

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

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

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

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

Conditionnement tumoral des cellules endothéliales cérébrales : effet sur la survie cellulaire, la migration et l'angiogenèse

Par
Mathieu Laroche

Département de physiologie
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maîtrise en
Sciences neurologiques

Décembre 2007

« copyright », Mathieu Laroche, 2007



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Conditionnement tumoral des cellules endothéliales cérébrales : effet sur la survie cellulaire, la migration et l'angiogenèse

Par
Mathieu Laroche

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Josette Noël, président rapporteur

Dr Richard Béliveau, directeur de recherche

Dr John Kalaska, codirecteur de recherche

Dr Michel W. Bojanowski, membre du jury

RÉSUMÉ EN FRANÇAIS

Le glioblastome multiforme est la tumeur cérébrale primaire la plus prévalente et pour lequel aucun traitement curatif n'est disponible. De nouvelles données en médecine moléculaire indiquent que les cellules tumorales sont en mesure de modifier les propriétés de leur microenvironnement vasculaire à leur avantage par le biais de facteurs de croissance.

Notre objectif est de mettre en évidence les effets cellulaires causés par les facteurs de croissances tumoraux sécrétés par une lignée de cellules tumorales cérébrales dérivées d'un glioblastome sur les cellules endothéliales cérébrales. Des modèles *in vitro* de cellule endothéliale microvasculaire humaine cérébrale (HBMEC) et de cellule de glioblastome humain (U-87) ont été utilisées. Les effets cellulaires des facteurs de croissance sécrétés par les cellules tumorales sur les cellules endothéliales ont été mesurés par des épreuves de survie cellulaire, de migration, de tubulogenèse et de prolifération.

L'étude des cellules HBMEC démontre que l'exposition aux facteurs de croissance tumoraux des cellules U-87 offre une protection partielle contre l'apoptose induite par MT1-MMP (une métalloprotéinase impliquée dans les interactions entre les cellules tumorales, les cellules endothéliales et la matrice extracellulaire) augmente leur migration cellulaire, a peu d'effet sur leur prolifération cellulaire et n'a pas d'effet significatif sur leur capacité à former de nouveaux vaisseaux (tubulogenèse). D'une manière globale, ces résultats suggèrent que les cellules HBMEC ont un phénotype différent des autres cellules endothéliales. Les phénomènes cellulaires engendrés par leur exposition à des facteurs de croissance tumoraux pourraient être importants dans la cooption qui se produit à un stade précoce de la tumorigenèse. Nos observations pourraient conduire au développement de nouvelles thérapies ciblant les processus précoces du développement ou des récives des glioblastomes multiformes.

MOTS CLÉS FRANÇAIS

Glioblastome, cellule endothéliale vasculaire cérébrale, angiogenèse, cooption, apoptose, migration, prolifération, barrière hémato-encéphalique, métalloprotéinase.

RÉSUMÉ EN ANGLAIS

Glioblastoma is the most prevalent primary brain tumour and is an incurable disease. Studies in molecular medicine have suggested that tumour cells are able to modify to their advantage their microenvironment by secreting growth factors.

Our objective is to study the cellular effects of growth factors secreted by tumour cells on brain endothelial cells. *In vitro* models of cellular culture of human brain microvascular endothelial cells (HBMEC) and human glioblastoma cells (U-87) were used. The cellular effects of growth factors secreted by tumour cells on endothelial cells were analysed using migration assays, tubulogenesis, proliferation assays and cell survival.

HBMEC cells exposed to the conditioned media by U-87 were partially protected from apoptosis induced by MT1-MMP (a metalloproteinase involved in the interactions between the tumour cells, endothelial cells and the extracellular matrix), and showed increased migration, no effect on the proliferation rate and no effect in growth of new vessels (tubulogenesis). Globally, our results suggest that HBMEC cells have a different phenotype in comparison to other endothelial cells. The cellular phenomena induced by exposition to tumour growth factor could be implied in vascular cooption which is happening at an early stage of tumorogenesis. In the future, the conclusion of this work could lead to the development of new therapies targeting early tumorogenesis or recurrence of glioblastoma.

MOTS CLÉS EN ANGLAIS

Glioblastoma, brain microvascular endothelial cells, angiogenesis, anti-angiogenic, cooption, apoptosis, migration, proliferation, blood brain barrier, metalloproteinase.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	iv
Mots clés en français.....	v
Résumé en anglais	vi
Mots clés en anglais.....	vii
Table des matières	viii
Liste des tableaux	xiii
Liste des figures.....	xiv
Abréviations	xvi
Remerciements	xviii
Chapitre I Introduction	1
1.1 Composition du microenvironnement cérébral.....	1
1.1.1 Généralités.....	1
1.1.2 Cellules nerveuses.....	1
1.1.3 Cellules gliales.....	2
1.1.4 Cellules endothéliales vasculaires cérébrales	2
1.1.4.1 La barrière hémato-encéphalique.....	3
1.1.4.2 Modulation de la barrière hémato-encéphalique	5
1.1.4.3 Altération de la barrière hémato-encéphalique par les tumeurs cérébrales	6
1.1.5 Les péricytes.....	6
1.1.6 La matrice extracellulaire cérébrale.....	7
1.1.6.1 Les métalloprotéinases de la matrice	8
1.1.6.2 Généralités sur les MMP	9
1.1.6.3 Les métalloprotéinases membranaires	11
1.1.6.4 Les métalloprotéinases sont impliquées dans l'angiogenèse ..	12

1.1.6.5 Les caractéristiques de MT1-MMP	13
1.1.6.6 La mort cellulaire.....	15
1.2 La vascularisation tumorale.....	15
1.2.1 L'angiogenèse tumorale.....	17
1.2.1.1 L'angiogenèse par bourgeonnement.....	18
1.2.1.2 L'angiogenèse par intussusception	20
1.2.1.3 Recrutement d'angioblastes.....	21
1.2.1.4 Vaisseaux mosaïques	21
1.2.1.5 Le mimétisme vasculaire	22
1.2.1.6 Le modèle de cooption vasculaire	22
1.2.1.7 Étude de l'angiogenèse <i>in vitro</i>	25
1.3 Les tumeurs cérébrales	26
1.3.1 La classification des tumeurs cérébrales	26
1.4 Les astrocytomes.....	28
1.4.1 Généralités.....	28
1.4.2 Le glioblastome multiforme (GBM).....	29
1.4.3 Caractéristiques pathologiques du GBM	29
1.4.4 Le traitement des GBM.....	30
1.4.4.1 Le rôle de la chirurgie pour le traitement du GBM.....	31
1.4.4.2 Le rôle de la radiothérapie pour le traitement du GBM.....	32
1.4.4.3 Le rôle de la chimiothérapie pour le traitement du GBM.	32
1.4.4.4 Les nouvelles cibles thérapeutiques pour le GBM	34
1.5 But du projet et objectifs.	35
Chapitre II Matériel et méthodes.....	36
2. Matériel.....	36
2.1 Culture cellulaire	36
2.1.1 Anticorps et réactifs	37
2.1.2 Plasmides.....	38
2.2 Méthodes.....	38

2.2.1 Culture cellulaire	38
2.2.1.1 Culture des cellules U-87.	38
2.2.1.2 Culture des cellules HBMEC	39
2.2.2 Comptage cellulaire	39
2.2.3 Transfections avec la lipofectamine	40
2.2.4 Lyse cellulaire et dosage des protéines.	40
2.2.4.1 Lyse des cellules.	40
2.2.4.2 Dosage des protéines.	41
2.3 Mesure de la mort cellulaire par cytométrie de flux.....	41
2.4 Migration cellulaire des cellules HBMEC	43
2.4.1 Préparation des solutions cellulaires.....	43
2.4.2 Préparation des puits de migration et chambres de Boyden.....	43
2.5 Tubulogénèse des cellules HBMEC sur Matrigel™	44
2.6 Test de prolifération cellulaire au WST-1.....	45
2.7 Zymographie sur gélatine.....	46
2.8 Électrophorèse et immunobuvardage des protéines des cellules U-87 et HBMEC.....	47
Chapitre III Résultats	49
3.1 Les protéines recombinantes MT1-MMP et MT1-MMP Δ -cyto surexprimées dans les lignées cellulaires U-87 et HBMEC sont fonctionnelles.....	49
3.2 MT1-MMP et MT1-MMP Δ -cyto induisent une augmentation significative de la mort cellulaire dans les cellules transfectées.....	52
3.3 La surexpression de MT1-MMP et MT1-MMP Δ -cyto induit une forte augmentation de l'apoptose et de la nécrose chez les cellules HBMEC transfectées et une augmentation de la nécrose chez les cellules U-87 transfectées	53

3.4 Protection partielle contre l'apoptose induite par la surexpression de MT1-MMP chez les cellules HBMEC par les facteurs de croissance sécrétés par les cellules tumorales U-87.....	55
3.5 Effet de MT1-MMP et de la troncation du domaine cytoplasmique (MT1-MMP Δ -cyto) sur la migration cellulaire des cellules HBMEC et l'effet des facteurs de croissance tumoraux relargués par les cellules U-87 sur la migration de ces population de cellules HBMEC.....	57
3.5.1 Les cellules HBMEC surexprimant MT1-MMP et MT1-MMP Δ -cyto ont un potentiel de migration diminué comparativement aux cellules témoins exposées à un milieu contenant ou non de l'ilomastat.....	58
3.5.2 Augmentation de la migration des cellules HBMEC en réponse aux facteurs de croissance tumoraux sécrétés par les cellules U-87 pendant 24 heures.....	60
3.6 Les facteurs de croissance tumoraux sécrétés par les les cellules U-87 n'augmentent pas la prolifération des cellules HBMEC.....	62
3.7 La surexpression de MT1-MMP et MT1-MMP Δ -cyto chez les cellules HBMEC n'entraîne pas d'effet significatif sur la tubulogenèse en comparaison aux cellules témoins. L'ajout de facteurs de croissance sécrétés par les cellules U-87 aux cellules HBMEC transfectées tend à diminuer la tubulogenèse.....	64
Chapitre IV Discussion.....	66
4.1 Le modèle expérimental utilisé.....	67
4.1.1 Les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines (HBMEC)	67
4.1.2 Caractérisation des cellules endothéliales dérivées des GBM ...	68
4.1.3 Les facteurs de croissance sécrétés par les cellules de GBM.....	69
4.2 Analyse des résultats.....	70
4.2.1 L'angiogenèse implique l'apoptose des cellules endothéliales..	71

4.2.2 Implication de MT1-MMP dans l'apoptose des cellules endothéliales	72
4.2.3 La tubulogenèse sur Matrigel™ est une méthode d'étude de l'angiogénèse <i>in vitro</i>	74
4.2.3.1 MT1-MMP est impliquée dans la tubulogenèse des cellules endothéliales non cérébrales	74
4.2.3.2 Rôle de MT1-MMP dans la tubulogenèse des cellules endothéliales cérébrales	75
4.3 La cooption vasculaire chez les GMB.....	77
4.4 La thérapie antiangiogénique pour le traitement des GBM.	80
4.4.1 Le ciblage de l'endothélium tumoral.....	81
Chapitre V Conclusion.	83
Bibliographie.....	87

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I Classification histologique des tumeurs cérébrales de l'Organisation
Mondiale de la Santé (OMS).....27

Tableau II Gradation des astrocytomes selon l'OMS28

LISTE DES FIGURES

Fig. 1.1 Vue schématique de la barrière hémato-encéphalique (BHE)	5
Fig. 1.2 Schématisation de la composition de la matrice extracellulaire	8
Fig. 1.3 Structure de base d'une métalloprotéinase et liste des différents types de métalloprotéinases	11
Fig. 1.4 Différents mécanismes connus de régulation de MT1-MMP	14
Fig. 1.5 Mécanismes de vascularisation tumorale	16
Fig. 1.6 Survie moyenne (en semaine) des patients traités pour un GBM selon les différentes modalités à partir du diagnostic	31
Fig. 2.1 Domaines encodés par les plasmides MT1-MMP	38
Fig. 3.1.1 Détection des formes recombinantes MT1-MMP et MT1-MMP Δ -cyto chez les cellules U-87 et HBMEC transfectées	50
Fig. 3.1.2 Zymographie sur gélatine montrant la transformation de la pro MMP-2 en MMP-2 chez les cellules U-87 et HBMEC transfectées avec MT1-MMP et MT1- MMP Δ -cyto	51
Fig. 3.2 La surexpression de MT1-MMP et MT1-MMP Δ -cyto induit la mort cellulaire chez les cellules U-87 et les cellules HBMEC transfectées	52
Fig. 3.3 A et B La surexpression de MT1-MMP et MT1-MMP Δ -cyto induit une forte augmentation de l'apoptose précoce et tardive chez les cellules HBMEC transfectées alors que seule la nécrose est augmentée chez les cellules U-87 transfectées	54
Fig. 3.4 A et B Protection partielle contre l'apoptose induite par la surexpression de MT1-MMP par les facteurs de croissance sécrétés par les cellules U-87	56
Fig. 3.5.1 A et B Les cellules HBMEC surexprimant MT1-MMP et MT1-MMP Δ -cyto ont un potentiel de migration diminué comparativement aux cellules témoins exposées à un milieu contenant ou non de l'ilomastat	59
Fig. 3.5.2 A et B Augmentation de la migration des cellules HBMEC en réponse aux facteurs de croissance tumoraux sécrétés par les cellules U-87	61
Fig. 3.6 Test de prolifération au WST-1 des cellules HBMEC exposées à différents milieux	63

Fig. 3.7 A et B Tubulogénèse sur Matrigel™ des cellules HBMEC surexprimant MT1-MMP et MT1-MMP Δ -cyto et exposées à du milieu témoin ou des facteurs de croissance tumoraux sécrétés par les cellules U-87.....	65
Fig. 4 Étapes de la cooption vasculaire dans le parenchyme cérébral	78
Fig. 5 Schéma résumé du modèle de cooption proposé	85

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique
 Ang-1 : Angiopoïétine-1
 Ang-2 : Angiopoïétine-2
 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
 CEC : Cellule précurseure endothéliale circulante
 CH(R)C5 : Cellules ovariennes d'hamster chinois résistantes aux drogues
 CO₂ : Dioxyde de carbone
 CT-Scan : Tomodensitométrie axiale
 DMEM : Milieu Eagle modifié par Dulbecco
 ECL : *Enhance chemiluminescence*
 EDTA : Acide éthylènediamine tétracétique
 EGFR : Récepteur du facteur de croissance endothélial
 EGC : Épigallocatechine
 EGCG : Épigallocatechine-3-gallate
 EGF : Facteur de croissance épidermique
 eNOS : Synthase de l'oxide nitrique endothéliale
 FBS : Sérum bovin foetal
 FDA : Food and drug administration
 FGF : Facteur de croissance fibroblastique
 FGFR1 : Isoforme 1 du récepteur de facteur de croissance de fibroblastique
 FGFR2 : Isoforme 2 du récepteur de facteur de croissance de fibroblastique
 GBM : Glioblastome multiforme
 GLUT-1 : Isoforme 1 du transporteur du glucose
 GPI : Glycosylphosphatidylinositol
 GTP : Polyphénols du thé vert
 Gy : Gray
 HA : Acide hyaluronique
 HBMEC : Lignée cellulaire de cellules microvasculaires endothéliales humaines
 HEPES : 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethanesulfonique
 HGF : Facteur de croissance hépatocytaire
 IAAP : [125I]-iodoaryl azidoprazosin
 IGF : Facteur de croissance semblable à l'insuline
 IgG : Immunoglobuline G
 INC : Institut national du cancer
 MAPC : Cellule progénitrice adulte multipotente
 MDM2 : *Murine double minute oncogene*

MEC : Matrice extracellulaire
MMP : Métalloprotéinase de la matrice extracellulaire
MT-MMP : MMP de type membranaire
NCAM : Molécule d'adhésion cellulaire neuronale
NGF : Facteur de croissance neuronal
O₂ : Oxygène
OMS : Organisation mondiale de la santé
PEX : Domaine hemopexine
P53 : Gène suppresseur de tumeur p53
PAI : Inhibiteur de l'activateur du plasminogène
PBS : Tampon phosphate salin
PDGF : Facteur de croissance d'origine plaquettaire
PECAM-1 : Isoforme 1 de la molécule d'adhésion cellulaire endothéliale/plaquettaire
PI : Iodure de propidium
PIGF : Facteur de croissance dérivé du placenta
PI3K : Inositol-3-phosphate kinase
P-gp : P-glycoprotéine
PTN : Pleiotrophine
PVDF : Difluorure polyvinylidène
RBE4 : Cellule endothéliale du cerveau de rat immortalisé
Rb : Gène du rétinoblastome
RMD : Résistance multidrogue
RMN : Résonance magnétique nucléaire
RPM : Rotation par minute
S1P : Sphingosine-1-phosphate
SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SMA : Actine alpha des muscles lisses
SNC : Système nerveux central
SNP : Système nerveux périphérique
TEMED : N,N,N',N'-tétraméthylènediamine
TIMP : Inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases
TMZ : Temozolomide
TNF-_α : Facteur de nécrose tumorale
TGF-_β : Facteur de croissance transformant
tPA : Activateur tissulaire du plasminogène
Tris : Trishydroxyméthylaminométhane
TSP-1 : Thrombospondine-1
U-87 : Lignée cellulaire de glioblastome humain
uPA : Activateur du plasminogène urokinase
uPAR : Récepteur de l'activateur du plasminogène urokinase
VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (Type A, B, C, D)
VEGFR-2 : Isoforme 2 du récepteur du VEGF

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce projet de maîtrise et tout particulièrement les docteurs Borhane Annabi, Richard Béliveau, Michel W Bojanowski et Nancy McLaughlin pour leurs encouragements, leurs soutiens, leur enthousiasme, leurs idées originales et la manière dont ils ont su me guider tout au long de ce projet. Merci à tous les membres des laboratoires du Dr Annabi et Dr Béliveau pour leur aide et leur soutien durant les manipulations expérimentales, en particulier Marie-Paul Lachambre. Merci à tous les membres du service de neurochirurgie de l'hôpital Notre-Dame de Montréal pour leur soutien et leur compréhension. J'offre mes remerciements à ma conjointe Mireille pour son support et sa présence. Finalement, je remercie la chaire de recherche Claude-Bertrand en neurochirurgie.

CHAPITRE I INTRODUCTION

1.1 Composition du microenvironnement cérébral

1.1.1 Généralités

Le fonctionnement du système nerveux central (SNC) dépend de l'interaction adéquate de ses composantes cellulaires et non cellulaires. Plusieurs types cellulaires sont présents dans le SNC que l'on peut diviser en trois grandes catégories : Les cellules nerveuses, les cellules gliales et les cellules vasculaires. Toutes ces cellules interagissent d'une manière complexe et sont unies par la matrice extracellulaire (MEC).

1.1.2 Les cellules nerveuses

Le cerveau humain est constitué de plus de 10^{11} neurones qui peuvent être subdivisés selon leur fonction, localisation et propriétés intrinsèques. La grande complexité des fonctions neurologiques est bien plus attribuable aux innombrables circuits anatomiques constitués par les neurones que leur spécialisation individuelle. Globalement, tous les neurones ont des mécanismes similaires et ce sont les différentes interconnexions qui permettent des fonctions variées. Ils sont souvent classifiés selon leur morphologie en neurones unipolaires, bipolaires, pseudo-unipolaires ou multipolaires. Les neurones sont soutenus par un important réseau de cellules de support afin d'obtenir tous les nutriments et l'oxygène nécessaires à leur activité métabolique importante.

1.1.3 Les cellules gliales

Les cellules gliales ont un rôle de support envers les neurones et leur nombre dépasse celui des cellules nerveuses. Elles sont surtout localisées autour du corps cellulaire, axones et dendrites. Les cellules gliales sont divisées en 2 grandes classes : les microglies et les macroglies. Les microglies sont des macrophages qui originent de l'extérieur du SNC. Elles sont activées principalement par des processus infectieux, traumatiques, inflammatoires et durant certains états pathologiques tels que la maladie d'Alzheimer et de Parkinson. Elles serviraient de cellules présentatrices d'antigènes. Deux types de cellules macrogliales sont prédominants dans le SNC : les oligodendrocytes et les astrocytes. Les oligodendrocytes (SNC) entourent les neurones et produisent la myéline qui permet l'isolement des axones et la transmission du potentiel d'action. Les astrocytes sont les cellules les plus nombreuses du SNC. Elles ont un rôle de support pour les cellules nerveuses en leur procurant des nutriments et en assurant l'homéostasie du microenvironnement. Elles sont aussi liées aux cellules endothéliales et participent activement à la barrière hémato-encéphalique (BHE) car elles sont étroitement liées à son développement et au maintien de son intégrité (Ballabh et al. 2004, Lee et al. 2006). Elles ont aussi d'autres rôles variés dont certains impliquent la recaptation de neurotransmetteurs, le maintien de la balance électrolytique, la migration cellulaire et la relâche de facteurs de croissance. Selon certaines études récentes, l'organisation architecturale variable des astrocytes contribue aux activités cérébrales complexes telles la mémoire (Banachlocha. 2004 et 2007.).

1.1.4 Les cellules endothéliales vasculaires cérébrales

Les cellules endothéliales vasculaires cérébrales possèdent plusieurs particularités qui les distinguent des cellules endothéliales systémiques et leur permettent de constituer la barrière hémato-encéphalique (BHE). En effet, elles forment des jonctions intercellulaires très serrées et ne possèdent pas de fenestrations. De cette manière,

elles limitent la diffusion de molécules de part et d'autre de cette barrière. De plus, elles offrent une grande résistance électrique et possèdent peu de vésicules pinocytaires. Seules les molécules hautement lipophiliques peuvent traverser facilement la BHE, les autres doivent emprunter divers mécanismes de transport spécifiques dont certains nécessitent de l'ATP. Finalement, les cellules endothéliales vasculaires cérébrales ont une activité métabolique importante et possèdent plusieurs enzymes leur permettant de métaboliser certains composés actifs. Au niveau moléculaire, les cellules endothéliales vasculaires interagissent fortement avec le microenvironnement immédiat par l'intermédiaire de facteurs solubles et de molécules d'adhésion. Elles sont en étroite relation avec les péricytes et les cellules astrocytaires.

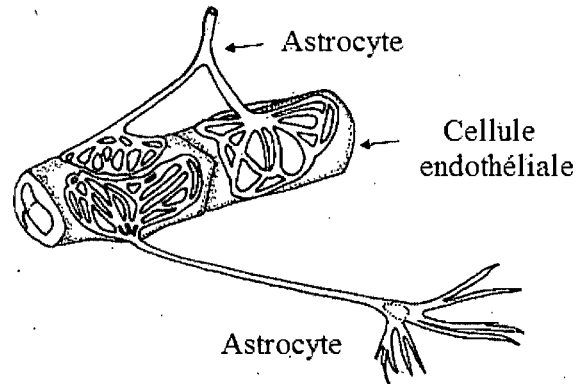
1.1.4.1 La barrière hémato-encéphalique

La barrière hémato-encéphalique est une composante unique au cerveau qui le protège des fluctuations de la composition plasmatique et de divers produits circulants pouvant perturber les fonctions neuronales. Elle joue aussi un rôle primordial sur la régulation du microenvironnement cérébral nécessaire pour la coordination des divers mécanismes cérébraux en permettant, d'une manière très sélective, l'entrée et la sortie des molécules dans le cerveau. Elle est constituée principalement des capillaires cérébraux dont les cellules endothéliales très rapprochées (environ 50-100 fois plus serrées que dans les microvaisseaux périphériques) entraînent une restriction importante au passage des molécules par les voies intercellulaires. On nomme jonction serrée cet espace intercellulaire qui limite la diffusion des solutés hydrophiliques. Les jonctions serrées sont constituées de complexes cadherine-catenine et de plusieurs protéines associées dont la claudine, l'occludine et d'autres molécules d'adhésion jonctionnelles associées aux cellules formant les jonctions serrées (Voir Fig. 1.1)(Ballabh et al. 2004, Lee et al. 2006). Seules les petites molécules lipophiliques comme O₂, CO₂ et l'éthanol peuvent passer de part et d'autre de la membrane lipidique des cellules endothéliales. Les péricytes et les processus pédieux des astrocytes contribuent aussi à cette restriction de diffusion

mais à un niveau moindre que les cellules endothéliales. Les petites molécules polaires nécessaires au fonctionnement du cerveau sont acheminées par le biais de transporteurs sélectifs, de même que divers déchets potentiellement toxiques (glutamate). Pour pénétrer la BHE, les molécules non lipophiles doivent utiliser des transporteurs. Certains de ces transporteurs comme le Glut-1 (glucose) utilisent le principe de la diffusion facilitée alors que d'autres transporteurs (Ex : glycine, alanine ou sérine) nécessitent de l'ATP et la présence d'un gradient de Na^+ .

La glycoprotéine-P qui appartient à une famille de protéine transmembranaire, est un transporteur nécessitant de l'ATP et permettant un efflux de molécules hydrophobiques. Elle joue un rôle important dans la protection du cerveau contre divers agents exogènes ayant pénétré dans le cerveau. Cliniquement, elle élimine divers agents de chimiothérapie utilisés dont les alkylants, l'actinomycine et la cyclosporine. L'endothélium cérébral a aussi un très faible niveau d'endocytose et de pinocytose comparativement aux cellules endothéliales systémiques. Cette endocytose se fait d'une manière très sélective et implique la liaison spécifique à un récepteur membranaire en tout premier lieu. Les cellules endothéliales possèdent aussi des transporteurs ioniques spécialisées dont des échangeurs Na^+/H^+ , $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ et une forte concentration d'enzymes Na,K-ATPase sur leur surface externe. Finalement, les cellules endothéliales cérébrales possèdent un système enzymatique incluant la monoamine oxydase et la DOPA décarboxylase. Ce système permet d'isoler le cerveau de certaines substances actives dans la circulation systémique pour ainsi empêcher une altération des fonctions neuronales. Seuls les organes circonventriculaires et l'hypophyse postérieure ne possèdent pas de BHE (Kandel et al. 2000, Abbott 2002, Abbott et al. 2006).

Fig. 1.1 Vue schématique de la barrière hémato-encéphalique (BHE)



Abbott et al. 2006

1.1.4.2 Modulation de la barrière hémato-encéphalique

Tel que mentionné précédemment, la BHE possède des propriétés statiques et dynamiques qui permettent à l'endothélium vasculaire cérébral de protéger et de réguler avec précision le microenvironnement cérébral. En condition normale et pathologique, de nombreuses substances et facteurs sont en mesure de modifier les propriétés de la BHE. Plusieurs facteurs humoraux sécrétés par les cellules endothéliales, les astrocytes, les péricytes, les neurones et les cellules tumorales peuvent augmenter ou diminuer la perméabilité de celle-ci à certaines substances selon la situation. Ces substances sont principalement des neurotransmetteurs et des médiateurs de l'inflammation tels que les interleukines, prostaglandines, bradykinines, facteurs de croissance (VEGF) et radicaux libres. Certains facteurs physiques dont les traumatismes cérébraux et les agents osmotiques peuvent aussi affecter la perméabilité de la BHE (Abbott et al. 2006, Abbott 2002, Lee et al. 2006, Ballabh et al. 2004).

1.1.4.3 Altération de la barrière hémato-encéphalique par les tumeurs cérébrales

Les tumeurs cérébrales invasives peuvent être visualisées à la tomодensitométrie axiale (Ct-Scan) ou à la résonance magnétique (RMN) grâce à la prise de substance de contraste injectée et qui témoigne ainsi d'une altération de la BHE. Il a été démontré que la BHE, peu développée dans les tumeurs cérébrales, entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire. Les mécanismes proposés sont multiples et impliquent une altération de la production des molécules d'adhésions entre les cellules endothéliales, en particulier la claudine et l'occludine. Ceci entraîne une ouverture des jonctions serrées, une augmentation de la perméabilité vasculaire et un œdème cérébral (Liebner et al. 2000, Papadopoulos et al. 2001). Divers facteurs solubles sécrétés par la tumeur dont le VEGF, les cytokines et le facteur de croissance hépatocytaire (HGF) pourraient être en cause (De Vries et al. 1996, Lamszus et al. 1999). Il a aussi été proposé que les cellules néoplasiques faiblement différenciées ne sont pas en mesure de produire les facteurs de croissance nécessaires pour les fonctions complexes de la BHE (Ballabh et al. 2004, Lee et al. 2006). Malgré l'altération des jonctions serrées, d'autres données ont démontré que la cytoarchitecture globale et plusieurs propriétés de la BHE sont tout de même préservées dans les tumeurs gliales de haut grade (Régina et al. 2001, Sawada et al. 2000, Shibata et al. 1989). Cet effet est visible en clinique par les faibles niveaux de concentration des agents de chimiothérapie qui parviennent à la tumeur.

1.1.5 Les péricytes

Les péricytes sont des cellules de support présentes dans les capillaires et les veinules post-capillaires. Elles sont aussi des acteurs importants dans le processus d'angiogenèse. Durant l'embryogenèse, les cellules endothéliales auraient la capacité de recruter les cellules mésenchymateuses non différenciées et de moduler leur différenciation en péricytes dans les capillaires et les veinules post-capillaires. Ce sont des cellules qui composent la membrane basale et qui interagissent étroitement avec les cellules endothéliales. Ces interactions se font de diverses manières par le

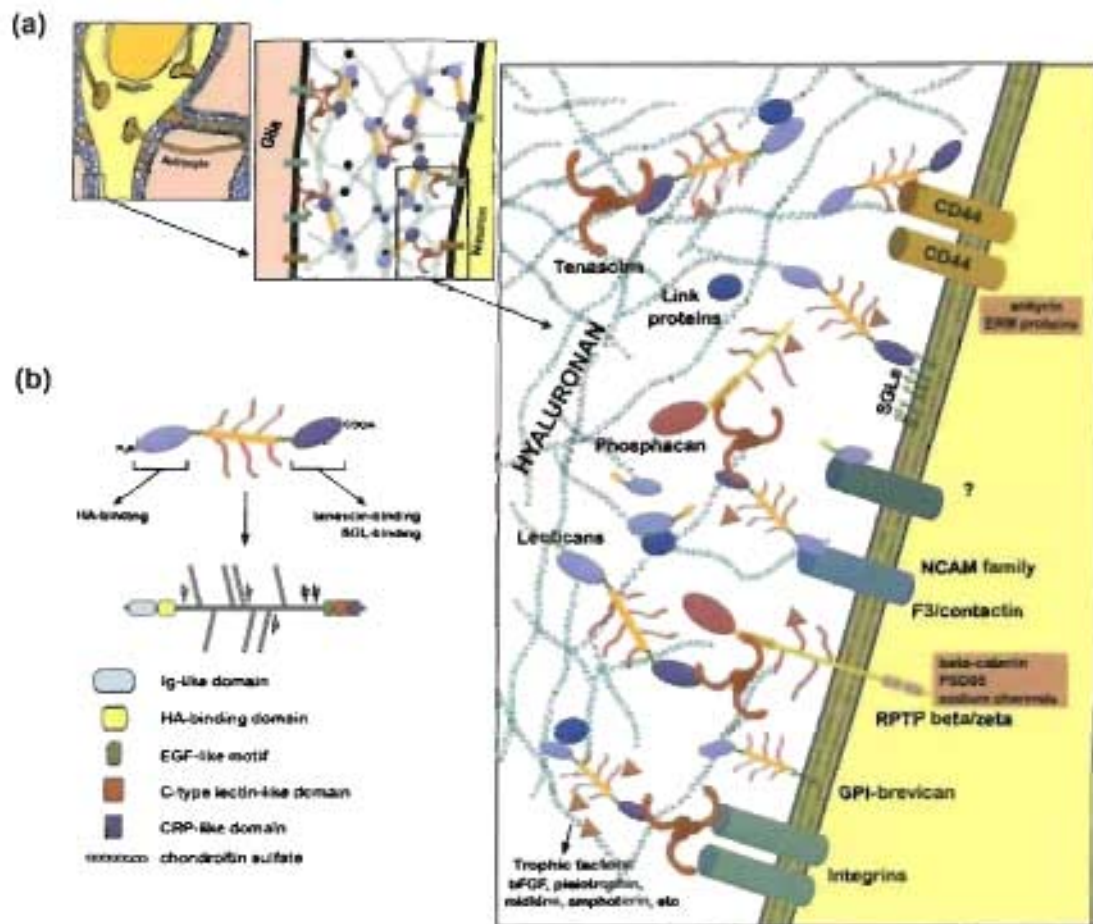
biais de facteurs solubles dont PDGF et TGF-B et par le biais de molécules d'adhésion, d'intégrines et de contacts directs avec les cellules endothéliales (Hirschi et al. 1996). De cette manière, les péricytes ont un rôle actif dans la prolifération et la migration cellulaire. Les péricytes sont des cellules multipotentes qui ont la capacité de se différencier en divers types cellulaires selon leur localisation. Elles peuvent se transformer en adipocytes, ostéoblastes et phagocytes (Rhodin et al. 1989, Brighton et al. 1992). Dans le cerveau, les péricytes ont la capacité de se différencier en microglie lors d'agressions diverses (Maxwell et al. 1965, Mato et al 1980). Chez les tumeurs, il a été proposé qu'une distorsion des interactions normales entre les péricytes et les cellules endothéliales pourrait expliquer en partie la perméabilité et le diamètre anormal des capillaires tumoraux (Morikawa et al. 2002).

