

Université de Montréal

Effets des polyphénols du thé vert et de la radiothérapie sur la progression et la résistance tumorale dans un modèle *in vivo* de glioblastome

Par

Paul Khoueir

Département de physiologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue d'obtention du grade de M.Sc.

(sciences neurologiques)

Août 2004

« copyright », Paul Khoueir, 2004



AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Effets des polyphénols du thé vert et de la radiothérapie sur la progression et la résistance tumorale dans un modèle *in vivo* de glioblastome

présenté par :

Paul Khoueir

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Guy Doucet – président rapporteur

Dr André Ferron – directeur de recherche

Dr Richard Béliveau – codirecteur de recherche

Dr Robert Moumdjian –membre du jury

RÉSUMÉ

Aucun traitement curatif n'est actuellement disponible contre le glioblastome. Il devient donc nécessaire de trouver une nouvelle alternative thérapeutique. *In vitro*, le thé vert possède des propriétés anticarcinogéniques. Les études démontrent qu'il inhibe l'activité des métalloprotéinases (impliquées dans la dégradation de la matrice extra-cellulaire durant l'invasion tumorale) et de la P-glycoprotéine (associée à la BHE, pompe rejetant les agents chimiothérapeutiques hors des cellules).

Notre objectif était d'évaluer l'efficacité antitumorale des polyphénols du thé vert, en combinaison ou non avec la radiothérapie, dans un modèle *in vivo* de glioblastome chez le rat. Les animaux ont été divisés en quatre groupes: témoin, traité à la radiothérapie, traité aux polyphénols et traité avec une combinaison de radiothérapie et polyphénols.

Selon notre modèle et les cibles étudiées, le thé vert n'a pas démontré ses propriétés anticarcinogéniques *in vivo*. Ceci était possiblement dû à une faible disponibilité du thé vert après une administration entérale.

Notre étude a parcontre démontré que les spécimens ayant reçu de la radiothérapie avaient une formation microvasculaire plus importante, une induction de l'activité des métalloprotéinases et une augmentation de l'expression de la cavéoline (marqueur de différenciation cellulaire). Donc, la radiothérapie entraîne une prolifération de vaisseaux matures. La P-glycoprotéine était également induite par la radiothérapie, ce qui expliquerait une résistance accrue à la chimiothérapie. Globalement, ces éléments semblent indiquer que la radiothérapie, malgré le fait qu'elle augmente la survie, pourrait aussi contribuer à augmenter le caractère invasif de la tumeur.

MOTS CLÉS FRANÇAIS

Barrière hémato-encéphalique

Métalloprotéinases

Angiostatine

Cavéoline

P-glycoprotéine

Néovascularisation

Antiangiogénique

Invasion

CNS-1

Cellule endothéliale

RÉSUMÉ EN ANGLAIS

No effective treatment is available against glioblastoma. It is therefore necessary to find new options to treat malignant glioma. *In vitro*, green tea has been shown to have anti-carcinogenic properties. It inhibits metalloproteinases' activity (enzymes which degrade the extra-cellular matrix during cell invasion) and P-glycoprotein's activity (protein associated with the BBB, acting as a pump expelling chemotherapy out of cells).

Our goal was to assess the anti-carcinogenic activity of green tea, with or without radiotherapy, using an *in vivo* rat model of glioblastoma. The rats were divided into four groups and received four different treatments: control (saline), radiotherapy, green tea and a combination of radiotherapy and green tea.

With our model and the involved targets, green tea has not shown its anticarcinogenic properties. This result might be explained by an insufficient green tea uptake after an oral administration.

However, in our study, we were able to show that the group receiving radiotherapy had an increased micro-vascular formation, MMP activity (revealing a greater invasiveness) and caveolin expression (indicator of cellular differentiation). These results suggest that radiotherapy leads to proliferation of mature blood vessels. P-glycoprotein was also induced by radiotherapy, which may explain the difficulty treating malignant glioma with chemotherapy if given after radiotherapy. In summary, these results seem to suggest that radiotherapy, in spite the fact that it increases survival, may contribute to increase the invasive features of the tumor.

MOTS CLÉS ANGLAIS

Blood-brain barrier

Metalloproteinases

Angiostatin

Caveolin

P-glycoprotein

Neovascularisation

Anti-angiogenic

Invasion

CNS-1

Endothelial cell

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iv
MOTS CLÉS FRANÇAIS	v
RÉSUMÉ EN ANGLAIS	vi
MOTS CLÉS ANGLAIS	vii
TABLE DES MATIÈRES	viii
Liste des tableaux	x
Liste des figures	xi
Liste des abréviations	xiii
LES REMERCIEMENTS	xiv
CHAPITRE I INTRODUCTION	1
1.1 Tumeurs cérébrales	1
1.2 Tumeurs gliales	2
1.2.1 Classification	2
1.2.2 Incidence	3
1.2.3 Le traitement des gliomes malins	3
1.3 Les nouvelles cibles thérapeutiques	6
1.3.1 Barrière hémato-encéphalique	7
1.3.1.1 Les cellules endothéliales.....	7
1.3.1.2 Les astrocytes.....	9
1.3.1.3 Les péricytes	9
1.3.2 P-glycoprotéine.....	9
1.3.3 La P-gp comme nouvelle cible thérapeutique.....	10
1.3.4 Angiogenèse	11
1.3.5 L'angiogenèse comme cible thérapeutique.....	13
1.4 Polyphénols du thé vert	14
1.4.1 Propriétés antitumorales des polyphénols	16
1.5 But de la recherche	18
1.5.1 Le modèle utilisé	18
1.5.2 Étude comparative	18
1.5.3 Les cibles choisies.....	19
CHAPITRE II MATÉRIEL ET MÉTHODES	20
2.1 Matériel	20
2.2. Méthodes	21
2.2.1 Préparation de la lignée cellulaire CNS-1 en vue de l'implantation cérébrale	21
2.2.2 Inoculation stéréotaxique et groupes d'étude	21
2.2.3 Culture des RBE4 et études in vitro	23
2.2.4 Culture BBCE et études in vitro.....	23
2.2.5 Préparation des homogénats de tumeurs.....	24
2.2.6 Isolement des cellules endothéliales	24
2.2.7 Dosage des protéines	26
2.2.8 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide et immunobuvardage.....	26
2.2.9 Analyse par zymographie.....	27

CHAPITRE III RÉSULTATS	28
3.1 <i>Courbe pondérale</i>	28
3.2 <i>Analyse histopathologique des tumeurs et caractérisation de la vascularisation en immunohistochimie</i>	29
3.3 <i>Isolement des cellules endothéliales</i>	30
3.4 <i>Mesure de l'activité enzymatique de la MMP-9 par zymographie dans l'homogénat de tissu tumoral et les cellules endothéliales isolées des groupes témoin, polyphénols, irradié et irradié avec polyphénols</i>	30
3.5 <i>Mesure en zymographie de l'activité des MMPs dans des cellules RBE4 traitées ou non aux polyphénols, avec ou sans radiothérapie et dans des cellules RBE4 traitées uniquement avec des concentrations croissantes de polyphénols</i>	31
3.6 <i>Détection de l'expression de la P-gp dans l'homogénat de tissu tumoral et les cellules endothéliales isolées des groupes témoin, polyphénols, irradié et irradié avec polyphénols</i>	32
3.7 <i>Détection de l'expression de la P-gp dans des cellules RBE4 traitées ou non aux polyphénols, avec ou sans radiothérapie et dans des cellules BBCE traitées avec des concentrations croissantes de polyphénols</i>	32
3.8 <i>Détection de l'expression de l'angiostatine dans l'homogénat de tissu tumoral et les cellules endothéliales isolées des groupes témoin, polyphénols, irradié et irradié avec polyphénols</i>	33
3.9 <i>Détection de l'expression de la cavéoline-1 dans l'homogénat et les cellules endothéliales isolées de tissu sain versus tumoral</i>	33
3.10 <i>Détection de l'expression des cavéolines-1 et -2 dans l'homogénat de tissu tumoral et les cellules endothéliales isolées des groupes témoin, polyphénols, irradié et irradié avec polyphénols</i>	34
3.11 <i>Détection de l'expression des cavéolines -1 et -2 dans des cellules RBE4 traitées ou non aux polyphénols, avec ou sans radiothérapie</i>	35
3.12 <i>Détection de l'expression de la cavéoline-1 dans des cellules RBE4 traitées ou non par du VEGF, bFGF, en absence ou en présence de sérum; dans des conditions ou non d'hypoxie; en co-culture ou non avec les CNS-1</i>	35
 CHAPITRE IV DISCUSSION	 48
4.1 <i>Le modèle utilisé</i>	49
4.2 <i>Radiothérapie</i>	50
4.2.1 <i>Radiothérapie et effets secondaires</i>	50
4.2.2 <i>Radiothérapie et invasion tumorale</i>	50
4.2.3 <i>Radiothérapie et maturation vasculaire</i>	52
4.3 <i>Thérapie antiangiogénique</i>	53
4.3.1 <i>Traitement combiné de radiothérapie et d'agents antiangiogéniques</i>	54
4.4 <i>Barrière hémato-encéphalique</i>	57
4.4.1 <i>Radiothérapie et P-gp</i>	57
4.4.2 <i>Polyphénols et P-gp</i>	58
 CHAPITRE V CONCLUSION	 59
BIBLIOGRAPHIE	61
ANNEXE I	xv

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.I : Classification des tumeurs cérébrales primaires selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS).....	2
Tableau II.I : Protocole utilisé dans chaque groupe.....	22

LISTE DES FIGURES

Fig 1.1 Algorithme du traitement des gliomes malins : glioblastome et astrocytome anaplasique.....	6
Fig 1.2 Schéma d'une vue en coupe d'un capillaire cérébral et d'un capillaire représentatif de la plupart des autres tissus (tissus périphériques).....	8
Fig 2.1 Schéma présentant la méthode d'isolement des cellules endothéliales à l'aide de microbilles magnétiques couplées à un anticorps dirigé contre la protéine de surface PECAM-1.....	25
Fig 3.1 Courbe pondérale (en g) des rats témoins, irradiés, traités aux polyphénols, et traités aux polyphénols et irradiés pendant une période de 24 jours.....	36
Fig 3.2 Analyse histopathologique par immunohistochimie du facteur VIII : caractérisation de la vascularisation du cerveau de rat normal (A) et des tumeurs témoins (B), traitées par irradiation (C), traitées aux polyphénols (D), traitées aux polyphénols et par irradiation (E).....	37
Fig 3.3 Détection de l'expression d'eNOS dans l'homogénat de tissu tumoral et des cellules endothéliales isolées des groupes témoin, polyphénols, traité aux polyphénols, irradié et irradié avec polyphénols... ..	38
Fig 3.4 Mesure en zymographie de l'activité enzymatique de la MMP-9 dans l'homogénat de tissu tumoral et des cellules endothéliales isolées des groupes témoin, polyphénols, irradié et irradié avec polyphénols.....	39
Fig 3.5 (A) Mesure en zymographie de l'activité enzymatique des MMP-2 et MMP-9 dans des cellules RBE4 traitées ou non aux polyphénols, avec ou sans radiothérapie.....	40
Fig 3.5 (B) Mesure en zymographie de l'activité enzymatique des MMP-2 et MMP-9 dans des cellules RBE4 traitées uniquement avec des concentrations croissantes de polyphénols.....	40
Fig 3.6 Détection de l'expression de la P-gp dans l'homogénat de tissu tumoral et des cellules endothéliales isolées des groupes témoin, traité aux polyphénols, irradié et irradié avec polyphénols.....	41
Fig 3.7 (A) Détection de l'expression de la P-gp dans des cellules RBE4 traitées ou non aux polyphénols, avec ou sans radiothérapie.....	42
Fig 3.7 (B) Détection de l'expression de la P-gp dans les cellules BBCE traitées avec des concentrations croissantes de polyphénols.....	42
Fig 3.8 Détection de l'expression de l'angiostatine dans l'homogénat de tissu tumoral et des cellules endothéliales isolées des groupes témoin, traité aux polyphénols, irradié et irradié avec polyphénols.....	43
Fig 3.9 Détection de l'expression de la cavéoline-1 et d'eNOS dans l'homogénat et des cellules endothéliales isolées de tissu cérébral sain versus tumoral.....	44

Fig 3.10 Détection de l'expression des cavéolines-1 et -2 dans l'homogénat de tissu tumoral et des cellules endothéliales isolées des groupes témoin, traité aux polyphénols, irradié et irradié avec polyphénols.....	45
Fig 3.11 Détection de l'expression des cavéolines -1 et -2 dans les cellules RBE4 traitées ou non aux polyphénols, avec ou sans radiothérapie.....	46
Fig 3.12 Détection de l'expression de la cavéoline-1 dans des cellules RBE4 traitées ou non avec du VEGF, du bFGF, en absence ou en présence de sérum; dans des conditions ou non d'hypoxie; en co-culture ou non avec des CNS-1.....	47

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique
 BBCE : Cellule endothéliale capillaire du cerveau de bovin
 BCNU : 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosurée
 BHE : barrière hémato-encéphalique
 BSA : Albumine sérique bovine
 CCPA : Conseil canadien de protection des animaux
 CH(R)C5 : Cellules ovariennes d'hamster chinois résistantes aux drogues
 DMEM : Milieu Eagle modifié par Dulbecco
 EDTA : Acide éthylènediamine tétracétique
 EGC : Épigallocatechine
 EGCG : Gallate d'épigallocatechine
 eNOS : Synthase de l'oxide nitrique endothéliale
 FGF : Facteur de croissance de fibroblastes
 GLUT-1 : Transporteur-1 du glucose
 GTP : Polyphénols du thé vert
 HEPES : 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethanesulfonique
 IAAP : [125I]-iodoaryl azidoprazosin
 IgG : Immunoglobuline G
 INC : Institut national du cancer
 MMP : Métalloprotéinase de la matrice extracellulaire
 MT-MMP : Métalloprotéinases matricielles de type membranaire
 NCAM : Molécule d'adhésion cellulaire neuronale
 OMS : Organisation mondiale de la santé
 PAI : Inhibiteur de l'activateur du plasminogène
 PBS : Tampon phosphate salin
 PDGF : Facteur de croissance d'origine plaquettaire
 PECAM-1 : Molecule-1 d'adhésion cellulaire endothéliale/plaquettaire
 P-gp : P-glycoprotéine
 PVDF : polyvinylidène difluorure
 RBE4 : Cellule endothéliale du cerveau de rat immortalisé
 RMD : Résistance multidroge
 SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
 SNC : Système nerveux central
 TEMED : N,N,N',N'-tétraméthylènediamine
 TIMP : Inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases
 tPA : : Activateur tissulaire du plasminogène
 Tris : Trishydroxyméthylaminométhane
 TSP-1 : Thrombospondine-1
 uPA : Activateur du plasminogène urokinase
 uPAR : Récepteur de l'activateur du plasminogène urokinase
 VEGF : Facteur de croissance endothélial vasculaire
 VEGFR-2 : Récepteur-2 du facteur de croissance endothélial vasculaire

LES REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de cette maîtrise. Plus particulièrement, j'aimerais remercier mes directeurs de recherche, les Docteurs André Ferron et Richard Béliveau, pour leur appui, leur enthousiasme et leur dynamisme. Je tiens également à remercier le Dr. Anthony Régina pour sa précieuse aide, ses encouragements et sa patience. Je remercie aussi ma douce moitié, Elizabeth, et ma famille pour leur support tout au long de mes études. Finalement, je remercie la bourse Claude-Bertrand pour le soutien financier.

CHAPITRE I INTRODUCTION

1.1 Tumeurs cérébrales

Les tumeurs cérébrales se divisent en deux grandes catégories : primaires et secondaires. Les tumeurs primaires surviennent au niveau du système nerveux central (SNC) et les secondaires sont des métastases ou des tumeurs avoisinantes qui envahissent le cerveau. Les symptômes d'un patient porteur d'une tumeur cérébrale sont nombreux. Il pourrait s'agir d'un simple mal de tête ou de symptômes plus graves, tels un changement de personnalité, une instabilité à la marche ou une perte visuelle. Il existe plusieurs types de tumeurs primaires (tableau I.I, p. 2); chez l'adulte, l'astrocytome est la plus fréquente.

Tableau I.I : Classification des tumeurs cérébrales primaires selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS)

<p>Tumeurs neuroépithéliales ou gliales</p> <ul style="list-style-type: none"> • Astrocytome • Oligodendrogliome • Ependymome • Tumeurs des plexus choroïdes <p>Tumeurs des méninges</p> <ul style="list-style-type: none"> • Méningiome • Hémangiopéricytome <p>Tumeurs des nerfs crâniens et des racines</p> <ul style="list-style-type: none"> • Schwannome • Neurofibrome 	<p>Tumeurs hématopoïétiques</p> <ul style="list-style-type: none"> • Lymphome • Plastrocytome <p>Tumeurs germinales</p> <ul style="list-style-type: none"> • Germinome • Carcinome embryonnaire • Choriocarcinome <p>Tumeurs kystiques</p> <ul style="list-style-type: none"> • Kyste épidermoïde • Kyste dermoïde • Kyste colloïde <p>Tumeurs de la région sellaire</p> <ul style="list-style-type: none"> • Adénome hypophysaire • Crâniopharyngiome
---	--

Selon la Société américaine du cancer, 17 400 nouveaux cas de tumeurs intracrâniennes ont été recensés en 1998. Parmi ces nouveaux cas, il y a eu 13 300 décès (Prados et Levin, 2000; Landis et al., 1999). Certaines études démontrent une augmentation significative de l'incidence des néoplasies cérébrales, avec environ 1200 nouveaux cas par année (Shapiro et Shapiro, 1998). Une augmentation de l'espérance de vie pourrait en partie expliquer ce phénomène.

1.2 Tumeurs gliales

1.2.1 Classification

Les tumeurs gliales se classent parmi les tumeurs cérébrales les plus fréquentes et sont divisées en deux grandes catégories (Prados et Levin, 2000; Shapiro et Shapiro, 1998) : les tumeurs astrocytaires et oligodendrogliales. Elles peuvent être soit bénignes, soit malignes. Le degré de malignité de ces tumeurs est classifié selon des critères histologiques et génétiques. Selon la classification de l'Organisation mondiale de la santé (OMS), la différence entre un gliome bénin et malin se fait principalement

selon la présence d'atypies nucléaires, de mitoses, d'hypercellularité, de nécrose ou de prolifération microvasculaire (Kleihues et al., 2002; Black 1991). Les tumeurs astrocytaires sont subdivisées en quatre catégories, selon la présence ou non de ces critères. L'astrocytome pilocytique n'a aucun critère de malignité et est classifié comme grade I. L'astrocytome fibrillaire bénin est composé de cellules bien différenciées avec quelques mitoses et atypies (grade II). L'astrocytome anaplasique est peu différencié, très cellulaire et a beaucoup d'atypies nucléaires (grade III). Le glioblastome multiforme est caractérisé par la présence de nécrose et de prolifération endothéliale (grade IV).

1.2.2 Incidence

Parmi les tumeurs astrocytaires, le glioblastome multiforme est la tumeur la plus fréquente et elle est responsable d'environ 23 % des décès dûs à des tumeurs du système nerveux central (Prados et Levin, 2000). Le pic d'incidence varie de la quatrième à la cinquième décennie et l'âge moyen est de 55 ans (Fuller et Burger, 1996). La plupart des glioblastomes sont spontanés mais certains peuvent aussi être associés à des syndromes génétiques tels que la neurofibromatose de type 2. Il s'agit d'une mutation dans le chromosome 22 qui entraîne une inactivation de la schwannomine et qui se manifeste par l'apparition de neurofibromes, de méningiomes, de gliomes ou de schwannomes.

1.2.3 Le traitement des gliomes malins

Aucun traitement curatif n'est actuellement disponible contre le glioblastome. La survie moyenne sans traitement est d'environ 3 mois. Il existe des options qui prolongent la survie moyenne de quelques mois seulement. Parmi ces options, une résection chirurgicale macroscopique complète peut être effectuée. Toutefois, cette résection n'est pas envisageable quand la tumeur se développe dans les zones éloquentes du cerveau (par exemple : l'aire du langage ou de la motricité) où la

morbidité associée contrebalance les effets positifs (Keles et al., 1999; Simpson et al., 1993; Quigley et Maroon, 1991). La survie moyenne postopératoire des patients avec des glioblastomes est seulement de 4 mois et ceci, même si on exclut ceux qui n'ont eu qu'une résection partielle ou une biopsie. La chirurgie est suivie par la radiothérapie (60 Gy au total) avec laquelle une augmentation de survie a été démontrée (Fiveash et Spencer, 2003; Shapiro et al., 1989; Liebel et Sheline, 1987). L'ajout de l'irradiation postopératoire améliore la survie moyenne de 3 à 9,25 mois et la survie à deux ans de 3 à 11% (Castro et al., 2003; Salcman, 1980). Si une lésion mesure moins de trois centimètres, une alternative thérapeutique appropriée est la radiochirurgie. Il s'agit d'une radiothérapie ciblée sur la lésion et qui minimise ainsi les effets secondaires d'une radiothérapie pancrânienne (Mehta et al., 1994; Loeffler et al., 1992).

Les gliomes malins ont la capacité d'infiltrer de façon diffuse les régions normales du cerveau. Ils ont tendance à respecter les structures anatomiques du cerveau et leur migration se fait le long des fibres myélinisées, comme le corps calleux et la capsule interne. Ils envahissent également les régions périvasculaires et les méninges (Tysnes et Mahesparan, 2001; Russel et Rubinstein, 1989). La région périvasculaire est une région de prédilection car c'est un des rares endroits du SNC où il existe une matrice extracellulaire riche en collagène, laminine et fibronectine (Tysnes et Mahesparan, 2001; Rutka et al., 1988; Carbonetto, 1984). Ces caractéristiques rendent la chirurgie et la radiothérapie locale des options peu curatives (Tysnes et Mahesparan, 2001). Toutefois, des métastases à l'extérieur du SNC sont rares (Pedersen et al., 1994). Seulement quelques cas ont été rapportés dans la littérature, dont celui d'un patient de 40 ans porteur d'un glioblastome opéré qui s'est présenté avec une métastase au niveau du ganglion lymphatique supraclaviculaire (Ates et al., 2003); et celui d'un autre patient qui s'est présenté avec des métastases pulmonaires (Adn et al., 2003).

L'utilisation de la chimiothérapie demeure controversée pour le moment. Elle pourrait augmenter la survie à long terme de 5 à 15%, mais il est difficile de prédire quels glioblastomes vont répondre à cette thérapie (Parney and Chang, 2003; Kornblith, 1995). Les médicaments de chimiothérapie sont des composés de

nitrosurées tels le 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosurée (BCNU), qui peuvent être combinés avec d'autres médicaments comme la procarbazine ou la vincristine. Mais, plusieurs mécanismes de résistance à ces agents ont été identifiés (Prados et Levin, 2000). Un de ces mécanismes permet à la cellule de réparer la réticulation de l'ADN avec une enzyme, l'O6-alkylguanine-DNA alkyltransférase (Wiestler et al., 1984). Une cible thérapeutique serait de désactiver cette enzyme et de permettre ainsi l'action des nitrosurées sur l'ADN (Dolan et Pegg, 1997; Wedge et al., 1996).

L'autre élément de résistance propre au SNC est la barrière hémato-encéphalique (BHE). Elle est constituée des cellules endothéliales qui ont la propriété particulière de limiter l'entrée des médicaments vers le cerveau. Plusieurs tentatives de contourner cette barrière ont été effectuées, dont l'injection intra-artérielle des produits chimiotoxiques, l'utilisation d'agents hyperosmotiques et l'introduction de polymères dans le lit tumoral par stéréotaxie, pour faciliter la disponibilité du médicament. Toutefois, les études combinant la chimiothérapie avec le Cereport (un analogue de la bradykinine qui rend la BHE perméable) n'ont pas été concluantes (Prados et al., 2003; Gregor et al., 1999). Une étude clinique récente randomisée de phase 2, à double insu, combinant la carboplatine avec soit un placebo, soit le cereport, administré en intraveineuse dans le but de traiter des gliomes malins récidivants a été effectuée. Les résultats n'ont pas démontré de différence significative entre les deux groupes pour la survie moyenne ou la progression tumorale (Prados et al., 2003). Ainsi, malgré tous ces efforts, l'efficacité de la chimiothérapie demeure réduite pour les glioblastomes.

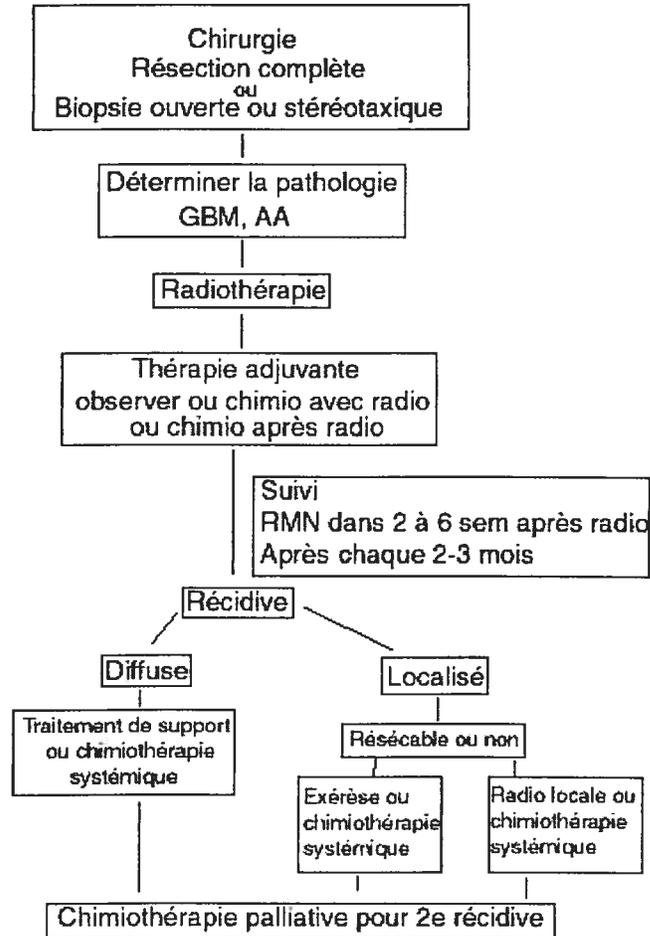


Figure 1.1 : Algorithme du traitement des gliomes malins : glioblastome et astrocytome anaplasique (Prados et Levin, 2000)

1.3 Les nouvelles cibles thérapeutiques

Malgré les efforts actuels dans le traitement des gliomes, en combinant chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie, le pronostic de ces tumeurs reste donc médiocre avec une survie moyenne d'environ 1 an pour les glioblastomes. Il est nécessaire de comprendre les mécanismes qui rendent ces tumeurs agressives, difficiles à traiter et de trouver des nouvelles cibles thérapeutiques. Selon l'Institut national du cancer (INC), il y a actuellement environ une centaine d'études cliniques dans le monde concernant les tumeurs cérébrales. Des approches innovatrices avec des agents qui

rendent la barrière hémato-encéphalique perméable et des agents antiangiogéniques sont en investigation.

1.3.1 Barrière hémato-encéphalique

Tel que mentionné précédemment, une des difficultés dans le traitement des glioblastomes vient du fait que les capillaires cérébraux constituent une structure particulière : la barrière hémato-encéphalique. Elle est constituée principalement d'une mono-couche de cellules endothéliales formant les vaisseaux sanguins cérébraux. De plus, on retrouve des pieds astrocytaires et des péricytes qui sont associés à cette couche cellulaire endothéliale (Labelle 2000). Son rôle premier est de maintenir l'homéostasie du SNC. La barrière agit comme un filtre sélectif en régulant le passage des molécules. En contrepartie, elle limite également le passage des médicaments.

