



HAL
open science

Lien entre la protéine HuR et les marqueurs de prolifération dans les gliomes diffus

Hélène Busby Venner

► **To cite this version:**

Hélène Busby Venner. Lien entre la protéine HuR et les marqueurs de prolifération dans les gliomes diffus. Sciences du Vivant [q-bio]. 2015. hal-01770806

HAL Id: hal-01770806

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01770806>

Submitted on 13 Nov 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE DE LORRAINE
2015

FACULTE DE MEDECINE DE NANCY
N°

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement

dans le cadre du troisième cycle de Médecine de Spécialité

Par

Hélène BUSBY VENNER

Le 7 Mai 2015

**Lien entre la protéine HuR et les marqueurs de prolifération
dans les gliomes diffus**

Examineurs de la thèse :

M. le Professeur Jean-Michel VIGNAUD

Président du Jury

M. le Professeur Luc TAILLANDIER

Juge

M. le Professeur Olivier KLEIN

Juge

Mme. le Docteur Shyue-Fang BATTAGLIA-HSU

Juge

M. le Docteur Guillaume GAUCHOTTE

Juge et Directeur de Thèse



**UNIVERSITÉ
DE LORRAINE**



FACULTÉ de MÉDECINE
NANCY

**Président de l'Université de Lorraine :
Professeur Pierre MUTZENHARDT**

**Doyen de la Faculté de Médecine :
Professeur Marc BRAUN**

Vice-doyen

Pr Karine ANGIOI-DUPREZ, Vice-Doyen
Pr Marc DEBOUVERIE, Vice-Doyen

Assesseurs :

Premier cycle : Dr Guillaume GAUCHOTTE
Deuxième cycle : Pr Marie-Reine LOSSER
Troisième cycle : Pr Marc DEBOUVERIE

Innovations pédagogiques : Pr Bruno CHENUÉL

Formation à la recherche : Dr Nelly AGRINIER

Animation de la recherche clinique : Pr François ALLA

Affaires juridiques et Relations extérieures : Dr Frédérique CLAUDOT

Vie Facultaire et SIDES : Dr Laure JOLY

Relations Grande Région : Pr Thomas FUCHS-BUDER

Etudiant : M. Lucas SALVATI

Chargés de mission

Bureau de docimologie : Dr Guillaume GAUCHOTTE

Commission de prospective facultaire : Pr Pierre-Edouard BOLLAERT

Universitarisation des professions paramédicales : Pr Annick BARBAUD

Orthophonie : Pr Cécile PARIETTI-WINKLER

PACES : Dr Chantal KOHLER

Plan Campus : Pr Bruno LEHEUP

International : Pr Jacques HUBERT

=====

DOYENS HONORAIRES

Professeur Jean-Bernard DUREUX - Professeur Jacques ROLAND - Professeur Patrick NETTER
Professeur Henry COUDANE

=====

PROFESSEURS HONORAIRES

Jean-Marie ANDRE - Daniel ANTHOINE - Alain AUBREGE - Gérard BARROCHE - Alain BERTRAND - Pierre BEY

Marc-André BIGARD - Patrick BOISSEL - Pierre BORDIGONI - Jacques BORRELLY - Michel BOULANGE

Jean-Louis BOUTROY - Jean-Claude BURDIN - Claude BURLET - Daniel BURNEL - Claude CHARDOT -

François CHERRIER - Jean-Pierre CRANCE - Gérard DEBRY - Jean-Pierre DELAGOUTTE - Emile de

LAVERGNE - Jean-Pierre DESCHAMPS

Jean-Bernard DUREUX - Gérard FIEVE - Jean FLOQUET - Robert FRISCH - Alain GAUCHER - Pierre GAUCHER

Hubert GERARD - Jean-Marie GILGENKRANTZ - Simone GILGENKRANTZ - Oliéro GUERCI - Claude HURIET

Christian JANOT - Michèle KESSLER - François KOHLER - Jacques LACOSTE - Henri LAMBERT - Pierre

LANDES

Marie-Claire LAXENAIRE - Michel LAXENAIRE - Jacques LECLERE - Pierre LEDERLIN - Bernard LEGRAS

Jean-Pierre MALLIÉ - Michel MANCIAUX - Philippe MANGIN - Pierre MATHIEU - Michel MERLE - Denise MONERET-VAUTRIN - Pierre MONIN - Pierre NABET - Jean-Pierre NICOLAS - Pierre PAYSANT - Francis PENIN - Gilbert PERCEBOIS
Claude PERRIN - Guy PETIET - Luc PICARD - Michel PIERSON – François PLENAT - Jean-Marie POLU - Jacques POUREL - Jean PREVOT - Francis RAPHAEL - Antoine RASPILLER – Denis REGENT - Michel RENARD - Jacques ROLAND
René-Jean ROYER - Daniel SCHMITT - Michel SCHMITT - Michel SCHWEITZER - Daniel SIBERTIN-BLANC - Claude SIMON - Danièle SOMMELET - Jean-François STOLTZ - Michel STRICKER - Gilbert THIBAUT - Augusta TREHEUX - Hubert UFFHOLTZ - Gérard VAILLANT - Paul VERT - Colette VIDAILHET - Michel VIDAILHET – Jean-Pierre VILLEMOT - Michel WAYOFF
Michel WEBER

=====

PROFESSEURS ÉMÉRITES

Professeur Gérard BARROCHE – Professeur Pierre BEY - Professeur Marc-André BIGARD – Professeur Jean-Pierre CRANCE - Professeur Jean-Pierre DELAGOUTTE – Professeure Michèle KESSLER - Professeur Jacques LECLERE
Professeur Pierre MONIN - Professeur Jean-Pierre NICOLAS - Professeur Luc PICARD – Professeur François PLENAT - Professeur Jacques POUREL - Professeur Michel SCHMITT – Professeur Daniel SIBERTIN-BLANC - Professeur Hubert UFFHOLTZ - Professeur Paul VERT - Professeure Colette VIDAILHET - Professeur Michel VIDAILHET - Professeur Michel WAYOFF

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

(Disciplines du Conseil National des Universités)

42^{ème} Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

1^{ère} sous-section : (Anatomie)

Professeur Gilles GROSDIDIER - Professeur Marc BRAUN

2^{ème} sous-section : (Cytologie et histologie)

Professeur Bernard FOLIGUET – Professeur Christo CHRISTOV

3^{ème} sous-section : (Anatomie et cytologie pathologiques)

Professeur Jean-Michel VIGNAUD

43^{ème} Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDECINE

1^{ère} sous-section : (Biophysique et médecine nucléaire)

Professeur Gilles KARCHER – Professeur Pierre-Yves MARIE – Professeur Pierre OLIVIER

2^{ème} sous-section : (Radiologie et imagerie médecine)

Professeur Michel CLAUDON – Professeure Valérie CROISÉ-LAURENT

Professeur Serge BRACARD – Professeur Alain BLUM – Professeur Jacques FELBLINGER - Professeur René ANXIONNAT

44^{ème} Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION

1^{ère} sous-section : (Biochimie et biologie moléculaire)

Professeur Jean-Louis GUÉANT – Professeur Jean-Luc OLIVIER – Professeur Bernard NAMOUR

2^{ème} sous-section : (Physiologie)

Professeur François MARCHAL – Professeur Bruno CHENUÉL – Professeur Christian BEYAERT

3^{ème} sous-section : (Biologie Cellulaire)

Professeur Ali DALLOUL

4^{ème} sous-section : (Nutrition)

Professeur Olivier ZIEGLER – Professeur Didier QUILLIOT - Professeure Rosa-Maria RODRIGUEZ-GUEANT

45^{ème} Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE

1^{ère} sous-section : (Bactériologie – virologie ; hygiène hospitalière)

Professeur Alain LE FAOU - Professeur Alain LOZNIÉWSKI – Professeure Evelyne SCHVOERER

2^{ème} sous-section : (Parasitologie et Mycologie)

Professeure Marie MACHOUART

3^{ème} sous-section : (Maladies infectieuses ; maladies tropicales)

Professeur Thierry MAY – Professeur Christian RABAUD – Professeure Céline PULCINI

46^{ème} Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ

1^{ère} sous-section : (Épidémiologie, économie de la santé et prévention)

Professeur Philippe HARTEMANN – Professeur Serge BRIANÇON - Professeur Francis GUILLEMIN
Professeur Denis ZMIROU-NAVIER – Professeur François ALLA

2^{ème} sous-section : (Médecine et santé au travail)

Professeur Christophe PARIS

3^{ème} sous-section : (Médecine légale et droit de la santé)

Professeur Henry COUDANE

4^{ème} sous-section : (Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication)

Professeure Eliane ALBUISSON – Professeur Nicolas JAY

47^{ème} Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE

1^{ère} sous-section : (Hématologie ; transfusion)

Professeur Pierre FEUGIER

2^{ème} sous-section : (Cancérologie ; radiothérapie)

Professeur François GUILLEMIN – Professeur Thierry CONROY - Professeur Didier PEIFFERT
Professeur Frédéric MARCHAL

3^{ème} sous-section : (Immunologie)

Professeur Gilbert FAURE – Professeur Marcelo DE CARVALHO-BITTENCOURT

4^{ème} sous-section : (Génétique)

Professeur Philippe JONVEAUX – Professeur Bruno LEHEUP

48^{ème} Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE, PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE

1^{ère} sous-section : (Anesthésiologie - réanimation ; médecine d'urgence)

Professeur Claude MEISTELMAN – Professeur Hervé BOUAZIZ - Professeur Gérard AUDIBERT
Professeur Thomas FUCHS-BUDER – Professeure Marie-Reine LOSSER

2^{ème} sous-section : (Réanimation ; médecine d'urgence)

Professeur Alain GERARD - Professeur Pierre-Édouard BOLLAERT - Professeur Bruno LÉVY – Professeur Sébastien GIBOT

3^{ème} sous-section : (Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie)

Professeur Patrick NETTER – Professeur Pierre GILLET – Professeur J.Y. JOUZEAU (*pharmacien*)

4^{ème} sous-section : (Thérapeutique ; médecine d'urgence ; addictologie)

Professeur François PAILLE – Professeur Faiez ZANNAD - Professeur Patrick ROSSIGNOL

49^{ème} Section : PATHOLOGIE NERVEUSE ET MUSCULAIRE, PATHOLOGIE MENTALE, HANDICAP ET RÉÉDUCATION

1^{ère} sous-section : (Neurologie)

Professeur Hervé VESPIGNANI - Professeur Xavier DUCROCQ – Professeur Marc DEBOUVERIE
Professeur Luc TAILLANDIER - Professeur Louis MAILLARD – Professeure Louise TYVAERT

2^{ème} sous-section : (Neurochirurgie)

Professeur Jean-Claude MARCHAL – Professeur Jean AUQUE – Professeur Olivier KLEIN
Professeure Thierry CIVIT - Professeure Sophie COLNAT-COULBOIS

3^{ème} sous-section : (Psychiatrie d'adultes ; addictologie)

Professeur Jean-Pierre KAHN – Professeur Raymund SCHWAN

4^{ème} sous-section : (Pédopsychiatrie ; addictologie)

Professeur Bernard KABUTH

5^{ème} sous-section : (Médecine physique et de réadaptation)

Professeur Jean PAYSANT

50^{ème} Section : PATHOLOGIE OSTÉO-ARTICULAIRE, DERMATOLOGIE ET CHIRURGIE PLASTIQUE

1^{ère} sous-section : (Rhumatologie)

Professeure Isabelle CHARY-VALCKENAERE – Professeur Damien LOEUILLE

2^{ème} sous-section : (Chirurgie orthopédique et traumatologique)

Professeur Daniel MOLE - Professeur Didier MAINARD - Professeur François SIRVEAUX – Professeur Laurent GALOIS

3^{ème} sous-section : (Dermato-vénéréologie)

Professeur Jean-Luc SCHMUTZ – Professeure Annick BARBAUD

4^{ème} sous-section : (Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie)

Professeur François DAP - Professeur Gilles DAUTEL - Professeur Etienne SIMON

51^{ème} Section : PATHOLOGIE CARDIO-RESPIRATOIRE ET VASCULAIRE

1^{ère} sous-section : (*Pneumologie ; addictologie*)

Professeur Yves MARTINET – Professeur Jean-François CHABOT – Professeur Ari CHAOUAT

2^{ème} sous-section : (*Cardiologie*)

Professeur Etienne ALIOT – Professeur Yves JUILLIERE

Professeur Nicolas SADOUL - Professeur Christian de CHILLOU DE CHURET

3^{ème} sous-section : (*Chirurgie thoracique et cardiovasculaire*)

Professeur Thierry FOLLIGUET

4^{ème} sous-section : (*Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire*)

Professeur Denis WAHL – Professeur Sergueï MALIKOV

52^{ème} Section : MALADIES DES APPAREILS DIGESTIF ET URINAIRE

1^{ère} sous-section : (*Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie*)

Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI – Professeur Laurent PEYRIN-BIROULET

3^{ème} sous-section : (*Néphrologie*)

Professeure Dominique HESTIN – Professeur Luc FRIMAT

4^{ème} sous-section : (*Urologie*)

Professeur Jacques HUBERT – Professeur Pascal ESCHWEGE

53^{ème} Section : MÉDECINE INTERNE, GÉRIATRIE ET CHIRURGIE GÉNÉRALE

1^{ère} sous-section : (*Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; médecine générale ; addictologie*)

Professeur Jean-Dominique DE KORWIN – Professeur Pierre KAMINSKY - Professeur Athanase BENETOS

Professeure Gisèle KANNY – Professeure Christine PERRET-GUILLAUME

2^{ème} sous-section : (*Chirurgie générale*)

Professeur Laurent BRESLER - Professeur Laurent BRUNAUD – Professeur Ahmet AYAV

54^{ème} Section : DÉVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNÉCOLOGIE-OBSTÉTRIQUE, ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION

1^{ère} sous-section : (*Pédiatrie*)

Professeur Jean-Michel HASCOET - Professeur Pascal CHASTAGNER - Professeur François FEILLET

Professeur Cyril SCHWEITZER – Professeur Emmanuel RAFFO – Professeure Rachel VIEUX

2^{ème} sous-section : (*Chirurgie infantile*)

Professeur Pierre JOURNEAU – Professeur Jean-Louis LEMELLE

3^{ème} sous-section : (*Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale*)

Professeur Philippe JUDLIN – Professeur Olivier MOREL

4^{ème} sous-section : (*Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques ; gynécologie médicale*)

Professeur Georges WERYHA – Professeur Marc KLEIN – Professeur Bruno GUERCI

55^{ème} Section : PATHOLOGIE DE LA TÊTE ET DU COU

1^{ère} sous-section : (*Oto-rhino-laryngologie*)

Professeur Roger JANKOWSKI – Professeure Cécile PARIETTI-WINKLER

2^{ème} sous-section : (*Ophthalmologie*)

Professeur Jean-Luc GEORGE – Professeur Jean-Paul BERROD – Professeure Karine ANGIOI

3^{ème} sous-section : (*Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie*)

Professeur Jean-François CHASSAGNE – Professeure Muriel BRIX

=====

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

61^{ème} Section : GÉNIE INFORMATIQUE, AUTOMATIQUE ET TRAITEMENT DU SIGNAL

Professeur Walter BLONDEL

64^{ème} Section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Professeure Sandrine BOSCHI-MULLER

=====

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS DE MÉDECINE GÉNÉRALE

Professeur Jean-Marc BOIVIN

PROFESSEUR ASSOCIÉ DE MÉDECINE GÉNÉRALE

Professeur associé Paolo DI PATRIZIO

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

42^{ème} Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

1^{ère} sous-section : (*Anatomie*)

Docteur Bruno GRIGNON – Docteure Manuela PEREZ

2^{ème} sous-section : (*Cytologie et histologie*)

Docteur Edouard BARRAT - Docteure Françoise TOUATI – Docteure Chantal KOHLER

3^{ème} sous-section : (*Anatomie et cytologie pathologiques*)

Docteure Aude MARCHAL – Docteur Guillaume GAUCHOTTE

43^{ème} Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDECINE

1^{ère} sous-section : (*Biophysique et médecine nucléaire*)

Docteur Jean-Claude MAYER - Docteur Jean-Marie ESCANYE

2^{ème} sous-section : (*Radiologie et imagerie médecine*)

Docteur Damien MANDRY – Docteur Pedro TEIXEIRA (*stagiaire*)

44^{ème} Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION

1^{ère} sous-section : (*Biochimie et biologie moléculaire*)

Docteure Sophie FREMONT - Docteure Isabelle GASTIN – Docteur Marc MERTEN

Docteure Catherine MALAPLATE-ARMAND - Docteure Shyue-Fang BATTAGLIA – Docteur Abderrahim OUSSALAH (*stagiaire*)

2^{ème} sous-section : (*Physiologie*)

Docteur Mathias POUSSEL – Docteure Silvia VARECHOVA

3^{ème} sous-section : (*Biologie Cellulaire*)

Docteure Véronique DECOT-MAILLERET

45^{ème} Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE

1^{ère} sous-section : (*Bactériologie – Virologie ; hygiène hospitalière*)

Docteure Véronique VENARD – Docteure Hélène JEULIN – Docteure Corentine ALAUZET

2^{ème} sous-section : (*Parasitologie et mycologie (type mixte : biologique)*)

Docteure Anne DEBOURGOGNE (*sciences*)

3^{ème} sous-section : (*Maladies Infectieuses ; Maladies Tropicales*)

Docteure Sandrine HENARD

46^{ème} Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ

1^{ère} sous-section : (*Epidémiologie, économie de la santé et prévention*)

Docteur Alexis HAUTEMANIÈRE – Docteure Frédérique CLAUDOT – Docteur Cédric BAUMANN – Docteure Nelly AGRINIER (*stagiaire*)

2^{ème} sous-section (*Médecine et Santé au Travail*)

Docteure Isabelle THAON

3^{ème} sous-section (*Médecine légale et droit de la santé*)

Docteur Laurent MARTRILLE

47^{ème} Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE

1^{ère} sous-section : (*Hématologie ; transfusion : option hématologique (type mixte : clinique)*)

Docteur Aurore PERROT (*stagiaire*)

2^{ème} sous-section : (*Cancérologie ; radiothérapie : oncologie (type mixte : biologique)*)

Docteure Lina BOLOTINE

4^{ème} sous-section : (*Génétique*)

Docteur Christophe PHILIPPE – Docteure Céline BONNET

48^{ème} Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE, PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE

3^{ème} sous-section : (*Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique*)

Docteure Françoise LAPICQUE – Docteur Nicolas GAMBIER – Docteur Julien SCALA-BERTOLA

50^{ème} Section : PATHOLOGIE OSTÉO-ARTICULAIRE, DERMATOLOGIE ET CHIRURGIE PLASTIQUE

1^{ère} sous-section : (*Rhumatologie*)

Docteure Anne-Christine RAT

3^{ème} sous-section : (Dermato-vénérologie)

Docteure Anne-Claire BURSZTEJN

4^{ème} sous-section : (Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie)

Docteure Laetitia GOFFINET-PLEUTRET

51^{ème} Section : PATHOLOGIE CARDIO-RESPIRATOIRE ET VASCULAIRE

3^{ème} sous-section : (Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire)

Docteur Fabrice VANHUYSE

4^{ème} sous-section : (Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire)

Docteur Stéphane ZUILY

52^{ème} Section : MALADIES DES APPAREILS DIGESTIF ET URINAIRE

1^{ère} sous-section : (Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie)

Docteur Jean-Baptiste CHEVAUX (*stagiaire*)

53^{ème} Section : MÉDECINE INTERNE, GÉRIATRIE et CHIRURGIE GÉNÉRALE

1^{ère} sous-section : (Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; médecine générale ; addictologie)

Docteure Laure JOLY

=====

MAÎTRE DE CONFÉRENCE DES UNIVERSITÉS DE MÉDECINE GÉNÉRALE

Docteure Elisabeth STEYER

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

5^{ème} Section : SCIENCES ÉCONOMIQUES

Monsieur Vincent LHUILLIER

19^{ème} Section : SOCIOLOGIE, DÉMOGRAPHIE

Madame Joëlle KIVITS

60^{ème} Section : MÉCANIQUE, GÉNIE MÉCANIQUE, GÉNIE CIVIL

Monsieur Alain DURAND

61^{ème} Section : GÉNIE INFORMATIQUE, AUTOMATIQUE ET TRAITEMENT DU SIGNAL

Monsieur Jean REBSTOCK

64^{ème} Section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Madame Marie-Claire LANHERS – Monsieur Pascal REBOUL – Monsieur Nick RAMALANJAONA

65^{ème} Section : BIOLOGIE CELLULAIRE

Monsieur Jean-Louis GELLY - Madame Ketsia HESS – Monsieur Hervé MEMBRE

Monsieur Christophe NEMOS - Madame Natalia DE ISLA - Madame Nathalie MERCIER – Madame Céline HUSELSTEIN

66^{ème} Section : PHYSIOLOGIE

Monsieur Nguyen TRAN

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES ASSOCIÉS

Médecine Générale

Docteure Sophie SIEGRIST - Docteur Arnaud MASSON - Docteur Pascal BOUCHE

=====

DOCTEURS HONORIS CAUSA

Professeur Charles A. BERRY (1982)
Centre de Médecine Préventive, Houston
(U.S.A)

Professeur Pierre-Marie GALETTI (1982)
Brown University, Providence (U.S.A)

Professeure Mildred T. STAHLMAN (1982)
Vanderbilt University, Nashville (U.S.A)

Professeur Théodore H. SCHIEBLER (1989)
Institut d'Anatomie de Würzburg (R.F.A)
Université de Pennsylvanie (U.S.A)

Professeur Mashaki KASHIWARA (1996)
Research Institute for Mathematical Sciences
de Kyoto (JAPON)

Professeure Maria DELIVORIA-
PAPADOPOULOS (1996)

Professeur Ralph GRÄSBECK (1996)
Université d'Helsinki (FINLANDE)

Professeur James STEICHEN (1997)
Université d'Indianapolis (U.S.A)

Professeur Duong Quang TRUNG
(1997)

Université d'Hô Chi Minh-Ville
(VIËTNAM)

Professeur Daniel G. BICHET (2001)
Université de Montréal (Canada)

Professeur Marc LEVENSTON (2005)
Institute of Technology, Atlanta (USA)

Professeur Brian BURCHELL (2007)
Université de Dundee (Royaume-Uni)

Professeur Yunfeng ZHOU (2009)
Université de Wuhan (CHINE)

Professeur David ALPERS (2011)
Université de Washington (U.S.A)

Professeur Martin EXNER (2012)
Université de Bonn (ALLEMAGNE)

Remerciements

A notre Maître et Président de thèse

Monsieur le Professeur Jean-Michel VIGNAUD

Professeur d'Anatomie et Cytologies Pathologiques

Vous nous faites l'honneur de présider ce jury et de juger ce travail de thèse.

Pour votre riche enseignement dont vous nous avez fait bénéficier durant les années d'internat

Veillez trouver ici le témoignage de notre sincère reconnaissance et de notre plus grand respect.

A nos Maîtres et Juges

Monsieur le Professeur Luc TAILLANDIER

Professeur de Neurologie

Vous nous avez fait l'honneur de juger cette thèse

Veillez recevoir l'expression de notre grand respect et de nos sincères remerciements.

Monsieur le Professeur Olivier KLEIN

Professeur de Neurochirurgie

Vous nous avez fait l'honneur de juger cette thèse

Veillez recevoir l'expression de notre grand respect et de nos sincères remerciements.

Madame le Docteur Shyue-Fang BATTAGLIA-HSU

Docteur de Biochimie et de Biologie Moléculaire

Vous nous avez fait l'honneur de juger cette thèse

Veillez recevoir l'expression de notre grand respect et de nos sincères remerciements.

A notre Juge et Directeur de Thèse

Monsieur le Docteur Guillaume GAUCHOTTE

Vous nous avez fait l'honneur de nous confier ce travail de thèse.

Vos précieux conseils et votre disponibilité ont permis l'aboutissement de ce travail.

Nous vous remercions sincèrement pour l'enseignement que vous nous avez apporté pendant notre internat.

Votre dévouement et votre passion pour la recherche sont précieux pour notre discipline.

Veillez trouver ici le témoignage de notre profonde reconnaissance et de notre plus grande estime.

A notre Maître

Monsieur le Professeur François PLENAT

Professeur Emérite

Pour votre riche enseignement et vos précieux conseils dont vous nous avez fait bénéficier durant notre internat.

Veillez trouver ici la manifestation de notre profond respect et notre plus grande estime.

A nos Maîtres successifs,

Monsieur le Professeur Luc FRIMAT

Monsieur le Professeur François CHABOT

Monsieur le Professeur Jean-Michel VIGNAUD

Monsieur le Professeur François PLENAT

Monsieur le Docteur Philippe HENROT

Madame le Docteur Agnès LEROUX

Un grand merci à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail

A toutes les techniciennes du laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques de l'Hôpital Central

Pour votre gentillesse, votre bienveillance et votre grande disponibilité tout au long de ce travail de thèse et au cours des 3 semestres passés en votre compagnie.

Recevez mes sincères remerciements et ma profonde reconnaissance.

Aux techniciennes d'immunohistochimie : Amale, Valérie, Aurélie Claudine :

Pour votre aide technique et votre disponibilité.

