



HAL
open science

Expression de l'intégrine alpha5beta1 dans les gliomes de haut grade : études préliminaires

Claire Bastien

► **To cite this version:**

Claire Bastien. Expression de l'intégrine alpha5beta1 dans les gliomes de haut grade : études préliminaires. Sciences du Vivant [q-bio]. 2011. hal-01732729

HAL Id: hal-01732729

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01732729v1>

Submitted on 14 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement
dans le cadre du troisième cycle de Médecine Spécialisée

par

Claire BASTIEN

le 13 octobre 2011

**EXPRESSION DE L'INTEGRINE ALPHA5 BETA1
DANS LES GLIOMES DE HAUT GRADE :
ETUDES PRELIMINAIRES.**

Examineurs de la thèse :

M. François PLENAT	Professeur	Président
M. Jean Michel VIGNAUD	Professeur	}
M. Luc TAILLANDIER	Professeur	} Juges
Mme Jacqueline CHAMPIGNEULLE	Docteur en médecine	}
Mme Sophie PINEL	Docteur en pharmacie et en sciences	}

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1

FACULTÉ DE MÉDECINE DE NANCY

Président de l'Université : Professeur Jean-Pierre FINANCE

Doyen de la Faculté de Médecine : Professeur Henry COUDANE

Vice Doyen Mission « sillon lorrain » : Professeur Annick BARBAUD

Vice Doyen Mission « Campus » : Professeur Marie-Christine BÉNÉ

Vice Doyen Mission « Finances » : Professeur Marc BRAUN

Vice Doyen Mission « Recherche » : Professeur Jean-Louis GUÉANT

Assesseurs :

- Pédagogie :	Professeur Karine ANGIOÏ-DUPREZ
- 1 ^{er} Cycle :	Professeur Bernard FOLIGUET
- « Première année commune aux études de santé (PACES) et universitarisation études para-médicales »	M. Christophe NÉMOS
- 2 ^{ème} Cycle :	Professeur Marc DEBOUVERIE
- 3 ^{ème} Cycle :	
« <i>DES Spécialités Médicales, Chirurgicales et Biologiques</i> »	Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI
« <i>DES Spécialité Médecine Générale</i> »	Professeur Francis RAPHAËL
- Filières professionnalisées :	M. Walter BLONDEL
- Formation Continue :	Professeur Hervé VESPIGNANI
- Commission de Prospective :	Professeur Pierre-Edouard BOLLAERT
- Recherche :	Professeur Didier MAINARD
- Développement Professionnel Continu :	Professeur Jean-Dominique DE KORWIN

DOYENS HONORAIRES

Professeur Adrien DUPREZ – Professeur Jean-Bernard DUREUX

Professeur Jacques ROLAND – Professeur Patrick NETTER

=====

PROFESSEURS HONORAIRES

Pierre ALEXANDRE – Jean-Marie ANDRE - Daniel ANTHOINE - Alain BERTRAND - Pierre BEY - Jacques BORRELLY
Michel BOULANGE - Jean-Claude BURDIN - Claude BURLET - Daniel BURNEL - Claude CHARDOT Jean-Pierre CRANCE -
Gérard DEBRY - Jean-Pierre DELAGOUTTE - Emile de LAVERGNE - Jean-Pierre DESCHAMPS
Michel DUC - Jean DUHEILLE - Adrien DUPREZ - Jean-Bernard DUREUX - Gérard FIEVE - Jean FLOQUET - Robert FRISCH
Alain GAUCHER - Pierre GAUCHER - Hubert GERARD - Jean-Marie GILGENKRANTZ - Simone GILGENKRANTZ
Oliéro GUERCI - Pierre HARTEMANN - Claude HURIET - Christian JANOT - Jacques LACOSTE - Henri LAMBERT
Pierre LANDES - Alain LARCAN - Marie-Claire LAXENAIRE - Michel LAXENAIRE - Jacques LECLERE - Pierre LEDERLIN
Bernard LEGRAS - Michel MANCIAUX - Jean-Pierre MALLIÉ – Philippe MANGIN - Pierre MATHIEU
Denise MONERET-VAUTRIN - Pierre NABET - Jean-Pierre NICOLAS - Pierre PAYSANT - Francis PENIN Gilbert PERCEBOIS
Claude PERRIN - Guy PETIET - Luc PICARD - Michel PIERSON - Jean-Marie POLU – Jacques POUREL Jean PREVOT
Antoine RASPILLER - Michel RENARD - Jacques ROLAND - René-Jean ROYER - Paul SADOUL - Daniel SCHMITT
Michel SCHWEITZER - Jean SOMMELET - Danièle SOMMELET - Michel STRICKER - Gilbert THIBAUT Augusta TREHEUX
Hubert UFFHOLTZ - Gérard VAILLANT - Paul VERT - Colette VIDAILHET - Michel VIDAILHET - Michel WAYOFF
Michel WEBER