1.3.1.1 Les cellules endothéliales des capillaires cérébraux possèdent des caractéristiques spécifiques et distinctes des cellules endothéliales des autres tissus, leur permettant de former une barrière sang-cerveau. Contrairement aux capillaires de tissus périphériques, les capillaires cérébraux sont formés par un endothélium continu présentant des jonctions cellulaires serrées et semblables, mais non-identiques à celles des cellules épithéliales, et une absence de fenestrations (Vorbrot and Dobrogowska, 2003; Scherrmann, 2002; Brightman, 1989; Schneeberg et Lynch, 1984). L'étanchéité de la BHE est reflétée par son imperméabilité au sucrose et par une résistance électrique beaucoup plus élevée pour les cellules endothéliales des capillaires cérébraux que pour les autres cellules endothéliales. La résistance électrique de la BHE *in vivo* est d'environ 8000 ohms/cm², comparativement à environ 1500 ohms/cm² pour les capillaires qui ne forment pas de barrière complète (Smith et Rapoport, 1986). De plus, les cellules endothéliales de la BHE possèdent très peu de vésicules pinocytaires, ce qui indique un faible taux de transport par pinocytose (Pardridge, 1997; Defazio et al., 1997).

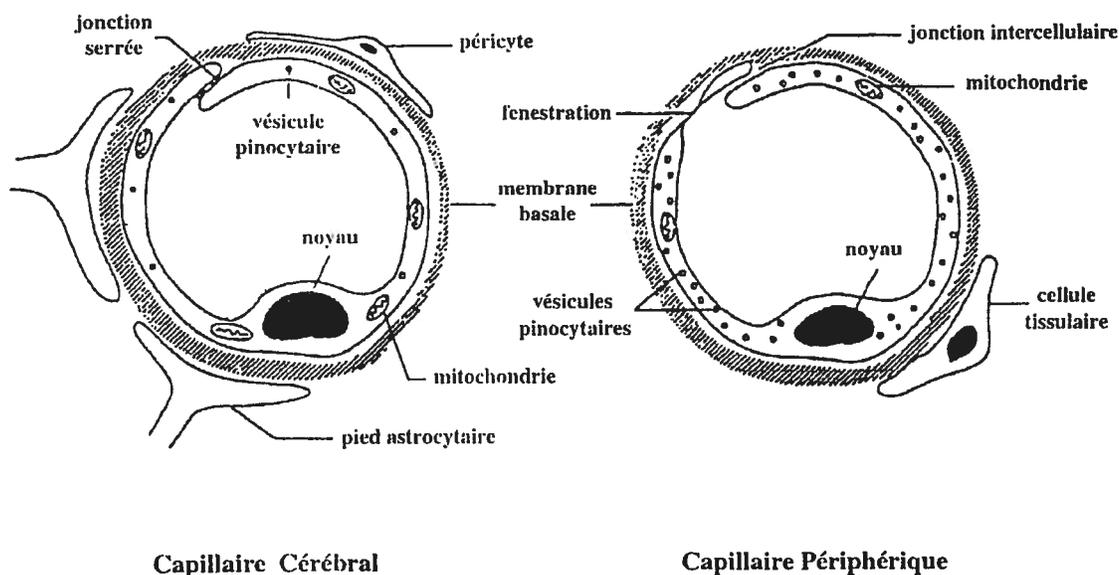


Figure 1.2 Schéma d'une vue en coupe d'un capillaire cérébral et d'un capillaire représentatif de la plupart des autres tissus (tissus périphériques) (Labelle 2000)

Pour les capillaires cérébraux, les cellules endothéliales sont liées par des jonctions serrées. Elles comptent peu de vésicules pinocytaires, un grand nombre de mitochondries et sont entourées de péricytes et de pieds astrocytaires. Par contre, les capillaires des tissus périphériques présentent des fenestrations et un grand nombre de vésicules pinocytaires qui facilitent les échanges sang-tissus. Les mitochondries sont aussi moins abondantes dans les capillaires périphériques (Miller, 1999).

Bien que la diffusion soit très faible, il existe plusieurs mécanismes permettant à certaines molécules de traverser la BHE. De petites molécules lipophiles peuvent traverser les cellules endothéliales de la BHE par transport passif. Une faible proportion de petites molécules hydrophiles pourraient également franchir la BHE par diffusion à travers les jonctions serrées. Les molécules peuvent aussi traverser la BHE via des transporteurs spécifiques, par endocytose ou par transcytose. Par exemple, l'endocytose de l'insuline ou de la transferrine est médiée par un récepteur (Aigner et al., 1997; Deschamps et al., 1996). La BHE possède également des systèmes de transport spécifiques qui permettent l'entrée contrôlée des nutriments et des acides aminés au cerveau (Egleton et Davis, 1997; Pardridge, 1997; Aigner et al., 1997; Risau, 1991). Le transporteur de glucose GLUT-1 est un autre exemple (Boado et Pardridge, 1994; Abott et al., 1992). Le grand nombre de mitochondries présentes dans les cellules endothéliales de la BHE reflète d'ailleurs la grande capacité

métabolique et le haut taux de transport actif de ces cellules (Aigner et al., 1997; Audus et Borchardt, 1987).

1.3.1.2 Les astrocytes sont un autre type cellulaire qui compose la BHE. Ce sont des cellules gliales présentant des projections qui entourent l'extérieur des capillaires cérébraux. Les astrocytes occupent 99% de la surface abluminale des capillaires cérébraux (Paspalas et Papadopoulos, 1996; Cohen et al., 1995). Les astrocytes seuls ne peuvent former la BHE, mais ils jouent un rôle extrêmement important dans son développement et le maintien de son intégrité (Bauer et Bauer, 2000; Goldstein, 1988). En effet, il a déjà été démontré que les cellules endothéliales en contact avec des astrocytes deviennent moins perméables et développent des caractéristiques de barrière (Hayashi et al., 1997; Rist et al., 1997; Hurwitz et al., 1993; Raub et al., 1992; Rubin et al., 1991; Stewart et Wiley, 1981).

1.3.1.3 Les péricytes sont les cellules entourant les cellules endothéliales des capillaires cérébraux. Elles partagent une membrane basale commune avec les cellules endothéliales et sont des cellules phagocytaires (Pardridge, 1999; Cancilla et al., 1972). Ce sont des cellules musculaires lisses, mais cependant différentes des cellules musculaires lisses entourant les vaisseaux sanguins de plus gros diamètre. Elles sont moins nombreuses que les astrocytes. Cependant l'existence d'une fonction contractile n'a pas encore été démontrée *in vivo* (Baodo et Pardridge, 1994). Elles pourraient par contre être impliqués dans la réponse immunitaire (Fabry et al., 1993).

1.3.2 P-glycoprotéine

Différents systèmes de transport sont présents au niveau des cellules endothéliales cérébrales. Des systèmes d'efflux sont également présents et sont essentiels à la fonction barrière des cellules endothéliales du système nerveux central. La P-glycoprotéine, qui est un exemple d'un tel transporteur, est une protéine membranaire responsable du phénomène de la résistance pléiotropique aux médicaments, appelée résistance multidrogue (RMD) (Ambudkar et al., 2003; Juliano et Ling, 1976). Elle

est exprimée par les cellules endothéliales (Demeule et al., 2001) et se trouve au niveau de la membrane luminale de ces cellules (Beaulieu et al., 1997). Elle agit en expulsant différents substrats dont des agents chimiothérapeutiques avant qu'ils n'atteignent un niveau cytotoxique (Gottesman et Pastan, 1993). De plus, la chimiothérapie peut induire son expression et ainsi entraîner une résistance à large spectre de médicaments. Il a été démontré que l'accumulation des médicaments était plus élevée dans le cerveau de souris *mdr1a* (-/-) (le gène qui code la P-gp chez les souris) par rapport aux souris de type sauvage (Schinkel et al., 1994).

Des études récentes ont démontré que la P-gp est bien présente dans les gliomes de haut grade ainsi que dans leurs cellules endothéliales (Sawada et al., 1999). De plus, la quantité de P-gp exprimée dans les tumeurs cérébrales primaires équivaut à la quantité de P-gp que l'on retrouve habituellement dans du tissu cérébral sain (Demeule et al., 2001). Ces résultats suggèrent que les tumeurs cérébrales retiennent une caractéristique importante de la BHE permettant ainsi de limiter l'entrée des agents de chimiothérapie au cerveau. Malgré l'apparence d'une BHE non fonctionnelle secondaire à une augmentation de la perméabilité microvasculaire visualisée en imagerie par de l'œdème cérébral, les glioblastomes conservent, assez étonnamment, leur cytoarchitecture de la barrière hémato-encéphalique avec peu de fenestrations au niveau de leurs cellules endothéliales (Régina et al., 2001; Shibata, 1989). Donc, les tumeurs cérébrales primaires comme le parenchyme normal possède une BHE intacte rendant difficile l'entrée des médicaments aux régions du cerveau infiltrées par des cellules néoplasiques.

1.3.3 La P-gp comme nouvelle cible thérapeutique

L'efficacité de la chimiothérapie est donc très probablement limitée par le phénotype de résistance multidrogues (RMD) de la cellule endothéliale. Le développement d'inhibiteurs de la P-gp dans le but de renverser ce phénotype a été étudié de façon extensive, mais avec peu de résultats encourageants. L'utilisation de la première génération d'agents (cyclosporine, verapamil) était limitée par leur toxicité. Les

agents de deuxième génération (valsopodar, biricodar) étaient mieux tolérés (Thomas et Coley, 2003). Par contre, cette deuxième génération d'inhibiteurs présentait des interactions pharmacocinétiques imprévisibles quand elle était co-administrée avec d'autres agents de chimiothérapie. La troisième génération, incluant le tariquidar (XR9576), le zosuquidar (R101933) et le ONT-093, a une grande spécificité pour la P-gp. Actuellement, des études cliniques sont en cours pour évaluer la contribution de ces médicaments en tant qu'inhibiteurs de la P-gp.

1.3.4 Angiogenèse

L'angiogenèse est un processus de formation de nouveaux vaisseaux à partir des vaisseaux pré-existants. Il est bien reconnu que la croissance et la formation de métastases à distance des tumeurs solides dépendent de l'angiogenèse (Fidler et Ellis, 1994; Folkman, 1990). Les tumeurs de 1 à 2 mm de diamètre peuvent recevoir leurs nutriments par diffusion, leur croissance ultérieure dépend par contre totalement de la formation de nouveaux vaisseaux (Bussolino et al., 1998). Ce processus qui permet aux tumeurs de croître est divisé au niveau de la cellule endothéliale en quatre étapes : 1) dégradation de la matrice, 2) migration des cellules endothéliales dans la matrice, 3) prolifération, 4) formation de nouvelles structures microvasculaires.

L'angiogenèse est stimulée par des facteurs angiogéniques tel le VEGF (facteur de croissance endothélial vasculaire) et FGF (facteur de croissance des fibroblastes) (Ferrara, 1999; Klagsbrun et D'Amore, 1996). Une des réponses à ce stimulus est une dégradation de la membrane basale de la cellule endothéliale par des protéases de la famille des métalloprotéinases de la matrice extracellulaire (MMPs) et du système activateur plasminogène/plasmine. Les MMPs dégradent le collagène et d'autres composantes de la matrice extracellulaire, permettant aux cellules endothéliales de migrer de leur vaisseau pré-existant vers le stimulus angiogénique (Moses, 1997). Plusieurs de ces MMPs sont impliquées dans l'angiogenèse, dont la MMP-2 et la MMP-9. Ces enzymes sont initialement sécrétées comme des proenzymes et doivent être clivées pour devenir fonctionnelles. En général, l'activation de ces MMPs est

transmise par une série de protéases solubles comme la plasmine, sauf pour la MMP-2 (Forget et al., 1999; Nagase, 1997). Son activation dépend d'une autre molécule de la famille des MMPs, la MT1-MMP qui est membranaire (Fillmore et al., 2001; Okada et al., 1990). Le système plasminogène inclut plusieurs entités : (a) le plasminogène, la proforme inactive qui est composée de la plasmine (la forme active), de l'angiostatine et du domaine Kringle-5 (deux domaines inhibiteurs) (b) les activateurs du plasminogène de type urokinase (uPA) ou tissulaire (tPA), deux protéinases qui convertissent le plasminogène en plasmine (c) les récepteurs, dont l'uPAR et (d) les inhibiteurs de l'activateur du plasminogène types 1 et 2 (PAI-1 et PAI-2) (Plow et al., 1995).

Les intégrines, des molécules d'adhésion cellulaire, contribuent à la migration des cellules endothéliales par des interactions cellulaires avec la matrice extracellulaire. Il s'agit de récepteurs cellulaires qui reconnaissent les éléments de la matrice extracellulaire telle la fibronectine (Eliceiri et Cheresh, 1998). Une induction de l'expression d'intégrines se fait à la suite d'une exposition soutenue à des stimulants angiogéniques comme le VEGF.

Après la migration et la prolifération, les cellules endothéliales forment des structures tubulaires avec une lumière perméable. La formation de la lumière vasculaire dépend d'une glycoprotéine d'adhésion, la E-selectine. Elle permet l'adhésion des cellules endothéliales entre elles (Nguyen et al., 1992). L'étape finale consiste en la maturation de ces vaisseaux sanguins. Il s'agit du recrutement des cellules mésenchymateuses et de leur différenciation subséquente en cellules de muscle lisse pour stabiliser les vaisseaux nouvellement formés. Le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) est un facteur important dans le recrutement des cellules mésenchymateuses et la stabilisation de ces vaisseaux sanguins (Benjamin et al., 1998).

1.3.5 L'angiogenèse comme cible thérapeutique

Une fois que le processus de l'angiogenèse a été décrit, des efforts ont été déployés pour en trouver des inhibiteurs comme nouveaux traitements tumoraux (Westphal et al., 2000; Folkman, 1971). D'un point de vue théorique, l'approche antiangiogénique démontre plusieurs avantages par rapport aux traitements anti-cancéreux conventionnels (Westphal et al., 2000). Dans plusieurs tumeurs solides, la pression interstitielle est importante, de façon à empêcher l'entrée des agents chimiothérapeutiques dans le compartiment tumoral. Par contre, les cibles des molécules antiangiogéniques sont dans la lumière du vaisseau et n'ont pas cette barrière à franchir (Jain, 1987). De plus, les cellules endothéliales n'ayant pas d'instabilité génétique comme les cellules tumorales, une résistance induite par le traitement ne risque pas de se développer (Kerbel, 1997). Finalement, les effets secondaires des médicaments antiangiogéniques sont minimes, car en temps normal, l'angiogenèse ne se produit quasiment pas dans l'organisme adulte (Westphal et al., 2000). En fait, l'angiogenèse est seulement limitée au système de reproduction. Elle est essentielle afin d'assurer la croissance et la maturation de l'ovaire (Tamanini et De Ambrogi, 2004).

Plus de 49 molécules antiangiogéniques sont en étude clinique actuellement. Plusieurs inhibiteurs naturels de l'angiogenèse ont été isolés, telle l'angiostatine. Dérivée du plasminogène, cette molécule est souvent produite par des tumeurs dormantes afin de contrôler leur croissance et leur prolifération. Les cellules ne sécrèteraient pas directement de l'angiostatine, mais plutôt les activateurs du plasminogène entreraient en contact avec le plasminogène pour produire de l'angiostatine (Holmgren et al., 1995, O'Reilly et al., 1994). Un autre exemple d'un inhibiteur naturel est la thrombospondine-1 (TSP-1). Son expression est inversement proportionnelle à l'activité de l'angiogenèse (Dameron et al., 1994). Par exemple, TSP-1 est supprimée pendant la tumorigenèse au moment d'une activité surélevée d'angiogenèse (Rastinejad et al., 1989). L'endostatine, un fragment du collagène XVIII, est un autre exemple. Elle inhibe spécifiquement la prolifération des cellules endothéliales capillaires *in vitro* et la croissance tumorale primaire et métastatique *in*

in vivo (Dhanabel et al., 1999; Bergers et al., 1999; O'Reilly et al., 1997). D'autres inhibiteurs endogènes ont été décrits : le fragment kringle 5 dérivé du plasminogène (Cao et al., 1997), la canstatine (Kamphaus et al., 2000), la tumastatine (Maeshima et al., 2000), des fragments dérivés de la fibronectine (Yi et Ruaslahti, 2001), de la prolactine (Clapp et al., 1993), de la MMP-2 (Brooks et al., 1998) et la calréticuline (Pike et al., 1998). De plus, d'autres inhibiteurs ont été développés, dont les anti-VEGF, dans le but de diminuer la densité vasculaire et le taux de croissance de plusieurs tumeurs (Kim et al., 1993). Il existe également des inhibiteurs des MMPs (TIMPs) qui ont été démontrés comme inhibiteurs efficaces de l'angiogenèse tumorale et embryonnaire *in vivo* (Moses et al., 1990). Ces études ont amené le développement de plusieurs inhibiteurs synthétiques des MMPs (Klagsbrun et Moses, 1999). Également, des molécules spécifiques contre la migration cellulaire ont été développées. Par exemple, le Taxol agit en inhibant différents composés du cytosquelette (Terzis et al., 1997). De plus, il existe des anticorps dirigés contre l'intégrine et différentes composantes de la matrice extracellulaire (Fukushima et al., 1998), et des thérapies géniques avec des virus sont actuellement en cours d'étude, dans le but de neutraliser la migration cellulaire (Bansal et Engelhard, 2000).

1.4 Polyphénols du thé vert

Différents composés antiangiogéniques naturels ont été mis en évidence, parmi lesquels les polyphénols du thé vert. Le thé vert est l'une des boissons les plus anciennes et, elle est la plus consommée au monde après l'eau. De plus en plus de pharmaciens, chimistes, médecins et nutritionnistes commencent à reconnaître les effets bénéfiques d'une consommation quotidienne de thé vert. Plus particulièrement, le thé vert a la possibilité d'agir comme un agent anticancéreux (Fujiki, 1999; Stoner et Mukhtar, 1995). Comme pour plusieurs maladies chroniques, l'environnement est responsable en grande partie des étiologies du cancer. Les exemples sont nombreux : la fumée des cigarettes, l'alcool et les déchets industriels. L'intervention apportée par la diète pourrait influencer le métabolisme de ces

carcinogènes ingérés quotidiennement. Dans cette optique, la nutraceutique (l'effet thérapeutique de certains aliments), et plus particulièrement le thé vert, pourrait devenir un atout important dans le combat contre le cancer.

Les bienfaits du thé vert rapportés dans la littérature sont nombreux. Par exemple, chez les japonaises atteintes du cancer du sein, une consommation accrue de thé vert a été associée à une diminution significative de la taille des nodules lymphatiques axillaires (Nakachi et al., 1998). Des études épidémiologiques ont également soulevé plusieurs points intéressants. Une des indications du bienfait du thé vert est la différence entre le taux de cancer entre les japonais et les occidentaux (McCulloch et al., 1995). Mais il est difficile de concevoir des bonnes études épidémiologiques assez concluantes, car il existe beaucoup de facteurs difficiles à contrôler, dont les caractéristiques démographiques, le travail, l'histoire médicale et familiale, les habitudes de vie, les différents modes de préparation du thé en fonction des régions, etc. (Setiawan et al., 2001; Inoue et al., 1998).

Le thé vert est varié en contenu. Il contient de la caféine (2-4%), des acides aminés (4%), des acides organiques (1,5%), des protéines (15%), de la chlorophylle (0,5%), et des polyphénols (25 à 35%) (Balentine et al., 1997; Hara et al., 1995). Parmi les polyphénols, le gallate d'épigallocatechine (EGCG) et l'épigallocatechine (EGC) sont les plus importants. Il est estimé qu'un verre de thé vert contient environ 10 à 30 mg d'EGCG (Demeule et al., 2002).

Alors, les études épidémiologiques orientent vers un effet bénéfique du thé vert. Des études plus poussées, à savoir si les polyphénols modifient la physiologie cellulaire qui est nécessaire à la croissance tumorale, la réplication cellulaire, l'invasion tissulaire et l'angiogenèse, ont été réalisées (Hanahan et Weinberg, 2000) et sont discutées ci-dessous.

1.4.1 Propriétés antitumorales des polyphénols

Plusieurs agents causant le cancer, tels les radiations ionisantes, la lumière ultraviolette, la fumée, l'ozone et les oxydes nitriques dans l'air pollué, induisent des mutations de l'ADN (Bondy et al., 2001). Plus spécifiquement, ce sont les radicaux libres induits par ces agents qui causent les dommages cellulaires. Les polyphénols ont justement une activité antioxydante importante (Mitscher et al., 1997). De façon plus spécifique, la partie acide gallique de la molécule agit comme chélateur de O_2^- , HO^- , et ROO^- (Lin et al., 2000; Guo et al., 1999). Dans le plasma humain, la quantité d'antioxydants augmente en fonction de la consommation de thé vert (Sung et al., 2000). D'autres études, *in vitro*, ont démontré que les catéchines corrigent le dommage créé par les radicaux libres sur l'ADN (Anderson et al., 2001; Elattar et Virji, 2000).

Les polyphénols agissent également comme substrat de la P-gp. Des expériences de photoaffinité utilisant le [125I]-iodoaryl azidoprazosin (IAAP), un substrat de P-gp, ont démontré que les polyphénols compétitionnent avec l'IAAP pour les sites de P-gp. En effet, quand la concentration de polyphénols augmente, la captation de IAAP par photoaffinité diminue et témoigne de cette compétition. De plus, les polyphénols inhibent l'efflux de la rhodamine 123 (un autre substrat de la P-gp) et augmente son accumulation dans les cellules ovariennes d'hamster chinois résistantes aux drogues (CH(R)C5) (Jodoin et al., 2002). Certains polyphénols inhibent la croissance cellulaire. Il a été observé que lors d'un traitement de la souche cellulaire CH(R)C5 avec du EGCG combiné à un traitement à la vinblastine, l'effet de la vinblastine était potentialisé. Donc, en inhibant la P-gp, l'EGCG potentialise l'accumulation de la vinblastine dans la cellule et augmente ainsi sa toxicité (Jodoin et al., 2002). De cette manière, les polyphénols du thé vert pourraient augmenter l'effet thérapeutique des agents chimiothérapeutiques, en augmentant leur concentration intracellulaire tout en inhibant la P-gp.

Des études *in vitro* ont montré que le thé vert possède des propriétés antiangiogéniques. Ceci a été observé lorsque les polyphénols bloquaient la

formation de néovaisseaux chez l'embryon de poulet (Cao et Cao, 1999). L'ajout de petites concentrations physiologiques (0,01 à 1 μ M) de polyphénols inhibe la phosphorylation des récepteurs du VEGF (VEGFR-2) (Lamy et al., 2002). L'effet du thé vert était très rapide avec une inhibition maximale après juste 30 minutes. De plus, l'inhibition du VEGFR-2 induite par les polyphénols est comparable à celle du Semaxanib (SU5416), un antagoniste spécifique du VEGFR, actuellement en développement pour traiter les tumeurs solides. Toujours dans la même optique, l'effet des catéchines du thé vert sur la VEGFR a été également observé sur la formation de structures capillaires par des cellules endothéliales en matrigel (une membrane basale riche en laminine). Dans ces conditions expérimentales, les polyphénols ont inhibé fortement la formation d'une structure tubulaire par les cellules endothéliales (Lamy et al., 2002). Puisqu'il y a des preuves assez convaincantes que l'inhibition du VEGFR-2 induit un arrêt dans la formation des vaisseaux sanguins, on pourra spéculer que les catéchines inhibent la formation des capillaires en bloquant l'activité du VEGFR-2.

Il a été décrit récemment que les collagénases des cellules cancéreuses du poumon de souris sont inhibées en présence des catéchines du thé vert et des théaflavines du thé noir (Sazuka et al., 1997). L'investigation a été poussée plus loin avec des produits naturels comme les polyphénols, le resveratrol et le génistéine, les composants organosulfurés de l'ail. Leur effet sur les MMPs a été mesuré. Les catéchines du thé vert avaient inhibé de façon la plus importante ces enzymes (Shapiro et Senior, 1998). De plus, les MT1-MMPs (les MMP membranaires responsables de l'activation des MMP-2) sont affectées par la présence des polyphénols du thé vert. On avait déjà rapporté que les polyphénols inhibaient l'activation des pro-MMP-2 dans les cellules des glioblastomes et les cellules COS-7 transfectées avec MT1-MMP (Demeule et al., 2000; Annabi et al., 2001). Il fut démontré par la suite que les polyphénols interfèrent avec l'activation des pro-MMP-2 à travers une régulation intracellulaire de l'expression du gène des MT1-MMP. Ceci implique qu'il existe un mécanisme de régulation de la transcription des MT1-MMP qui reste à être identifié et qui sera impliqué dans l'effet inhibiteur de l'EGCG (Annabi et al., 2002).

Ainsi, des études épidémiologiques et de laboratoire démontrent une association inverse entre la consommation du thé vert et le développement de plusieurs types de cancer. Plusieurs activités biologiques qui sont impliquées dans la carcinogénèse semblent être affectées par les polyphénols du thé vert (Demeule et al., 2002).

1.5 But de la recherche

1.5.1 Le modèle utilisé

Dans la continuité de ces résultats obtenus *in vitro*, notre objectif était d'évaluer l'efficacité antitumorale des polyphénols du thé vert dans des modèles de tumeurs cérébrales *in vivo*. Les glioblastomes sont les plus communes des tumeurs malignes cérébrales pour lesquelles aucun traitement n'est disponible actuellement. La réalisation de ce projet s'est faite à l'aide d'un modèle orthotopique murin de glioblastome. Les implantations intracérébrales ont été réalisées par stéréotaxie. Le modèle utilisé (la souche cellulaire CNS-1) permet des études crédibles car la lignée cellulaire est syngénique pour la souche de rat Lewis. De plus, cette lignée présente des caractéristiques très similaires au glioblastome humain. Premièrement, elle exprime une grande malignité ; la survie moyenne des rats injectés avec 10^5 cellules est de 20,5 à 30 jours. Deuxièmement, elle infiltre le parenchyme, les leptoméninges, la région périvasculaire et périventriculaire de façon similaire qu'un glioblastome humain. Troisièmement, elle exprime des marqueurs histochimiques qu'on retrouve dans le glioblastome : la protéine gliale fibrillaire acide, la protéine S100, la vimentine, la molécule d'adhésion cellulaire neuronale (NCAM) et le récepteur de l'acide rétinoïque (Kruse et al., 1994).

1.5.2 Étude comparative

Pour évaluer l'efficacité des polyphénols contre la croissance tumorale *in vivo* et comparer avec la seule modalité thérapeutique qui est actuellement reconnue efficace

(la radiothérapie), des implantations intracérébrales des cellules gliales CNS-1 ont été réalisées chez le rat. Les rats étaient divisés en 4 groupes : témoin, gavés aux polyphénols, irradiés et, finalement, irradiés et gavés aux polyphénols. Une fois les données *in vivo* obtenues, ces résultats ont été comparés à des études faites sur des lignées cellulaires endothéliales et tumorales *in vitro* ayant reçu les mêmes modalités de traitement que les rats.

1.5.3 Les cibles choisies

Dans cette étude, nous avons choisi d'examiner l'effet des polyphénols et de la radiothérapie sur les cibles suivantes : la P-gp dans le contexte de la BHE, l'angiostatine et les MMPs dans l'angiogenèse. De plus, des résultats intéressants ont été obtenus à propos de la cavéoline. Il s'agit de la protéine majeure de structure des cavéoles, qui sont des microdomaines membranaires. Elles sont impliquées dans la transduction du signal, le triage des protéines et des lipides, l'endocytose et la pinocytose.