Madame Lydia BROCHIN,

Pour ton investissement, ta disponibilité et ta grande patience, ton enseignement des techniques de biologie moléculaire. Promis, je m'entraîne aux pipetages !

Madame Sandra LOMAZZI,

Pour ton investissement dans ce travail qui, sans toi n'aurait jamais pu commencer. Merci pour ton soutien, tes conseils et ta disponibilité.

A Madame Charlène VIGOUROUX,

Pour ta patience, ta grande disponibilité et bienveillance et ton investissement dans ce travail.

Reçois mes sincères remerciements et ma profonde reconnaissance.

Au Docteur Clément VENNÉ,

Pour ton investissement dans la réalisation des tests statistiques et ta grande patience dans l'explication de leurs mécanismes.

La Région Lorraine et la GIRCI Est

Pour leur soutien financier

A tous les médecins qui ont contribué à ma formation en Anatomie et Cytologie Pathologiques, et en particulier

Madame le Docteur Jacqueline CHAMPIGNEULLE,

Pour votre riche enseignement, votre pédagogie et pour la bienveillance dont vous faites preuve. Je suis honorée de pouvoir continuer à apprendre à vos côtés.

Madame le Docteur Béatrice MARIE,

Pour votre riche enseignement durant mon internat, votre gentillesse et vos valeurs et engagements dans notre spécialité.

Madame le Docteur Claire BASTIEN,

Pour ton passion de la médecine, pour ton précieux enseignement, pour m'avoir fait adorer l'hématopathologie, pour ta grande gentillesse, ta disponibilité et ta profonde bienveillance. Je suis honorée de pouvoir travailler à tes côtés.

Madame le Docteur Camille LEMARIE-DELAUNAY,

Pour ton riche enseignement, ta rigueur, ta profonde bienveillance et ta grande gentillesse. Je suis honorée de pouvoir travailler à tes côtés.

Madame le Docteur Charlène VIGOUROUX,

Pour ton enseignement, ta bonne humeur, ta bienveillance, tes conseils précieux, ton soutien et ton aide inestimable durant ce travail de thèse.

Madame le Docteur Agnès LEROUX,

Merci pour votre riche enseignement au cours de mon semestre au Centre.

Madame le Docteur Catherine BARLIER-PAGEL,

Merci pour votre bienveillance et votre riche enseignement.

Madame le Docteur Aude MARCHAL-BRESSENOT,

Pour ta profonde sympathie, ton riche enseignement ainsi que pour ton engagement dans la recherche.

Madame le Docteur Virginie CAHN,

Pour ta grande gentillesse et ton riche enseignement au cours de mon premier semestre à Brabois, pour ta patience car « la répétition entraîne l'acquisition » !

Madame le Docteur Marie-Pierre WISSLER,

Merci pour ton enseignement au cours de notre semestre à Brabois, pour ta gentillesse. J'aurais aimé travailler plus longtemps à tes côtés.

**Mademoiselle le Docteur Colette MIGEON et Monsieur le Docteur Claude
DEPARDIEU**

Merci pour votre enseignement, votre disponibilité et votre bienveillance

A toute l'équipe technique et aux secrétaires du laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques de Brabois,

Merci pour votre gentillesse, votre accueil chaleureux à chaque stage.

A toute l'équipe technique et aux secrétaires du laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques de Central,

Merci pour votre gentillesse, pour votre bonne humeur, pour votre apprentissage et pour votre grande disponibilité.

A toute l'équipe technique et aux secrétaires du laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques de l'Institut de Cancérologie de Lorraine,

Merci pour votre accueil chaleureux, votre sympathie et votre grand professionnalisme.

A mes co-internes, Arnaud, Pierre, Sophie, Sylvain, Magali, Antoine, Céline, Jacques, Mathilde et Clémence :

Merci pour tous les bons moments passés avec vous en stage.

A Catherine et Anne,

Merci pour le super semestre à Central. Merci pour votre gentillesse. Merci pour tous les fous rires et merci pour « et c'est la même chanson..... »

A Charlie et Celso,

Merci pour votre soutien dans la préparation de cette thèse et pour votre précieuse aide apportée au cours de ce semestre.

A Jean-Matthieu,

Merci pour ta gentillesse, ta bonne humeur, tes yoichi 15 ans d'âge sur la place Stan, les fous rires au cours de notre premier semestre, tes goûts quand même un peu particuliers : la grosse tête de rhino, ta décoration très personnelle du bureau des internes, le tee-shirt pour la naissance de Juliette où il a fallu te convaincre que non définitivement cela ne se faisait pas d'offrir à un bébé un tee-shirt avec des organes dessus !

A ma famille,

A mes parents,

Je suis fière d'être votre fille. Je vous dédie ce travail avec tout mon amour.

Maman, simplement, merci pour tout. Merci d'avoir toujours été là, d'avoir su me guider, d'avoir toujours cru en moi, pour tous les efforts que tu as fournis pour me permettre de réussir, pour m'avoir encouragé à quitter Antibes pour faire la spécialité que je voulais, même si cela nous séparait de 1000 km.

Papa, j'imagine sans mal la scène : tu m'aurais demandé environ 250 fois le titre de mon sujet de thèse. Je me serais évidemment un peu agacée et nous nous serions chamaillé. Tu aurais conclu par « HuR c'est pas le fils de Ben-HuR ? ».

Pour cela et pour un milliard d'autres choses, tu me manques chaque jour.

A Mémé,

Merci de t'être si bien occupé de moi. J'ai beaucoup de chance d'avoir une grand-mère comme toi. Tu es le pilier de la famille.

A Clément,

Te rencontrer fût une chance extraordinaire, devenir ta femme fut merveilleux, pouvoir avancer dans la vie à tes côtés est un bonheur précieux. Merci d'être aussi parfait pour moi. Reçois le témoignage de tout mon amour.

A ma Marraine,

Merci d'avoir toujours cru en moi, de m'avoir toujours soutenue.

A mon Parrain et à Monique,

Merci pour les fous rires au volley à Marrakech. Merci pour votre grande gentillesse et générosité. Merci d'avoir toujours été là et pour votre soutien sans faille durant mes études.

A Anaïs, Vincent, Baptiste et Camille

Merci pour tous les bons moments. Merci de m'avoir fait confiance en tant que témoin de votre union. Merci de m'avoir choisi comme marraine de Camille : je suis très fière.

A tatan Yvette et tonton Rolland,

Merci pour votre grande gentillesse, votre générosité et votre bienveillance. Merci d'avoir autant d'enthousiasme pour les bonheurs simples de la vie.

A ma belle-famille :

Merci d'avoir eu un fils formidable. Merci de m'avoir accueilli avec autant de bienveillance dans votre famille. Merci pour les bons moments que nous passons à chaque fois en votre compagnie.

A mes amis,

A Nathalie,

Merci d'avoir toujours été là pour moi. Merci d'avoir cru en moi et d'avoir toujours eu la conviction que je ferais un bon médecin. J'espère un jour être à la hauteur de tes espérances. Merci aussi pour tous les vendredis-sushis que tu as financé en me disant « quand tu seras docteur tu m'inviteras » : Bon on y est, fais les comptes ! Et surtout, merci d'être mon amie.

A Benjamin,

Nous nous sommes rencontrés le premier jour de la P2 et nous ne nous sommes plus quittés jusqu'à l'internat. Merci pour tous les fous rires en cours : « toi la fille avec le poull rose », merci d'avoir toujours été là. Merci de m'avoir convaincu de faire anapath. Merci d'avoir accepté d'être mon témoin de mariage. Merci d'être un ami aussi précieux.

A Arnaud,

Quel semestre en néphro ! Premier hiver lorrain : affreux ! De la neige partout ! Du jamais vu pour des sudistes comme nous !

C'est grâce à toi que j'ai rencontré Clément. Merci d'avoir toujours été là et d'être un ami aussi fidèle.

A Gaëlle et Alexandre,

Merci de m'avoir fait confiance en me désignant témoin de votre union. Merci pour cette longue amitié.

A mes amis niçois : Anaïs, Benoît, Elodie, Guillaume, Adeline, Sabrina, Christophe, Lucille, Diane:

L'externat à vos côtés fût fabuleux. Vous me manquez en Lorraine ! Je vous attends au mariage les copains !

Aux Nancéens : A Jean-Matthieu, Elise, Sophie et Jean-Christophe, Anne, Aurélia, Clémence et Alexandre, Laure et Adrien :

Merci pour tous les bons moments. Nous avons beaucoup de chance, Clément et moi, de vous avoir à nos côtés.

SERMENT

« **A**u moment d'être admise à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité. Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux. Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité. J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences. Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admise dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me sont confiés. Reçue à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs. Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonorée et méprisée si j'y manque ».

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION.....	1
AVANT PROPOS.....	1
I- GLIOMES.....	2
A- Notion d'anatomie et d'histologie du système nerveux.....	2
B- Introduction sur les tumeurs cérébrales.....	3
C- Classification des tumeurs gliales.....	3
D- Données moléculaires.....	9
E- Présentation clinique.....	13
F- Aspects radiologiques.....	14
G- Principes de prise en charge	17
II- HUR.....	22
A- Introduction.....	22
B- La protéine HuR.....	22
C- Fonction de HuR.....	23
D- Les mécanismes de régulation de HuR.....	25
E- HuR et cancer.....	28
III- MICRO-ARN.....	31
A- Définition et biosynthèse.....	31
B- MiR et HuR.....	32
IV- MARQUEURS DE PROLIFÉRATION.....	33
A- KI-67.....	33
B- MCM6.....	34
C- PPH3.....	34

OBJECTIFS.....	36
MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	37
I- ÉTUDE CLINICO-PATHOLOGIQUE.....	37
A- Population	37
B- Étude histologique et immunohistochimique	38
II- ÉTUDE DES MICRO-ARN PAR qRT-PCR.....	41
A- Extraction des ARN.....	41
B- Etape de transcription inverse.....	41
C- La PCR en temps réel par méthode TaqMan.....	42
D- Quantification relative	42
III- ANALYSE STATISTIQUE.....	44
RÉSULTATS.....	46
I- ÉTUDE CLINICO-PATHOLOGIQUE.....	46
A- Caractéristiques de la population étudiée et données cliniques.....	46
B- Étude immunohistochimique des marqueurs de prolifération.....	51
C- Étude immunohistochimique de l'expression de HuR.....	55
II- ÉTUDE DES MICRO-ARN MIR9 ET MIR29 PAR qRT-PCR.....	62
A- MIR9.....	62
B- MIR29.....	63
DISCUSSION.....	65
I- DÉRÉGULATION DE HUR DANS LES GLIOMES.....	65
II- ÉTUDE DES MARQUEURS DE PROLIFERATION	66
A- Valeur pronostique MCM6.....	66
B- Valeur pronostique de Ki-67.....	67
III- LIEN ENTRE HUR ET MARQUEURS DE PROLIFERATION.....	68
IV- ETUDE DE L'EXPRESSION DES MICRO-ARN MIR9 ET MIR29.....	69

CONCLUSION.....	71
BIBLIOGRAPHIE.....	72
ANNEXES.....	81
ANNEXE 1 : Protocole d'immunohistochimie.....	81
ANNEXE 2 : Extraction des ARN des tissus fixés en paraffine	82
ANNEXE 3 : La réaction de RT.....	84
ANNEXE 4 : La réaction de qPCR.....	85

INTRODUCTION

AVANT PROPOS

Les gliomes diffus de l'adulte sont les tumeurs primitives du système nerveux central les plus fréquentes. En pratique, les gliomes sont classés selon deux groupes : les gliomes de bas grade de malignité et les gliomes de haut grade. Les données récentes de la biologie moléculaire ont permis d'établir une carte d'identité des altérations génétiques des gliomes et ainsi de mettre en évidence différents facteurs pronostiques. Malgré d'importants progrès thérapeutiques, le pronostic des gliomes, et en particulier des gliomes de haut grade, reste péjoratif.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux facteurs pronostiques des tumeurs gliales, et plus particulièrement à la protéine HuR. En effet, HuR est une protéine de liaison à l'ARN impliquée dans les phénomènes de régulation post-transcriptionnelle. Parmi les cibles de HuR, certaines sont impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, et donc de la prolifération, ou dans la néo-angiogénèse.

Ainsi, la dérégulation de la protéine HuR serait impliquée dans l'acquisition des principaux traits de malignité d'une tumeur, et HuR apparaît alors comme une cible thérapeutique potentielle.

Peu d'études ont été réalisées dans les tumeurs cérébrales. Une étude récente suggère que le niveau d'expression de HuR est corrélé au grade histologique. A notre connaissance, il n'y a pas d'étude s'intéressant à la corrélation entre le niveau d'expression de HuR et la survie des patients, ni à la corrélation entre HuR et les marqueurs de prolifération.

Dans la première partie de cette étude nous évaluons, à partir d'une série de 116 cas, la valeur pronostique de la protéine HuR ainsi que des marqueurs de prolifération tels que ki67 et MCM6.

Dans une seconde partie nous nous intéresserons aux mécanismes de régulation de HuR, et notamment aux micro-ARN.

I- LES GLIOMES

A- Notions d'anatomie et d'histologie du système nerveux

Du point de vue anatomique, le système nerveux est divisé en trois parties : le système nerveux central (SNC), le système nerveux périphérique (SNP) et le système nerveux végétatif (SNV). Le SNC comprend le cerveau, le cervelet, le tronc cérébral et la moelle épinière.

Du point de vue cellulaire, le SNC est constitué majoritairement de neurones, cellules spécialisées dans la communication intercellulaire, et de cellules gliales, ayant pour rôle la protection et la nutrition des neurones.

Il existe 4 variétés de cellules gliales : les astrocytes, les oligodendrocytes, les cellules épendymaires et les cellules de la microglie.

1. Les astrocytes

Les astrocytes sont les cellules les plus nombreuses du SNC. Ils sont de forme étoilée, composés d'un noyau clair et de prolongements cytoplasmiques ramifiés. Ils assurent un rôle de soutien des neurones ainsi que la régulation des échanges entre le sang et les neurones au travers de la barrière hémato-encéphalique.

2. Les oligodendrocytes

Ils ont un corps cellulaire de petit volume d'où partent des prolongements cellulaires moins nombreux et plus fins que les astrocytes. Ils assurent en particulier la myélinisation des fibres nerveuses de la substance blanche du SNC.

3. Les cellules épendymaires

Elles constituent le revêtement des ventricules.

4. Les cellules de la microglie

Ce sont des cellules de petite taille, au noyau de petite taille allongé ou arrondi et aux prolongements fins et ramifiés. Elles ont un rôle de phagocytose des débris des neurones et aussi de synthèse des cytokines et facteurs de croissance.

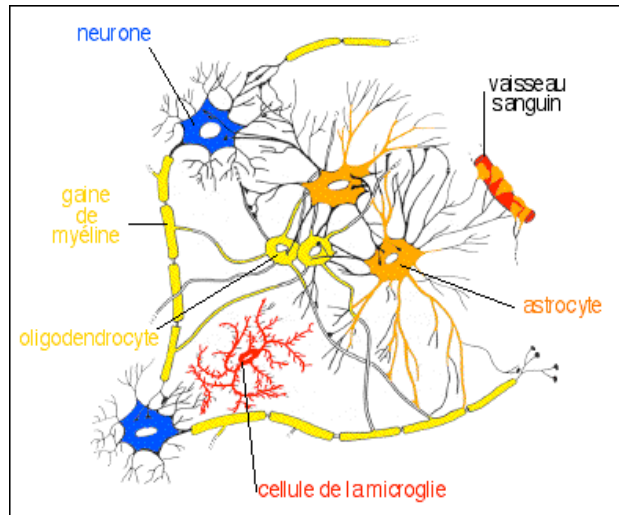


Figure 1 : La composition de la glie d'après Fig 10,8, Précis de Physiologie, Doin, 1997

B- Introduction sur les tumeurs cérébrales

Les gliomes correspondent à un groupe de tumeurs hétérogènes dérivant de cellules progénitrices des cellules gliales. Ce sont les tumeurs primitives intraparenchymateuses du système nerveux central les plus fréquentes et représentent environ 50% des tumeurs cérébrales. Leur incidence en France est d'environ 8/100000 avec 4000 nouveaux cas par an (1).

Le pronostic de ces tumeurs dépend essentiellement du type histologique et du grade. La classification des tumeurs cérébrales est celle de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), revue en 2007.

C- Classification des tumeurs gliales

La première classification histologique des tumeurs cérébrales fut établie par Bailey et Cushing en 1926 postulant alors que le développement des tumeurs s'effectuait à partir de cellules embryonnaires.

En 1979, Kernohan et al. introduisaient la notion de grading histologique et de malignité. Ils supposent que les tumeurs se développent à partir de cellules adultes susceptibles de se différencier.

En 1979, la première classification OMS associe des éléments des deux premières classifications. La classification OMS a bénéficié de révisions en 1993, 2000 et 2007.

1. Classification OMS 2007 :

Elle propose un typage histologique en fonction :

1. Du type cytologique prédominant : astrocytaire, oligodendrogial ou mixte
2. Du grade

Le grade repose sur la présence ou l'absence de critères de malignité tel que la densité cellulaire, la présence d'atypies cytonucléaires, les mitoses, la prolifération vasculaire et la nécrose.

Ainsi, il existe 4 grades histopronostiques de I à IV : de « bénin » à hautement malin.

WHO 2007 classification of gliomas	
<i>Tumeurs astrocytaires</i>	
Astrocytome à cellules géantes sous-épendymaire	Grade I
Astrocytome pilocytique	Grade I
Astrocytome pilocytique, variant pilomyxoïde	Grade II
Astrocytome diffus	Grade II
Fibrillaire	
Protoplasmique	
Gémistocytique	
Astrocytome anaplasique	Grade III
Xanthoastrocytome pléiomorphe	Grade II
Glioblastome	Grade IV
Glioblastome à cellules géantes	Grade IV
Gliosarcome	Grade IV
Gliomatose	Grade III
<i>Tumeurs oligodendrogiales</i>	
Oligodendrogliome	Grade II
Oligodendrogliome anaplasique	Grade III
<i>Tumeurs oligoastrocytaires</i>	
Oligoastrocytome	Grade II
Oligoastrocytome anaplasique	Grade III

Figure 2 : Classification OMS 2007 des tumeurs cérébrales

a) Les gliomes astrocytaires

L'astrocytome pilocytique de grade I : Il se caractérise par une architecture biphasique composée de cellules bipolaires et des fibres de Rosenthal alternant avec des cellules rondes pseudo-oligodendrogiales formant des microkystes. La présence de corps granuleux est décrite. La vascularisation est souvent anormale avec parfois une prolifération microvasculaire. Les mitoses et la nécrose sont exceptionnelles. Il touche préférentiellement les enfants.

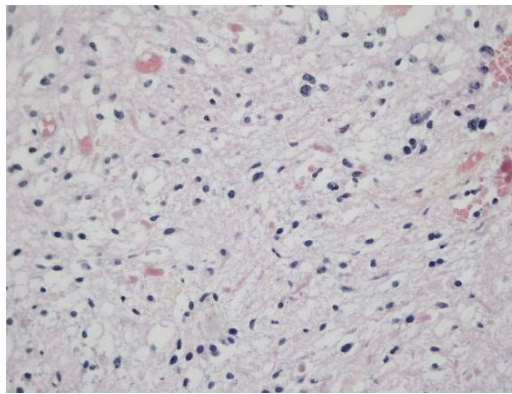


Figure 3 : Astrocytome pilocytique

L'astrocytome diffus de grade 2 : Il est défini par une cellularité augmentée comparativement à la substance blanche normale, avec des atypies cyto-nucléaires avec au maximum une mitose pour 10 champs au fort grossissement. Il n'y a pas de nécrose ni de prolifération vasculaire. Selon l'aspect des cellules, différents sous types sont identifiés : fibrillaires, gémistocytique et protoplasmique.

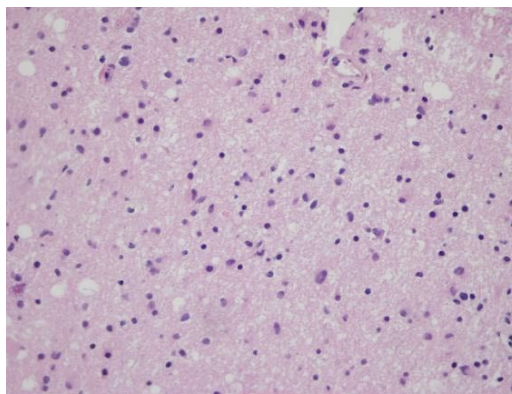


Figure 4 : Astrocytome de grade II

L'astrocytome anaplasique de grade 3 : Il se caractérise par une densité cellulaire plus importante, des atypies cytonucléaires plus marquées et des mitoses.

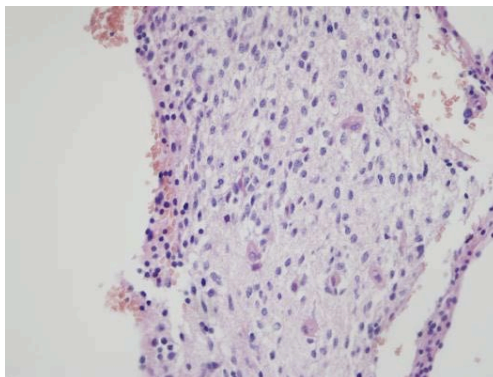
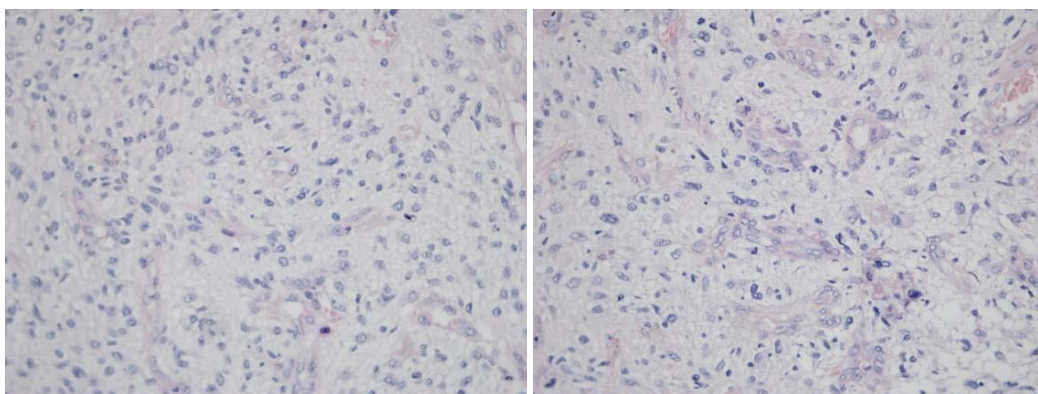


Figure 5 : Astrocytome anaplasique

Le glioblastome : Il s'agit d'une tumeur de densité cellulaire élevée aux nombreuses atypies cyto-nucléaires, aux nombreuses mitoses ainsi qu'une vascularisation anormale avec prolifération endothéliocapillaire et des plages de nécrose.



Figures 6 : Glioblastome

b) Les tumeurs oligodendrogiales

Ces gliomes sont composés de cellules tumorales arrondies, à noyaux réguliers avec un halo clair périnucléaire conférant un aspect en « nid d'abeille ». La présence de microcalcification est fréquente. Le réseau vasculaire est constitué de vaisseaux arciformes.

Selon la classification OMS, une activité mitotique significative (supérieure à 6 mitoses pour 10 champs à fort grossissement) ainsi qu'une prolifération microvasculaire ou de la nécrose orientent vers une progression en grade III.

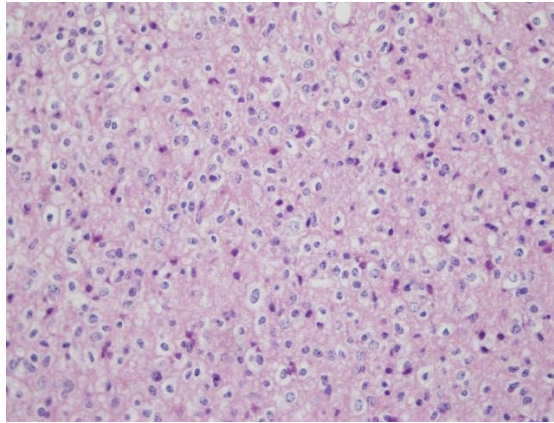


Figure 7 : oligodendrogliome de grade II

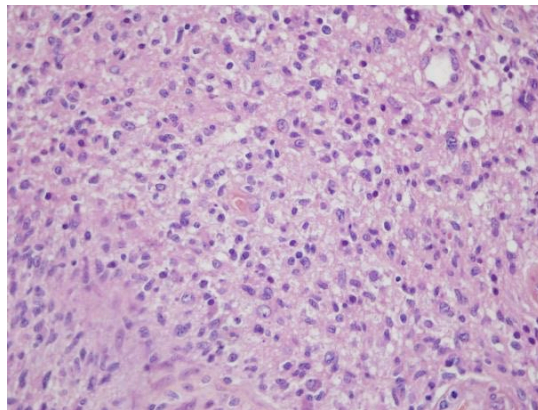


Figure 8 : oligodendrogliome anaplasique

c) Les tumeurs oligoastrocytaires

A l'heure actuelle, il n'existe pas de consensus clair sur la proportion minimale nécessaire à chacun des deux contingents pour établir le diagnostic de gliome mixte. Les oligoastrocytomes sont classés en grade II à IV en fonction des critères de malignité tel que la densité cellulaire, les atypies cytonucléaires, les mitoses ou la nécrose.