1.1.6 La matrice extracellulaire cérébrale

La MEC est un environnement complexe et hautement organisé qui semble avoir de nombreux rôles dans les processus neurodéveloppementaux dont la migration cellulaire, la croissance neuronale, la synaptogenèse et la plasticité neuronale (Mariano et al. 2006). La MEC cérébrale a une composition moléculaire unique et possède très peu de collagène, laminin-1 et de fibronectine (Ruoslahti 1996). Elle est principalement composée d'un échafaud d'acide hyaluronique (HA) qui se comporte comme une toile moléculaire qui influence la migration et la division cellulaire. Les particularités structurales de la MEC cérébrale sont aussi déterminées par la liaison de glycoprotéines et de protéoglycans à l'HA. La principale molécule liée à HA est la famille des *lecticans* qui fait partie des protéoglycans chondro_tine sulfate et qui comprend *l'aggrecan*, *le neurocan*, *le vesican* et *le brevican* (Yamaguchi 2000)(Voir Fig. 1.2). Ces molécules permettent le lien entre la membrane cellulaire et l'échafaud de HA et auraient ainsi un rôle à jouer dans l'organisation péricellulaire et les interactions entre la MEC cérébrale et les molécules de surface. Quoique, les recherches actuelles ne permettent pas de déterminer avec précision toutes les fonctions de la MEC cérébrale, les diverses molécules qui la composent semblent avoir des rôles importants dans les mécanismes cellulaires et moléculaires en

conditions normale et pathologique (Ruoslahti 1996, Mariano et al. 2006). Les glycoprotéines *vesicans* de la famille des *lectinans* pourraient aussi avoir un rôle à jouer dans la croissance, l'invasion et la vascularisation des gliomes malins par le biais de diverses interactions avec des ligands exprimés par les cellules tumorales (Gadson 1999, Bellail et al. 2004, Paulus et al. 1996, Nutt et al. 2001).

Fig. 1.2 Schématisation de la composition de la matrice extracellulaire



Mariano et al. 2006

1.1.6.1 Les métalloprotéinases de la matrice

Pour accomplir leurs fonctions, les cellules se doivent de communiquer et d'interagir avec leur environnement immédiat. Différentes interactions ont lieu entre les cellules,

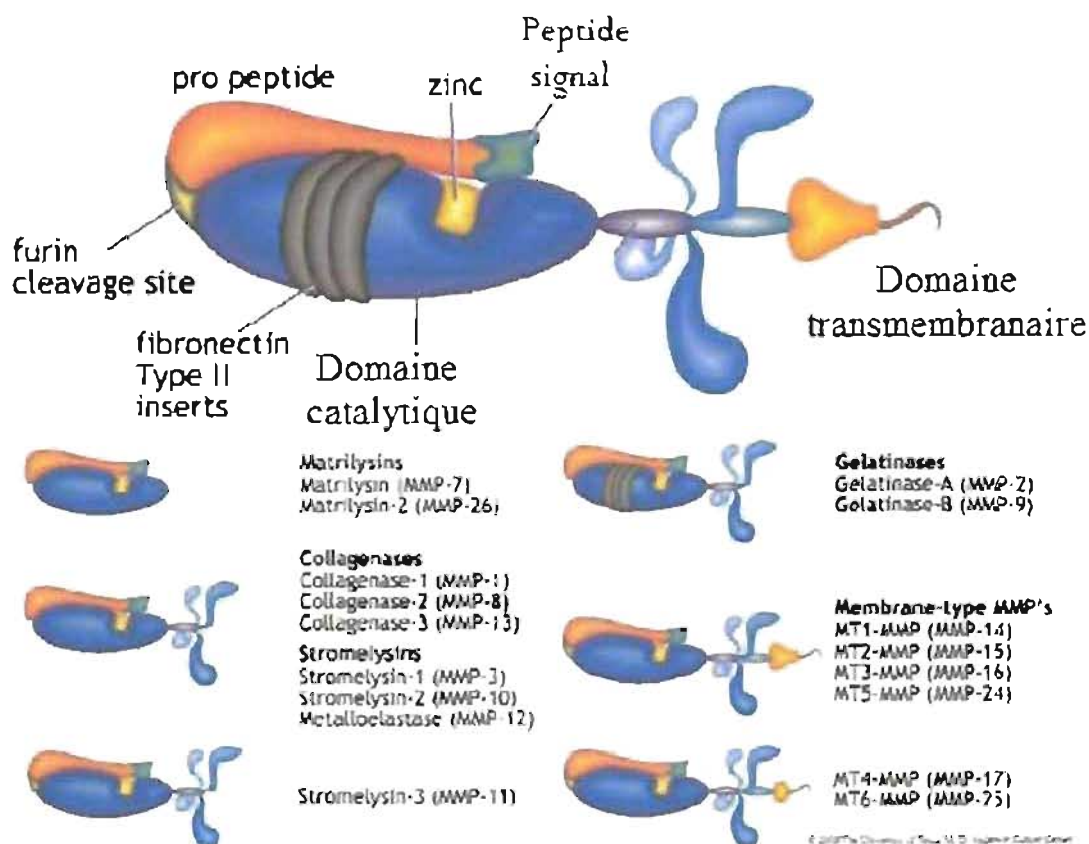
mais aussi entre les cellules et la MEC qui les entourent. Les récepteurs membranaires, les molécules d'adhésion cellulaire et la sécrétion de facteurs solubles ne sont que quelques-unes des méthodes utilisées pour moduler ces interactions. Tous ces mécanismes sont nécessaires pour préserver l'intégrité cellulaire et accomplir les diverses fonctions cellulaires normales (Osenkowski et al. 2004). De nombreux signaux extracellulaires sont au départ du microenvironnement péricellulaire. Les cellules peuvent influencer directement leur milieu extracellulaire par le biais d'enzymes protéolytiques qui permettent une dégradation de la matrice extracellulaire et une libération de substances ayant une influence sur la croissance, la différenciation et la survie des cellules. Plusieurs protéases ont été impliquées dans ces processus dont les métalloprotéinases de la matrice (MMP). Les MMP ont un rôle clé dans la dégradation des protéines péricellulaires et sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques (Sterlicht et al. 2001).

1.1.6.2 Généralités sur les MMP

Les MMP font partie d'une famille de plus de 20 endopeptidases contenant du zinc capable de dégrader diverses composantes de la MEC. Elles sont produites sous la forme de pro-enzymes qui nécessitent une activation protéolytique. Elles sont divisées en deux groupes selon qu'elles soient sécrétées par la cellule ou ancrées à la membrane (MT) (Rundhaug 2005, Haas 2005, Handsley et al. 2005). Chacune de ces enzymes démontre une spécificité pour son substrat (protéines) de la matrice extracellulaire, mais elles peuvent aussi cliver différentes molécules d'adhésion cellulaire, facteurs de croissance liés à la matrice et d'autres enzymes solubles (Woessner et al. 1994, Egeblad et al. 2002). Le pro-domaine de toutes les MMPs contient un résidu de cystéine dont le groupe sulfhydryl et l'ion de zinc servent à maintenir leur état latent (Nagase et al. 1999). La séparation de ce groupe cystéine-zinc par une méthode physique ou chimique est la première étape d'activation de l'activité catalytique des MMP (Stamenkovic 2005)(Voir Fig. 1.3). La plupart des MMPs sont activées à l'extérieur de la cellule par d'autres MMP ou des protéases à sérine. Certaines MMP et MT-MMP peuvent aussi être activées dans le compartiment

intracellulaire par des protéases à sérine tels que la furine (Egeblad et al. 2002). D'autres systèmes de régulation impliquent leur régulation par des inhibiteurs de protéase endogènes (TIMP-1,-2, -3, -4), plasmatiques (α_2 -macroglobuline) ou autres (TSP-1). De plus, l'expression des MMP peut aussi être régulée à des niveaux transcriptionnels et post-transcriptionnels par des cytokines, agents chimiques, stress physique, oncogènes ou par des interactions avec la MEC (Rundhaug 2005). Leur domaine hemopexine (PEX) permet le clivage des fibrilles de collagène et sert aussi de site de liaison pour diverses protéines incluant les intégrines, les récepteurs de surface cellulaire et des inhibiteurs cellulaires (Rundhaug 2005). Dans l'ensemble, les MMP ont un rôle clé dans la dégradation de la MEC et sont impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires de prolifération, migration, invasion et d'apoptose. Ces processus sont associés à l'invasion tumorale, les métastases et l'angiogenèse (Egeblad et al. 2002) en permettant la dégradation de la MEC, mais aussi en rendant disponible des facteurs de croissance actifs et des cytokines.

Fig. 1.3 Structure de base d'une métalloprotéinase et liste des différents types de métalloprotéinases



Légende : Structure de base des MMP contenant un pro-domaine et un domaine catalytique. Les MMP de type membranaire comme MT1-MMP possèdent un domaine transmembranaire (Rundhaug et al. 2005).

1.1.6.3 Les métalloprotéinases membranaires (MT-MMP)

Les MT-MMP sont des MMP qui sont ancrées à la surface de la cellule via un domaine transmembranaire C-terminal ou d'une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Lee et al. 2004, Vihinen et al. 2002). En plus de dégrader la gélatine, le collagène de type I et II, la fibronectine, les protéoglycans et d'autres constituants de la matrice (McCawley et al. 2001), les MT-MMP sont très impliquées dans d'autres fonctions cellulaires dont la migration et la prolifération des cellules endothéliales en condition normale et pathologique, surtout en lien avec les processus oncologiques

impliquant l'angiogenèse, l'invasion et les métastases. De plus, elles se différencient des MMP solubles par leur affinité envers différents substrats, leur interaction avec les TIMP et leur mécanisme de régulation impliquant des processus autocatalytiques, d'invagination d'ectodomaines, homodimérisation et d'internalisation (Osenkowski et al. 2004). Contrairement aux autres MMP, l'activité protéolytique des MT-MMP ne dépend pas des niveaux d'inhibiteur de protéase endogène présents dans le milieu extracellulaire. Les MT-MMP peuvent ainsi réguler leur activité protéolytique par ces mécanismes de régulation, ce qui est une de leur caractéristique importante. MT1-MMP (MMP-14) est l'une des MT-MMP les plus étudiées en raison de son implication dans divers processus cellulaires et développementaux en plus de nombreuses conditions pathologiques impliquant le développement de tumeurs dont les tumeurs gliales (Seiki et al. 2003, Yana et al. 2002).

1.1.6.4 Les MMP sont impliquées dans l'angiogenèse

Les MMP jouent un rôle essentiel dans l'angiogenèse pour plusieurs raisons (Osenkowski et al. 2004). Premièrement, l'une des premières étapes de l'angiogenèse nécessite une dégradation protéolytique de la membrane basale et de la MEC. Deuxièmement, les MMP possèdent aussi des fonctions pro et anti-angiogéniques dont la balance pourrait être déterminante sur les phénomènes vasculaires. En condition normale, l'angiogenèse physiologique est étroitement régulée par la balance entre la signalisation des facteurs angiogéniques, l'activité et la signalisation des MMP, les inhibiteurs d'angiogenèse endogène et les inhibiteurs de MMP. Troisièmement, les MMP ont des effets multiples sur les cellules endothéliales et augmentent leur migration et la formation de tubules (Nguyen et al. 2001). Quatrièmement, plusieurs facteurs de croissance tels que VEGF, TNF- α , bFGF, TGF- β induisent l'expression des MMP dans les cellules endothéliales et les cellules du stroma. Cet effet peut être potentialisé par les MMP elles-mêmes lorsqu'elles dégradent les composantes de la MEC et libèrent ces mêmes facteurs de croissances (Kalluri et al. 2004). Cinquièmement, certaines MMP comme MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-12 ont aussi un rôle anti-angiogénique soit directement, soit en

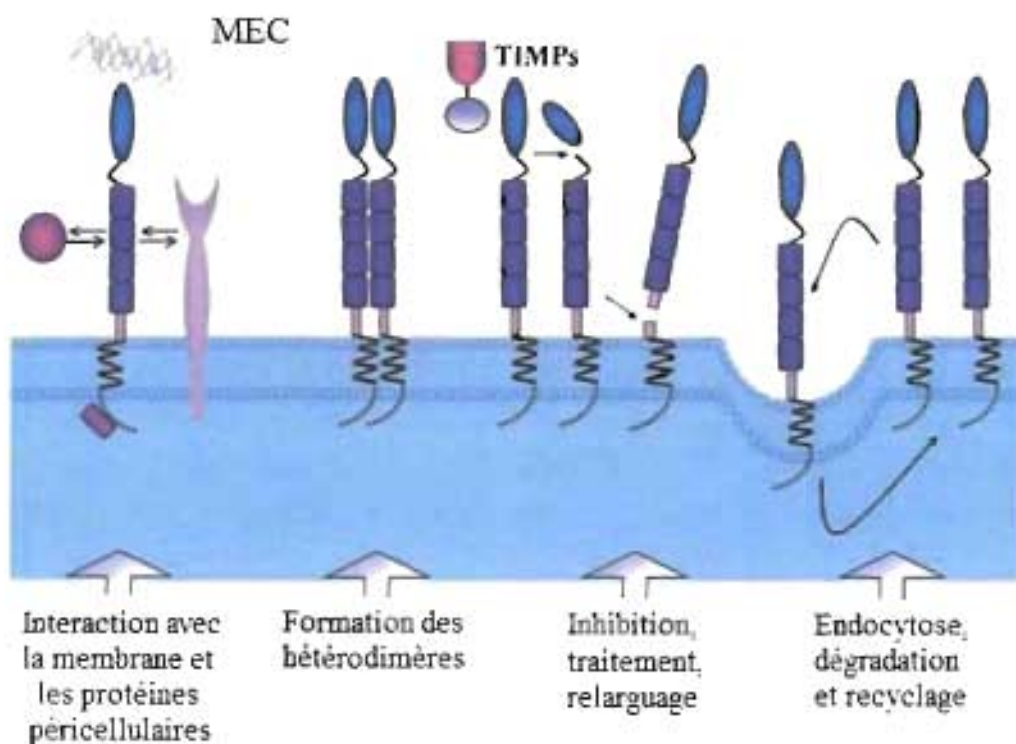
entraînant la libération de facteurs anti-angiogéniques durant la dégradation de la MEC. Ainsi, une modulation étroite de l'angiogenèse est en partie régulée par la balance entre tous les facteurs pro et anti-angiogéniques impliquant les MMP, ce qui offre des avenues prometteuses à certains nouveaux traitements antiangiogéniques en déterminant des cibles moléculaires de plus en plus précises.

1.1.6.5 Les caractéristiques de MT1-MMP

MT1-MMP est une métalloprotéinase de la matrice ancrée à la membrane cellulaire via un domaine transmembranaire à son extrémité C-terminale. Initialement produite sous la forme d'un zymogène inactif de 60 kDa, sa forme active de 57 kDa est insérée dans la membrane plasmique avec sa partie catalytique orientée vers l'espace extracellulaire (Osenkowski et al. 2004). Elle a été découverte lors de l'étude de l'activation de la pro-MMP-2, une MMP sécrétée qui est associée aux capacités invasives des cellules tumorales et aux métastases. La forme active de MT1-MMP dégrade de nombreuses composantes de la MEC dont le collagène type 1-2-3, la fibronectine, les laminines type 1 et 5, la vitronectine, fibrine et aggrecans (Pei et al. 1996, Ohuchi et al. 1997). L'activité collagénolytique de MT1-MMP est essentielle pour le développement normal. De plus, MT1-MMP joue un rôle crucial dans le remodelage de la matrice des tissus conjonctifs en raison de son activation de pro-MMP-2, pro-MMP-13 et pro-MMP-13 (Osenkowski et al. 2004). En plus de son activité protéolytique sur la MEC, MT1-MMP est aussi capable d'hydrolyser les récepteurs de facteurs de croissance et des cytokines. MT1-MMP a aussi de nombreux rôles dans la migration cellulaire, l'angiogenèse et la mort cellulaire. Ces fonctions sont en partie régulées par la portion catalytique de MT1-MMP, mais aussi via des voies de signalisation intracellulaires qui impliquent sa portion cytoplasmique. De nombreuses études ont démontré que la mort cellulaire corrélait avec une activation de la pro-MMP-2 en MMP-2 par l'intermédiaire de MT1-MMP (Galvez et al. 2002, Jeong et al. 1999). En effet, ces études sur les cellules endothéliales ont pu démontrer qu'une augmentation de la MMP-2 via l'activité de MT1-MMP corrélait avec un potentiel migratoire augmenté des cellules endothéliales

et tumorales, une augmentation de la tubulogénèse sur Matrigel™ et une augmentation de la mort cellulaire. Il a récemment été démontré que la surexpression de MT1-MMP entraîne une mort cellulaire importante (Belkaid et al. 2007) et que cette mort cellulaire ne serait que partiellement médiée par sa portion catalytique et l'activation de la MMP-2. La portion cytoplasmique activerait des voies apoptotiques par un mécanisme dépendant des caspases (Langlois et al. 2005). L'expression de MT1-MMP semble corrélée avec la malignité de différents types de tumeurs pulmonaires, gastriques, tumeur du colon et des seins et surtout avec les gliomes malins (Souni et al. 2003). La régulation de MT1-MMP est encore mal comprise mais celle-ci implique plusieurs mécanismes qui peuvent réguler son activité à la surface. En effet, l'interaction avec les protéines membranaires et péricellulaires, la formation d'homodimères, l'inhibition (via les TIMPs), le traitement, le relargage, l'endocytose, la dégradation et le recyclage sont toutes des manières différentes de réguler son activité à la surface de la cellule (Voir Fig. 1.4)(Osenkowski et al. 2004).

Fig. 1.4 Différents mécanismes connus de la régulation de MT1-MMP



Osenkowski et al. 2004

1.1.6.6 La mort cellulaire

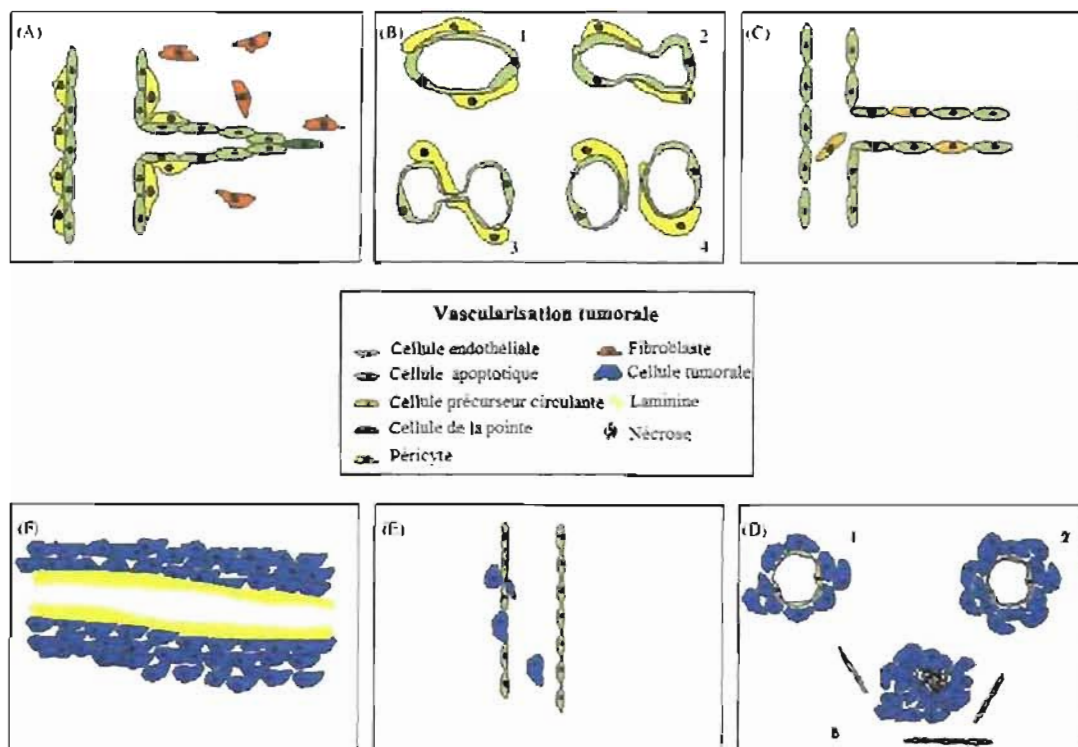
L'apoptose est une forme de mort cellulaire programmée qui a des caractéristiques biochimiques et morphologiques précises contrairement à la nécrose qui est une mort cellulaire se produisant après un épuisement d'énergie de la cellule. L'apoptose a un rôle important dans l'homéostasie car elle est observée dans plusieurs conditions physiologiques comme la réparation tissulaire, les processus immunologiques et au niveau de l'endomètre durant le cycle menstruel. Pour devenir apoptotique, la cellule doit exécuter un programme précis qui aura comme finalité la destruction structurée de la cellule sans déclencher de processus inflammatoire. Les principaux acteurs de cette destruction cellulaire organisée sont les caspases, des protéases de la cystéine, qui possèdent deux voies d'activation qui ont été bien décrites : la voie des récepteurs de mort et la voie mitochondriale (Stasser et al. 2000, Edinger et al. 2005, Ziegler et al. 2004). Expérimentalement, la morphologie spécifique des cellules apoptotiques et nécrotiques peut être déterminée par la cytométrie de flux avec une méthode de double marquage avec l'annexin V et l'iodure de propidium (PI). L'un des signes précoces de l'apoptose est l'externalisation de la phosphatidylsérine qui devient un marqueur pour les cellules phagocytaires (Grimsley et al. 2003). L'annexin V, une protéine de 35 kDa liant le calcium et qui peut être associée à un fluorochrome, va se lier à la phosphatidylsérine. Lors de la nécrose, la membrane cellulaire devient perméable et permet l'entrée dans la cellule de l'iodure de propidium (PI) qui a une forte affinité pour l'ADN et l'ARN du noyau et la fluorescence de la cellule augmentera (Ziegler et al. 2004).

1.2 La vascularisation tumorale

Comme les autres cellules du corps humain, les cellules tumorales sont dépendantes de la vascularisation pour leurs apports en oxygène et nutriments en plus de l'élimination des déchets. Pour y parvenir, les tumeurs utilisent non seulement des processus angiogéniques impliquant la formation de nouveaux vaisseaux, mais aussi

plusieurs mécanismes non-angiogéniques qui recrutent la vascularisation préexistante. Ces différents processus pour obtenir un apport vasculaire pourraient exister d'une manière concomittante dans une même tumeur ou peuvent être sélectivement déterminées selon le type de tumeurs ou de microenvironnement de l'hôte (Auguste et al. 2005). Les six principaux mécanismes de vascularisation tumorale sont : 1) l'angiogenèse par bourgeonnement, 2) l'intussusception, 3) le recrutement de précurseurs endothéliaux circulants, 4) le vaisseau mosaïque, 5) le mimétisme vasculaire et 6) la cooption vasculaire.

Fig. 1.5 Mécanismes de vascularisation tumorale



Légende : Six principaux mécanismes de vascularisation tumorale sont connus A) Angiogenèse par bourgeonnement, B) Intussusception, C) Recrutement de cellules précurseurs circulantes, D) Cooption, E) Vaisseau mosaïque et F) Mimétisme vasculaire. (Auguste et al. 2005).

1.2.1 L'angiogenèse tumorale

L'angiogenèse est le processus par lequel des nouveaux vaisseaux sont formés à partir de la vascularisation préexistante. Elle est impliquée dans un grand nombre de conditions biologiques normales et pathologiques. En condition normale, le processus d'angiogenèse est vital durant l'embryogenèse, le développement et la réparation du corps humain (processus de cicatrisation, système reproducteur féminin...). L'angiogenèse est aussi centrale dans plusieurs processus pathologiques très prévalents dans la population comme les maladies inflammatoires, la rétinopathie diabétique et la croissance de tumeurs solides.

Depuis plusieurs décennies, l'angiogenèse est reconnue comme un processus central dans le développement des tumeurs. En 1945, Algire et al. avaient déjà suggéré que les cellules tumorales avaient la capacité de stimuler continuellement la croissance de nouveaux capillaires (Algire et al. 1945). En 1971, Folkman a démontré que les tumeurs solides ne peuvent pas se développer au-delà d'un certain volume sans le support de l'angiogenèse (Folkman 1971). En pratique, la capacité angiogénique des tumeurs peut être déterminée lors de biopsies de régions possédant une densité élevée de microvaisseaux (Weidner et al. 1995). Dans certains types de tumeurs, la densité de microvaisseaux intratumoraux a une valeur pronostique car elle démontre une corrélation directe avec l'incidence de métastases et la survie des patients (Weidner et al. 1995, 1999).

L'angiogenèse est un mécanisme complexe suivant une multitude d'étapes coordonnées impliquant la production et la relâche de facteurs angiogéniques, la prolifération, l'apoptose et la migration des cellules microvasculaires, la dégradation protéolytique de la MEC et la composition de nouveaux vaisseaux (Ausprunk et al. 1977, Senger et al. 1996, Wesseling et al. 1997, Gupta et al. 2003, Auguste et al. 2005). Lorsque la demande métabolique de la tumeur augmente, celle-ci change en un phénotype angiogénique et recrute de nouveaux vaisseaux à partir du stroma

environnant. Le passage à ce phénotype angiogénique semble être régulé par la balance entre les facteurs pro et anti-angiogéniques (Hanahan et al. 1996).

1.2.1.1 Angiogenèse par bourgeonnement

L'angiogenèse par bourgeonnement implique la prolifération et la migration des cellules endothéliales des vaisseaux préexistants suivi de leur organisation en structures tubulaires. Pour ce faire, plusieurs étapes doivent s'enchaîner pour coordonner les différentes interactions entre les cellules endothéliales et la matrice extracellulaire. Il doit y avoir une dégradation protéolytique de la membrane basale entourant les cellules endothéliales suivie de la migration et de la prolifération des cellules endothéliales du stroma environnant. Cette étape est suivie de la différenciation et maturation des cellules endothéliales, formation d'une lumière, recrutement des péricytes et coalescence des tubes en boucles pour compléter le processus (Rundhaug 2005).

Les principales substances impliquées seraient le facteur de croissance vasculaire endothéliale (VEGF) et les angiopoïétines (Ang-1 et Ang-2). Les récepteurs pour ces deux familles sont spécifiquement retrouvés sur l'endothélium vasculaire (Flamme 1995, Dumont et al. 1992, Sato et al. 1995). Le principal facteur contrôlant ce mécanisme est le VEGF-A (Carmeliet et al. 2000). Le VEGF-A est la protéine angiogénique et le facteur de perméabilité vasculaire le plus puissant qui soit connu (Dvorak et al. 1995a, Feng et al. 1996, 1999). Cette protéine fait partie de la famille des VEGF qui comporte plusieurs autres types VEGF-B, C, D, E et le facteur de croissance dérivé du placenta (PlGF) (Leenders et al. 2002). Le VEGF-A est crucial pour le développement de l'angiogenèse tumorale (Wesseling et al. 1997). Il est sécrété par les cellules tumorales et agit sur les cellules endothéliales qui expriment les récepteurs VEGFR-1 (Flt-1) et VEGFR-2 (KDR). Le récepteur VEGFR-2 semble médier la majorité des effets angiogéniques du VEGF-A en induisant la prolifération des cellules endothéliales, l'expression de protéases et la perméabilité vasculaire (Gille et al. 2000, Keyt et al. 1996).

L'angiopoïétine 1 (Ang-1) et son antagoniste naturel l'angiopoïétine 2 (Ang-2) sont des ligands régulant la phosphorylation des récepteurs tyrosine kinase Tie2/Tek sur la surface des cellules endothéliales. Ang-1 entraîne la phosphorylation de Tie2/Tek alors que l'Ang-2 bloque le récepteur et empêche l'action de l'Ang-1. La régulation précise de ce récepteur est primordiale pour le développement normal du système vasculaire (Suri et al. 1996, Maisonpierre et al. 1997). Cependant, Ang-2 n'est pas retrouvée dans le cerveau normal (Zagzag et al. 1999). Ang-1 agirait sur la modulation des interactions entre les cellules endothéliales et les cellules de support (péricytes et muscles lisses). Ang-2 aurait pour fonction de favoriser le remodelage vasculaire (en empêchant l'action stabilisatrice de Ang-1). Une interaction très précise de ces substances pro-angiogéniques est nécessaire pour l'angiogenèse par bourgeonnement. En entraînant la vasodilatation et en augmentant la perméabilité des capillaires préexistants, le VEGF-A permet la mise en place d'une MEC temporaire qui servira à la migration et la prolifération des cellules endothéliales. Cette matrice initiale est surtout constituée de fibrinogène, une protéine plasmatique importante. Par la suite, l'effet déstabilisant causé par l'Ang-2, produite et relâchée par les cellules endothéliales, entraîne une inhibition des interactions entre les cellules endothéliales et les péricytes, ce qui favorise la mise en place d'un réseau vasculaire immature et l'apoptose de certaines cellules endothéliales (Maisonpierre et al. 1997, Gale et al. 1999). Le VEGF-A a par la suite un rôle primordial sur la MEC et les cellules endothéliales. Il entraîne une augmentation de l'expression des métalloprotéinases et des activateurs de plasminogène qui vont dégrader la MEC (Vu et al. 1998, Bergers et al. 2000, Pepper et al. 1992). Ce processus est nécessaire à la prolifération et la migration des cellules endothéliales qu'il induira par la suite (Plouet et al. 1989, Connolly et al. 1989). Les vaisseaux nouvellement formés semblent utiliser le gradient de concentration du VEGF pour les guider vers les cellules tumorales. Cette forme de chimiotactisme a déjà été démontrée dans l'embryogenèse et semblerait se répéter lors de l'angiogenèse tumorale. Une grande concentration de récepteurs VEGFR2 serait localisée sur les cellules endothéliales à l'extrémité des nouveaux vaisseaux (Gerhardt et al. 2003, Gerhardt et al. 2005). De plus, des signaux répulsifs

produits par des récepteurs membranaires, les nétrines UNC5B à la pointe des cellules endothéliales pourraient aussi contribuer à moduler l'orientation des vaisseaux et engendrer des trajets aberrants (Lu et al. 2004). Bien que non prouvés, ces deux mécanismes sont proposés et pourraient expliquer en partie pourquoi les néovaisseaux tumoraux n'atteignent pas le niveau d'organisation présent durant l'embryogenèse, ce qui produit une vascularisation très désorganisée.