CHAPITRE II MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Matériel

Les rats mâles Lewis pesant 200 à 300 g provenaient de Charles River (St-Constant, QC). Les polyphénols du thé vert ont été obtenus des laboratoires LKT (St-Paul, MN, É-U). La lignée cellulaire de gliome murin (CNS-1) a été fournie par le Dr W. F. Hickey (Hanover, NH, É-U). La lignée de cellules endothéliales immortalisées de cerveau de rat (RBE4) a été obtenue du Dr. F. Roux (Roux et al., 1994). La lignée de cellules BBCE (cellule endothéliale microvasculaire cérébrale bovine) a été fournie par le Dr Cechelli (Lille, France). L'appareil de cadre stéréotaxie a été acheté de Stoelting Xymotec Biosystems (North York, ON, Canada). La collagénase A a été obtenue de Roche Diagnostics (Laval, QC). Les microbilles magnétiques MACS couplées à un anti-IgG1 de souris, les colonnes de séparation et l'aimant étaient de Miltenyi Biotec (Auburn, CA). L'anticorps de souris anti-PECAM-1, lié aux microbilles, provenait des Laboratoire Cedarlane (Hornby, ON, Canada), tandis que les anticorps de chèvre anti-PECAM-1 utilisés dans l'analyse de transfert western provenaient de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, É-U). L'anticorps C219 dirigé contre la P-gp provenait de ID Labs (London, ON). Les anticorps contre la synthase de l'oxide nitrique endothéliale (eNOS) et la cavéoline ont été achetés de Transduction Laboratories (Lexington, KY). L'anticorps monoclonal contre l'angiostatine a été obtenu de Biodesign International (Saco, Maine). L'anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à la peroxydase de raifort a été acheté chez

Jackson Immuno Research Laboratories (West Grove, PA). Les produits utilisés pour les électrophorèses venaient de chez BioRad (Mississauga, ON). La solution pour l'obtention du signal de chimioluminescence (ECL) venait de chez Amersham-Pharmacia Biotech (Baie d'Urfée, QC). Les autres réactifs ont été commandés de chez Sigma Chemicals (Oakville, ON, Canada).

2.2. Méthodes

2.2.1 Préparation de la lignée cellulaire CNS-1 en vue de l'implantation cérébrale

Les cellules CNS-1 ont été cultivées en présence de milieu RPMI 1640 avec 10% de sérum de veau fœtal comme supplément. Après 4 jours de culture, les cellules ont été trypsinisées, dissociées, comptées, centrifugées et resuspendues dans un milieu sans sérum, à la concentration désirée.

2.2.2 Inoculation stéréotaxique et groupes d'étude

Des rats ont été injectés avec la lignée CNS-1 en intracrânien et séparés en 4 groupes : 1) témoin ou gavé au salin, 2) gavé aux polyphénols, 3) irradié, 4) irradié et gavé aux polyphénols. L'inoculation se faisait avec les rats anesthésiés avec de la xylazine (7mg/kg) et de la kétamine (87mg/kg), puis placés dans le cadre stéréotaxique. Selon les coordonnées stéréotaxiques du noyau caudé (3mm en latéral de la ligne médiane, 2mm en antérieur du Bregma), un trou de trépan a été pratiqué, puis 50 000 cellules CNS-1 dans 5 μ l, ont été inoculées à 4mm sous la surface dans le noyau caudé en utilisant une microseringue (durée d'injection 1 min et seringue retirée après 5 min). Finalement, la plaie a été fermée avec des points de suture.

Les gavages ont débuté 7 jours avant l'inoculation, aux concentrations indiquées ci-dessous, et une dose de radiothérapie de 15 Gy a été administrée 5 jours après l'inoculation. Les groupes étaient constitués de 7 rats (Tableau II.I).

Groupe	Traitement	Concentrations	Début du traitement	Objectifs finaux	Nombre D'animaux
1	Saline	2 ml de saline 2 fois/jour	7 jours avant l'implantation	Examen histopathologique	2
				Isolation cellules endothéliales	5
2	Saline	2 ml de saline 2 fois/jour	7 jours avant l'implantation	Examen histopathologique	2
	Radiothérapie	15 Gy	5 jours après l'implantation	Isolation cellules endothéliales	5
3	Polyphénols	15 mg dans eau 2 fois/jour	7 jours avant l'implantation	Examen histopathologique	2
				Isolation cellules endothéliales	5
4	Polyphénols	15 mg dans eau 2 fois/jour	7 jours avant l'implantation	Examen histopathologique	2
	Radiothérapie	15 Gy	5 jours après l'implantation	Isolation cellules endothéliales	5

Tableau II.1 Protocole utilisé dans chaque groupe

Le protocole des expériences réalisées sur les animaux a été approuvé par le Comité institutionnel de protection des animaux de l'UQAM. Quinze jours après l'implantation, un tableau d'observation fut rempli quotidiennement, rendant compte de l'état d'éveil, de l'apparence (hygiène pauvre, sécrétions nasales et oculaires, dilatation pupillaire, peu de déplacement, état moribond) et du poids corporel des animaux. Avec ce tableau, un pointage a été obtenu tous les jours. Les rats étaient sacrifiés en fonction des points limites fixés par le Conseil canadien de protection des animaux.

Au moment du sacrifice, 2 rats de chaque groupe ont été utilisés pour un examen histopathologique et les 5 autres pour obtenir des homogénats de tumeurs cérébrales et pour isoler des cellules endothéliales.

2.2.3 Culture des RBE4 et études in vitro

Les cellules immortalisées de l'endothélium des microvaisseaux du cerveau de rats ont été cultivées sur des plaques contenant une mince couche de collagène I (2 mg/ml) de queue de rats et maintenues avec du milieu α -MEM/Ham's F-10 supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur, 2 mM de glutamine, 300 μ g/ml de généticine (G418) et 1 ng/ml de bFGF. Les cellules RBE4 ont été cultivées jusqu'au 4^e jour de confluence. Par la suite, elles ont été :

1) Divisées en différents groupes de traitement : témoin, irradié, polyphénols, polyphénols et irradiés. Les cellules des groupes polyphénols ont été incubées avec des polyphénols (1 μ M) en présence de sérum et les cellules des groupes irradiés ont reçu une dose de 3 Gy. Vingt-quatre heures après les traitements, les cellules ont été analysées.

2) Traitées avec des concentrations croissantes de polyphénols : 0 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M et 5 μ M

3) Placées dans un milieu sans sérum, puis mises en condition d'hypoxie dans une boîte anaérobie où le niveau d'oxygène était maintenu à 1% O₂ avec un contrôleur de P100x modèle 110, le mélange des gaz résiduels étant composé de 5% CO₂ et 94% N₂.

4) Placées dans un milieu sans sérum contenant 10 ng/ml de VEGF ou 5 ng/ml de bFGF ou 1 :1 de milieu conditionné de cellules CNS-1 pendant 24 heures.

2.2.4 Culture BBCE et études in vitro

Les cellules endothéliales des microvaisseaux cérébraux bovins (BBCE) ont été cultivées en présence de milieu Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) supplémenté avec 10% (v/v) de sérum de veau fœtal, 10% (v/v) de sérum de cheval (Hyclone Laboratories, Logan), 2 mM de glutamine, 50 μ g/ml de gentamycine et 1 ng/ml de bFGF à tous les deux jours (Méresse et al 1989). Les cellules BBCE ont été cultivées

jusqu'au 4^e jour de confluence, puis divisées en 4 groupes et ont ensuite reçu des concentrations croissantes de polyphénols : 0 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M.

2.2.5 Préparation des homogénats de tumeurs

Après le sacrifice des rats, la tumeur de chaque rat a été disséquée du reste du parenchyme cérébral sain. Par la suite, les tumeurs ont été placées dans un tampon physiologique (Ringer) (147 mM NaCl, 4 mM KCl, 3 mM CaCl₂. H₂O, 1,2 mM MgCl₂, 5 mM glucose, 15 mM HEPES, pH 7,4) et homogénéisées à l'aide d'un polytron (Brinkman Instruments, Rexdale, ON) durant 20 secondes.

2.2.6 Isolement des cellules endothéliales

L'autre partie du culot a ensuite été resuspendue dans de la collagénase A (1 mg/ml), et incubée avec agitation pendant 45 min à 37°C. La suspension cellulaire a été filtrée sur un filtre de Nitex de 180 μ m de porosité, à l'aide d'une tige de verre, puis le filtrat a été filtré une seconde fois sur un filtre de Nitex de 30 μ m de porosité. Finalement, la suspension cellulaire a été lavée en effectuant 4 centrifugations de 10 minutes à 600 g et en resuspendant le culot final dans 10 ml de PBS contenant 0,5 % de BSA et 2 mM d'EDTA .

Un volume de 10 μ l d'anticorps dirigés contre PECAM-1 de rat a été incubé avec 100 μ l de microbilles magnétiques couplées à des anti-IgG de souris durant 1 heure à 4°C. Les microbilles qui ont lié l'anticorps ont ensuite été isolées en les passant sur une colonne de séparation placée dans un aimant. La colonne a été rincée 3 fois avec 3 ml de PBS contenant 0,5% de BSA et 2 mM d'EDTA, puis les microbilles retenues dans la colonne ont été éluées dans 3 ml de PBS, 0,5% de BSA, 2 mM d'EDTA, en exerçant une pression sur le dessus de la colonne (figure 2.1). Les billes ont ensuite été incubées durant 45 minutes à 4°C avec la suspension cellulaire. La suspension cellulaire a ensuite été centrifugée pendant 10 minutes à 600 g, puis les cellules

endothéliales ont été sélectionnées en passant la suspension cellulaire sur une colonne magnétique, tel que décrit pour les microbilles. Les cellules endothéliales ont été éluées dans 3 ml de PBS contenant 0,5% de BSA, et 2 mM d'EDTA. Les cellules endothéliales ont été lavées en les centrifugeant 2 fois à 600 g durant 10 minutes et en les resuspendant dans 5 ml de PBS. Finalement, le surnageant fut retiré et les cellules ont été congelées à -80°C .

Incubation des cellules avec des microbilles magnétiques couplées à un α -PECAM-1 via un anticorps secondaire



Passage de la suspension cellulaire sur la colonne et rétention des cellules endothéliales liées aux billes



Lavages de la colonne



Élution des cellules endothéliales

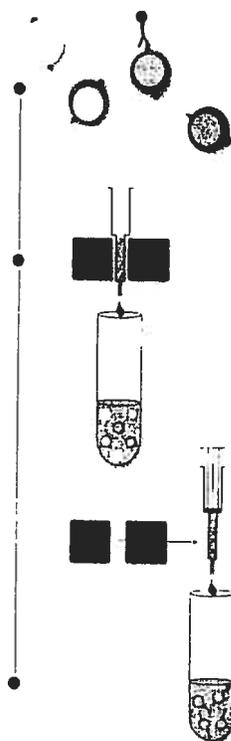


Figure 2.1. Schéma présentant la méthode d'isolement des cellules endothéliales à l'aide de microbilles magnétiques couplées à un anticorps dirigé contre la protéine de surface PECAM-1.

2.2.7 Dosage des protéines

La quantité de protéines contenues dans les différents échantillons a été mesurée par la méthode de microBCA (Pierce, Rockford, IL), en utilisant de l'albumine sérique bovine (BSA) comme standard. Un microlitre d'échantillon à doser a été dilué dans 1 ml d'eau, puis 1 ml de réactif de microBCA a été ajouté. Ces échantillons ont été chauffés à 60°C durant une heure et la densité optique a été mesurée à 562 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Hitachi, San Jose, CA).

2.2.8 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide et immunobuvardage

La méthode de Laemmli (1970) modifiée a été utilisée pour les analyses électrophorétiques (*SDS-PAGE pour sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). Les échantillons resuspendus à une concentration de 1 µg/µl dans un tampon de Laemmli (62,5 mM Tris/HCl pH 6,8, 10% de glycérol, 2% de SDS, 5% β-mercaptoéthanol et 0,00625% bleu de bromophénol) et chauffés ou non pendant 10 minutes à 100°C, ont été déposés sur des gels de polyacrylamide. Les gels de séparation utilisés contenaient 12,5% (p/v) d'acrylamide, 0,3% (p/v) de N,N-méthylène-bis-acrylamide ou 7,5% (p/v) d'acrylamide, 0,2% (p/v) de N,N-méthylène-bis-acrylamide, ainsi que 0,375 M de Tris/HCl pH 8,8, 0,1% de SDS 1 µl/ml de N,N,N',N'-tétraméthylènediamine (TEMED) et 0,5 mg/ml de persulfate d'ammonium. Les gels d'entassement contenaient 3,8% (p/v) d'acrylamide, 0,1% (p/v) de N,N-méthylène-bis-acrylamide, 0,125 M de Tris/HCl pH 6,8, 0,1% de SDS 1 µl/ml de N,N,N',N'-tétraméthylènediamine (TEMED) et 0,5 mg/ml de persulfate d'ammonium. La migration a été effectuée à 100 volts sur un système Mini-protean II (Bio-Rad, Mississauga, ON) dans un tampon d'électrodes composé de 192 mM glycine, 20 mM Tris et 0,1% SDS. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de difluorure de polyvinylidène (PVDF) de 0,45 µm de porosité pendant 1 heure 30 minutes à 80 mA par gel, dans un tampon de transfert contenant 96 mM de glycine, 10 mM de Tris et 10% de méthanol, à l'aide d'un appareil de transfert Milliblot Graphite Electrobloetter (Millipore, Mississauga, ON). Les membranes ont

été incubées pendant 17 heures à 4°C dans une solution de Tris salin (137 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7.5) contenant 0,1% de Tween 20 et 5% de lait en poudre, pour bloquer les sites non spécifiques. Par la suite, les membranes ont été lavées trois fois pendant 15 minutes avec la solution de Tris décrite ci-dessus, puis incubées avec agitation avec les anticorps dilués pendant une heure à température ambiante. Quatre lavages avec la même solution et les membranes ont par la suite été incubées avec l'anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à la peroxydase de raifort. Ensuite, après une dernière série de lavage, la détection a été révélée avec des réactifs ECL, selon les instructions du fabricant.

2.2.9 Analyse par zymographie

Environ 25 µg de protéines de chaque échantillon ont été dénaturées dans la solution de tampon Laemmli décrite ci-dessus, sans β-mercaptoéthanol. Les échantillons non chauffés ont été agités pendant 20 minutes à température ambiante. Par la suite, les échantillons ont été déposés sur un gel SDS d'acrylamide/bisacrylamide de 7,5% contenant 0,1% (w/v) de gélatine. Après électrophorèse à 100 Volts dans la même solution d'électrolytes, les gels ont été lavés 2 fois 30 minutes dans 2,5% de Triton X-100 et rincés 5 fois avec de l'eau nanopure. Par la suite, les gels contenant la gélatine ont été incubés à 37°C pendant 24 à 48 heures dans un tampon contenant 50 mM de Tris-HCl, 20 mM de NaCl, 5 mM de CaCl₂ et 0,02% de Brij-35, à pH 7,6. Dans les expériences de témoins, 1,10 de phénantroline (0,5 mM, la concentration finale) a été ajouté à la solution d'incubation. Après l'incubation, les gels ont été colorés au bleu de Coomassie à 0,1% dans 30 % de méthanol et 10% d'acide acétique pendant 1 heure, puis décolorés avec la même solution ne contenant pas de bleu.

CHAPITRE III RÉSULTATS

3.1 Courbe pondérale

L'état général des animaux était évalué quotidiennement en mesurant leur poids sur une période de 24 jours. En suivant la courbe de poids du groupe témoin (fig 3.1, p. 36), la moyenne des poids s'est accrue de façon progressive jusqu'au 24^e jour, de 308 g à 350 g. Le groupe des polyphénols a présenté une perte pondérale importante après le 20^e jour. Par contre, dans le groupe témoin, deux rats furent sacrifiés de façon précoce, à 18 jours, à cause d'une détérioration rapide de leur état général. Aucune détérioration dans le groupe des polyphénols n'a été notée à ce moment-là.

Il a été constaté également, d'après la figure 3.1 (p. 36), que la différence entre ceux qui ont subi la radiothérapie versus ceux qui n'en ont pas reçu est une perte pondérale après le cinquième jour (la journée du traitement), qui s'est maintenue pendant environ 5 ou 6 jours. Dans le groupe avec radiothérapie, cette perte pondérale était d'environ 8 g et dans le groupe radiothérapie avec polyphénols, elle était de 10 g. Après cette période transitoire de perte de poids, les rats, dans les 2 groupes, ont recommencé à reprendre du poids. Par contre, le groupe polyphénols avec radiothérapie a présenté une diminution du poids à partir du 20^e jour, comparable à celui des polyphénols.

3.2 Analyse histopathologique des tumeurs et caractérisation de la vascularisation en immunohistochimie

Un examen histopathologique a été réalisé sur les coupes de cerveau des rats colorées à l'hématoxyline-éosine. L'analyse a d'abord porté sur l'étude de l'apparence globale des tumeurs, et de leur type de développement en termes de caractéristiques d'invasion. Pour les tumeurs témoins, plusieurs des caractéristiques morphologiques observées se rapprochent des caractéristiques de croissance des glioblastomes multiformes chez l'humain. En effet, la présence de nécroses avec palissades, l'invasion périvasculaire et l'invasion du parenchyme par des cellules tumorales isolées est observable. Les tumeurs des rats ayant reçu une irradiation se caractérisent par une augmentation importante du centre nécrotique tumoral. Le traitement avec les polyphénols du thé vert ne semble pas induire de différence en terme de motif architectural des tumeurs, ou en terme d'aspect des cellules tumorales. Les tumeurs des rats ayant reçu la combinaison des deux traitements présentent un aspect similaire à celui des rats ayant reçu uniquement l'irradiation.

L'analyse du lit vasculaire des tumeurs a également été réalisée par immunohistochimie du facteur VIII, un marqueur des cellules endothéliales. Le marquage étant au niveau du cytoplasme des cellules endothéliales, il permet de visualiser la taille des cellules endothéliales. Les tumeurs témoins présentent une augmentation de la vascularisation en comparaison au parenchyme cérébral normal. Les cellules endothéliales tumorales montrent un marquage cytoplasmique abondant indiquant une forte activité mitotique. De plus, les capillaires tumoraux se caractérisent par la présence de cellules endothéliales hyperplasiques. Au niveau des tumeurs des rats irradiés, une augmentation de l'infiltration est observée à l'interface de la tumeur et du parenchyme normal. Dans cette zone, les cellules endothéliales sont nombreuses, le réseau de capillaires est bien défini et la migration tumorale périvasculaire semble plus importante que dans les tumeurs témoins (fig. 3.2, p. 37).

Le traitement aux polyphénols ne semble pas modifier l'aspect de la vascularisation des tumeurs en comparaison aux tumeurs témoins. Pour les tumeurs des rats ayant

reçu la combinaison des deux traitements, la présence de zones d'hyperprolifération vasculaire et d'invasion tumorale ne semble pas être modifiée par rapport aux tumeurs irradiées.

3.3 Isolement des cellules endothéliales

Après le sacrifice des rats, les tumeurs de chaque groupe ont été homogénéisées à l'aide d'un polytron. Une partie de chaque homogénat a été utilisée pour isoler des cellules endothéliales à l'aide de microbilles couplées à des anticorps dirigés contre la PECAM-1 (antigène spécifique aux cellules endothéliales), selon la méthode illustrée dans la figure 2.1 (p. 25). L'efficacité de l'isolement des cellules endothéliales était évaluée par électrophorèse des protéines en détectant l'expression de eNOS, un marqueur des cellules endothéliales dans la fraction isolée versus l'homogénat pur. La figure 3.3 (p. 38) démontre que dans les échantillons d'homogénats de tumeur, eNOS était non décelable. Par contre, l'expression d'eNOS était fortement enrichie dans la fraction finale obtenue par la méthode décrite ci-dessus. Ces résultats suggèrent que la fraction finale est composée en grande majorité de cellules endothéliales.

3.4 Mesure de l'activité enzymatique de la MMP-9 par zymographie dans l'homogénat de tissu tumoral et les cellules endothéliales isolées des groupes témoin, polyphénols, irradié et irradié avec polyphénols

L'activité enzymatique des MMPs a été évaluée en zymographie-gélatine. Les échantillons, contenant 25 µg de protéines d'homogénat de tissu tumoral et 5 µg de protéines de cellules endothéliales de chacun des quatre groupes, ont été déposés sur des gels d'acrylamide contenant de la gélatine. Après électrophorèse, incubation avec un tampon permettant l'activité enzymatique et coloration au bleu de Coomassie, les résultats de la figure 3.4 (p. 39) ont obtenus.

L'activité de la MMP-9 dans l'homogénat de tissu tumoral ne varie pas avec l'ajout de polyphénols. Par contre, l'ajout de la radiothérapie induit une activité accrue de la MMP-9. La combinaison de la radiothérapie et les polyphénols ne semble pas diminuer cette activité induite par la radiothérapie.

Comme dans l'homogénat de tumeur, les cellules endothéliales traitées aux polyphénols ont une activité enzymatique semblable à celle des témoins, et la radiothérapie semble induire une légère augmentation de cette activité. Par contre, l'ajout des polyphénols à la radiothérapie ramène l'activité au niveau témoin.

3.5 Mesure en zymographie de l'activité des MMPs dans des cellules RBE4 traitées ou non aux polyphénols, avec ou sans radiothérapie et dans des cellules RBE4 traitées uniquement avec des concentrations croissantes de polyphénols

Deux manipulations ont été effectuées après que les cellules RBE4 ont été cultivées jusqu'au 4^e jour de confluence. La première consistait à traiter ou non les RBE4 avec 1 μ M de polyphénols, avec ou sans irradiation de 3 Gy, et la deuxième à les traiter avec des concentrations croissantes de polyphénols : 0 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M, et 5 μ M. De la même manière, une zymographie-gélatine fut réalisée afin d'analyser l'activité enzymatique des MMPs pour chacun de ces traitements.

D'après la figure 3.5 (A) (p. 40), le traitement aux polyphénols n'influence pas l'activité de la MMP-9 ou de la MMP-2. Le traitement avec la radiothérapie ne cause pas de variation dans l'activité de la MMP-9 mais augmente l'activité de la MMP-2. Avec l'ajout des polyphénols à la radiothérapie, on note une diminution dans l'activité des MMP-2 et MMP-9.

La figure 3.5 (B) (p. 40) permet de mettre en évidence qu'à petites concentrations de polyphénols, 0,5 μ M et 1 μ M, peu d'effet sur l'activité de la MMP-9 et de la MMP-2 est noté. Par contre, à des concentrations élevées de polyphénols (5 μ M), une nette diminution de l'activité des MMPs est observée.

3.6 Détection de l'expression de la P-gp dans l'homogénat de tissu tumoral et les cellules endothéliales isolées des groupes témoin, polyphénols, irradié et irradié avec polyphénols

L'expression de la P-gp a été mesurée par migration électrophorétique et transfert de type western. Les échantillons utilisés contenaient 25 µg de protéines d'homogénat de tissu tumoral et 5 µg de protéines de cellules endothéliales isolées des quatre groupes. Après électrophorèse, transfert, incubation avec l'anticorps primaire et secondaire, les résultats suivants ont été obtenus (fig. 3.6, p. 41).

Dans l'homogénat, l'expression de la P-gp est faible dans les conditions témoins et de traitement aux polyphénols. Toutefois, la radiothérapie induit de façon importante l'expression de la P-gp. Cette augmentation est plus élevée avec la combinaison de radiothérapie avec les polyphénols.

De la même manière, l'expression de la P-gp dans les cellules endothéliales augmente avec le traitement aux polyphénols et de façon plus importante avec la radiothérapie. Cette augmentation est plus notable avec le traitement combiné de radiothérapie et polyphénols.

3.7 Détection de l'expression de la P-gp dans des cellules RBE4 traitées ou non aux polyphénols, avec ou sans radiothérapie et dans des cellules BBCE traitées avec des concentrations croissantes de polyphénols

L'expression de la P-gp a été mesurée par transfert de type western avec 5 µg de cellules RBE4 traitées ou non avec 1 µM de polyphénols, avec ou sans irradiation de 3 Gy. De la même manière, l'immunodétection de la P-gp a été réalisée avec des BBCE traitées avec des concentrations croissantes de polyphénols de 0 à 10 µM.

La figure 3.7 (A) (p. 42) montre que l'expression de la P-gp dans des cellules RBE4 est induite par la radiothérapie. Par contre, il n'y a pas eu de changement significatif avec le traitement aux polyphénols.

La figure 3.7 (B) (p. 42) démontre qu'un traitement aux polyphénols à des concentrations croissantes de 0 à 10 μ M entraîne une nette augmentation de l'expression de la P-gp dans les cellules BBCE.

3.8 Détection de l'expression de l'angiostatine dans l'homogénat de tissu tumoral et les cellules endothéliales isolées des groupes témoin, polyphénols, irradié et irradié avec polyphénols

La détection de l'expression de l'angiostatine a été effectuée par migration électrophorétique et transfert de type western. Vingt-cinq microgrammes d'homogénat de tissu tumoral et 5 μ g de cellules endothéliales isolées des quatre groupes ont également été utilisés comme échantillon. La détection obtenue est illustrée dans la figure 3.8 (p. 43).

Dans l'homogénat de tissu tumoral, la détection de l'angiostatine ne semble pas être influencée d'une manière ou d'une autre par un traitement avec la radiothérapie ou les polyphénols. La détection de l'angiostatine avec la combinaison de polyphénols et de radiothérapie est identique au témoin, mais semble plus forte que la radiothérapie ou polyphénols seul. Par contre, aucune détection de l'angiostatine n'a eu lieu avec les cellules endothéliales.

3.9 Détection de l'expression de la cavéoline-1 dans l'homogénat et les cellules endothéliales isolées de tissu sain versus tumoral

En utilisant la même méthode de transfert de type western, l'expression de la cavéoline-1 a été mesurée avec 25 μ g d'homogénat et 5 μ g de cellules endothéliales isolées de tissu sain versus tumoral .

La figure 3.9 (p. 44) permet de mettre en évidence que dans l'homogénat, la détection de la cavéoline est faible dans les deux conditions de tissu sain et tumoral, quoique légèrement plus accentuée dans le tissu sain.

En ce qui concerne l'expression de la cavéoline-1 des cellules endothéliales saines versus tumorales, il y a une diminution de l'expression de la cavéoline-1 dans les cellules endothéliales de la tumeur. Cette diminution est très nette, tel qu'illustré dans la figure 3.9 (p. 44).

3.10 Détection de l'expression des cavéolines-1 et -2 dans l'homogénat de tissu tumoral et les cellules endothéliales isolées des groupes témoin, polyphénols, irradié et irradié avec polyphénols

La mesure de l'expression des cavéolines-1 et -2 a été également réalisée par l'électrophorèse et transfert de type western, en utilisant 25 µg d'homogénat de tissu tumoral et 5 µg de cellules endothéliales isolées des quatre groupes.

Dans les homogénats du groupe témoin, la détection des cavéolines-1 et -2 est faible. Avec l'ajout de la radiothérapie et les polyphénols, l'expression des cavéolines-1 et -2 augmente avec un effet maximal quand les traitements de radiothérapie et polyphénols sont combinés (fig. 3.10, p. 45).

De façon identique, dans les cellules endothéliales, l'ajout de la radiothérapie seule entraîne une augmentation de l'expression des cavéolines-1 et -2 par rapport au témoin. Cette augmentation devient encore plus élevée quand les polyphénols sont ajoutés à la radiothérapie. Une augmentation des cavéolines-1 et -2 est constatée par rapport aux groupes polyphénols ou irradiation seuls (fig. 3.10, p. 45).

3.11 Détection de l'expression des cavéolines -1 et -2 dans des cellules RBE4 traitées ou non aux polyphénols, avec ou sans radiothérapie

Les niveaux d'expression des cavéolines -1 et -2 ont été mesurés par transfert de type western avec 5 µg de cellules de RBE4 traitées ou non avec 1 µM de polyphénols, avec ou sans radiothérapie de 3 Gy. L'expression des cavéolines-1 et -2 est augmentée nettement dans les RBE4 traitées avec des polyphénols ou avec de la radiothérapie (fig. 3.11, p. 46).

3.12 Détection de l'expression de la cavéoline-1 dans des cellules RBE4 traitées ou non avec du VEGF, du bFGF, en absence ou en présence de sérum; dans des conditions ou non d'hypoxie; en co-culture ou non avec des CNS-1

Après 4 jours de confluence, les RBE4 étaient placées soit dans des conditions avec sérum, soit dans des conditions sans sérum contenant 10 ng/ml de VEGF, 5 ng/ml de bFGF ou 1 :1 de milieu conditionné de cellules de CNS-1 pendant 24 heures. Aussi, certaines RBE4 étaient mises en condition d'hypoxie pendant 8 heures et 24 heures. Dans chacune de ces conditions, l'expression de la cavéoline-1 a été déterminée par migration électrophorétique et transfert de type western en utilisant 5 µg de cellules RBE4. La figure 3.12 (p. 47) met en évidence, dans des conditions où la prolifération cellulaire est augmentée, tel un milieu avec du VEGF, du bFGF, en hypoxie ou en co-culture avec les CNS-1, une diminution de l'expression de la cavéoline par rapport au témoin.