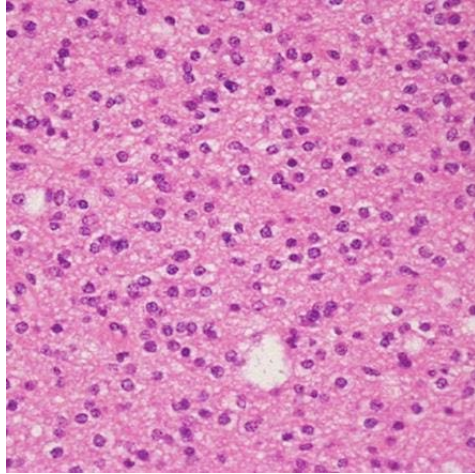


Figure 9 : Oligoastrocytome de grade II (d'après pathology outlines)

La classification OMS repose sur des critères subjectifs et relativement peu reproductibles. Pour essayer de palier à ces défauts, une autre classification a été proposée en 1987 par l'Hôpital Saint Anne ayant pour but de corrélérer l'histologie et l'imagerie.

2. Classification des gliomes selon l'Hôpital Saint Anne :

Cette classification résulte de l'étude de biopsies stéréotaxiques corrélées à l'imagerie. Elle distingue ainsi 4 classes de gliomes : les oligodendrogliomes et oligoastrocytomes de grade A, les oligodendrogliomes et oligoastrocytomes de grade B, les tumeurs glioneuronales malignes et les glioblastomes. Le grading repose sur 2 critères :

- l'hyperplasie des cellules endothéliales
- la prise de contraste en imagerie.

Le grade A correspond alors à l'absence d'hyperplasie endothéliale et de prise de contraste. Le grade B se caractérisant par une hyperplasie endothéliale et/ou une prise de contraste.

La classification de l'hôpital Saint Anne pose cependant certains problèmes notamment l'absence de corrélation possible avec la classification OMS, qui reste la classification standard et la seule reconnue par la communauté internationale. La difficulté à évaluer la micro-angiogénèse dans certains cas et donc à classer la tumeur en grade A ou B reste également une limite de cette classification (2).

D- Données moléculaires

De nombreuses altérations génétiques sont présentes au sein des tumeurs gliales. La découverte et les récentes avancées concernant les altérations génomiques au sein des tumeurs gliales permettent de réaliser une carte d'identité moléculaire de la tumeur.

1. Principales altérations moléculaires :

Les principales altérations moléculaires observées sont :

1. La codélétion 1p19q
2. La mutation du gène TP53
3. La mutation des gènes IDH
4. La méthylation de la MGMT

a) La codélétion 1p19q

La codélétion 1p19q correspond à une translocation déséquilibrée centromérique et péri-centromérique entre les chromosomes 1p et 19q.

Cette mutation est l'apanage des oligodendrogliomes : elle est détectée dans 80% des oligodendrogliomes (grade II) et environ 60% des oligodendrogliomes anaplasiques (grade III) (3). Elle est associée à un meilleur pronostic et à une meilleure réponse à la chimiothérapie (4).

En 2009, une étude portant sur 122 gliomes a montré que la codélétion 1p19q s'accompagnait d'une surexpression de gènes proneuraux comme l'interneurine-alpha, un neurofilament de classe IV impliqué dans la morphogénèse neuronale. Ainsi, l'expression immunohistochimique de l'interneurine-alpha est un facteur prédictif de la codélétion 1p19q (5).

b) La mutation du gène TP53

La protéine p53 est une phosphoprotéine nucléaire qui agit en intégrant des signaux de stress cellulaire et en initiant des réponses coordonnées telles que l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose. Une fois mutée, elle ne peut plus se lier à l'ADN. Sa demi-vie est alors augmentée, provoquant son accumulation. Cette accumulation est détectable en immunohistochimie.

Cette mutation est fréquemment observée dans les tumeurs de type astrocytaire (6).

La mutation p53 est un marqueur pronostic défavorable au sein des gliomes de grade II et III (7). La mutation TP53 et la codélétion 1p19q sont mutuellement exclusive (8).

c) La mutation des gènes IDH

L'isocitrate deshydrogénase est une enzyme permettant la décarboxylation de l'isocitrate en alpha-kétoglutarate dépendante du NADP^+ , jouant ainsi un rôle de protection cellulaire contre le stress oxydatif.

Il existe deux isoformes principaux : IDH1 et IDH2. L'IDH1 agit au niveau du cytosol et IDH2 au niveau mitochondrial. Les mutations IDH1 sont beaucoup plus fréquentes que les mutations d'IDH2. La mutation d'IDH1 survient le plus fréquemment au niveau du codon 132, remplaçant alors une arginine par une histidine (R132H) (9). La mutation induit une perte de fonction d'IDH1 conduisant à une accumulation de 2-hydroxyglutarate et à une diminution du glutathion réduit. La conséquence de cette mutation est donc une sensibilité accrue au stress oxydatif. Les mutations IDH1 et IDH2 sont mutuellement exclusives.

Il a été démontré que les mutations des gènes IDH sont très fréquentes dans les gliomes infiltrants de bas grade ainsi que dans les glioblastomes secondaires mais sont retrouvés de manière plus rare (12%) au sein des glioblastomes primaires. Les mutations seraient corrélées à un âge plus jeune et à un meilleur pronostic (10,11).

La mutation R132H est recherchée en routine par immunohistochimie (12).

d) La méthylation de la MGMT

Le gène de la MGMT (O6-MéthylGuanine-DNA MéthylTransférase MGMT) est situé sur le chromosome 10. La MGMT est impliquée dans la réparation de l'ADN. Cette enzyme

s'oppose aux effets de la chimiothérapie par agents alkylants tel que le temozolomide (TEMODAL).

Son expression est régulée par la méthylation de son promoteur. Lorsque le promoteur n'est pas méthylé, MGMT est exprimée et il existe donc une résistance à l'action d'une chimiothérapie alkylante.

La méthylation de son promoteur est responsable d'une inactivation de l'enzyme. Celle-ci est donc associée à une meilleure réponse au traitement par chimiothérapie.

La méthylation du promoteur de MGMT serait plus fréquente dans les gliomes diffus de bas grade et dans les gliomes avec composante oligodendrogliale que dans les gliomes de haut grade (13).

La méthylation du promoteur de la MGMT serait corrélée à une meilleure survie dans les glioblastomes.

En 2005, Hegi et Al ont comparé l'association chimiothérapie-radiothérapie au traitement radiothérapie seule chez les patients atteints de glioblastome. Il a été démontré que les patients présentant une méthylation de MGMT répondaient mieux au traitement par temozolomide (14).

2. Classification histo-moléculaire et gliomagénèse

La découverte des mutations des gènes IDH permet de proposer 2 voies de gliomagénèse différentes(15):

a) La gliomagénèse IDH-dépendante

Elle concerne environ 90% des gliomes infiltrants de grade II. Ils sont également classés en fonction des mutations TP53 et de la codéletion 1p19q.

Ainsi, on distingue :

- Les gliomes IDH+, p53 non exprimée sans codéletion 1p19q : IDH+/p53-/1p19q-
- Les gliomes IDH+/p53+/1p19q- : le plus souvent de phénotype astrocytaire
- Les gliomes IDH+/p53-/1p19q+ : le plus souvent de phénotype oligodendroglial.

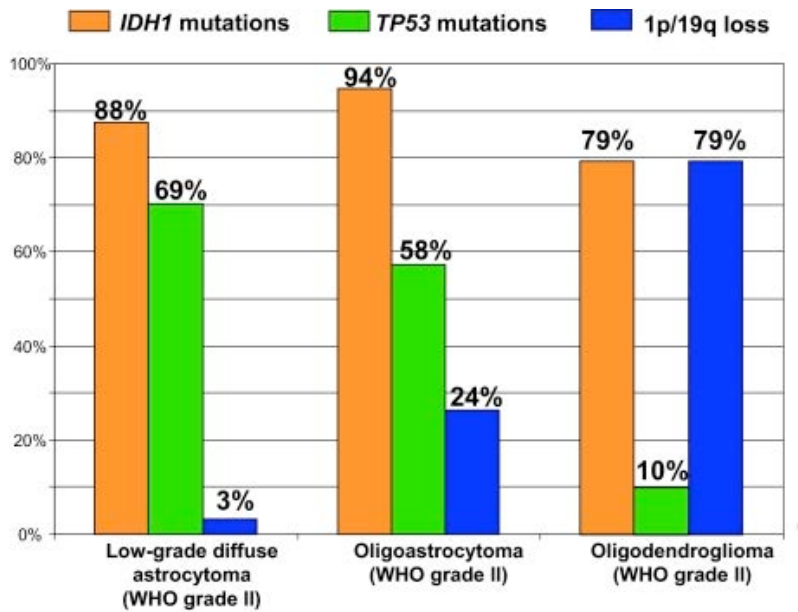


Figure 10 : Fréquence des altération génétiques dans les gliomes diffus de bas grade (10).

b) La gliomagénèse IDH-indépendante

Ce groupe inclut :

- Le grade II triple négatif : Il se caractérise par un pronostic nettement plus péjoratif (16).
- Les gliomatoses primitives : Elles sont définies par des critères radiologiques tels qu'une tumeur très infiltrante atteignant au moins 3 lobes et le tronc cérébral ou les noyaux gris centraux.
- Les glioblastomes de novo : ils dériveraient de la transformation maligne d'une cellule souche neurale. En 2009, Verhaack et coll ont établi une classification en 4 sous-groupes en fonction de leurs altérations génétiques(17) :
 - Le groupe proneural et neural : amplification de PDGFRalpha,
 - Les glioblastomes classiques : amplification du chromosome 7
 - Les glioblastomes mésenchymateux : altération de NF1, délétion du chromosome 10 et délétion PTEN.

E- Présentation clinique (18)

1. Syndrome d'hypertension intracrânienne

Le syndrome d'hypertension intracrânienne (HTIC) peut être lié soit à processus expansif intracrânien soit à un blocage des voies d'écoulement du LCR.

Il se caractérise par l'association de :

- céphalées typiquement matinales
- vomissements
- troubles cognitifs
- un oedème papillaire au fond d'œil.

2. La comitialité

Les crises d'épilepsies partielles ou généralisées peuvent être révélatrices de tumeurs cérébrales. Ainsi la survenue d'une première crise chez un patient adulte justifie la réalisation d'une imagerie cérébrale à la recherche d'un processus expansif.

3. Déficits focaux

Ils sont liés à l'infiltration du parenchyme cérébral par la tumeur. Ils peuvent être d'apparition très rapide. Leurs types dépendent de la localisation de la tumeur.

Le tableau ci-après résume les principales atteintes cliniques en fonction de la localisation tumorale.

Tableau 1 : Symptomatologie clinique en fonction de la localisation tumorale

Localisation	FRONTALE	PARIETALE	TEMPORALE	OCCIPITALE
Principaux signes cliniques	Syndrome frontal (apragmatisme, désinhibition) Troubles de l'attention HTIC isolée	Aphasie, apraxie, Déficits sensitifs	Troubles du langage si hémisphère dominant Troubles mnésiques	Hémianopsie HTIC isolée

4. Les complications évolutives

a) Hydrocéphalie

Elle résulte de l'obstruction des voies d'écoulement du LCR par la tumeur.

b) Engagement

L'engagement temporal correspond au passage de l'uncus et de l'hippocampe dans la fente de Bichat entre le bord libre de la tente du cervelet et le tronc cérébral. Cliniquement, il se traduit par une atteinte du nerf oculomoteur (III) homolatéral avec ptosis et mydriase aréactive et peut s'accompagner d'une hémiparésie controlatérale à la tumeur.

L'engagement sous falcoriel correspond à un engagement du cingulum sous la faux du cerveau entraînant un déplacement des structures ventriculaires médianes.

L'engagement des amygdales cérébelleuses au travers du trou occipital est une complication gravissime entraînant une détresse respiratoire majeure.

c) Méningite tumorale

Elle résulte de l'extension aux espaces sous arachnoidiens d'une tumeur cérébrale. Le diagnostic est évoqué devant l'apparition d'une paralysie affectant un ou plusieurs nerfs crâniens associée à des radiculopathies.

F- Aspects radiologiques

1. Gliomes diffus de bas grade

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est le gold standard. Les gliomes diffus de bas grade apparaissent comme des lésions mal limitées, en hyposignal T1 et en hypersignal en pondération T2/FLAIR. Ils ne se rehaussent pas après injection de produit de contraste.

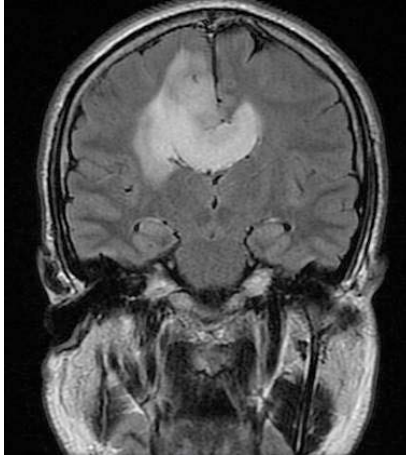


Figure 11 : IRM pondération FLAIR- oligodendrogliome de grade II de localisation fronto-calleuse

2. Gliomes de grade III

Il n'y a pas de présentation radiologique caractéristique. Trois situations peuvent alors se présenter :

- La lésion est hétérogène, avec un œdème et prend le contraste de manière hétérogène sans prise de contraste annulaire : cet aspect doit faire évoquer en premier lieu un gliome anaplasique.
- La lésion est similaire à celle d'un gliome de grade II, infiltre le parenchyme et ne prend pas le contraste.
- La lésion est caractérisée par une masse hétérogène avec prise de contraste en anneau autour d'une zone nécrotique, évoquant alors un aspect de glioblastome.

3. Gliomes de grade IV

a) Tomodensitométrie (TDM)

En TDM, le glioblastome se caractérise par une masse, hypodense, assez mal limitée, entourée d'un oedème péri-lésionnel. Après injection de produit de contraste il existe une prise de contraste périphérique dite en cocarde, entourant une zone centrale nécrotique.

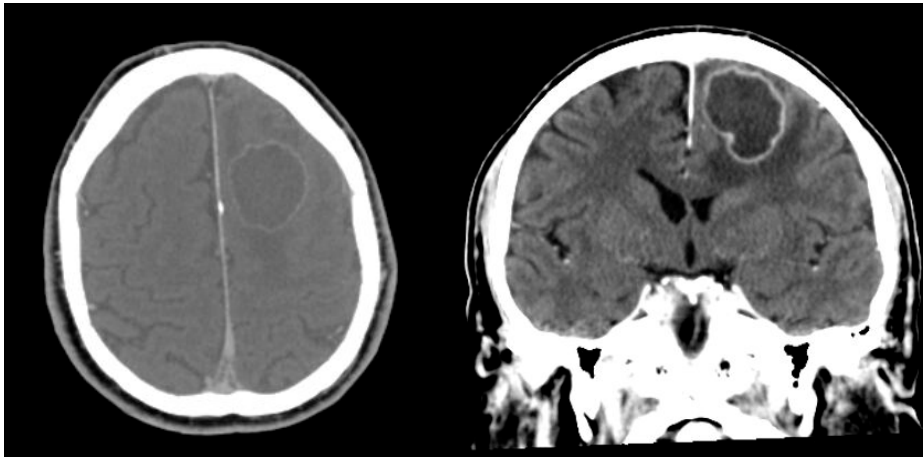


Figure 12 : TDM après injection de produit de contraste iodé - glioblastome frontal gauche

b) IRM

- IRM conventionnelle

Il s'agit d'une lésion en hyposignal T1 et en hypersignal sur les séquences pondérées en T2/FLAIR. Après injection de Gadolinium, il existe une prise de contraste hétérogène. La lésion est entourée d'une plage en hypersignal T2 correspondant à l'oedème péri-lésionnel et d'infiltration périphérique.

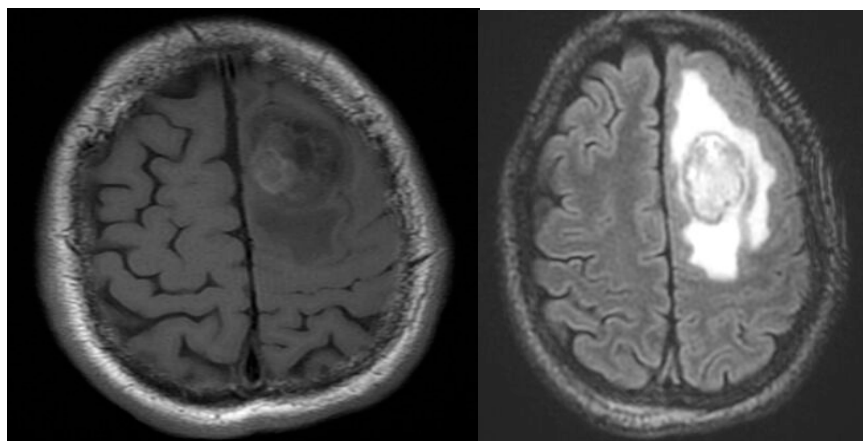


Figure 13 : IRM encéphalique séquence T1 et T2 FLAIR- glioblastome frontal gauche.

- IRM de diffusion

L'IRM de diffusion évalue le mouvement aléatoire des molécules d'eau. Le calcul du coefficient apparent de diffusion (ADC) permet de déterminer la densité tumorale. En effet, il est d'autant plus élevé que les molécules d'eau sont mobiles. Dans les glioblastomes, l'ADC est basse.

- IRM de perfusion

L'IRM de perfusion apporte des informations sur la vascularisation du parenchyme cérébral. En effet, le degré de prolifération vasculaire est corrélé à l'agressivité de la tumeur. L'estimation du volume sanguin cérébral relatif (rCBV) est un bon reflet de l'état de vascularisation. Dans les tumeurs gliales de haut grade, le rCBV est haut (19).

- Spectro-IRM

La spectro-IRM apporte des informations sur le développement spatial des gliomes par étude des modifications spatiales des métabolites tels que la choline ou le N-acétyl-aspartate.

Ainsi les gliomes de haut grade se caractérisent par une augmentation de la choline et une diminution du N-acétyl-aspartate (19).

G- Principes de prise en charge (20)

En dehors de toute urgence vitale, il est recommandé qu'une réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) précède tout geste chirurgical.

Celle-ci aura pour but de déterminer la meilleure stratégie diagnostique et thérapeutique ainsi que la faisabilité d'un geste chirurgical.

La confirmation histologique est fondamentale et nécessite l'obtention d'un prélèvement par voie neurochirurgicale. Elle doit précéder toute décision d'instauration d'un traitement complémentaire par radiothérapie ou chimiothérapie.

1. La chirurgie

La chirurgie, quand elle est possible, a deux buts :

- diagnostique : l'obtention d'un prélèvement en quantité suffisante pour obtenir un diagnostic histologique.

- thérapeutique : le résidu tumoral influençant directement la survie, la résection tumorale est conseillée à chaque fois qu'elle est réalisable, avec pour objectif l'obtention d'une exérèse la plus complète possible de la tumeur, sans entraîner de risque fonctionnel majeur.

Les critères d'opérabilité doivent tenir compte de l'âge du patient, de son état général, de l'existence d'éventuelles co-morbidités, de son état clinique et fonctionnel (score OMS et index de Karnofsky), de la taille et la localisation de la tumeur et de la possibilité d'une exérèse complète.

Une IRM précoce dans les 48 à 72 heures après le geste chirurgical doit être pratiquée afin d'apprécier le volume résiduel tumoral.

2. La radiothérapie

Les modalités de la radiothérapie varient en fonction de la tumeur et de sa localisation. Elle doit prendre en compte le risque de neurotoxicité post radique.

a) Gliomes de grade II

La radiothérapie est réservée aux patients aux critères défavorables tels que l'impossibilité d'une résection chirurgicale, ou de progression clinique et/ou radiologique après chimiothérapie.

La dose d'irradiation est alors de 45 à 50.4 Gy en fraction de 1.8 Gy.

b) Gliomes de grade III

Une méta-analyse de Lapperrière et *al.* en 2002 a conclu à l'intérêt sur la survie d'une radiothérapie post-opératoire dans les gliomes de grade III, comparativement à l'absence de radiothérapie.

Les doses recommandées sont 57 à 60 Gy en fraction de 1.8 à 2 Gy. Le délai recommandé avant l'instauration du traitement est de 2 à 6 semaines après la chirurgie.

c) Gliomes de grade IV

Elle doit être débutée 4 à 6 semaines après le geste chirurgical. En cas d'association avec une chimiothérapie, la radiothérapie débute le jour de la chimiothérapie.

La dose recommandée est de 60 Gy en 30 fractions de 2 Gy, 5 jours par semaine. Des adaptations de dose sont effectuées en fonction de l'âge et de l'association à une chimiothérapie.

3. La chimiothérapie

a) Le témozolomide (TMZ)

Le TMZ est une chimiothérapie alkylante administrée par voie orale. Le TMZ agit en ajoutant des groupes méthyls sur l'ADN en position O6-guanine, N7-guanine et N3-adenine. Ceci a pour conséquence un mismatch au niveau de l'ADN alors dégradé par l'action du complexe mismatch repair (MMR). La MGMT s'oppose à l'action du TMZ en dégradant les groupes méthyls en position O6-guanine.

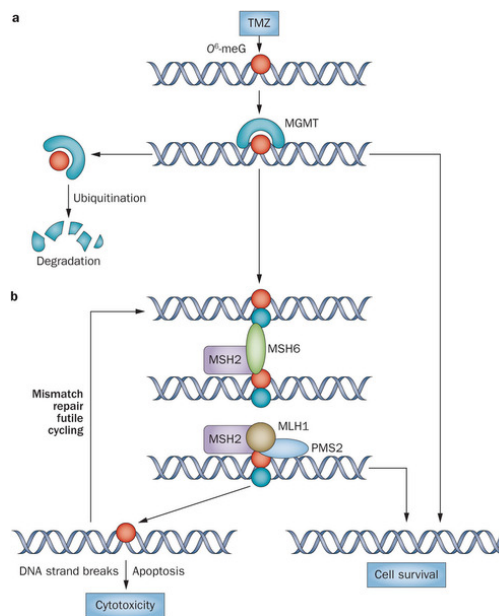


Figure 14 : Interaction entre TMZ et MGMT d'après Wilck *et al.*

Il a ainsi été démontré un bénéfice en terme de survie plus important de l'association radiochimiothérapie chez les patients présentant une mutation de MGMT (21).

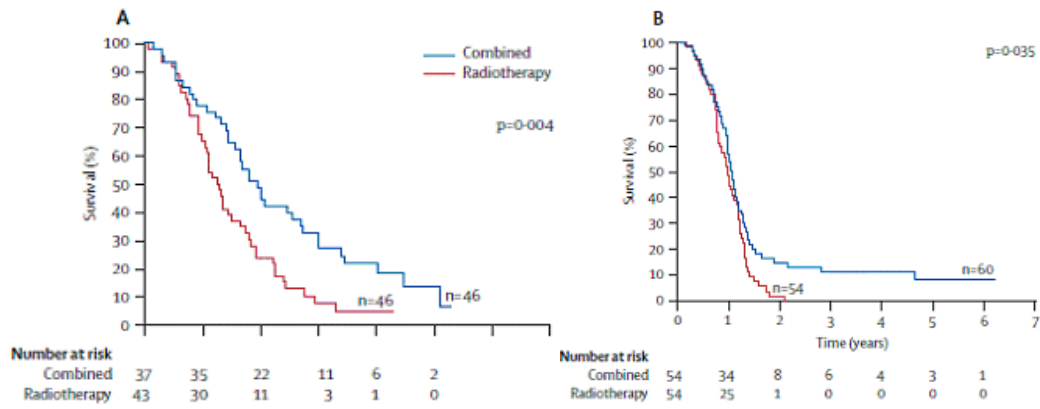


Figure 15: courbe de Kaplan-Meier- survie en fonction du statut MGMT association radio-chimiothérapie (22)

b) Le protocole de STUPP

Ce protocole est basé sur les conclusions de l'essai EORCT-NCIC 2005. Il consiste à associer, chez les patients atteints de GBM de moins de 70 ans, une radiothérapie conformationnelle à la dose de 60 Gy et un traitement oral quotidien concomittant par témozolomide, suivi d'un traitement adjuvant de 6 cycles témozolomide cinq jours par mois (21).

c) Le bévacizumab

Le bévacizumab est un anticorps monoclonal dirigé contre le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF).

L'essai AVAGLIO étudiait l'adjonction de bévacizumab au traitement classique par radio-chimiothérapie en première ligne de traitement des glioblastomes.