1.2.1.2 Angiogenèse par intussusception

Ce processus, différent de l'angiogenèse par bourgeonnement, implique la formation d'une colonne de tissu interstitiel à l'intérieur de la lumière d'un vaisseau préexistant, ce qui entraîne la partition de sa lumière (Auguste et al. 2005). Deux cellules endothéliales opposées entrent en contact et une jonction interendothéliale se développe au point de contact. Par la suite, la pression des cytoplasmes et l'épaississement de leurs membranes entraînent la formation d'une lumière supplémentaire entre les deux cellules. Ce processus serait métaboliquement plus avantageux et plus rapide que l'angiogenèse par bourgeonnement car il n'implique pas la prolifération de cellules endothéliales. Les cellules endothéliales augmentent leur volume et deviennent plus épaisses (Burri et al. 2004). Les péricytes et les fibroblastes semblent avoir un rôle clé dans ce phénomène car elles vont envahir l'espace intercellulaire (Buri et al. 2002). Des protéines comme le collagène et la fibrine vont ensuite envahir le pilier. Ce mécanisme d'intussusception est présent durant l'embryogenèse, mais a aussi été démontré durant l'angiogenèse tumorale (Patan et al. 1996, Patan et al. 2001). Il se produit alors une arborisation vasculaire qui peut entraîner soit un remodelage du réseau existant, soit un nouveau réseau (Djovov et al. 2002). Bien que les mécanismes moléculaires précis soient encore mal compris, le stress de cisaillement semble être un facteur majeur dans le développement de ces vaisseaux. Certaines études de modèles animaux expérimentaux indiquent que les facteurs impliqués dans les interactions entre les péricytes et les cellules endothéliales sont les principaux acteurs de ce mécanisme (Djonov et al. 2002, Djonov et al. 2003). Les données actuelles tendent à démontrer

que l'angiogenèse par bourgeonnement et par intussusception ne sont pas des phénomènes mutuellement exclusifs (Burri et al. 2004).

1.2.1.3 Recrutement d'angioblastes

L'hémangioblaste est un précurseur commun aux cellules hématopoïétiques et aux lignées endothéliales. Cette cellule qui exprime le récepteur VEGFR2 est capable de se différencier en angioblaste, une cellule progénitrice qui est, quant à elle capable de se différencier en cellule endothéliale. Chez l'adulte, les angioblastes sont dérivés des cellules progénitrices adultes multipotentes (MAPC) produites dans la moelle osseuse. Elles possèdent plusieurs récepteurs dont VEGFR1, VEGFR2 (Moore et al. 2002, Raffii et al. 2000). Ces cellules deviennent par la suite des cellules précurseurs endothéliales circulantes (CEP). Elles sont recrutées dans la circulation lors d'une stimulation causée par le VEGF-A, Ang-1 et MMP-9 (Rabbany et al. 2003, Rafii et al. 2002). La mobilisation de CEP lors de la création d'une néovascularisation tumorale a surtout été démontrée dans des modèles animaux impliquant des souris (Lyden et al. 2001). Le recrutement de CEP pour former la néovascularisation tumorale dépend aussi du type de tumeur, étant maximale chez les lymphomes (> 90%) et moindre chez les neuroblastomes (< 5%) lorsque ces tumeurs sont implantées par voie sous-cutanée chez la souris (Rafii et al. 2002, Davidoff et al. 2001). D'un point de vue thérapeutique, les CEP pourraient être utilisées éventuellement pour administrer des molécules anti-angiogéniques directement dans la vascularisation tumorale (Davidoff et al. 2001).

1.2.1.4 Vaisseaux mosaïques

En 2000, Chang et al. ont décrit un type de vascularisation tumorale qu'ils nomment vaisseau mosaïque. Dans ce modèle, la surface intraluminale des vaisseaux est tapissée à la fois par des cellules tumorales et des cellules endothéliales (Chang et al. 2000). Bien que les mécanismes et l'importance de cette vascularisation tumorale soient encore mal compris, leur régulation pourrait impliquer l'activation de MMP-2

par des facteurs de croissance angiogéniques tels que VEGF-A et FGF-2, ce qui aurait pour effet de dégrader la membrane basale et ainsi augmenter le nombre de vaisseaux mosaïques (Chang et al. 2000, Folkman et al. 2001).

1.2.1.5 Mimétisme vasculaire

Le concept de mimétisme vasculaire a été proposé par Maniotis et al. en 1999 lors de l'observation d'un modèle de mélanome agressif qui présentait des vaisseaux angiogéniques à sa périphérie seulement, contrairement au centre de la tumeur qui était vascularisé par des canaux vasculaires pourvus d'une membrane basale sans aucune cellule endothéliale. Ils ont été en mesure de reproduire ces canaux vasculaires *in vitro* en faisant croître les mêmes cellules tumorales dans une matrice de Matrigel™ (Folberg et al. 2004). Une étude approfondie de ces cellules tumorales permet de mettre en évidence certains gènes de cellules embryonnaires, des marqueurs de cellules endothéliales et des protéines de la MEC (Bittner et al. 2000). Les mécanismes régissant ce mimétisme vasculaire pourraient impliquer MT1-MMP et la voie de signalisation des PI3K, EphA2, un récepteur pour l'ephrin A1 est très exprimé chez les mélanomes agressifs et pourrait aussi contribuer à ce mécanisme (Hendrix et al. 2001, Hess et al. 2001, Hess et al. 2006). Bien que décrit initialement chez le mélanome, le mimétisme vasculaire est aussi présent dans le cancer du sein, des poumons, de la prostate et le carcinome ovarien (Passalidou et al. 2002, Sharma et al. 2002, Sood et al. 2001, Shirakawa et al. 2002).

1.2.1.6 Le modèle de cooption vasculaire

Depuis plusieurs décennies, la recherche sur la tumorigenèse tend vers l'étude du développement de la néovascularisation tumorale. Le modèle de croissance tumorale proposé par Folkman stipule que la majorité des tumeurs et des métastases est issue de petites structures avasculaires qui doivent ensuite induire le développement de nouveaux vaisseaux pour supporter leur croissance au-delà de 1-3 mm³ (Folkman 1971). Cette hypothèse a été testée avec différents types de modèles de cellules

tumorales implantées dans des milieux avasculaires (cornée, sous-cutané, humeur aqueuse). Deux phases de croissance des tumeurs étaient alors mises en évidence, soit une phase avasculaire démontrant une croissance linéaire jusqu'à un certain niveau et une phase vasculaire qui était caractérisée par la néovascularisation tumorale suivie d'une croissance exponentielle de cellules tumorales. *In vivo*, ce phénomène est observé dans le cas des carcinomes ovariens qui produisent des implants péritonéaux métastatiques initialement petits et avasculaires qui ont ensuite une croissance importante après leur vascularisation (Folkman 1995). Ce modèle proposé est surtout vrai pour les tumeurs qui tendent initialement à se développer dans un milieu séparé de leur vascularisation par une membrane basale ou dans des modèles expérimentaux (Folkman 1990, Hanahan 1996).

Depuis quelques années, des groupes de recherche ont étudié la migration de cellules tumorales le long des vaisseaux. Certaines observations tendent à indiquer que le développement des tumeurs dans des milieux très vascularisés ou de métastases ne suivent pas le modèle proposé par Folkman (Wesseling et al. 1994, Holmgren et al. 1995, Pezzella et al. 1997). Holash et al. (Holash et al. 1999) ont été les premiers à observer que la croissance initiale de cellules de glioblastomes multiformes implantées dans le cerveau de rats étaient dépendantes des vaisseaux de l'hôte qu'elles utilisaient pour leur propre vascularisation. Par la suite, la croissance des cellules tumorales est appuyée par une phase d'angiogenèse en périphérie de la tumeur. Ils ont utilisé le terme cooption pour décrire cette première phase qui implique le parasitage des vaisseaux de l'hôte.

Pour faire cette observation, Holash et al. ont implanté des cellules de glioblastome de rat C6 dans le noyau caudé et le putamen de rat Sprague-Dawley. Par la suite, les rats étaient sacrifiés après 1, 2 et 4 semaines pour l'étude des lames histopathologiques et la quantification de certaines protéines. Après une semaine, les échantillons de taille infra-millimétriques étaient bien vascularisés par des vaisseaux identiques aux vaisseaux cérébraux normaux sans aucune évidence d'angiogenèse. Après deux semaines, les tumeurs étaient de plus de 2 millimètres, ne démontraient

aucun signe de réponse angiogénique, mais plutôt une dilatation et une diminution de la densité des vaisseaux. À quatre semaines, des changements marqués se produisirent dans les tumeurs. Les tumeurs mesurant plusieurs millimètres de diamètre présentaient une régression des vaisseaux internes accompagnée d'une nécrose centrale. La périphérie de la tumeur quant à elle, démontrait une réponse angiogénique très marquée. Plusieurs autres modèles *in vivo* ont démontré des résultats similaires lors d'implantation de cellules tumorales (lignée gliale GL261, cellules d'adénocarcinome de rat RBA) dans le cerveau et les poumons (Lewis Lung Carcinoma celles) de rats (Holash et al. 1999, Zagzag et al. 2000). Holash et al. ont observé que certains types de tumeurs faisaient rapidement une cooption des vaisseaux de l'hôte pour former une masse tumorale initialement très vascularisée. Par la suite, il y a une régression des vaisseaux inclus dans la cooption qui entraîne une tumeur avasculaire et une perte massive de cellules tumorales. Cet événement est très précoce et il se produit une apoptose des cellules vasculaires qui précède l'apoptose des cellules tumorales. Les cellules endothéliales se détachent progressivement de leurs cellules de support (péricytes et muscles lisses). Cependant, les cellules tumorales restantes sont ultimement maintenues en vie par une angiogenèse importante qui se produit majoritairement en périphérie de la tumeur.

Les mécanismes précis qui régissent l'interrelation entre les vaisseaux préexistants qui subissent la cooption et l'angiogenèse tumorale sont encore mal compris, mais ils semblent impliquer des facteurs anti et pro-angiogéniques déjà connus. Les principales substances seraient le VEGF et les angiopoïétines Ang-1 et Ang-2. Les récepteurs pour ces deux familles sont spécifiquement retrouvés sur l'endothélium vasculaire (Flamme 1995, Dumont et al. 1992, Sato et al. 1995). Le VEGF-A est crucial pour le développement de l'angiogenèse tumorale (Wesseling et al. 1997). Il est sécrété par les cellules tumorales et agit sur les cellules endothéliales qui expriment les récepteurs VEGFR-1 (Flt-1) et VEGFR-2 (KDR). Le récepteur VEGFR-2 semble médier la majorité des effets angiogéniques du VEGF-A en induisant la prolifération des cellules endothéliales, l'expression de protéases et la perméabilité vasculaire (Gille et al. 2000, Keyt et al. 1996). Chez les gliomes, le

VEGF est préférentiellement exprimé autour des régions hypoxémiques et nécrotiques (Plate et al. 1994) et le niveau de VEGF semble corrélérer avec le grade de malignité et la densité de microvaisseaux (Schmidt et al. 1999, Samoto et al. 1995).

1.2.1.7 Étude de l'angiogenèse in vitro

La culture de cellules endothéliales permet d'étudier l'angiogenèse *in vitro*. Initialement, les cultures 2D de ces cellules dans un milieu uniquement liquide ont permis de mieux comprendre leurs fonctions et les effets de différents facteurs de croissance. Cependant, ce type de culture ne permet pas de reproduire le microenvironnement tridimensionnel complexe dans lequel les cellules endothéliales évoluent *in vivo*. Pour médier à ce problème, diverses matrices semi-gélatineuses ont été développées et permettent d'étudier la réponse des cellules endothéliales à des facteurs de croissance et leur permet une organisation spatiale (Hiraoka et al. 1998, Vernon et al. 1999). Ces matrices reproduisent la MEC et contiennent des facteurs de croissances impliqués dans l'angiogenèse comme le VEGF et le FGF. Les cellules endothéliales sont alors en mesure de former des structures tubulaires avec une lumière perméable qui représentent la formation de capillaires. Ce processus se nomme la tubulogenèse. La tumorigenèse est maintenant utilisé pour étudier l'angiogenèse des cellules endothéliales (Meyer et al. 1997, Yang et al. 1999). De nombreuses études utilisent le Matrigel™ (BD Biosciences) préparée à partir de membranes basales solubilisées et extraites à partir d'une tumeur sarcomateuse de souris (Engelbreth-Holm-Swarm). Le Matrigel™ est ainsi riche en protéines et facteurs de croissance de la MEC. Bien que certaines protéines et peptides ne soient pas entièrement caractérisés, le Matrigel™ est constitué principalement de laminine, collagène type IV, protéoglycane héparane sulfate et entactines. Il contient aussi différents facteurs de croissance tels que EGF, bFGF, NGF, PDGF, IGF-1, TGF-β. Ce gel se polymérise à la température de la pièce et il reproduit une matrice biologiquement active (www.bdbiosciences.com).

1.3 Les tumeurs cérébrales

1.3.1 La classification des tumeurs cérébrales

Les tumeurs cérébrales peuvent être primaires ou secondaires. Les tumeurs primaires représentent environ 50 % de toutes les nouvelles tumeurs cérébrales diagnostiquées. Elles proviennent directement des composantes intracrâniennes. Chez l'adulte, les tumeurs gliales de haut grade (glioblastome multiforme) sont les plus fréquentes, offrant un pronostic défavorable.

Les tumeurs secondaires représentent 50% des tumeurs cérébrales. Elles proviennent de tumeurs situées à l'extérieur du système nerveux et qui secondairement envahissent le parenchyme cérébral par contiguë ou par voie hémotogène telle les métastases.

Qu'elles soient primaires ou secondaires, les tumeurs cérébrales sont souvent invasives, ce qui contribue au mauvais pronostic. Plusieurs classifications des tumeurs cérébrales ont été proposées. La plus utilisée est celle de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) qui différencie les tumeurs en 7 catégories histopathologiques. (Voir tableau I).

Tableau I Classification histologique des tumeurs cérébrales de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS)

<p>Tumeur du tissu neuroépithélial</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tumeur astrocytaire • Tumeur oligodendrogliale • Gliome mixte • Tumeur épendymaire • Tumeur des plexus choroïde • Tumeur mixtes gliales-neuronale • Tumeur neuroblastique • Tumeur du parenchyme pinéal • Tumeur embryonnaire <p>Tumeur des nerfs périphériques et spinaux</p> <ul style="list-style-type: none"> • Schwannome • Neurofibrome • Perineuriome • Tumeur maligne de la gaine nerveuse périphérique (MPNST) <p>Tumeur des méninges</p> <ul style="list-style-type: none"> • Méningiome • Méningiome atypique • Méningiome anaplasique • Tumeur mésenchymateuse non-méningothéliale • Lésion mélanocytaire primaire 	<p>Lymphome et néoplasique hématopoïétique</p> <ul style="list-style-type: none"> • Lymphome malin • Plasmocytome • Sarcome granulocytaire <p>Tumeur des cellules germinales</p> <ul style="list-style-type: none"> • Germinome • Carcinome embryonnaire • Tumeur du sac vitellin • Choriocarcinome • Teratome • Tumeur à cellules germinales mixtes <p>Tumeur de la région sellaire</p> <ul style="list-style-type: none"> • Craniopharyngiome • Tumeur à cellule granulaire <p>Métastase</p> <p>Kleinhues, P, Cavenee, Wk. Tumours of the Nervous System. IARC Press, Lyon 2000, p.6.</p>
---	---

Bien que cette classification soit largement utilisée, celle-ci comporte certaines faiblesses. Par exemple, plusieurs types cellulaires peuvent participer à la composition d'une tumeur et parfois, les cellules peuvent être très indifférenciées, ce qui rend difficile leur identification.

1.4 Les astrocytomes

1.4.1 Généralités

Les astrocytomes originent des astrocytes et représentent 26,6% de tous les nouveaux cas de tumeurs gliales diagnostiquées chaque année (Mahaley et al. 1989). Selon l'OMS, les astrocytomes sont classifiés en quatre grades (grade 1 à 4) selon leur degré de malignité (Tableau II).

Tableau II Gradation des astrocytomes selon l'OMS

Classification de l'OMS des astrocytomes	
Grade	Tumeur
1	Astrocytome pilocytique
2	Astrocytome diffus
3	Astrocytome anaplasique
4	Glioblastome multiforme

Les tumeurs astrocytaires de grade I (astrocytome pilocytique, xanthoastrocytome pléiomorphe) sont des tumeurs astrocytaires bien circonscrites avec un potentiel de croissance limité et une très faible capacité invasive. Les astrocytomes anaplasiques quant à eux, infiltrent le parenchyme cérébral et se développent plus rapidement. Les glioblastomes multiformes représentent entre 40-50% des astrocytomes et offrent le pronostic le plus sombre avec une survie maximale dépassant rarement 12 mois (Davis et al. 1999) après le diagnostic avec un traitement médical et chirurgical. Dans tous les services de neurochirurgie et de neuro-oncologie, les patients souffrant de

GBM sont une partie très importante de la clientèle cotoyée par les professionnels de la santé sur une base quotidienne. Les GBM représentent une source importante de morbidité et mortalité chez ces mêmes patients, ce qui a motivé notre travail actuel.

1.4.2 Le glioblastome multiforme (GBM)

Le GBM est la tumeur cérébrale primaire la plus fréquente et la plus maligne. Bien qu'elle ne représente que 1% de tous les cancers chez l'adulte, elle est responsable de 2% de tous les décès liés au cancer. Rarement retrouvée chez les enfants, elle touche surtout les femmes (60%) entre 65 et 74 ans et son incidence est plus élevée dans la population caucasienne nord-américaine. Peu de facteurs étiologiques ont été identifiés mis à part les radiations ionisantes et un possible effet environnemental de certains produits chimiques comme les pesticides, les substances pétrochimiques et les formaldéhydes. Certains facteurs cliniques et moléculaires permettent de classer les GBM en deux catégories : les GBM primaires (de novo) et les GBM secondaires. Les GBM de novo se présentent surtout chez des patients plus âgés sans évidence de lésion gliale de bas grade préexistante et impliqueraient une activité élevée de EGFR et MDM2. Les GBM secondaires sont une dégénérescence maligne de tumeurs de bas grade, se présentent chez des individus plus jeunes et semblent impliquer une perte précoce de p53, une surexpression de PDGF suivi d'une perte de Rb et de CFK4/6. Les GBM primaires et secondaires partagent le même pronostic (Burger et al. 2005).

1.4.3 Caractéristiques pathologiques des GBM

Les GBM ont été décrits à tous les niveaux du système nerveux central mais sont retrouvés d'une manière préférentielle dans les hémisphères cérébraux. Ces tumeurs mal délimitées sont composées de cellules anaplasiques et présentent fréquemment des zones hémorragiques et une nécrose centrale. À l'histologie, ces tumeurs démontrent de nombreuses anomalies cellulaires caractérisées par un pléiomorphisme nucléaire, une importante activité mitotique, une hyperplasie endothéliale et de la

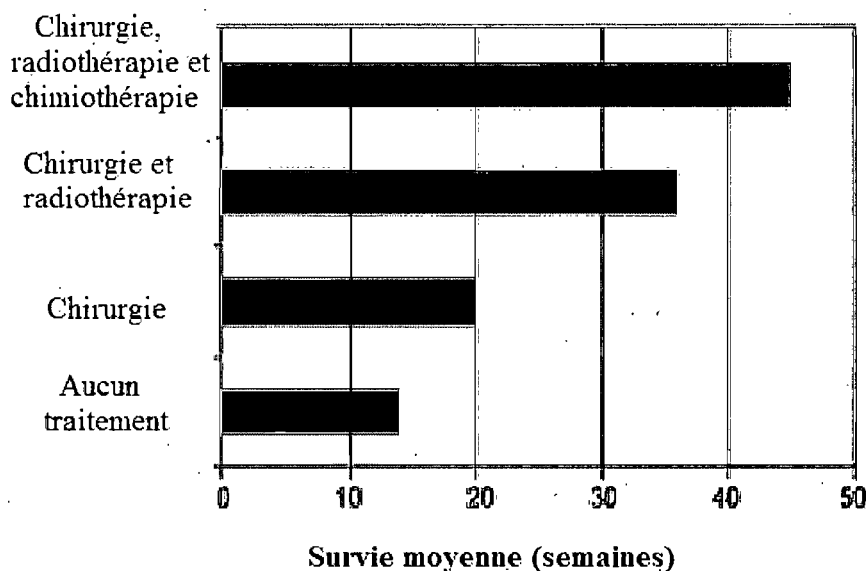
nécrose (Epstein et al. 1987). L'infiltration diffuse du parenchyme cérébral et la néovascularisation entraînent une altération marquée de la BHE.

1.4.4 Traitement des GBM

En raison de son caractère diffus, infiltrant et récidivant, le traitement des GBM vise surtout à prolonger la qualité de vie des patients. Aucun traitement unique n'est efficace et dans la majorité des cas, une approche multimodale associant la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie est préconisée (Ashby et al. 2006). Malgré tout l'arsenal thérapeutique à notre disposition, la survie des patients souffrant de GBM est en moyenne de 1 an après le diagnostic et 4 mois après l'apparition de récurrence (Voir Fig. 1.6).

La prise en charge initiale des patients présentant des GBM est généralement non spécifique et surtout axée sur le renversement des symptômes causés par la tumeur. Dans la majorité des cas, l'œdème vasogénique associé à la tumeur contribue au déficit neurologique initial et à l'effet de masse. Les corticostéroïdes dont la dexaméthasone sont très efficaces pour diminuer cet œdème vasogénique en diminuant la réponse inflammatoire associée à la lésion. Dans plusieurs cas, les corticostéroïdes peuvent renverser complètement les symptômes associés à cet œdème tels les céphalées, les déficits neurologiques et une amélioration de l'état de vigilance du patient. Les patients ayant présenté des épisodes convulsifs seront traités avec des anticonvulsivants. Afin d'établir un diagnostic, deux modalités chirurgicales peuvent être utilisées pour obtenir du tissu pathologique, soit la biopsie stéréotaxique ou une chirurgie ouverte (Ashby et al. 2006, Burger et al. 2005).

Fig. 1.6 Survie moyenne (en semaine) des patients traités pour un GBM selon les différentes modalités à partir du diagnostic.



Ashby et al. 2006

1.4.4.1 Rôle de la chirurgie dans le traitement des GBM

La chirurgie joue un rôle clé dans la prise en charge des patients souffrant de GBM. Les options disponibles sont la biopsie stéréotaxique, la biopsie ouverte, la résection partielle et la résection macroscopique complète. Ces procédures sont généralement réalisées pour établir un diagnostic histologique et procéder à une cytoréduction. La sélection des patients pouvant bénéficier d'une chirurgie de résection doit se faire en tenant compte des comorbidités, de l'état général du patient, des déficits fonctionnels, de la localisation de la tumeur et de la volonté du patient et de la famille. L'âge n'est pas un critère d'exclusion, mais de nombreuses études ont démontré que la chirurgie procure peu d'avantages aux patients âgés de plus de 70 ans. Cependant, plusieurs études rétrospectives ont démontré que la résection macroscopique complète est associée à une amélioration du pronostic de survie chez les autres patients (Lacroix et al. 2001, Shinoda et al. 2001, Ammirati et al. 1987, Simpson et al. 1993, Keles et al. 1999). Malgré une résection macroscopique complète, la survie moyenne demeure de 6 mois si aucun autre traitement adjuvant n'est utilisé (Kelly et al. 1984, Paoletti et al.

1984). Une résection chirurgicale peut parfois être indiquée dans les cas de récurrence. Celle-ci est associée à un taux de complications plus élevé. Dans tous les cas, les GBM sont associés à un pronostic réservé (Mieno et al. 2007, Burger et al. 2005).

1.4.4.2 Rôle de la radiothérapie dans le traitement des GBM

La radiothérapie a un rôle primordial dans le traitement des GBM. En effet, de nombreuses études ont démontré qu'elle augmentait la survie des patients. Elle est administrée à tous les patients qu'ils aient subi une résection complète ou seulement une biopsie. Typiquement, une dose de 60 Gy fractionnée est administrée à raison de 2 Gy cinq jours par semaine pendant environ 6 semaines. L'ajout de radiothérapie à une chirurgie de résection macroscopique complète augmente la survie moyenne à 9 mois (Laperriere et al. 2002, Fiveash et al. 2003, Shapiro et al. 1989). La radiochirurgie est une méthode qui permet de délivrer une dose unique importante de radiation à un endroit ciblé avec des conséquences limitées sur le tissu environnant. Dû en partie à la nature infiltrante des GBM, la radiochirurgie n'a pas démontré une efficacité supérieure à la radiothérapie traditionnelle. D'une manière similaire, la brachythérapie permet aussi une exposition très ciblée de la radiothérapie directement sur la lésion tumorale. Cependant, elle n'a pas démontré une efficacité supérieure comparativement à la radiothérapie traditionnelle (Sneed et al. 1996, Selker et al. 2002).

1.4.4.3 Rôle de la chimiothérapie dans le traitement des GBM

L'utilisation de chimiothérapie pour le traitement des GBM a longtemps été controversée. Les tumeurs cérébrales primaires ne répondent généralement pas à la chimiothérapie car les agents utilisés ne traversent pas la BHE. De plus, les cellules néoplasiques sont en mesure de développer des mécanismes de résistance à la chimiothérapie. Enfin, les effets secondaires de la chimiothérapie représentent parfois un facteur limitant à leur utilisation. De ce fait, les premières études sur l'efficacité de la chimiothérapie dans le traitement des GBM ne démontraient pas d'avantage

significatif lorsque chaque agent de chimiothérapie était considéré individuellement. Cependant, une méta-analyse réalisée par Stewart en 2002 a démontré une augmentation significative de la survie chez les patients ayant reçu de la chimiothérapie en plus d'un traitement de radiothérapie. Il a révisé 12 études randomisées incluant plus de 3001 patients de 1961 à 1991. Les patients traités avec chimiothérapie et radiothérapie avaient en moyenne une survie augmentée de 2 mois comparativement au groupe ayant reçu de la radiothérapie seulement (Stewart 2002). La combinaison chimiothérapie et radiothérapie a aussi été étudiée par d'autres groupes et l'analyse des données suggère une augmentation de la survie à long terme chez les patients avec une possibilité de survie de 18% à 5 ans, contre 0% dans le groupe n'ayant pas reçu de chimiothérapie (Ashby et al. 2006, Chamberlain et al. 1998, Scott et al. 1999). Dans toutes ces études, les principaux agents de chimiothérapie utilisés étaient de la famille des nitrosurées et incluaient : carmustatine, lomustine, nimustine, procarbazine et dacarbazine. L'utilisation de nitrosurée comme le BCNU (1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosurée) est souvent favorisée car ces produits ont une bonne pénétration dans le SNC. Cependant, ils présentent une toxicité systémique significative affectant principalement le système pulmonaire, rénal et hématologique. Ils peuvent aussi être combinés à d'autres agents de chimiothérapie comme le carboplatin et le cisplatine. De plus, des implants permanents implantés durant la chirurgie et relâchant du BCNU de manière locale (Gliadel) sont maintenant approuvés par la FDA et augmentent le taux de survie et le maintien des fonctions neurologiques chez les patients avec des GBM (Brem et al. 1995, Valtonen et al. 1997, Westphal et al. 2003, Westphal et al. 2006).

Depuis peu, il a été démontré que l'utilisation de temozolomide (3,4-dihydro-3-méthyl-4-oxoimidazo(5,1-d)-as-tétrazine-8-carboxamide)(TMZ) augmente la survie chez tous les patients avec des GBM et ce, même en monothérapie (Parlato et al. 2006, Dehdashti et al. 2006). Cet agent de la famille des alkylants a une bonne pénétration de la BHE, s'administre oralement avec une biodisponibilité de 100% et possède une faible toxicité systémique. Son effet cytotoxique implique un mécanisme de méthylation de l'ADN. Son efficacité a été démontrée envers les GBM

nouvellement diagnostiqués et les récurrences (Newlands et al. 1997, Stupp et al. 2002, Stupp et al. 2001, Stupp et al. 2005, Parlato et al. 2006). L'augmentation moyenne de la survie lorsqu'il est associé à la radiothérapie est de 2,5 mois et la survie à 2 ans est de 26,5% comparativement à 10,4% avec la radiothérapie seulement (Stupp et al. 2005). Lorsque le TMZ est associé à la chirurgie et la radiothérapie, la survie moyenne augmente à 18,3 mois comparativement à 14,2 mois avec la chirurgie et la radiothérapie seulement (van der Bent et al. 2005).

1.4.4.4 Les nouvelles cibles thérapeutiques pour les GBM

Malgré une approche thérapeutique multimodale impliquant la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie, la survie moyenne des patients atteints de GBM est d'environ un an. Des progrès récents dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la radiorésistance, la chimiorésistance et la physiopathologie des gliomes malins ont permis de développer des nouvelles cibles thérapeutiques (Sathornsumetee et al. 2006, Kesari et al. 2006). En effet, plusieurs études précliniques et cliniques sont en cours et impliquent des thérapies impliquant l'inhibition de facteurs de croissance, la thérapie génique et les thérapies anti-angiogéniques. De plus, de nouveaux modes d'administration de la chimiothérapie sont aussi étudiés dont la chimiothérapie intra-artérielle par ouverture de la BHE (Medajewicz et al. 2000), la chimiothérapie locale avec des implants de polymère (Westphal et al. 2006) et la radiothérapie locale (Gabayan et al. 2006). Les cibles moléculaires actuelles visent surtout l'inhibition de récepteurs de facteurs de croissance dont le EGFR, PDGFR et VEGFR, mais aussi les molécules impliquées dans l'invasion tumorale comme les MMP et les agents affectant les voies apoptotiques (Sathornsumetee et al. 2006, Kesari et al. 2006). Pour cette raison, les succès de la chimiothérapie seront probablement obtenus par une combinaison visant plusieurs cibles moléculaires contribuant à la physiopathologie de cette lésion.

1.5 But du projet et objectifs

Étant donné les multiples interactions entre les cellules tumorales, les cellules endothéliales et la MEC, il apparaît raisonnable de proposer que les cellules tumorales sont en mesure de moduler leur environnement immédiat à leur avantage. MT1-MMP semble être un acteur important de cette modulation en raison de sa capacité à dégrader la matrice extracellulaire, mais aussi de ses nombreux effets cellulaires dans les cellules endothéliales. En effet, plusieurs travaux récents ont proposés que MT1-MMP entraîne l'apoptose des cellules endothéliales (Belkaid et al. 2007)(Langlois et al. 2005) et que ces processus apoptotiques ont un rôle important durant l'angiogenèse tumorale (Teruyama et al. 2001)(Choi et al. 1995)(Peter et al. 2002). Finalement, les cellules endothéliales cérébrales ont un phénotype différent des autres cellules endothéliales systémiques. À la lumière de ces données, nous avons émis l'hypothèse que les facteurs de croissance sécrétés par les cellules tumorales cérébrales sont en mesure de conditionner les cellules endothéliales cérébrales pour augmenter la vascularisation tumorale.

Lors de ce travail, nos objectifs étaient de recréer *in vitro* l'effet des cellules tumorales sur leur microenvironnement en exposant les cellules endothéliales cérébrales aux facteurs de croissance sécrétés par les cellules tumorales cérébrales. En raison de son implication présumée importante, l'un de nos buts était de décrire les effets de la surexpression de MT1-MMP sur les cellules endothéliales cérébrales. Finalement, nous avons voulu caractériser est mécanismes importants pour la vascularisation tumorale, soit la migration cellulaire, la mort cellulaire (nécrose et/ou apoptose), la tubulogénèse et la prolifération cellulaire. Une meilleure compréhension de ces mécanismes cellulaires pourrait éventuellement mener au développement de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement des GBM.