=====

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS PRATICIENS HOSPITALIERS

(Disciplines du Conseil National des Universités)

42^{ème} Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

1^{ère} sous-section : (*Anatomie*)

Professeur Gilles GROSDIDIER

Professeur Pierre LASCOMBES – Professeur Marc BRAUN

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

Professeur Bernard FOLIGUET

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

Professeur François PLENAT – Professeur Jean-Michel VIGNAUD

43^{ème} Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDICALE

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

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

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

Professeur Denis REGENT – Professeur Michel CLAUDON

Professeur Serge BRACARD – Professeur Alain BLUM – Professeur Jacques FELBLINGER

Professeur René ANXIONNAT

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

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

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

2^{ème} sous-section : (Physiologie)

Professeur François MARCHAL – Professeur Bruno CHENUÉL – Professeur Christian BEYAERT

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

Professeur Ali DALLOUL

4^{ème} sous-section : (Nutrition)

Professeur Olivier ZIEGLER – Professeur Didier QUILLIOT

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

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

Professeur Alain LE FAOU - Professeur Alain LOZNIIEWSKI

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

Professeur Thierry MAY – Professeur Christian RABAUD

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

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

Professeur Philippe HARTEMANN – Professeur Serge BRIANÇON - Professeur Francis GUILLEMIN

Professeur Denis ZMIROU-NAVIER – Professeur François ALLA

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

Professeur Christophe PARIS

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

Professeur Henry COUDANE

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

Professeur François KOHLER – Professeur Éliane ALBUISSON

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

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

Professeur Thomas LECOMPTE – Professeur Pierre BORDIGONI

Professeur Jean-François STOLTZ – Professeur Pierre FEUGIER

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

Professeur François GUILLEMIN – Professeur Thierry CONROY

Professeur Didier PEIFFERT – Professeur Frédéric MARCHAL

3^{ème} sous-section : (Immunologie)

Professeur Gilbert FAURE – Professeur Marie-Christine BENE

4^{ème} sous-section : (Génétique)

Professeur Philippe JONVEAUX – Professeur Bruno LEHEUP

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

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

Professeur Claude MEISTELMAN – Professeur Hervé BOUAZIZ

Professeur Paul-Michel MERTES – Professeur Gérard AUDIBERT

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

Professeur Alain GERARD - Professeur Pierre-Édouard BOLLAERT

Professeur Bruno LÉVY – Professeur Sébastien GIBOT

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

Professeur Patrick NETTER – Professeur Pierre GILLET

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

Professeur François PAILLE – Professeur Gérard GAY – Professeur Faiez ZANNAD - Professeur Patrick ROSSIGNOL

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

1^{ère} sous-section : (Neurologie)

Professeur Gérard BARROCHE – Professeur Hervé VESPIGNANI
Professeur Xavier DUCROCQ – Professeur Marc DEBOUVERIE

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

Professeur Jean-Claude MARCHAL – Professeur Jean AUQUE
Professeur Thierry CIVIT

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

Professeur Jean-Pierre KAHN – Professeur Raymund SCHWAN

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

Professeur Daniel SIBERTIN-BLANC – Professeur Bernard KABUTH

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

Professeur Jean PAYSANT

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

1^{ère} sous-section : (Rhumatologie)

Professeur Isabelle CHARY-VALCKENAERE – Professeur Damien LOEUILLE

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

Professeur Daniel MOLE - Professeur Didier MAINARD

Professeur François SIRVEAUX – Professeur Laurent GALOIS

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

Professeur Jean-Luc SCHMUTZ – Professeur Annick BARBAUD

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

Professeur François DAP – Professeur Gilles DAUTEL

51^{ème} Section : PATHOLOGIE CARDIORESPIRATOIRE et VASCULAIRE

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

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

2^{ème} sous-section : (Cardiologie)