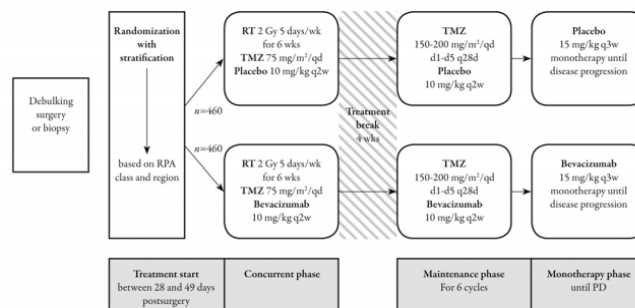


Figure 16 : Design de l'étude AVAGLIO (22)

Les résultats sont: une augmentation de la durée de survie sans progression, de la qualité de vie et une diminution de prescription de corticoïdes dans le bras expérimental versus placebo (22).

Une étude menée récemment confirme ces données. La survie sans progression est significativement augmentée dans le bras bénéficiant d'un traitement par bévacizumab (10.6 mois) comparativement au placebo (6.2 mois). En revanche, il n'existe pas d'amélioration en terme de survie globale (23).

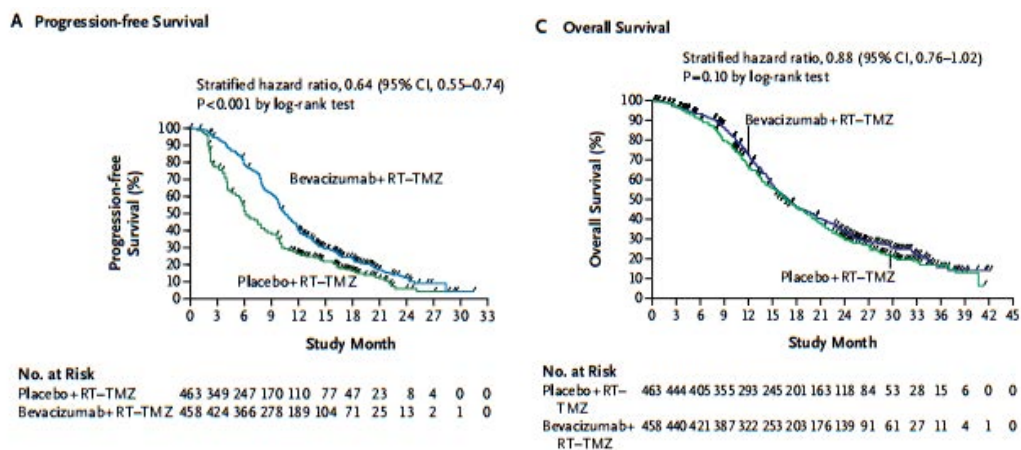


Figure 17 : Kaplan Meier- Survie sans progression et survie bevacizumab versus placebo (23)

4. Les traitements symptomatiques

Les corticoïdes oraux et parentéraux sont fréquemment utilisés pour leur action anti-oedémateuse. D'autres traitements symptomatiques tels que les anti-épileptiques et antiémétiques peuvent être prescrits au cours de l'évolution d'une tumeur cérébrale.

II- HUR

A- Introduction

HuR (Human Antigen R) est une protéine de 36 kD, composée de 326 acides aminés, appartenant à la famille des protéines ELAV (Embryonic Lethal Abnormal Vision). Cette famille comprend 4 protéines : HuB, HuC et HuD présentes dans les cellules neuronales, et HuR, de localisation ubiquitaire. Le gène HuR est localisé sur le chromosome 19 (24).

B- La protéine HuR

HuR est une protéine de liaison à l'ARN possédant 3 domaines de liaison à l'ARN messagers (ARNm) nommés « RNA Recognition Motif » (RRM1 à 3). Ces domaines reconnaissent spécifiquement les séquences riches en adénosine et en uracile (ARE) dans la région non traduite des ARNm.

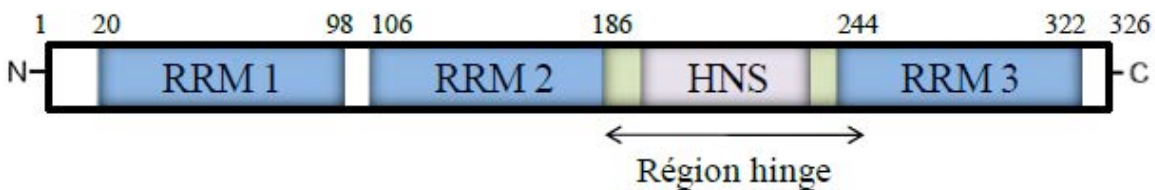


Figure 18 : Protéine HuR et ses différents domaines

1. Les domaines RRM

Ils se composent d'environ 90 acides aminés. RRM 1 et RRM2 sont impliqués dans la fixation de HuR aux ARNm riches en ARE. RRM3 serait impliqué dans l'oligomérisation (25).

Les domaines RRM2 et RRM3 sont séparés par une région « hinge » contenant le domaine HNS.

2. Le domaine HNS

Le domaine HNS (HuR nuclear shuttling) est composé de 32 acides aminés. Il est impliqué dans transport nucléo-cytoplasmique de HuR. En effet, HuR est de localisation essentiellement nucléaire mais peut accéder au cytoplasme via ce domaine (26).

Les mécanismes moléculaires permettant l'export de HuR restent mal compris. Il semblerait que le transport de HuR du noyau vers le cytoplasme soit sous la dépendance de CARM1 (Coactivator Associated Arginine Methyltransferase) (26,27).

C- Fonction de HuR

HuR participe à la régulation post transcriptionnelle des ARNm.

1. Au niveau nucléaire

a) Epissage alternatif

Ainsi il a été démontré que HuR régulate l'épissage alternatif du pré-ARNm de fas, une protéine impliquée dans l'apoptose (28). Récemment, Zhao et al. ont démontré l'implication de HuR dans l'épissage alternatif du pré-ARNm de SIRT1. SIRT1 est une protéine intervenant dans différents processus tel que la résistance au stress, l'apoptose, la sénescence cellulaire (29).

b) Polyadénylation

HuR régule la polyadénylation en bloquant les sites contenant des séquences riches en uracile (30,31).

2. Au niveau cytoplasmique :

Bien qu'étant majoritairement présent au niveau nucléaire, c'est au niveau cytoplasmique que le rôle de HuR dans la régulation post-transcriptionnelle est le mieux connu : la stabilisation des ARNm et la régulation de la traduction.

a) La stabilisation

HuR se fixe aux éléments riches en AU dans la région 3' non traduite des ARN messagers permettant ainsi leur stabilisation.

La stabilisation des ARNm participe à leur protection. Cette stabilisation serait sous la dépendance de RRM3 qui, en se fixant sous forme d'oligomère aux ARNm, empêcherait la fixation des protéines déstabilisatrices avec notamment une dissociation du complexe RISC et de l'ARNm (32).

b) Modulation de la traduction

Les mécanismes précis de modulation de la traduction de ces cibles restent méconnus.

Cependant, il a été démontré que, dans certains cas, en particulier pour p53, la fixation de HuR au niveau des ARE des ARNm augmente le recrutement des polysomes et donc entraîne une majoration de la traduction (33).

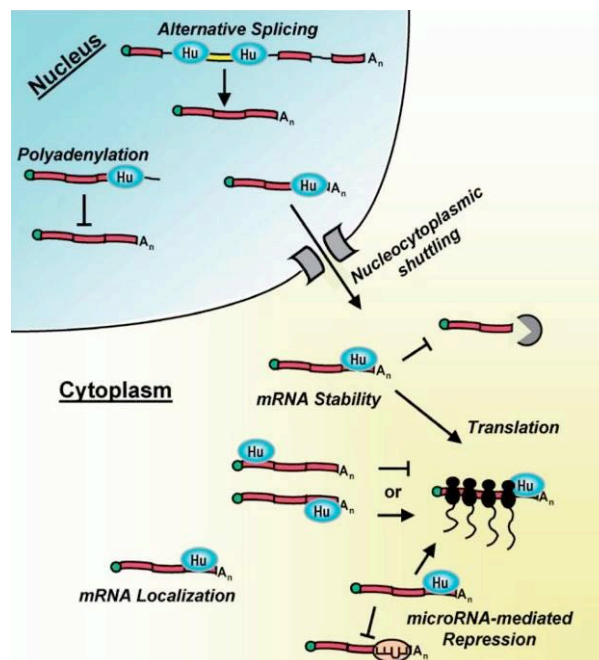


Figure 19 : HuR et la régulation post-transcriptionnelle au niveau nucléaire et cytoplasmique (34).

D- Les mécanismes de régulation de HuR

HuR étant de localisation principalement nucléaire, son transport, via le domaine HNS, vers le cytoplasme, apparaît essentiel pour assurer ses fonctions de régulation. Cependant, les conditions exactes de l'export de HuR restent mal comprises.

Les modifications de HuR par phosphorylation ou méthylation auraient une action de régulation au niveau de la localisation de HuR et de son affinité avec les ARNm.

Le transport de HuR via le domaine HNS ainsi que son affinité aux ARNm sont sous la dépendance de nombreux facteurs à la fois endogènes et exogènes qui agissent par activation de différentes voies de signalisation. Voici les principaux de mécanismes de régulation connus à ce jour.

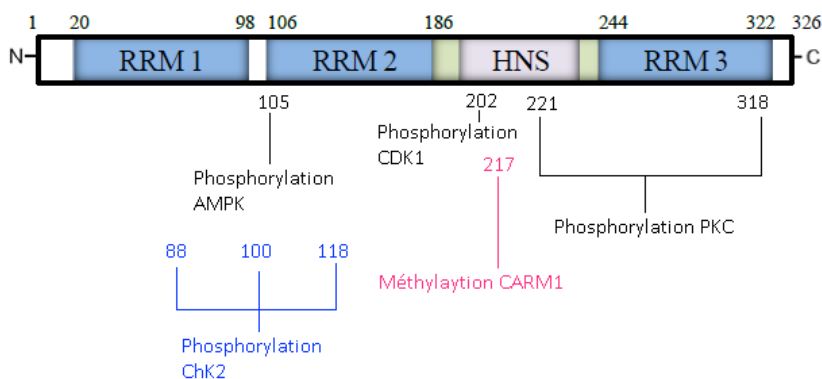


Figure 20 : Principales modifications post-transcriptionnelles de HuR

1. L'AMP activated kinase (AMPK)

L'AMPK est une enzyme ubiquitaire intervenant dans la régulation du métabolisme énergétique. Elle intervient dans l'import nucléaire de HuR par phosphorylation de l'importine alpha sur la sérine 105. Il a été prouvé que l'inhibition de l'AMPK entraînait une augmentation du taux cytoplasmique de HuR et que son activation augmentait la présence de HuR au niveau nucléaire (35,36).

2. Les protéines kinase C (PKC) α et δ

Les protéines kinases C α et δ sont deux isoformes de la famille des sérine/thréonine kinases PKC, impliquées dans diverses fonctions cellulaires telles que la différenciation cellulaire, la prolifération cellulaire, la néo-angiogénèse ou l'apoptose.

Schématiquement, l'activité des PKC α et δ est modulée par l'ATP et l'angiotensine II qui induisent le passage des PKC au niveau nucléaire. Une fois dans le noyau, les PKC phosphorylent HuR au niveau des sérines 221 (sur le domaine HNS) et 318 (RRM3) entraînant alors son export vers le cytoplasme (27,37–40).

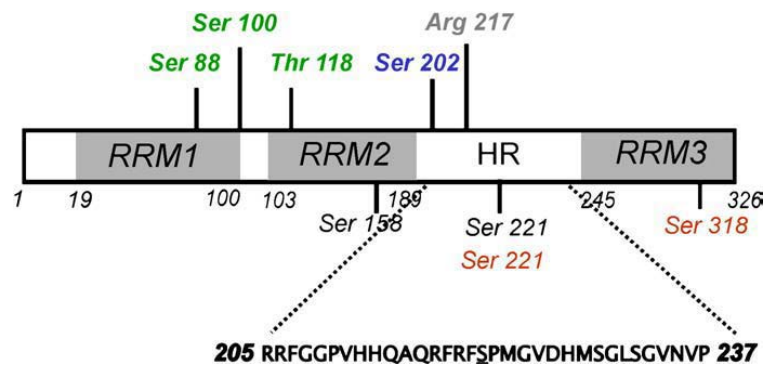


Figure 21 : Phosphorylation de HuR par les PKC au niveau des sérines 221 et 318(40)

3. Cycline dépendante kinase 1 (Cdk1)

Cdk1 est une sérine/thréonine kinase intervenant dans la régulation du cycle cellulaire. Elle est en effet essentielle pour le passage des phases G2 à M.

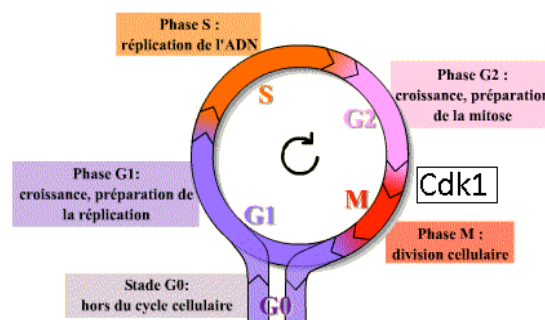


Figure22 : Le cycle cellulaire et Cdk1, d'après http://biophile.free.fr/Cours/L3_BioCell.html

Cdk1 est capable de phosphoryler HuR au niveau de la sérine 202 au moment de la phase G2 entraînant alors un maintien de HuR au niveau nucléaire. Ainsi la phosphorylation en position 202 empêcherait son passage cytoplasmique. L'inhibition de Cdk1, par des facteurs endogènes ou exogènes entraîne une augmentation du taux cytoplasmique de HuR(41).

En condition de stress cellulaire, plusieurs signaux inhibent le cycle cellulaire et donc l'action de Cdk1. HuR est alors exporté vers le cytoplasme. Dans ce compartiment, HuR interagit avec les ARNm codant pour les protéines de réponse au stress cellulaire telles que p53 ou Bcl-2 (41).

4. Coactivator Associated Arginine Methyltransferase (CARM1)

CARM-1 est responsable de la méthylation de HuR au niveau de son arginine 217, se trouvant au niveau du domaine HNS. Les conséquences exactes de cette méthylation sur le transport restent mal connues. Elle pourrait non seulement entraîner une augmentation de l'export mais aussi bloquer la réintroduction de HuR au niveau nucléaire. Cette accumulation cytoplasmique modifierait le pool d'ARNm de certaines cibles de HuR comme la cycline A, la cycline B1, c-fos ou encore p16 (42)(43).

5. Checkpoint Kinase 2 (ChK2)

ChK2 est une sérine/thréonine kinase impliquée dans la régulation du cycle cellulaire et le déclenchement de l'apoptose en cas de dommage de l'ADN. Les altérations de l'ADN entraînent l'activation de ChK2 par phosphorylation par l'ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated). Une fois activée, Chk2 peut phosphoryler différents substrats impliqués dans la régulation du cycle cellulaire ou la réparation de l'ADN (44).

ChK2 phosphoryle HuR au niveau de 3 résidus : la sérine 88, la sérine 100 et la thréonine 118. Cette mutation modifie l'affinité de HuR pour le pool d'ARNm disponible.

Abdelmohsen et *al.* ont démontré que la phosphorylation de HuR par ChK2 entraîne une modification de son affinité pour SIRT1. HuR régule positivement l'expression de SIRT1, protéine impliquée notamment dans la résistance au stress et la survie cellulaire. En phosphorylant HuR, Chk2 entraîne une modification de son affinité pour SIRT1 et donc une diminution son expression (45).

E- HuR et cancer

1. Implication de HuR dans la cancérogénèse

HuR régule de nombreux ARNm par sa fonction stabilisatrice et son action sur la traduction. Ainsi, HuR est impliqué dans l'expression de gènes codant pour la différenciation, la prolifération cellulaire, la résistance au stress, l'angiogénèse ainsi que la réponse immune et inflammatoire. La possibilité d'une implication de HuR dans les cancers a été évoquée dès les années 1990 (46).

Les données actuelles suggèrent que la dérégulation de HuR serait impliquée dans l'acquisition par les cellules des principaux traits de malignité propres aux cellules cancéreuses (47) :

- L'augmentation de la prolifération cellulaire
- La résistance à l'apoptose
- L'augmentation de l'angiogénèse locale
- La possibilité d'une invasion et de métastases
- L'échappement au contrôle immunitaire

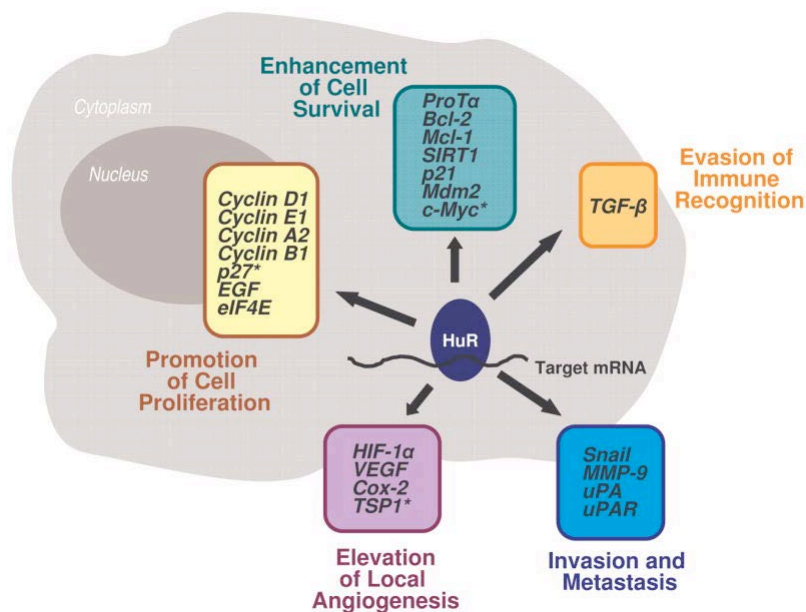


Figure 23 : Implication de HuR dans l'acquisition de la malignité (48)

a) L'augmentation de la prolifération cellulaire

Par sa fixation aux ARNm, HuR augmente le niveau d'expression de protéines régulant le cycle cellulaire, parmi elles, les cyclines, qui en activant les CDK jouent un rôle dans la progression tumorale (49).

b) La résistance à l'apoptose

HuR favorise l'expression de protéines anti-apoptotiques (Pro T α , Bcl-2, SIRT1) et inhibe l'expression des protéines pro-apoptotiques (Fas, c-Myc) (48).

c) Augmentation de l'angiogénèse locale :

Pour s'étendre, une tumeur nécessite de l'oxygène et des nutriments qui lui sont apportés par les vaisseaux. La néo-angiogénèse est donc un processus capital dans la cancérogenèse. HuR stabilise les ARNm des facteurs pro-angiogéniques (VEGF, COX-2 et HIF1 α) et empêche la synthèse des facteurs anti-angiogéniques (TSP1(50)).

d) L'échappement au système immunitaire

Le système immunitaire est en charge de la dégradation des cellules cancéreuses. Mais les cellules cancéreuses sont capables de développer des mécanismes de résistance. HuR contribue à l'échappement au système immunitaire en augmentant le taux de TGF- β (transforming growth factor β), une cytokine impliquée dans la prolifération et l'invasion cellulaire (51,52).

e) L'invasion cellulaire et les métastases

L'invasion cellulaire est un mécanisme complexe qui nécessite des changements au niveau de la matrice extra-cellulaire. HuR est capable d'encourager l'invasion cellulaire par action stabilisatrice sur des protéines pouvant dégrader la matrice extra-cellulaire telles que MMP-9 (48).

2. Expression de HuR dans les tissus tumoraux

En 2003, Lopez et Al. ont étudié l'expression immunohistochimique de HuR dans un panel de 135 tissus sains et 182 tumeurs d'origine diverse (gastrique, pulmonaire, colique, thyroïdienne et rénale). Les données suggèrent qu'au sein de tous les tissus normaux, il existe une expression principalement nucléaire de HuR d'intensité faible à modérée, contrastant avec une nette augmentation du niveau de HuR au niveau des tissus tumoraux, associée à une présence cytoplasmique (53).

Ainsi, une surexpression cytoplasmique de HuR est associée à un pronostic plus sombre dans les cancers coliques, à un grade plus élevé, une taille tumorale plus importante et un plus faible taux de survie dans les cancers du sein et de l'ovaire, ainsi qu'à un risque accru de rechute dans le carcinome prostatique (54–61).

3. Expression de HuR dans les tumeurs cérébrales

En 2001, Nabors et *al.* ont étudié l'expression de HuR dans 49 tumeurs cérébrales. Les données permettent de conclure que HuR est exprimé au niveau des tumeurs cérébrales et que sa surexpression est corrélée au grade histopronostique de la tumeur. Au sein des glioblastomes, les auteurs observent un fort marquage immunohistochimique de HuR au niveau des zones de nécrose et de néo-angiogénèse. Dans ces zones, il existe également une augmentation des facteurs pro-angiogéniques comme COX-2 et VEGF (52,62).

Les études menées par Ido et *al.* et Sakuma et *al.* ont prouvé l'implication de HuR dans la régulation de l'expression de VEGF dans les méningiomes et les astrocytomes (63,64).

Plus récemment Bolognani et *al.* ont étudié l'expression de HuR dans une série de 216 tumeurs gliales et au sein de culture cellulaire de gliomes. Les auteurs rapportent que le niveau d'expression cytoplasmique de HuR est corrélé au grade histologique avec un niveau d'expression global plus important au sein des tumeurs oligodendrogiales. Ils soulignent également que l'augmentation cytoplasmique de HuR est en lien avec la diminution du facteur pro-apoptotique c-myc et l'augmentation des facteurs favorisant la néo-angiogénèse : VEGF et COX-2.

De plus, l'inhibition de HuR au niveau des cultures cellulaires diminue significativement la croissance tumorale (65).

III- MICRO-ARN

A- Définition et biosynthèse

Les micro-ARN (miRs) sont des ARN simple brin dont la taille est inférieure à 25 nucléotides. Ils ont un rôle de régulation post transcriptionnelle.

Les miR sont transcrits par la polymérase II en un transcrit primaire appelé « pri-miARN ». Le pri-miARN contient des structures en épingles à cheveux. Il subit alors une première phase de maturation par Drosha en association avec DGCR8. Cette maturation consiste en un clivage des structures en épingles à cheveux.

Les structures en épingles à cheveux sont des « pré-miARN ». Ceux-ci sont exportés dans le cytoplasme via l'exportine 5. Dans le cytoplasme, ils subissent la deuxième étape de maturation. Cette maturation est alors réalisée par Dicer. Il s'agit d'une excision de la boucle pré-terminale des pré-miARN.

Après cette maturation, le pré-miARN devient micro-ARN. Il est alors chargé sur une protéine Argonaute pour former le complexe RISC. Un seul des 2 brins est conservé dans le complexe RISC, l'autre étant dégradé par la fonction hélicase de Dicer.

Les miR régulent négativement l'expression des gènes. En effet les miR entraînent une dégradation des ARNm cibles via une dé-adénylation et un retrait de la coiffe. D'autres interactions plus complexes ont également été décrites.

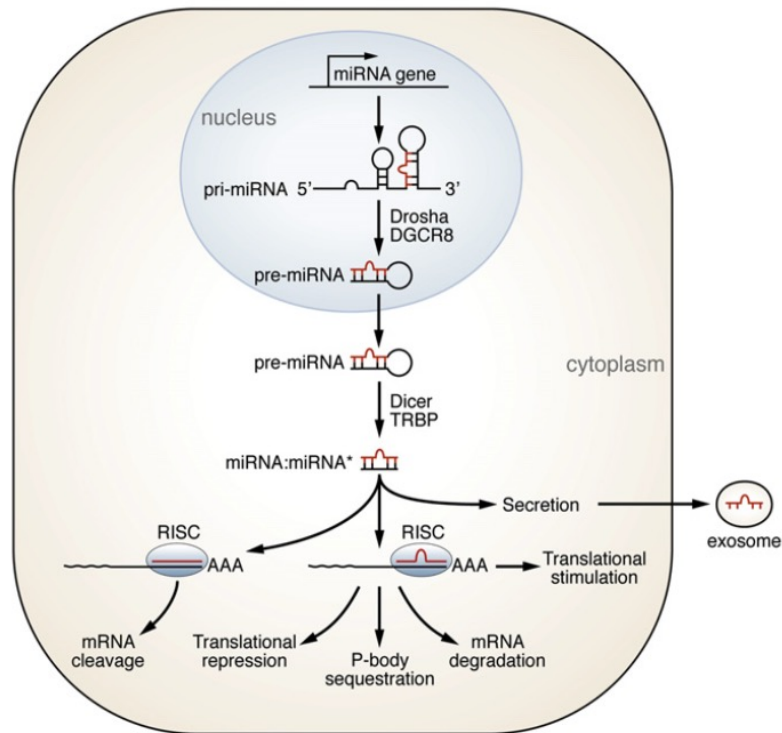


Figure 24 : Biosynthèse des micro-ARN

B- MiR et HuR

Plusieurs études expérimentales ont montré le rôle de certaines microARNs dans la régulation de HuR.

1. miR29

Dans les carcinomes mammaires, une dérégulation de miR29 serait impliquée dans l'acquisition des capacités invasives des tumeurs par action sur N-myc inhibitor, une cytokine impliquée dans la régulation de nombreuses voies de signalisation (66).