CHAPITRE II MATÉRIEL ET MÉTHODES

2 *Matériel*

2.1 *Culture cellulaire*

La lignée cellulaire de glioblastome multiforme humain U-87 a été obtenue chez American Type Culture Collection (Manassas, VA). Les cellules U-87 ont été cultivées dans du milieu Eagle's minimum essential medium (MEM) (HyClone Laboratories, Logan, UT) contenant 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (FBS) (HyClone Laboratories, Logan, UT), 2 mM de L-glutamine (Gibco, Burlington, ON), 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine (Gibco, Burlington, ON). La lignée cellulaire d'endothélium microvasculaire cérébral humain, HBMEC (Human brain microvascular endothelial cells), a été conçue par Dr Kwang Sik Kim (John Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD). Cette lignée a été immortalisée par transfection du virus simien 40 à antigène grand T qui permet de maintenir leurs caractéristiques morphologiques et fonctionnelles pour 30 passages (Greiffenberg et al. 1998). Les cellules HBMEC ont été cultivées dans du milieu constitué de RPMI 1640 (Gibco, Burlington, ON) supplémenté de 10% (v/v) de FBS, 10% de NuSérum (BD Bioscience, Mountain View, CA), 1% d'acides aminés modifiés non essentiels Eagle's (Gibco, Burlington, ON) et 1% de vitamines (Gibco, Burlington, ON), 5 U/ml d'héparine (Gibco, Burlington, ON), 1 mM de pyruvate de sodium, 2 mM de L-glutamine, 30 µg/ml de supplément de croissance pour cellules endothéliales (EC growth supplement) (Upstate Cell Signaling Solution, Lake Placid, NY), 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine. La trypsine et la lipofectamine 2 000 ont été obtenues chez Invitrogen (Burlington, ON). Finalement,

le collagène type I utilisé à une concentration de 0.2% a été isolé à partir de queues de rat puis purifiée.

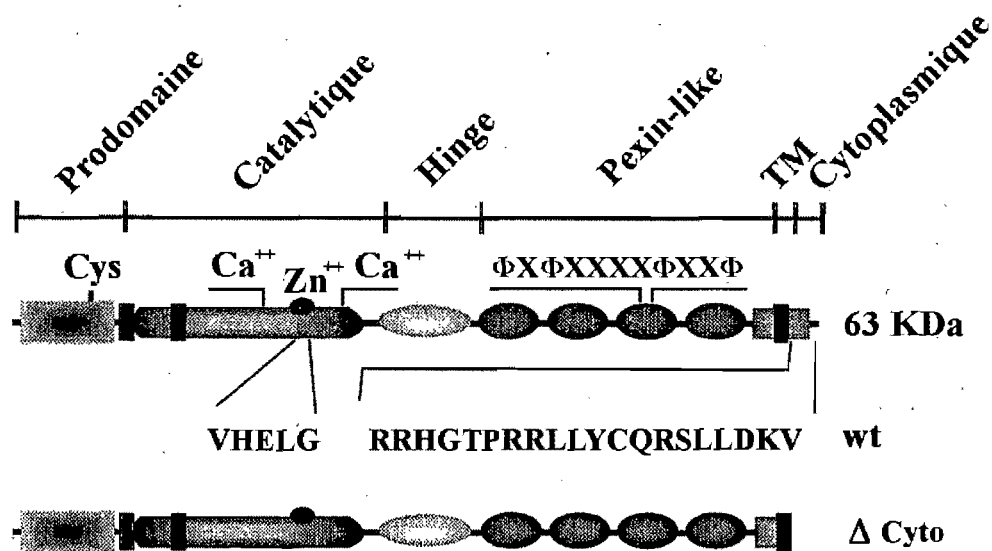
2.1.1 Anticorps et réactifs

Les produits pour l'électrophorèse et la zymographie ont été obtenus de Bio-Rad (Mississauga, ON) et les membranes de difluorure polyvinylidène (PVDF) ont été obtenues de Boehringer Mannheim. L'anticorps polyclonal anti-MT1-MMP a été obtenu de Chemicon (Temecula, CA). L'anticorps polyclonal anti β -actine a été obtenu chez Sigma (Oakville, ON, Canada). Les anticorps secondaires anti-IgG anti-souris et anti-lapin conjugués à la peroxidase sont de Jackson Immunoresearch Laboratories (Mississauga, ON). Le réactif de chimioluminescence (ECL) était de Amersham Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, QC, Canada). Le MatrigelTM était de BD Biosciences (Mississauga, ON). Le kit de quantification de protéine MicroBCA Protein Assay a été obtenu de Pierce (Rockford, IL). La spectrophotomètre utilisée était de la compagnie Spectamax Plus 584 Molecular Device avec logiciel d'analyse Softmax Pro Software. La cytométrie de flux utilisée était de la compagnie FACS Calibur de Becton Dickinson avec logiciel d'analyse CellQuest Pro Software et les réactifs Annexin-V fluorescein isothiocyanate (FITC) et iodure de propidium (PI) ont été achetés de BD Bioscience (Mississauga, ON). L'ilomastat (GM-6001) et l'albumine sérique bovine (BSA) ont été obtenus chez Sigma (St-Louis, MO). Le MatrigelTM était de BD Biosciences (Mississauga, ON). Le réactif de prolifération cellulaire WST-1 a été acheté chez Roche Diagnostic (Laval, QC). Les plaques 24-puits contenant 12 chambres de Boyden avec micropores de 8 μ m ont été obtenues de Costar (Acton). Les autres réactifs et produits ont été commandés de Sigma (Oakville, ON).

2.1.2 Plasmides

Les plasmides MT1-MMP et MT1-MMP Δ -cyto utilisés pour les transfections ont été conçus et validés par le Dr Borhane Annabi (UQAM, Qc) selon la méthode décrite dans l'article Annabi et al. 2001 (Fig. 2.1).

Fig. 2.1 Domaines encodés par les plasmides MT1-MMP



2.2 Méthode

2.2.1 Culture cellulaire

2.2.1.1 Culture des cellules U-87

Les cellules de la lignée U-87 ont étéensemencées dans des flacons de 75 cm² dans du milieu MEM contenant 10% (v/v) de FBS; 2mM de glutamine 100 U/ml de pénicilline et 100 μ g/ml de streptomycine à un pH ajusté de 7,3 et cultivé dans un incubateur maintenu à 37° C sous une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂. Les cellules étaient divisées deux fois par semaine ou lorsque leur confluence

atteignait 100%. Pour la division et la récolte des cellules, 1 mL de trypsine 0,5 X durant 5 minutes a été utilisé et a par la suite été inactivée par l'ajout de 4 mL de MEM contenant du FBS.

2.2.1.2 Culture des cellules HBMEC

La lignée cellulaire HBMEC a étéensemencée dans des flacons de 75 cm² qui avaient préalablement été enduits d'une couche de collagène de type I à une concentration de 0.2% provenant de queues de rat. Les cellules HBMEC ont été cultivées dans du milieu constitué de RPMI 1640 supplémenté de 10% (v/v) de FBS, 10% de NuSérum, 1% d'acides aminés modifiés non essentiels Eagle's et 1% de vitamines, 5 U/mL d'héparine, 1 mM de pyruvate de sodium, 2 mM de L-glutamine, 30 µg/ml de supplément de croissance pour cellules endothéliales (*EC growth supplement*), 100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine. Par la suite, les cellules HBMEC étaient placées dans un incubateur à 37° C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂. Les cellules HBMEC étaient divisées 2 fois par semaine (lundi et vendredi) lorsque leur confluence atteignait 100 % en utilisant de la trypsine pendant 5 minutes, celle-ci qui était par la suite inactivée par 4 mL de MEM avec FBS. Toutes les expériences ont été réalisées en utilisant des cellules entre le passage 16 et 28.

2.2.2 Comptage cellulaire et préparation des solutions cellulaires

En tout premier lieu, les cellules ont été mises en suspension. Par la suite, 20 µL de cette solution cellulaire ont été mélangées avec 20 µL d'une solution de bleu de trypan 5%. Cette nouvelle solution fut étalée sur l'hémangiocytomètre et un décompte manuel a été entrepris en microscopie en utilisant un objectif de grossissement de 10X. Les cellules colorées n'ont pas été incluses dans le décompte. Par la suite, les cellules en suspension ont été centrifugées durant 3 minutes à une vitesse de rotation de 1 000 RPM. Le surnageant ainsi produit a été aspiré et le culot cellulaire a été resuspendu dans du milieu sans sérum pour obtenir la concentration cellulaire voulue.

2.2.3 Transfection avec la lipofectamine

Les cellules ont été transfectées lorsque leur confluence avait atteint 70-80%. En premier lieu, celles-ci ont été sevrées durant une période de 30 minutes à l'aide de milieu de culture sans sérum. Par la suite, une solution contenant un ratio de 4 μL de lipofectamine pour chaque 2 μg de plasmide a été réalisée. La solution de lipofectamine a été préparée en utilisant 4 μL de lipofectamine ajouté à 100 μL de milieu sans sérum. La solution contenant le plasmide a été préparée en diluant 2 μg de plasmide (MT1-MMP ou MT1-MMP Δ -cyto) dans 100 μL de milieu sans sérum. Par la suite, la solution de lipofectamine a été additionnée à la solution contenant le plasmide et cette nouvelle solution a été en attente pendant 30 minutes. Une fois cette période écoulée, la solution a été ajoutée dans chaque puit respectif contenant les cellules à transfecter. Les cellules ainsi exposées à cette solution ont été incubées à une température de 37°C sous une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO_2 pendant 3 heures. Après cette période, le milieu de culture dans chaque puit a été aspiré et 2 ml de milieu avec sérum a été ajouté. Cette étape a pour but de laisser récupérer les cellules pendant une période de 24h. Par la suite, les cellules ont été récoltées ou ont été mises en présence de différents milieux ou inhibiteurs pour une période additionnelle de 24h. Dans tous les cas, l'efficacité de la transfection a été déterminée par une technique de zymographie sur gélatine et une détection de protéines par électrophorèse et immunobuvardage. Lors des différentes expériences utilisant des cellules transfectées, tous les groupes témoins ont aussi été exposés à une solution de lipofectamine.

2.2.4 Lyse cellulaire et dosage des protéines

2.2.4.1 Lyse des cellules

La collecte des cellules a été effectuée par une technique de grattage délicat des puits de culture ou selon une méthode de décollement utilisant la trypsine. La solution

cellulaire ainsi produite a été centrifugée à une vitesse de rotation de 5 000 RPM pendant 5 minutes et le surnageant a été aspiré à l'aide d'une micropipette. Le culot cellulaire produit par cette méthode a ensuite été resuspendu dans 100 µl d'une solution constituant un tampon de lyse (1% Triton X-100, 0,5% NP-40, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris, 200 mM NaF, 200 mM PMSF dans l'isopropanol, 5 µg /ml NaVO₄, 1 µg/ml Aprotinine, 1 µg/ml Pepstatine) et laissé sur une couche de glace durant une période minimum de 30 minutes. Durant cette étape, les solutions ont été mélangées vigoureusement à l'aide d'un vortex à chaque période de 5 minutes. Finalement, les solutions ont été centrifugées à une vitesse de rotation de 13 000 RPM pendant 5 minutes. Le surnageant produit lors de cette dernière étape a été récolté et utilisé pour le dosage des protéines.

2.2.4.2 Dosage des protéines

La quantité de protéine contenue dans chaque échantillon a été mesurée en utilisant la méthode de *MicroBCA Protein Assay* (Pierce, Rockford, IL). Les échantillons ont été comparés à une courbe étalon de BSA (albumine sérique bovine). Pour le dosage des protéines, 3 microlitres d'échantillons ont été ajoutés à 1 ml d'eau distillée. Par la suite, 1 ml de réactif de microBSA a été ajouté. Ces échantillons ont été chauffés à 60°C durant une période d'une heure et leur densité optique a été mesurée à 562 nm à l'aide du spectrophotomètre Spectamax Plus 584 Molecular Device utilisant le logiciel d'analyse Softmax Pro.

2.3 Mesure de la mort cellulaire par cytométrie de flux

Les cellules transfectées U-87 et HBMEC soumises aux différents milieux pendant 24h ont été récoltées avec leur surnageant, décollées en utilisant une solution de trypsine et finalement comptées manuellement selon la méthode déjà décrite. Par la suite, ces cellules ont été centrifugées pendant 3 minutes à une vitesse de rotation de 1 000 RPM. Le surnageant ainsi produit a été aspiré et le culot cellulaire ainsi obtenu a été resuspendu en ajoutant un volume de milieu sans sérum nécessaire pour obtenir

une solution cellulaire de 100 000 cellules / 100 μ l. Un volume de 100 μ l de chaque échantillon a par la suite été prélevé et centrifugé durant une période de 5 minutes à une vitesse de rotation de 3 000 RPM. Le nouveau surnageant obtenu a été aspiré à l'aide d'une micropipette et un volume de 500 μ l de PBS sans calcium ni magnésium (150 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,3 KH_2PO_4 , 8,1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) a été ajouté. Le tout a ensuite été centrifugé pendant une période de 5 minutes à une vitesse de rotation de 3 000 RPM. Le surnageant ainsi obtenu a été aspiré et un volume de 100 μ l d'une solution de tampon de liaison (140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl_2 , Hepes 10 mM/ NaOH pH 7,4) a été ajoutée. Par la suite, un volume de 1 μ l d'annexine V-FITC (BD Bioscience) et un volume de 1 μ l d'iodure de propidium (PI) (BD Bioscience) ont été ajoutés à chaque échantillon. Ces mêmes échantillons cellulaires ont par la suite été resuspendus à l'aide d'un vortex et laissés reposer à l'abri de la lumière pendant une période de 15 minutes. Par la suite, un volume de 400 μ l d'une solution de PBS sans calcium ni magnésium a été ajouté par échantillon et mélangé. Les solutions cellulaires ainsi obtenues ont été analysées avec la cytométrie de flux FACS Calibur de Becton Dickinson qui utilise le logiciel d'analyse CellQuest Pro. Ce logiciel produit un graphique dont l'axe X et Y représentent la fluorescence de l'annexin-V et de l'iodure de propidium respectivement. Cette méthode est basée sur le principe selon lequel durant les stades précoces de l'apoptose, la phosphatidylsérine est transloquée à la surface extérieure de la membrane cytoplasmique qui demeure cependant intacte. Ainsi, l'annexine-V pourra se lier à la phosphatidylsérine et le colorant ne sera pas en mesure de pénétrer la membrane cellulaire (Annexine-V + / PI -). De la même manière, les cellules en apoptose tardive seront positives pour l'annexine-V et le PI (Annexine-V + / PI +). Finalement, les cellules nécrotiques qui auront perdu complètement l'intégrité de leur membrane plasmique seront positives seulement pour le PI (Annexine-V - / PI +).

2.4 Migration des cellules HBMEC

2.4.1 Préparation de la solution cellulaire

Les cellules HBMEC transfectées ont été utilisées après la période de récupération de 24h dans du milieu avec sérum. En premier lieu, ces cellules ont été décollées à l'aide de trypsine pendant une période de 5 minutes, comptées manuellement et centrifugées pendant une période 5 minutes à une vitesse de rotation de 1 000 RPM. Le surnageant ainsi produit a été aspiré à l'aide d'une micropipette et les culots cellulaires ont été resuspendus dans un volume de milieu sans sérum calculé pour obtenir 100 000 cellules / 100 μ l.

2.4.2 Préparation des puits de migration et chambres de Boyden

Un volume de 100 μ l d'une solution de collagène type I 0.2% a été déposé sur la paroi supérieure de la chambre de Boyden (pores de 8 μ M) et celles-ci ont été incubées à une température de 37°C durant une période de 1 heure. Par la suite, l'excès de collagène a été retiré en secouant délicatement la chambre de Boyden et celles-ci ont été déposées dans les puits. Un volume de 600 μ l de milieu expérimental a été déposé au fond de chaque puit et un volume de 100 μ l de la solution cellulaire à une concentration de 100 000 cellules / 100 μ l a été déposée dans le fond de la chambre de Boyden. Tout le système a par la suite été incubé à une température de 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂ pendant une période de 24 heures. Après cette période, la solution cellulaire contenue dans la chambre de Boyden et le milieu dans le puit ont été aspirés à l'aide d'une micropipette et les cellules ont été fixées en ajoutant un volume de 600 μ l de phosphate de formaldéhyde 10% dans chaque puit et un volume de 100 μ l dans chaque chambre de Boyden. Le tout est laissé reposer pendant une période minimale de 30 minutes. Par la suite, la solution de phosphate de formaldéhyde a été aspirée et les cellules ont été colorées avec un volume de 600 μ l d'une solution de cristal violet (0.1% cristal violet, 20 %

MeOH et H₂O) dans chaque puit et un volume de 100 µl dans chaque chambre de Boyden. Après une période minimale de 30 minutes, la solution de colorant a par la suite été aspirée avec une micropipette et les chambres de Boyden ont été lavés délicatement avec de l'eau distillée en utilisant une micropipette. Les cellules colorées à l'intérieur de la chambre de Boyden ont été retirées en utilisant délicatement une tige munie d'une pointe en coton. Finalement, les cellules colorées ayant réussi à traverser les pores contenus dans le fond de la chambre de Boyden ont été comptés en utilisant le logiciel Northern Eclipse qui est en mesure d'identifier les cellules en leur attribuant une couleur spécifique qui les différencie de l'arrière plan. Pour ce faire, 5 à 10 photographies de chaque chambre de Boyden ont été prises en utilisant un microscope possédant un objectif de grossissement de 10X. Une fois intégrée dans le logiciel, chaque photographie a été ajustée individuellement pour s'assurer que les cellules ont bien été sélectionnées. Ainsi, cette méthode permet d'identifier et de quantifier les cellules qui ont été en mesure de migrer sur la surface supérieure de la chambre de Boyden.

2.5 Tubulogénèse des cellules HBMEC sur Matrigel™

Les cellules HBMEC transfectées selon la méthode décrite ci-haut ont été utilisées après avoir subi une récupération de 24h dans du milieu avec sérum. Les cellules ont été décollées à l'aide de trypsine appliquée pendant 5 minutes, comptées manuellement et centrifugées pendant 5 minutes à une vitesse de rotation de 1 000 RPM. Le surnageant a été aspiré et le culot cellulaire a été resuspendu dans le volume de milieu avec sérum nécessaire pour obtenir 10 000 cellules / 100 µl. Par la suite, un volume de 50 µl de Matrigel™ a été déposé dans une plaque contenant 96 puits et celle-ci a été incubée à une température de 37°C pendant une période de 30 minutes. Un volume de 100 µl de la solution cellulaire a par la suite été ajouté sur le Matrigel™ et la solution cellulaire a été en attente durant 1 heure dans un incubateur à 37°C. La solution cellulaire a ensuite été aspirée avec une micropipette et un volume de 200 µl du milieu à tester a été ajouté dans chaque puit. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triplicata. Les cellules sont ensuite incubées à une

température de 37°C avec une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂ pendant 24 heures. Après cette période, 5 à 10 photographies de chaque chambre de Boyden ont été prises en utilisant un microscope possédant un objectif de grossissement de 10X. Une fois intégrée dans le logiciel Northern Eclipse, chaque photographie a été ajustée individuellement pour s'assurer que les cellules ont bien été sélectionnées. Ainsi, cette méthode permet au logiciel d'identifier et de quantifier les structures tubulaires formées par les cellules.

2.6 Test de prolifération cellulaire au WST-1

Cette expérience a pour but de quantifier la prolifération cellulaire des cellules HBMEC. Pour ce faire, la densité optique émise lorsque les cellules hydrolysant le WST-1 a été mesurée. En effet, les cellules viables peuvent cliver le sel de trétrazolium WST-1 via leurs enzymes déshydrogénases mitochondriales. Cette expérience a été réalisée durant une période de 96 heures. Au jour 0, les cellules HBMEC non transfectées ont été décollées à l'aide de trypsine, comptées manuellement et resuspendues dans un volume de milieu avec sérum nécessaire pour obtenir une solution cellulaire d'une concentration de 10 000 cellules / 100 µl. Par la suite, le volume nécessaire de la solution cellulaire pour obtenir 10 000 cellules a été déposée dans les puits de la plaque de 96 puits préalablement enduits de collagène type I 0.2%. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triplicata. Les cellules ont ensuite été incubées à une température de 37°C sous une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂. Au jour 1, les milieux avec sérum de 3 plaques ont été aspirés à l'aide d'une micropipette et un volume de 100 µl de chaque milieu a été ajouté dans chaque puits. Les cellules ont été ensuite incubées de nouveau dans les mêmes conditions pour une période de 24h, 48h ou 72h. La détermination du niveau basal de prolifération a été effectuée en aspirant le milieu de la plaque témoin et en ajoutant un volume de 100 µl de solution contenant du réactif WST-1 (10 µl de WST-1 dans 90 µl de milieu HBMEC sans sérum). La densité optique à 450 nm a par la suite été mesurée à chaque 30 secondes pendant 1 heure à l'aide du spectrophotomètre Spectamax Plus 584 Molecular Device et le logiciel d'analyse Softmax Pro. Les

plaques contenant les différents milieux ont été préparées avec une solution de WST-1 et analysées de la même manière au jour 1, 2 et 3. L'analyse des résultats a été effectuée en calculant les pentes des densités optiques obtenues durant l'intervalle 500 à 2000 secondes.

2.7 Zymographie sur gélatine

Toutes les zymographies sur gélatine ont été effectuées à partir du milieu d'incubation des cellules (U-87 et HBMEC) cultivées dans des plaques de 6-puits après les transfections le cas échéant. Un volume de 20 µl d'échantillons a été dénaturé dans un tampon d'échantillon SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) sans β-mercaptoéthanol (62,5 mM Tris/HCl pH 6,8, 10% (v/v) glycérol, 2% (p/v) SDS, 0,00625% (v/v) de bleu de bromophénol). Les échantillons non chauffés ont été vortexés puis centrifugés à une vitesse de rotation de 13 000 RPM pendant 2 minutes. Ensuite, les échantillons ont été déposés sur un gel SDS de polyacrylamide contenant 0,1% (v/v) de gélatine. Le gel de séparation contenait 9% (p/v) d'acrylamide, 0,3% (p/v) de N,N-méthylène-bis-acrylamide ainsi que 0,375 M de Tris/HCl, pH 8,8, 0,1% (p/v) 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, 1µl/ml de N,N,N',N'-tétraméthylènediamine (TEMED) et 0,5 mg/ml de persulfate d'ammonium. Par la suite, la migration des échantillons sur le gel SDS de polyacrylamide a été effectuée dans un système Mini Trans-Blot. La source de courant Bio-Rad Power-Supply 1000/500 de Bio-Rad a été ajustée pour produire 100 volts durant l'entassement et 130 volt durant la séparation. Cette migration a été effectuée en utilisant un tampon d'électrode (0.1% (p/v) SDS, 19,2 mM glycine et 25 mM de Tris à un pH de 8,3). Les gels ont ensuite été démontés et agités pendant une période de 30 minutes à deux reprises dans une solution de 2,5% (v/v) de Triton-100X. Les gels ont été rincés dans de l'eau nanopure à plusieurs reprises pour éliminer les résidus de SDS. Ces mêmes gels ont ensuite été mis dans un tampon de zymographie (50 mM de Tris-HCl, 20

mM de NaCl, 5 mM de CaCl₂ et 0,02% de Brij-35, à pH 7,6) pour être incubés à une température de 37°C pendant 24 ou 48 heures. Par la suite, les gels ont été colorés et agités pendant 1 heure dans une solution de 0,4% (v/v) de bleu de Coomassie (0,4% (v/v) bleu de Coomassie, 40% (v/v) méthanol, 50% (v/v) H₂O nanopure et 10% (v/v) d'acide acétique). Finalement, les gels ont été décolorés et agités pendant 1 heure dans une solution constituée de 7,5% (v/v) d'acide acétique, 30% (v/v) de méthanol et 62,5% (v/v) d'eau distillée. Le séchage a ensuite été effectué en mettant les gels entre 2 feuilles de papier cellophane qui ont été déposés dans un séchoir pour une période de 120 minutes.

2.8 Électrophorèse et immunobuvardage des protéines de cellules U-87 et HBMEC

Entre 20 et 60 µg de protéines par échantillon ont été dénaturées dans le tampon d'échantillon SDS avec β-mercaptoéthanol (5% (v/v) β-mercaptoéthanol 62,5 mM Tris/HCl, pH 6,8, 10% (v/v) glycérol, 2% (p/v) SDS, 0,00625% (v/v) de bleu de bromophénol) et chauffé à 100°C pendant 5 minutes. Par la suite, les échantillons ont été placés dans un gel SDS de 9, 12 ou 15% (p/v) de polyacrylamide. Le gel de séparation contenait 9 ou 12% (p/v) d'acrylamide, 0,3% (p/v) de N,N-méthylène-bis-acrylamide ainsi que 1,5 M de Tris/HCl pH 8,8, 0,1% (p/v) de SDS 1 µl/ml de N,N,N',N'-tétraméthylènediamine (TEMED) et 0,5 mg/ml de persulfate d'ammonium. Pour sa part, le gel de d'entassement contenait que 0,5 M de Tris/HCl pH 6,8, 0,1% (p/v) de SDS 1 µl/ml de N,N,N',N'-tétraméthylènediamine (TEMED) et 0,5 mg/ml de persulfate d'ammonium. Par la suite, la migration des échantillons sur le gel SDS de polyacrylamide est effectuée dans le système Mini Trans-Blot et la source de courant Bio-Rad Power-Supply 1000/500 de Bio-Rad (Mississauga, ON) à 100 volts pour l'entassement et 130 volt pour la séparation, le tout dans un tampon d'électrode (0,1% (p/v) SDS, 19,2 mM glycine et 25 mM de Tris à un pH de 8,3). Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de difluorure de polyvinylidène (PVDF) de 0,45 µm de porosité (Millipore Corporation, Billerica, MA) pendant 1 heure 30 minutes à 60 mA par gel dans un tampon de transfert contenant 96 mM de glycine, 10 mM de Tris et 10% (v/v) de méthanol, à l'aide d'un

appareil de transfert Semi-Dry Blotting System (The W.E.P Corporation, Seattle, WA) et la source de courant Bio-Rad Power-Supply 1000/500 (Bio-Rad, Mississauga, ON) à 300 volts pendant 1h30. Après le transfert, les sites non spécifiques des membranes PVDF ont été bloqués par une solution de lait en poudre 5% (p/v) diluée dans du Tris salin (137 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7.5) contenant 0,1% de Tween 20 à la température ambiante pendant 1 heure avec agitation. Les membranes ont ensuite été lavées 3 fois à intervalle de 15 minutes avec une solution de Tris salin (137 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7.5) contenant 0,3% de Tween 20 à température ambiante avec agitation. Les différents anticorps primaires dilués dans une solution de 3% BSA, 0.02% azide et Tris salin (137 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7.5) contenant 0,1% de Tween 20 ont été ajoutés durant 17 heures et les membranes ont été agitées à 4°C. Par la suite, les membranes ont été de nouveau lavées 3 fois à intervalle de 15 minutes avec la solution de TBST 0.3% décrite ci-haut et l'anticorps secondaire anti-IgG de souris ou de lapin couplé à la peroxydase de Raifort a été ajouté sur les membranes pendant 1 heure à température ambiante avec agitation. Les membranes ont de nouveau été lavées 3 fois à intervalle de 15 minutes avec du TBST 0.3% tel que décrit ci-haut. Finalement, l'immunodétection des protéines a été révélée par l'ajout du réactif ECL pendant 1 minute suivi du développement d'autoradiogramme.

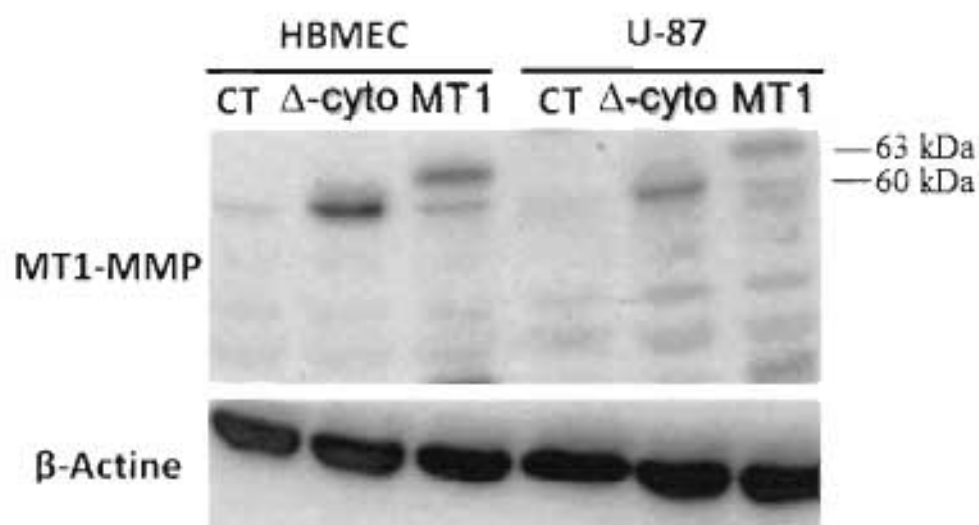
CHAPITRE III RÉSULTATS

3.1 Les protéines recombinantes MT1-MMP et MT1-MMP Δ -cyto surexprimées dans les lignées cellulaires U-87 et HBMEC sont fonctionnelles

Les lignées cellulaires U-87 et HBMEC ont été transfectées avec les plasmides MT1-MMP et MT1-MMP Δ -cyto en utilisant la lipoféctamine pour rendre la membrane cytoplasmique perméable à l'incorporation des plasmides. La surexpression de ces protéines a été confirmée par la méthode d'immunobardage et d'électrophorèse. En effet, les membranes PVDF mises en présence d'anticorps primaire monoclonal anti-MT1-MMP 1 :500 ou 1 :1000 permet de mettre en évidence une très faible expression de MT1-MMP endogène chez les cellules témoins non transfectées à 55 kDa, alors que la forme complète de MT1-MMP apparaît à 63 kDa et MT1-MMP Δ -cyto apparaît à 60 kDa (Voir Fig. 3.1.1). L'aspect fonctionnel de l'expression de MT1-MMP et MT1-MMP Δ -cyto a été prouvé par méthode de zymographie sur gélatine. Les cellules témoins non transfectées démontrent surtout une activité de la pro MMP 2 alors que les cellules transfectées avec MT1-MMP et Δ -cyto démontrent une grande transformation de pro MMP 2 en MMP-2, ce qui indique l'activité enzymatique de MT1-MMP et Δ -cyto (Voir Fig. 3.1.2). L'expression de pro MMP-2 et sa transformation en MMP-2 est plus élevée dans la lignée cellulaire U-87 que dans la lignée cellulaire HBMEC (Voir Fig. 3.1.2). Pour la suite de ce travail, l'efficacité de transfection a toujours été déterminée par ces deux méthodes, soit par la méthode d'immunobardage, soit par la zymographie sur gélatine ou les deux à la fois.