Professeur Etienne ALIOT – Professeur Yves JUILLIERE – Professeur Nicolas SADOUL

Professeur Christian de CHILLOU

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

Professeur Jean-Pierre VILLEMOT - Professeur Jean-Pierre CARTEAUX

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

Professeur Denis WAHL – Professeur Sergueï MALIKOV

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

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

Professeur Marc-André BIGARD - Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI – Professeur Laurent PEYRIN-BIROULET

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

3^{ème} sous-section : (Néphrologie)

Professeur Michèle KESSLER – Professeur Dominique HESTIN – Professeur Luc FRIMAT

4^{ème} sous-section : (Urologie)

Professeur Jacques HUBERT – Professeur Pascal ESCHWEGE

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

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

Professeur Jean-Dominique DE KORWIN – Professeur Pierre KAMINSKY

Professeur Athanase BENETOS - Professeur Gisèle KANNY – Professeur Christine PERRET-GUILLAUME

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

Professeur Patrick BOISSEL – Professeur Laurent BRESLER

Professeur Laurent BRUNAUD – Professeur Ahmet AYAV

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

1^{ère} sous-section : (Pédiatrie)

Professeur Pierre MONIN - Professeur Jean-Michel HASCOET - Professeur Pascal CHASTAGNER
Professeur François FEILLET - Professeur Cyril SCHWEITZER

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

Professeur Michel SCHMITT – Professeur Pierre JOURNEAU – Professeur Jean-Louis LEMELLE

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

Professeur Jean-Louis BOUTROY - Professeur Philippe JUDLIN – Professeur Patricia BARBARINO

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

Professeur Georges WERYHA – Professeur Marc KLEIN – Professeur Bruno GUERCI

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

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

Professeur Claude SIMON – Professeur Roger JANKOWSKI – Professeur Cécile PARIETTI-WINKLER

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

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

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

Professeur Jean-François CHASSAGNE – Professeur Etienne SIMON

=====

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

64^{ème} Section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Professeur Sandrine BOSCHI-MULLER

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

42^{ème} Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

1^{ère} sous-section : (Anatomie)

Docteur Bruno GRIGNON – Docteur Thierry HAUMONT – Docteur Manuela PEREZ

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

Docteur Edouard BARRAT - Docteur Françoise TOUATI – Docteur Chantal KOHLER

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

Docteur Aude BRESSENOT

43^{ème} Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDICALE

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

Docteur Marie-Hélène LAURENS – Docteur Jean-Claude MAYER

Docteur Pierre THOUVENOT – Docteur Jean-Marie ESCANYE

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

Docteur Damien MANDRY

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

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

Docteur Jean STRACZEK – Docteur Sophie FREMONT

Docteur Isabelle GASTIN – Docteur Marc MERTEN – Docteur Catherine MALAPLATE-ARMAND

Docteur Shyue-Fang BATTAGLIA

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

Docteur Véronique DECOT-MAILLERET

4^{ème} sous-section : (Nutrition)

Docteur Rosa-Maria RODRIGUEZ-GUEANT

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

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

Docteur Francine MORY – Docteur Véronique VENARD

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

Docteur Nelly CONTET-AUDONNEAU – Madame Marie MACHOUART

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

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

Docteur Alexis HAUTEMANIÈRE – Docteur Frédérique CLAUDOT

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

Docteur Laurent MARTRILLE

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

Docteur Nicolas JAY

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

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

Docteur Lina BOLOTINE

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

Docteur Marcelo DE CARVALHO BITTENCOURT

4^{ème} sous-section : (*Génétiq*ue)

Docteur Christophe PHILIPPE – Docteur Céline BONNET

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

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

Docteur Françoise LAPICQUE – Docteur Marie-José ROYER-MORROT – Docteur Nicolas GAMBIER

50^{ème} Section : RHUMATOLOGIE

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

Docteur Anne-Christine RAT

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

Docteur Anne-Claire BURSZTEJN

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

3^{ème} sous-section :

Docteur Olivier MOREL

5^{ème} sous-section : (*Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale*)

Docteur Jean-Louis CORDONNIER

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

5^{ème} section : SCIENCE ÉCONOMIE GÉNÉRALE

Monsieur Vincent LHUILLIER

40^{ème} section : SCIENCES DU MÉDICAMENT

Monsieur Jean-François COLLIN

60^{ème} section : MÉCANIQUE, GÉNIE MÉCANIQUE ET GÉNIE CIVILE

Monsieur Alain DURAND

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

Monsieur Jean REBSTOCK – Monsieur Walter BLONDEL

64^{ème} section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Mademoiselle Marie-Claire LANHERS – Monsieur Pascal REBOUL – Mr Nick RAMALANJAONA