De plus miR29 augmenterait la surexpression de HuR et son inhibition normaliserait le taux de HuR dans les cancers mammaires invasifs (67).

2. miR9

Dans le tissu mammaire, une surexpression de miR9 est associée à une augmentation du potentiel métastatique par action sur E-cadhérine. Une surexpression de miR9 serait un facteur de mauvais pronostic dans les tumeurs gliales (68,69).

Leucci et *al.* ont démontré que HuR était une cible de miR9. Dans les cultures cellulaires de lymphome de Hodgkin, miR9 inhibe HuR. Ainsi, une inhibition de miR9 par action pharmacologique entraîne une augmentation du niveau de HuR (70).

A notre connaissance, la relation entre miR9, miR29a et HuR n'a pas été spécifiquement étudiée dans les tumeurs gliales.

IV- MARQUEURS DE PROLIFERATION

A- Ki67

Le Ki67 est un antigène nucléaire dont l'expression est associée à la prolifération cellulaire. Il est exprimé tout au long du cycle cellulaire, de la phase G1 à la phase M et est indétectable dans les cellules quiescentes (phase G0) (71).

Cette propriété en fait un marqueur reconnu d'estimation de la prolifération cellulaire et donc de la prolifération tumorale. En effet, l'évaluation de l'index Ki67 peut avoir de multiples applications diagnostiques, pronostiques et prédictives dans de nombreuses pathologies tumorales. Ainsi, depuis 2010, il intervient dans le grading OMS des tumeurs neuro-endocrines digestives. En effet, au sein de ces tumeurs, l'index Ki67 est corrélé à la survie et au risque de récurrence après chirurgie (72,73).

La détermination du Ki67 s'effectue par technique immunohistochimique en comptant le taux de cellules marquées à l'aide de l'anticorps MIB-1, anticorps monoclonal de souris dirigé contre l'antigène Ki67.

Au sein des tumeurs cérébrales, les études réalisées suggèrent que le Ki67 est corrélé à la survie chez les patients atteints d'astrocytome de grade II (74).

Une étude menée précédemment dans notre service au sein des méningiomes, a démontré l'existence d'une forte corrélation entre le Ki67 et le grade histologique ainsi que la survie sans récurrence (75).

B- MCM6

Le complexe minichromosome maintenance (MCM) joue un rôle clé dans la synthèse et la réplication de l'ADN. Ce complexe fait partie du complexe pré réplcatif. Il possède une activité hélicase intervenant durant les phases d'initiation et d'élongation de l'ADN au cours de la phase S (76).

Le complexe MCM est composé de 6 sous unités : de MCM2 à MCM7.

Dans le domaine de la cancérologie, les protéines MCM sont reconnues comme marqueur de prolifération dans plusieurs tumeurs telles les cancers du sein, le cancer urothélial ou encore le cancer colique (77–79).

Au niveau cérébral, plusieurs études ont été réalisées sur la corrélation entre l'expression immunohistochimique des protéines MCM et le grading des tumeurs gliales (80,81). Ainsi, il a été démontré une corrélation entre un taux élevé de MCM2 et un pronostic plus sombre dans les tumeurs oligodendrogiales (82). Soling *et al.* ont démontré que le niveau d'expression de MCM3 était un facteur prédictif de survie chez les patients atteints d'astrocytome anaplasique (83)

MCM6 est l'une des 6 sous unités du complexe MCM. Il a été démontré que MCM6 possède une expression plus précoce que Ki67 au cours du cycle cellulaire.

L'expression immunohistochimique de MCM6 a été étudiée comme marqueur pronostic dans différentes tumeurs tel que les lymphomes, les chondrosarcomes (84,85).

Un travail mené au sein de notre laboratoire sur 32 méningiomes de grade I et 27 méningiomes de grade II a permis de démontrer que l'expression de MCM6 est fortement corrélée au grade histologique et à la survie sans récidence, et ce avec une excellente reproductibilité inter-observateur (75).

C- PHH3

Histone 3 est une protéine impliquée dans la structure de la chromatine. Sa phosphorylation, au niveau de la sérine 10, entraîne la condensation de la chromatine au moment la prophase. La phosphorylation demeure jusqu'à la télophase où l'histone H3 est alors dephosphorylée par une phosphatase.

L'étude immunohistochimique de l'expression de PHH3 est un marqueur de l'activité mitotique (86,87).

Ainsi, il a été démontré que, non seulement PHH3 facilite le compte mitotique comparativement à Ki67 mais, il est corrélé au pronostic dans plusieurs cancers tels que les cancers mammaires, les cancers endométriaux ou encore les mélanomes (88–90).

Récemment, Olar et *al.* ont étudié l'expression de PHH3 au sein de 363 méningiomes afin de déterminer l'indice mitotique et d'aider au grading. Les conclusions sont que PHH3 est un excellent marqueur pour le compte mitotique. En effet, il contribue à diminuer les causes de confusions potentielles (tels que les noyaux en apoptose). De plus, son compte aisé réduit la variabilité inter-observateur. PHH3 est également corrélé à la survie sans récurrence et au taux de récurrence (91).

OBJECTIFS

Objectif principal :

Evaluer la valeur pronostique de HuR dans les tumeurs gliales

Objectifs secondaires :

- Etudier la corrélation entre HuR et la prolifération cellulaire

- Etudier les liens entre les microARN miR9 et miR29 le niveau d'expression de HuR

- Evaluer la valeur pronostique de Ki67 et MCM6 dans les tumeurs gliales

MATERIELS ET METHODES

I- ETUDE CLINICO-PATHOLOGIQUE

A- Population

116 cas de tumeurs gliales ont été sélectionnés rétrospectivement. Les cas se répartissent en 55 cas de glioblastome, 12 cas d'astrocytome de grade III, 11 cas d'oligodendrogliome anaplasique, 2 cas d'oligoastrocytome, 12 cas d'astrocytome de grade II et 24 cas d'oligodendrogliome de grade II.

Les patients ont été opérés ou biopsiés dans le service de Neurochirurgie du CHU de Nancy entre 2004 et 2013. Ils ont tous remplis et signé le formulaire d'information et de non opposition à l'utilisation d'échantillons de tissu à une fin de recherche scientifique et médicale.

Les prélèvements concernaient 69 hommes et 47 femmes, tous majeurs.

Les données cliniques furent collectées à partir des dossiers du département de Neurologie du CHU de Nancy. Les données recueillies sont :

- l'âge
- le sexe
- circonstance de découverte des lésions cérébrales
- date et type de la chirurgie (biopsie stéréotaxique versus exérèse chirurgicale)
- la présence à l'imagerie d'un résidu tumoral après la chirurgie
- la progression, et si oui, la date et le type : radiologique et/ou clinique
- la prise d'un traitement néoadjuvant
- le protocole de traitement

- la prise de bevacizumab
- la date des dernières nouvelles
- le décès : date et circonstance

B- Etude histologique et immunohistochimique

Les prélèvements sont acheminés au laboratoire de Pathologie de l'Hôpital Central du CHU de Nancy à l'état frais ou fixés dans le formol. Quand l'abondance du prélèvement le permettait, un fragment de tissu frais a été cryoconservé et répertorié dans la tumorothèque du CHU de Nancy.

Ils sont fixés dans du formol tamponné à 4% et inclus en paraffine. Des coupes en paraffine à 4 µm sont réalisées afin d'être colorée par HES (hématoxyline, eosine, safran) ainsi que des lames blanches pour l'étude immunohistochimique.

1. Principe de l'immunohistochimie :

Le but de l'immunohistochimie est la mise en évidence de protéines par un système de reconnaissance antigène-anticorps. La protéine est d'abord reconnue par un anticorps primaire spécifique, monoclonal ou polyclonal, puis est secondairement révélé par un montage variable.

a) Anticorps

- Monoclonaux

Il s'agit d'une population d'anticorps identiques dirigés contre le même site antigénique d'une protéine. Ils sont fabriqués selon la technique des hybridomes. Après avoir immunisé une souris (ou parfois d'autres animaux) contre un antigène donné, les lymphocytes B sont prélevés dans sa rate.

Les anticorps monoclonaux sont très spécifiques mais peuvent se révéler moins sensibles que les anticorps polyclonaux.

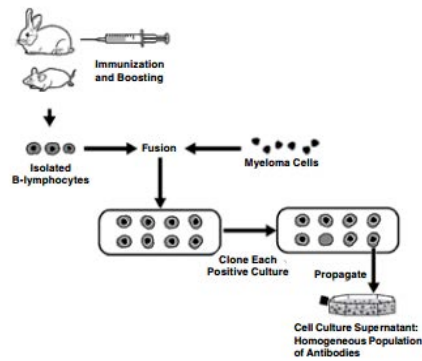


Figure 25 : Production d'anticorps monoclonaux d'après DAKO

- Polyclonaux

Ils consistent en la production d'anticorps par des animaux immunisés tels que le lapin ou la chèvre. L'avantage est un coût moins élevé et la possibilité de reconnaître plusieurs épitopes. Ils sont par contre moins spécifiques que les anticorps monoclonaux.

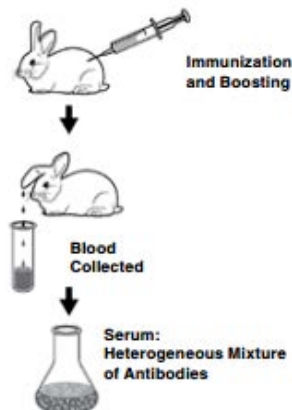


Figure 26 : Production d'anticorps polyclonaux d'après DAKO

b) Modes de révélation

Il repose sur l'ajout d'un montage aux anticorps primaires ou secondaires. La révélation peut se faire soit par un marquage fluorescent soit par un marquage enzymatique.

Au laboratoire de Pathologie du l'Hôpital Central du CHU de Nancy, le système utilisé est la technique EnVision FLEX de Dako.

c) EnVision FLEX Dako

L'antigène au niveau du tissu est détecté par un anticorps primaire. Celui-ci se lie à un anticorps secondaire nommé le LINKER. Le LINKER se fixe à un polymère de dextrane sur lequel des molécules de peroxydase (HRP) et des anticorps secondaires ont été couplés. Ce montage est ensuite révélé par un système chromogène-substrat. Le protocole complet est disponible en annexe 1.

2. Anticorps utilisés

Tableau 2 : Dilutions et références des anticorps primaires

Protéine	Clone	Fournisseur	Dilution
HuR	Monoclonal souris 19F12	Invitrogen	1/2000
MCM6	Polyclonal chèvre	Santa Cruz Biotechnology	1/800
Ki67	Monoclonal souris MIB1	Dako	1/200
IDH1	Monoclonal souris H09	Dianova	1/50
Internexine alpha (INX)	Monoclonal souris 2E 3	Novus Biologicals	1/50
p53	Monoclonal souris DO7	Nova Castra	1/60

3. Quantification

a) HuR

Le taux de cellules tumorales exprimant HuR a été étudié au niveau nucléaire et au niveau cytoplasmique sur 500 cellules tumorales, dans les zones présentant le plus fort marquage. Les résultats sont exprimés sous forme de pourcentage.

b) MCM6, Ki67 et p53

Pour ces 3 marqueurs, il a été défini le taux de cellules marquées comme étant le pourcentage de cellules présentant un marquage nucléaire, en comptant 500 cellules, dans les zones présentant le plus de noyaux marqués. La surexpression de p53 est définie par un marquage intense d'au moins 10% des cellules tumorales.

c) INX et IDH

Pour ces 2 marqueurs, la positivité a été définie comme un marquage cytoplasmique de plus de 10% des cellules tumorales, en analysant l'ensemble de la lame.

II- ANALYSE DES MICRO-ARN PAR qRT-PCR

A- Extraction des ARN

L'extraction des ARN est réalisée à partir de tissu fixé dans le formol et inclus en paraffine. Il est alors réalisé des copeaux de 10 µm dans le bloc, au niveau d'une zone délimitée sur lame HES par le pathologiste.

Les copeaux sont alors déposés dans un tube Eppendorf. Après déparaffinage, les prélèvements sont soumis à digestion enzymatique par la protéinase K. L'ARN est extrait par technique de séparation de phase en utilisant le Trizol (Life Technologies) selon les recommandations du fournisseur. Les ARN sont ensuite stockés au congélateur à -80°C. Le protocole complet est disponible en annexe 2.

B- Etape de transcription inverse

L'étape de la transcription inverse a pour but de créer un brin d'ADN complémentaire à partir d'ARN. L'ADN complémentaire est alors destiné à être amplifié au cours de cycles de PCR.

Cette étape a été réalisée selon les recommandations du fournisseur à l'aide des réactions TaqMan MicroRNA Assays (Applied Biosystems). Le protocole complet est disponible en annexe 3.

C- La PCR en temps réel par la méthode TaqMan

La PCR en temps réel consiste en une amplification cyclique d'un fragment d'ADN mesurée tout au long de la réaction.

A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN est mesurée grâce à un marqueur fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits. Ceci permet d'obtenir une cinétique de la réaction.

La technologie Taqman est basée sur l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase pour hydrolyser une sonde hybridée à sa séquence cible sur l'amplicon durant l'étape d'hybridation/extension de la PCR. Les sondes sont marquées à leur extrémité 5' par un fluorochrome émetteur (reporter) et à leur extrémité 3' par un fluorochrome suppresseur (quencher) fluorescent ou non, qui inhibe l'émission du reporter lorsqu'ils sont à proximité.

Au cours de la PCR, si la sonde est hybridée sur sa cible, elle est hydrolysée par l'ADN polymérase. Le reporter ainsi séparé du quencher émet un signal proportionnel au nombre de sondes hydrolysées, mesurable au moment de l'élongation. La spécificité de la réaction est liée à la fois à celle des amorces et à celle de la sonde réduisant significativement l'émission de fluorescence non spécifique due à des mésappariements ou des dimères d'amorce.

D. Quantification relative

1. Le cycle Threshold

Pour chaque échantillon, il faut déterminer la concentration du gène cible et la concentration du gène de ménage (ou gène référence). L'expression de gènes cibles et de référence est fonction de l'efficacité de la PCR et du cycle threshold (cT). Le threshold (ou seuil) correspond au seuil de détection optique au-delà duquel la variation en intensité de fluorescence suit une loi exponentielle. Le cT correspond au point d'intersection de la courbe cinétique PCR avec la ligne seuil, au départ de la phase exponentielle. Il est donc directement lié à la quantité d'ADN cible présent dans l'échantillon. Pour un micro-ARN donné la ligne de seuil doit être la même pour tous les échantillons.

Model of real time quantitative PCR plot

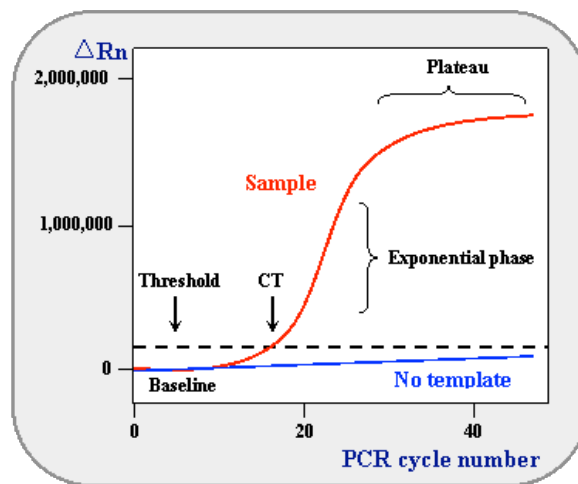


Figure 27 : Modèle de PCR en temps réel d’après NCBI-Real time PCR

2. Efficacité

Il est important de connaître l’efficacité de la PCR afin de pouvoir valider la technique. Pour connaître l’efficacité de la PCR on effectue une PCR en temps réel sur des échantillons de dilution croissante afin d’obtenir une courbe étalon.

L’efficacité est déterminée pour chaque micro-ARN avec le calibrateur à partir d’une gamme de 4 dilutions en triplicat réalisée à deux reprises. Le calibrateur est un mélange de plusieurs échantillons de parenchyme cérébral sain et tumoral. Il a pour but de contrôler et normaliser l’efficacité de la PCR.

L’efficacité est corrélée à la pente de la courbe. La formule de calcul est la suivante :

Efficacité = $10^{(-\text{pente}) - 1}$. Si la pente est égale à 0.301 alors l’efficacité de la PCR est de 100%.

L’efficacité de miR191 est de 0.94, celle de miR29a est de 0.89 et celle de miR9 0.94.

3. MiR de référence

Les stabilités du micro-ARN191 et de RNU ont été analysées dans une série de 13 cas à l’aide du logiciel Normfinder (Department of Molecular Medicine, Aarhus University Hospital,

Denmark). La meilleure stabilité a été retrouvée pour miR191, qui a été choisi comme microARN de référence pour la quantification de miR29 et miR9.

4. Cycle de qPCR

La quantité d'ARN utilisée pour miR191, miR9 et miR29a est de 10ng.

Les réactions de RT et de qPCR ont été réalisées en utilisant le kit TaqMan MicroRNA Reverse Transcription et TaqMan MicroRNA Assays (Applied Biosystems), suivant les données du fournisseur.

Le volume de réaction est de 20µL. Chaque analyse a été effectuée en triplicat. Les conditions du cycle de PCR sont les suivantes : 10 minutes à 95°C puis 40 cycles de 15 secondes à 95°C et 60 secondes à 60°C. Le protocole complet est disponible en annexe 4.

La quantité relative pour chaque micro-ARN a été déterminée par la formule suivante :

$$\text{Ratio} = E^{-\Delta\Delta\text{Ct}} ;$$

$$E = 1 + \text{efficacité} ;$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = (\Delta\text{Ct échantillon}) - (\Delta\text{Ct calibrateur}) ;$$

$$\Delta\text{Ct} = (\text{Ct du microARN d'intérêt} - \text{Ct du microARN de référence})$$

III- ANALYSE STATISTIQUE

Toutes les variables continues sont représentées sous la forme de médiane ou moyenne \pm écart-type. Les variables discontinues sont décrites par leur fréquence de distribution relative et absolue. L'étude de la normalité de la distribution des variables a été réalisée par un test de Kosmogorov-Smirnov.

L'ensemble des données cliniques et immunohistochimiques des patients a été comparé selon leur grade histologique par le test de Mann-Whitney pour les variables continues et le test du Chi-2 pour les variables discontinues. Le coefficient de corrélation de Spearman a été utilisé pour étudier les corrélations entre les différents marqueurs immunohistochimiques.

La survie globale et la survie sans progression ont été estimées à l'aide de la méthode de Kaplan-Meier et présentée en mois.

L'analyse de la survie globale et de la survie sans progression a été menée grâce au test du Logrank et un modèle de Cox avec régression univariée. Seuls les paramètres significatifs en régression de Cox univariée ont été retenus pour l'analyse multivariée.

Pour tous les tests, une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative à l'exception du test de Kosmogorov-Smirnov.

Les analyses ont été réalisées grâce au logiciel IBM SPSS 21.0.

RESULTATS

I-ETUDE CLINICO-PATHOLOGIQUE

A- Caractéristiques de la population étudiée et données cliniques

1. Données cliniques

L'âge moyen des patients au moment de la chirurgie est de 56 ans, avec des extrêmes allant de 18 à 83 ans. La médiane de l'âge est de 59 ans.

Le suivi clinique est disponible pour l'ensemble des patients. La médiane de suivi, tous grades confondus est de 43 mois. La médiane de survie dans le groupe des patients avec tumeurs de grades II est de 109 mois (min.43, max. 175 mois). La médiane de survie des grades III est de 15,5 mois (min.13 mois, max. 18 mois). La médiane de survie est de 15 mois pour les grades IV (min. 8 mois, max.21 mois).

Concernant la survie sans progression, la médiane est de 50,9 mois pour les grades 2, 60,7 mois pour les grades III et de 10,3 mois pour les grades IV.

Les tableaux ci-après résument les principales données en fonction des grades, de la survenue d'un décès et les principaux signes cliniques révélateurs.

Tableau 3 : Principales données cliniques en fonction des grades

Données	Grades 2 (moy ± EC, n(%))	Grades 3	Grades 4	p
Age au diagnostic	45,90 ± 17,03	60,67 ± 13,35	61,78 ± 8,99	0.001
Sexe				0.342
- Homme	24 (34,8)	12 (17,4)	33 (47,8)	
- Femme	12 (25,5)	13 (27,7)	22 (46,8)	
Type de Chirurgie				0,365
- biopsie stéréotaxique	18 (33,3)	14 (25,9)	22 (40,7)	
- Exérèse	18 (29)	11 (17,7)	33 (53,2)	
Résidu chirurgical	6 (20,7)	4 (13,8)	19 (65,5)	0,251
Progression	20 (24,4)	18 (22)	44 (53,7)	0,008
Chimiothérapie	28 (29,8)	19 (20,2)	47 (50)	0,003
Bevacizumab	2 (5,1)	10 (25,6)	27 (69,2)	< 0,0001
Radiothérapie	10 (13,5)	18 (24,3)	46 (62,2)	< 0,0001
Décès	14 (17,7)	19 (24,1)	46 (58,2)	< 0,0001

Tableau 4 : Principales données cliniques en fonction de la survenue de décès

Données	Décédés (moy ± EC, n(%))	Vivants	p
Age au diagnostic	59,26 ± 13,13	50,96 ± 16,36	0,004
Sexe			0,042
- Homme	52 (75,4)	17 (24,6)	
- Femme	27 (57,4)	20 (42,6)	
Type de Chirurgie			0,198
- Biopsie stéréotaxique	40 (74,1)	14 (25,9)	
- Exérèse	39 (62,9)	23 (37,1)	
Résidu chirurgical	20 (69)	9 (31)	0,275
Progression	65 (79,3)	17 (20,7)	< 0,0001
Chimiothérapie	63 (69,2)	28 (30,8)	0,131
Bevacizumab	31 (79,5)	8 (20,5)	0,118
Radiothérapie	57 (77,0)	17 (23,0)	0,007
Grade			< 0,0001
- Grade 2	14 (17,7)	22 (59,5)	
- Grade 3	19 (24,1)	6 (16,2)	
- Grade 4	46 (58,2)	9 (24,3)	

Tableau 5 : Symptomatologie clinique révélatrice

Symptômes cliniques	Effectifs (nombre)	Pourcentage (%)
Crise d'épilepsie	29	25.0
Troubles cognitifs	26	22.4
Céphalées	18	15.5
Troubles sensitifs	12	10.3
Malaise avec perte de connaissance	8	6.9
Troubles moteurs	7	6.0
Hypertension intra-cranienne	6	5.2
Troubles visuels	3	2.6
Vertiges	1	0.9
Non connu	6	5.1
Total	116	100

2. Analyse de la survie en fonction du grade

Il existe une association statistiquement significative entre le grade histologique et la survie sans progression ($p < 0.0001$) ainsi que la survie globale ($p < 0.0001$).

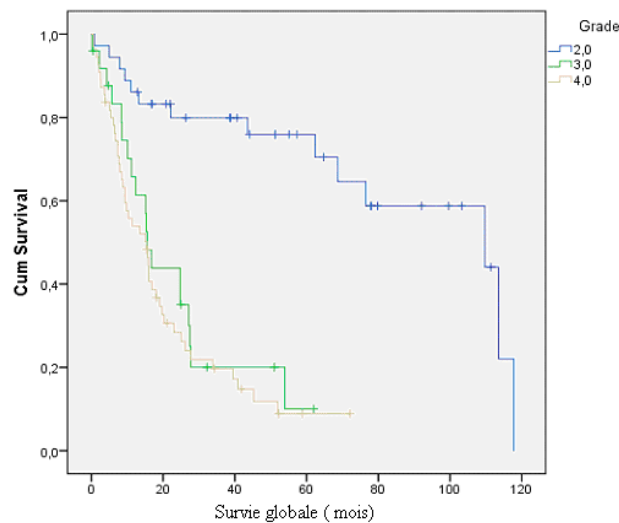


Figure 28 : Analyse de la survie globale en fonction des grades histologiques

Au sein des grades III et II, il n'existe pas de différence en terme de survie, statistiquement significative, entre les différents types histologiques (p grade III =0.318, p grade II = 0.063).

3. Expression des marqueurs pronostiques moléculaires

a) P53

44 patients (37.9%) présentent une surexpression de P53, correspondant à 4 cas de grade II (11 %) 8 cas de grade III (32%) et 32 cas de grade IV (58%).

En utilisant un modèle de Kaplan-Meier, il n'existe pas d'impact de la surexpression de p53 sur la survie globale (log rank $p = 0.201$), la surexpression de p53 a un impact négatif sur la survie sans progression ($p = 0.034$).

b) IDH1

15 patients (12.9%) présentent une expression d'IDH1. Ils se répartissent en 1 cas de grade IV (1.8%), 3 cas d'oligodendrogliome anaplasique (12%), 2 cas d'astrocytome de grade II (5.5%) et 9 cas d'oligodendrogliome de grade II (12%).

En analyse bivariée par méthode de Kaplan-Meier, l'expression d'IDH1 a un impact positif sur la survie sans récurrence (log rank $p= 0.02$) et sur la survie globale (log rank $p = 0.01$).

c) Internexine-alpha

15 patients (12.9%) présentent une expression d'internexine-alpha. Ils se répartissent 9 cas d'oligodendrogliome de grade II (25%), 1 cas d'astrocytome de grade II (2.7%), 3 cas d'oligodendrogliome anaplasique (12%) et 2 cas de glioblastome (3.6%).