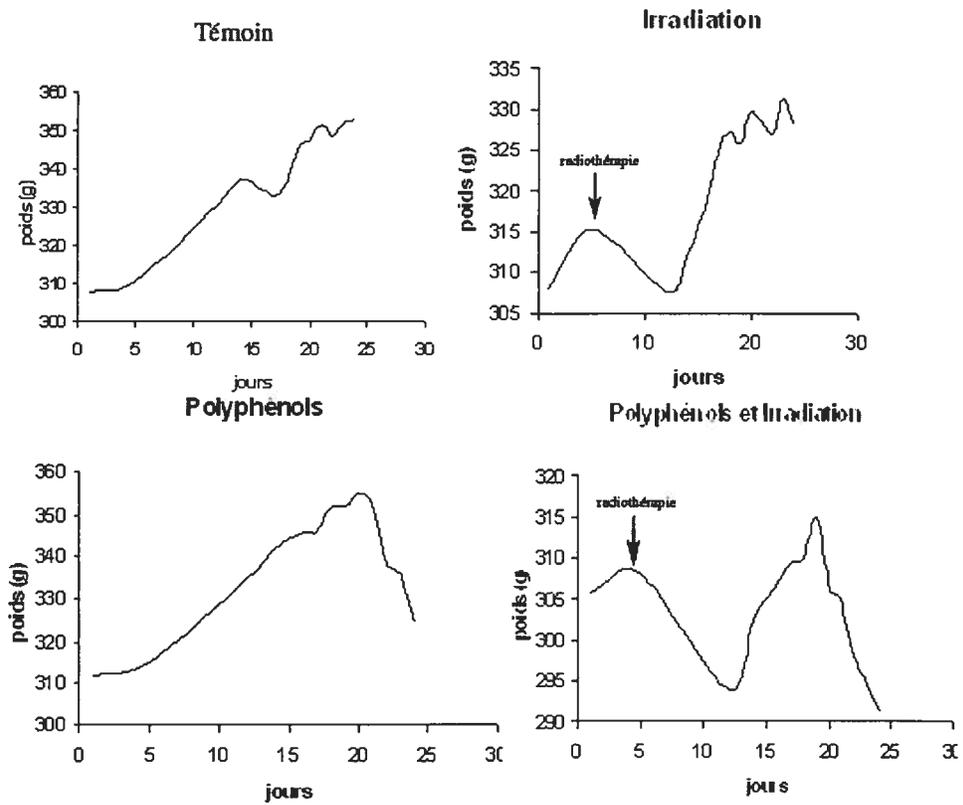
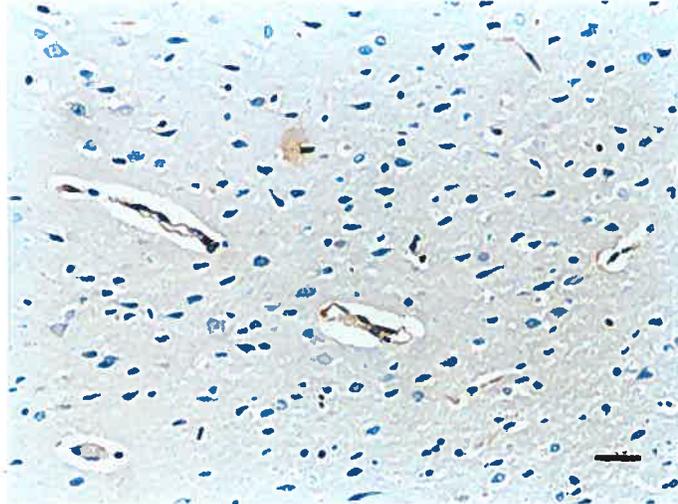


Figure 3.1 : Courbe pondérale (en g) des rats témoins, irradiés, traités aux polyphénols, et traités aux polyphénols et irradiés pendant une période de 24 jours. La radiothérapie a été administrée au 5^e jour après l'implantation (les flèches). Les gavages ont été débutés 7 jours avant l'implantation.

A

37

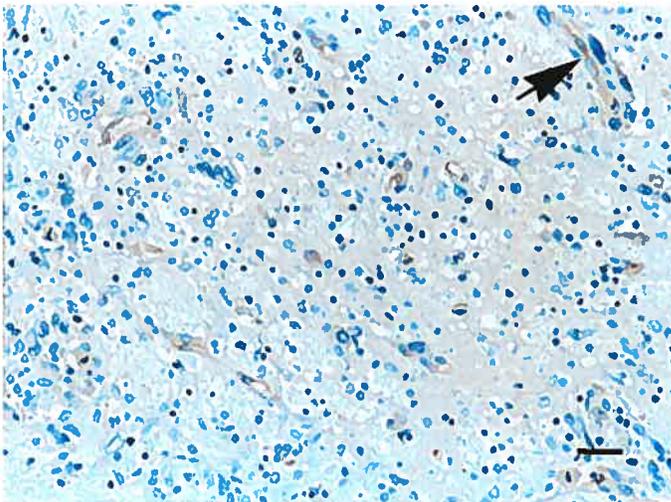
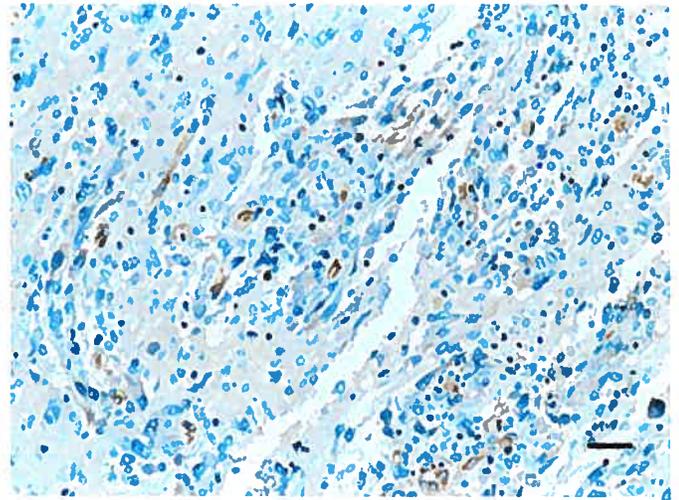
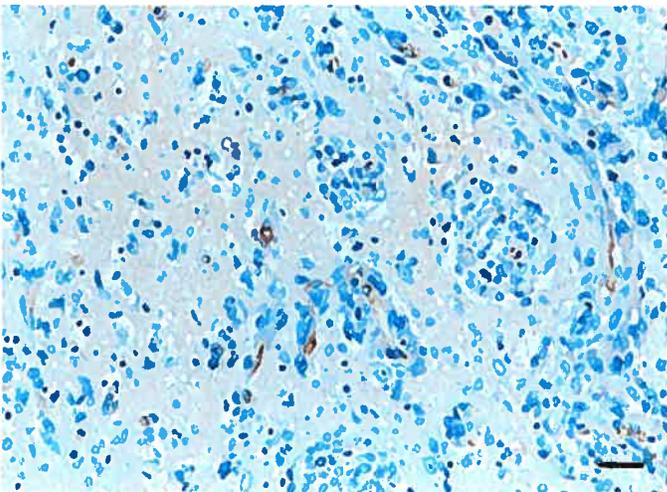
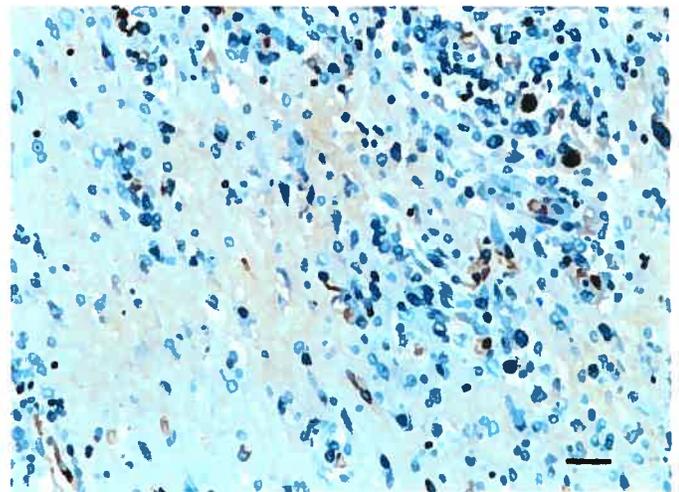
B**C****D****E**

Fig 3.2 Analyse histopathologique par immunohistochimie du facteur VIII : caractérisation de la vascularisation du cerveau de rat normal (A) et des tumeurs témoins (B), traitées par irradiation (C), traitées aux polyphénols (D), traitées aux polyphénols et par irradiation (E). Cellule endothéliale marquée (flèche)

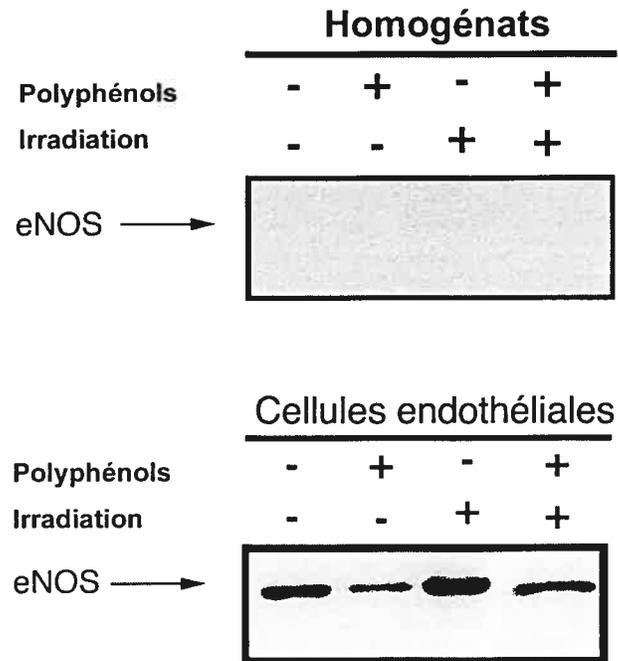


Fig 3.3 Détection de l'expression d'eNOS dans l'homogénat de tissu tumoral et des cellules endothéliales isolées des groupes témoin, polyphénols, traité aux polyphénols, irradié et irradié avec polyphénols

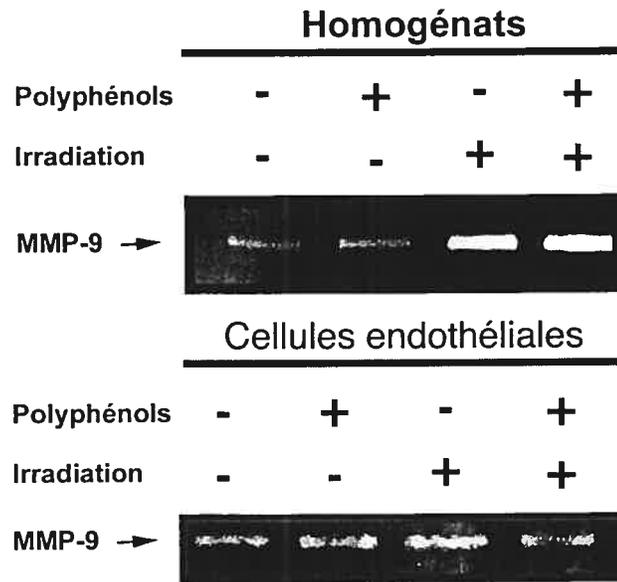


Fig 3.4 Mesure en zymographie de l'activité enzymatique de la MMP-9 dans l'homogénat de tissu tumoral et des cellules endothéliales isolées des groupes témoin, polyphénols, irradié et irradié avec polyphénols

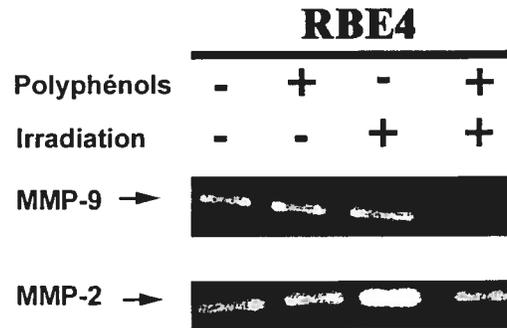


Fig 3.5 (A) Mesure en zymographie de l'activité enzymatique des MMP-2 et MMP-9 dans des cellules RBE4 traitées ou non aux polyphénols, avec ou sans radiothérapie

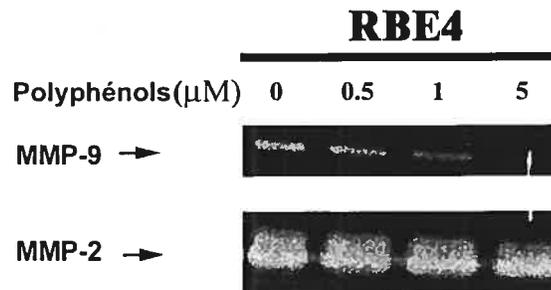


Fig 3.5 (B) Mesure en zymographie de l'activité enzymatique des MMP-2 et MMP-9 dans des cellules RBE4 traitées uniquement avec des concentrations croissantes de polyphénols

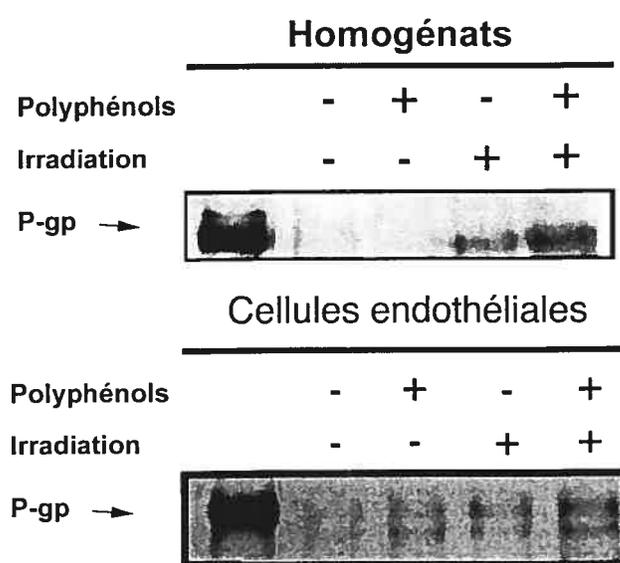
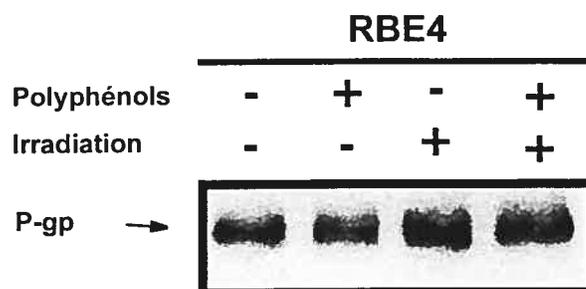


Fig 3.6 Détection de l'expression de la P-gp dans l'homogénat de tissu tumoral et des cellules endothéliales isolées des groupes témoin, traité aux polyphénols, irradié et irradié avec polyphénols

A)



B)

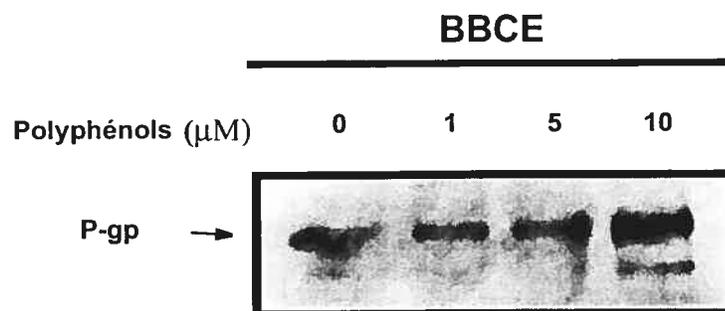


Fig 3.7 (A) Détection de l'expression de la P-gp dans des cellules RBE4 traitées ou non aux polyphénols, avec ou sans radiothérapie (B) Détection de l'expression de la P-gp dans les cellules BBCE traitées avec des concentrations croissantes de polyphénols

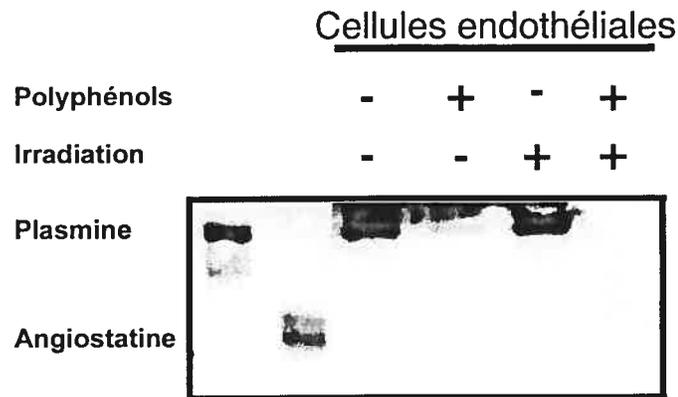
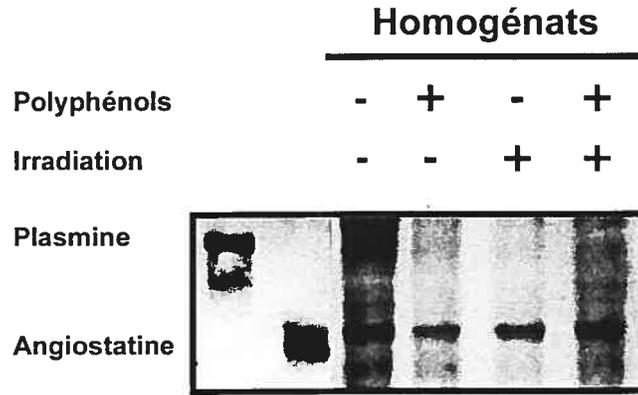


Fig 3.8 Détection de l'expression de l'angiostatine dans l'homogénat de tissu tumoral et des cellules endothéliales isolées des groupes témoin, traité aux polyphénols, irradié et irradié avec polyphénols

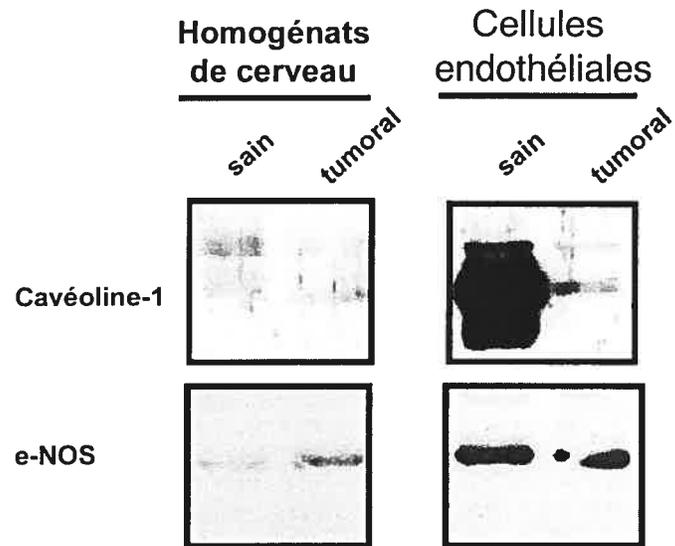


Fig 3.9 Détection de l'expression de la cavéoline-1 et d'eNOS dans l'homogénat et des cellules endothéliales isolées de tissu cérébral sain versus tumoral

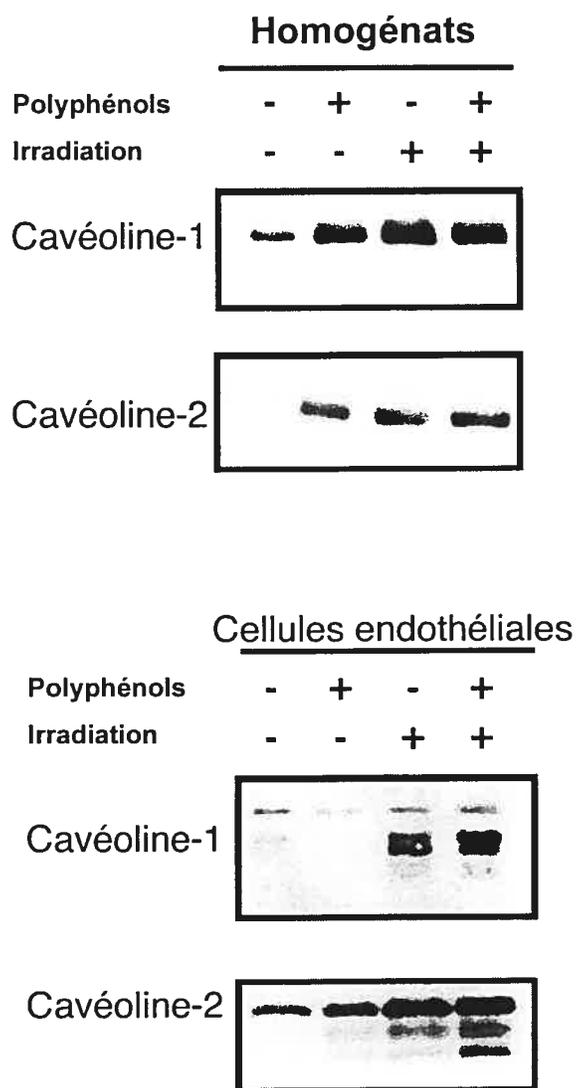


Fig 3.10 Détection de l'expression des cavéolines-1 et -2 dans l'homogénat de tissu tumoral et des cellules endothéliales isolées des groupes témoin, traité aux polyphénols, irradié et irradié avec polyphénols

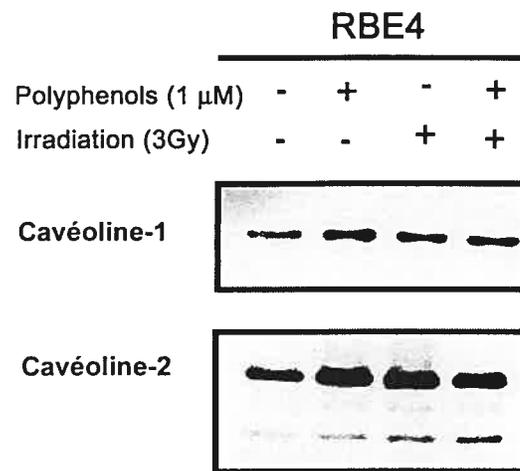


Fig 3.11 Détection de l'expression des cavéolines -1 et -2 dans les cellules RBE4 traitées ou non aux polyphénols, avec ou sans radiothérapie

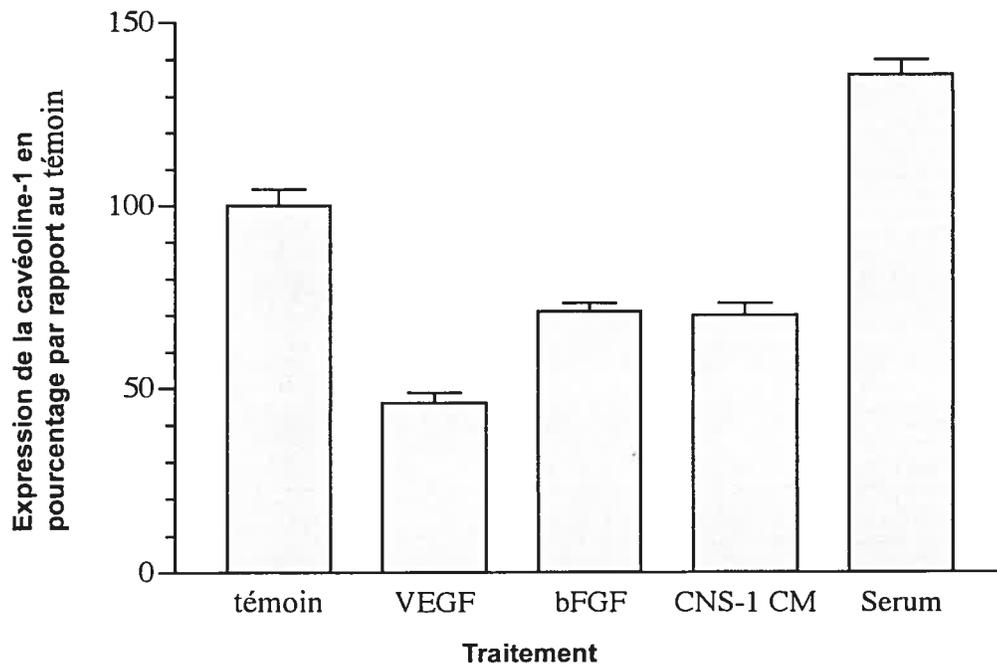
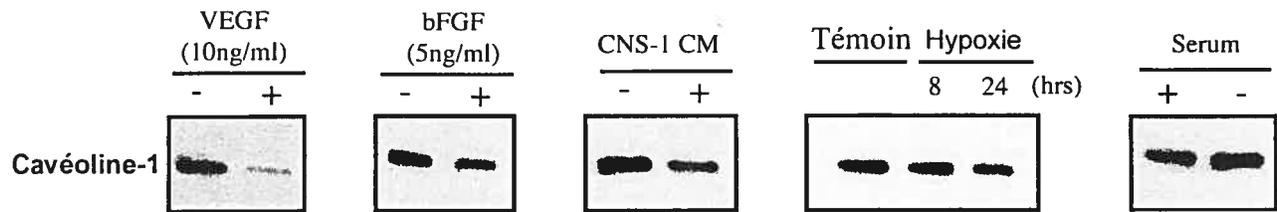


Fig 3.12 Détection de l'expression de la cavéoline-1 dans des cellules RBE4 traitées ou non avec du VEGF, du bFGF, en absence ou en présence de sérum; dans des conditions ou non d'hypoxie; en co-culture ou non avec des CNS-1

CHAPITRE IV DISCUSSION

Le traitement actuel des glioblastomes est non curatif et apporte peu à la survie de l'individu. La radiothérapie standard, incluant une exérèse macroscopique totale de la tumeur, améliore la survie de trois mois à un an seulement. Puisque le traitement contribue peu à l'amélioration de la survie de l'individu porteur d'un glioblastome malin, il est nécessaire de trouver une nouvelle stratégie thérapeutique. L'une des approches serait de cibler les cellules endothéliales des gliomes. Cette nouvelle méthode est intéressante à plusieurs points de vue. Premièrement, les cellules endothéliales forment, avec les astrocytes et les péricytes, une barrière qui limite le passage des molécules et de la chimiothérapie. En ciblant notre étude sur la cellule endothéliale, notre objectif était de déterminer l'efficacité de certains agents à augmenter la perméabilité de la barrière à certains médicaments de chimiothérapie. Deuxièmement, les cellules endothéliales jouent un rôle central dans l'angiogenèse pour permettre la croissance et l'invasion ultérieure de la tumeur. Ainsi, en étudiant l'effet de certains agents sur la cellule endothéliale, leur propriété antiangiogénique pouvait être déterminée. Troisièmement, elles ne sont pas sujettes au phénomène de résistance.

En plus des études *in vitro* sur les lignées de cellules endothéliales en culture, l'isolement des cellules endothéliales développée par notre laboratoire à l'aide de billes magnétiques nous a permis d'investiguer directement la cellule endothéliale traitée *in vivo*. Vu que les polyphénols du thé vert ont plusieurs propriétés

antiangiogéniques *in vitro* et interagissent avec la P-gp, nous avons déterminé l'effet des polyphénols directement sur les cellules endothéliales isolées. De plus, l'utilisation des polyphénols comme adjuvant à la radiothérapie est envisageable. En effet, le thé vert est un produit abondant et très accessible à la population et la radiothérapie est la seule modalité non chirurgicale reconnue efficace contre le glioblastome.