65^{ème} section : BIOLOGIE CELLULAIRE

Mademoiselle Françoise DREYFUSS – Monsieur Jean-Louis GELLY
Madame Ketsia HESS – Monsieur Hervé MEMBRE – Monsieur Christophe NEMOS - Madame Natalia DE ISLA
Madame Nathalie MERCIER

66^{ème} section : PHYSIOLOGIE

Monsieur Nguyen TRAN

67^{ème} section : BIOLOGIE DES POPULATIONS ET ÉCOLOGIE

Madame Nadine MUSSE

=====

PROFESSEURS ASSOCIÉS

Médecine Générale

Professeur associé Alain AUBREGE
Professeur associé Francis RAPHAEL

MAÎTRES DE CONFÉRENCES ASSOCIÉS

Médecine Générale

Docteur Jean-Marc BOIVIN
Docteur Jean-Louis ADAM
Docteur Elisabeth STEYER
Docteur Paolo DI PATRIZIO
Docteur Sophie SIEGRIST

=====

PROFESSEURS ÉMÉRITES

Professeur Jean-Marie ANDRÉ - Professeur Daniel ANTHOINE - Professeur Pierre BEY - Professeur Michel BOULANGÉ
Professeur Jean-Pierre CRANCE – Professeur Jean-Pierre DELAGOUTTE - Professeur Jean-Marie GILGENKRANTZ
Professeur Simone GILGENKRANTZ - Professeur Henri LAMBERT - Professeur Alain LARCAN
Professeur Denise MONERET-VAUTRIN - Professeur Jean-Pierre NICOLAS - Professeur Luc PICARD
Professeur Michel PIERSON - Professeur Jacques POUREL - Professeur Jacques ROLAND – Professeur Michel STRICKER
Professeur Gilbert THIBAUT - Professeur Hubert UFFHOLTZ - Professeur Paul VERT - Professeur Colette VIDAILHET
Professeur Michel VIDAILHET

=====

DOCTEURS HONORIS CAUSA

Professeur Norman SHUMWAY (1972) <i>Université de Stanford, Californie (U.S.A)</i>	Professeur Théodore H. SCHIEBLER (1989) <i>Institut d'Anatomie de Würzburg (R.F.A)</i>
Professeur Paul MICHIELSEN (1979) <i>Université Catholique, Louvain (Belgique)</i>	Professeur Maria DELIVORIA-PAPADOPOULOS (1996) <i>Université de Pennsylvanie (U.S.A)</i>
Professeur Charles A. BERRY (1982) <i>Centre de Médecine Préventive, Houston (U.S.A)</i>	Professeur Mashaki KASHIWARA (1996) <i>Research Institute for Mathematical Sciences de Kyoto (JAPON)</i>
Professeur Pierre-Marie GALETTI (1982) <i>Brown University, Providence (U.S.A)</i>	Professeur Ralph GRÄSBECK (1996) <i>Université d'Helsinki (FINLANDE)</i>
Professeur Mamish Nisbet MUNRO (1982) <i>Massachusetts Institute of Technology (U.S.A)</i>	Professeur James STEICHEN (1997) <i>Université d'Indianapolis (U.S.A)</i>
Professeur Mildred T. STAHLMAN (1982) <i>Vanderbilt University, Nashville (U.S.A)</i>	Professeur Duong Quang TRUNG (1997) <i>Centre Universitaire de Formation et de Perfectionnement des Professionnels de Santé d'Hô Chi Minh-Ville (VIËTNAM)</i>
Harry J. BUNCKE (1989) <i>Université de Californie, San Francisco (U.S.A)</i>	
Professeur Daniel G. BICHET (2001) <i>Université de Montréal (Canada)</i>	Professeur Marc LEVENSTON (2005) <i>Institute of Technology, Atlanta (USA)</i>
Professeur Brian BURCHELL (2007) <i>Université de Dundee (Royaume Uni)</i>	

Remerciements

A notre Maître et Président de Thèse,

Monsieur le Professeur François PLENAT

Professeur d'Anatomie et Cytologie Pathologiques (option biologie)

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter de nous confier ce travail et d'accepter la présidence du jury de cette thèse,

Pour votre riche enseignement et vos précieux conseils dans la réalisation de ce travail et tout au long de notre internat,

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

A notre Maître et Juge,

Monsieur le Professeur Jean Michel VIGNAUD
Professeur d'Anatomie et Cytologie Pathologiques

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter de juger cette thèse,

Pour votre riche enseignement dont nous avons pu bénéficier tout au long de notre internat,

Veillez trouver ici le témoignage de notre profond respect et de notre plus grande estime.

