsevier): 1220–1225.

- 52) Thotakura M, Tirumalasetti N., Ravi K., (2014). Role of Ki-67 labeling index as an adjunct to the histopathological diagnosis and grading of astrocytomas. *Journal of Cancer Research and Therapeutics* 10(3): 641-645.
- 53) Truc G., (2012). Radiothérapie et astrocytomes pilocytiques. *Groupe Neuro Oncologie Nord Est (NENO)*: 11p.
- 54) Yang Ch., Iyer R R., Yu A C H., Raymund Y L., Deric P M., Robert W J., Ikejiria B., Brady R O., Lonser R R., Zhuang Z., (2012). β -Catenin signaling initiates the activation of astrocytes and its dysregulation contributes to the pathogenesis of astrocytomas. *PNAS* 109(18): 6963–6968.

Annexes

Numéro de dossier	Age	Sexe	Localisation	Aspect radiologique	Qualité d'exérèse	Chimiothérapie	Suivi
1 « 169/13 »	8 ans	M	Fosse Cérébrale Postérieure	Charnu	Totale		Evolution favorable
2 « 411/06 »	16 ans	F	Fosse Cérébrale Postérieure	Kystique et charnu	Large	+	Reprise évolutive (a 2002 et a 2006)
3 « 153/09 »	6 ans	M	Fosse Cérébrale Postérieure	Kystique et charnu	Totale		Evolution favorable
4 « 173/13 »	2 ans	M	Voies optiques	Charnu	Biopsie	+	Evolution favorable
5 « 38/11 »	6 ans	F	Fosse Cérébrale Postérieure	Charnu	1 ^{ère} Ex : large 2 ^{ème} Ex : Totale	+	Reprise évolutive (a 2011) Récidive (a 2016)
6 « 661/07 »	7 ans	F	Hypothala-chismatique	Kystique et charnu	Partielle	+	Evolution favorable
7 « 227/14 »	4 ans	M	Fosse Cérébrale Postérieure	Kystique et charnu	Totale		Evolution favorable
8 « 217/14 »	4 ans	M	Fosse Cérébrale Postérieure	Charnu	Totale		Récidive (a 2014)
9 « 19/09 »	15 ans	F	Fosse Cérébrale Postérieure	Kystique et charnu	1 ^{ère} Ex : Sub-totale 2 ^{ème} Ex : Totale		Reprise évolutive (a 2011)
10 « 845/09 »	6 ans	M	Fosse Cérébrale Postérieure	Kystique	Totale		Evolution favorable