Concernant la survie globale et sans récurrence, la présence d'une surexpression d'internexine-alpha est un facteur prédictif positif, tous grades confondus (log rank $p= 0.01$) et au sein des grades III (log rank $p= 0.026$).

B- Etude immunohistochimique des marqueurs de prolifération

1. MCM6

Le nombre de cellules marquées par MCM6 est significativement plus élevé dans les gliomes de grade IV que dans les gliomes de grade III (75.7% vs 44.2%, $p < 0.0001$). Il existe une différence significative entre les grades III et les grades II (44.2% vs 11.9%) $p < 0.0001$ ainsi qu'entre les gliomes de haut grade (les grades IV et les grades III) versus les gliomes de bas grade ($p < 0.0001$).

L'analyse de la survie met en évidence une relation négative entre le taux de MCM6 et la survie sans progression ainsi que la survie globale des patients, tous grades confondus par méthode de régression de Cox univariée ($p < 0.0001$) (Tableaux 4 et 5) comme avec le test du log-rank ($p < 0.0001$).

Ainsi, les patients présentant un pourcentage d'expression de MCM6 supérieure à la valeur médiane (49%) ont un taux de survie significativement plus bas que les patients présentant un taux inférieur à la médiane (log rank $p < 0.0001$).

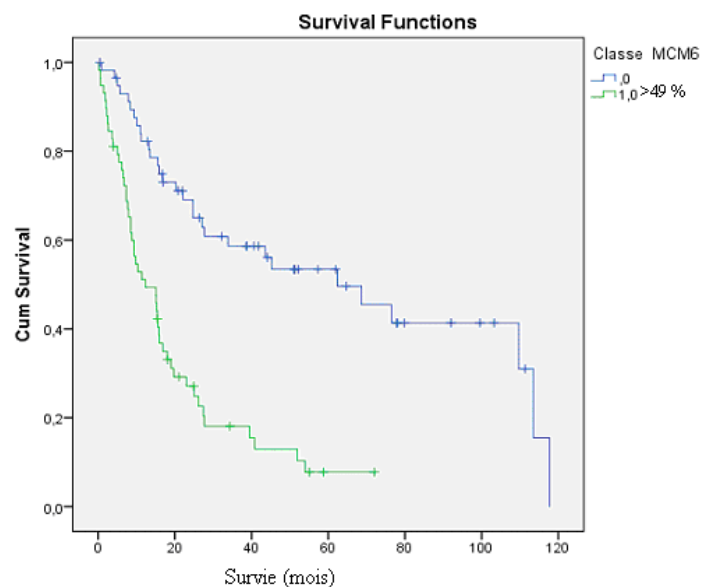


Figure 29 : Survie globale en fonction de MCM6 tous grades confondus

L'analyse en sous-groupe par grade histologique ne retrouve pas de relation significative entre la valeur de MCM6 et la survie sans progression ainsi que la survie globale (glioblastome, survie globale : $p = 0.068$; autres groupes $p > 0.10$).

En ce qui concerne l'analyse multivariée, 3 modèles ont été réalisés

1. les scores de MCM6 et le grade
2. les scores de MCM6, le grade et l'âge
3. les scores de MCM6, le grade, l'âge, l'expression des marqueurs P53, internexine alpha et IDH1.

MCM6 est un facteur pronostique négatif indépendant dans les 3 modèles utilisés (Tableau 6).

2. Ki67

L'indice de prolifération évalué à l'aide de l'anticorps Ki67 est significativement plus élevé dans les gliomes de grade IV que dans les gliomes de grade III (14.1% vs 6.3%) ($p < 0.0001$). Il existe une différence significative entre les gliomes de grade III et les gliomes de grade II (6.3% vs 1.4%) ($p < 0.0001$) tout comme entre gliomes de haut grade et les gliomes de bas grades ($p < 0.0001$).

L'analyse de survie met en évidence un impact négatif de l'indice de prolifération sur la survie sans progression ($p < 0.0001$) et sur la survie globale ($p < 0.0001$), en analyse univariée, tous grades confondus (tableaux 4 et 5).

En analyse de sous-groupe, par grades histologiques :

1. Dans les grades IV : Il n'y a pas de relation significative entre le niveau d'expression de Ki-67, la survie sans progression ($p = 0.564$) et la survie globale ($p = 0.148$)
2. Dans les grades III : la valeur de Ki-67 a un impact négatif sur la survie sans progression ($p = 0.034$) ainsi que la survie globale ($p = 0.002$).
3. Dans les grades II : Il n'y a pas de relation entre l'indice de prolifération et la survie sans progression ($p = 0.628$) et la survie globale ($p = 0.745$).

L'analyse multivariée de la survie sans progression et la survie globale a été réalisée selon 3 modèles étudiants respectivement :

1. le taux de Ki-67 et le grade
2. le taux de Ki-67, l'âge et le grade
3. le taux de Ki-67, l'âge, le grade, l'expression de p53, internexine-alpha et IDH1

Dans le modèle 2, le niveau d'expression de Ki-67 est un facteur pronostique défavorable indépendant (Tableau 7).

L'analyse multivariée de survie en sous-groupe par grade ne retrouve pas d'association significative.

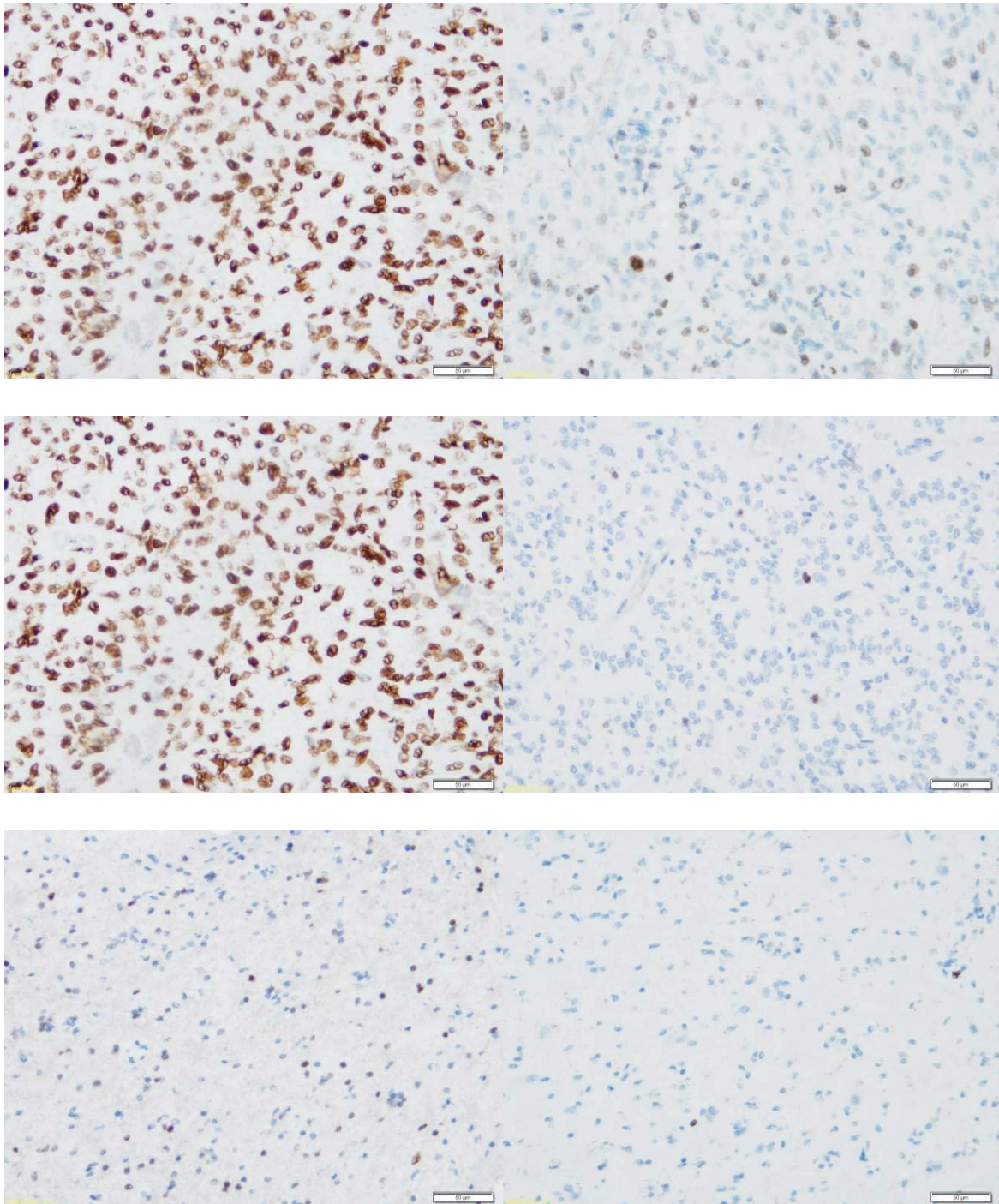


Figure 30 : Comparaison des marquages entre MCM6 (à gauche) et Ki-67 (à droite) au grossissement x200.

En haut : Un glioblastome. Au milieu : un oligodendrogliome anaplasique. En bas : un oligodendrogliome de grade 2.

C- Etude immunohistochimique de l'expression de HuR

1. HuR cytoplasmique

Le pourcentage de cellules présentant une expression cytoplasmique de HuR est significativement plus élevé dans les grades IV comparativement aux grades II (30.7% vs 14.4% $p < 0.0001$) ainsi qu'entre les grades III et les grades II (26.7% vs 14.4% $p < 0.0001$). Au sein des grades II, il existe une différence d'expression entre les astrocytomes et les oligodendrogliomes (17.9% vs 12.6% $p = 0.026$). Cette différence n'est pas retrouvée au sein des grades III ($p = 0.096$).

Il existe également une différence significative entre les hauts grades et les bas grades ($p < 0.0001$).

Néanmoins, il n'existe pas de différence significative concernant le niveau d'expression de HuR cytoplasmique entre les grades IV et III ($p = 0.191$).

En analyse univariée, il existe une association statistiquement significative entre le niveau d'expression cytoplasmique de HuR et la survie globale en utilisant le modèle régression de Cox ($p = 0.007$) et avec le test du log Rank ($p = 0.005$).

En prenant comme valeur la médiane de HuR cytoplasmique (23,15%), les patients présentant un niveau d'expression supérieur à la médiane ont un taux de survie plus faible que ceux présentant une valeur de HuR cytoplasmique inférieure à la médiane ($p = 0.005$).

En analyse univariée, de sous groupe par grade, il existe une association entre le niveau d'expression cytoplasmique de HuR et la survie globale dans les grades III ($p = 0.048$) mais pas dans les grades IV ni dans les grades III.

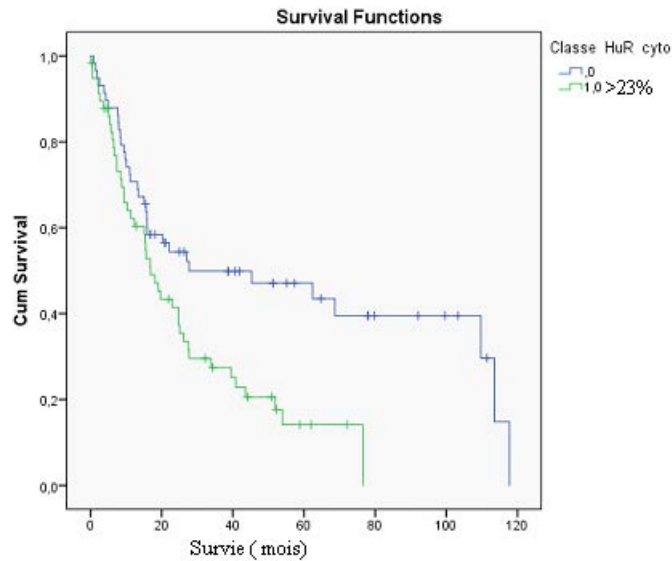


Figure 31 : Survie globale en fonction de la médiane de HuR cytoplasmique

Le niveau d'expression cytoplasmique de HuR n'a pas d'impact significatif sur la survie sans progression tous grades confondus ni après analyse en sous groupe.

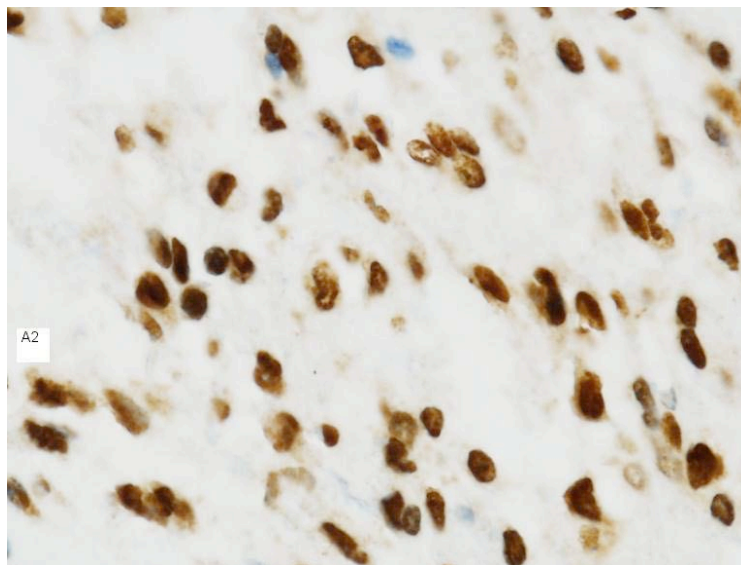
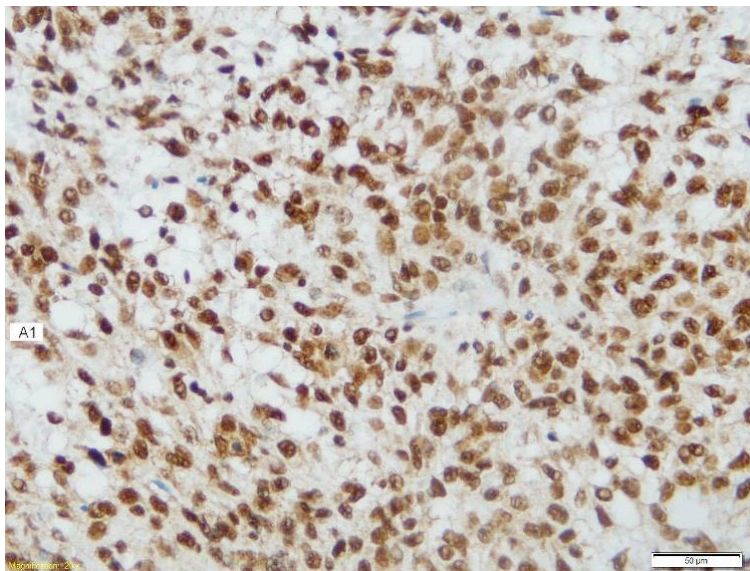
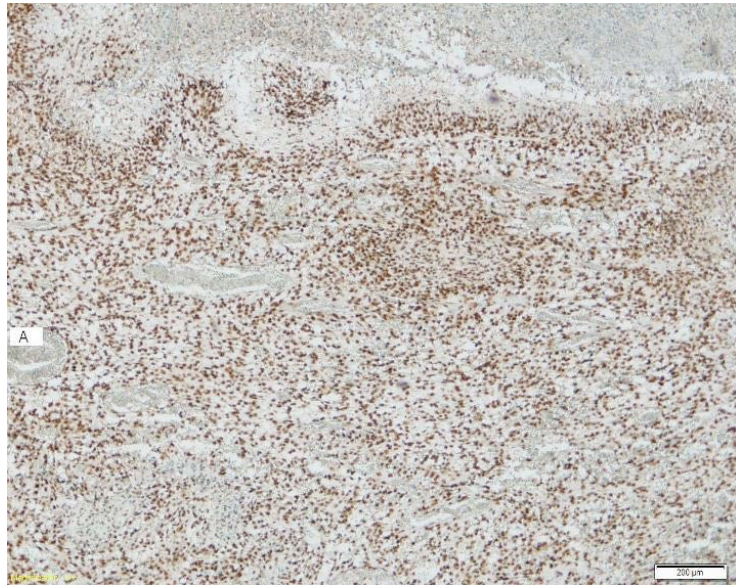
L'association n'est pas significative en analyse multivariée, après réalisation de 3 modèles (Tableau 8).

2. HuR nucléaire

Le pourcentage d'expression nucléaire de HuR est significativement plus élevé dans les grades IV (94.2%) que dans les grades II (83.4%) ($p < 0.05$) et également entre les grades IV (94.2%) et les grades III (87.3%) ($p < 0.05$). En revanche, il n'existe pas de différence significative dans l'expression nucléaire de HuR entre les hauts grades et les bas grades ($p = 0.059$) et entre les grades III et les grades II ($p = 0.644$).

En analyse univariée, le niveau d'expression nucléaire de HuR n'a pas d'impact significatif sur la survie sans progression ($p = 0.582$) et sur la survie globale ($p = 0.945$).

L'association est également non significative après analyse par sous groupe histologique.



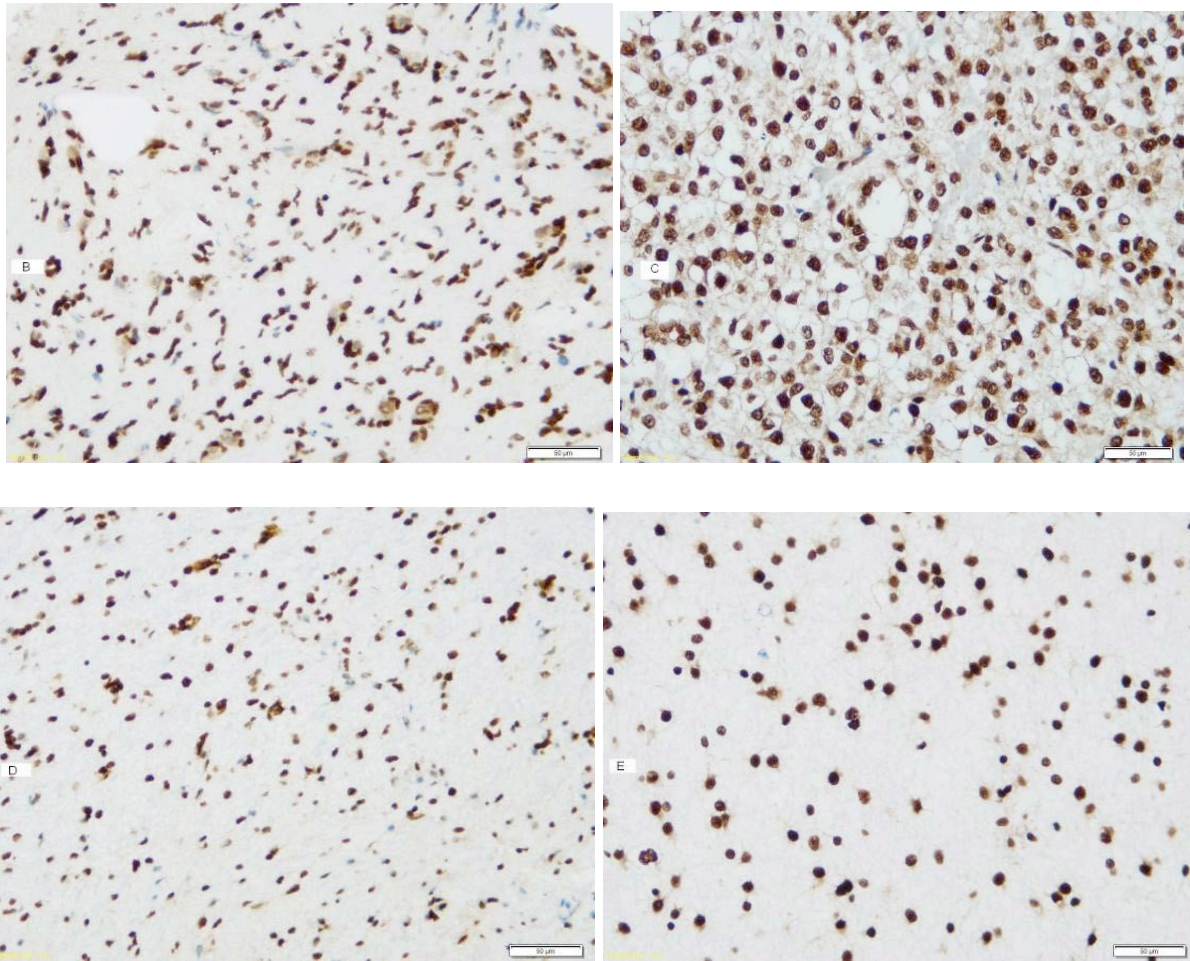


Figure 32 : Expression de HuR dans les différents grades

A: Glioblastome (grossissement x40) A1: Glioblastome (x200). A2 Glioblastome (x400) B:
 Astrocytome anaplasique (x200) C: Oligodendrogliome anaplasique (x200) D:
 Astrocytome(x200). E : Oligodendrogliome (x200).

Tableau 4 : Analyse univariée de la survie sans progression selon le modèle de régression de Cox

Paramètre	Odds Ratio	Intervalle de confiance à 95%	p
HuR cytoplasmique	1.012	0.998-1.026	0.86
HuR nucléaire	1.004	0.990-1.018	0.594
MCM6	1.017	1.011-1.024	<0.0001
Ki67	1.040	1.022-1.059	<0.0001
P53	1.008	1.000-1.016	0.046

Tableau 5 : Analyse univariée de la survie globale, selon le modèle de régression de Cox

Paramètre	Odds Ratio	Intervalle de confiance à 95%	p
HuR cytoplasmique	1.019	1.005-1.033	0.007
HuR nucléaire	1.001	0.987-1.016	0.899
MCM6	1.020	1.013-1.027	<0.0001
Ki67	1.046	1.028-1.064	<0.0001

Tableau 6 : Analyse de l'impact de MCM6 sur la survie globale, selon le modèle de régression de Cox multivarié

Paramètre	Rapport de risque	Intervalle de confiance à 95%	p
Modèle 1 : MCM6 grade			<0.0001
MCM6	1.011	1.001-1.022	0.030
Grade	1.604	1.046-2.460	0.030
Modèle 2 : MCM6, grade, âge			<0.0001
MCM6	1.012	1.001-1.022	0.028
Grade	1.417	0.919-2.185	0.114
Age	1.025	1.005-1.047	0.016

Modèle 3 : MCM6 et autres variables			<0.0001
MCM6	1.012	1.001-1.022	0.027
Grade	1.309	0.834-2.054	0.242
Age	1.043	1.019-1.067	0.0003
p53	0.660	0.406-1.073	0.094
INX alpha	0.141	0.039-0.513	0.003
IDH1	1.954	0.710-5.374	0.194

Tableau 7 : Analyse de l'impact de Ki-67 sur la survie globale selon le modèle de régression de cox multivarié

Paramètre	Rapport de risque	Intervalle de confiance à 95%	p
Modèle 1 : Ki-67, grade			<0.0001
Ki-67	1.022	1.000-1.044	0.052
Grade	1.961	1.405-2.738	0.000007
Modèle 2 : Ki-67, grade, âge			<0.0001
Ki-67	1.023	1.001-1.045	0.045
Grade	1.732	1.229-2.441	0.002
Age	1.026	1.005-1.047	0.015
Modèle 3 : Ki-67 et autres variables			<0.0001
Ki-67	1.021	0.999-1.043	0.057
Grade	1.623	1.122-2.349	0.010
Age	1.041	1.018-1.065	0.001
p53	0.649	0.398-1.058	0.083
INX alpha	0.144	0.039-0.524	0.003
IDH1	1.920	0.684-5.932	0.216

Tableau 8 : Analyse de l'impact de HuR cytoplasmique sur la survie globale, modèle de régression de Cox multivarié

Paramètre	Rapport de risque	Intervalle de confiance à 95%	p
Modèle 1 : HuR cytoplasmique, grade			<0.0001
HuR cytoplasmique	0.997	0.980-1.013	0.680
Grade	2.308	1.659-3.212	<0.0001
Modèle 2 : HuR cytoplasmique, grade, âge			<0.0001
HuR cytoplasmique	0.994	0.978-1.012	0.528
Grade	2.073	1.478-2.909	0.00002
Age	1.026	1.005-1.048	0.015
Modèle 3 : HuR cytoplasmique et autres variables			<0.0001
HuR cytoplasmique	0.999	0.982-1.016	0.901
Grade	1.821	1.272-2.608	0.001
Age	1.042	1.018-1.066	0.001
p53	0.688	0.411-1.149	0.153
INX alpha	0.141	0.039-0.510	0.003
IDH1	1.852	0.664-5.170	0.239

3. Corrélation entre HuR et les marqueurs de prolifération

Les différentes variables sont significativement corrélées entre elles ($p < 0.0001$). En particulier, il existe une corrélation forte entre MCM6 et Ki-67 ($\rho : 0,627$ et $p < 0.0001$).

Ces 2 variables sont également corrélées au pourcentage cytoplasmique de HuR avec en particulier, une meilleure corrélation pour HuR cytoplasmique et MCM6 ($Rho : 0.464$ et $p < 0.0001$). HuR nucléaire est également, plus faiblement, corrélé aux valeurs de MCM6 et Ki-67 (Tableau 9).