Fig. 3.1.1

Détection des formes recombinantes MT1-MMP et MT1-MMP Δ -cyto chez les cellules U-87 et HBMEC transfectées

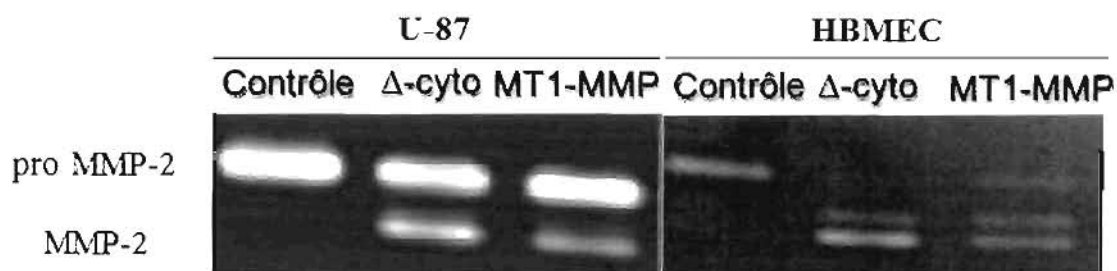


Légende :

Gel de SDS polyacrylamide 9 % avec 66 μ g de protéine par puits. L'anticorps polyclonal anti-MT1-MMP 1:500 (Chemicon) incubé pendant 18h à 4°C et anti β -actine 1 :4000 (Sigma) incubé 1 heure ont été utilisés. CT : témoin, MT1 : MT1-MMP, Δ -cyto : MT1-MMP Δ cyto.

Fig 3.1.2

Zymographie sur gélatine montrant la transformation de la pro MMP-2 en MMP-2 chez les cellules U-87 et HBMEC transfectées avec MT1-MMP et MT1-MMP Δ -cyto.



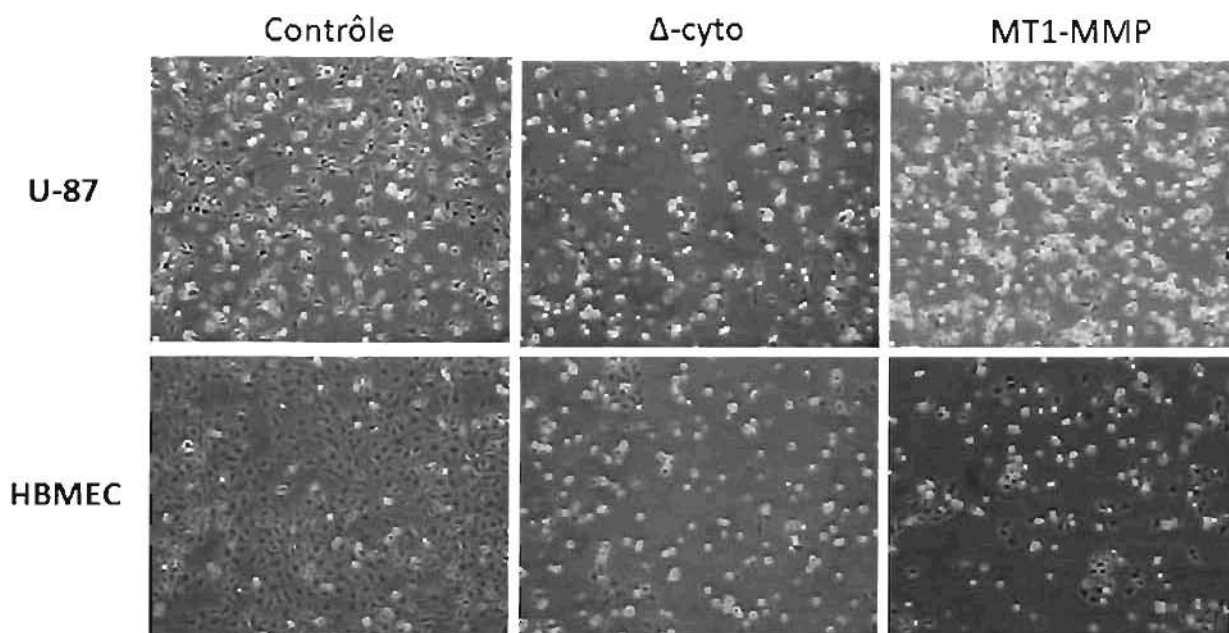
Légende :

Gel SDS de polyacrylamide 9% de contenant 0,1% de gélatine. 20 μ L de milieu sans sérum recueilli dans les plaques transfectées contenant des cellules U-87 et HBMEC ont été utilisés. Incubation à 37°C dans le tampon de zymographie durant 24 h (U-87) ou 48 h (HBMEC). On constate que seule la pro MMP-2 est présente dans les cellules témoins alors que la MMP-2 active se retrouve dans les cellules transfectées. Δ -cyto : MT1-MMP Δ cyto

3.2 *MT1-MMP et MT1-MMP Δ -cyto induisent une augmentation significative de la mort cellulaire dans les cellules transfectées*

Rapidement après la transfection, les cellules transfectées avec MT1-MMP et Δ -cyto démontrent une augmentation significative de la mort cellulaire. Cet effet est observable moins de 24 heures après la transfection à l'aide du microscope optique, lequel révèle une très grande quantité de cellules flottantes, autant chez les lignées U-87 que HBMEC (Voir Fig. 3.2).

Fig. 3.2 La surexpression de MT1-MMP et MT1-MMP Δ -cyto induit la mort cellulaire chez les cellules U-87 et les cellules HBMEC transfectées.



Légende :

La microscopie optique 10 X démontre une grande quantité de cellules flottantes chez les cellules transfectées. Les cellules U-87 sont des cellules légèrement fuseauformes alors que les cellules HBMEC sont des cellules cuboïdes. Δ -cyto : MT1-MMP Δ cyto

3.3 La surexpression de MT1-MMP et MT1-MMP Δ -cyto induit une forte augmentation de l'apoptose et de la nécrose chez les cellules HBMEC transfectées et une augmentation de la nécrose chez les cellules U-87 transfectées.

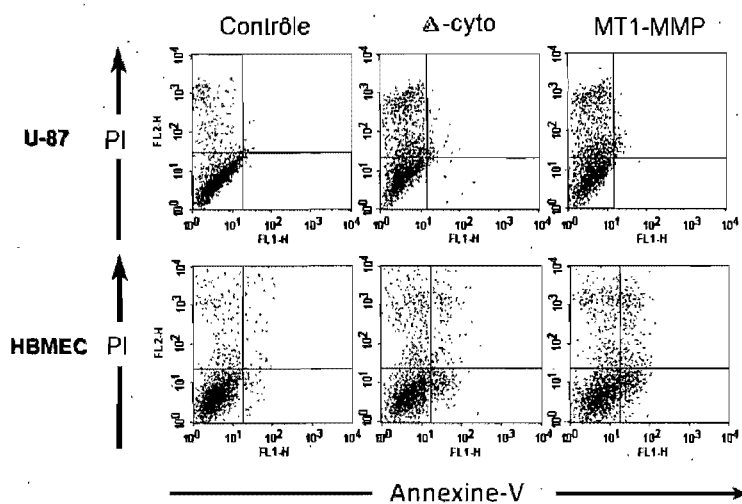
Après avoir laissé récupérer les cellules transfectées pendant 24h dans du milieu avec sérum, celles-ci ont été divisées en différents groupes de traitement : Témoin, MT1-MMP et MT1-MMP Δ -cyto. Le milieu avec sérum a été aspiré et les cellules ont été incubées pendant 24h en présence de 1 ml de milieu sans sérum. Les cellules ont été récoltées après cette période et ont été utilisées pour la cytométrie de flux pour la détection d'apoptose et de nécrose. Pour chaque échantillon, un volume de 100 μ l du sérum a été conservé pour la zymographie sur gélatine et les cellules restantes ont été utilisées pour le dosage des protéines par immunobuvardage. La cytométrie de flux (FACS Calibur de Becton Dickinson) avec les réactifs Annexine-V fluorescein isothiocyanate (FITC) et iodure de propidium (PI) permet d'apprécier une forte augmentation des cellules apoptotiques et nécrotiques chez les cellules HBMEC transfectées avec MT1-MMP et MT1-MMP Δ -cyto comparativement aux cellules témoins ayant reçu seulement de la lipofectamine (Voir Fig. 3.3 A et 3.3 B).

L'apoptose précoce et tardive est proportionnellement plus élevée que la nécrose chez les cellules HBMEC. D'une manière intéressante, cette induction de l'apoptose et de la nécrose est plus importante avec MT1-MMP comparativement au mutant possédant uniquement la partie catalytique (Δ -cyto). Chez les cellules U-87, la nécrose était augmentée d'une manière importante comparativement à l'apoptose qui fut peu modifiée (Voir Fig. 3.3 A et 3.3 B).

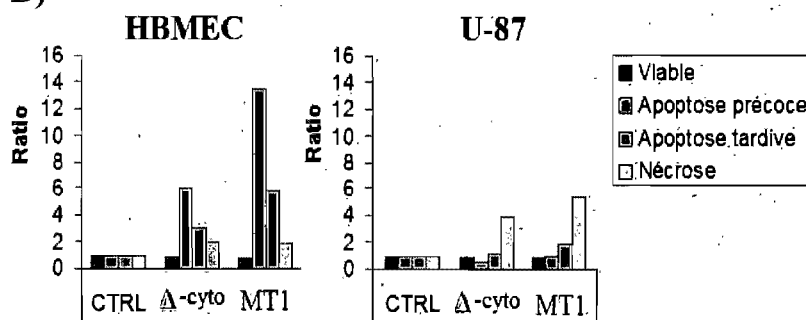
Fig. 3.3

La surexpression de MT1-MMP et MT1-MMP Δ -cyto induit une forte augmentation de l'apoptose précoce et tardive chez les cellules HBMEC transfectées alors que seule la nécrose est augmentée chez les cellules U-87 transfectées.

A)



B)



Légende :

- A) Cytométrie de flux avec les réactifs Annexine-V et iodure de propidium (PI). Les cellules viables sont représentées dans le coin inférieur gauche, l'apoptose précoce dans le coin inférieur droit, l'apoptose tardive dans le coin supérieur droit et la nécrose dans le coin supérieur gauche. Expérience représentative de $n=2$. Δ -cyto : MT1-MMP Δ -cyto.
- B) Les résultats présentés sont issus de 2 expériences indépendantes et sont exprimés en ratio par rapport au groupe de cellules témoins qui ont seulement été traitées avec de la lipofectamine. CTRL : Témoin, Δ -cyto : MT1-MMP Δ -cyto, MT1 : MT1-MMP

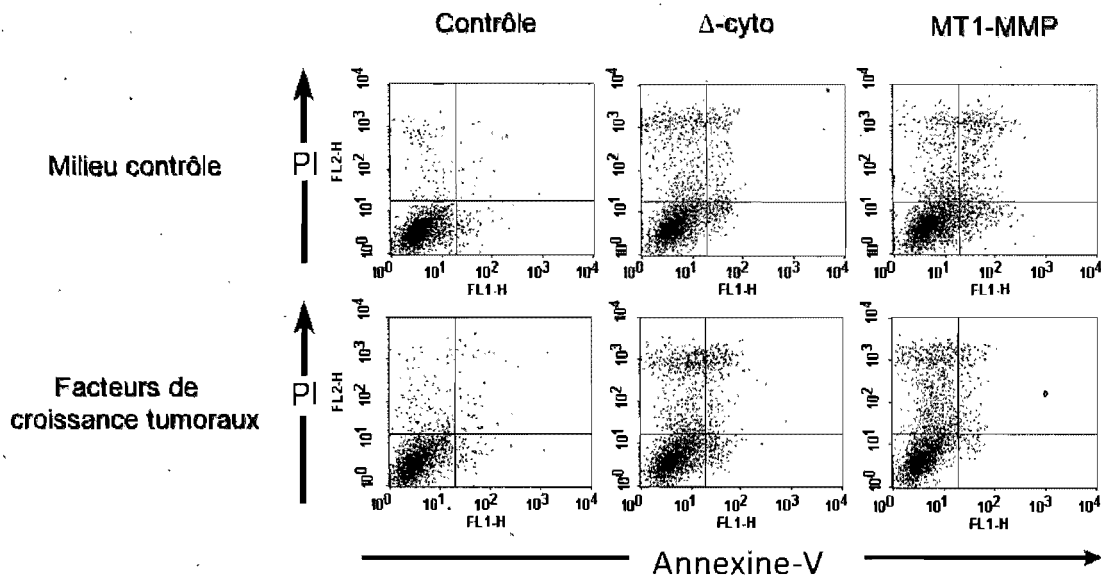
3.4 Protection partielle contre l'apoptose induite par la surexpression de MT1-MMP chez les cellules HBMEC par les facteurs de croissance sécrétés par les cellules tumorales U-87.

Lorsque les cellules HBMEC transfectées avec MT1-MMP et MT1-MMP Δ -cyto sont mises en culture avec des facteurs de croissance sécrétés par les cellules U-87 pendant 24h, une diminution de l'apoptose est observée chez les cellules transfectées avec MT1-MMP (Voir Fig. 3.4 A et 3.4 B). Un tel effet n'a pas été observé au niveau de la nécrose. Les facteurs de croissance sécrétés par les cellules U-87 ont été obtenus en sevrant pendant 24h des cellules U-87 en présence d'un volume de 20 ml de milieu U-87 sans sérum dans un flacon de 175 cm². Le surnageant a été récolté, centrifugé et conservé à - 80° C. Par la suite, un volume de 1 ml de ce milieu conditionné a été ajouté aux puits (contenant une solution cellulaire d'un volume de 2 ml) contenant les cellules transfectées. Ces solutions cellulaires ont reposé 24h dans l'incubateur par la suite. L'analyse avec la cytométrie de flux telle que décrite dans la méthodologie a ensuite été réalisée. Suivant cette technique, nous observons que les degrés d'apoptose et de nécrose de MT1-MMP et MT1-MMP Δ -cyto sont similaires lorsque celles-ci sont mises en culture avec les facteurs de croissance tumoraux. Les résultats présentés à la figure 3.4 B représentent la moyenne de 4 expériences indépendantes excepté pour la condition MT1-MMP Δ -cyto qui a été effectuée à 2 reprises.

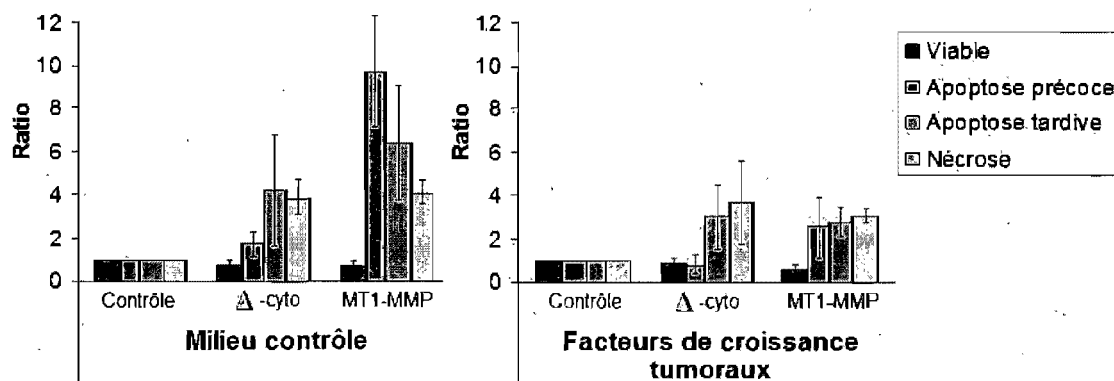
Fig. 3.4

Protection partielle contre l'apoptose induite par la surexpression de MT1-MMP par les facteurs de croissance sécrétés par les cellules U-87.

A)



B)



Légende :

- A) Résultats de l'analyse avec la cytométrie de flux réalisée avec les réactifs Annexine-V et iodure de propidium (PI). Les cellules viables sont représentées dans le coin inférieur gauche, l'apoptose précoce dans le coin inférieur droit, l'apoptose tardive dans le coin supérieur droit et la nécrose dans le coin supérieur gauche. Δ-cyto : MT1-MMP Δ-cyto.
- B) Les résultats sont exprimés en ratio par rapport au groupe de cellules témoins qui ont seulement été traitées avec de la lipofectamine.
 Δ-cyto : MT1-MMP Δ-cyto (n=2), MT1-MMP (n=4)

3.5 Effet de MT1-MMP et de la troncation du domaine cytoplasmique (MT1-MMP Δ -cyto) sur la migration cellulaire des cellules HBMEC et l'effet des facteurs de croissance tumoraux relargués par les cellules U-87 sur la migration de ces populations de cellules HBMEC.

Lors des épreuves de migration de la lignée cellulaire HBMEC, plusieurs conditions différentes ont été utilisées pour tenter de démontrer l'effet de la surexpression de MT1-MMP et MT1-MMP Δ -cyto ainsi que de l'ajout de facteurs de croissance tumoraux sécrétés par les cellules U-87. Pour ce faire, les trois populations cellulaires de HBMEC (témoin, MT1-MMP et MT1-MMP Δ -cyto) ont été mises en migration tel que décrit dans la section méthodologie avec différents milieux durant la migration :

- 1) Milieu HBMEC sans sérum
- 2) Milieu U-87 sans sérum
- 3) Milieu U-87 sans sérum contenant 20 μ M d'ilomastat (GM-6001)
- 4) Milieu U-87 conditionné contenant 20 μ M d'ilomastat (GM-6001)
- 5) Milieu U-87 conditionné (contenant les facteurs de croissance tumoraux des cellules U-87).

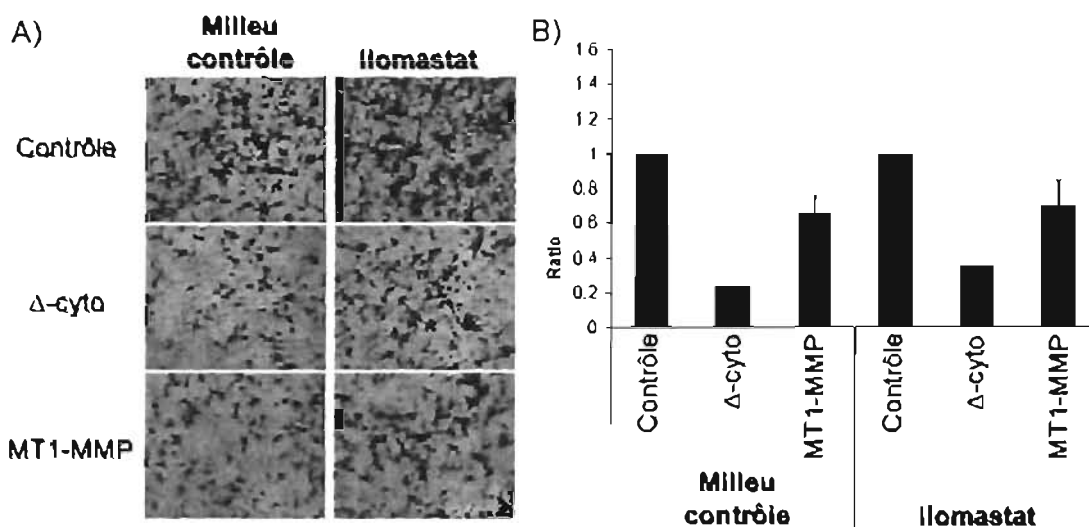
Cette expérience de migration avait pour but de mettre en évidence l'effet de la surexpression de MT1-MMP et de l'ajout de facteurs de croissance tumoraux. Pour déterminer l'apport de la portion catalytique de MT1-MMP dans la migration, nous avons testé une population cellulaire de HBMEC transfectée avec le plasmide MT1-MMP Δ -cyto dont le domaine cytoplasmique a été tronqué. Pour mettre en évidence l'apport de la portion cytoplasmique de MT1-MMP sur la migration cellulaire des cellules HBMEC, nous avons par la suite utilisé l'ilomastat (GM-6001), qui est un inhibiteur de la portion catalytique de MT1-MMP. L'effet des facteurs de croissance tumoraux sécrétés par les cellules U-87 a par la suite été mesuré en ajoutant le milieu conditionné U-87 à ces trois populations cellulaires (Témoin, MT1-MMP et MT1-MMP Δ -cyto). Dans tous les cas, l'analyse de la migration a été réalisée à l'aide du logiciel d'analyse Northern Eclipse selon la méthodologie décrite dans la section méthode.

3.5.1 *Les cellules HBMEC surexprimant MT1-MMP et MT1-MMP Δ -cyto ont un potentiel de migration diminué comparativement aux cellules témoins exposées à un milieu contenant ou non de l'ilomastat*

Les cellules HBMEC transfectées par les plasmides codant pour MT1-MMP et MT1-MMP Δ -cyto migrent moins que les cellules témoins (0,66 fois pour MT1-MMP et 0,22 fois pour Δ -cyto) (Voir Fig. 3.5.1). Cette tendance a été observée dans au moins deux expériences indépendantes excepté pour le plasmide MT1-MMP Δ -cyto (n=1). L'exposition ou non à du milieu contenant de l'ilomastat n'a pas induit de variation significative de la migration chez les cellules HBMEC transfectés. Les barres d'erreur présentées dans la Fig. 3.5.1 représentent les valeurs extrêmes de chaque groupe mesurées durant cette expérience.

Fig. 3.5.1

Les cellules HBMEC surexprimant MT1-MMP et MT1-MMP Δ -cyto ont un potentiel de migration diminué comparativement aux cellules témoins exposées à un milieu contenant ou non de l'ilomastat



Légende :

- A) Les cellules HBMEC ayant migrées au-travers des pores situés au fond de la chambre de Boyden sont colorées (taches noires sur ces photographies) puis quantifiées au moyen d'un microscope possédant un objectif de grossissement de 10X.
- B) L'analyse des données de la migration cellulaire a été effectuée en utilisant le logiciel Northern Eclipse. Une fois intégrée dans le logiciel, chaque photographie a été ajustée individuellement pour s'assurer que les cellules ont bien été sélectionnées. Ainsi, cette méthode permet d'identifier et de quantifier les cellules ayant migré sur la surface inférieure de la chambre de Boyden. Les résultats sont exprimés sous forme de ratio par rapport au groupe de cellules témoins et représentent 2 expériences indépendantes pour les conditions témoin et MT1-MMP, et une seule expérience pour MT1-MMP Δ -cyto.

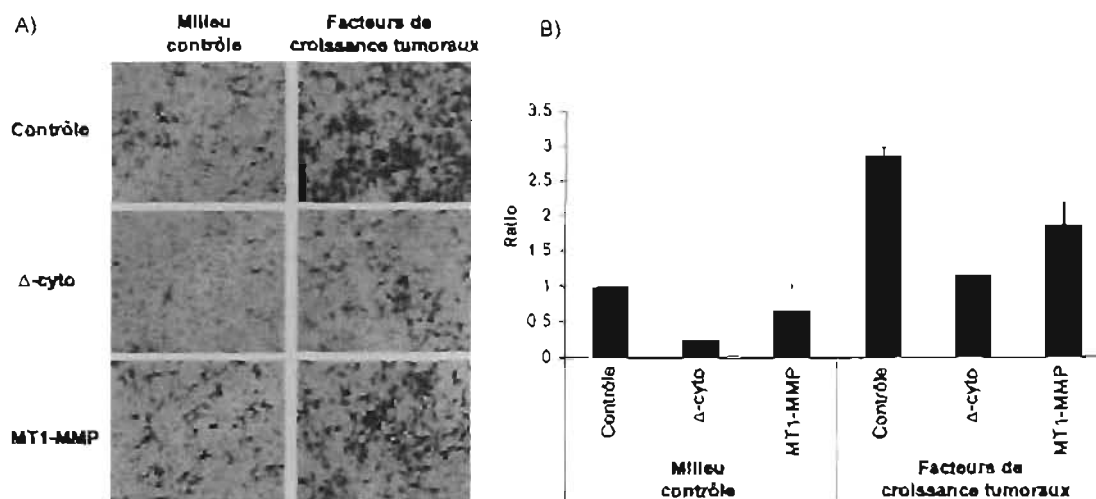
Δ -cyto : MT1-MMP Δ -cyto

3.5.2 Augmentation de la migration des cellules HBMEC en réponse aux facteurs de croissance tumoraux sécrétés par les cellules U-87 pendant 24 heures

Les cellules incubées en présence de facteurs de croissance sécrétés par les cellules U-87 pendant 24 heures démontrent un potentiel migratoire augmenté d'environ 2,8 fois comparativement aux cellules mises en présence dans du milieu U-87 sans sérum pour la même période. Les cellules HBMEC surexprimant MT1-MMP et MT1-MMP Δ -cyto démontrent aussi un potentiel migratoire augmenté de 1,1 et 1,9 fois respectivement en présence des facteurs de croissance tumoraux sécrétés par les cellules U-87 en regard des cellules témoins incubées dans du milieu U-87 sans sérum. Les cellules HBMEC transfectées avec le plasmide MT1-MMP et MT1-MMP Δ -cyto et incubées en présence de facteurs de croissance tumoraux sécrétés par les cellules U-87 ont une migration augmentée de 2,8 et 4,8 fois respectivement lorsqu'elles sont comparées à leurs homologues dans le milieu U-87 sans sérum. Dans les deux cas, la migration des cellules transfectées est inférieure à celle des cellules non transfectées (Fig. 3.5.2). Les résultats présentés à la figure 3.5.2 représentent la moyenne de 2 expériences indépendantes excepté pour la condition MT1-MMP Δ -cyto qui a été effectuée à une reprise. Les barres d'erreur présentées dans la figure 3.5.2 représentent les valeurs extrêmes de chaque groupe mesurées durant cette expérience. Lors de cette expérience, les tests préliminaires pour déterminer le meilleur moment pour la quantification de la migration avaient été réalisés par une autre étudiante du laboratoire travaillant sur les cellules HBMEC. De plus, aucune courbe dose réponse avec le milieu conditionné par les cellules tumorales U-87 n'a été réalisée car la quantité maximale de milieu conditionné (600 μ L) a été utilisée pour chaque échantillon.

Fig. 3.5.2

Augmentation de la migration des cellules HBMEC en réponse aux facteurs de croissance tumoraux sécrétés par les cellules U-87.



Légende :

- A) Les cellules HBMEC ayant migrées au-travers des pores situés au fond de la chambre de Boyden sont colorées (taches noires sur ces photographies) puis quantifiées au moyen d'un microscope possédant un objectif de grossissement de 10X.
- B) L'analyse des données de la migration cellulaire a été effectuée en utilisant le logiciel Northern Eclipse. Une fois intégrée dans le logiciel, chaque photographie a été ajustée individuellement pour s'assurer que les cellules ont bien été sélectionnées. Ainsi, cette méthode permet d'identifier et de quantifier les cellules ayant migré sur la surface inférieure de la chambre de Boyden. Les résultats sont exprimés sous forme de ratio par rapport au groupe de cellules témoins exposées au milieu sans facteur de croissance et représentent 2 expériences indépendantes excepté pour la condition MT1-MMP Δ-cyto (n=1). Δ-cyto = MT1-MMP Δ-cyto

3.6 Les facteurs de croissance tumoraux sécrétés par les cellules U-87 n'augmentent pas la prolifération des cellules HBMEC

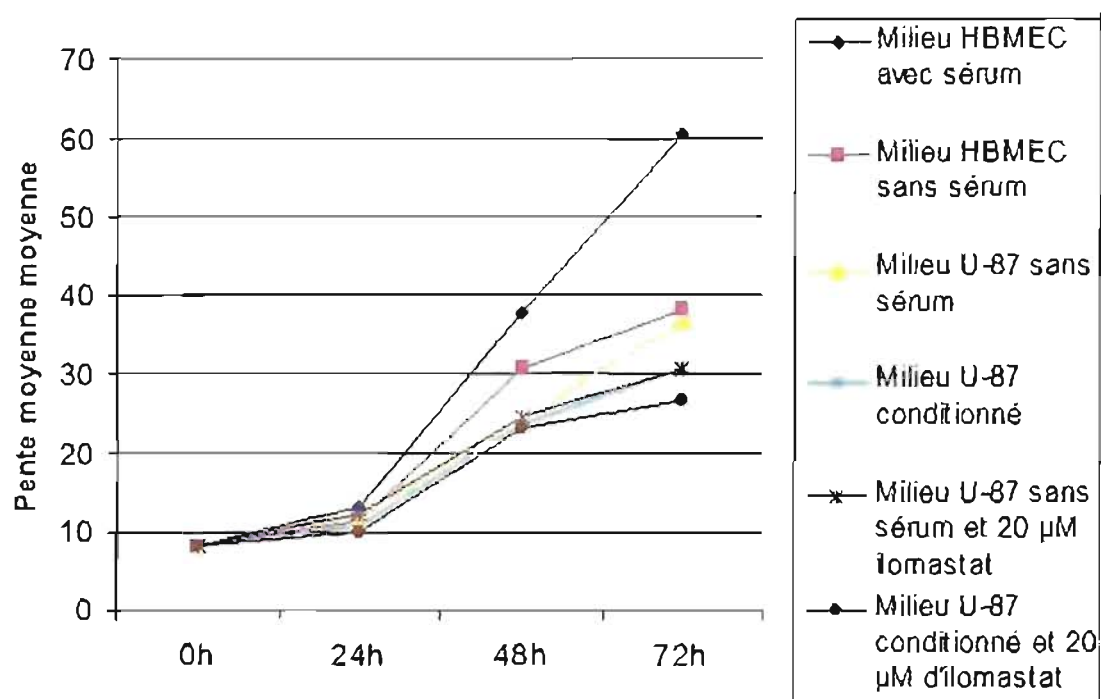
Les cellules HBMEC ont été incubées pendant 96 heures en présence de différents milieux de cultures :

- 1) Milieu HBMEC avec sérum,
- 2) Milieu HBMEC sans sérum
- 3) Milieu U-87 sans sérum,
- 4) Milieu U-87 conditionné,
- 5) Milieu U-87 sans sérum avec 20 μ M d'ilomastat
- 6) Milieu U-87 conditionné avec 20 μ M d'ilomastat.

Les cellules HBMEC incubées en présence de milieu U-87 sans sérum ont été utilisées comme témoin pour pouvoir déterminer l'effet du milieu U-87 conditionné. Les cellules HBMEC incubées en présence de milieu HBMEC avec sérum ont démontré la croissance la plus importante durant cette période, suivi des cellules HBMEC en présence de milieu HBMEC sans sérum. Toutes les cellules cultivées en présence de milieu U-87 (conditionné ou sans sérum) en l'absence ou présence de 20 μ M d'ilomastat ont démontré des résultats similaires de prolifération, avec des valeurs inférieures aux cellules cultivées en présence de milieu HBMEC (Voir Fig. 3.6.). Des résultats similaires ont été obtenus en répétant l'expérience mais cette fois, en changeant les milieux 2 fois par jour (8h00 et 17h00). De cette manière, les facteurs de croissance sécrétés par les cellules U-87 n'ont pas modifié significativement la prolifération des cellules HBMEC à 72h en comparaison avec le milieu de culture témoin de nos expériences (milieu U-87 sans sérum).

Fig 3.6

Test de prolifération au WST-1 des cellules HBMEC exposées à différents milieux.



Légende :

Les cellules HBMEC ont été exposées dans différents milieux de culture en présence et absence de 20 µM d'ilomastat pendant 72h. Le milieu HBMEC avec sérum offre la prolifération la plus importante suivi du milieu HBMEC sans sérum. Tous les autres milieux y compris le milieu U-87 conditionné ont démontré une prolifération semblable, diminuée comparativement aux milieux HBMEC.