4.1 Le modèle utilisé

Les études histopathologiques ont confirmé que le modèle expérimental utilisé est bien approprié. En effet, la présence de nécroses avec palissades, l'invasion périvasculaire et l'invasion du parenchyme par des cellules tumorales isolées sont observées à la fois dans le modèle expérimental et dans le glioblastome multiforme chez l'humain. De plus, les manifestations cliniques des rats pendant la période d'observation dans ce modèle de glioblastome, correspondent à ce que l'on retrouve chez l'humain : perte d'appétit, perte de poids, ataxie, paralysie, changements de comportement, apathie, etc. Donc, d'après ces observations, notre modèle de CNS-1 implanté dans le cerveau du rat est comparable au glioblastome humain. Les résultats obtenus avec la thérapie aux polyphénols combinés ou non à la radiothérapie pourraient être donc extrapolés aux patients porteurs de glioblastome.

4.2 Radiothérapie

4.2.1 Radiothérapie et effets secondaires

Les groupes de rats ayant reçu de la radiothérapie ont subi une perte pondérale après importante l'administration du traitement. Chez l'humain, la radiothérapie entraîne des effets secondaires non négligeables. À court terme, une irradiation du système nerveux central peut entraîner une encéphalite aiguë. À long terme, la radionécrose et une atrophie cérébrale diffuse peuvent se manifester par une atteinte cognitive, une instabilité à la marche et des changements de personnalité. Le modèle présente donc des effets secondaires renforçant la comparaison possible avec l'humain. Dans une étude de survie, la survie moyenne des rats implantés avec la lignée cellulaire C6 était de 29 jours dans le groupe témoin et de 39 jours dans le groupe traité avec radiochirurgie. Cette différence était non significative avec $p=0,07$ (Kondziolka et al., 1992), malgré que la lignée cellulaire utilisée ait été le gliome de C6 qui est un modèle de glioblastome moins invasif que le CNS-1, tel que démontré dans une étude précédente au laboratoire (Régina et al., 2003). Tel que constaté, le gain thérapeutique avec la radiothérapie n'est pas énorme, au prix des effets secondaires non négligeables, d'où l'importance de trouver une nouvelle alternative afin de diminuer les doses de radiothérapie administrées. Comme traitement adjuvant à la radiothérapie, le thé vert pourrait être un choix intéressant.

4.2.2 Radiothérapie et invasion tumorale

Au niveau des analyses histopathologiques, les spécimens ayant reçu de la radiothérapie avaient une formation microvasculaire plus organisée et plus abondante que les spécimens du groupe témoin. Nous avons également constaté que la radiothérapie *in vivo* entraînait une augmentation des MMP-9 dans l'homogénat de tissu tumoral et les cellules endothéliales isolées. Les données obtenues *in vitro* démontrent une induction de la MMP-2 des cellules RBE4 avec la radiothérapie. Ces résultats démontrent que globalement, les MMPs sont probablement induits par la

radiothérapie et suggèrent que la radiothérapie est associée à un processus angiogénique plus important. Malgré que la radiothérapie soit connue pour ses propriétés cytotoxiques, pouvant réduire la taille tumorale de façon significative (Iwadate et al., 2001; Shapiro et Shapiro, 1998; Kondziolka et al., 1992) et induire l'apoptose des cellules endothéliales (Garacia-Barros et al., 2003; Paris et al., 2001), elle semble aussi augmenter le caractère envahissant de la tumeur résiduelle et la rendre plus résistante à d'autres formes de thérapies. La propriété envahissante des gliomes, par exemple, est probablement augmentée après l'administration de petites doses de radiothérapie. En utilisant la lignée cellulaire gliale de rat 9L, il a été observé une augmentation du nombre de tumeurs satellites dans le cerveau de rat, accompagnée par d'induction de la MMP-2 et d'une diminution de l'expression de l'inhibiteur de la MMP-2 (Wild-Bode et al., 2001). Également, dans un système de co-culture de cellules de glioblastome SNB19 avec des cellules endothéliales bovines de la rétine (BRE), la radiothérapie augmentait le niveau d'activité des MMP-2 et MMP-9 (Nirmala et al., 2000). De plus, d'autres études avec différents types de tumeurs ont rapporté des résultats similaires. Par exemple, 3 lignées de tumeurs pancréatiques humaines ont démontré une induction de l'activité des MMP-2 par suite de l'irradiation (Qian et al., 2002). Chez des patients atteints du cancer de la prostate, où des prélèvements au niveau du rectum ont été effectués avant et après la radiothérapie, une augmentation de l'activité des MMPs a été notée dans les échantillons rectaux après radiothérapie (Hovdenak et al., 2002, Kumar et al., 2000). Il a déjà été noté également une augmentation de l'activité plasminolytique et de la plasmine dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire, consécutive à une radiothérapie pulmonaire (Maasilta et al., 1991). Il a aussi été démontré que l'irradiation augmentait l'expression des molécules d'adhésion vasculaire et d'intégrines dans la lumière des vaisseaux tumoraux irradiés. Alors, la radiothérapie semble augmenter la propriété envahissante de la cellule cancéreuse en activant les MMPs et le système plasminogène/plasmine, qui sont nécessaires au remodelage de la matrice extracellulaire, afin de mobiliser la cellule. De plus, l'expression des intégrines qui sont impliquées dans la migration cellulaire est augmentée par la radiothérapie.

4.2.3 Radiothérapie et maturation vasculaire

Les résultats avec la cavéoline montrent que la radiothérapie, non seulement entraîne une prolifération des vaisseaux, tel que décrit ci-dessus, mais établirait un réseau de vaisseaux matures. L'expression de la cavéoline-1 est associée à l'état de différenciation cellulaire (Liu et al., 2002). La cavéoline diminue dans les cellules en division rapide (Galbiati et al., 1998) et dans plusieurs souches de cellules cancéreuses (Fiucci et al., 2002), tandis qu'une augmentation de l'expression de la cavéoline est observée dans les cellules bien différenciées (Fiucci et al., 2002). De plus, la cavéoline pourrait agir comme gène suppresseur (Galbiati et al., 1998). Les résultats démontrent que la cavéoline est drastiquement diminuée dans les cellules endothéliales tumorales en comparaison des cellules endothéliales de cerveau sain. Ces observations suggèrent que les cellules endothéliales des tumeurs cérébrales sont dans un état de prolifération et de dédifférenciation. De la même manière, une diminution de l'expression de la cavéoline est observée quand les cellules endothéliales (la lignée cellulaire des RBE4) sont exposées *in vitro* à un stimulus angiogénique. Dans des conditions d'hypoxie de 24 heures, dans des milieux enrichis en VEGF ou en bFGF, l'expression de la cavéoline était diminuée. De plus, la prolifération endothéliale est active dans des milieux de RBE4 co-cultivés avec des cellules gliales, telle qu'observée par une expression de cavéoline diminuée. D'autres études ont démontré un phénomène similaire. Dans une lignée de cellules endothéliales de veine ombilicale (ECV304) et des cellules endothéliales microvasculaires humaines (HMEC-1), l'expression de la cavéoline-1 était diminuée en présence des facteurs qui stimulaient l'angiogenèse et la prolifération cellulaire (Liu et al., 1999, 2002).

La radiothérapie a entraîné une augmentation de l'expression des cavéolines-1 et -2, avec l'homogénat de tissu tumoral et les cellules endothéliales isolées, ainsi qu'avec les RBE4. Une augmentation de l'expression de la cavéoline-1 avec des cellules endothéliales a déjà été rapportée dans un endothélium irradié (Kasper et al., 1998). Par contre, dans une étude qui déterminait l'effet de la radiothérapie sur les cellules endothéliales tumorales, la cavéoline-1 était diminuée en conséquence de la

radiothérapie (Sonveaux et al., 2002). Dans cette étude, l'analyse a été faite à court terme après irradiation. Les artérioles étaient disséquées seulement 24 heures après la radiothérapie. Dans l'étude actuelle, ce sont les effets à long terme de la radiothérapie qui étaient investigués, car l'isolement des cellules endothéliales était fait 20 jours après l'irradiation. On pense que dans la phase initiale suivant la radiothérapie, il y a une augmentation de l'angiogenèse et de la prolifération cellulaire avec une diminution de la cavéoline. Par contre, dans la phase plus tardive, au moment de la maturation et de la différenciation des cellules endothéliales, l'expression de la cavéoline est plus élevée. *In vitro*, il a été démontré que le niveau d'expression de la cavéoline-1 variait durant la formation capillaire, avec l'expression maximale juste avant la stabilisation du réseau vasculaire. (Liu et al., 2002).

Ces résultats ont été publiés dans un article sur la diminution de l'expression de la cavéoline dans le réseau vasculaire des gliomes et sa modulation par la radiothérapie. (Annexe I, p. xv).

4.3 Thérapie antiangiogénique

Depuis 1999, il y a eu une grande vague d'essais cliniques de thérapies antiangiogéniques, avec 46 molécules différentes chez des patients porteurs du cancer. Il y a eu au moins 10 000 patients traités avec une forme quelconque de thérapie antiangiogénique expérimentale (angio.org). Pour le moment, un seul résultat positif a été rapporté avec des agents antiangiogéniques. Il s'agit de l'anticorps monoclonal Avastin (anti-VEGF) qui devient le premier agent antiangiogénique démontré efficace, par des études cliniques de phase III à prolonger la survie des patients atteints du cancer des reins (Yang et al., 2003; Sonpavde, 2003).

4.3.1 Traitement combiné de radiothérapie et d'agents antiangiogéniques

Puisque la radiothérapie semble augmenter le potentiel angiogénique des tumeurs, la combinaison des agents antiangiogéniques à la radiothérapie pourrait constituer une stratégie thérapeutique (Landuyt et al., 2001). Par exemple, dans une étude, la combinaison de la radiothérapie à l'angiostatine, un fragment du plasminogène, a amené une diminution de la taille des métastases pulmonaires secondaire à une leucémie lymphoïde chronique (Gorski et al., 2003), et une diminution de la taille d'une tumeur dans un modèle *in vivo* de glioblastome (Griscelli et al., 2000). Par contre, les données les plus récentes ont été documentées avec des agents antiangiogéniques synthétiques. Ainsi, l'inhibiteur du récepteur du VEGF, le PTK787 (Hess et al., 2001), combiné à la radiothérapie, a diminué la prolifération cellulaire endothéliale et le nombre des microvaisseaux dans un adénocarcinome du colon. De plus, d'autres agents anti-angiogéniques tels le SU5416 (un inhibiteur du récepteur du VEGF) et SU6668 (un inhibiteur des récepteurs du VEGF, FGF, et PDGF) ont augmenté l'effet antitumoral de la radiothérapie (Ning et al., 2002).

Dans notre étude, l'activité des MMP-2 était potentialisée *in vitro* avec la radiothérapie et diminuée après l'administration du thé vert. Une autre étude récente a démontré que les EGCG inhibaient la tubulogénèse induite par la radiothérapie (Annabi et al., 2003). Il a également été rapporté que des catéchines de thé vert, dont l'EGCG, inhibent l'activité kinase du récepteur VEGF dans la cellule endothéliale (Lamy et al., 2002). De plus, il a été décrit que les collagénases des cellules cancéreuses du poumon de souris étaient inhibées en présence des catéchines du thé vert et des théaflavines du thé noir (Sazuka et al., 1997). L'investigation sur les MMPs a été poussée plus loin avec des produits naturels comme les polyphénols, le resvératrol, la génistéine, et les composés organosulfurés de l'ail. Parmi ces produits naturels, les catéchines du thé vert avaient inhibé de façon la plus importante l'activité gélatinolytique de ces protéases (Shapiro et Shapiro, 1998).

In vivo, les résultats que nous avons obtenu ne semblent pas reproduire ce phénomène. Les groupes ayant reçu un traitement combiné de radiothérapie et des

polyphénols avaient autant de néovascularisation que ceux ayant reçu la radiothérapie seule. De plus, dans l'homogénat de tumeurs, l'expression de la MMP-9 était induite autant dans le groupe ayant reçu de la radiothérapie que dans celui ayant reçu les polyphénols avec la radiothérapie. Le thé vert administré dans un contexte *in vivo* n'a pas produit l'effet antiangiogénique attendu.

Un autre système, à part celui des MMPs, est impliqué dans le processus d'invasion et l'angiogénèse tumorale. Il s'agit du système uPA/tPA/ plasminogène. Ni les polyphénols, ni la radiothérapie, ni la combinaison des deux n'ont semblé affecter l'expression de l'angiostatine dans l'homogénat de tissu tumoral, et l'angiostatine n'était pas exprimée dans les cellules endothéliales isolées. Parmi la famille des inhibiteurs de l'angiogénèse, l'angiostatine a été démontrée parmi les plus puissantes (Cao, 2001; Cao, 1998). L'administration de l'angiostatine humaine a inhibé la croissance des carcinomes humains et murins chez les souris (O'Reilly et al., 1996). Au lieu de les administrer, une des nouvelles stratégies de traitement antiangiogénique serait de stimuler la tumeur à produire ses propre molécules antiangiogéniques (Westphall et al., 2000). L'induction de l'angiostatine *in vitro* a déjà été démontrée avec plusieurs enzymes protéolytiques (uPA, tPA, élastase, MMPs), (O'Reilly et al., 1999, 1994; Lijnen et al., 1998; Patterson et Sang, 1997; Gately et al., 1996). La production de l'angiostatine a été démontrée *in vitro* seulement, avec quelques lignées cellulaires (O'Mahoney et al., 1998; Gately et al., 1996). Dans une autre étude, il a été constaté que 50% des échantillons de différentes lignées tumorales produisaient de l'angiostatine (Westphall et al., 2000; Gorrin-Rivas et al., 1998). Donc, vu que la production de l'angiostatine par la tumeur est un événement qui n'est pas rare, il serait intéressant de trouver un moyen de stimuler davantage cette production (Westphall et al., 2000). Dans notre étude, on avait démontré la présence *in vivo* de l'angiostatine dans l'homogénat tumoral de CNS-1, mais qui n'était stimulé ni par les polyphénols, ni par la radiothérapie. Par contre, dans la fraction isolée des cellules endothéliales, l'angiostatine n'a pas été mesurée car il s'agit d'un inhibiteur circulant de l'angiogénèse (Moser et al., 2002; O'Reilly et al., 1994).

Il a été récemment proposé que l'activité anticancéreuse des polyphénols du thé vert était associée avec une inhibition de l'urokinase (Demeule et al., 2000). Selon des modèles moléculaires sur ordinateur, les polyphénols se lient à l'urokinase de façon efficace. Cette hypothèse a été confirmée par la suite en mesurant, par spectrophotométrie, l'inhibition de l'activité de l'urokinase par les polyphénols. Par contre, les concentrations utilisées pour inhiber l'activité de l'urokinase étaient beaucoup plus importantes que celles utilisées pour inhiber les MMPs. Ceci suggère que les MMPs sont plus sensibles à l'action des polyphénols et représentent une meilleure cible (Garbisa et al., 2001; Jankun et al., 1997).

Cette discordance entre les résultats *in vivo* et *in vitro* avec les MMPs pourrait être expliquée par une plus faible disponibilité du thé vert au niveau des capillaires cérébraux, après une administration orale de celui-ci. *In vitro*, le thé vert était administré à des concentrations probablement plus importantes et directement sur les cellules. La figure 3.5 B (p. 40) démontre que même *in vitro*, l'inhibition de l'activité de la MMP-2 et de la MMP-9 était concentration dépendante. De la même manière, vu que les concentrations utilisées pour inhiber l'activité de l'urokinase doivent être plus importantes que celles utilisées pour inhiber les MMPs, des changements au niveau de l'expression de l'angiostatine n'ont pu être observés.

Avec les polyphénols, une augmentation *in vivo* des cavéolines-1 et -2 fût également démontrée avec l'homogénat de tumeur et les cellules endothéliales isolées. *In vitro*, avec les RBE4, leur expression a également été induite. Comparée à la radiothérapie, où l'augmentation de la cavéoline suggérerait une maturation des cellules déjà proliférées, l'augmentation de la cavéoline avec les polyphénols témoigne d'un arrêt de la prolifération cellulaire endothéliale et tumorale et corrèle bien avec les études *in vivo* et *in vitro*.

4.4 Barrière hémato-encéphalique

Une autre difficulté dans le traitement des gliomes, qui est unique pour ce genre de tumeur, est la barrière hémato-encéphalique. Cette barrière, constituée essentiellement de cellules endothéliales, contrôle le passage des molécules entre le sang et le système nerveux central. En contrepartie, elle limite aussi le passage des médicaments. De plus, il existe un système d'efflux, comme la P-gp, une protéine transmembranaire qui agit en expulsant différents substrats, dont des agents chimiothérapeutiques, avant qu'ils atteignent un niveau cytotoxique.

4.4.1 Radiothérapie et P-gp

Dans cette étude, il a été démontré que l'expression de la P-gp est induite par la radiothérapie de façon importante. En effet, une corrélation entre les études *in vivo* (les homogénats de tumeur et les cellules endothéliales isolées) et les études *in vitro* sur des RBE4, a été observée. Dans les deux cas, la radiothérapie entraînait une induction de l'expression de la P-gp. Une étude récente réalisée *in vitro* avait montré que la P-gp augmentait l'efflux de la calcéine, un substrat de la P-gp, dans la lignée cellulaire endothéliale de rat, RBE4, deux heures après l'irradiation, et de façon plus significative après 14 jours (Andersson et al., 2002), suggérant une augmentation de l'activité de la P-gp. Cette augmentation d'expression de la P-gp avait été observée dans les néoplasies du sein. Parmi les tumeurs du sein irradiées, 59% exprimaient la P-gp contre 31% des tumeurs non irradiées. Ce résultat était significatif avec $p < 0,05$ (Akashi-Tanaka et al., 1995). Ces résultats peuvent expliquer la résistance des gliomes à la chimiothérapie suivant des séances de radiothérapie, d'où la nécessité de considérer de nouvelles stratégies thérapeutiques pouvant agir sur la P-gp.

4.4.2 Polyphénols et P-gp

Nous avons noté, dans les études *in vivo* avec les homogénats de tumeurs et les cellules endothéliales isolées, une augmentation de l'expression de la P-gp avec le traitement aux polyphénols. Ceci correspond bien à ce que nous avons trouvé *in vitro* avec les BBCE. L'augmentation de l'expression de la P-gp par les polyphénols, était concentration dépendante. Alors, les polyphénols induisent l'expression de la P-gp. Or, nous savons que les polyphénols agissent comme substrat de la P-gp. Ils augmentent l'effet thérapeutique des agents chimiothérapeutiques en augmentant leur concentration intracellulaire. Par exemple, il a été observé que lors d'un traitement de la souche cellulaire CH(R)C5 avec de l'EGCG combiné à un traitement à la vinblastine, l'effet de la vinblastine était potentialisé. Donc, en agissant comme substrat de la P-gp, l'EGCG favorise l'accumulation de la vinblastine dans la cellule et, donc, augmente sa toxicité (Jodoin et al., 2002). En agissant comme substrat de la P-gp, les polyphénols entraînent probablement une régulation à la hausse de l'expression de la P-gp. Il s'agit d'un effet « classique », quand la P-gp est en présence de ses substrats, son expression ou son activité est induite. Par exemple, nous savons que la P-gp participe au transport des cytokines (IL-2, IL4, et IFN-gamma) (Drach et al., 1996). Il a été démontré qu'en présence d'interféron gamma, l'activité de la P-gp était induite (Kawaguchi et al., 2004). De plus, l'activité de la P-gp était augmentée en présence de plusieurs médicaments, dont la vinblastine, connue pour être transportée par la P-gp (Sarkadi et al., 1992). D'autres substrats, tels les antioestrogènes (tamoxifène) et les stéroïdes, ont été rapportés comme augmentant l'activité de la P-gp (Rao et al., 1994). Une autre étude a démontré une augmentation de l'expression de la P-gp en présence de ses substrats tels les antirétroviraux (saquinavir, ritonavir, lopinavir, etc.) (Chandler et al., 2003). Cette dépendance de l'expression et de l'activité de la P-gp pour son substrat indique probablement que l'induction de l'expression et de l'activité de la P-gp par un médicament est un reflet direct du transport de ce médicament par la P-gp.

CHAPITRE V CONCLUSION

La radiothérapie est une modalité thérapeutique, comme la chirurgie, qui entraîne une légère augmentation de la survie moyenne de l'individu porteur de glioblastome. Cette légère augmentation de la survie est accompagnée d'effets secondaires chez l'humain et, tel que constaté chez le rat, la radiothérapie entraîne une perte de poids non négligeable. De plus, la radiothérapie semble augmenter le caractère invasif de la tumeur et la formation d'un nouveau réseau de vaisseaux en activant les MMPs, le système plasminogène/plasmine et l'expression des intégrines. L'analyse histopathologique démontre également que les sujets ayant reçu de la radiothérapie avaient une augmentation du nombre de vaisseaux nouvellement formés. Alors, afin d'améliorer l'efficacité de la radiothérapie, des agents antiangiogéniques seraient intéressants à combiner avec cette modalité thérapeutique. L'étude avec la cavéoline nous suggère que le moment d'administration de ces agents antiangiogéniques est important. Il faut les administrer au début du processus, au moment de la prolifération endothéliale. Les résultats obtenus suggèrent que l'administration des agents antiangiogéniques, quand les cellules endothéliales sont déjà matures, traduit par une expression augmentée de cavéoline, est probablement inefficace après 20 jours.

Parmi les agents antiangiogéniques, nous avons choisi les polyphénols du thé vert pour être combinés à la radiothérapie. Nous avons constaté que les polyphénols ne réduisent pas la quantité de vaisseaux nouvellement formés sur les coupes histologiques. De plus, nous n'avons pas noté d'effet sur l'activité des MMPs ni de l'angiotatine *in vivo*. L'absence d'effet significatif du traitement pourrait venir du fait que la radiothérapie induit l'expression de la P-gp. Nous savons également que

les polyphénols sont des substrats de la P-gp (Jodoin et al., 2002) qui fait partie autant du réseau vasculaire cérébral sain que tumoral (Demeule et al., 2001). Alors, si la quantité de P-gp est augmentée, les polyphénols ne se rendent peut-être pas à leur cible, étant utilisés comme substrat de la P-gp. Les polyphénols se sont donc « comportés » comme les autres médicaments de chimiothérapie avec les cellules endothéliales. Ils ont été pris en charge et rejetés par la P-gp et donc n'ont pas pu agir sur leur cible. De plus, la disponibilité du thé vert au niveau des capillaires cérébraux, après une administration orale, devait être faible. Une alternative à explorer dans le futur serait l'administration intraveineuse d'EGCG en bolus. À ce moment, la saturation de la P-gp pourrait permettre l'action antiangiogénique des polyphénols.

Notre étude aura permis d'explorer pour la première fois *in vivo*, avec un modèle animal, l'effet des polyphénols du thé vert sur l'angiogenèse et la BHE des tumeurs gliales. Il s'agit d'un début et, en perfectionnant notre modèle animal et nos modes d'administration, nous pourrions peut-être un jour obtenir des effets antitumoraux avec les polyphénols *in vivo*. Il ne faut pas oublier que la plupart de nos médicaments, dont la pénicilline, sont des dérivés de notre environnement.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbot N.J., Hughes C.C.W., Revest P.A. et al. *Development and characterisation of a rat brain capillary endothelial culture: towards an in vitro blood-brain barrier*. J. Cell. Sci., 130, 23-37, 1992.
- Abbott N.J., Revest P.A. et Romero A. *Astrocyte-endothelial interaction: physiology and pathology*. Neuropathology and applied neurobiology, 18, 424-433, 1992.
- Adn M., Riffaud L., Amlashi S.F. et al. *Pleuro-pulmonary metastases of a cerebral glioblastoma*. Presse Med., 32, 30, 1417, 2003.
- Aigner A., Wolf S., Gassen H. *Transport and detoxication: principles, approaches and perspectives for research on blood-brain barrier*. Angewandte Chemie-International edition in english, 36, 24-41, 1997.
- Akashi-Tanaka S., Fukutomi T., Tsuda H. *Higher level of p-glycoprotein expression in human breast cancer cells after radiation therapy*. Breast Cancer, 2, 2, 99-103, 1995.
- Ambudkar S.V., Kimchi-Sarfaty C., Sauna Z.E. *P-glycoprotein: from genomics to mechanism*. Oncogene, 22, 47, 7468-85, 2003.
- Anderson R.F., Fisher L.J., Hara Y., et al. *Green tea catechins partially protect DNA from $-OH$ radical-induced strand breaks and base damage through fast chemical repair of DNA radicals*. Carcinogenesis, 22, 1189-93, 2001.
- Andersson U., Grankvist K., Bergenheim A.T. et al. *Rapid induction of long-lasting drug efflux activity in brain vascular endothelial cells but not malignant glioma following irradiation*. Med Oncol., 19, 1, 1-9, 2002.
- Andratschke N., A.L. Grosu, M. Molls, C. Nieder. *Perspectives in the treatment of malignant gliomas in adults*. Anticancer Res., 21, 3541-50, 2001.
- Annabi B., Lachambre M., Bousquet-Gagnon N., et al. *Localization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in caveolae membrane domains*. Biochem J., 353(Pt 3), 547-53, 2001.

- Annabi B., Lachambre M.P., Bousquet-Gagnon N, et al. *Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate inhibits MMP-2 secretion and MT1-MMP-driven migration in glioblastoma cells.* Biochim Biophys Acta, 1542(1-3), 209-20, 2002.
- Annabi B., Lee Y-T., Martel C., et al. *Radiation induced-tubulogenesis in endothelial cells is antagonized by the antiangiogenic properties of green tea polyphenol (-)epigallocatechin-3-gallate.* Mol. Cancer. Res. In press. 2003.
- Ates L.E., Bayindir C., Bilgic B. et al. *Glioblastoma with lymph node metastases.* Neuropathology, 23, 2, 146-9, 2003.
- Audus K., Borchardt R. *Bovine brain microvessel endothelial cell monolayers as a model system for the blood-brain barrier.* Ann. N. Y. Acad. Sci., 507, 9-18, 1987.
- Balentine D.A., Wiseman S.A. Bouwens L.C. *The chemistry of tea flavonoids.* Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 37(8), 693-704, 1997.
- Bansal K., Engelhard H.H. *Gene therapy for brain tumors.* Curr. Oncol. Rep., 2, 463-472, 2000.
- Bauer H.C., Bauer H. *Neural induction of the blood-brain barrier: still an enigma.* Cell Mol Neurobiol, 20, 1, 13-28, 2000.
- Beaulieu E., Demeule M., Ghitescu L., et al. *P-glycoprotein is strongly expressed in the luminal membranes of the endothelium of blood vessels in the brain.* Biochem. J., 326, 539-544, 1997.
- Benjamin L.E., Hemo I. et Keshet E. *A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF.* Development, 125, 1591-1598, 1998.
- Bergers G., Javaherian K. Lo K.M. et al. *Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice.* Science, 284, 808-812, 1999.
- Black P.M. *Brain Tumors. Part 1.* New England Journal of Medicine, 324, 1471-1476, 1991.
- Black P.M. *Brain Tumors. Part 2.* New England Journal of Medicine, 324, 1555-1564, 1991.
- Boado R. et W. Partridge. *Measurement of blood-brain barrier GLUT1 glucose transporter and actin mRNA by a quantitative polymerase chain reaction assay.* J. Neurochem., 62, 2085-90, 1994.
- Bondy M.L., Wang L.E., El-Zein R. et al. *Gamma-radiation sensitivity and risk of glioma.* J. Natl. Cancer Inst., 93(20), 1553-7, 2001.