Les valeurs de HuR nucléaire et HuR cytoplasmique sont également corrélées ($Rho : 0.367$, $p < 0.0001$).

Tableau 9 : Corrélation entre HuR et marqueurs de prolifération

Coefficient de corrélation de Spearman Rho				
	Hur cyto	HuR nucléaire	MCM6	Ki67
HuR cyto	1.000	0.367 (p<0.0001)	0.464 (p<0.0001)	0.390 (p<0.0001)
HuR nucléaire	0.367 (p<0.0001)	1.000	0.318 (p<0.0001)	0.261 (p<0.0001)
MCM6	0.464 (p<0.0001)	0.318 (p<0.0001)	1.000	0.627 (p<0.0001)
KI67	0.390 (p<0.0001)	0.261 (p<0.0001)	0.627 (p<0.0001)	1.000

II-ETUDE DES MICRO-ARN MIR9 ET MIR29 PAR qRT-PCR

Nous avons analysé, pour chacun des micro-ARN, 34 cas de tumeurs gliales se répartissant en 15 cas de tumeurs de grades II, 4 cas de tumeurs de grades III et 15 cas de tumeur de grade IV.

A- MiR9

La moyenne du ratio normalisé est de 1.50 ± 1.44 dans les grades II et de 0.89 ± 1.27 dans les tumeurs de haut grade. Il n'existe pas de différence significative dans l'expression de miR9 entre les tumeur de bas grade (grade II) et les tumeurs de haut grade (III et IV) ($p=0.204$).

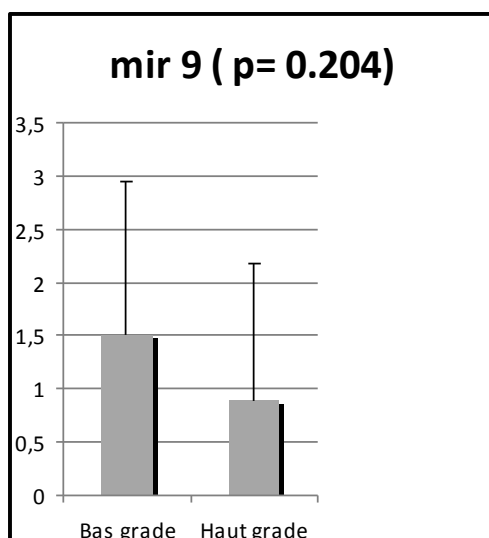


Figure 33 : Expression de miR9 dans les tumeurs gliales

B- MIR 29

La moyenne du ratio normalisé est de 0.96 ± 0.87 dans les grades II, et de 1.16 ± 1.03 dans les tumeurs de haut grade.

Il n'existe pas de différence significative d'expression de miR29 entre les tumeurs de bas grade et les tumeurs de haut grade ($p=0.96$).

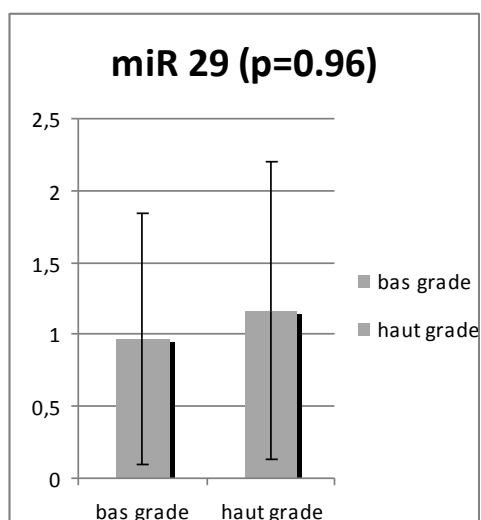


Figure 34 : Expression de miR29 dans les tumeurs gliales

C- Corrélation entre niveau d'expression des miR et HuR

Il n'a pas été mis en évidence de corrélation significative entre le niveau d'expression de miR9 et miR29 et l'expression de HuR (Tableau 10).

Tableau 10 : Corrélation entre HuR, miR9, miR29

Coefficient de corrélation de Spearman Rho				
	Hur cyto	HuR nucléaire	miR9	miR29
HuR cyto	1.000	0.444 p=0.04	-0.148 p=0.202	0.094 p=0.299
HuR nucléaire	0.444 p=0.04	1.000	-0.0302 p=0.429	0.027 p=0.440
miR9	-0.148 p=0.202	-0.0302 p=0.429	1.000	0.207 p=0.120
miR29	0.094 p=0.299	0.027 p=0.440	0.207 p=0.120	1.000

DISCUSSION

I-DEREGULATION DE HUR DANS LES GLIOMES

HuR est une protéine de liaison à l'ARN ayant un rôle clé dans la stabilisation des ARN messagers. En situation normale, HuR est principalement localisé au niveau du noyau, mais en situation de survie et de prolifération cellulaire, HuR se relocaliserait au niveau cytoplasmique. Cette relocalisation serait un mécanisme de réponse au stress. Au niveau cytoplasmique, HuR régule de nombreux ARNm dont certains sont impliqués, en cas de dérégulation, dans l'acquisition des principaux traits de malignité, comme des régulateurs du cycle cellulaire, des facteurs de croissance, des facteurs anti-apoptiques et pro-angiogéniques (50).

Ainsi, au travers de diverses études, il a été prouvé que la surexpression de HuR était un facteur de mauvais pronostic. Plus particulièrement, il apparaît que c'est essentiellement la surexpression cytoplasmique de HuR qui est corrélée à une plus faible survie dans de nombreuses tumeurs (59-62).

Dans les tumeurs gliales, Ido et Al. ont étudié l'expression de HuR au sein de 27 astrocytomes de grades II à IV. Une expression cytoplasmique a été retrouvée dans 11 cas (2 astrocytomes anaplasiques et 9 glioblastomes). L'expression cytoplasmique de HuR était corrélée à une augmentation du facteur pro-angiogénique VEGF (63).

Bolognani et Al. ont étudié l'expression de HuR au sein de 216 tumeurs gliales ainsi qu'au sein de parenchyme cérébral sain. Ils rapportent que, dans les cellules gliales de cerveaux sains, HuR est uniquement présent au niveau nucléaire alors qu'il existe une redistribution des compartiments dans les tumeurs gliales. Les auteurs démontrent une corrélation entre le niveau cytoplasmique de HuR, le grade et le type histologique (65).

Dans notre étude, le niveau d'expression cytoplasmique de Hur est significativement plus élevé dans les gliomes de haut grade que dans les gliomes de bas grade. Ce résultat est concordant avec les données de la littérature et confirment donc la redistribution et l'accumulation cytoplasmique de HuR en cas de processus tumoral. Contrairement à l'étude de Bolognani et Al., qui rapportait un niveau d'expression de HuR plus important dans les tumeurs de type oligodendrogiales, nous mettons en évidence une différence d'expression

entre les différents types histologiques uniquement dans les grades II, avec une expression plus forte au sein des tumeurs astrocytaires. Ces résultats discordants peuvent s'expliquer par un manque de puissance de notre étude. En effet nous n'avons inclus que 25 cas de grades 3 alors que l'étude de Bolognani *et al.* en étudiaient 75 cas.

Conformément à notre hypothèse, nous démontrons dans cette étude la valeur pronostique péjorative de la surexpression cytoplasmique de HuR sur la survie globale, tous grades confondus ($p=0.007$) et dans les gliomes de grade III ($p<0.05$), cependant sans impact sur la survie sans progression. Ces résultats ne sont cependant pas significatifs en analyses multivariées. Ce manque de significativité pourrait s'expliquer d'une part par le manque de puissance de notre étude, et d'autre part par le lien fort entre HuR et grade, et l'impact majeur du grade sur la survie.

Même si l'expression cytoplasmique de HuR n'apparaît pas être un marqueur pronostique particulièrement performant, en comparaison avec le grade OMS, il semble néanmoins être un paramètre intéressant à évaluer, notamment pour son impact sur la réponse à la chimiothérapie. En effet, dans une étude sur les carcinomes urothéliaux, il a été démontré que chez les patients présentant une surexpression cytoplasmique, un traitement par chimiothérapie adjuvante avait un effet bénéfique sur la survie. La possibilité d'une modification de la sensibilité des cellules à la chimiothérapie en fonction du taux cytoplasmique de HuR avait été précédemment évoquée dans une étude sur les carcinomes pancréatiques. L'hypothèse des auteurs est que l'accumulation cytoplasmique de HuR entrainerait une activation du métabolisme de la gemcitabine (92,93). Ainsi, une étude sur la relation entre HuR et réponse à la chimiothérapie serait pertinente afin d'évaluer un potentiel impact thérapeutique de HuR.

II-ETUDE DES MARQUEURS DE PROLIFERATION

A- Valeur pronostique de MCM6

Les protéines MCM jouent un rôle central dans l'initiation de la synthèse et de la réplication de l'ADN. L'indice prolifératif évalué à l'aide de l'anticorps anti-MCM est corrélé à la valeur du Ki67, marqueur reconnu de prolifération (94).

Les protéines du complexe MCM sont exprimées de manière plus précoce dans le cycle (phase précoce de G1) et sont inhibées plus tardivement que Ki67. C'est la raison pour laquelle les protéines MCM ont été étudiées comme marqueur de prolifération dans différentes tumeurs telles que les cancers urothéliaux ou mammaires (77,78).

Dans le domaine de la neuropathologie, plusieurs études ont démontré l'impact de MCM2, MCM3 et MCM7 dans les tumeurs gliales (84-85,94-95).

Une étude menée au sein de notre laboratoire, a mis en évidence une forte corrélation entre l'expression de MCM6 avec le grade histologique et le risque de récurrence dans les méningiomes (75).

Cette étude est, à notre connaissance, la première à analyser l'expression de MCM6 dans les tumeurs gliales. Ainsi, nous avons mis en évidence une surexpression significative de MCM6 dans les tumeurs gliales de haut grade comparativement aux tumeurs de bas grade. Il existe une forte corrélation entre l'expression de MCM6, le grade histologique et la survie globale.

Ces résultats sont à mettre en parallèle avec ceux obtenus par Hua *et al.* qui retrouvent une corrélation entre niveau d'expression de MCM2, MCM3 et MCM7, le grade et la survie. Ainsi, après étude par qRT-PCR et analyse de la survie, ils rapportent qu'une augmentation du nombre de copies de l'ARNm de MCM2 et MCM7 est associée à un pronostic plus sombre dans les glioblastomes (95).

MCM6 apparaît donc un marqueur pronostique pertinent de la survie sans progression et la survie globale dans les tumeurs gliales, indépendamment du grade en analyse multivariée.

B- Valeur pronostique de Ki-67

Ki-67 est un antigène nucléaire exprimé tout au long du cycle cellulaire, de la phase G1 à la phase M et est indétectable dans les cellules quiescentes (phase G0) (71). Cette propriété en fait un marqueur reconnu de prolifération cellulaire.

Au niveau cérébral, il a été démontré que Ki-67 était un facteur pronostique dans les astrocytomes de grade 2. En effet, McKeever *et al.* ont démontré qu'une augmentation de l'indice de prolifération Ki-67 était un facteur pronostic négatif.

Dans une série de 128 tumeurs oligodendrogiales anaplasiques, Preusser *et al.* ont déterminé, en analyse univariée, qu'une valeur basse de Ki-67 était un marqueur pronostic péjoratif fort en termes de survie sans progression et de survie totale (96).

Plus récemment, une étude incluant 267 cas de gliomes a démontré que la valeur de Ki-67 était corrélée au grade et que pour un même grade il n'existait pas de différence significative entre les types astrocytaires ou oligodendrogiaux (97).

Néanmoins, même si Ki-67 est un marqueur pronostique reconnu dans de nombreuses tumeurs, il ne faut pas méconnaître ses limites. Le premier facteur limitant est la présence d'une grande variabilité inter-laboratoire dans l'interprétation de Ki-67. Cette variabilité peut s'expliquer par l'absence de recommandation officielle concernant les paramètres à respecter pour l'utilisation de l'anticorps MIB-1, en particulier la dilution, le temps d'incubation, le démasquage ou encore la technique de révélation. Il n'existe pas à l'heure actuelle de recommandations claires concernant le décompte des cellules marquées. Certaines équipes dénumbreront alors dans les zones les plus marquées, nommées « hot-spot », alors que d'autres compteront les cellules marquées sur un échantillon plus global. Nous avons opté dans cette étude pour une évaluation dans les zones comportant le plus de cellules marquées. La détermination du nombre de cellules à compter est aussi un paramètre important.

Le deuxième facteur limitant est l'hétérogénéité tumorale : il peut exister une hétérogénéité significative dans la distribution des cellules marquées au sein d'une tumeur, entraînant des erreurs dans l'évaluation du Ki-67, notamment sur les prélèvements biopsiques.

Les données de notre étude confirment une corrélation entre l'indice de prolifération, le grade et la survie. Ainsi, Ki-67 est un marqueur pronostique négatif dans les tumeurs gliales.

Cette étude va être poursuivie en intégrant une deuxième lecture indépendante, afin de pouvoir évaluer la reproductibilité inter-observateur.

III-LIEN ENTRE HUR ET MARQUEURS DE PROLIFERATION

Les données de la littérature suggèrent que HuR a comme cibles des protéines impliquées dans le cycle cellulaire, comme p27 ou cycline D1 (50). Liang *et al.* ont démontré que la surexpression cytoplasmique de HuR était non seulement un critère pronostique péjoratif dans

les cancers urothéliaux mais qu'elle était corrélée à une augmentation de l'expression nucléaire de cycline A, appuyant l'hypothèse du rôle de HuR dans la prolifération tumorale.

Ainsi, nos résultats sont concordants avec cette hypothèse, puisque nous décrivons, de manière significative, une corrélation entre le niveau d'expression cytoplasmique de HuR et les marqueurs de prolifération, notamment MCM6. La poursuite de cette étude par des expérimentations sur des lignées cellulaires pourrait conforter ces résultats, en évaluant les effets de l'inhibition de HuR sur la croissance cellulaire. Un projet a par ailleurs été déposé afin d'évaluer l'impact de l'inhibition de HuR par agents pharmacologiques sur la sensibilité au témozolomide.

III-ETUDE DE L'EXPRESSION DES MICRO-ARN MIR9 ET MIR29

Les micro-ARN sont des ARN simple brin non codants de petite taille ayant un rôle dans la régulation post transcriptionnelle de certains gènes. Ils sont synthétisés par la polymérase II en pri-miARN et bénéficient ensuite de plusieurs étapes de maturation nucléaire puis cytoplasmique aboutissant à la formation d'un micro-ARN. Ce micro-ARN va ensuite s'associer au complexe RISC et cibler les ARN messagers.

L'association entre le complexe miR-RISC/ARNm cible entraîne une diminution de la stabilité et/ou de la traduction de l'ARNm aboutissant à une diminution de cet ARNm.

Il a été démontré, dans des lignées cellulaires, que le niveau d'expression de HuR pouvait être régulé par des micro-ARN, notamment miR16 et miR519. Ainsi ces micro-ARN pourraient jouer le rôle de suppresseur de tumeur en inhibant l'expression de HuR (98,99).

Concernant les micro-ARN que nous avons étudiés, il a été démontré que miR29 serait un oncomiR impliqué notamment dans l'acquisition des capacités invasives dans les tumeurs mammaires ainsi que dans l'augmentation de l'expression de HuR. Son inhibition normaliserait le niveau d'expression de HuR dans les tumeurs mammaires (66,67).

A notre connaissance, il n'a pas été étudié au niveau des tumeurs gliales.

Les données de notre étude ne retrouvent pas de différence significative d'expression de miR29 en fonction des grades ni de corrélation entre la quantité de miR29 et HuR.

Concernant miR9, il a été démontré qu'il serait également un oncomiR impliqué dans l'acquisition par les cellules tumorales mammaires d'un potentiel métastatique par action de la protéine E-Cadhérine (69). Sa surexpression serait un facteur de mauvais pronostic dans les tumeurs gliales.

Ainsi, Wu et al. ont étudié 128 cas de tumeurs gliales et 10 échantillons de parenchyme cérébral sain par qRT-PCR. Les auteurs ont démontré non seulement la présence d'une surexpression de miR9 dans les tumeurs gliales mais que cette surexpression était liée au grade et à la survie (68).

Dans notre étude, nous n'avons pas mis en évidence de différence significative d'expression de miR9 en fonction des grades, ni de corrélation avec HuR.

Ces résultats peuvent s'expliquer par le manque de puissance de notre étude. Il serait utile de mener à nouveau cette étude sur un plus grand nombre de prélèvements.

De même, il serait intéressant d'étudier miR9 et miR29 sur des lignées cellulaires de gliomes afin d'analyser les conséquences d'une surexpression sur la prolifération tumorale et HuR.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans cette étude nous démontrons que la surexpression cytoplasmique de la protéine HuR est un facteur pronostique péjoratif dans les tumeurs gliales. Il apparaît donc comme un paramètre intéressant à évaluer, notamment au travers de son potentiel rôle pronostique et thérapeutique. En particulier, l'accumulation de HuR favoriserait le métabolisme de la chimiothérapie, lié notamment au probable rôle de HuR dans la résistance au stress cellulaire.

De plus, la corrélation positive entre le niveau d'expression de HuR et les marqueurs de prolifération appuie l'hypothèse selon laquelle HuR stimulerait la prolifération cellulaire.

Nous ne mettons pas en évidence de corrélation entre le niveau d'expression des micro-ARN miR9 et mir29 et HuR, mais d'autres analyses sur un plus grand nombre d'échantillons semblent nécessaires. Il serait également intéressant d'évaluer la relation entre ces 2 micro-ARN, la prolifération cellulaire et HuR au sein de lignées cellulaires de glioblastome afin de comprendre les mécanismes de régulation de HuR.

Enfin, l'évaluation de la prolifération cellulaire par technique immunohistochimique apparaît comme un marqueur fiable et pertinent de survie. Ainsi, MCM6 et Ki-67 semblent être des paramètres efficaces pour identifier les tumeurs gliales de pronostic plus sombre, et ce indépendamment du grade.

BIBLIOGRAPHIE

1. Zouaoui S, Rigau V, Mathieu-Daudé H, Darlix A, Bessaoud F, Fabbro-Peray P, et al. French brain tumor database: general results on 40,000 cases, main current applications and future prospects. *Neurochirurgie*. févr 2012;58(1):4-13.
2. Figarella-Branger D, Colin C, Coulibaly B, Quilichini B, Maues De Paula A, Fernandez C, et al. Histological and molecular classification of gliomas. *Rev Neurol (Paris)*. juill 2008;164(6-7):505-15.
3. Jenkins RB, Blair H, Ballman KV, Giannini C, Arusell RM, Law M, et al. A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. *Cancer Res*. 15 oct 2006;66(20):9852-61.
4. Smith JS, Perry A, Borell TJ, Lee HK, O'Fallon J, Hosek SM, et al. Alterations of chromosome arms 1p and 19q as predictors of survival in oligodendrogliomas, astrocytomas, and mixed oligoastrocytomas. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. févr 2000;18(3):636-45.
5. Ducray F, Crinière E, Idbah A, Mokhtari K, Marie Y, Paris S, et al. alpha-Internexin expression identifies 1p19q codeleted gliomas. *Neurology*. 13 janv 2009;72(2):156-61.
6. Ohgaki H, Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol*. juin 2005;64(6):479-89.
7. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic profile of astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Brain Tumor Pathol*. juill 2011;28(3):177-83.
8. Kim Y-H, Nobusawa S, Mittelbronn M, Paulus W, Brokinkel B, Keyvani K, et al. Molecular Classification of Low-Grade Diffuse Gliomas. *Am J Pathol*. déc 2010;177(6):2708-14.
9. Hartmann C, Meyer J, Balss J, Capper D, Mueller W, Christians A, et al. Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta Neuropathol (Berl)*. oct 2009;118(4):469-74.
10. Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am J Pathol*. avr 2009;174(4):1149-53.
11. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC-H, Leary RJ, Angenendt P, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*. 26 sept 2008;321(5897):1807
12. Capper D, Zentgraf H, Balss J, Hartmann C, von Deimling A. Monoclonal antibody

specific for IDH1 R132H mutation. *Acta Neuropathol (Berl)*. nov 2009;118(5):599-601.

13. Möllemann M, Wolter M, Felsberg J, Collins VP, Reifenberger G. Frequent promoter hypermethylation and low expression of the MGMT gene in oligodendroglial tumors. *Int J Cancer J Int Cancer*. 20 janv 2005;113(3):379-85.

14. Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, Hamou M-F, de Tribolet N, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*. 10 mars 2005;352(10):997-1003.

15. Figarella-Branger D, Maues de Paula A, Colin C, Bouvier C. Histomolecular classification of adult diffuse gliomas: the diagnostic value of immunohistochemical markers. *Rev Neurol (Paris)*. oct 2011;167(10):683-90.

16. Metellus P, Coulibaly B, Colin C, de Paula AM, Vasiljevic A, Taieb D, et al. Absence of IDH mutation identifies a novel radiologic and molecular subtype of WHO grade II gliomas with dismal prognosis. *Acta Neuropathol (Berl)*. déc 2010;120(6):719-29.

17. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, et al. Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. janv 2010;17(1):98-110.

18. Collège des Enseignants de Neurologie. 2014.

19. Law M, Yang S, Wang H, Babb JS, Johnson G, Cha S, et al. Glioma grading: sensitivity, specificity, and predictive values of perfusion MR imaging and proton MR spectroscopic imaging compared with conventional MR imaging. *AJNR Am J Neuroradiol*. déc 2003;24(10):1989-98.

20. Taillandier L, Bauchet L. Référentiel de l'ANOCEF pour les gliomes de l'adulte [Internet]. 2012. Disponible sur: http://www.oncologik.fr/images/c/c6/Public_Anocef_referentiels_gliomes.pdf

21. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJB, Janzer RC, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol*. mai 2009;10(5):459-66.

22. Chinot OL, de La Motte Rouge T, Moore N, Zeaiter A, Das A, Phillips H, et al. AVAglio: Phase 3 trial of bevacizumab plus temozolomide and radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Adv Ther*. avr 2011;28(4):334-40.

23. Chinot OL, Wick W, Mason W, Henriksson R, Saran F, Nishikawa R, et al. Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med*. 20 févr 2014;370(8):709-22.

24. Ma WJ, Furneaux H. Localization of the human HuR gene to chromosome 19p13.2. *Hum Genet*. janv 1997;99(1):32-3.

25. Toba G, White K. The third RNA recognition motif of *Drosophila* ELAV protein has a role in multimerization. *Nucleic Acids Res.* 20 déc 2007;36(4):1390-9.
26. Brennan CM, Steitz JA. HuR and mRNA stability. *Cell Mol Life Sci CMLS.* févr 2001;58(2):266-77.
27. Doller A, Pfeilschifter J, Eberhardt W. Signalling pathways regulating nucleo-cytoplasmic shuttling of the mRNA-binding protein HuR. *Cell Signal.* déc 2008;20(12):2165-73.
28. Izquierdo JM. Hu Antigen R (HuR) Functions as an Alternative Pre-mRNA Splicing Regulator of Fas Apoptosis-promoting Receptor on Exon Definition. *J Biol Chem.* 4 juill 2008;283(27):19077-84.
29. Zhao W, Zhao J, Hou M, Wang Y, Zhang Y, Zhao X, et al. HuR and TIA1/TIAL1 Are Involved in Regulation of Alternative Splicing of SIRT1 Pre-mRNA. *Int J Mol Sci.* 20 févr 2014;15(2):2946-58.
30. Zhu H, Zhou H-L, Hasman RA, Lou H. Hu proteins regulate polyadenylation by blocking sites containing U-rich sequences. *J Biol Chem.* 26 janv 2007;282(4):2203-10.
31. Barnhart MD, Moon SL, Emch AW, Wilusz CJ, Wilusz J. Changes in cellular mRNA stability, splicing, and polyadenylation through HuR protein sequestration by a cytoplasmic RNA virus. *Cell Rep.* 27 nov 2013;5(4):909-17.
32. Kundu P, Fabian MR, Sonenberg N, Bhattacharyya SN, Filipowicz W. HuR protein attenuates miRNA-mediated repression by promoting miRISC dissociation from the target RNA. *Nucleic Acids Res.* juin 2012;40(11):5088-100.
33. Mazan-Mamczarz K, Galbán S, López de Silanes I, Martindale JL, Atasoy U, Keene JD, et al. RNA-binding protein HuR enhances p53 translation in response to ultraviolet light irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 8 juill 2003;100(14):8354-9.
34. Hinman MN, Lou H. Diverse molecular functions of Hu proteins. *Cell Mol Life Sci.* oct 2008;65(20):3168-81.
35. Wang W, Fan J, Yang X, Fürer-Galban S, Lopez de Silanes I, von Kobbe C, et al. AMP-activated kinase regulates cytoplasmic HuR. *Mol Cell Biol.* mai 2002;22(10):3425-36.
36. Zou T, Liu L, Rao JN, Marasa BS, Chen J, Xiao L, et al. Polyamines modulate the subcellular localization of RNA-binding protein HuR through AMP-activated protein kinase-regulated phosphorylation and acetylation of importin alpha1. *Biochem J.* 15 janv 2008;409(2):389-98.
37. Doller A, Huwiler A, Müller R, Radeke HH, Pfeilschifter J, Eberhardt W. Protein kinase C α -dependent phosphorylation of the mRNA-stabilizing factor HuR: implications for posttranscriptional regulation of cyclooxygenase-2. *Mol Biol Cell.* 2007;18(6):2137-48.
38. Doller A, Huwiler A, Müller R, Radeke HH, Pfeilschifter J, Eberhardt W. Protein kinase

C alpha-dependent phosphorylation of the mRNA-stabilizing factor HuR: implications for posttranscriptional regulation of cyclooxygenase-2. *Mol Biol Cell*. juin 2007;18(6):2137-48.