Annexe II

Appareillages



Appareil de circulation



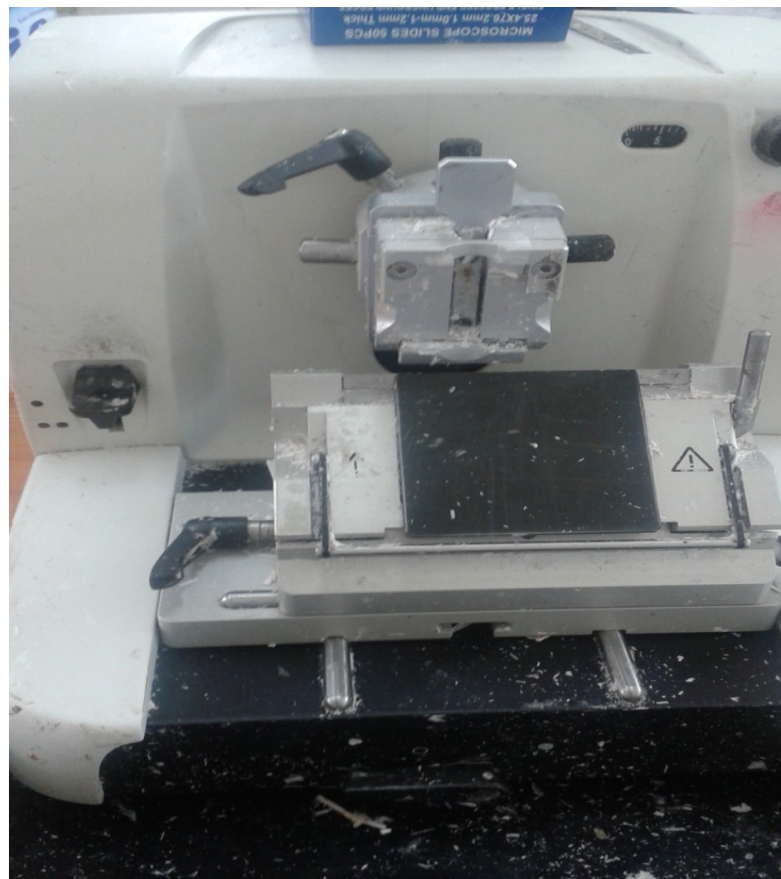
Plaque de refroidissement

Appareil d'inclusion

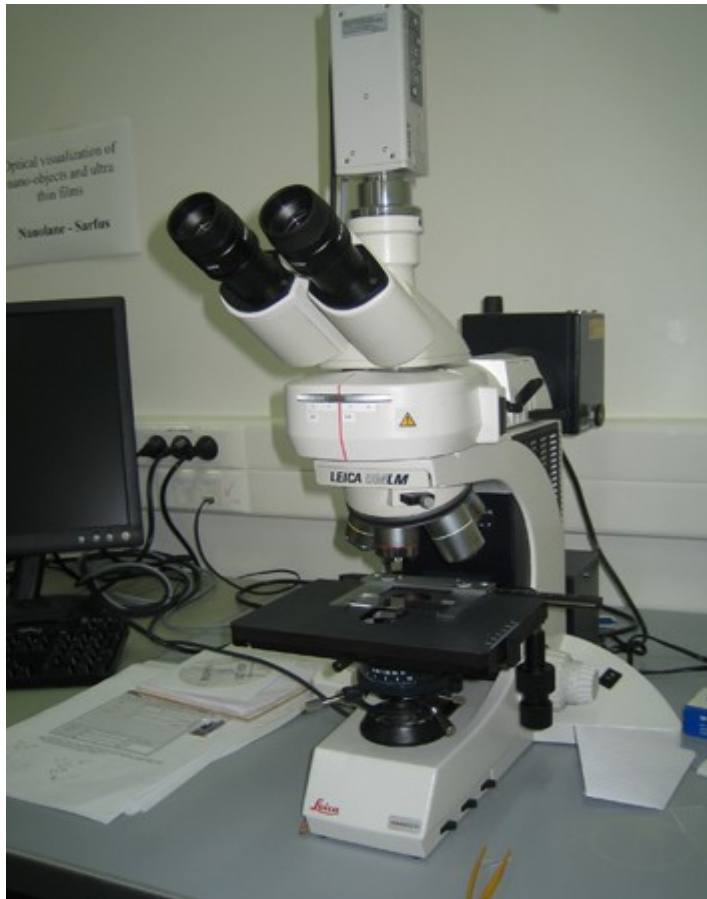
Annexe II



Étuve thermostatif



Microtome



Microscope optique

INCLUSION EN PARAFFINE

- ✓ Technique qui consiste à enrober le tissu préalablement déshydraté pour réaliser le bloc.
- ✓ La bonne réalisation du bloc conditionne la qualité de la coupe et la conservation du prélèvement.

Principe

Le prélèvement histologique est déposé bien à plat au fond d'un moule adapté à sa taille dans lequel est coulée de la paraffine chaude (56° à 60°C).

Sa cassette d'identification est posée dessus et l'ensemble est refroidi immédiatement sur une platine réfrigérante (pour durcir la paraffine). Après démoulage on obtient le bloc.

Protocole standard

- 1- Récupérer les cassettes contenant les prélèvements déshydratés et imprégnés de paraffine chaude
- 2- Placer les prélèvements dans la station d'enrobage
- 3- Préparer le moule adéquat en le remplissant de paraffine liquide et déposer le prélèvement bien au fond et bien à plat.



- 4- Figurer le tout sur le point pelletier*
-

Annexe III

- 5- Rajouter sa cassette d'identification et recouvrir le tout de paraffine liquide jusqu'au remplissage complet de la cassette



- 6- Mettre le tout sur la platine réfrigérante, laisser refroidir et démouler le bloc.