A nos Maîtres et Juges,

Monsieur le Professeur Luc TAILLANDIER
Professeur de Neurologie

Vous nous avez fait l'honneur de juger cette thèse,

Pour l'apprentissage de la clinique à vos côtés durant l'externat et pour nous avoir fait partager votre passion pour la neuro oncologie,

Veillez trouver ici le témoignage de notre profond respect et de notre plus grande estime.

Madame le Docteur Jacqueline CHAMPIGNEULLE
Docteur en Anatomie et Cytologie Pathologiques

Vous nous avez fait l'honneur de juger cette thèse,

Pour l'apprentissage dont nous avons pu bénéficier, pour votre enseignement rigoureux et votre pédagogie ainsi que la bienveillance dont vous faites preuve,

Veillez trouver ici le témoignage de notre reconnaissance et de notre profond respect.

A notre Juge,

Madame le Docteur Sophie PINEL

Docteur en pharmacie, Docteur en sciences mention science du médicament

Vous nous avez fait l'honneur de juger cette thèse,

Pour nous avoir donné l'envie de continuer dans le domaine de la recherche et pour votre précieuse collaboration dans la réalisation de ce travail,

Veillez trouver ici le témoignage de notre profond respect et de notre plus grande estime.

A nos Maîtres successifs,

Madame le Docteur Marielle BAUDET-BRAUN

Monsieur le Docteur Etienne GODET

Monsieur le Professeur François PLENAT

Monsieur le Professeur Jean Michel VIGNAUD

Madame le Docteur Françoise BRAUN

Madame le Docteur Agnès LEROUX

Monsieur le Professeur Pierre BROUSSET

Nous remercions tous ceux qui ont participé à l'élaboration de ce travail et en particulier :

Au Docteur Abderrahim OUSSALAH, pour avoir réalisé les statistiques en urgence, ton analyse m'a été précieuse, je te remercie infiniment,

Madame Denise THIEBAULT, Madame Corinne BONNET, pour votre collaboration, votre aide si précieuse à la réalisation des techniques et votre patience.

Madame LOMAZZI Sandra et Mademoiselle CARNIN Charlotte, un grand merci pour votre aide précieuse dans le recueil de toutes les données.

L'ensemble du personnel de la plateforme commune de biologie moléculaire en particulier le Docteur MONHOVEN Nathalie et Madame PIZZAGALI Sylviane pour nous avoir aidé dans toutes les étapes des techniques en biologie moléculaire.

L'équipe du SiGReTO et en particulier le Dr PINEL Sophie et Mademoiselle CHATEAU Alicia pour leur aide précieuse tout au long de ce travail. Merci également à Mademoiselle BENENEMISSI Hana pour ton aide lors des techniques de biologie moléculaire. Merci l'équipe du Pr M. DONTENWILL.

Le Professeur Jean-Michel VIGNAUD, le Docteur Guillaume GAUCHOTTE, Mesdames les secrétaires et techniciennes du laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques de l'hôpital Central, le Docteur Stéphanie LACOMME et Roseline. Merci pour votre collaboration à la bonne réalisation de ce travail,

Mesdames les secrétaires et techniciennes du laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques de l'hôpital de Brabois. Merci pour votre collaboration à la bonne réalisation de ce travail.

L'équipe de neuro-oncologie et en particulier Madame CARAT Evelyne et le Professeur Luc TAILLANDIER, merci d'avoir été disponible pour moi au moment du recueil des données cliniques.

A tous les médecins qui ont contribué à ma formation et en particulier:

Madame le Docteur MARIE Béatrice, pour le riche enseignement dont j'ai pu profiter durant mes deux semestres à l'hôpital central.

Madame le Docteur MONTAGNE Karine, pour ton enseignement si précieux et ta grande disponibilité,

Madame le Docteur CAHN Virginie, pour ton soutien durant ce semestre, ta bonne humeur constante et ton enseignement, j'espère pouvoir continuer longtemps nos séances au multi tête.

Madame le Docteur MARCON Nathalie, on se connaît depuis mon premier semestre d'internat en anapath, je t'ai vu devenir une super anapath, merci pour ce premier semestre,

Madame le Docteur BRESSENOT Aude, pour ton apprentissage au cours de mon premier semestre d'internat en anapath,

Monsieur le Docteur Guillaume GAUCHOTTE, nous n'avons jamais eu l'occasion de travailler ensemble, j'espère que cela sera rendu possible par la fusion!