- Brightman M.W. The anatomic basis of the blood-brain barrier. *Implications of the blood-brain barrier and its manipulation*, 53-83, New York: Plenum Press, 1989.
- Brooks P.C., Silletti S., von Schalscha T. L., et al. *Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity*. Cell, 92, 391-400, 1998.
- Bussolino F., Claesson-Welsh L., et al. *Molecular mechanisms of angiogenesis associated to cancer progression: targets for new diagnostic tools and for new anticancer therapeutic approaches*. Cancer Research, 117-121, 1998.
- Cameron P.L., Liu C., Smart D.K., et al. *Caveolin-1 expression is maintained in rat and human astrogloma cell lines*. Glia, 37, 275-290, 2002.
- Campbell L. Gumbleton M. et Ritchie K. *Caveolae and the caveolins in human disease*. Advanced Drug Delivery Reviews, 49, 325-335, 2001.
- Cancilla P.A., Baker R.N., Pollack P.S., et al. *The reaction of pericytes of the central nervous system to exogenous protein*. Lab. Invest., 26, 376-383, 1972.
- Cao Y. *Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implication*. Int. J. Biochem. Cell Biol., 33, 357-69, 2001
- Cao Y. *Endogenous angiogenesis inhibitors: angiostatin, endostatin, and other proteolytic fragments*. Prog. Mol. Subcell. Biol., 20, 161-76, 1998.
- Cao Y., Cao R. *Angiogenesis inhibited by drinking tea*. Nature, 398 (6796), 381, 1999.
- Cao Y., Chen A., An S.S., et al. *Kringle 5 of plasminogen is a novel inhibitor of endothelial cell growth*. J. Biol. Chem., 272(36), 22924-8, 1997.
- Carbonetto S. *The extracellular matrix of the nervous system*. Trends Neurosci., 7, 382-387, 1984.
- Castro M.G, Cowen R., Williamson I.K. et al. *Current and future strategies for the treatment of malignant brain tumors*. Pharmacol Ther., 98, 1, 71-108, 2003.
- Chandler B., Almond L., Ford J., et al. *The effects of protease inhibitors and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors on p-glycoprotein expression in peripheral blood mononuclear cells in vitro*. J Acquir Immune Defic Syndr., 33, 5, 551-6, 2003.
- Chen J., Braet F., Brodsky S., et al. *VEGF-induced mobilization of caveolae and increase in permeability of endothelial cells*. Am. J. Physiol. Cell Physiol., 282, C1053-C1063, 2002.

- Clapp C., Martial J. A., Guzman R.C., et al. *The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis*. *Endocrinology*, 133, 1292-1299, 1993.
- Cohen A.W., Park D.S., Woodman S.E. et al. *Caveolin-1 null mice develop cardiac hypertrophy with hyperactivation of p42/44 MAP kinase in cardiac fibroblasts*. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 284, C457-C474, 2003.
- Cohen Z., Ehret M., Maitre M., et al. *Ultrastructural analysis of tryptophan hydroxylase immunoreactive nerve terminals in rat cerebral cortex and hippocampus: their association with local blood vessels*. *Neurosci.*, 66, 555-569, 1995.
- Dameron K.M, Volpert O.V., Tainsky M.A. et al. *Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1*. *Science*, 265, 1582-1585, 1994.
- Defazio G., Ribatti D., Nico B., et al. *Endocytosis of horseradish peroxidase by brain microvascular and umbilical vein endothelial cells in culture: an ultrastructural and morphometric study*. *Brain Res. Bull.*, 43, 467-72, 1997.
- Demeule M., Brossard M., Pagé M., et al. *Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1478, 51-60, 2000.
- Demeule M., Labelle M., Régina A., et al. *Isolation of endothelial cells from brain, lung, and kidney: expression of the multidrug resistance P-glycoprotein isoforms*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 281, 827-834, 2001.
- Demeule M., Michaud-Levesque J., Annabi B., et al. *Green tea catechins as novel antitumor and antiangiogenic compounds*. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents*, 2, 4, 441-63, 2002
- Demeule M., Shedid D., Beaulieu E., et al. *Expression of multidrug-resistance P-glycoprotein (MDR1) in human brain tumors*. *Int. J. Cancer*, 93, 62-66, 2001.
- Deschamps L., Dehouck M., Torpier G., et al. *Receptor-mediated transcytosis of transferrin through blood-brain barrier endothelial cells*. *Am. J. Physiol.*, 270, 1149-1158, 1996.
- Dhanabal M., Ramchandran R., Waterman MJ., et al. *Endostatin induces endothelial cell apoptosis*. *J. Biol. Chem.*, 274, 11721-11726, 1999.
- Dolan M.E., A.E. Pegg. *O6-benzylguanine and its role in chemotherapy*. *Clin. Cancer Res.*, 3, 837-847, 1997.

- Drach J., Gsur A., Hamilton G., et al. *Involvement of P-glycoprotein in the transmembrane transport of interleukin-2 (IL-2), IL-4, and interferon-gamma in normal human T lymphocytes.* Blood, 88(5), 1747-54, 1996.
- Egleton R.D. et Davis T.P. *Bioavailability and transport of peptides and peptide drugs into the brain.* Peptides, 18, 1431-39, 1997.
- Elattar T.M., Virji A.S. *Effect of tea polyphenols on growth of oral squamous carcinoma cells in vitro.* Anticancer Res., 20, 3459-65, 2000.
- Eliceiri, B.P. and Cheresh, D.A. *The role of $\alpha_v\beta_3$ integrins during angiogenesis.* Mol. Med., 4, 741-750, 1998.
- Fabry Z., Fitzsimmons K.M., Herlin J.A. et al. *Production of the cytokines interleukin 1 and 6 by murine brain microvessel endothelium and smooth muscle pericytes.* J. Neuroimmunol, 47, 23-34, 1993.
- Ferrara N. *Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects.* Curr. Top. Microbiol. Immunol., 237, 1-30, 1999.
- Fidler I.J. and Ellis L.M. *The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis.* Cell, 79, 185-188, 1994.
- Fillmore H.L., VanMeter T.E. et Broaddus W.C. *Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs): expression and function during glioma invasion.* Journ. of Neuro-Onc., 53, 187-202, 2001.
- Fiucci G., Ravid D., Reich R., et al. *Caveolin-1 inhibits anchorage independent growth, anoikis and invasiveness in MCF-7 human breast cancer cells.* Oncogene, 21, 2365-75, 2002.
- Fiveash J.B., Spencer S.A. *Role of radiation therapy and radiosurgery in glioblastoma multiforme.* Cancer J., 9, 3, 222-9, 2003.
- Folkman J. *Tumor Angiogenesis: Therapeutic implications.* N. Eng. J. Med., 285, 1182-1186, 1971.
- Folkman J. *What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?* J. Nat. Cancer. Inst., 82, 1-3, 1990.
- Forget M.A., Desrosiers R.R., Beliveau R. *Physiological roles of matrix metalloproteinases: implications for tumour growth and metastasis.* Can J Physiol Pharmacol., 77(7), 465-80, 1999.
- Fujiki H.J. *Two stages of cancer prevention with green tea.* Cancer Res. Clin. Oncol., 125, 589-97, 1999.

- Fukushima Y., Ohnishi T., Arita N., et al. *Integrin alpha3beta1-mediated interaction with laminin-5 stimulates adhesion, migration and invasion of malignant glioma cells*. Int. J. Cancer, 76, 63-72, 1998.
- Fuller G.N., P.C. Burger. *Gliomas: Pathology*. Neurosurgery Wilkins R.H. et S.S. Rengachary, vol.1, part. IV, chap. 77, p.735-745, 1996.
- Galbiati F., Volonte D., Engelman J.A., et al. *Targeted downregulation of caveolin-1 is sufficient to drive cell transformation and hyperactivate the p42/44 MAP kinase cascade*. EMBO J, 17, 6633-48, 1998.
- Garbisa S., Sartor L., Biggin S., et al. *Tumor gelatinases and invasion inhibited by the green tea flavanol epigallocatechin-3-gallate*. Cancer, 91, 822-32, 2001.
- Garcia-Barros M., Paris F., Cordon-Cardo C., et al. *Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis*. Science, 300, 1155-1159, 2003.
- Gately S., Twardowski P., Stack M.S. et al. *Human prostate carcinoma cells express enzymatic activity that converts human plasminogen to the angiogenesis inhibitor, angiostatin*. Cancer Res., 56, 4887-4890, 1996.
- Goldstein G.W. *Endothelial cell-astrocyte interactions*. Ann. N. Y. Acad. Sci., 529, 31-39, 1988.
- Gorrin Rivas M.J., Arm S., Furutani M., et al. *Expression of human macrophage metalloelastase gene in hepatocellular carcinoma: Correlation with angiostatin generation and its clinical significance*. Hepatology, 28, 986-993, 1998.
- Gorski D. H., Mauceri H.J., Salloum R.M., et al. *Prolonged treatment with angiostatin reduces metastatic burden during radiation therapy*. Cancer Res., 63, 308-311, 2003.
- Gottesman M.M., Pastan I. *Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter*. Annu. Rev. Biochem., 62, 385-427, 1993.
- Gregor A., Lind M., Newman H., et al. *Phase II studies of RMP-7 and carboplatin in the treatment of recurrent high grade glioma*. RMP-7 European Study Group. J Neurooncol., 44, 2, 137-45, 1999.
- Griffoni C., Spisni E., Santi S., et al. *Knockdown of caveolin-1 by antisense oligonucleotides impairs angiogenesis in vitro and in vivo*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 276, 756-61, 2000.
- Griscelli F., Li H., Cheong C., et al. *Combined effects of radiotherapy and angiostatin gene therapy in glioma tumor model*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97, 6698-6703, 2000.

- Guo Q., Zhao B., Shen S. et al. *ESR study on the structure-antioxidant activity relationship of tea catechins and their epimers*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1427, 13-23, 1999.
- Gupta S., Hastak K., Ahmad N., et al. *Inhibition of prostate carcinogenesis in TRAMP mice by oral infusion of green tea polyphenols*. *PNAS*, 98, 10350-10355, 2001.
- Hanahan D., Weinberg R.A. *The hallmarks of cancer*. *Cell*, 100, 57-70, 2000.
- Hara Y., Luo S.J., Wickremashinghe R.L., et al. *Food reviews international*, 11, 435, 1995.
- Hayashi Y., Nomura M., Yamagishi S. et al. *Induction of various blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells by close apposition to co-cultured astrocytes*. *Glia*, 19, 19-26, 1997.
- Hennes S., Davey M.W, Harvey R.M et al. *Fractionated irradiation of H69 small-cell lung cancer cells causes stable radiation and drug resistance with increased MRP1, MRP2, and topoisomerase I α expression*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, 54, 3, 895-902, 2002.
- Herfath K.K., S. Gutwein, J. Debus. *Postoperative radiotherapy of astrocytomas*. *Semin Surg. Oncol.*, 20, 13-23, 2001.
- Hess C., Vuong V., Hegyi I., et al. *Effect of VEGF receptor inhibitor PTK 787/ZK222584 [correction of ZK222548] combined with ionizing radiation on endothelial cells and tumour growth*. *Br. J. Cancer*, 85, 2010-2016, 2001.
- Holmgren, L., O'Reilly M.S. et Folkman J. *Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression*. *Nat. Med.*, 1, 149-153, 1995.
- Hovdenak N, Wang J., Sung C.C. et al. *Clinical significance of increased gelatinolytic activity in the rectal mucosa during external beam radiation therapy of prostate cancer*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, 53, 4, 919-27, 2002.
- Hurwitz A.A., Berman J.W., Rashbaum W.K. et al. *Human fetal astrocytes induce the expression of blood-brain barrier specific proteins by autologous endothelial cells*. *Brain Res.*, 625, 238-243, 1993.
- Ikezu T., Ueda H., Trapp B.D., et al. *Affinity-purification and characterization of caveolins from the brain: differential expression of caveolin-1, -2, and -3 in brain endothelial and astroglial cell types*. *Brain res.*, 804, 177-192, 1998.

- Inoue M., Tajima K., Hirose K., et al. *Tea and coffee consumption and the risk of digestive tract cancers : data from a comparative case-referent study in Japan.* Cancer Causes Control, 9, 209-16, 1998.
- Iwadata Y., Mizoe J., Osaka Y., et al. *High linear energy transfer carbon radiation effectively kills cultured glioma cells with either mutant or wild-type p53.* Int J Radiat Oncol Biol Phys., 50, 3, 803-8, 2001.
- Jain R.K. *Transport of molecules in the tumor interstitium: A review.* Cancer Res., 47, 3039-3051, 1987.
- Jankun J., Selman S.H., Swiercz R. *Why drinking green tea could prevent cancer.* Nature, 387, 561, 1997.
- Jodoin J., Demeule M., Béliveau R. *Inhibition of the multidrug resistance P-glycoprotein activity by green tea polyphenols.* Biochim. Biophys. Acta, 1542, 149-59, 2002.
- Johansson M., Bergenheim A.T., Widmark A. et al. *Effects of radiotherapy and estramustine on the microvasculature in malignant glioma.* Br J Cancer., 80(1-2), 142-8, 1999.
- Juliano R.L. et Ling V. *A surface glycoprotein modulating drug permeability in chinese hamster ovary cell mutants.* Biochim. Biophys. Acta, 455, 152-162, 1976.
- Kamphaus G.D., Colorado P.C., Panka D. J., et al. *Canstatin, a novel matrix-derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth.* J. Biol. Chem., 275, 1209-1215, 2000.
- Kasper M., Reimann T., Hempel U., et al. *Loss of caveolin expression in type I pneumocytes as an indicator of subcellular alterations during lung fibrogenesis.* Histochem. Cell Biol., 109, 41-48, 1998.
- Kawaguchi H., Matsui Y., Watanabe Y., et al. *Effect of interferon-gamma on the pharmacokinetics of digoxin, a p-glycoprotein substrate, intravenously injected into the mouse.* J Pharmacol Exp Ther., 308, 91-6, 2004.
- Keles G.E., B. Anderson, M.S. Berger. *The effect of the extent of resection on time to tumor progression and survival in patients with glioblastoma multiforma of the cerebral hemisphere.* Surg. Neurol., 52, 371-379, 1999.
- Kerbel R.S. *A cancer therapy resistant to resistance.* Nature (Lond.), 390, 335-336, 1997.
- Kim K.J. et al. Et Ferrara N. *Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo.* Nature, 362, 841-844, 1993.

- Klagsbrun M. and Moses M.A. *Molecular angiogenesis*. Chemistry and Biology, 6, R217-R224, 1999.
- Klagsbrun, M. et D'Amore P. *Vascular endothelial growth factor and its receptors*. Cytokine Growth Factor Rev., 7, 259-270, 1996.
- Kleihues P., D.N. Louis, B.W. Scheithauer, L.B. Rorke, G. Reifenberger, P.C. Burger, W.K. Cavenee. *The WHO Classification of Tumors of the Nervous System*. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 3, 215-225, 2002.
- Knott J.C.A., Mahesparan R., Garcia-Cabrera I. et al. *Stimulation of extracellular matrix components in the normal brain by invading glioma cells*. Int. J. Cancer, 75, 864-872, 1998.
- Koleske A.J., Baltimore D., Lisanti M.P. *Reduction of caveolin and caveolae in oncogenically transformed cells*. Proc Natl Acad Sci U.S.A., 92, 1381-85, 1995.
- Kondziolka D., Lunsford L.D., Claassen D. et al. *Radiobiology of radiosurgery: part II. The rat C6 glioma model*. Neurosurgery, 31, 2, 280-8, 1992.
- Kornblith P.L. *The role of cytotoxic chemotherapy in treatment of malignant brain tumors*. Surg. Neuro., 44, 551-552, 1995.
- Kruse C.A., Molleston M.C. Parks E.P., et al. *A rat glioma model, CNS-1, with invasive characteristics similar to those of human gliomas: a comparison to 9L gliosarcoma*. Jour. of Neuro-Onc., 22, 191-200, 1994.
- Kumar A., Collins H.M., Scholefield J.H. et al. *Increased type-IV collagenase (MMP-2 and MMP-9) activity following preoperative radiotherapy in rectal cancer*. British J. of Cancer, 82, 4, 960-965, 2000.
- Labelle M. mémoire intitulé: *Isolement et caractérisation des cellules endothéliales de différents tissus*. Université de Québec à Montréal., 2000
- Lampert K., Machein U., Machein M.R. et al. *Expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in human brain tumors*. Am. J. Pathol., 153, 429-437, 1998.
- Lamy S., Gingras D., and Beliveau R. *Green tea catechins inhibit vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation*. Cancer Res., 62, 381-5, 2002.
- Landis SH., T. Murray, S. Bolden et al. *Cancer statistics*. CA Cancer J. Clin., 49, 8-31, 1999.

- Landuyt W., Ahmed B., Nuyts S., et al. *In vivo antitumor effect of vascular targeting combined with either ionizing radiation or anti-angiogenesis treatment.* Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 49, 443-450, 2001.
- Lee G., Dallas S., Hong M. et al. *Drug transporters in the central nervous system: brain barriers and brain parenchyma considerations.* Pharm. reviews, 53, 569-596, 2001.
- Lesniak M.S., Langer R., Brem H. *Drug delivery to tumors of the central nervous system.* Curr. Neurol. Neurosci. Rep., 1, 210-16, 2001.
- Levin V.A. *Chemotherapy for brain tumors of astrocytic and oligodendroglial lineage: the past decade and where we are heading.* Neuro-oncol., 1, 69-80, 1999.
- Liebel S.A. et G.E. Sheline. *Radiation therapy for neoplasms of the brain.* J. Neurosurgery, 70, 371-379, 1987.
- Lijnen HR, Ugwu F, Bini A, Collen D. *Generation of an angiostatin-like fragment from plasminogen by stromelysin-1 (MMP-3).* Biochemistry, 37(14), 4699-702, 1998.
- Lin J.K., Chen P.C., Ho C.T., et al. *Inhibition of xanthine oxidase and suppression of intracellular reactive oxygen species in HL-60 cells by theaflavin-3,3'-digallate, (-)-epigallocatechin-3-gallate, and propyl gallate.* J. Agric. Food Chem., 48, 2736-43, 2000.
- Liu J., Razani B., Tang S., et al. *Angiogenesis activators and inhibitors differentially regulate caveolin-1 expression and caveolae formation in vascular endothelial cells. Angiogenesis inhibitors block vascular endothelial growth factor-induced down-regulation of caveolin-1.* J. Biol. Chem., 274, 15781-85, 1999.
- Liu J., Wang X.B, Park D.S, et al. *Caveolin-1 expression enhances endothelial capillary tubule formation.* J. of biol. Chem., 277, 12, 10661-10668, 2002.
- Liu P., Rudick M. et Anderson R.G.W. *Multiple functions of caveolin-1.* J. of Biol. Chem., 277, 41295-41298, 2002.
- Loeffler J.S., E. Alexander, W.M. Wara et al. *Radiosurgery as part of the initial management of patients with malignant Glioma.* J. Clin. Oncology, 10, 541-549, 1992.
- Maasilta P., Salonen E.M. Vaheri A. et al. *Procollagen-III in serum, plasminogen activation and fibronectin in bronchoalveolar lavage fluid during and following irradiation of human lung.* Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 20, 5, 973-80, 1991.

- Maeshima Y., Colorado P.C., Torre A., et al. *Distinct antitumor properties of a type IV collagen domain derived from basement membrane*. J. Biol. Chem., 275, 21340-21348, 2000.
- McCulloch, P.G., Ochiai A., O'Dowd G.M. et al. *Comparison of the molecular genetics of c-erb-B2 and p53 expression in stomach cancer in Britain and Japan*. Cancer, 75, 920-5, 1995.
- Mehta M.P., J. Masciopinto, J. Rozental et al. *Stereotactic radiosurgery for glioblastoma: report of a prospective study evaluating prognostic factors and analyzing long-term survival*. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 30, 541-549, 1994.
- Méresse S., Dehouck M.P., Delorme P., et al. *Bovine brain endothelial cells express tight junctions and monoamine oxidase activity in long-term culture*. J. Neurochem. 53, 1363-1371, 1989.
- Miller D.W. *Immunology of the blood-brain barrier*. J. Neurovirol., 5, 570-578, 1999.
- Mitscher L.A., Jung M., Shankel D., et al. *Chemoprotection: a review of the potential therapeutic antioxidant properties of green tea (Camellia sinensis) and certain of its constituents*. Med. Res. Rev., 17, 327-65, 1997.
- Mohanam S., Wang S.W., Rayford A., et al. *Expression of tissue inhibitors of metalloproteinases: negative regulators of human glioblastoma invasion in vivo*. Clin. Exp. Metastasis, 13, 57-62, 1995.
- Moser T.L, Stack M.S., Wahl M.L., et al. *The mechanism of action of angiostatin: can you teach an old dog new tricks?* Thromb Haemost, 87, 394-401, 2002.
- Moses M.A., Sudhalter J. et Langer R. *Identification of an inhibitor of neovascularization from cartilage*. Science, 248, 1408-1410, 1990.
- Moses, M.A. *The regulation of neovascularisation by matrix metalloproteinases and their inhibitors*. Stem Cells, 15, 180-189, 1997.
- Nagase H. *Activation mechanisms of matrix metalloproteinases*. Biol Chem. 378, 151-60, 1997.
- Nakachi K., Suemasu K., Suga K., et al. *Jpn J. Influence of drinking green tea on breast cancer malignancy among Japanese patients*. Cancer Res., 89, 254-61, 1998.
- Nakagawa t., Kubota T., Kabuto M. et a l. *Production of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 by human brain tumors*. J. Neurosurg., 81, 60-77, 1994.

- Nakano A., Tani E., Miyazaki K. et al. *Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human gliomas*. J. Neurosurg, 83, 298-307, 1995.
- Nelson A.R., Fingleton B., Rothenberg M.L. et al. *Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications*. J. of Clinical Onc., 18, 1135-1149, 2000.
- Neufeld G., Cohen T., Gengrinovitch et al. *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors*. FASEB J., 13, 9-22, 1999.
- Nguyen M., Folkman J., J et Bischoff J. *1-Deoxymannojirimycin inhibits capillary tube formation in vitro. Analysis of N-linked oligosaccharides in bovine capillary endothelial cells*. J. Biol. Chem., 267, 26157-26165, 1992.
- Ning S., Laird D., Cherrington J.M., and Knox S.J. *The antiangiogenic agents SU5416 and SU6668 increase the antitumor effects of fractionated irradiation*. Radiat. Res., 157, 45-51, 2002.
- Nirmala C., Jasti S. L., Sawaya R., et al. *Effects of radiation on the levels of MMP-2, MMP-9 and TIMP-1 during morphogenic-glia-endothelial cell interactions*. Int. J. Cancer. 88, 766-771, 2000.
- O'Mahony C.A., Seidel A., Albo D., et al. *Angiostatin generation by human pancreatic cancer*. J. surg. Res., 77, 55-58, 1998.
- O'Reilly M. S., Boehm T., Shing Y., et al. *Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth*. Cell, 88, 277-285, 1997.
- O'Reilly M.S. Holmgren L., Chen C., et al. *Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice*. Nat. Med, 2, 689-92, 1996.
- O'Reilly M.S., Holmgren L., Shing Y., et al. *Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma*. Cell, 79, 315-328, 1994.
- O'Reilly M.S., Wiederschain D., Stetler Stevenson W.G., et al. *Regulation of angiostatin production by matrix metalloproteinase-2 in a model of concomitant resistance*. J. Biol. Chem., 274, 29568-29571, 1999.
- Okada Y., Morodomi T., Enghild J.J., et al. *Matrix metalloproteinase 2 from human rheumatoid synovial fibroblasts. Purification and activation of the precursor and enzymatic properties*. Eur J Biochem., 194, 721-30, 1990.
- Papetti M. et Herman I.M. *Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis*. Am. J. Physiol. Cell Physiol., 282, C947-C970, 2002.

- Pardridge W.M. *Blood-brain barrier biology and methodology*. J Neurovirol., 5,6, 556-69, 1999.
- Pardridge W.M. *Blood-brain barrier transport mechanisms*. Primer on cerebrovascular diseases, 21-25, San Diego, CA : Academic Press, 1997.
- Pardridge W.M. *Targeting neurotherapeutic agents through the blood-brain barrier*. Arch. Neurol., 59, 35-40, 2002.
- Paris F., Fuks Z., Kang A., et al. *Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice*. Science, 293, 293-297, 2001.
- Parney I.F., Chang S.M. *Current chemotherapy for glioblastoma*. Cancer J., 9, 3, 149-56, 2003.
- Paspalas C.D., Papadopoulos G.C. *Ultrastructural relationships between noradrenergic nerve fibers and non-neuronal elements in the rat cerebral cortex*. Glia, 17, 133-46, 1996.
- Patterson B.C. and Sang Q.A. *Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/type IV collagenase (MMP-9)*. J. Biol. Chem., 272, 28823-28825, 1997.
- Pedersen P-H, Rucklidge G.J., Mork S.J et al. *Leptomeningeal tissue: a barrier against brain tumor cell invasion*. J Natl Cancer Inst., 86, 1593-1599, 1994.
- Pepper M.S. *Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 21, 1104-1117, 2001.
- Pike S.E., Yao L., Jones K.D., et al. *Vasostatin, a calreticulin fragment, inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth*. J. Exp. Med., 188, 2349-2356, 1998.
- Pisters K.M.W., Newman R.A., Coldman B., et al. *Phase I trial of oral green tea extract in adult patients with solid tumors*. J. Clin. Oncol., 19, 1830-1838, 2001.
- Plow E.F., Herren T., Redlitz A., et al. *The cell biology of the plasminogen system*. FASEB J., 9, 939-945, 1995.
- Prados M.D. et Levin V. *Biology and treatment of malignant glioma*. Seminars in oncology, 27, 3, suppl 6, 1-10, 2000.
- Prados M.D., Schold S.C. J.R. S.C., Fine H.A. et al. *A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study of RMP-7 in combination with administered intravenously for the treatment of recurrent malignant glioma*. Neuro-oncol., 5, 2, 96-103, 2003.

- Qian L.W., Mizumoto K., Urashima T., et al. *Radiation-induced increase in invasive potential of human pancreatic cancer cells and its blockade by a matrix metalloproteinase inhibitor, CGS27023*. Clin. Cancer Res., 8, 1223-1227, 2002.
- Quigley M.R. et J.C. Maroon. *Relationship between survival and the extent of resection in patients with supratentorial malignant glioma*. Neurosurgery, 29, 385-389, 1991.
- Rao J.S, Steck P.A., Mohanam S. et al. *Elevated levels of M(r) 92 000 type IV collagenase in human brain tumors*. Cancer Res., 53, 2208-2211, 1993.
- Rao U.S., Fine R.L. Scarborough G.A. *Antiestrogens and steroid hormones: substrates of the human p-glycoprotein*. Biochem Pharmacol, 48, 2, 287-92, 1994.
- Rastinejad F., Polverini P.J. et Bouck N.P. *Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene*. Cell, 56, 345-355, 1989.
- Raub T.J, Kuentzel S.L. et Sawada G.A. *Permeability of bovine brain microvessel endothelial cells in vitro: Barrier tightening by a factor released from astrogloma cells*. Exp. Cell. Res., 199, 330-40, 1992.
- Razani B. et Lisanti M.P. *Caveolins and caveolae: molecular and functional relationships*. Experimental Cell Research, 271, 36-44, 2001.
- Razani B., Engelman J.A., Wang X.B., et al. *Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities*. J. Biol. Chem., 276, 38121-38138, 2001.
- Razani B., Schlegel A., Liu J. et al. *Caveolin-1, a putative tumour suppressor gene*. Biochem. Soc. Trans, 29, 494-499, 2001.
- Régina A., Demeule M., Bérubé A. et al. *Differences in multidrug resistance phenotype and matrix metalloproteinases activity between endothelial cells from normal brain and glioma*. Journal of Neurochem., 84, 316-324, 2003.
- Régina A., Demeule M., Laplante A. et al. *Multidrug resistance in brain tumors : roles of the blood-brain barrier*. Cancer and metastasis reviews, 20, 13-25, 2001.
- Risau W. *Induction of blood-brain barrier endothelial cell differentiation*. Ann. NY Acad. Sci., 633, 405-419, 1991.
- Rist R.J., Romero L.A., Chan M.W. et al. *F-actin cytoskeleton and sucrose permeability of immortalised rat brain microvascular endothelial cell monolayers : effects of cyclic AMP and astrocytic factors*. Brain Res., 768, 10-18, 1997.