- 7- Enlever le surplus de paraffine sur les côtés du bloc pour faciliter l'insertion dans la tête du microtome.
-

HÉMALUN EOSINE

- ✓ Coloration histologique topographique qui, en différenciant le noyau du cytoplasme, donne une vue d'ensemble d'un tissu
- ✓ 1ère étape nécessaire et essentielle pour établir un diagnostic.

Principe

Cette coloration permet de visualiser la morphologie des cellules (noyau et cytoplasme) afin de déterminer leur répartition, architecture et structure. C'est la plus simple des colorations

« Combinées » qui s'effectue avec 2 colorants :

- un colorant nucléaire « basique » hématoxyline (bleu)
- un colorant cytoplasmique « acide » type éosine, orange G... (rose orangé)

Cette technique fait agir successivement:

- ✓ la solution d'hématoxyline localise la chromatine nucléaire : c'est une coloration progressive (bleu violet)
 - ✓ l'alcool-acide permet la différenciation rapide
 - ✓ l'eau ammoniacquée bleuie les noyaux
 - ✓ la solution d'éosine localise le cytoplasme : c'est une coloration régressive (rose à rose orangé)

 - ❖ Une coloration est dite « progressive » lorsqu'elle s'effectue par passage dans le colorant pendant un temps optimum.

 - ❖ Une coloration est dite « régressive » quand après sur-coloration on élimine l'excès par un différenciateur (alcool acide).
-

Annexe IV

Protocole standard

La coloration des coupes est effectuée selon les étapes suivantes :

-Déparaffinage dans 2 bains de xylène pendant 10 min chacun



-Déshydratation deux bains d'alcool 5 min chacun



-Rinçage à l'eau courante

-Coloration dans un bain d'Hématoxyline pendant 5 minutes

-Rinçage à l'eau courante

-Deux bains de différenciateurs :

Le 1er différenciateur (l'acide hydro-chlorohydrique) pendant quelques secondes pour éliminer l'excès d'hématoxyline.

Rinçage à l'eau

Après, le 2^{ème} différenciateur (l'ammoniaque) pendant quelques secondes

-Un bain d'éosine pendant 2 minutes

-Rinçage à l'eau courante

-Séchage des lames

-Montage par Eukitt et lamelles



Numéro d'anapath	Localisation	Aspects radiologiques	Qualité d'exérèse	Aspects anatomopathologique
1 « 8043/13 »	Fosse Cérébrale Postérieure	Charnu	Totale	Aspect microkystique, présence de fibres de Rosenthal et des corps granuleux
2 « 3544/06 »	Fosse Cérébrale Postérieure	Kystique et charnu	Large	Aspect microkystique, présence de fibres de Rosenthal avec des corps granuleux et des cellules olig-like
3 « 3162/09 »	Fosse Cérébrale Postérieure	Kystique et charnu	Totale	Aspect lâche et microkystique renfermant des corps granuleux
4 « 8476/13 »	Voies optiques	Charnu	Biopsie	Aspect microkystique et fasciculé, présence de fibres de Rosenthal et des corps granuleux La vascularisation est gloméruloïde
5 « 7819/07 »	Fosse Cérébrale Postérieure	Charnu	1 ^{ère} Ex : large 2 ^{ème} Ex : Totale	Aspect microkystique, et présence de fibres de Rosenthal
6 « 7052/07 »	Hypothala-chismatique	Kystique et charnu	Partielle	Aspect fibrillaire et microkystique, présence de fibres de Rosenthal et des corps granuleux
7 « 13160/14 »	Fosse Cérébrale Postérieure	Kystique et charnu	Totale	Aspect microkystique, présence de fibres de Rosenthal et des corps granuleux La vascularisation est gloméruloïde
8 « 12780/14 »	Fosse Cérébrale Postérieure	Charnu	Totale	Aspect microkystique, et présence de fibres de Rosenthal Présence de zones de nécrose ischémique
9 « 7283/11 »	Fosse Cérébrale Postérieure	Kystique et charnu	1 ^{ère} Ex : Sub-totale 2 ^{ème} Ex : Totale	Aspect lâche avec une vascularisation gloméruloïde, ainsi que présence des cellules olig-like
10 « 11851/09 »	Fosse Cérébrale Postérieure	Kystique	Totale	Aspect microkystique, et présence de fibres de Rosenthal