Madame le Docteur De COATODON Luminita, Madame le Docteur ROUSSEAU Amandine,

Les médecins du Centre Alexis Vautrin; Madame le Docteur LEROUX Agnès, Monsieur le Docteur GENIN Pascal, Mademoiselle le Docteur MIGEON Colette et Madame le Docteur BARLIER Catherine.

A toute l'équipe Toulousaine et en particulier les Professeurs DELSOL, BROUSSET, LAMANT et ainsi que le docteur Camille LAURENT pour m'avoir accueilli et m'avoir transmis leur passion pour la dermatopathologie et l'hématopathologie.

A tous les membres de ma famille et en particulier:

A mes parents, pour avoir su me guider, m'avoir soutenue et encouragée tout au long de mes études et dans la vie en général, pour m'avoir toujours aidée à chaque difficulté, pour avoir toujours cru en moi,

A mon petit frère, dont je suis si fière, pour me supporter depuis presque 30 ans, pour notre grande complicité, pour son aide et ses conseils judicieux,

A papi et mamie de Nilvange, pour avoir toujours été là pour moi, pour m'avoir accueilli en Lorraine lors de ma première année d'étude et pour m'avoir rassurée à maintes reprises ces dernières semaines,

A ma mémé de Samatan, pour sa gentillesse et son accueil pendant mon semestre toulousain, et pour toutes nos conversations si enrichissantes,

A ma marraine et ma cousine Caro, pour tous ces séjours linguistiques passés ensemble,

A mon parrain Pierrot, à Gilou, Bernard et mes tatas Edith, Danielle et Claudine, tous mes cousins, pour leur accueil chaleureux à chaque descente dans le sud ouest,

Recevez ici le témoignage de toute ma reconnaissance et de tout mon Amour.

A mes cointernes, Julia, Camille, Olivia, Marie Pierre, Cyril, Caroline, Claire, Delphine et en particulier Radwan pour sa gentillesse, pour avoir supporté mes longues discussions sur les intégrines (j'espère ne pas avoir été trop pénible ces dernières semaines), pour avoir supporté mes longues discussions tout court en fait, pour tes supers histogrammes et pour m'avoir fait rire pendant tout ce semestre, et Charlène pour tous les bons moments passés depuis l'internat de Thionville, au multi tête, en salle de macro et en dehors du travail, j'espère pouvoir continuer à travailler avec toi!

A tous les techniciens et secrétaires du Centre Alexis Vautrin pour leur gentillesse, leurs attentions, merci pour ce semestre passé à vos côtés!

A mes amis et en particulier,

Ceux des toutes premières années d'études: Zozo (et Pierre), tonton Charlie (et Sarah), bobby, Dédé, pour toutes les bonnes soirées passées ensemble, nos cafés-discussions-révisions,

Mes bretons préférés: Fabrice et Caro, pour me faire découvrir leur nouvelle région, pour toutes ces heures à bosser l'internat, pour tous ces coups de fils de soutien moral, ma ptite caro, j'espère qu'on pourra visiter ensemble toutes les capitales d'Europe (plus que 25!).

Marc, merci pour ton aide dans ce travail, pour tous les bons moments passés ensemble, pour passer outre mes sautes d'humeur et croire en moi,

Les toulousains : Odile, Lara, Hanane, Lynda et Véro pour toutes ces bonnes soirées à l'internat de Toulouse (surtout au bord de la piscine le jeudi soir...).

A ceux et celles de Verdun (Caro, Thomas, Blandine), Les ex colocs (La ptite Marie pour toutes ses anecdotes, Léa, AA et Shirine), le duo (ou peut être devrais je maintenant dire le trio) de choc, Benoît, pour toutes tes blagues (promis Charlène, j'arrête de l'encourager).

Merci à Anne Agathe pour m'avoir beaucoup aidé et conseillé dans la réalisation de ce travail, pour sa bonne humeur constante et ses précieux conseils (et son immense self contrôle quand on se retrouve près d'Epinal au lieu de Nancy centre).