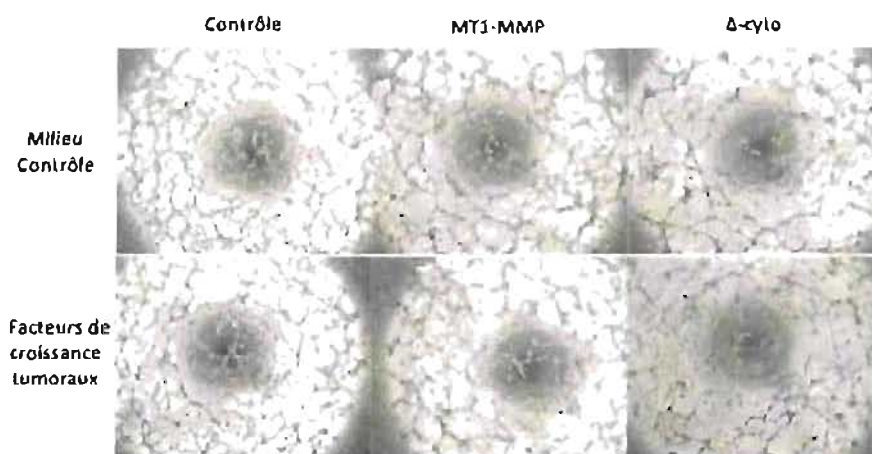
3.7 La surexpression de MT1-MMP et MT1-MMP Δ -cyto chez les cellules HBMEC n'entraîne pas d'effet significatif sur la tubulogénèse en comparaison aux cellules témoins. L'ajout de facteurs de croissance sécrétés par les cellules U-87 aux cellules HBMEC transfectées tend à diminuer la tubulogénèse

La tubulogénèse sur Matrigel™ a été effectuée selon la méthode décrite dans la section méthodologie. Les cellules HBMEC transfectées avec MT1-MMP, MT1-MMP Δ -cyto et les témoins (cellules HBMEC exposées à la lipofectamine) ont été placées dans le Matrigel™ avec du milieu témoin (Milieu de U-87 sans sérum) ou du milieu contenant des facteurs de croissance sécrétés par les cellules U-87 (100 μ l de milieu et 50 μ l de Matrigel™). En microscopie, il y a très peu de différence entre la tubulogénèse des cellules transfectées avec le milieu témoin (Voir Fig. 3.7). L'ajout de facteurs de croissance dérivés des cellules U-87 tend à augmenter légèrement la tubulogénèse des cellules témoins et à diminuer celle des cellules transfectées. Les valeurs obtenues sont la moyenne de trois expériences indépendantes (n=3). Les barres d'erreur représentent les valeurs extrêmes obtenues lors de ces expériences.

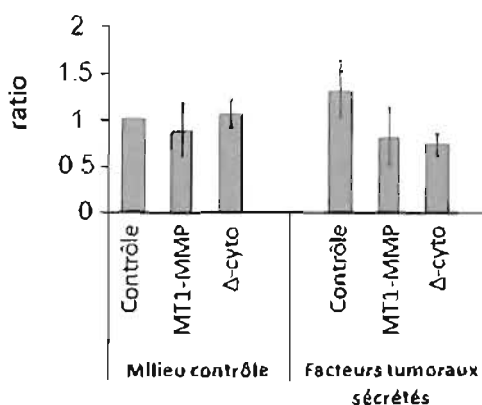
Fig. 3.7

Tubulogenèse sur MatrigelTM des cellules HBMEC surexprimant MT1-MMP et MT1-MMP Δ -cyto et exposées à du milieu témoin ou des facteurs de croissance tumoraux sécrétés par les cellules U-87.

A)



B)



Légende :

- A) Les cellules HBMEC ayant formé des structures tubulaires dans les puits sont visualisées puis quantifiées au moyen d'un microscope possédant un objectif de grossissement de 10X.
- B) Graphique de la tubulogenèse des cellules HBMEC surexprimant MT1-MMP ou MT1 Δ -cyto en présence ou absence de facteurs de croissances tumoraux sécrétés par les cellules U-87. L'analyse des données a été effectuée en utilisant le logiciel Northern Eclipse. Une fois intégrée dans le logiciel, chaque photographie a été ajustée individuellement pour s'assurer que les cellules ont bien été sélectionnées. Les valeurs sont exprimées en ratio des cellules HBMEC témoins incubées dans le milieu témoin. Les données proviennent de 3 expériences indépendantes et les barres d'erreur représentent les variations extrêmes obtenues.

CHAPITRE IV DISCUSSION

Les glioblastomes multiformes représentent des tumeurs incurables dont le traitement est surtout axé sur la préservation de la qualité de vie du patient plutôt qu'une visée curative en dépit des avancements des connaissances des dernières années. En effet, de nombreuses découvertes réalisées dans le domaine de la médecine moléculaire ont permis de mieux comprendre la pathogenèse des GBM et d'élucider certains mécanismes clés qui pourraient devenir de nouvelles cibles thérapeutiques. De nombreuses études se sont penchées sur la vascularisation et l'invasion tumorale. De ce fait, plusieurs traitements antiangiogéniques sont actuellement testés, mais aucun n'est en mesure d'arrêter complètement le développement des GBM. Une approche thérapeutique multimodale impliquant la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie est actuellement la meilleure approche connue.

Les avancées en médecine moléculaire ont permis de mettre en évidence la complexité des interactions entre les cellules tumorales et leur microenvironnement immédiat. La modulation de ces interactions pourrait mener à de nouvelles thérapies plus efficaces. En effet, la prolifération cellulaire des GBM, leur capacité d'invasion et la présence de nécrose sont toutes des caractéristiques importantes des GBM et pourraient être en partie liées à la microvascularisation tumorale cérébrale (Brems 2003). Les cellules endothéliales sont des acteurs stratégiques dans les interactions entre les cellules tumorales et leur microenvironnement. Elles influencent et sont influencées par les cellules tumorales par l'intermédiaire de molécules d'adhésion et de facteurs solubles. La MEC ne doit pas être vue seulement comme un espace passif séparant les cellules. Au contraire, elle est un joueur principal dans toutes les interactions entre les cellules endothéliales et les cellules tumorales. Sa modulation

peut favoriser ou nuire aux cellules tumorales. Tel que mentionné précédemment, les MMP dont MT1-MMP sont des molécules importantes pour la modulation de la MEC, mais aussi pour la communication intercellulaire et les processus de vascularisation tumorale et d'invasion tumorale. Ceci a motivé notre étude sur les interactions des facteurs de croissance sécrétés par les cellules tumorales des GBM sur les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales. Bien que nous n'ayons pas quantifié le contenu du milieu conditionné produit par les cellules tumorales, cette "soupe" moléculaire reflète certainement une partie des conditions *in vivo* où plusieurs molécules différentes sont présentes au même moment.

4.1 Le modèle expérimental utilisé

4.1.1 Les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines (HBMEC)

Dans ce travail, les cellules HBMEC ont été utilisées comme modèle substitut aux cellules endothéliales dérivées des GBM. Celles-ci sont, à notre connaissance, le modèle de culture *in vitro* qui se rapproche le plus de la réalité car cette lignée est en mesure de maintenir les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles qui sont exprimées par les cellules endothéliales dérivées des GBM. Jusqu'à tout récemment, les études portant sur la microcirculation cérébrale étaient réalisées avec des cellules endothéliales systémiques comme les cellules endothéliales issues des veines ombilicales humaines (HUVEC) (Annabi et al. 2003) et les cellules endothéliales aortiques bovines (BAEC) (Tanaka 1997). Les résultats étaient alors extrapolés aux cellules endothéliales microvasculaires cérébrales malgré le fait que celles-ci présentent un phénotype différent des cellules endothéliales systémiques à plusieurs niveaux (Stins et al. 1997, Bouis et al. 2001). Bien que des cellules endothéliales dérivées des GBM ont été isolées dans certaines études (Bian et al. 2006, Charalambous et al. 2005), leur culture *in vitro* à long terme n'a pas été possible car ces cellules se dé-différencient en culture et leur potentiel prolifératif est rapidement affecté par leur senescence (Bian et al. 2005). Les cellules HBMEC utilisées dans ce travail ont été générées et caractérisées par le Dr Kwang Sik Kim de l'université John

Hopkins à Baltimore, aux États-Unis. Ces cellules sont positives pour le facteur VIII-Rag, l'anhydrase carbonique IV, l'Ulex Europeus Agglutinin I, peuvent capter les LDL acétylés marqués par fluorescence et expriment la gamma glutamyl transpeptidase, ce qui définit un phénotype spécifique pour les cellules endothéliales cérébrales (Stins et al. 1997). Pour maintenir leurs caractéristiques morphologiques et fonctionnelles pour au moins 30 passages, les cellules HBMEC ont été immortalisées par la transfection du virus simian 40 à antigène grand T. Cette transfection leur confère aussi un potentiel prolifératif augmenté (Greiffenberg et al. 1998). Pour toutes ces raisons, nous croyons que les cellules HBMEC utilisées comme substitut aux cellules endothéliales associées aux GBM est le modèle *in vitro* qui se rapproche le plus du phénotype des cellules endothéliales dérivées du microenvironnement des GBM.

4.1.2 Caractérisation des cellules endothéliales dérivées des GBM

Dans notre étude, l'ajout de milieu conditionné par les cellules de GBM sur les cellules HBMEC semble démontrer des résultats similaires à ceux observés par l'analyse de cellules endothéliales dérivées des GBM. En effet, de nombreuses études récentes ont démontré que les cellules endothéliales dérivées des GBM ont des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles différentes de cellules endothéliales cérébrales normales (Alessandri et al. 1999, Charalambous et al. 2005 et 2006, Kniesel et al. 2000, Miebach et al. 2006). D'un point de vue morphologique, les cellules endothéliales associées aux GBM sont des cellules larges et aplaties ayant une apparence se rapprochant surtout à celles des veines, contrairement aux cellules endothéliales normales qui sont plus petites et plus gonflées (Charalambous et al. 2006). Charalambous et al. ont fait l'analyse de cellules endothéliales dérivées de 6 échantillons de GBM et ont comparé leurs caractéristiques morphologiques et fonctionnelles avec les cellules endothéliales cérébrales normales. Pour ce faire, ils ont isolé ces cellules endothéliales et les ont fait croître *in vitro*. La mort cellulaire, la prolifération, la migration cellulaire et l'expression de divers facteurs ont par la suite été déterminées sur ces 2 populations. Globalement, leurs résultats indiquent que les

cellules endothéliales dérivées des GBM ont un phénotype différent des cellules cérébrales normales et ce, en regard d'une capacité de migration augmentée, une diminution de l'apoptose et une diminution de la prolifération cellulaire. De plus, les cellules endothéliales dérivées des GBM avaient une expression plus marquée de l'actine alpha des muscles lisses (SMA) et une diminution de la cadherine endothéliale vasculaire (VE-cadherin). Les molécules CD31, CD105 et le facteur VIII avaient une expression similaire dans les 2 populations (Charalambous et al. 2005). Ces résultats semblent démontrer que les cellules endothéliales peuvent changer de phénotype et de morphologie lorsqu'elles sont exposées au microenvironnement tumoral et ce, malgré le fait qu'elles puissent être issues des cellules endothéliales normales avoisinantes ou de précurseurs circulants (Asahara et al. 1999, Bussolati et al. 2003). Ces données sont aussi consistantes avec l'observation qu'il y a une dichotomie temporelle entre la prolifération des cellules endothéliales et leur migration dans les GBM. Ces cellules endothéliales démontrent une diminution de leur prolifération lors de l'augmentation de leur migration et vice-versa (Giese et al. 1996).

4.1.3 Les facteurs de croissance sécrétés par les cellules de GBM

Pour reproduire le plus possible les conditions *in vivo*, nous avons décidé d'exposer les cellules endothéliales au milieu conditionné produit par les cellules de GBM (U-87). Celui-ci était produit selon la méthode décrite dans la section méthodologie et bien que sa composition exacte n'a pas été évaluée dans ce travail, nous croyons qu'il représente bien le microenvironnement tumoral car il comporte certainement plusieurs facteurs de croissance sécrétés par les cellules tumorales, mais aussi certains déchets et diverses autres molécules. De nombreuses études portant sur la caractérisation des facteurs de croissance produits par les GBM ont déjà été réalisées. Certaines d'entre elles ont tenté de déterminer les facteurs de croissance et autres molécules solubles influençant l'angiogenèse, mais aussi la capacité d'invasion des GBM (Hamel et al. 2000). Même si ces études ont des méthodologies différentes en regard de la collecte des cellules, de l'extraction des facteurs et de leur analyse, elles

mettent en évidence plusieurs facteurs de croissance dont l'expression semble corrélérer directement avec le grade histologique et la densité vasculaire des GBM. Les principaux facteurs impliqués sont le VEGF, le bFGF et le facteur de croissance hépatocytaire (hepatocyte growth factor/scatter factor, HGF/SC). En 1999, Schmidt et al. ont analysé les niveaux de VEGF, bFGF et de HGF/SC chez 71 échantillons de gliomes cérébraux par immunobuvardage puis ont ensuite fait une corrélation entre les différents niveaux d'expression et la densité de la vascularisation tumorale. Dans les GBM comparativement aux tumeurs gliales de bas grade, le niveau de VEGF était augmenté de 11 fois et le niveau de HGF/SC de 7 fois comparativement au niveau de bFGF qui était semblable. *In vitro*, le VEGF et le HGF/SC étaient des facteurs angiogéniques indépendants et puissants alors que le bFGF avait surtout un rôle de co-facteur avec VEGF et HGF/SC (Schmidt et al. 1999). De tous les facteurs, le VEGF est reconnu comme étant le facteur le plus important dans la néovascularisation des GBM (Plate et al. 1992, Plate et al. 1995, Samoto et al. 1995, Hatva et al. 1995) et son expression est surtout marquée dans les cellules tumorales en périphérie (Plate et al. 1992). Plusieurs autres facteurs sont connus pour être exprimés par les gliomes incluant : FGF-1, FGF-2, PDGF-AA, PDGF-BB, IGF-1, IGF-2, TGF (alpha, beta-1 et beta-2), pleiotrophin (PTN) et la midkine (MK) (Hamel et al. 2000). Les récepteurs nécessaires pour ces molécules sont exprimés sur les cellules tumorales, mais aussi sur les cellules endothéliales et les cellules microgliales (Brockman et al. 2003). Étant donné la multitude de facteurs sécrétés par les cellules tumorales de GBM, les effets cellulaires produits par ceux-ci sur les cellules endothéliales peuvent être documentés en mettant celles-ci en contact avec du milieu conditionné.

4.2 Analyse des résultats

Ce travail consistait à déterminer les effets cellulaires des facteurs de croissance sécrétés par les cellules tumorales de GBM sur les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines. La prolifération, la migration cellulaire, la tubulogénèse et la mort cellulaire sont des caractéristiques importantes des GBM et

nous avons tenté de quantifier ces effets sur les cellules endothéliales cérébrales. Outre les divers facteurs de croissance, les MMP exprimées par les cellules tumorales auraient aussi un effet important sur le développement de la vascularisation tumorale et l'angiogenèse. Pour vérifier la relation entre MT1-MMP et les facteurs de croissance tumoraux, nous avons induit une surexpression de la molécule MT1-MMP chez les cellules endothéliales HBMEC en utilisant la technique de transfection transitoire décrite dans la section méthodologie. Deux plasmides ont été utilisés, soit MT1-MMP qui contient une partie catalytique extracellulaire et une partie cytoplasmique intacte et MT1-MMP Δ -cyto qui contient seulement la partie catalytique extracellulaire.

Dans un premier temps, nous avons fait la culture cellulaire des lignées de cellules U-87 et de cellules HBMEC. Par la suite, des transfections transitoires utilisant les plasmides codant soit pour MT1-MMP pleine longueur, soit pour son mutant tronqué de sa partie cytoplasmique MT1-MMP Δ -cyto. Les différentes études cellulaires impliquant les épreuves de migration, de tubulogenèse, de prolifération et d'apoptose-nécrose par cytométrie de flux ont par la suite été réalisées sur ces cellules. L'expression de MT1-MMP et MT1-MMP Δ -cyto a été confirmée chez tous les échantillons en utilisant la technique d'électrophorèse et d'immunobuvardage telle que décrite dans la section méthodologie. Ensuite, l'aspect fonctionnel de MT1-MMP et MT1-MMP Δ -cyto a été démontré par l'activation de la pro-MMP-2 en MMP-2 par la technique de zymographie sur gélatine telle que décrite dans la section méthodologie.

4.2.1 L'angiogenèse implique l'apoptose des cellules endothéliales

Des études récentes ont suggéré que la formation de nouveaux vaisseaux durant le processus d'angiogenèse requiert l'apoptose de certaines cellules endothéliales (Teruyama et al. 2001). En 2001, Teruyama et al. ont observé que l'apoptose des cellules endothéliales HUVEC se produisait à l'initiation de l'angiogenèse aux sites où il y a une communication avec les nouveaux vaisseaux et aux endroits où il y a eu

la régression de néo-vaisseaux. (Teruyama et al. 2001). Une apoptose sélective des cellules endothéliales avait déjà été observée chez les cellules endothéliales tapissant les régions de bourgeonnement des capillaires durant l'angiogenèse (Choi et al. 1995). De plus, il a aussi été démontré *in vitro* que l'apoptose permettait la formation de la lumière des capillaires (Peters et al. 2002) et que son inhibition affectait la formation de structures vasculaires *in vitro* et réduisait l'angiogenèse *in vivo* (Segura et al. 2002).

4.2.2 Implication de MT1-MMP dans l'apoptose des cellules endothéliales

Bien que tous les mécanismes régissant l'apoptose des cellules endothéliales durant l'angiogenèse ne soient pas encore bien compris, MT1-MMP semble être impliquée grandement dans ce processus pour plusieurs raisons. De nombreuses études ont démontré que la mort cellulaire corrélait avec une activation de la pro MMP-2 en MMP-2 par l'intermédiaire de MT1-MMP (Galvez et al. 2002, Jeong et al. 1999). La mort cellulaire causée par MT1-MMP implique l'activité de sa portion catalytique qui active la pro MMP-2 en MMP-2, mais aussi sa portion intracellulaire. En effet, Langlois et al. ont démontré que la surexpression de MT1-MMP sensibilisait les cellules endothéliales à devenir apoptotiques via l'activation de la caspase-3 par la voie mitochondriale par des mécanismes requérant l'activité catalytique et cytoplasmique de MT1-MMP (Langlois et al. 2005). Cette étude a été effectuée sur des cellules endothéliales HUVEC et des cellules endothéliales aortiques bovines (BAEC). Plusieurs études semblent démontrer que la protéolyse de la MEC par des molécules de la famille des MMP pourrait contribuer à l'apoptose des cellules endothéliales en créant de l'espace pour leur migration, mais aussi en libérant des facteurs de croissance séquestrés dans la MEC (Heissing et al. 2003). Cette protéolyse du microenvironnement pourrait être un facteur clé dans le déclenchement de l'apoptose des cellules endothéliales car celles-ci nécessitent plusieurs interactions avec la matrice pour survivre. En effet, plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont démontré l'apoptose des cellules endothéliales lors de l'altération de l'intégrité de la MEC (Re et al. 1994, Meredith et al. 1993, Duval et al. 2003). Pour être efficace,

l'apoptose des cellules endothéliales durant l'angiogenèse doit être bien régulée. Le rôle de MT1-MMP a été démontré à plusieurs reprises dans l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo* (Hiraoka et al. 1998, Galvez et al. 2001) et ses mécanismes de régulation précis pourraient lui permettre d'avoir le niveau de précision requis pour mener à bien une partie de l'angiogenèse. En effet, MT1-MMP est surtout localisée sur les pseudopodes des cellules endothéliales, ce qui facilite leur migration. De plus, MT1-MMP est localisée dans les calvéoles qui sont des domaines précis de la membrane cellulaire. Ceci pourrait constituer un autre mécanisme de régulation de son activité (Annabi et al. 2001). D'autres mécanismes comme l'endocytose et sa liaison avec la calvéoline-1 pourraient aussi contribuer à la modulation de son activité à la surface des cellules endothéliales (Osenkowski et al. 2004). Le rôle de MT1-MMP dans l'apoptose a déjà été démontré dans d'autres types cellulaires dont les chondrocytes, les cellules ostéoblastiques humaines SaOS-2 et les myofibroblastes hépatiques (Holmbeck et al. 2003, Preaux et al. 2002, Luo et al. 2003). Pour toutes ces raisons, il apparaît crédible de penser que MT1-MMP a un rôle important à jouer dans l'apoptose des cellules endothéliales durant l'angiogenèse. Cependant, son action n'a jamais été étudiée directement sur les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines (HBMEC).

Dans ce travail, la mort cellulaire a été augmentée d'une manière importante (surtout en regard de l'apoptose) chez les cellules HBMEC surexprimant MT1-MMP et MT1-MMP Δ -cyto. Tel que démontré par Langlois et al. en 2005, le niveau d'apoptose est le plus élevé avec l'expression de la forme complète de MT1-MMP comparativement à son mutant Δ -cyto qui ne possède pas la portion cytoplasmique. Le processus de transfection en soit peut conduire en une augmentation de la mort cellulaire car il nécessite une perméabilisation de la membrane cellulaire par la lipofectamine pour que le plasmide puisse être intégré par la cellule. Cependant, dans cette étude, les cellules témoins étaient aussi traitées avec de la lipofectamine, ce qui élimine en partie ce biais. L'ajout de milieu contenant des facteurs de croissance tumoraux a offert une protection partielle contre l'apoptose induite par la transfection avec MT1-MMP. Cet effet s'est manifesté par un niveau similaire d'apoptose chez les cellules

HBMEC transfectées avec MT1-MMP et MT1-MMP Δ -cyto, comparativement aux mêmes cellules qui n'ont pas été exposées aux facteurs de croissance tumoraux où nous avons observé des niveaux d'apoptose plus élevés chez les cellules transfectées avec MT1-MMP. Seule la nécrose ne semblait pas affectée par les facteurs de croissance tumoraux, celle-ci était grandement augmentée chez toutes les cellules transfectées, indépendamment de l'utilisation de facteurs de croissance tumoraux ou non. Bien que l'interprétation de nos résultats est grandement limitée par le petit nombre des échantillons (n=3 pour la plupart), ces données suggèrent que cette protection partielle contre l'apoptose offerte par les facteurs de croissance pourrait être en partie médiée par des voies de signalisation intracellulaire. En effet, le plasmide MT1-MMP Δ -cyto exprime seulement la portion catalytique de MT1-MMP. Le niveau plus élevé d'apoptose dans les 2 groupes de cellules HBMEC transfectées avec MT1-MMP et MT1-MMP Δ -cyto pourrait être dû à l'effet de la portion catalytique de MT1-MMP qui était présente dans les 2 cas. L'absence de variation significative avec l'utilisation de l'ilomastat (GM-6001) qui est un inhibiteur de la portion catalytique de MT1-MMP est aussi en faveur de cette hypothèse, bien que ces données ne soient pas significatives en raison du nombre d'échantillon restreint (n=2).

4.2.3 La tubulogenèse sur MatrigelTM est une mesure d'étude de l'angiogenèse in vitro

4.2.3.1 MT1-MMP est impliquée dans la tubulogenèse des cellules endothéliales non cérébrales

La tubulogenèse sur MatrigelTM est une technique utilisée dans de nombreuses études comme modèle *in vitro* d'angiogenèse. Cette matrice est composée de facteurs de croissance, peptides et molécules de la MEC qui sont dérivées de tumeurs, et permet de reproduire le microenvironnement cellulaire tridimensionnel des cellules endothéliales tumorales. Des études ont démontré que l'angiogenèse par les cellules endothéliales comporte plusieurs étapes importantes, dont la formation de tubules qui sont des structures tubulaires formées par les cellules endothéliales (Lafleur et al.

2002). Cette tubulogénèse implique la réorganisation de la MEC et la migration des cellules endothéliales. L'implication de MT1-MMP dans la tubulogénèse a déjà été décrite dans plusieurs études portant sur des cellules endothéliales non cérébrales dont les HUVEC (Galvez et al. 2001, Lafleur et al. 2002), les cellules HDMEC (Lafleur et al. 2002) et les cellules BAEC (Langlois et al. 2004). Dans ces études, la surexpression de MT1-MMP entraîne une augmentation de la tubulogénèse et l'inhibition de son activité enzymatique la diminue. En 2002, Lafleur et al. ont utilisé divers facteurs de croissance et différents inhibiteurs des MMP pour mieux comprendre la tubulogénèse des cellules endothéliales macro et microvasculaires (HUVEC et HDMEC). L'expression des MT-MMP, surtout de MT1-MMP, était très augmentée durant la tubulogénèse et la tubulogénèse était inhibée par l'ajout d'inhibiteurs endogènes des MMP (TIMP-2 et TIMP-4), alors que la tubulogénèse n'était pas affectée par TIMP-1 (un inhibiteur n'affectant pas les MT-MMP), ce qui démontre l'implication importante des MT-MMP dans la tubulogénèse. L'ajout de VEGF et bFGF augmentait le plus la tubulogénèse et l'ajout de plusieurs facteurs de croissance entraîne une synergie importante. La co-culture des cellules endothéliales et des cellules de GBM U-87 a démontré que les facteurs de croissance tumoraux sont capables d'augmenter la tubulogénèse d'une manière importante chez ces mêmes cellules endothéliales (Lafleur et al. 2002). Chez les cellules endothéliales non cérébrales, MT1-MMP induit la migration cellulaire et une différenciation morphogénique favorisant la tubulogénèse (Langlois et al. 2004, Langlois et al. 2005, Handsley et al. 2005).

4.2.3.2 Rôle de MT1-MMP dans la tubulogénèse des cellules endothéliales cérébrales

Notre travail est l'un des premiers à étudier directement la tubulogénèse des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines (HBMEC). La littérature sur la tubulogénèse et l'implication de MT1-MMP est majoritairement constituée de travaux réalisés avec des cellules endothéliales non cérébrales. Étant donné leur phénotype particulier, les cellules endothéliales cérébrales pourraient avoir une

réponse particulière. Dans ce travail, la transfection de MT1-MMP et MT1-MMP Δ -cyto n'a pas été en mesure d'augmenter d'une manière significative la tubulogénèse des cellules HBMEC. L'ajout de facteurs de croissance sécrétés par les cellules U-87 tend même à diminuer la tubulogénèse des cellules transfectées, alors qu'il augmente légèrement la tubulogénèse des cellules témoins. Ces résultats surprenant peuvent s'expliquer par un phénotype particulier des cellules endothéliales cérébrales humaines par rapport aux cellules endothéliales systémiques. En effet, des cellules endothéliales cérébrales animales ont déjà démontré des réponses différentes à des stimulations paracrines par le SIP (sphingosine-1-phosphate) en diminuant leur migration cellulaire et leur tubulogénèse comparativement à des cellules endothéliales systémiques (Pilorget et al. 2005). Sur le plan expérimental, bien que les techniques aient été soigneusement respectées, le faible nombre d'échantillons ou une erreur de manipulation pourraient aussi avoir contribué à ces résultats de tubulogénèse. La tubulogénèse sur Matrigel™ est une technique difficile à réaliser et nécessite de nombreuses manipulations successives et plusieurs étapes dans l'analyse des résultats. Dans ce travail, les cellules utilisées pour les études sur le Matrigel™ ont été préalablement transfectées, ce qui aurait pu contribuer à les affaiblir en augmentant la mort cellulaire, surtout en regard de la nécrose et de l'apoptose tardive. Pour minimiser ce biais, les cellules ont été comptées manuellement et les cellules nécrotiques colorées n'ont pas été incluses dans le décompte pour la préparation des solutions cellulaires lors de l'expérience du Matrigel™. Il est toutefois possible que certaines cellules apoptotiques aient été colorées et incluses dans les solutions cellulaires. De plus, tel que démontré lors du test de prolifération au WST-1, le milieu U-87 témoin ou conditionné offre toujours une prolifération cellulaire diminuée en comparaison au milieu HBMEC. Il est possible que cette prolifération cellulaire sous-optimale ait pu avoir un effet sur nos résultats. Cependant, la tendance des résultats ne devrait pas être modifiée grandement car les groupes témoins et les groupes traités étaient traités avec ce milieu U-87, ce qui peut minimiser ce biais. Dans l'ensemble, ces résultats tendent à suggérer une diminution de l'angiogénèse chez les cellules endothéliales cérébrales transfectées exposées à des facteurs de croissance tumoraux.

4.3 La cooption vasculaire chez les GBM

Dans notre étude, l'exposition des cellules HBMEC aux facteurs de croissance sécrétés par les cellules issues de tumeurs cérébrales entraîne une augmentation de la migration cellulaire, une protection partielle contre l'apoptose associée à MT1-MMP, une diminution de la tubulogénèse et peu d'effet sur la prolifération cellulaire. Ces données sont en faveur d'un phénotype de cooption vasculaire observé dans la croissance initiale des GBM. Telle que décrite à la section 1.2.1.6, la cooption est un processus par lequel les cellules tumorales vont profiter du réseau vasculaire de l'hôte sans en altérer les caractéristiques. Ce n'est que depuis quelques années que ce phénomène a été observé chez les tumeurs se développant dans les milieux hautement vascularisés tels que le cerveau, le parenchyme pulmonaire et le foie. Suivant la phase de cooption, il y a une apoptose des cellules endothéliales, une mort des cellules tumorales suivi d'une phase d'angiogénèse importante surtout en périphérie de la tumeur qui semble stimulée par les conditions hypoxiques provoquant la relâche de VEGF et de HIF-1 par les cellules tumorales. Les mécanismes exacts qui régissent l'interrelation entre les vaisseaux préexistants qui subissent la cooption et l'angiogénèse tumorale sont encore mal compris, mais ils semblent impliquer des facteurs anti et pro-angiogéniques déjà connus. Les principales substances seraient le VEGF et les angiopoïétines (Ang-1 et Ang-2). Les récepteurs pour ces deux familles sont spécifiquement retrouvés sur l'endothélium vasculaire (Flamme 1995, Dumont et al. 1992, Satō et al. 1995). Le VEGF-A est la protéine angiogénique et le facteur de perméabilité vasculaire le plus puissant qui soit connu (Dvorak et al. 1995a, Feng et al. 1996, Feng et al. 1999). Chez les gliomes, le VEGF est préférentiellement exprimé autour des régions hypoxémiques et nécrotiques (Plate et al. 1994) et le niveau de VEGF semble corrélérer avec le grade de malignité et la densité de microvaisseaux (Schmidt et al. 1999, Samoto et al. 1995). L'observation *in vivo* met en lumière différentes fonctions de l'Ang-2 selon la présence ou l'absence de VEGF. En présence de VEGF, l'expression de l'Ang-2 entraîne une déstabilisation du vaisseau et une réponse angiogénique très importante, contrairement à l'expression de l'Ang-2 en l'absence de VEGF qui déstabilise le vaisseau en entraînant sa régression sans

toutefois augmenter l'angiogénèse (Maisonpierre et al. 1997). L'apoptose des cellules vasculaires et leur involution précèdent la nécrose tumorale et l'apparition de l'angiogénèse (Voir Fig. 4). Les niveaux d'Ang-2 détectés avant l'apoptose des cellules vasculaires pourraient être en lien avec l'involution vasculaire (Zagzag et al. 2000).