39. Doller A, Akool E-S, Huwiler A, Müller R, Radeke HH, Pfeilschifter J, et al. Posttranslational modification of the AU-rich element binding protein HuR by protein kinase Cdelta elicits angiotensin II-induced stabilization and nuclear export of cyclooxygenase 2 mRNA. *Mol Cell Biol*. avr 2008;28(8):2608-25.

40. Doller A, Schlepckow K, Schwalbe H, Pfeilschifter J, Eberhardt W. Tandem phosphorylation of serines 221 and 318 by protein kinase Cdelta coordinates mRNA binding and nucleocytoplasmic shuttling of HuR. *Mol Cell Biol*. mars 2010;30(6):1397-410.

41. Kim HH, Abdelmohsen K, Lal A, Pullmann R, Yang X, Galban S, et al. Nuclear HuR accumulation through phosphorylation by Cdk1. *Genes Dev*. 1 juill 2008;22(13):1804-15.

42. Li H. Lipopolysaccharide-induced Methylation of HuR, an mRNA-stabilizing Protein, by CARM1. *J Biol Chem*. 15 nov 2002;277(47):44623-30.

43. Pang L, Tian H, Chang N, Yi J, Xue L, Jiang B, et al. Loss of CARM1 is linked to reduced HuR function in replicative senescence. *BMC Mol Biol*. 2013;14:15.

44. Stolz A, Ertych N, Bastians H. Tumor suppressor CHK2: regulator of DNA damage response and mediator of chromosomal stability. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1 févr 2011;17(3):401-5.

45. Abdelmohsen K, Pullmann R, Lal A, Kim HH, Galban S, Yang X, et al. Phosphorylation of HuR by Chk2 Regulates SIRT1 Expression. *Mol Cell*. févr 2007;25(4):543-57.

46. Dalmau J, Furneaux HM, Gralla RJ, Kris MG, Posner JB. Detection of the anti-Hu antibody in the serum of patients with small cell lung cancer--a quantitative western blot analysis. *Ann Neurol*. mai 1990;27(5):544-52.

47. López de Silanes I, Lal A, Gorospe M. HuR: post-transcriptional paths to malignancy. *RNA Biol*. janv 2005;2(1):113.

48. Abdelmohsen K, Gorospe M. Posttranscriptional regulation of cancer traits by HuR. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. oct 2010;1(2):214-29.

49. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer*. mars 2009;9(3):153-66.

50. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 9 août 1996;86(3):353-64.

51. Beck C, Schreiber H, Rowley D. Role of TGF-beta in immune-evasion of cancer. *Microsc Res Tech*. 15 févr 2001;52(4):387-95.

52. Nabors LB, Gillespie GY, Harkins L, King PH. HuR, a RNA stability factor, is expressed in malignant brain tumors and binds to adenine-and uridine-rich elements within the 3'

untranslated regions of cytokine and angiogenic factor mRNAs. *Cancer Res.* 2001;61(5):2154-61.

53. De Silanes IL, Fan J, Yang X, Zonderman AB, Potapova O, Pizer ES, et al. Role of the RNA-binding protein HuR in colon carcinogenesis. *Oncogene.* 16 oct 2003;22(46):7146-54.

54. Dixon DA, Tolley ND, King PH, Nabors LB, McIntyre TM, Zimmerman GA, et al. Altered expression of the mRNA stability factor HuR promotes cyclooxygenase-2 expression in colon cancer cells. *J Clin Invest.* déc 2001;108(11):1657-65.

55. Denkert C, Koch I, von Keyserlingk N, Noske A, Niesporek S, Dietel M, et al. Expression of the ELAV-like protein HuR in human colon cancer: association with tumor stage and cyclooxygenase-2. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* sept 2006;19(9):1261-9.

56. Heinonen M, Bono P, Narko K, Chang S-H, Lundin J, Joensuu H, et al. Cytoplasmic HuR expression is a prognostic factor in invasive ductal breast carcinoma. *Cancer Res.* 2005;65(6):2157-61.

57. Denkert C, Weichert W, Winzer K-J, Müller B-M, Noske A, Niesporek S, et al. Expression of the ELAV-like protein HuR is associated with higher tumor grade and increased cyclooxygenase-2 expression in human breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004;10(16):5580-6.

58. Erkinheimo T-L, Lassus H, Sivula A, Sengupta S, Furneaux H, Hla T, et al. Cytoplasmic HuR expression correlates with poor outcome and with cyclooxygenase 2 expression in serous ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 15 nov 2003;63(22):7591-4.

59. Denkert C, Weichert W, Pest S, Koch I, Licht D, Köbel M, et al. Overexpression of the embryonic-lethal abnormal vision-like protein HuR in ovarian carcinoma is a prognostic factor and is associated with increased cyclooxygenase 2 expression. *Cancer Res.* 1 janv 2004;64(1):189-95.

60. Niesporek S, Kristiansen G, Thoma A, Weichert W, Noske A, Buckendahl A-C, et al. Expression of the ELAV-like protein HuR in human prostate carcinoma is an indicator of disease relapse and linked to COX-2 expression. *Int J Oncol.* févr 2008;32(2):341-7.

61. Barbisan F, Mazzucchelli R, Santinelli A, Lopez-Beltran A, Cheng L, Scarpelli M, et al. Overexpression of ELAV-like protein HuR is associated with increased COX-2 expression in atrophy, high-grade prostatic intraepithelial neoplasia, and incidental prostate cancer in cystoprostatectomies. *Eur Urol.* juill 2009;56(1):105-12.

62. Fischer I, Gagner J-P, Law M, Newcomb EW, Zagzag D. Angiogenesis in gliomas: biology and molecular pathophysiology. *Brain Pathol Zurich Switz.* oct 2005;15(4):297-310.

63. Ido K, Nakagawa T, Sakuma T, Takeuchi H, Sato K, Kubota T. Expression of vascular endothelial growth factor-A and mRNA stability factor HuR in human astrocytic tumors. *Neuropathol Off J Jpn Soc Neuropathol.* déc 2008;28(6):604-11.

64. Sakuma T, Nakagawa T, Ido K, Takeuchi H, Sato K, Kubota T. Expression of vascular endothelial growth factor-A and mRNA stability factor HuR in human meningiomas. *J Neurooncol.* juin 2008;88(2):143-55.
65. Bolognani F, Gallani A-I, Sokol L, Baskin DS, Meisner-Kober N. mRNA stability alterations mediated by HuR are necessary to sustain the fast growth of glioma cells. *J Neurooncol.* févr 2012;106(3):531-42.
66. Rostas JW, Pruitt HC, Metge BJ, Mitra A, Bailey SK, Bae S, et al. microRNA-29 negatively regulates EMT regulator N-myc interactor in breast cancer. *Mol Cancer.* 2014;13:200.
67. Al-Ahmadi W, Al-Ghamdi M, Al-Souhibani N, Khabar KSA. miR-29a inhibition normalizes HuR over-expression and aberrant AU-rich mRNA stability in invasive cancer. *J Pathol.* mai 2013;230(1):28-38.
68. Wu Z, Wang L, Li G, Liu H, Fan F, Li Z, et al. Increased expression of microRNA-9 predicts an unfavorable prognosis in human glioma. *Mol Cell Biochem.* déc 2013;384(1-2):263-78.
69. Ma L, Young J, Prabhala H, Pan E, Mestdagh P, Muth D, et al. miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nat Cell Biol.* mars 2010;12(3):247-56.
70. Leucci E, Zriwil A, Gregersen LH, Jensen KT, Obad S, Bellan C, et al. Inhibition of miR-9 de-represses HuR and DICER1 and impairs Hodgkin lymphoma tumour outgrowth in vivo. *Oncogene.* 6 déc 2012;31(49):508-9.
71. Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol.* avr 1991;138(4):867-73.
72. Boninsegna L, Panzuto F, Partelli S, Capelli P, Delle Fave G, Bettini R, et al. Malignant pancreatic neuroendocrine tumour: lymph node ratio and Ki67 are predictors of recurrence after curative resections. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. juill 2012;48(11):1608-15.
73. Dhall D, Mertens R, Bresee C, Parakh R, Wang HL, Li M, et al. Ki-67 proliferative index predicts progression-free survival of patients with well-differentiated ileal neuroendocrine tumors. *Hum Pathol.* avr 2012;43(4):489-95.
74. McKeever PE, Strawderman MS, Yamini B, Mikhail AA, Blaivas M. MIB-1 proliferation index predicts survival among patients with grade II astrocytoma. *J Neuropathol Exp Neurol.* oct 1998;57(10):931-6.
75. Gauchotte G, Vigouroux C, Rech F, Battaglia-Hsu S-F, Soudant M, Pinelli C, et al. Expression of minichromosome maintenance MCM6 protein in meningiomas is strongly correlated with histologic grade and clinical outcome. *Am J Surg Pathol.* févr 2012;36(2):283

76. Lindner K, Gregán J, Montgomery S, Kearsey SE. Essential role of MCM proteins in premeiotic DNA replication. *Mol Biol Cell*. févr 2002;13(2):435-44.
77. Gonzalez MA, Pinder SE, Callagy G, Vowler SL, Morris LS, Bird K, et al. Minichromosome maintenance protein 2 is a strong independent prognostic marker in breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 déc 2003;21(23):4306-13.
78. Korkolopoulou P, Givalos N, Saetta A, Goudopoulou A, Gakiopoulou H, Thymara I, et al. Minichromosome maintenance proteins 2 and 5 expression in muscle-invasive urothelial cancer: a multivariate survival study including proliferation markers and cell cycle regulators. *Hum Pathol*. août 2005;36(8):899-907.
79. Giaginis C, Georgiadou M, Dimakopoulou K, Tsourouflis G, Gatzidou E, Kouraklis G, et al. Clinical significance of MCM-2 and MCM-5 expression in colon cancer: association with clinicopathological parameters and tumor proliferative capacity. *Dig Dis Sci*. févr 2009;54(2):282-91.
80. Facchetti A, Ranza E, Benericetti E, Ceroni M, Tedeschi F, Nano R. Minichromosome maintenance protein 7: a reliable tool for glioblastoma proliferation index. *Anticancer Res*. avr 2006;26(2A):1071-5.
81. Facchetti A, Ranza E, Grecchi I, Benericetti E, Ceroni M, Morbini P, et al. Immunohistochemical evaluation of minichromosome maintenance protein 7 in astrocytoma grading. *Anticancer Res*. oct 2006;26(5A):3513-6.
82. Wharton SB, Chan KK, Anderson JR, Stoeber K, Williams GH. Replicative Mcm2 protein as a novel proliferation marker in oligodendrogliomas and its relationship to Ki67 labelling index, histological grade and prognosis. *Neuropathol Appl Neurobiol*. août 2001;27(4):305-13.
83. Söling A, Sackewitz M, Volkmar M, Schaarschmidt D, Jacob R, Holzhausen H-J, et al. Minichromosome maintenance protein 3 elicits a cancer-restricted immune response in patients with brain malignancies and is a strong independent predictor of survival in patients with anaplastic astrocytoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1 janv 2005;11(1):249-58.
84. Helfenstein A, Frahm SO, Krams M, Drescher W, Parwaresch R, Hassenpflug J. Minichromosome maintenance protein (MCM6) in low-grade chondrosarcoma: distinction from enchondroma and identification of progressive tumors. *Am J Clin Pathol*. déc 2004;122(6):912-8.
85. Schrader C, Janssen D, Klapper W, Siebmann J-U, Meusers P, Brittinger G, et al. Minichromosome maintenance protein 6, a proliferation marker superior to Ki-67 and independent predictor of survival in patients with mantle cell lymphoma. *Br J Cancer*. 17 oct 2005;93(8):939-45.
86. Hendzel MJ, Wei Y, Mancini MA, Van Hooser A, Ranalli T, Brinkley BR, et al. Mitosis-

specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma*. nov 1997;106(6):348-60.

87. Tapia C, Kutzner H, Mentzel T, Savic S, Baumhoer D, Glatz K. Two mitosis-specific antibodies, MPM-2 and phospho-histone H3 (Ser28), allow rapid and precise determination of mitotic activity. *Am J Surg Pathol*. janv 2006;30(1):83-9.

88. Ladstein RG, Bachmann IM, Straume O, Akslen LA. Prognostic importance of the mitotic marker phosphohistone H3 in cutaneous nodular melanoma. *J Invest Dermatol*. avr 2012;132(4):1247-52.

89. Skaland I, Janssen EAM, Gudlaugsson E, Klos J, Kjellevoid KH, Søyland H, et al. Phosphohistone H3 expression has much stronger prognostic value than classical prognosticators in invasive lymph node-negative breast cancer patients less than 55 years of age. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. déc 2007;20(12):1307-15.

90. Brunner A, Riss P, Heinze G, Brustmann H. pHH3 and survivin are co-expressed in high-risk endometrial cancer and are prognostic relevant. *Br J Cancer*. 26 juin 2012;107(1):84-90.

91. Olar A, Wani KM, Sulman EP, Mansouri A, Zadeh G, Wilson CD, et al. Mitotic Index is an Independent Predictor of Recurrence-Free Survival in Meningioma. *Brain Pathol Zurich Switz*. 18 juill 2014;

92. Liang P-I, Li W-M, Wang Y-H, Wu T-F, Wu W-R, Liao AC, et al. HuR cytoplasmic expression is associated with increased cyclin A expression and poor outcome with upper urinary tract urothelial carcinoma. *BMC Cancer*. 2012;12:611.

93. Richards NG, Rittenhouse DW, Freydin B, Cozzitorto JA, Grenda D, Rui H, et al. HuR status is a powerful marker for prognosis and response to gemcitabine-based chemotherapy for resected pancreatic ductal adenocarcinoma patients. *Ann Surg*. sept 2010;252(3):499-505; discussion 505-6.

94. Scott IS, Morris LS, Bird K, Davies RJ, Vowler SL, Rushbrook SM, et al. A novel immunohistochemical method to estimate cell-cycle phase distribution in archival tissue: implications for the prediction of outcome in colorectal cancer. *J Pathol*. oct 2003;201(2):187

95. Hua C, Zhao G, Li Y, Bie L. Minichromosome Maintenance (MCM) Family as potential diagnostic and prognostic tumor markers for human gliomas. *BMC Cancer*. 21 juill 2014;14:526.

96. Preusser M, Hoeffberger R, Woehrer A, Gelpi E, Kouwenhoven M, Kros JM, et al. Prognostic value of Ki67 index in anaplastic oligodendroglial tumours--a translational study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Group. *Histopathology*. mai 2012;60(6):885-94.

97. Skjulsvik AJ, Mørk JN, Torp MO, Torp SH. Ki-67/MIB-1 immunostaining in a cohort of human gliomas. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(12):8905-10.

98. Abdelmohsen K, Srikantan S, Kuwano Y, Gorospe M. miR-519 reduces cell proliferation by lowering RNA-binding protein HuR levels. *Proc Natl Acad Sci.* 2008;105(51):20297-302.
99. Young LE, Moore AE, Sokol L, Meisner-Kober N, Dixon DA. The mRNA stability factor HuR inhibits microRNA-16 targeting of COX-2. *Mol Cancer Res MCR.* janv 2012;10(1):167-80.

ANNEXE 1 : PROTOCOLE IMMUNOHISTOCHEMIE

PREPARATION DES COUPES

- Après inclusion en paraffine, réalisation de coupes fines (5µm) montées à l'eau sur des lames de verre Polysine™ (LABONORD S.A, Templemars, FR).
- Séchage pendant 5 min sur une platine chauffante à 58°C puis placées à l'étuve à 56 °C pendant quelques heures.

DEPARAFFINAGE

Le déparaffinage et le démasquage des sites antigéniques sont réalisés dans le même temps dans un bain-marie PT LinK™ DAKO en tampon citrate 6,0 pendant 20 minutes.

DILUTION DES ANTICORPS

Les anticorps primaires concentrés sont dilués dans le diluant EnVision™ FLEX Antibody Diluent

TECHNIQUE FLEX+

- rinçage avec une solution saline de tampon Tris contenant du Tween 20, pH 7,6 (±0,1) pendant 5 min
- blocage des peroxydases endogènes avec le réactif EnVision™ FLEX Peroxidase Blocking Reagent (SM 801) soit avec un tampon phosphate contenant du peroxyde d'hydrogène, NaN₃ 15mmol/L et un détergent pendant 5 min
- rinçage pendant 5 min
- incubation avec l'anticorps primaire pendant 1h
- rinçage pendant 5 min
- anticorps secondaire avec EnVision™ FLEX+ Rabbit (LINKER) (SM 805) soit une solution tampon contenant une protéine stabilisante et un agent antimicrobien pendant 15 min
- rinçage pendant 5 min
- polymère marqué avec EnVision™ FLEX/HRP (SM802) pendant 20 min
- rinçage pendant 2 x 5 min
- chromogène substrat avec EnVision™ FLEX Substrate Buffer (SM 803) soit une solution tamponnée diluant une solution contenant du peroxyde d'hydrogène et le chromogène iaminobenzidine (DAB) et un agent conservateur pendant 10 min
- rinçage pendant 5 min
- contre-coloration avec EnVision™ FLEX Hematoxylin (SM 806) soit une solution aqueuse d'hématoxyline pendant 5 min
- rinçage pendant 5 min à l'eau distillée
- montage à l'Eukitt® (LABONORDS.A., Templemars, FR) ; après déshydratation par des bains successifs d'éthanol 0 96° et 100°.

ANNEXE 2 : EXTRACTION ARN DES TISSUS FIXES EN PARAFFINE

DEPARAFFINAGE ET DIGESTION

- Gratter avec un scalpel stérile environ 50 mg de tissu dans un tube de 2 ml (supprimer les 1eres coupes)
- Déparaffiner les coupes avec 1 ml de toluène (à manipuler sous hotte à solvants) :
 - 5 mn sur agitateur rotatif
 - centrifuger 5 mn à 12000G
 - éliminer le surnageantRépéter cette étape 2 fois au total

- Déshydrater
 - 2 X dans 1 ml d'alcool absolu, vortexer, centrifuger 5 mn à 12000G
 - 1 X dans 1 ml d'alcool 70°, vortexer, centrifuger 5 mn à 12000G
 - évaporer au Speed Vac ou sécher à l'air

- Lyse des tissus
 - tampon lyse : 20 mM Tris- HCl pH 7.5, 20 mM EDTA, 1% SDS
Soit : 200 µl de Tris- HCl 1M pH 7.5
400 µl EDTA 0.5 M
1 ml SDS 10%
QSP 10 ml eau qualité biologie moléculaire

Très important : pré incuber le tampon de lyse à 37 °C, 30 mn pour éliminer les RNases du tampon.

- protéinase K à 20 mg/ml (solution mère)

Ajouter au tissu déparaffiné 225 µl de tampon de lyse pré incubé et 25 µl de protéinase K

Incuber ON à 4 jours à 55°C jusqu'à digestion complète, si nécessaire rajouter de la protéinase K

EXTRACTION AU TRIZOL ET QUANTIFICATION

- Solutions :
 - TRIZOL LS Reagent (Invitrogen ref 10926-010)
 - Chloroforme
 - Isopropanol
 - Ethanol 70° pour lavage
 - Glycogène (Roche ref 14489922 à 20mg/ml)
 - RNasine 40 U/µl (Promega ref N 251A)

- Technique :
 - 250 µl de produit de digestion + 750 µl de Trizol (à manipuler sous la hotte à solvants)
Mélanger, vortexer, puis laisser 5 mn RT
 - ajouter 200 µl de chloroforme
Vortexer, laisser 5 mn RT, centrifuger 15 mn 4°C à 12000G

- prélever 500 µl de phase aqueuse (sans interphase) + 1 µl de glycogène
+ 500 µl Isopropanol

Vortexer, laisser 10 mn RT, centrifuger 15 mn 4°C à 12000G
- laver le précipité 2 X avec 1 ml éthanol à 70°
Vortexer, centrifuger 5 mn 4°C à 12000G
- enlever le maximum d'éthanol et laisser sécher à l'air
- dissoudre le précipité dans 30 à 50 µl H₂O + 1 µl de RNAsine
- doser l'ARN avec le QUBIT (200 ng pour 1 réaction de RT PCR)
- aliquoter et garder à -80°C

ANNEXE 3 : LA REVERSE TRANSCRIPTION

PREPARATION DES ARN TOTAUX

- Isoler les ARN
- Dosage des ARN

PREPARATION DE RT MASTER MIX

- Préparation du RT master mix sur un support de glace.
Volume total : 7 μ L :
 - 100mMd NTPs : 0.15 μ L
 - MultiScribe RT : 1.00 μ L
 - 10X RT Buffer : 1.50 μ L
 - RNase inhibitor : 0.19 μ L
 - Water : 4.16 μ L
- Vortexer puis centrifuger.
- Placer le mélange dans la glace.
- Distribuer 7 μ L du mélange précédent dans chaque tube

PREPARATION DE LA REACTION DE RT

- Ajouter au mélange précédent 5 μ L d'ARN à 10ng
- Ajouter 3 μ L de RT-Primer 5X.
- Vortexer puis centrifuger

REALISATION DE LA RT

Mettre les prélèvements dans le thermocycleur. Mode : standard. Volume : 15 μ L.

Temps	Température (°C)
30 minutes	16
30 minutes	42
5 minutes	85

ANNEXE 4 : LA REACTION qPCR

PREPARATION DE LA REACTION DE qPCR

- Préparation du mélange :
 - TaqMan PCR Master Mix : 10 μ L
 - Water: 7.67 μ L
 - Taqman Small RNA Assay 20X : 1.00 μ L

- Vortexer puis centrifuger
- Distribuer 18.7 μ l du mélange précédent dans les puits
- Ajouter 1.33 μ L de produit de RT, préalablement dilué au 1/5

REALISATION DE LA REACTION DE qPCR

La PCR est réalisée sur l'appareil ROTOR-GENE 6000.

Les conditions du cycle de PCR sont les suivantes : 10 minutes à 95°C puis 40 cycles de 15 secondes à 95°C et 60 secondes à 60°C.

RESUME DE LA THESE :

Introduction : Les gliomes sont les tumeurs primitives intraparenchymateuses les plus fréquentes du système nerveux central. Malgré de récents progrès thérapeutiques, le pronostic des gliomes de haut grade reste péjoratif. A ce jour, peu de marqueurs pronostiques sont évalués dans ces tumeurs. HuR est une protéine jouant un rôle important dans la régulation de nombreux ARN messagers. Parmi ces cibles, certaines protéines sont impliquées dans le cycle cellulaire et la prolifération tumorale. Le but de notre étude est d'analyser la valeur pronostique de HuR ainsi que des marqueurs de prolifération, MCM6 et Ki-67 dans les tumeurs gliales, de rechercher une corrélation entre HuR et les marqueurs de prolifération, et d'étudier le lien entre les micro-ARN miR9, miR29a et HuR, ces micro-ARN étant potentiellement impliqués dans la régulation de HuR.

Matériels et méthodes : L'étude immunohistochimique de HuR, de MCM6 et Ki-67 a été réalisée sur 116 cas de tumeurs gliales. Le niveau d'expression de miR9 et miR29a a été étudié au sein de 34 cas de tumeurs gliales, inclus en paraffine, par qRT-PCR.

Résultats : Il existe une surexpression cytoplasmique de HuR dans les gliomes de haut grade en comparaison aux gliomes de bas grade ($p < 0.0001$). La surexpression cytoplasmique de HuR est un marqueur pronostique péjoratif en analyse univariée ($p = 0.007$). HuR est corrélé avec les marqueurs de prolifération MCM6 et Ki-67 ($p < 0.0001$). MCM6 est un facteur pronostique péjoratif de survie sans progression et de survie globale, indépendant du grade en analyse multivariée ($p < 0.0001$). Il n'existe pas de différence significative d'expression de miR9 et miR29a en fonction du grade, ni de corrélation avec le niveau d'expression de HuR.

Conclusion : L'expression de HuR est corrélée au grade histologique des tumeurs gliales, aux marqueurs de prolifération et à la survie. MCM6 est un marqueur pronostique péjoratif, indépendant du grade.

TITRE EN ANGLAIS

Association between HuR and cellular proliferation in diffuse glioma

THESE : MEDECINE SPECIALISEE - ANNEE 2015

MOTS CLEFS : Gliome, HuR, MCM6, Ki67, micro-ARN

INTITULÉ ET ADRESSE :

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Faculté de Médecine de Nancy

9, avenue de la Forêt de Haye

54505 VANDOEUVRE LES NANCY Cedex