A Julie, Nico, Caro, Estelle et à tous ceux que je n'ai pas cité,

A tous, je dédie cette thèse,

SERMENT

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

Admise dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me sont confiés. Reçue à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs. Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément. Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

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

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

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	15
PARTIE I: RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	17
I.Les intégrines.	17
I.A.Définition	17
I.B.Biologie des intégrines.	17
I.B.1.Structure hétérodimérique.	17
I.B.2.Les intégrines et leurs ligands.	20
I.B.3.Conformation des intégrines.	21
I.B.4.Signalisation des intégrines et points d'ancrage.	22
I.B.5.Intégrines et plateforme de signalisation.	24
I.B.6.Intégrines et internalisation.	25
I.C.Intégrines et cancer.	26
I.C.1.Modifications de l'expression des intégrines.	26
I.C.2.Anomalies génétiques	27
I.C.3.Intégrines et facteurs de croissance.	28
I.C.4.Coopération des intégrines et oncogènes.	28
I.C.5.Rôle des intégrines dans l'angiogenèse et la lymphangiogenèse tumorale.	28
I.C.6.Les intégrines dans la progression tumorale et développement des métastases.	29
I.C.7.Intégrines et hypoxie	30
II.Biologie des gliomes.	30
II.A.Définition	30
II.B.Hypothèses sur les origines des gliomes.	31
II.C.Gliomes malins et anomalies moléculaires	32
II.D.Gliomes malins et invasion	33
II.E.Gliomes malins et vascularisation.	33
II.F.Traitements des gliomes de haut grade.	34

II.F.1.Principes généraux.	34
II.F.2.Thérapies ciblées.	35
II.F.2.a.Les inhibiteurs des facteurs de croissance et de leurs récepteurs à activité tyrosine kinase	35
II.F.2.b.Les antiangiogéniques	37
III.Intégrines et gliomes.	38
IV.La cavéoline-1	41
PARTIE II: MATERIEL ET METHODES	42
I.Matériel	42
I.A.Les gliomes humains greffés chez la souris athymique.	42
I.B.Les tumeurs humaines.	43
I.C.Les prélèvements servant de témoins positifs et d'étalons de niveau d'expression.	43
I.D.Les prélèvements pour l'étude de la distribution de ces trois protéines dans les tissus normaux et de leur expression par les cellules des glioses réactionnelles.	44
II.Méthodes	45
II.A.Immunohistochimie.	45
II.B.Interprétation de l'étude immunohistochimique..	46
II.C.Analyse transcriptionnelle.	47
II.C.1.Etapes d'extraction de l'ARN, qualité des ARNm.	47
II.C.2.Etape de RT-PCR.	47
II.C.3.Etape de PCR quantitative.	47
III.Statistiques	48
PARTIE III: RESULTATS	49
I.Le marquage des tissus témoins, vérification de la spécificité.	49
I.A.La cavéoline-1.	49
I.B.Sous-unité $\alpha 5$.	49
I.C.Sous-unité $\beta 1$.	50
II.Expression des protéines $\alpha 5$, $\beta 1$ et cavéoline-1 dans les tissus non tumoraux.	51

II.A.Introduction.	51
II.B.Distribution de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et de la cavéoline-1: tableaux récapitulatifs (hors gliose réactionnelle et ulcération colique).	52
II.B.1.Prélèvements encéphaliques:	52
II.B.1.a.Hémisphère cérébral :	52
II.B.1.b.Cervelet :	52
II.B.2.Tissus normaux (hors encéphale).	53
II.B.2.a.Placenta : Les données sont reportées dans la première partie.	53
II.B.2.b.Foie :	53
II.B.2.c.Peau.	53
II.B.2.d.Rein	54
II.B.2.e.Poumon	54
II.B.2.f.Pancréas	55
II.B.2.g.Ganglion lymphatique.	55
II.B.2.h.Glande thyroïde	56
II.B.2.i.Moelle osseuse.	56
II.B.2.j.Thymus	57
II.B.2.k.Oesophage.	57
II.B.2.l.Estomac, fundus	58
II.B.2.m.Estomac, antre	58
II.B.2.n.Duodénum	59
II.B.2.o.Illéon	59
II.B.2.p.Appendice	60
II.B.2.q.Colon	60
II.B.2.r.Ovaire	61
II.B.3.Distribution: tissus sains.	61
II.B.3.a.Prélèvements encéphaliques.	61
II.B.3.b.Prélèvements des tissus normaux (hors encéphale).	64