Fig. 4 Étapes de la cooption vasculaire dans le parenchyme cérébral

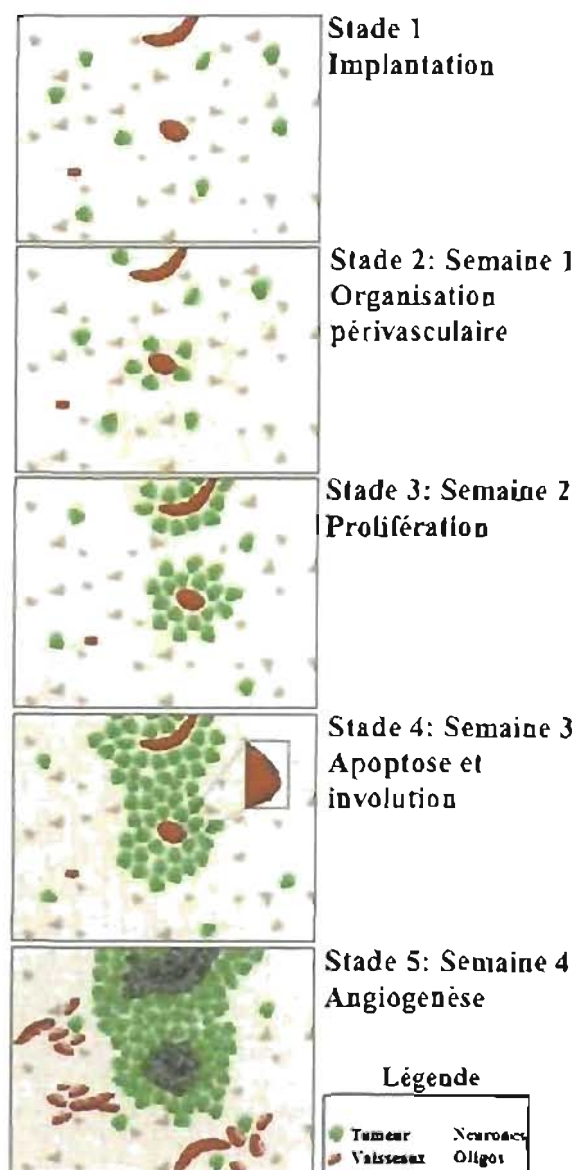


Fig. 4. L'évolution de la croissance de cellules de glioblastomes implantées dans le parenchyme cérébral d'un modèle animal. Initialement, les cellules tumorales

s'organisent autour des vaisseaux existants et les utilisent sans en altérer les caractéristiques. À partir d'un certain moment, il y a apoptose des cellules endothéliales, suivi de l'apoptose des cellules tumorales. L'angiogenèse se produit par la suite (ZagZag et al. 2000).

Les mécanismes de cette involution des cellules endothéliales *cooptées* restent encore à élucider. Cependant, il est probable que ce soit un événement multifactoriel en raison des nombreux facteurs exogènes qui interagissent directement avec ces cellules endothéliales incluant les cytokines (Geng et al. 1996), les récepteurs de mort Fas/Fas (Nagata et al. 1997), la perte de contact avec la MEC (Bates et al. 1994), l'hypoxie (Stempien-Otero et al. 1999), les radicaux libres (Li et al. 1997) et le retrait de facteurs de croissance (Benjamin et al. 1999).

Le modèle de cooption vasculaire n'explique pas à lui seul le développement vasculaire des GBM, car l'angiogenèse reste un facteur prédominant chez ces tumeurs solides qui sont les plus vascularisées. Par ailleurs, il semble de plus en plus probable que la cooption vasculaire puisse survenir lors de leur développement initial. Outre les modèles expérimentaux de glioblastomes, plusieurs autres observations appuient l'hypothèse de la cooption vasculaire. La gliomatose cerebri est une tumeur gliale maligne (OMS grade 3) rare qui a un potentiel invasif très puissant. En effet, cette tumeur tend à infiltrer diffusément le parenchyme cérébral avec une préservation relative de l'architecture neuronale (Artigas et al. 1985). Le développement de cette tumeur n'impliquerait pas d'angiogenèse, mais bien une cooption des vaisseaux préexistant. Bernsen et al. ont démontré l'absence d'angiogenèse lors de l'analyse de paramètres microvasculaires d'échantillons de gliomatose cerebri qui démontraient une densité vasculaire identique au parenchyme cérébral normal. Cette observation pourrait expliquer le fait que ces tumeurs ne rehaussent pas lors de l'administration de produit de contraste car la BHE n'est pas altérée (Bernsen et al. 2005). Certains modèles expérimentaux ont démontré une augmentation de la cooption vasculaire associée à des traitements anti-angiogéniques visant à bloquer l'action du VEGF. En 2000, Rubenstein et al. ont observé que le blocage pharmacologique de l'action du

VEGF par l'administration d'anticorps anti-VEGF chez des rats implantés avec des GBM entraînait une diminution de la vascularisation de la tumeur et une augmentation de l'apoptose des cellules néoplasiques. Bien que la croissance des GBM était alors ralentie, leur analyse histologique a démontré une augmentation de leur capacité invasive et une cooption de la vascularisation de l'hôte (Rubenstein et al. 2000). Ainsi, de nombreuses études expérimentales sont en faveur d'un modèle de cooption vasculaire chez les GBM, ce qui indique que ces tumeurs ne dépendent pas seulement de l'angiogenèse pour leur vascularisation tumorale.

4.4 Thérapies antiangiogéniques pour le traitement des GBM

Depuis quelques années, l'étude de modèles expérimentaux chez les animaux tend à démontrer que les GBM peuvent adapter leur phénotype suivant un traitement avec un traitement antiangiogénique inhibant le VEGF (Rubenstein et al. 2000, Kunkel et al. 2001, Lamszus et al. 2003). Ce phénomène se produit uniquement en présence d'un environnement vascularisé comme le parenchyme cérébral et pulmonaire et n'est pas observé après l'implantation sous-cutanée de GBM chez les modèles animaux (Prewett et al. 1999, Kim et al. 1993). En l'absence de traitement, les vaisseaux cooptés par les GBM subissent ultimement une involution marquée par l'apoptose des cellules endothéliales et néoplasique suivie d'une phase d'angiogenèse induite par le milieu hypoxique. Lors du traitement anti-angiogénique, il y a une persistance des vaisseaux *cooptés* et les tumeurs tendent à produire des lésions satellites et à migrer d'une façon préférentielle le long des vaisseaux de l'hôte (Lamszus et al. 2003).

D'une manière intéressante, cette persistance des vaisseaux *cooptés* n'était pas observée par Kim et al. avec l'utilisation d'un leurre-VEGF ou *VEGF-trap* (faux récepteur construit à partir de la fusion des récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 au segment Fc d'un IgG1) administré chez un modèle animal *in vivo* implanté avec des cellules de neuroblastome (Kim et al. 2002). Dans ce modèle, les vaisseaux cooptés ont subi une régression apoptotique qu'ils ont expliqué par un blocage plus complet de la voie VEGF/VEGFR qui empêcherait la stabilisation à long terme des vaisseaux

cooptés. Cependant, malgré l'accentuation du phénotype de cooption chez le modèle animal, le traitement des animaux avec l'Avastin (un anticorps monoclonal bloquant l'isoforme 2 du récepteur VEGFR) a démontré une diminution de la vascularisation tumorale, une augmentation de l'apoptose tumorale et ultimement une prolongation de la survie de plus de 95% (Rubenstein et al. 2000). Bien que la survie des animaux soit augmentée d'une manière significative, leurs tumeurs acquièrent un phénotype de cooption et ont un potentiel invasif très marqué qui pourrait éventuellement mener à une tumeur du type gliomatose cerebri (Rubenstein et al. 2000). Les raisons de ce changement de phénotype sont encore mal comprises, mais certains ont émis l'hypothèse que l'hypoxémie entraînée par la destruction des néovaisseaux favorisait l'expression de molécules stimulant le caractère invasif des cellules tumorales, ce qui favoriserait leur migration vers les vaisseaux de l'hôte (Lamszus et al. 2003, Tamaki et al. 1997, Krishnamachary et al. 2003). Certaines études ont même démontré que les traitements anti-angiogéniques avaient la capacité de normaliser les vaisseaux tumoraux et de rétablir la barrière hémato-encéphalique, ce qui pourrait nuire à la détection des tumeurs et à leur traitement avec des agents de chimiothérapie (Winkler et al. 2004, Jansen et al. 2004, Jain et al. 2001). En plus des difficultés liées à l'administration, la pharmacocinétique et à la courte demi-vie de la majorité des agents anti-angiogéniques, certaines études ont démontré que l'effet bénéfique de ces agents était rapidement renversé par l'arrêt du traitement. En effet, la destruction des néovaisseaux laisse une membrane basale fantôme et un espace vide (Inai et al. 2004) qui est rapidement repeuplé de néovaisseaux quelques jours après l'arrêt d'un traitement anti-VEGF chez un modèle animal (Mancuso et al. 2006). Des études combinant l'Avastin et la radiothérapie ou un inhibiteur de kinase sont actuellement en cours (Sathornsumetee et al. 2006).

4.4.1 Le ciblage de l'endothélium vasculaire tumoral

Le ciblage spécifique des cellules endothéliales tumorales pourrait contribuer à contrer l'effet de la cooption vasculaire induite par le traitement anti-angiogénique. Pour ce faire, l'identification de molécules exprimées d'une manière exclusive par ces

cellules endothéliales est nécessaire. L'atteinte des cellules endothéliales tumorales pourrait mener à la thrombose des vaisseaux tumoraux et la nécrose de la tumeur (van Kempen et al. 2006). Actuellement, des anticorps contre des protéines spécifiques exprimées par les cellules endothéliales tumorales sont développés et la difficulté tient au fait que celles-ci doivent être accessibles aux anticorps et qu'elles puissent marquer les vaisseaux en développement et quiescents dans la tumeur. Les molécules étudiées actuellement sont la V-CAM (une molécule d'adhésion cellulaire vasculaire), EDB-FN (une variante de la fibronectine) et $\alpha_v\beta_3$ intégrine (van Kempen et al. 2006). Le phénotype de cooption pose un problème de taille car très peu est connu sur la façon de le différencier des vaisseaux normaux de l'hôte. Arap et al. ont suggéré que les cellules endothéliales possèderaient une signature protéique spécifique selon leur microenvironnement immédiat (Arap et al. 2004). Il est probable que les facteurs sécrétés par les cellules tumorales ainsi que les différentes molécules d'adhésion puissent affecter les cellules endothéliales et permettre leur identification. De plus amples recherches à ce sujet seront nécessaires.

Chapitre V Conclusion

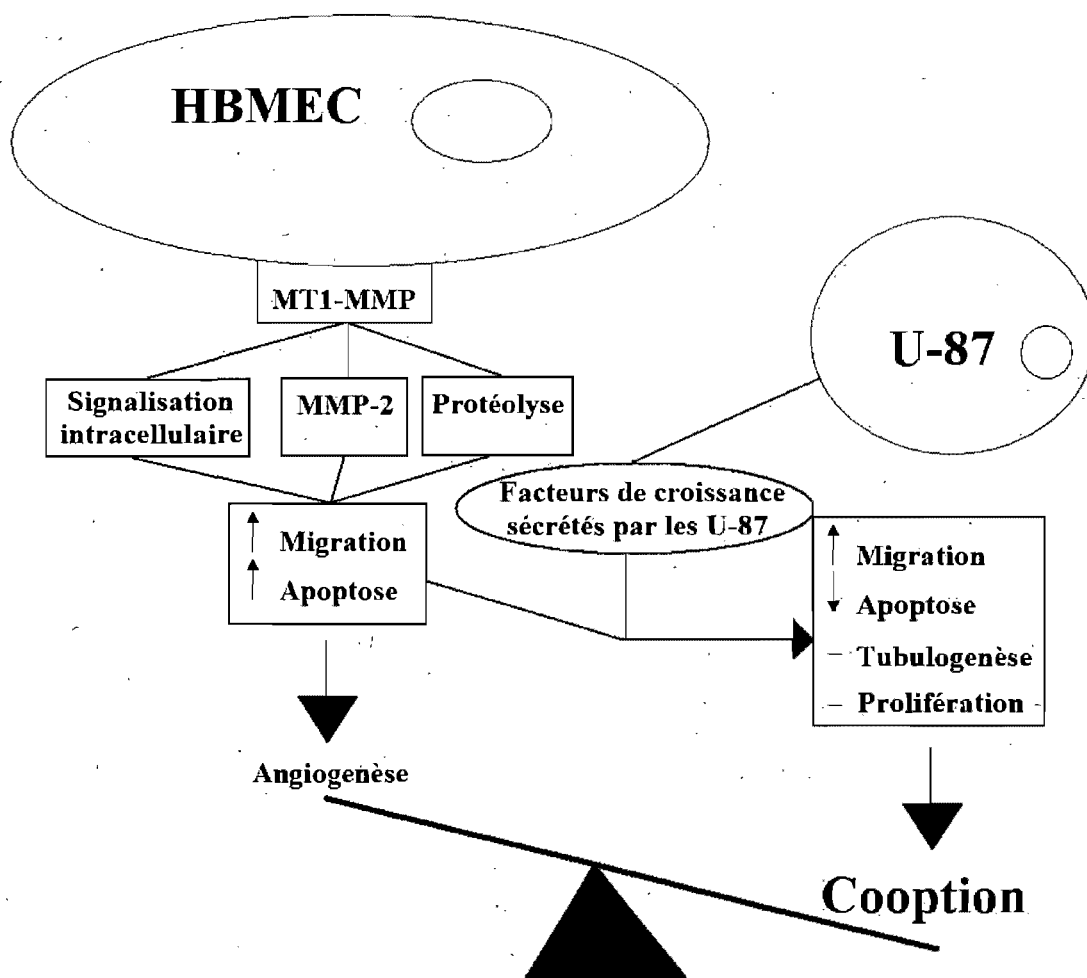
Les GBM sont les tumeurs cérébrales primaires les plus fréquentes et les plus mortelles. Leur traitement actuel n'est pas curatif et vise la prolongation de la qualité de vie des malades. La combinaison de chirurgie de résection macroscopique complète, radiothérapie et chimiothérapie au témozolomide est présentement la meilleure arme à notre disposition. Depuis quelques années, les avancements dans le domaine de la médecine moléculaire ont permis de mieux comprendre la pathogenèse de ces tumeurs et l'importance des interactions entre les cellules tumorales, les cellules endothéliales et leur microenvironnement immédiat. En effet, le réseau vasculaire de ces tumeurs dépend non seulement de l'angiogenèse, mais aussi de l'utilisation de la vascularisation de l'hôte, un processus nommé cooption vasculaire. Les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales sont des acteurs clés dans ces phénomènes et leur phénotype particulier les différencie des autres cellules endothéliales systémiques. C'est pour cette raison que nous avons étudié les interactions entre facteurs de croissance sécrétés par les cellules de glioblastomes et les cellules microvasculaires cérébrales humaines.

In vitro, l'étude des cellules HBMEC démontre que l'exposition au milieu conditionné par les cellules tumorales U-87 offre une protection partielle contre l'apoptose cellulaire induite par MT1-MMP, augmente la migration cellulaire et affecte peu leur prolifération et la tubulogenèse des cellules HBMEC transfectées avec MT1-MMP et MT1-MMP Δ -cyto. Dans l'ensemble, les résultats observés pourraient être en faveur d'un phénotype de cooption qui est possiblement soutenu par l'exposition des cellules endothéliales cérébrales normales aux facteurs de croissance sécrétés par les GBM. MT1-MMP pourrait avoir un rôle dans ce phénotype en raison de ses interactions privilégiées avec les cellules endothéliales, la

MEC et les cellules tumorales. Les résultats obtenus dans cette étude permettent de mettre en évidence toute la complexité des interactions entre les cellules tumorales, les cellules endothéliales et la MEC. Les mécanismes moléculaires régissant les effets cellulaires observés dans cette étude devront être mieux caractérisés et pourront éventuellement servir au développement de nouvelles cibles thérapeutiques. Il serait intéressant de développer un modèle *in vitro* basé sur la co-culture de cellules endothéliales et de cellules de GBM. Un modèle comme celui-ci pourrait reproduire plus précisément les interactions entre les cellules endothéliales et les cellules néoplasiques cérébrales.

Malgré les résultats contradictoires obtenus lors des études animales pré-cliniques et les études cliniques, les traitements anti-angiogéniques sont très prometteurs pour le traitement des GBM. Une meilleure caractérisation des vaisseaux ayant subi la cooption vasculaire et la possibilité d'identifier précisément les cellules endothéliales tumorales par des marqueurs moléculaires pourraient sans doute permettre une meilleure réponse clinique. De plus, l'association de différentes cibles moléculaires avec des traitements de radiothérapie et de chimiothérapie sont actuellement en cours. La recherche dans ce domaine est encore nécessaire pour être en mesure de mieux comprendre les mécanismes qui régissent la croissance des GBM pour ainsi développer des cibles moléculaires plus précises qui pourront retarder ou arrêter leur progression.

Fig. 5. Schéma résumé du modèle de cooption proposé



Légende :

Les cellules HBMEC exposées aux facteurs de croissance sécrétés par les cellules tumorales U-87 semblent acquérir un phénotype de cooption vasculaire. Cette exposition entraîne chez les cellules HBMEC une migration augmentée, une apoptose diminuée tout en ayant peu d'effet sur la prolifération cellulaire et la tubulogenèse. Ceci pourrait faire pencher la balance vers un phénotype de cooption plutôt que vers l'angiogenèse. La surexpression de MT1-MMP par les cellules endothéliales pourrait quant à elle favoriser l'angiogenèse. L'effet des facteurs de croissance sécrétés par les

cellules tumorales cérébrales pourrait favoriser ce phénotype de cooption en inhibant certaines fonctions de MT1-MMP.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbott, N. *Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability*. Journal of anatomy., 200, 6, 629-638, 2002.
- Abbott NJ, Ronnback L., Hansson E. *Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier*. Nature reviews: Neurosciences., 7, 1, 41-53, 2006.
- Abramsson A, Berlin O., Papayan H, Paulin D, Shani M, Betsholtz C. *Analysis of mural cell recruitment to tumor vessels*. Circulation., 105, 1, 112-117, 2002.
- Alessandri G, Chirivi R., Fiorentini S, Dossi R et al. *Phenotypic and functional characteristics of tumour-derived microvascular endothelial cells*. Clinical & experimental metastasis., 17,8, 655-662, 1999.
- Algire GH, Chalkley H., Legallais FY, Park HD. *Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo*. The Journal of National Cancer Institute., 6, 73-85, 1945.
- Ammirati M, Vick N., Liao YL, Ciric I et al. *Effect of the extent of surgical resection on survival and quality of life in patients with supratentorial glioblastomas and anaplastic astrocytomas*. Neurosurgery., 21, 2, 201-206, 1987.
- Annabi B, Lachambre M., Bousquet-Gagnon N, Page M, et al. *Localization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in caveolae membrane domains*. The Biochemical Journal., 353, 3, 547-553, 2001.

- Annabi B, Lee Y., Martel C, Pilorget A, et al. *Radiation induced-tubulogenesis in endothelial cells is antagonized by the antiangiogenic properties of green tea polyphenol (-) epigallocatechin-3-gallate*. *Cancer biology and therapy.*, 2, 6, 642-649, 2003.
- Artigas J, Cervos-Navarro J., Iglesias JR, Ebhardt G. *Gliomatosis cerebri: clinical and histological findings*. *Clinical neuropathology.*, 4, 4, 135-148, 1985.
- Asahara T, Masuda H., Takahashi T, Kalka C et al. *Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization*. *Circulation research.*, 85, 3, 221-228, 1999.
- Ashby LS, Ricken. T. *Management of malignant glioma: steady progress with multimodal approaches*. *Neurosurgical Focus.*, 20, 4, E3, 2006.
- Ashkenazi A, Dixit V. *Death receptors: signaling and modulation*. *Science.*, 281, 5381, 1305-1308, 1998.
- Auguste P, Gursel D., Lemiere S, Reimers D, et al. *Inhibition of fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor activity in glioma cells impedes tumor growth by both angiogenesis-dependent and -independent mechanisms*. *Cancer research.*, 61, 4, 1717-1726, 2001.
- Auguste P, Lemiere S., Larrieu-Lahargue F, Bikfalvi A., et al. *Molecular mechanisms of tumor vascularization*. *Critical reviews in Oncology / Hematology.*, 54, 1, 53-61, 2005.

- Ausprunk DH, Folkman J. *Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis.* Microvascular research 14, 1, 53-65, 1977.
- Avgeropoulos NG, Bachelor T. *New treatment strategies for malignant gliomas.* The Oncologist., 4, 3, 209-224, 1999.
- Ballabh P, Brun A., Nedergaard M. *The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications.* Neurobiology of diseases., 16, 1, 1-13, 2004.
- Banachlocha MA. *Neuromagnetic dialogue between neuronal minicolumns and astroglial network: a new approach for memory and cerebral computation.* Brain Res Bull., 73(1-3), 21-27, 2007.
- Banachlocha MA. *Architectural organisation of neuronal activity associated magnetic fields: a hypothesis for memory.* Med Hypotheses, 63, 3, 481-484, 2004.
- Bates RC, Buret A., van Helden DF, Horton MA, et al. *Apoptosis induced by inhibition of intercellular contact.* The journal of cell biology., 125, 2, 403-415, 1994.
- Belkaid A, Fortier S., Jian Cao et al. *Necrosis induction in glioblastoma cells reveals a new "bioswitch" function for the MT1-MMP/G6PT signaling axis in proMMP-2 activation versus cell death decision.* Neoplasia 9:4: 332-340, 2007.
- Bellail AC, Hunter S., Brat DJ, Tan C, et al. *Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion.* The international journal of biochemistry & cell biology., 36, 6, 1046-1069, 2004.

- Benjamin LE, Golijamin D., Itin A, Podes D, et al. *Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal.* The Journal of clinical investigation., 103, 2, 159-165, 1999.
- Bergers G, Brekken R., McMahon G, Vu TH, et al. *Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis.* Nature Cell Biology., 2, 10, 737-744, 2000.
- Bernsen H, Van der Lac J., Kusters B, Van der Ven A, et al. *Gliomatosis cerebri: quantitative proof of vessel recruitment by cooptation instead of angiogenesis.* Journal of neurosurgery., 103, 4, 702-706, 2005.
- Bian C, Zhao K., Tong GX, Zhu YL, Chen P. *Immortalization of human umbilical vein endothelial cells with telomerase reverse transcriptase and simian virus 40 large T antigen.* Journal of Zhejiang University. Science. B., 6, 7, 631-636, 2005.
- Bian XW, Jiang X., Chen JH, Bai JS, Dai C, et al. *Increased angiogenic capabilities of endothelial cells from microvessels of malignant human gliomas.* International immunopharmacology., 6, 1, 90-99, 2006.
- Bittner M, Meltzer P., Chen Y, Jiang Y, et al. *Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling.* Nature., 406, 6795, 536-540, 2003.
- Bouis D, Hospers G., Meijer C, Molema G, et al. *Endothelium in vitro: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research.* Angiogenesis., 4, 2, 91-102, 2001.

- Brem H, Piantadosi S., Burger PC, Walker M, et al. *Placebo-controlled trial of safety and efficacy of intraoperative controlled delivery by biodegradable polymers of chemotherapy for recurrent gliomas. The Polymer-brain Tumor Treatment Group.* Lancet., 345, 8956, 1008-1012, 1995.
- Brem, S. *Angiogenesis and brain tumors* In: Youmans Neurological Surgery. Philadelphia Saunders., 2003.
- Brighton CT, Lorich D., Kupcha R, Reilly TM, et al. *The pericyte as a possible osteoblast progenitor cell.* Clinical orthopaedics and relative research., 275, 287-289, 1992.
- Brockmann MA, Ulbricht U., Gruner K, Fillbrandt R, et al. *Glioblastoma and cerebral microvascular endothelial cell migration in response to tumor-associated growth factors.* Neurosurgery., 52, 6, 1391-1399, 2003.
- Burri PH, Hulshchuk R., Djonov V. *Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance.* Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists., 231, 3, 474-488, 2004.
- Bussolati B, DREAMBROSIS I., Russo S, Deregibus MC, et al. *Altered angiogenesis and survival in human tumor-derived endothelial cells.* The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology., 17, 9, 1159-1163, 2003.
- Carmeliet, P. *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis.* Nature Medicine., 6, 4, 389-395, 2000.
- Chamberlain MC, Kormanik. P. *Practical guidelines for the treatment of malignant gliomas.* The Western journal of medicine., 168, 2, 114-120, 1998.

- Chang YS, di-Tomaso. E., McDonald DM, Jones R, Jain RK, et al. *Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America., 97, 26, 14608-14613, 2000.
- Charalambous C, Chen T., Hofman FM. *Characteristics of tumor-associated endothelial cells derived from glioblastoma multiforme*. Neurosurgery Focus., 20, 4, E22, 2006.
- Charalambous C, Hofman F., Chen TC. *Functional and phenotypic differences between glioblastoma multiforme-derived and normal human brain endothelial cells*. Journal of neurosurgery., 102, 4, 699-705, 2005.
- Choi ME, Ballermann B. *Inhibition of capillary morphogenesis and associated apoptosis by dominant negative mutant transforming growth factor-beta receptors*. Journal of biological chemistry., 270, 36, 21144-21150, 1995.
- Connolly DT, Heuvelman DM., Nelson R, Olander JV, et al. *Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis*. The Journal of clinical investigation., 84, 5, 1470-1478, 1989.
- Davidoff AM, Ng C., Brown P, Leary MA, et al. *Bone marrow-derived cells contribute to tumor neovasculature and, when modified to express an angiogenesis inhibitor, can restrict tumor growth in mice*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research., 7, 9, 2870-2879, 2001.
- Davis FG, McCarthy. B., Freels S, Kupelian V, et al. *The conditional probability of survival of patients with primary malignant brain tumors:*

surveillance, epidemiology, and end results (SEER) data. Cancer., 85, 2, 485-491, 1999.

- de Vries HE, Blom-Rosenmalen. M., van Oosten M, de Boer AG, et al. *The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier in vitro.* Journal of neuroimmunology., 64, 1, 37-43, 1996.
- Dehdashti AR, Hegi M., Regli L, Pica A, et al. *New trends in the medical management of glioblastoma multiforme: the role of temozolomide chemotherapy.* Neurosurgical Focus., 20, 4, E6, 2006.
- Dickson MC, Martin J., Cousins FM, Kulkarni AB, et al. *Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice.* Development., 121, 6, 1845-1854, 1995.
- Djonov V, Baum O., Burri PH. *Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis.* Cell tissue research., 314, 1, 107-117, 2003.
- Djonov VG, Kurz H., Burri PH. *Optimality in the developing vascular system: branching remodeling by means of intussusception as an efficient adaptation mechanism.* Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists., 224, 4, 391-402, 2002.
- Dumont DJ, Gradwohl G., Fong GH, Puri MC, et al. *Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo.* Genes and development., 8, 16, 1897-1909, 1994.
- Dumont DJ, Yamaguchi T., Conlon RA, Rossant J, et al. *tek, a novel tyrosine kinase gene located on mouse chromosome 4, is expressed in endothelial cells and their presumptive precursors.* Oncogene., 7, 8, 1471-1480, 1992.

- Duval H, Harris M., Li J, Johnson N, Print C. *New insights into the function and regulation of endothelial cell apoptosis*. *Angiogenesis.*, 6, 3, 171-183, 2003.
- Dvorak, H. *Angiogenesis: update 2005*. *Journal of thrombosis and haemostasis.*, 3, 8, 1835-1842, 2005.
- Dvorak HF, Brown L., Detmar M, Dvorak AM. *Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis*. *The American journal of pathology.*, 146, 5, 1029-1039, 1995,
- Edinger AL, Thompson C. *Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy*. *Current opinion in cell biology.*, 16, 6, 663-669, 2004.
- Egeblad M, Werb Z. *New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression*. *Nature Review. Cancer.*, 2, 3, 161-174, 2002.
- Epstein F, Wisoff J. *Intra-axial tumors of the cervicomedullary junction*. *Journal of neurosurgery.*, 67, 4, 483-487, 1987.
- Fabbro D, Parkinson D., Matter A. *Protein tyrosine kinase inhibitors: new treatment modalities?* *Current opinion in pharmacology.*, 2, 4, 374-378, 1998.
- Feng D, Nagy J., Hipp J, Dvorak HF, et al. *Vesiculo-vacuolar organelles and the regulation of venule permeability to macromolecules by vascular permeability factor, histamine, and serotonin*. *The Journal of Experimental Medicine.*, 183, 5, 1981-1986, 1996.

- Feng D, Nagy J., Pyne K, Hammel I, et al. *Pathways of macromolecular extravasation across microvascular endothelium in response to VPF/VEGF and other vasoactive mediators*. *Microcirculation.*, 6, 1, 23-44, 1999.
- Fischer I, Gagner J., Law M, Newcomb EW, et al. *Angiogenesis in gliomas: biology and molecular pathophysiology*. *Brain Pathology.*, 15, 4, 297-310, 2005.
- Fiveash JB, Spencer S. *Role of radiation therapy and radiosurgery in glioblastoma multiforme*. *Cancer Journal.*, 9, 3, 222-229, 2003.
- Flamme I, Breier G., Risau W. *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor 2 (flk-1) are expressed during vasculogenesis and vascular differentiation in the quail embryo*. *Developmental biology.*, 169, 2, 699-712, 1995.
- Folberg R, Hendrix M., Maniotis AJ. *Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis*. *The American journal of pathology.*, 156, 2, 361-381, 2000.
- Folberg R, Maniotis A. *Vasculogenic mimicry*. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica.*, 112, 7-8, 508-525, 2004.
- Folkman, J. *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*. *The New England journal of medicine.*, 285, 21, 1182-1186, 1971.
- Folkman, J. *What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?* *Journal of National Cancer Institute.*, 82, 1, 4-6, 1990.
- Folkman, J. *Tumor angiogenesis*. Philadelphia, WB Saunders., 1995.

- Folkman, J. *Can mosaic tumor vessels facilitate molecular diagnosis of cancer*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America., 98, 2, 398-400, 2001.
- Gabayan AJ, Green S., Sanan A, Jenrette J, et al. *GliaSite brachytherapy for treatment of recurrent malignant gliomas: a retrospective multi-institutional analysis*. Neurosurgery., 58, 4, 701-709, 2006.
- Gale NW, Yancopoulos G. *Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development*. Genes and development., 13, 9, 1055-1066, 1999.
- Galvez BG, Matias-Roman S., Albar JP, Sanchez-Madrid F, et al. *Membrane type 1-matrix metalloproteinase is activated during migration of human endothelial cells and modulates endothelial motility and matrix remodeling*. The Journal of biological chemistry 276, 40, 37491-37500, 2001.
- Geng YJ, Wu Q., Muszynski M, Hansson GK, et al. *Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by in vitro stimulation with interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1 beta*. Atherosclerosis, thrombosis and vascular biology., 16, 1, 19-27, 1996.
- Gerhardt H, Betsholtz C. *How do endothelial cells orientate?* EXS., 94, 3-15, 2003.
- Gerhardt H, Golding M., Fruttiger M, Ruhrberg C, et al. *VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia*. The journal of cell biology., 161, 6, 1163-1177, 2005.

- Gille H, Kowalski J., Li B, LeCouter J, Moffat B, et al. *Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants.* The Journal of biological chemistry., 276, 5, 3222-3230, 2001.
- Gingras D, Pagé M., Annabi B et al. *Rapid activation of matrix metalloproteinase-2 by glioma cells occurs through a posttranslational MT1-MMP-dependent mechanism.* Biochimica et biophysica acta 1497:3: 341-350, 2000.
- Gladson, C. *The extracellular matrix of gliomas: modulation of cell function.* Journal of neuropathology and experimental neurology., 58, 10, 1029-1040, 1999.
- Green DR, Reed J. *Mitochondria and apoptosis.* Science., 281, 5381, 1309-1312, 1998.
- Greiffenberg L, Goebel W., Kim KS, Weiglein I, et al. *Interaction of Listeria monocytogenes with human brain microvascular endothelial cells: InlB-dependent invasion, long-term intracellular growth, and spread from macrophages to endothelial cells.* Infection and immunity., 66, 11, 5260-5270, 1998.
- Grimsley C, Ravichandran K. *Cues for apoptotic cell engulfment: eat-me, don't eat-me and come-get-me signals.* Trends in cell biology., 13, 12, 648-656, 2003.
- Glioma Meta-Analysis Trialists Group . T. G. *Chemotherapy for high-grade glioma.* Cochrane database of systematic reviews (Online) 4, CD003913, 2002.