- Riva P., Franceschi G., Frattarelli M., et al. *¹³¹I radioconjugated antibodies for the locoregional radioimmunotherapy of high-grade malignant glioma- phase I and II study.* Acta Oncol., 38, 351-359, 1999.
- Robbins P.D., Ghivizzani S.C. *Viral vectors for gene therapy.* Pharmacol. Ther., 80, 35-47, 1998.
- Roux F., Durieu-Trautmann O., Chaverot N., Claire M., Mailly P., Bourre J.M., Strosberg A.D., Couraud P.O. *Regulation of gamma-glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase activities in immortalized rat brain microvessel endothelial cells.* J Cell Physiol, 159, 1, 101-113, 1994.
- Rubin L.L., Hall D.E., Porter S., et al. *A cell culture model of the blood-brain barrier.* J. Cell. Biol., 115, 1725-35, 1991.
- Russell D.S. et Rubinstein L.J. *Tumours of central neuroepithelial origin.* Pathology of Tumours of the Nervous System, 5^{ème} édit. Williams and Wilkins, Londres, 83-350, 1989.
- Rutka J.T., Apodaca G., Stern R. et al. *The extracellular matrix of the central and peripheral nervous systems: structure and function.* J. Neurosurg., 69, 155-170, 1988.
- Salcman M. *Survival in glioblastoma: historical perspective.* Neurosurgery, 7, 435-439, 1980.
- Sarkadi B., Price E.M., Boucher R.C. et al. *Expression of the human multidrug resistance cDNA in insect cells generates a high activity drug-stimulated membrane ATPase.* J Biol Chem., 267, 7, 4854-8, 1992.
- Sawada T., Kato Y., Sakayori N., et al. *Expression of the multidrug-resistance p-glycoprotein (P-gp, MDR-1) by endothelial cells of the neovasculature in central nervous system tumors.* Brain tumor pathol., 16, 23-27, 1999.
- Sazuka M., Imazawa H., Shoji Y., et al. *Inhibition of collagenases from mouse lung carcinoma cells by green tea catechins and black tea theaflavins.* Biosci Biotechnol Biochem, 61, 1504-6, 1997.
- Scherrmann J.M. *Exchanges through the blood-brain barrier.* Ann Pharm Fr. 60, 6, 372-9, 2002.
- Schinkel A.H., Smit J.J., Tellingen O.V., et al. *Disruption of the mouse mdr la p-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs.* Cell, 77, 491-502, 1994.
- Schneeberger E.E et Lynch R.T. *Tight junctions, their structure, composition and function.* Circ. Res., 55, 723-733, 1984.

- Setiawan V.W., Zhang Z.F. Yu G.P., et al. *Protective effect of green tea on the risks of chronic gastritis and stomach cancer*. Int. J. Cancer, 92, 600-4, 2001.
- Shapiro S.D., Senior R.M. *Matrix metalloproteinases*. Parks, Mecham, Eds: Academic Press, San Diego, 185, 1998.
- Shapiro W.R., S.B. Green, P.C. Burger et al. *Randomized trial of three chemotherapy regimens and two radiotherapy regimens postoperative treatment of malignant glioma: Brain Tumor Cooperative Group Trial 8001*. J. Neurosurg., 71, 1-9, 1989.
- Shapiro W.R., Shapiro J.R. *Biology and treatment of malignant glioma*. Oncology, 12, 233-246, 1998.
- Shaul P.W., Anderson R.G. *Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction*. Am. J. Physiol., 275, L843-51, 1998.
- Shibata S. *Ultrastructure of capillary walls in human brain tumors*. Acta Neuropathol. (Berl), 78, 561-571, 1989.
- Simpson, J.R., Horton J., Scott C. et al. *Influence of location and extent of surgical resection on survival of patients with glioblastoma multiforme: results of three consecutive radiation therapy oncology (RTOG) clinical trials*. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 26, 239-244, 1993.
- Smith Q.R. et Rapoport S.I. *Cerebrovascular permeability coefficients to sodium, potassium and chloride*. J. Neurochem., 46, 1732-42, 1986.
- Sonpavde G. *Bevacizumab in renal-cell cancer*. N Engl J Med., 349, 17, 1674, 2003.
- Sonveaux P., Dessy C., Brouet A. et al. *Modulation of the tumor vasculature functionality by ionizing radiation accounts for tumor radiosensitization and promotes gene delivery*. FASEB J., 16, 1979-81, 2002.
- Stewart P.A. et Wiley M.J. *Developing nervous tissue induces formation of blood-brain barrier characteristics in invading endothelial cells: a study using quail-chick transplantation chimeras*. Dev. Biol., 84, 184-92, 1981.
- Stoner G.D., Mukhtar H.J. *Polyphenols as cancer chemoprotective agents*. J Cell Biochem., 22, 169-80, 1995.
- Sung H., Nah J., Chun S., et al. *In vivo antioxidant effect of green tea*. Eur. J. Clin. Nutr., 54, 527-9, 2000.
- Tamanini C., De Ambrogi M. *Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum*. Reprod Domest Anim. 39, 206-16, 2004.

- Temsamani J., Rousselle C., Rees A.R. et al. *Vector-mediated drug delivery to the brain*. *Expert Opin. Biol. Ther.*, 1, 773-82, 2001.
- Terzis A.J., Thorsen F., Heese O., et al. *Proliferation, migration and invasion of human glioma cells exposed to paclitaxel (Taxol) in vitro*. *Br. J. Cancer*, 75, 1744-1452, 1997.
- Thomas H. and Coley H.M. *Overcoming multidrug resistance in cancer : an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein*. *Cancer Control*, 10, 159-165, 2003.
- Tysnes B.B. et Mahesparan R. *Biological mechanisms of glioma invasion and potential therapeutic targets*. *J. of Neuro-Oncology*, 53, 129-147, 2001.
- Tysnes B.B., Larsen L.F. Ness G.O. et al. *Stimulation of glioma-cell migration by laminin and inhibition by anti-alpha3 and anti-beta1 integrin antibodies*. *Int. J. Cancer*, 67, 777-784, 1996.
- Vorbrodth A.W., Dobrogowska D.H. *Molecular anatomy of intercellular junctions in brain endothelial and epithelial barriers: electron microscopist's view*. *Brain Res Brain Res Rev.* 42, 3, 221-42, 2003.
- Watts M.E., Parkins C.S., Chaplin D.J. *Influence of hypoxia and tumour-conditioned medium on endothelial cell adhesion molecule expression in vitro*. *Anticancer Res.*, 22, 953-958, 2002.
- Wedge S.R., J.K. Proteus, B.L. May et al. *Potentiation of protemozolomide and BCNU cytotoxicity by O(6)-benzylguanine: a comparative study in-vitro*. *Br J. Neurosurg.*, 70, 573-577, 1996.
- Wesseling P., D.J. Ruiter et P.C. Burger. *Angiogenesis in Brain Tumors; Pathobiological and Clinical Aspects*. *J Neurooncol.*, 32, 253-265, 1997.
- Westphal J.R., Ruiter D.J. et De Waal R.M.W. *Anti-angiogenic treatment of human cancer: pitfalls and promises*. *Int. J. Cancer.*, 86, 870-873, 2000.
- Wick W., Wick A., Schulz J.B., et al. *Prevention of irradiation-induced glioma cell invasion by temozolomide involves caspase 3 activity and cleavage of focal adhesion kinase*. *Cancer Res.*, 62, 1915-1919, 2002.
- Wiestler O., P. Kleihues et A.E. Pegg. *O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity in human brain and brain tumors*. *Carcinogenesis*, 5, 121-124, 1984.
- Wild-Bode C., Weller M., Rimner A., et al. *Sublethal irradiation promotes migration and invasiveness of glioma cells: implications for radiotherapy of human glioblastoma*. *Cancer Res.*, 61, 6, 2744-50, 2001.

- Wind T., Hansen M., Jensen J.K. et al. *The molecular basis for anti-proteolytic and non-proteolytic functions of plasminogen activator inhibitor type-1: roles of the reactive centre loop, the shutter region, the flexible joint region and the small serpin fragment.* Biol. Chem, 383, 1, 21-36, 2002.
- Yang J.C., Haworth L., Sherry R.M. et al. *A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer.* N. Engl. J. Med., 349, 5, 427-34, 2003.
- Yi M. and Ruoslahti E. *A fibronectin fragment inhibits tumor growth, angiogenesis, and metastasis.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 98, 620-624, 2001.

ANNEXE I

Article publié par notre laboratoire traitant de la modulation de l'expression de la cavéoline dans le réseau vasculaire des gliomes et de l'effet de la radiothérapie.

Down-Regulation of Caveolin-1 in Glioma Vasculature: Modulation by Radiotherapy

Anthony Régina,¹ Julie Jodoin,¹ Paul Khoueir,¹ Yannève Rolland,¹ France Berthelet,² Robert Moundjian,² Laurence Fenart,³ Romeo Cecchelli,³ Michel Demeule,¹ and Richard Béliveau^{1*}

¹Laboratoire de Médecine Moléculaire, Université du Québec à Montréal-Hôpital Ste.-Justine, Montréal, Québec, Canada

²Département de Pathologie, Hôpital Notre-Dame, Montréal, Québec, Canada

³Laboratoire Mixte Institut Pasteur de Lille, Université d'Artois, Lens Cedex, France

Primary brain tumors, particularly glioblastomas (GB), remain a challenge for oncology. An element of the malignant brain tumors' aggressive behavior is the fact that GB are among the most densely vascularized tumors. To determine some of the molecular regulations occurring at the brain tumor endothelium level during tumoral progression would be an asset in understanding brain tumor biology. Caveolin-1 is an essential structural constituent of caveolae that has been implicated in mitogenic signaling, oncogenesis, and angiogenesis. In this work we investigated regulation of caveolin-1 expression in brain endothelial cells (ECs) under angiogenic conditions. *In vitro*, brain EC caveolin-1 is down-regulated by angiogenic factors treatment and by hypoxia. Coculture of brain ECs with tumoral cells induced a similar down-regulation. In addition, activation of the p42/44 MAP kinase is demonstrated. By using an *in vivo* brain tumor model, we purified ECs from gliomas as well as from normal brain to investigate possible regulation of caveolin-1 expression in tumoral brain vasculature. We show that caveolin-1 expression is strikingly down-regulated in glioma ECs, whereas an increase of phosphorylated caveolin-1 is observed. Whole-brain radiation treatment, a classical way in which GB is currently being treated, resulted in increased caveolin-1 expression in tumor isolated ECs. The level of tumor cells spreading around newly formed blood vessels was also elevated. The regulation of caveolin-1 expression in tumoral ECs may reflect the tumoral vasculature state and correlates with angiogenesis kinetics. © 2003 Wiley-Liss, Inc.

Key words: caveolin-1; angiogenesis; brain tumors; endothelial cells; irradiation

Under normal conditions, brain vasculature constitutes a highly differentiated structure, the blood–brain barrier (BBB), that allows maintenance of brain homeostasis and protects the brain from potentially toxic molecules. Brain tumor progression is accompanied by intensive angiogenesis, the formation of new blood vessels first described by Folkman (1995). Characterization of the mo-

lecular events occurring in angiogenic brain tumor vasculature may be a determinant in aggressive behavior and invasiveness. Several lines of evidence suggest that caveolin-1 is a tumor suppressor gene; it is often down-regulated in human tumors (Galbiati et al., 1998). In this study, we investigated caveolin-1 regulation in brain capillary endothelial cells (ECs) under angiogenic conditions. Caveolae are flask-shaped plasma membrane invaginations involved in many cellular events, such as signal transduction, lipid and protein sorting, endocytosis, and potocytosis. Caveolins are the principal protein components of caveolae. The caveolin gene family consists of caveolin-1, -2, and -3. Caveolin-1 and -2 are coexpressed particularly in adipocytes, ECs, and epithelial cells as well as in fibroblasts (Shaul and Anderson, 1998). In the brain, the three caveolin subtypes have been detected *in vivo* by affinity purification and immunohistochemistry. Caveolin-1 and -2 are expressed in microvessels, predominantly in ECs but also in pericytes and astrocytes, whereas caveolin-3 expression is restricted to astrocytes (Ikezu et al., 1998; Virgintino et al., 2002). Terminally differentiated cells expressed a higher level of caveolin, in contrast to transformed cells and some tumoral cells, in which caveolin-1 is down-regulated (Koleske et al., 1995; Okamoto et al., 1998). The involvement of caveolin-1 in angiogenesis remains subject to controversy. Angiogenesis activators have been shown to down-regulate EC's caveolin-1 expression (Liu et al., 1999), and knock-down of caveolin-1 by antisense oligonucleotides impairs angiogenesis (Grifoni et al., 2000). However, caveolin-1 expression also enhances endothelial capillary tubule formation (Liu et al., 2002). Those results suggest that caveolin-1 may act at

The first two authors contributed equally to this work.

*Correspondence to: Richard Béliveau, Laboratoire de Médecine Moléculaire, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3P8.

Received 29 July 2003; Revised 7 October 2003; Accepted 8 October 2003

different levels during the angiogenesis process, which contains several stages with fine regulation.

The phenotypes of ECs that make up capillaries are known to differ as a result of the microenvironment to which they are exposed. Brain ECs are particularly responsive to such regulation. In the present study we investigated potential regulation of caveolin-1 expression at the level of the brain tumoral vasculature. We first used brain ECs cultured under angiogenic conditions to show that such a regulation was occurring. We then used an EC-isolation approach to study caveolin-1 expression and the effect of irradiation on the tumoral vasculature of rat gliomas. This magnetic cell sorting (MACS) approach allows isolation of enriched EC populations from tissues. We have already with this approach demonstrated phenotypical differences among ECs from lung, kidney, and brain (Demeule et al., 2001) and between ECs from normal and from tumoral vasculature (Régina et al., 2003). The results reported here identify a new molecular regulation at the tumoral vasculature by showing that caveolin-1 expression is down-regulated in tumoral brain ECs. We also demonstrate that irradiation treatment exerts the opposite effects on this regulation.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

MACS was performed with microbeads, a MidiMacs separation unit, and positive-selection MACS columns from Miltenyi Biotec (Auburn, CA). Mouse anti-PECAM-1 antibody (Cedarlane Laboratories Limited, Hornby, Ontario, Canada) that was linked to microbeads is specific to rat PECAM-1 (clone No. TLD-3A12). Goat anti-PECAM-1 antibody, used in Western blotting analysis, was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) and cross-reacts with rat tissue according to the manufacturer's product information. The monoclonal antibody directed against the endothelial nitric oxide synthase (eNOS; Transduction Laboratories, Mississauga, Ontario, Canada) was raised against the C-terminal portion of the protein and cross-reacts with human, rat, and mouse tissues. Erk1/2 antibody (p44/42 MAP kinase antibody) was from Cell Signaling (Beverly, MA) and was raised against a synthetic peptide derived from the sequence of rat p42 MAP kinase. Phospho-ERK1/2 antibody (Cell Signaling) was raised against a synthetic phosphopeptide corresponding to residues around Thr202/Tyr204 of human p44 MAP kinase and cross-reacts with human, rat, and mouse tissues. Antibody directed against caveolin-1 (Transduction Laboratories, Lexington, KY) was generated against a fragment of human caveolin-1 and cross-reacts with human, rat, dog, mouse, and chick tissues according to the manufacturer's product information. Caveolin (PY14) phosphospecific antibody (BD Biosciences Pharmingen, Mississauga, Ontario, Canada) was generated from human caveolin-1 and cross-reacts with rat tissue. Electrophoresis reagents were purchased from Bio-Rad (Mississauga, Ontario, Canada). IgG horseradish peroxidase-linked whole antibody was from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA), and the chemiluminescence (ECL) reagent was purchased from Amersham-Pharmacia Biotech (Baie-d'Urfé, Québec, Canada). Cell culture

media were from Gibco BRL (Burlington, Ontario, Canada). Others reagents were from Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada).

Cell Culture

The CNS-1 murine glioma cell line, kindly provided by Dr. W.F. Hickey (Hanover, NH), was cultivated in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). RBE4 immortalized rat brain microvessel ECs (Roux et al., 1994) were maintained in α -MEM/Ham's F-10 (1:1) supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 2 mM glutamine, 300 μ g/ml gentamicin (G418), and 1 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF).

Isolation of rat astrocytes and the establishment of an *in vitro* model of the BBB were performed as previously described (Fenart et al., 1999; Cecchelli et al., 1999). Bovine brain capillary endothelial cells (BBCEC) were plated onto small culture plate inserts (Millicell PC; Millipore Corp., Bedford, MA) and set into six-well dishes containing astrocytes. The coculture medium was composed of DMEM supplemented with 10% heat-inactivated horse serum, 2 mM glutamine, 50 μ g/ml gentamicin, and 1 ng/ml bFGF. BBCEC formed a confluent monolayer after 5 days, and experiments were performed 7 days following confluence.

Brain Tumor Implantation

All animal experiments were evaluated and approved by the Institutional Committee for Good Animal Practices (UQAM, Montréal, Québec, Canada). Intracerebral tumor implantation was performed as previously described (Régina et al., 2003). Anesthetized 250–280-g male Lewis rats (Charles River, Québec, QC, Canada) were placed in a stereotaxic frame; then, a burr hole was drilled into the right frontal cortex, and viable CNS-1 glioma cells (5×10^4) suspended in 5 μ l of RPMI 1640 were injected at a depth of 4 mm at a point 3 mm lateral to the midline and 2 mm anterior to the bregma.

Treatment Schedule

In Vivo Treatment. In total, 28 rats were divided into four groups ($n = 7$). Five days after implantation, two groups were exposed to radiotherapy in the form of whole-head irradiation by using a single 15-Gy dose delivered with an Elekta SL75 linear accelerator with a 6-MV photon beam. Animals from one control and one irradiated group were sacrificed when rats from the control group began to lose weight. Two brains from each rat group were recovered, fixed in 10% buffered formalin, and embedded in paraffin for histopathological evaluation. Five brains were used for EC isolation. A survival study was performed with animals from the two remaining groups.

In Vitro Treatment. Confluent RBE4 cells in serum-free medium were irradiated using the same apparatus at lower single dose of 3 Gy. Cells were analyzed 24 hr posttreatment. Moreover, RBE4 cells and BBCEC were exposed to hypoxia during 24 hr in a controlled-atmosphere culture chamber, an airtight incubation apparatus into which a gas mixture containing 1% O₂, 5% CO₂, 94% N₂ was flushed. A compact gas O₂ controller (Proox model 110) was used to maintain a constant gas composition. Control cells were cultivated under normoxic conditions (20% O₂, 5% CO₂, and 75% N₂).

Isolation of EC Fractions

From normal brain, meninges-free cortex was homogenized in Ringer's solution, mixed with dextran T-70 (31%), and centrifuged at 4°C to remove myelin. Intracerebral gliomas were dissected from the tumor-injected animals and minced. Isolation of ECs was performed as previously described (De-meule et al., 2001; Régina et al., 2003) with a MidiMacs separation unit and positive selection using MACS columns from Miltenyi Biotec. Briefly, samples were incubated with collagenase A (1 mg/ml), passed through Nitex filters (180 and 30 µm), and incubated with microbeads linked to the anti-PECAM-1 antibody (20 µl/10⁷ cells). ECs bound by the magnetic microbeads were selected with the separation unit. Cell fractions retained by the column were washed with phosphate-buffered saline (PBS), followed by centrifugation at 600g for 5 min. The final pellets containing ECs were kept at -80°C until use.

Western Blot Analysis

Normal brain and brain tumor tissue samples, isolated ECs, RBE4, and BBCEC were homogenized in lysis buffer (150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% Nonidet P-40, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM sodium orthovanadate, 10 mM Tris HCl, pH 7.4, containing protease inhibitors (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). Lysates were then centrifuged at 12,000g for 10 min to remove insoluble debris, resuspended in Laemmli electrophoresis buffer, heated for 5 min at 95°C, and separated on SDS-PAGE gels. After electrophoresis, proteins were transferred onto PVDF membranes, and the immunodetection of PECAM-1, caveolin-1, pCav, eNOS, ERK and pERK was performed with specific antibodies. Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-IgG antibodies were used as secondary antibodies, and immunoreactive proteins were revealed with ECL reagents (Amersham-Pharmacia Biotech). Protein concentrations were determined with the micro-BCA protein assay kit from Pierce (Rockford, IL). PVDF membranes were further stained with Coomassie blue to ensure that equal gel protein loading was accomplished.

Assessment of Tumor Vascularization

Histopathological examination of hematoxylin-eosin-stained rat tumor brain sections was performed. Tumor vascularization was assessed by immunohistochemistry with a polyclonal rabbit antibody to human von Willebrand factor (factor VIII; Dako, Carpinteria, CA) as a marker for the cytoplasm of vascular ECs. Four-micrometer-thick brain tumor slices were treated with pronase, washed, and incubated with the antiserum to factor VIII (1/1500 dilution), followed by incubation with a biotinylated goat anti-rabbit antibody. Sections were then incubated with streptavidin-HRP and finally developed with 3,3'-diaminobenzidine (DAB⁺) substrate chromogen (Dako).

RESULTS

In Vitro Regulation of Brain EC Caveolin-1 Expression by Angiogenic Factors and Hypoxia

Brain capillary ECs expressed caveolin-1 (Ikezu et al., 1998; Virgintino et al., 2002). However, conditions that regulate caveolin-1 expression at the BBB remain

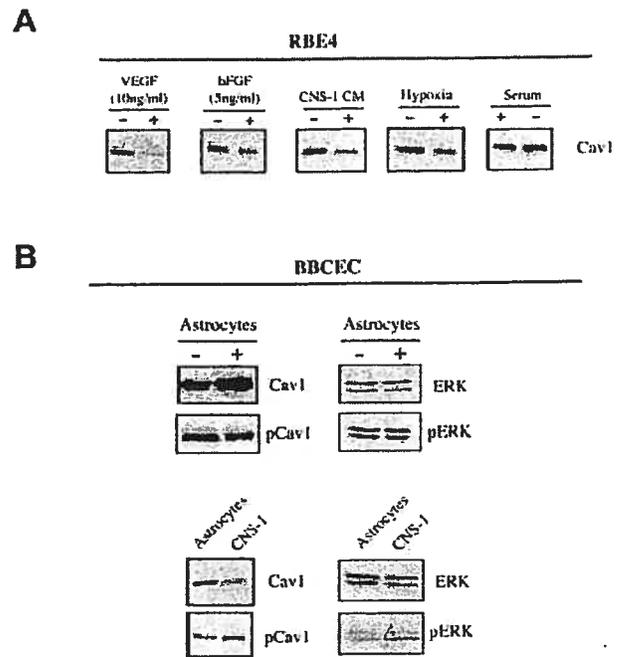


Fig. 1. Regulation of caveolin-1 expression in cultured brain ECs by angiogenic factors, serum deprivation, coculture conditions, and hypoxia. **A:** Caveolin-1 was detected in RBE4 cells treated with VEGF (10 ng/ml), bFGF (5 ng/ml), and glioma cell-conditioned medium (CNS-1 CM) subjected to normal (N) and hypoxic (H) conditions or to serum deprivation for 24 hr. **B:** BBCEC were grown with or without astrocytes as described in Materials and Methods. In addition, BBCEC cocultured with astrocytes were placed for 48 hr in coculture with CNS-1 cells grown in six-well plates. Immunodetection of caveolin-1, pCav-1, ERK, and pERK in BBCEC was performed. One representative experiment of three is shown.

unexplored. We first evaluated the effects of angiogenic factors and hypoxia on caveolin-1 expression in RBE4 immortalized rat brain microvessel ECs. Caveolin-1 expression was down-regulated in RBE4 cells after a 24-hr treatment with VEGF, bFGF, or glioma cell-conditioned medium (Fig. 1A). Moreover, 24 hr of hypoxia decreased caveolin-1 expression in RBE4 cells. An increase in hypoxia inducible factor 1- α (HIF-1) protein expression could be observed after only 4 hr of hypoxia in RBE4 cells (data not shown), showing that hypoxia-responsive genes are induced, as demonstrated by Turcotte et al. (2003) using CAKI-1 cells. However, those conditions did not cause EC injury, insofar as no cell cytotoxicity was measured when using a WST-1 assay (data not shown). In contrast, serum deprivation induced an up-regulation of caveolin-1 expression in RBE4 cells. Under normal conditions, astrocytes surrounding brain ECs exert a paracrine regulation on EC differentiation. We studied caveolin-1 regulation using BBCEC growing on filters in coculture with astrocytes, which is an accurate BBB model. BBCEC caveolin-1 expression increased by 35% in coculture con-

ditions compared with monoculture conditions (Fig. 1B). We also measured the phosphorylation of caveolin-1 by Western blot analysis, using an antibody that detected the phosphorylation of caveolin-1 at tyrosine 14. Caveolin-1 phosphorylation decreased by 50% in BBCEC cocultured with astrocytes. Thus, the ratio pCav/caveolin in BBCEC grown in the presence of astrocytes decreased (0.4) compared with the monoculture (1.0). Western blot analysis with a phosphospecific antibody that selectively recognizes only the activated/phosphorylated form of ERK1/2 and a phosphoindependent ERK1/2 antibody revealed that the ratio pERK/ERK was unaffected (1.0) in BBCEC cocultured with astrocytes compared with monoculture conditions (Fig. 1B).

We reproduced the change in the EC cellular environment that occurs during tumor progression by coculturing BBCEC with glioma cells (CNS-1). BBCEC filters that were first maintained in coculture with astrocytes were placed in coculture with CNS-1 cells for 48 hr. Under this condition, a down-regulation of caveolin-1 expression and an up-regulation of pCav were observed in BBCEC (Fig. 1B). The ratios pCav/Cav (2.0) and pERK/ERK (1.2) was increased in BBCEC exposed to CNS-1 cells. In addition, down-regulation of caveolin-1 occurs in BBCEC treated with 10 ng/ml VEGF or submitted to 24 hr of hypoxia (data not shown) as observed in RBE4 cells.

Regulation of Caveolin-1 Expression in Normal Brain and Brain Tumor Isolated ECs

Because caveolin-1 expression in BBB *in vitro* models was down-regulated by angiogenic factors, we investigated vascular caveolin-1 expression in an intracerebral brain tumor model. ECs from normal and tumoral rat brains were isolated by magnetic positive selection with a monoclonal antibody directed against the endothelial marker PECAM-1, or CD31, as previously reported (De-meule et al., 2001; Régina et al., 2003). Caveolin-1 expression was measured in normal brain and brain tumor homogenates (25 μ g protein) and in the final, isolated EC fractions (5 μ g proteins). Figure 2A shows that caveolin-1 was immunodetected at a very high level in isolated ECs from normal brain, whereas it was almost absent from isolated ECs of brain tumors. Even a fivefold increase in the amount of protein loaded was not sufficient to immunodetect caveolin-1 in the homogenates, reflecting the high level of caveolin expression in normal-brain ECs. In isolated ECs of brain tumors, caveolin-1 expression and caveolin-1 phosphorylation decreased by 75% and 44% respectively, compared with isolated ECs from normal brain. Thus, the ratio pCav/Cav was highly increased in tumoral brain ECs (2.2) compared with normal brain ECs (1.0), suggesting that the remaining caveolin-1 is highly phosphorylated. In addition, the ratio pERK/ERK in brain tumor ECs is increased (1.4) compared with normal brain ECs (1.0), indicating that ERK1/2 is activated in isolated tumor ECs (Fig. 2B). PECAM-1 immunodetection in the same samples shows that high, equivalent enrichments in PECAM-1 expression were obtained in

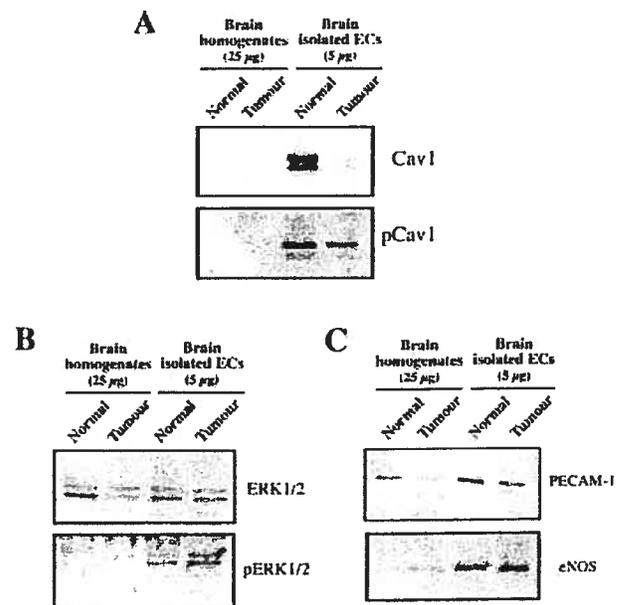


Fig. 2. Western blot analysis of caveolin-1, pCav-1, ERK, pERK, and EC marker expression in homogenates and isolated ECs from normal brain and brain tumor. Twenty-five micrograms of protein from normal brain (NB) and brain tumor (BT) homogenates and 5 μ g of protein from normal brain and brain tumor-isolated ECs were separated on a 12.5% polyacrylamide gel for caveolin-1/pCav-1 (A) and ERK/pERK detection (B) and a 7.5% gel for eNOS and PECAM-1 detection (C). One representative experiment of three is shown.

both EC fractions compared with their homogenates. We examined, in addition to that of PECAM-1, the expression level of eNOS in ECs, as an endothelial cell marker. Highly enriched eNOS expression levels were seen in ECs isolated from both samples compared with their homogenates. No differences in the expression levels of eNOS were observed between EC fractions isolated from normal brain or from brain tumor (Fig. 2C).