Annexe VI

Les différentes étapes de la technique immuno-histochimie (IHC) :

1/Déparaffinage et réhydratation

2/ Blanchiment dans de l'eau distillée pendant 5 minutes



3/Démasquage des sites antigéniques (par la chaleur ou par des enzymes protéolytiques tels que la trypsine)

4/Blocage peroxydase endogène par (H₂O₂) à 3% pendant 10 minutes

5/Anticorps primaire

Puis

6/Anticorps secondaire biotinylé



7/Systèmes d'amplification à la streptavidine biotine

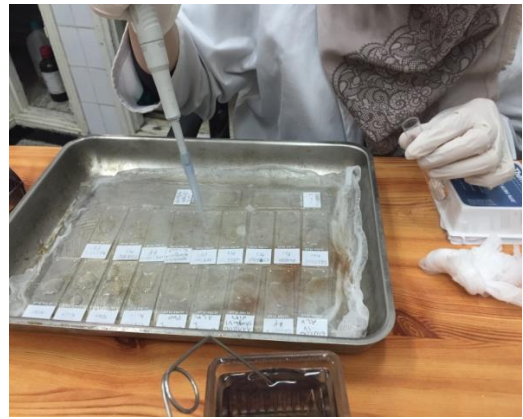


Annexe VI

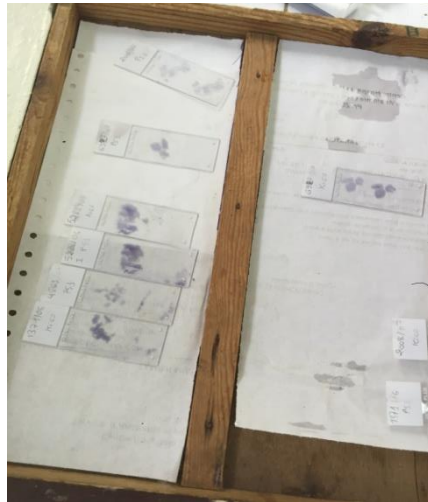
8/Révélation par
les chromogènes
de peroxydase

+

DAB



9/Contre
coloration à
l'Hématéine de
Mayer et
montage avec
lamelles.



Numéro d'anapath	Age	Sexe	Qualité d'exérèse + suivi	β-caténine	Ki-67
1 « 8043/13 »	8 ans	M	Totale (Evolution favorable)	Positivité cytoplasmique diffuse modérée	2%
2 « 3544/06 »	16 ans	F	Large (Reprise évolutive)	Positivité cytoplasmique diffuse modérée	1%
3 « 3162/09 »	6 ans	M	Totale (Evolution favorable)	Positivité cytoplasmique diffuse modérée	négatif
4 « 8476/13 »	2 ans	M	Biopsie (Evolution favorable)	Positivité cytoplasmique intense	1%
5 « 7819/07 »	6 ans	F	1 ^{ère} Ex : large (Reprise évolutive) 2 ^{ème} Ex : Totale (Récidive)	Positivité cytoplasmique diffuse modérée	1%
6 « 7052/07 »	7 ans	F	Partielle (Evolution favorable)	Positivité cytoplasmique diffuse modérée	1%
7 « 13160/14 »	4 ans	M	Totale (Evolution favorable)	Positivité cytoplasmique diffuse modérée	2%
8 « 12780/14 »	4 ans	M	Totale (Récidive)	Positivité cytoplasmique intense	2%
9 « 7283/11 »	15 ans	F	1 ^{ère} Ex : Sub-totale (Reprise évolutive) 2 ^{ème} Ex : Totale	Positivité cytoplasmique diffuse modérée	1%
10 « 11851/09 »	6 ans	M	Totale (Evolution favorable)	Positivité cytoplasmique faible	1%