- Gupta MK, Qin R. *Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis*. World Journal of Gastroenterology: WJG., 9, 6, 1144-1155, 2003.
- Haas, T. L. *Endothelial cell regulation of matrix metalloproteinases*. Canadian Journal of physiology and pharmacology., 83, 1, 1-7, 2005.
- Hamel W, Westphal M. *Growth factors in gliomas revisited*. Acta Neurochirurgica., 142, 2, 113-137, 2000.
- Hanahan D, Folkman J. *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis*. Cell., 86, 3, 353-364, 1996.
- Handsley MM, Edwards D. *Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis*. International journal of cancer. Journal international du cancer., 115, 6, 849-860, 2005.
- Hatva E, Kaipainen A., Mentula P, Jaaskelainen J, et al. *Expression of endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases and growth factors in human brain tumors*. American Journal of Pathology., 146, 2, 368-378, 1995.
- Heissig B, Hattori K., Friedrich M, Rafii S, et al. *Angiogenesis: vascular remodeling of the extracellular matrix involves metalloproteinases*. Current opinion in hematology., 10, 2, 136-141, 2003.
- Hendrix MJ, Seftor E., Hess AR, Seftor RE. *Molecular plasticity of human melanoma cells*. Oncogene., 22, 20, 3070-3075, 2003.

- Hess AR, Seftor E., Gardner LM, Carles-Kinch K, et al. *Molecular regulation of tumor cell vasculogenic mimicry by tyrosine phosphorylation: role of epithelial cell kinase (Eck/EphA2)*. *Cancer research.*, 61, 8, 3250-3255, 2001.
- Hess AR, Seftor E., Gruman LM, Kinch MS, et al. *VE-cadherin regulates EphA2 in aggressive melanoma cells through a novel signaling pathway: implications for vasculogenic mimicry*. *Cancer biology and therapy.*, 5, 2, 228-233, 2006.
- Hinoue A, Takigawa T., Miura T, et al. *Disruption of actin cytoskeleton and anchorage-dependent cell spreading induces apoptotic death of mouse neural crest cells cultured in vitro*. *The anatomical record* 282:2:130-137, 2005.
- Hiraoka N, Allen. E., Apel IJ, Gyetko MR, et al. *Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins*. *Cell.*, 95, 3, 365-377, 1998.
- Hirschi KK, D'Amore A. P. *Pericytes in the microvasculature*. *Cadiovascular research.*, 32, 4, 687-698, 1996.
- Holash J, Maisonneuve. P., Compton D, Boland P, et al. *Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF*. *Science.*, 284, 5422, 1994-1998, 1999.
- Holash J, Wiegand S., Yancopoulos GD. *New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF*. *Oncogene.*, 18, 38, 5356-5362, 1999.
- Holmbeck K, Bianco P., Chrysovergis K, Yamada S, et al. *MT1-MMP-dependent, apoptotic remodeling of unmineralized cartilage: a critical*

process in skeletal growth. The journal of cell biology., 163, 3, 661-671, 2003.

- Holmgren L, O'Reilly R. M., Folkman J. *Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression*. Nature Medicine., 1, 2, 149-153, 1995.
- Ilan N, Mahooti S., Madri JA. *Distinct signal transduction pathways are utilized during the tube formation and survival phases of in vitro angiogenesis*. Journal of cell science 111:24::3621-3631, 1998.
- Inai T, Mancuso M., Hashizume H, Baffert F, et al. *Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in cancer causes loss of endothelial fenestrations, regression of tumor vessels, and appearance of basement membrane ghosts*. The American journal of pathology., 165, 1, 35-52, 2004.
- Jain, R. *Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy*. Nature Medicine., 7, 9, 987-989, 2001.
- Jansen M, de Witt Hamer P., Witmer AN, Troost D, van Noorden CJ. *Current perspectives on antiangiogenesis strategies in the treatment of malignant gliomas*. Brain research. Brain research reviews., 45, 3, 143-163, 2004.
- Kalluri, R. *Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis*. Nature Review. Cancer., 3, 6, 422-433, 2003.
- Kandel Eric R. , Schwartz. J. H., Thomas M. Jessell et al. *Principles of neural science*, McGraw-Hill, 2000.

- Keles GE, Anderson B., Berger MS. *The effect of extent of resection on time to tumor progression and survival in patients with glioblastoma multiforme of the cerebral hemisphere.* Surgical Neurology., 52, 4, 371-379, 1999.
- Keles GE, Anderson B., Berger MS. *The effect of extent of resection on time to tumor progression and survival in patients with glioblastoma multiforme of the cerebral hemisphere.* Surgical Neurology., 52, 4, 371-379, 1999.
- Kelly KA, Kikwood J., Kapp DS. *Glioblastoma multiforme: pathology, natural history and treatment.* Cancer treatment reviews., 11, 1, 1-26, 1984.
- Kesari S, Ramakrishna N., Sauvageot C, Stiles CD, et al. *Targeted molecular therapy of malignant gliomas.* Current oncology reports., 8, 1, 58-70, 2006.
- Keyt BA, Nguyen H., Berleau LT, Duarte CM, et al. *Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis.* The Journal of biological chemistry., 271, 10, 5638-5646, 1996.
- Kim ES, Serur A., Huang J, Manley CA, et al. *Potent VEGF blockade causes regression of coopted vessels in a model of neuroblastoma.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America., 99, 17, 11399-11404, 2002.
- Kim KJ, Li B., Winer J, Armanini M, et al. *Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo.* Nature., 362, 6423, 841-844, 1993.
- Kniesel U, Wolburg H. *Tight junctions of the blood-brain barrier.* Cellular and molecular neurobiology., 20, 1, 57-76, 2000.

- Krishnamachary B, Berg-Dixon S., Kelly B, Agani F, et al. *Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1*. Cancer research., 63, 5, 1138-1143, 2003.
- Kunkel P, Ulbrich U., Bohlen P, Brockmann MA, et al. *Inhibition of glioma angiogenesis and growth in vivo by systemic treatment with a monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor receptor-2*. Cancer research., 61, 18, 6624-6628, 2001.
- Lacroix M, Abi-Said D., Fourney DR, Gokaslan ZL et al. *A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival*. Journal of Neurosurgery., 95, 2, 190-198, 2001.
- Lafleur MA, Handsley M., Knauper V, et al. *Endothelial tubulogenesis within fibrin gels specifically requires the activity of membrane-type-matrix metalloproteinases (MT-MMPs)*. Journal of cell science 115:17:3427-3438, 2002.
- Laird AD, Vajkoczy P., Shawver LK, Thurnher A, et al. *SU6668 is a potent antiangiogenic and antitumor agent that induces regression of established tumors*. Cancer research., 60, 15, 4152-4160, 2000.
- Lamszus K, Kunkel P., Westphal M. *Invasion as limitation to anti-angiogenic glioma therapy*. Acta Neurochirurgica Supplement., 88, 169-177, 2003.
- Lamszus K, Laterra J., Westphal M, Rosen EM. *Scatter factor/hepatocyte growth factor (SF/HGF) content and function in human gliomas*. International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience., 17, 5-6, 517-530, 1999.

- Langlois S, Gingras D., Béliveau R. *Membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) cooperates with sphingosine 1-phosphate to induce endothelial cell migration and morphogenic differentiation.* Blood 103:8: 3020-3028, 2004.
- Langlois S, Di-Tomasso G., Boivin D, Roghi C, et al. *Membrane type 1-matrix metalloproteinase induces endothelial cell morphogenic differentiation by a caspase-dependent mechanism.* Experimental cell research., 307, 2, 252-264, 2005.
- Laperriere N, Zurra L., Cairncross G; Cancer Care Ontario Practice Guidelines Initiative Neuro-Oncology Disease Site Group. *Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review.* Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology., 64, 3, 259-273, 2002.
- Lee MH, Murphy G. *Matrix metalloproteinases at a glance.* The Journal of cell science., 117, Pt 18, 4015-4016, 2004.
- Lee SW, Kim W., Park JA, Choi YK, et al. *Blood-brain barrier interfaces and brain tumors.* Archives of Pharmacal research., 29, 4, 265-275, 2006.
- Leenders WP, Kusters B., de Waal RM. *Vessel co-option: how tumors obtain blood supply in the absence of sprouting angiogenesis.* Endothelium., 9, 2, 83-87, 2002.
- Leenders WP, Kusters B., Verrijp K, Maass C, et al. *Antiangiogenic therapy of cerebral melanoma metastases results in sustained tumor progression via vessel co-option.* Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research., 10, 18, 6222-6230, 2004.

- Li PF, Dietzs R., von Harsdorf R. *Reactive oxygen species induce apoptosis of vascular smooth muscle cell* .FEBS letters., 404, 2-3, 249-252, 1997.
- Liebner S, Fishmann A., Rascher G, Duffner F, et al. *Claudin-1 and claudin-5 expression and tight junction morphology are altered in blood vessels of human glioblastoma multiforme*. Acta neuropathologica., 100, 3, 323-331, 2000.
- Lindahl P, Johansson. B., Leyeen P, Betsholtz C. *Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice*. Science., 277, 5323, 242-245, 1997.
- Lu X, Le Noble F., Yuan L, Jiang Q, et al. *The netrin receptor UNC5B mediates guidance events controlling morphogenesis of the vascular system*. Nature., 434, 714, 179-186, 2004.
- Luo XH, Liao E., Liao HJ, Jin Y, et al. *Recombinant matrix metalloproteinase-14 catalytic domain induces apoptosis in human osteoblastic SaOS-2 cells*. Journal of endocrinological investigation., 26, 11, 1111-1114, 2003.
- Lyden D, Hattori K., Dias S, Costa C et al. *Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth*. Nature Medicine 7, 11, 1191-2001, 2001.
- Madajewicz S, Chowhan N., Tfayli A, Roque C et al. *Therapy for patients with high grade astrocytoma using intraarterial chemotherapy and radiation therapy*. Cancer 88, 10, 2350-2356, 2000.

- Mahaley MS Jr, Mettlin C., Natarajan N, Laws ER Jr, et al. *National survey of patterns of care for brain-tumor patients*. Journal of Neurosurgery 71, 6, 826-836, 1989.
- Maisonpierre PC, Suri C., Jones PF, Bartunkova S et al. *Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis*. Science 277, 5322, 55-60, 1997.
- Mancuso MR, Davis R., Norberg SM, O'Brien S et al. *Rapid vascular regrowth in tumors after reversal of VEGF inhibition*. The Journal of clinical investigation 116, 10, 2610-2621, 2006.
- Maniotis AJ, Folberg R., Hess A, Seftor EA et al. *Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry*. The American journal of pathology 155, 3, 739-752, 1999.
- Mato M, Oakawara S., Kurihara K. *Uptake of exogenous substances and marked infoldings of the fluorescent granular pericyte in cerebral fine vessels*. The American Journal of Anatomy 157, 3, 329-332, 1980.
- Maxwell DS, Kruger L. *Small blood vessels and the origin of phagocytes in the rat cerebral cortex following heavy particle irradiation*. Experimental Neurology 12, 33-54, 1965.
- McCawley LJ, Matrisian L. *Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore!* Current opinion in cell biology 13, 5, 534-540, 2001.
- Meredith JE Jr, Fazeli B., Schwartz MA. *"The extracellular matrix as a cell survival factor*. Molecular biology of the cell 4, 9, 953-961, 1993.

- Meyer GT, Matthias L., Noack L, et al. *Lumen formation during angiogenesis in vitro involves phagocytic activity, formation and secretion of vacuoles, cell death, and capillary tube remodelling by different populations of endothelial cells.* The anatomical record 249:3: 327-340, 1997.
- Miebach S, Grau S., Hummel V, Rieckmann P et al. *Isolation and culture of microvascular endothelial cells from gliomas of different WHO grades.* Journal of Neuro-oncology 76, 1, 39-48, 2006.
- Mineo JF, B. A., Baroncini M, Ramirez C et al. *Prognosis factors of survival time in patients with glioblastoma multiforme: a multivariate analysis of 340 patients.* Acta Neurochirurgica: [Epub ahead of print], 2007.
- Moore, M. *Putting the neo into neoangiogenesis.* The Journal of clinical investigation 109, 3, 313-318, 2002.
- Morikawa S, Bordron P., Kaidoh T, Haskell A et al. *Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors.* The American journal of pathology 160, 3, 985-1000, 2002.
- Nagase H, Woessner J. J. *Matrix metalloproteinases.* The Journal of biological chemistry 274, 31, 21491-21494, 1999.
- Nagata, S. *Fas ligand-induced apoptosis.* Annual review of genetics 33, 29-55, 1999.
- Newlands ES, Stevens. M., Wedge SR, Wheelhouse RT et al. *Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials.* Cancer treatment reviews 23, 1, 35-61, 1997.
- Novak, K. *Angiogenesis inhibitors revised and revived at AACR.* American Association for Cancer Research. Nature Medicine 8, 5, 427, 2002.

- Nutt CL, Matthews R., Hockfield S. *Glial tumor invasion: a role for the upregulation and cleavage of BEHAB/brevican*. The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry 7, 2, 113-122, 2001.
- Ohuchi E, Imai K., Fujii Y, Sato H et al. *Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules*. The Journal of biological chemistry 272, 4, 2446-2451, 1997.
- Osenkowski P, Toth M., Fridman R. *Processing, shedding, and endocytosis of membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP)*. Journal of cellular physiology 200, 1, 2-10, 2004.
- Paoletti, P. *Therapeutic strategy for central nervous system tumors: present status, criticism and potential*. Journal of neurosurgical sciences 28, 2, 51-60, 1984.
- Papadopoulos MC, Saadoun S., Woodrow CJ, Davies DC et al. *Occludin expression in microvessels of neoplastic and non-neoplastic human brain*. Neuropathology and applied neurobiology 27, 5, 384-391, 2001.
- Papapetropoulos A, Garcia.-Cardera G., Dengler TJ, Maisonpierre PC et al. *Direct actions of angiopoietin-1 on human endothelium: evidence for network stabilization, cell survival, and interaction with other angiogenic growth factors*. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology 79, 2, 213-223, 1999.
- Parlato C, Barbarisi M., Moraci M, Moraci A. *Surgery, radiotherapy and temozolomide in treating high-grade gliomas*. Frontiers in bioscience : a journal and virtual library 1, 11, 1280-1283, 2006.

- Passalidou E, Trivella M., Singh N, Ferguson M, et al. *Vascular phenotype in angiogenic and non-angiogenic lung non-small cell carcinomas*. British Journal of cancer 86, 2, 244-249, 2002.
- Patan S, Munn L., Jain RK. *Intussusceptive microvascular growth in a human colon adenocarcinoma xenograft: a novel mechanism of tumor angiogenesis*. Microvascular research 55, 2, 260-272, 1996.
- Patan S, Munn L., Tãnda S, Roberge S et al. *Vascular morphogenesis and remodeling in a model of tissue repair: blood vessel formation and growth in the ovarian pedicle after ovariectomy*. Circulation research 89, 8, 723-731, 2001.
- Patan S, Tãnda S., Roberge S, Jones RC et al. *Vascular morphogenesis and remodeling in a human tumor xenograft: blood vessel formation and growth after ovariectomy and tumor implantation*. Circulation research 89, 8, 232-239, 2001.
- Paulus W, Baur. I., Dours-Zimmermann MT, Zimmermann DR. *Differential expression of versican isoforms in brain tumors*. Journal of neuropathology and experimental neurology 55, 5, 528-533, 1996.
- Pei D, Weiss S. *Transmembrane-deletion mutants of the membrane-type matrix metalloproteinase-1 process progelatinase A and express intrinsic matrix-degrading activity*. The Journal of biological chemistry 271, 15, 9135-9140, 1996.
- Pepper MS, Belin D., Montesano R, Orci L et al. *Transforming growth factor-beta 1 modulates basic fibroblast growth factor-induced proteolytic and*

angiogenic properties of endothelial cells in vitro. The journal of cell biology 111, 1, 743-755, 1990.

- Pepper MS, Sappino A., Montesano R, Orci L et al. *Plasminogen activator inhibitor-1 is induced in migrating endothelial cells*. Journal of cell physiology 123, 1, 129-139, 1992.
- Peters K, Troyer D., Kummer S, Kirkpatrick CJ et al. *Apoptosis causes lumen formation during angiogenesis in vitro*. Microvascular research 64, 2, 334-338, 2002.
- Pezzella F, Pastorino U., Tagliabue E, Andreola S et al. *Non-small-cell lung carcinoma tumor growth without morphological evidence of neo-angiogenesis journal of pathology*. The American journal of pathology 151, 5, 1417-1423, 1997.
- Pilorget A, Annabi B., Bouzeghrane F, et al. *Inhibition of angiogenic properties of brain endothelial cells by platelet-derived sphingosine-1-phosphate*. Journal of cerebral blood flow and metabolism 25:9: 1171-1782, 2005.
- Plate KH, Breier G., Weich HA, Risau W. *Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo*. Nature 359, 6398, 845-848, 1992.
- Plate KH, Breier G., Risau W. *Molecular mechanisms of developmental and tumor angiogenesis*. Brain Pathology 4, 3, 207-118, 1994.
- Plate KH, Risau W. *Angiogenesis in malignant gliomas*. Glia 15(3): 339-347, 1995.

- Plouet J, Schilling J., Gospodarowicz D. *Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells.* The EMBO Journal 8, 12, 3801-3806, 1989.
- Preaux AM, D'ortho. o. M., Bralet MP, Laperche Y et al. *Apoptosis of human hepatic myofibroblasts promotes activation of matrix metalloproteinase-2.* Hepatology 36, 3, 615-622, 2002.
- Prewett M, Huber J., Li Y, Santiago A, O'Connor W et al. *Antivascular endothelial growth factor receptor (fetal liver kinase 1) monoclonal antibody inhibits tumor angiogenesis and growth of several mouse and human tumors.* Cancer research 59, 20, 5209-5218, 1999.
- Rabbany SY, Heissig B., Hattori K, Rafii S. *Molecular pathways regulating mobilization of marrow-derived stem cells for tissue revascularization.* Trend in molecular medicine 9, 3, 109-117, 2003.
- Rafii, S. *Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise.* The Journal of clinical investigation 105, 1, 17-19, 2000.
- Rafii S, Heissig B., Hattori K. *Efficient mobilization and recruitment of marrow-derived endothelial and hematopoietic stem cells by adenoviral vectors expressing angiogenic factors.* Gene therapy 9, 10, 631-641, 2002.
- Ravi R, Mookerjee B., Bhujwalla ZM, Sutter CH et al. *Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha.* Genes and development 14, 1, 34-44, 2000.
- Re F, Zanetti A., Sironi M, Polentarutti N, et al. *Inhibition of anchorage-dependent cell spreading triggers apoptosis in cultured human endothelial cells.* The journal of cell biology 127, 2, 537-546, 1994.

- Regina A, Demeule M., Laplante A, Jodoin J et al. *Multidrug resistance in brain tumors: roles of the blood-brain barrier*. Cancer metastasis reviews 20, 1-2, 13-25, 2001.
- Rhodin JA, Fujita H. *Capillary growth in the mesentery of normal young rats. Intravital video and electron microscope analyses*. Journal of submicroscopic cytology and pathology 21, 1, 1-34, 1989.
- Risau W, Drexler H., Mironov V, Smits A et al. *Platelet-derived growth factor is angiogenic in vivo*. Growth factors 7, 4, 261-266, 1992.
- Rosenfeldt HM, Hobson J., Milstien S, Spiegel S. *The sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 is essential for platelet-derived growth factor-induced cell motility*. Biochemical society transaction 26, Pt 6, 836-839, 2001.
- Rubenstein JL, Kim J., Ozawa T, Zhang M et al. *Anti-VEGF antibody treatment of glioblastoma prolongs survival but results in increased vascular cooption*. Neoplasia 2, 4, 306-314, 2000.
- Rundhaug, J. E. *Matrix metalloproteinases and angiogenesis*. The Journal of cellular and molecular medicine 9, 2, 267-285, 2005.
- Ruoslahti, E. *Brain extracellular matrix*. Glycobiology 6, 5, 489-492, 1996.
- Samoto K, Ibezaki K., Ono M, Shono T et al. *Expression of vascular endothelial growth factor and its possible relation with neovascularization in human brain tumors*. Cancer research 55, 5, 1189-1193, 1995.

- Sanchez-Elsner T, Botella L., Velasco B, Corbi A et al. *Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor-beta pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression.* The Journal of biological chemistry 276, 42, 38527-38535, 2001.
- Sathornsumetee S, Rich J. *New approaches to primary brain tumor treatment.* Anticancer drugs 17, 9, 1003-1016, 2006.
- Sato TN, Tosawa Y., Deutsch U, Wolburg-Buchholz K et al. *Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation.* Nature 376, 6535, 70-74, 1995.
- Sawada T, Kato Y., Kobayashi M, Takekekawa Y. *Immunohistochemical study of tight junction-related protein in neovasculature in astrocytic tumor.* Brain tumor pathology 17, 1, 1-6, 2006.
- Schmidt NO, Westphal M., Hagel C, Ergun S et al. *Levels of vascular endothelial growth factor, hepatocyte growth factor/scatter factor and basic fibroblast growth factor in human gliomas and their relation to angiogenesis.* International Journal of Cancer 84, 1, 8-10, 1999.
- Scott JN, Rewcastle N., Brasher PM, Fulton D et al. *Which glioblastoma multiforme patient will become a long-term survivor? A population-based study.* Annals of neurology 46, 2, 183-188, 1999.
- Segura I, Serrano A., De Buitrago GG, Gonzalez MA et al. *Inhibition of programmed cell death impairs in vitro vascular-like structure formation and reduces in vivo angiogenesis.* The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 16, 8, 833-841, 2002.

- Seiki M, Kashikawa N., Yana I. *Role of pericellular proteolysis by membrane-type 1 matrix metalloproteinase in cancer invasion and angiogenesis.* Cancer metastasis reviews 22, 2-3, 129-143, 2003.
- Selker RG, Shapiro. W., Burger P, Blackwood MS et al. *The Brain Tumor Cooperative Group NIH Trial 87-01: a randomized comparison of surgery, external radiotherapy, and carmustine versus surgery, interstitial radiotherapy boost, external radiation therapy, and carmustine.* Neurosurgery 51, 2, 343-355, 2002.
- Senger, D. *Molecular framework for angiogenesis: a complex web of interactions between extravasated plasma proteins and endothelial cell proteins induced by angiogenic cytokines.* The American journal of pathology 149, 1, 1-7, 1996.
- Sharma N, Seftor R., Seftor EA, Gruman LM et al. *Prostatic tumor cell plasticity involves cooperative interactions of distinct phenotypic subpopulations: role in vasculogenic mimicry.* Prostate 50, 3, 189-201, 2002.
- Shibata, S. *Ultrastructure of capillary walls in human brain tumors.* Acta neuropathologica 78, 6, 361-371, 1989.
- Shinoda J, Sakai N., Murase S, Yano H et al. *Selection of eligible patients with supratentorial glioblastoma multiforme for gross total resection.* Journal of Neuro-oncology 52, 2, 161-171, 2001.
- Shirakawa K, Furuhashi S., Watanabe I, Hayase H et al. *Induction of vasculogenesis in breast cancer models.* British Journal of cancer 87, 12, 1454-1461, 2002.

- Simpson JR, Horton J., Scott C, Curran WJ et al. *Influence of location and extent of surgical resection on survival of patients with glioblastoma multiforme: results of three consecutive Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) clinical trials.* International journal of radiation oncology, biology, physics 26, 2, 239-244, 1993.
- Sneed PK, Lamborn K., Larson DA, Prados MD et al. *Demonstration of brachytherapy boost dose-response relationships in glioblastoma multiforme.* International journal of radiation oncology, biology, physics 35, 1, 37-44, 1996.
- Sood AK, Seftor E., Fletcher MS, Gardner LM et al. *Molecular determinants of ovarian cancer plasticity.* The American journal of pathology 158, 4, 1279-1288, 2001.
- Sounni NE, Jansson M., Foidart JM, Noel A. *Membrane type-1 matrix metalloproteinase and TIMP-2 in tumor angiogenesis.* Matrix biology 22, 1, 55-61, 2003.
- Stamenkovic, I. *Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases.* Journal of pathology 200, 4, 448-464, 2003.
- Stempien-Otero A, Karsan A., Cornejo CJ, Xiang H et al. *Mechanisms of hypoxia-induced endothelial cell death. Role of p53 in apoptosis.* The Journal of biological chemistry 274, 12, 8039-8045, 1999.
- Sternlicht MD, Werb Z. *How matrix metalloproteinases regulate cell behavior.* Annual review of cell and developmental biology 17, 463-516, 2001.

- Stewart, L. *Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials*. Lancet 359, 9311, 1011-1018, 2002.
- Stins MF, Gilles F., Kim KS. *Selective expression of adhesion molecules on human brain microvascular endothelial cells*. Journal of neuroimmunology 76, 1-2, 81-90, 1997.
- Strasser A, O'Connor. C. L., Dixit VM. *Apoptosis signaling*. Annual reviews of biochemistry 69, 217-245, 2000.
- Stupp R, Dietrich P., Ostermann Kraljevic S, Pica A et al. *Promising survival for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with concomitant radiation plus temozolomide followed by adjuvant temozolomide*. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 20, 5, 1375-1382, 2002.
- Stupp R, Gander M., Leyvraz S, Newlands E. *Current and future developments in the use of temozolomide for the treatment of brain tumours*. The Lancet Oncology 2, 9, 552-560, 2001.
- Stupp R, Mason W., van den Bent MJ, Weller M et al. *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. The New England journal of Medicine 352, 10, 987-996, 2005.
- Suri C, Jones P., Patan S, Bartunkova S et al. *Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis*. Cell 87, 7, 1171-1180, 1996.

- Suri C, McClain J., Thurston G, McDonald DM et al. *Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1*. Science 282, 5588, 468-471, 1998.
- Takano S, Yoshii Y., Kondo S, Suzuki H et al. *Concentration of vascular endothelial growth factor in the serum and tumor tissue of brain tumor patients*. Cancer research 56, 9, 2185-2191, 1996.
- Tamaki M, McDonald W., Amberger VR, Moore M et al. *Implantation of C6 astrocytoma spheroid into collagen type I gels: invasive, proliferative, and enzymatic characterizations*. Journal of neurosurgery 87, 4, 602-609, 1997.
- Tanaka, T. *Effect of adenoviral-mediated thymidine kinase transduction and ganciclovir therapy on tumor-associated endothelial cells*. Neurologia medico-chirurgia 37, 10, 730-737, 1997.
- Tanaka T, Cao Y., Folkman J, Fine HA. *Viral vector-targeted antiangiogenic gene therapy utilizing an angiostatin complementary DNA*. Cancer research 58, 15, 3362-3369, 1998.
- Teruyama K, Abe M., Nakano T, Iwasaka-Yagi C et al. *Role of transcription factor Ets-1 in the apoptosis of human vascular endothelial cells*. Journal of cell physiology 188, 2, 243-252, 2001.
- Valtonen S, Timonen U., Toivanen P, Kalimo H et al. *Interstitial chemotherapy with carmustine-loaded polymers for high-grade gliomas: a randomized double-blind study*. Neurosurgery 41, 1, 44-48, 1997.
- Van Brocklyn JR, Young N., Roof R. *Sphingosine-1-phosphate stimulates motility and invasiveness of human glioblastoma multiforme cells*. Cancer letters 199, 1, 53-60, 2003.

- van den Bent MJ, Stupp R., Mason W, et al. *Impact of the extend of resection on overall survival in newly-diagnosed glioblastoma after chemo-irradiation with temozolomide: further analysis of EORTX study 26981*. The European Journal of Cancer 3, 134, 2005.
- van Kempen LC, Leenders W. *Tumours can adapt to anti-angiogenic therapy depending on the stromal context: lessons from endothelial cell biology*. European journal of cell biology 85, 2, 61-68, 2006.
- Vernon RB, Sage E. *A novel, quantitative model for study of endothelial cell migration and sprout formation within three-dimensional collagen matrices*. Microvascular research 57:2: 118-133, 1999.
- Viapiano MS, Matthews R. *From barriers to bridges: chondroitin sulfate proteoglycans in neuropathology*. Trends in molecular medicine 12, 10, 488-496, 2006.
- Vihinen P, Kahari V. *Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets*. International journal of cancer. Journal international du cancer 99, 2, 157-166, 2002.
- Vu TH, Shipley J., Bergers G, Berger JE et al. *MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes*. Cell 93, 3, 411-422, 1998.
- Wang D, Huang H., Kazlauskas A, Cavenee WK. *Induction of vascular endothelial growth factor expression in endothelial cells by platelet-derived growth factor through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase*. Cancer research 59, 7, 1464-1472, 1999.

- Wang JK, Gao G., Goldfarb M. *Fibroblast growth factor receptors have different signaling and mitogenic potentials*. Molecular and cell biology 14, 1, 181-188, 1994.
- Weidner, N. *Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer*. The American journal of pathology 147, 1, 9-19, 1995.
- Weidner, N. *Tumour vascularity and proliferation: clear evidence of a close relationship*. The Journal of pathology 189, 3, 309-318, 1999.
- Wesseling P, Ruitter D., Burger PC. *Angiogenesis in brain tumors; pathobiological and clinical aspects*. Journal of Neuro-oncology 32, 3, 253-265, 1997.
- Wesseling P, Schlingemann R., Rietveld FJ, Link M et al. *Early and extensive contribution of pericytes/vascular smooth muscle cells to microvascular proliferation in glioblastoma multiforme: an immuno-light and immuno-electron microscopic study*. Journal of neuropathology and experimental neurology 54, 3, 304-310, 1995.
- Wesseling P, van der Laak J., de Leeuw H, Ruitter DJ et al. *Quantitative immunohistological analysis of the microvasculature in untreated human glioblastoma multiforme. Computer-assisted image analysis of whole-tumor sections*. Journal of neurosurgery 81, 6, 902-909, 1994.
- Westphal M, Hilt D., Bortey E, Delavault P et al. *A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma*. Neuro-oncology 5, 2, 79-88, 2003.

- Westphal M, Ram Z., Riddle V, Hilt D et al. *Gliadel wafer in initial surgery for malignant glioma: long-term follow-up of a multicenter controlled trial.* Acta Neurochirurgica 148, 3, 269-275, 2006.
- Winkler F, Kozin S., Tong RT, Chae SS et al. *Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases.* Cancer cell 6, 6, 553-563, 2004.
- Woessner, J. J. *The family of matrix metalloproteinases.* Annals of the New York Academy of Sciences 732, 11-21, 1994.
- Yamaguchi, Y. *Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix.* Cellular and molecular life sciences 57, 2, 276-289, 2000.
- Yana I, Seiki M. *MT-MMPs play pivotal roles in cancer dissemination.* Clinical and experimental metastasis 19,3, 209-215, 2002.
- Yang S, Graham J., Kahn JW, et al. *Functional roles for PECAM-1 (CD31) and VE-cadherin (CD144) in tube assembly and lumen formation in three-dimensional collagen gels.* The american journal of pathology 155:3: 887-895, 1999.
- Zagzag D, Amirnovin R., Greco MA, Yee H et al. *Apoptosis and involution in gliomas precede neovascularization: a novel concept for glioma growth and angiogenesis.* Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology 80, 6, 837-849, 2000.
- Zagzag D, Friedlander D., Margolis B, Grumet M et al. *Molecular events implicated in brain tumor angiogenesis and invasion.* Pediatric neurosurgery 33, 1, 49-55, 2000.

- Zagzag D, Hooper A., Friedlander DR, Chan W et al. *In situ expression of angiopoietins in astrocytomas identifies angiopoietin-2 as an early marker of tumor angiogenesis*. Experimental Neurology 159, 2, 391-400, 1999.
- Ziegler U, Groscurth P. *Morphological features of cell death*. News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society 19, 124-128, 2004.