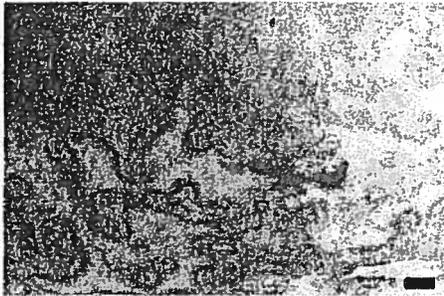
Effect of Radiotherapy in Glioma Tumor Model

Because radiotherapy is a current treatment for glioma, we investigated the effect of irradiation on the molecular regulation identified in brain tumoral endothelium. First, hematoxylin-eosin staining was performed on brain tumor slices from untreated and irradiated rat brains. Irradiation induced a large increase in the necrotic area center of the tumor, as can be clearly observed in Figure 3A. Survival of rats with intracerebral glioma exposed or not to a single 15-Gy dose of radiotherapy was measured (Fig. 3B). The median survival time for the untreated rat group was 20.3 ± 1.5 days. Irradiation treatment resulted in a very significant increase in survival, with a median survival time of 29.2 ± 5.1 days.

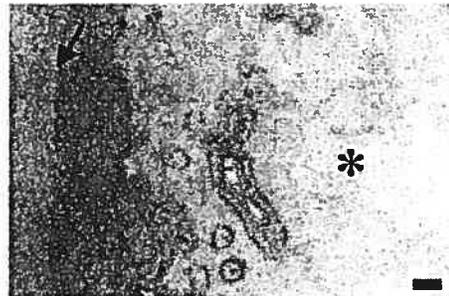
In addition, factor VIII immunohistochemistry was performed to assess vascularization at the tumor-brain interface, indicative of tumor invasion and tumoral

A

Untreated brain tumour



Irradiated brain tumour



B

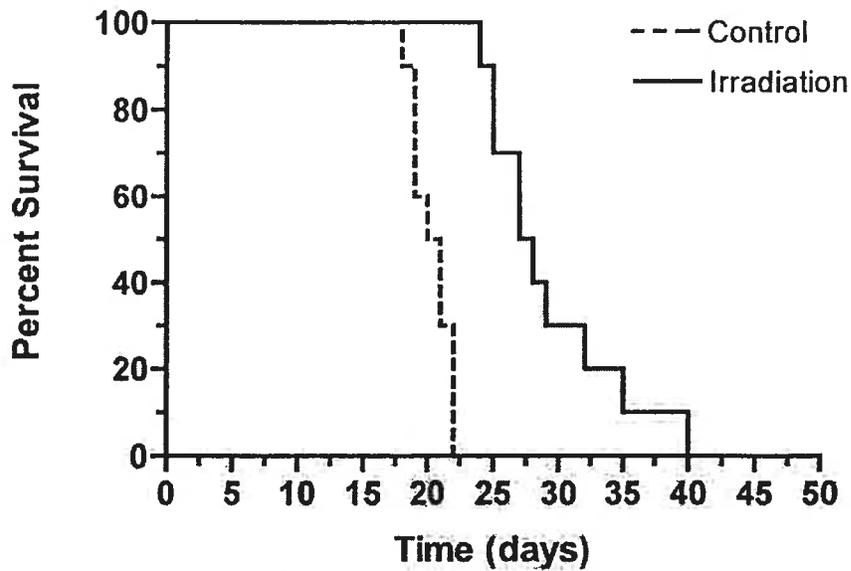


Fig. 3. Effect of radiotherapy on histopathological appearance of CNS-1 tumors and survival of rats with intracranial CNS-1 tumors. **A:** Hematoxylin-eosin staining of untreated and irradiated tumor. Irradiation induced a large increase in necrotic areas (asterisk) in the tumor center. The interface between normal brain and brain tumor is indicated by the arrow. **B:** Kaplan-Meier curve showing length of

survival of animals implanted with 5×10^4 CNS-1 cells as described in Materials and Methods. Each group represents $n = 7$ rats. Irradiation significantly increased survival (median survival 29 days vs. 20 days, $P < .0001$). Scale bars = 100 μm . Figure can be viewed in color online via www.interscience.wiley.com.

perivascular spreading. Compared with the case in normal brain endothelium, an increase in vascularization could be observed in tumor control animals, with hyperplasia of ECs. An increase in tumoral vascular spreading and stronger factor VIII cytoplasmic staining were observed after irradiation treatment. After irradiation, ECs were clearly surrounded by more numerous tumoral cells (Fig. 4A).

In Vitro and In Vivo Effects of Irradiation on Caveolin-1 Expression

Finally, regulation of caveolin-1 expression in tumoral vasculature following irradiation was investigated. Immunodetection of caveolin-1 was performed in homogenates and isolated ECs from brain tumors exposed or not to irradiation. Compared with the case in untreated brain tumor, an increase in caveolin-1 expression was seen both in tumor homogenate and in isolated tumor ECs from animals treated with irradiation. However, the level of caveolin-1 expression in isolated tumor ECs following irradiation remains lower than that in normal brain isolated ECs. Moreover, caveolin-1 was immunodetected in RBE4 cells exposed to irradiation (3 Gy). Irradiation treatment induced an increase in caveolin-1 expression (Fig. 4B).

DISCUSSION

Brain tumors, and in particular glioblastomas, are among the most angiogenic of all human tumors (Lopes, 2003). In a continuing attempt to define systematically the unique molecular profile of ECs under pathophysiologic conditions, we have already demonstrated phenotypic differences between normal brain and tumoral brain ECs (Régina et al., 2003) in important elements in brain tumor progression, matrix metalloproteinase activities, and the multidrug resistance phenotype. We report here that a drastic decrease in caveolin-1 expression occurs in brain tumor ECs. This decrease in caveolin-1 expression could be associated with an activation of the p42/44 MAP kinase cascade, shown by increased phosphorylation of ERK1/2. When the effects of irradiation treatment were monitored, we observed a reversal of this caveolin-1 regulation.

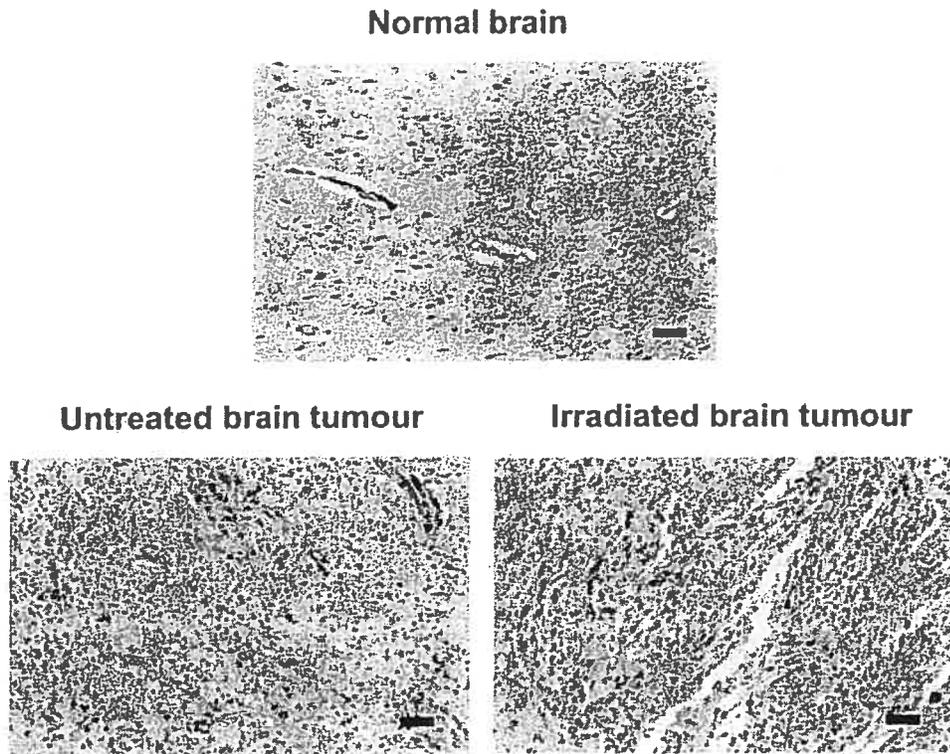
Angiogenesis is a complex phenomenon that involves several steps by which ECs form new capillaries, an initial proliferative step and a terminal differentiation phase. In a human umbilical vein EC line (ECV304) and human microvascular ECs (HMEC-1) *in vitro*, caveolin-1 expression has been shown to be down-regulated by angiogenesis factors that stimulate cell proliferation (Liu et al., 1999, 2002). We observed a similar regulation of caveolin-1 expression in the brain EC line RBE4 and in bovine brain ECs that represent an *in vitro* model of the BBB when cocultured with astrocytes. In this model, caveolin-1 expression was increased following coculture with astrocytes and decreased after the cells were cocultured with glioma cells for 48 hr. Glioma cell-conditioned medium also induced a decrease in RBE4 caveolin-1 expression. Down-regulation of caveolin-1 was also seen in both models after 24 hr of hypoxia. Our *in vitro* results showing that caveolin-1 is down-regulated under angio-

genic conditions led us to investigate this regulation *in vivo* by using a brain tumor model. CNS-1 tumors show a complex three-dimensional shape and a high degree of invasiveness. In that infiltration is a well-known feature of human glioblastoma multiforme, this model is appropriate for studying the effect of treatments on tumor spread. Furthermore, we have already shown that angiogenesis occurs in this model, demonstrating that it is suitable for studying molecular regulation of angiogenesis (Régina et al., 2003).

Caveolin-1 expression has been associated with the extent of cell differentiation (Liu et al., 2002). Caveolin-1 expression is down-regulated in rapidly dividing cells (Galbiati et al., 1998) and in many oncogenically transformed and cancerous cells (Fiucci et al., 2002). On the other hand, up-regulation of caveolin-1 expression is observed in confluent cells and in terminally differentiated cells (Fiucci et al., 2002). Our results show that caveolin-1 expression is drastically down-regulated in ECs from brain tumor compared with ECs from normal brain. This difference was not due to a difference in EC isolation between normal brain and brain tumor, in that the expression levels of the endothelial markers PECAM-1 and eNOS were similar in both cell fractions. Furthermore, we have previously reported that the cell fractions obtained are highly enriched EC populations, insofar as no contamination by astrocytes (for normal brain samples) or tumoral cells (for brain tumor samples) was observed (Régina et al., 2003). In this previous study, no morphological difference between normal and tumoral ECs was seen when they were placed in culture. However, our *in vivo* observations suggest that ECs in brain tumors are in a proliferative and dedifferentiated state.

Down-regulation of caveolin-1 may affect the activity of several proteins that have been reported to be closely coupled with caveolin-1. We observed increased ERK1/2 phosphorylation in ECs isolated from brain tumors. Activation of ERKs occurs in response to growth factors and phorbol esters and is associated with proliferation and differentiation (Enslen and Davis, 2001). ERK1/2 and other components of the Ras-extracellular signal-regulated kinase (ERK) mitogenic pathway are reported to be localized in caveolae. As reported for most interactions of caveolin-1 with other molecules, *in vitro* negative regulation of the ERK cascade by caveolin-1 has been demonstrated (Engelman et al., 1997, 1998; Galbiati et al., 1998). Demonstration of this regulation in an *in vivo* system has been recently provided by using the caveolin-1 null mouse model. More specifically, hyperactivation of the p42/44 MAP kinase cascade has been demonstrated in heart tissue (Cohen et al., 2003). It has been shown that, in gliomas, ERK/MAPK activation may contribute to the neoplastic glial phenotype (Mandell et al., 1998). Our results demonstrate that constitutive activation of ERK pathway also occurs in glial vascular endothelium. Furthermore, a link was observed *in vitro* between glioma invasion and ERK activation with a decrease in glioma cell invasion associated with down-regulation of MMP-9 after

A



B

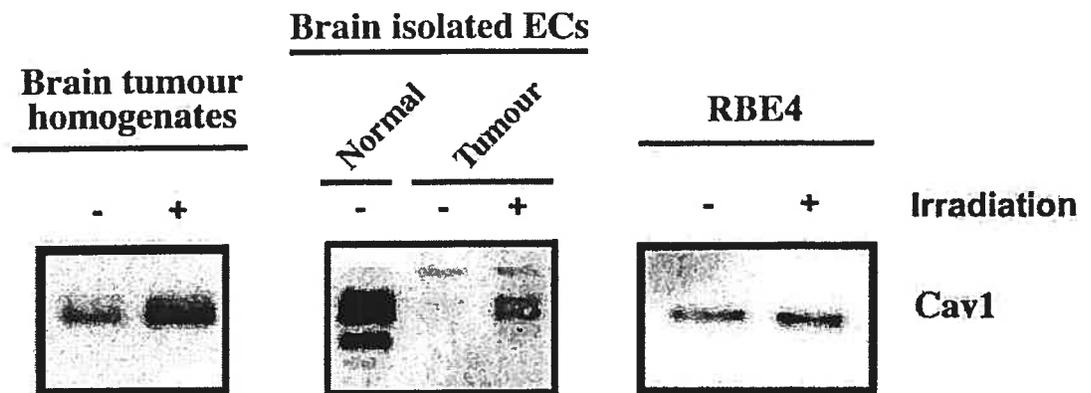


Fig. 4. Effect of irradiation on tumor vascularization and caveolin-1 expression. **A:** Factor VIII immunostaining of normal parenchyma and tumoral tissue. Photomicrographs were taken at the tumor-brain interface to evaluate tumor infiltrative growth pattern and neovascularization level. Normal brain parenchyma shows thick vessel walls. Increased vessel number is observed in untreated tumor with EC hyperplasia compared with normal parenchyma. High perivascular tu-

mor cell density and increased factor VIII cytoplasmic staining are observed after radiotherapy. **B:** Immunodetection of caveolin-1 in brain tumor homogenates and in ECs isolated from control and irradiated brain tumors and in the RBE4 cell line with or without irradiation, as described in Materials and Methods. One representative experiment of three is shown. Scale bars = 40 μ m.

stable transfection of a mutated ERK (Lakka et al., 2002). We have previously reported an up-regulation of MMP-9 activity in ECs from brain tumors (Régina et al., 2003). Activation of the ERK pathway, as reported here, may well correlate with this MMP-9 up-regulation. Those results demonstrate again that glioma invasion is associated not only with tumoral cell behavior but also with EC modulation. In addition, our results suggest that the phosphorylation level of caveolin-1 in tumoral ECs is higher than that in normal ECs. There are not many studies of the role and function of phosphocaveolin-1. One investigation has recently shown that caveolin-1 is phosphorylated at tyrosine 14 in response to cellular stress (Sanguinetti and Mastick, 2003) and VEGF (Labrecque et al., 2003). In another study, phosphocaveolin-1 was localized at cell focal-adhesion regions, which are major sites of tyrosine kinase signaling (Brown et al., 2002). The consequences of increased phosphorylation of caveolin-1 in angiogenic ECs remain to be determined. Our results for brain tumor ECs can be put into perspective with recent results obtained with the caveolin-1 (-/-) knockout mouse model showing that lung capillaries in these mice are hyperpermeable (Schubert et al., 2002). Brain tumor capillaries are also known to be hyperpermeable, causing brain tumor-associated edema (Papadopoulos et al., 2001). The model proposed to explain this is based on tight junction opening associated with VEGF secretion by tumor cells. It was reported that VEGF receptor VEGFR-2 is localized in endothelial caveolae and associated to caveolin-1. Moreover, caveolin-1 acts as a negative regulator of VEGFR-2 activity (Labrecque et al., 2003). The loss of brain tumor EC caveolin-1 expression that we report here may certainly be one of the molecular mechanisms associated with blood-tumor hyperpermeability.

Because patients with glioma are often subjected to radiotherapy, we investigated the effects of radiation on the molecular regulation that we identified in the tumoral vasculature. Radiation treatment alone resulted in up-regulation of caveolin-1 expression both in vitro in the RBE4 cell line and in vivo in the tumor homogenates and corresponding isolated ECs. Up-regulation of caveolin-1 expression in ECs has been reported for irradiated lung parenchyma, a model of irradiation-induced lung injury (Kasper et al., 1998). In contrast to this, a study aimed at characterizing the effects of irradiation on tumor ECs found a decrease in caveolin-1 expression in tumor-isolated arterioles following irradiation (Sonveaux et al., 2002). In this study, arterioles were dissected 24 hr after irradiation, permitting analysis of the short-term impact of irradiation on tumor vasculature. In our experiments, tumor EC isolation was performed 20 days after irradiation, allowing examination of the long-term effects of irradiation on tumor vasculature. Radiotherapy treatment produces the expected increase in survival. Histopathological evaluation of tumor after irradiation showed a large tissue necrotic center. However, immunohistochemical study of the remaining tumor vascularization showed an increase in tumor cells density around newly formed vessels in the

parenchyma adjacent to the tumor center following irradiation. This observation is indicative of increased perivascular spreading of tumor cells, suggesting increased dissemination of the tumor. Recent reports have also shown that low-dose irradiation promotes migration and invasiveness of glioma cells (Wild-Bode et al., 2001) and stimulates angiogenesis (Mirsky et al., 2002; Sonveaux et al., 2003). In vitro, it has been shown that caveolin-1 expression level was regulated during capillary formation, with the highest expression found just before the stabilization of the vessels network (Liu et al., 2002).

In conclusion, we have investigated caveolin-1 regulation in brain endothelium in a pathological state and show that, in vitro, regulation of caveolin-1 expression occurs in brain ECs subjected to angiogenic culture conditions. By using magnetic cell sorting, we show that, in vivo, highly differentiated normal-brain ECs express a high level of caveolin-1. In tumor ECs a down-regulation of caveolin-1 occurs. After irradiation, caveolin-1 expression in tumor ECs tends to return to the level in normal-brain ECs. This observation suggests that irradiation might have stimulated the maturation of the remaining tumoral capillary network. Thus caveolin-1 expression could be a marker for vasculature state at a defined time in the angiogenic process.

ACKNOWLEDGMENTS

We especially thank Dr. William F. Hickey (Dartmouth Medical School, Lebanon, NH) for providing us with the CNS-1 cell line. We also thank Charles Martel and Dr. Jean-Paul Bahary for their collaboration (Department of Radiology, Hôpital Notre-Dame-CHUM, Montreal, Québec, Canada). This work was supported by grants to R.B. from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and from the Cancer Research Society. A.R. and J.J. are recipients of fellowships from the Canadian Institutes of Health Research.

REFERENCES

- Brown G, Rixon HW, Sugrue RJ. 2002. Respiratory syncytial virus assembly occurs in GM1-rich regions of the host-cell membrane and alters the cellular distribution of tyrosine phosphorylated caveolin-1. *J Gen Virol* 83:1841-1850.
- Cecchelli R, Dehouck B, Descamps L, Fenart L, Buee-Scherrer VV, Duhem C, Lundquist S, Rentfel M, Torpier G, Dehouck MP. 1999. In vitro model for evaluating drug transport across the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev* 36:165-178.
- Cohen AW, Park DS, Woodman SE, Williams TM, Chandra M, Shirani J, Pereira DS, Kitsis RN, Russell RG, Weiss LM, Tang B, Jelicks LA, Factor SM, Shtutin V, Tanowitz HB, Lisanti MP. 2003. Caveolin-1 null mice develop cardiac hypertrophy with hyperactivation of p42/44 MAP kinase in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 284:C457-C474.
- Demeule M, Labelle M, Régina A, Berthelet F, Beliveau R. 2001. Isolation of endothelial cells from brain, lung, and kidney: expression of the multidrug resistance P-glycoprotein isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* 281:827-834.
- Engelman JA, Wykoff CC, Yasuhara S, Song KS, Okamoto T, Lisanti MP. 1997. Recombinant expression of caveolin-1 in oncogenically transformed cells abrogates anchorage-independent growth. *J Biol Chem* 272:16374-16381.

- Engelman JA, Chu C, Lin A, Jo H, Ikezu T, Okamoto T, Kohtz DS, Lisanti MP. 1998. Caveolin-mediated regulation of signaling along the p42/44 MAP kinase cascade in vivo. A role for the caveolin-scaffolding domain. *FEBS Lett* 428:205-211.
- Enslin H, Davis RJ. 2001. Regulation of MAP kinases by docking domains. *Biol Cell* 93:5-14.
- Fenart L, Casanova A, Dehouck B, Duhem C, Slupek S, Cecchelli R, Betbeder D. 1999. Evaluation of effect of charge and lipid coating on ability of 60-nm nanoparticles to cross an in vitro model of the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* 291:1017-1022.
- Fiucci G, Ravid D, Reich R, Liscovitch M. 2002. Caveolin-1 inhibits anchorage-independent growth, anoikis and invasiveness in MCF-7 human breast cancer cells. *Oncogene* 21:2365-2675.
- Folkman J. 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1:27-31.
- Galbiati F, Volonte D, Engelman JA, Watanabe G, Burk R, Pestell RG, Lisanti MP. 1998. Targeted downregulation of caveolin-1 is sufficient to drive cell transformation and hyperactivate the p42/44 MAP kinase cascade. *EMBO J* 17:6633-6648.
- Griffoni C, Spisni E, Santi S, Riccio M, Guarnieri T, Tomasi V. 2000. Knockdown of caveolin-1 by antisense oligonucleotides impairs angiogenesis in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 276:756-761.
- Ikezu T, Ueda H, Trapp BD, Nishiyama K, Sha JF, Volonte D, Galbiati F, Byrd AL, Bassell G, Serizawa H, Lane WS, Lisanti MP, Okamoto T. 1998. Affinity-purification and characterization of caveolins from the brain: differential expression of caveolin-1, -2, and -3 in brain endothelial and astroglial cell types. *Brain Res* 804:177-192.
- Kasper M, Reimann T, Hempel U, Wenzel KW, Bierhaus A, Schuh D, Dimuner V, Haroske G, Muller M. 1998. Loss of caveolin expression in type I pneumocytes as an indicator of subcellular alterations during lung fibrogenesis. *Histochem Cell Biol* 109:41-48.
- Koleske AJ, Baltimore D, Lisanti MP. 1995. Reduction of caveolin and caveolae in oncogenically transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:1381-1385.
- Labrecque L, Royal I, Surprenant DS, Patterson C, Gingras D, Beliveau R. 2003. Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 activity by caveolin-1 and plasma membrane cholesterol. *Mol Biol Cell* 14:334-347.
- Lakka SS, Jasti SL, Gondi C, Boyd D, Chandrasekar N, Dinh DH, Olivero WC, Gujrati M, Rao JS. 2002. Downregulation of MMP-9 in ERK-mutated stable transfectants inhibits glioma invasion in vitro. *Oncogene* 21:5601-5608.
- Liu J, Razani B, Tang S, Terman BI, Ware JA, Lisanti MP. 1999. Angiogenesis activators and inhibitors differentially regulate caveolin-1 expression and caveolae formation in vascular endothelial cells. Angiogenesis inhibitors block vascular endothelial growth factor-induced downregulation of caveolin-1. *J Biol Chem* 274:15781-15785.
- Liu J, Wang XB, Park DS, Lisanti MP. 2002. Caveolin-1 expression enhances endothelial capillary tubule formation. *J Biol Chem* 277:10661-10668.
- Lopes MB. 2003. Angiogenesis in brain tumors. *Microsc Res Techniq* 60:225-230.
- Mandell JW, Hussaini IM, Zecevic M, Weber MJ, VandenBerg SR. 1998. In situ visualization of intratumor growth factor signaling: immunohistochemical localization of activated ERK/MAP kinase in glial neoplasms. *Am J Pathol* 153:1411-1423.
- Mirsky N, Krispel Y, Shoshany Y, Maltz L, Oron U. 2002. Promotion of angiogenesis by low energy laser irradiation. *Antiox Redox Signal* 4:785-790.
- Okamoto T, Schlegel A, Scherer PE, Lisanti MP. 1998. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J Biol Chem* 273:5419-5422.
- Papadopoulos MC, Saadoun S, Davies DC, Bell BA. 2001. Emerging molecular mechanisms of brain tumor oedema. *Br J Neurosurg* 15:101-108.
- Régina A, Demeule M, Berube A, Moumdjian R, Berthelet F, Beliveau R. 2003. Differences in multidrug resistance phenotype and matrix metalloproteinases activity between endothelial cells from normal brain and glioma. *J Neurochem* 84:316-324.
- Roux F, Durieu-Trautmann O, Chaverot N, Claire M, Mailly P, Bourre JM, Strosberg AD, Couraud PO. 1994. Regulation of gamma-glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase activities in immortalized rat brain microvessel endothelial cells. *J Cell Physiol* 159:101-113.
- Sanguinetti AR, Mastick CC. 2003. c-Abl is required for oxidative stress-induced phosphorylation of caveolin-1 on tyrosine 14. *Cell Signal* 3:289-298.
- Schubert W, Frank PG, Woodman SE, Hyogo H, Cohen DE, Chow CW, Lisanti MP. 2002. Microvascular hyperpermeability in caveolin-1 (-/-) knock-out mice. Treatment with a specific nitric-oxide synthase inhibitor, L-name, restores normal microvascular permeability in Cav-1 null mice. *J Biol Chem* 277:40091-40098.
- Shaul PW, Anderson RG. 1998. Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction. *Am J Physiol* 275:L843-L851.
- Sonveaux P, Dessy C, Brouet A, Jordan BF, Gregoire V, Gallez B, Balligand JL, Feron O. 2002. Modulation of the tumor vasculature functionality by ionizing radiation accounts for tumor radiosensitization and promotes gene delivery. *FASEB J* 16:1979-1981.
- Sonveaux P, Brouet A, Havaux X, Gregoire V, Dessy C, Balligand JL, Feron O. 2003. Irradiation-induced angiogenesis through the up-regulation of the nitric oxide pathway: implications for tumor radiotherapy. *Cancer Res* 63:1012-1019.
- Turcotte S, Desrosiers RR, Beliveau R. 2003. HIF-1alpha mRNA and protein upregulation involves Rho GTPase expression during hypoxia in renal cell carcinoma. *J Cell Sci* 116:2247-2260.
- Virgintino D, Robertson D, Errede M, Benagiano V, Tauer U, Roncali L, Bertossi M. 2002. Expression of caveolin-1 in human brain microvessels. *Neuroscience* 115:145-152.
- Wild-Bode C, Weller M, Rimmner A, Dichgans J, Wick W. 2001. Sublethal irradiation promotes migration and invasiveness of glioma cells: implications for radiotherapy of human glioblastoma. *Cancer Res* 61:2744-2750.