II.C.Expression des sous-unités $\alpha 5$ et $\beta 1$ dans la gliose et la microglie réactionnelles.	68
II.D.Expression des sous-unités $\alpha 5$ et $\beta 1$ dans un tissu de granulation.	69
III.Expression des sous-unités $\alpha 5$ et $\beta 1$ et de la cavéoline-1 dans les xénogreffes de souris athymiques.	70
III.A.Greffes hétérotopiques	70
III.A.1.Observations au niveau des cellules tumorales:	72
III.A.2.Observation au niveau des cellules endothéliales.	73
III.A.3.Analyse statistique.	73
III.B.Greffes orthotopiques.	74
IV.Analyse transcriptionnelle et immunohistochimique des sous-unités $\alpha 5$, $\beta 1$ et de la cavéoline-1 dans les gliomes malins humains.	76
IV.A.Résultats quantitatifs globaux.	76
IV.B.Analyse morphologique.	76
IV.C.3. Analyse statistique.	85
IV.C.A.a.Corrélation entre le ratio d'ARNm et l'expression de la sous-unité $\alpha 5$.	85
IV.C.A.b.Corrélation entre le ratio d'ARNm et l'expression de la sous-unité $\beta 1$.	86
IV.C.A.c.Corrélation entre le ratio d'ARNm et l'expression de la cavéoline-1.	86
IV.C.A.d.Lien entre le taux des différents ARNm et le grade tumoral.	88
IV.C.A.e.Lien entre le ratio d'ARNm de la sous-unité $\alpha 5$ et celui de la cavéoline-1	89
PARTIE IV: DISCUSSION	90
I.Limites rencontrées lors de notre étude.	90
II.Expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ au sein des tissus non tumoraux.	92
III.Expression des protéines d'intérêt dans les tissus tumoraux.	94
CONCLUSION	98
BIBLIOGRAPHIE	99

INTRODUCTION

L'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour inhiber la progression tumorale et le développement des métastases constitue une étape importante de la lutte pour une baisse de la mortalité en cancérologie. Découvertes au début des années 1980, les intégrines, une famille de récepteurs de la surface cellulaire, ont depuis été impliquées à toutes les étapes de la cancérogénèse. Elles participent, en effet, à la régulation d'un ensemble de fonctions cruciales pour l'initiation, la progression et l'extension métastatique des tumeurs solides en fournissant des signaux d'adhérence, de migration, et de survie aux cellules tumorales ainsi qu'à celles de leur micro environnement, y compris aux cellules endothéliales. Un certain nombre d'antagonistes des intégrines sont actuellement à un stade de développement pré clinique et clinique.

Par ailleurs, les gliomes malins représentent un défi en oncologie. En effet, malgré des avancées significatives dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement et la progression de ces derniers, les progrès thérapeutiques dans ce domaine restent limités. La durée moyenne de survie des patients atteints de glioblastome est de 12 à 14 mois en dépit de la mise en œuvre de traitements combinant une résection chirurgicale, une radiothérapie et une chimiothérapie. Le témozolomide a montré un effet incontestable mais cependant modeste, la médiane de survie passant de 12 à 15 mois lorsque ce médicament est associé à la radiothérapie. La recherche de nouveaux traitements pour les tumeurs malignes de haut grade est donc indispensable.

Les intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$ qui reconnaissent la vitronectine par l'intermédiaire d'un site de liaison Arg-Gly-Asp (RGD) sont les plus étudiées dans les gliomes malins. Dans ces tumeurs ces récepteurs sont exprimés par les cellules tumorales et les cellules endothéliales des néovaisseaux. Le cilengitide, un pentapeptide cyclique antagoniste de ces intégrines, est actuellement évalué comme agent thérapeutique pour le traitement des glioblastomes récidivants ou nouvellement diagnostiqués. Son mode d'action est anti angiogénique mais comporterait un effet direct sur les cellules tumorales et tout particulièrement sur l'adhérence, la migration, l'invasion et la viabilité des cellules tumorales. Les résultats obtenus avec cette molécule dans un essai clinique de phase II se sont cependant avérés modestes. De plus, des études pré cliniques dans des modèles murins de mélanome et de carcinome pulmonaire de Lewis suggèrent qu'à faibles doses le cilengitide administré isolément peut stimuler l'angiogénèse et la croissance tumorale.

L'ambivalence des résultats a conduit l'équipe du laboratoire Biophotonique et Pharmacologie (Pr M. Dontenwill, UMR CNRS 7213, Université Louis Pasteur, Strasbourg) à s'intéresser à un autre récepteur membranaire: l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et aux protéines associées comme marqueurs diagnostiques, pronostiques et cibles thérapeutiques originales pour les tumeurs cérébrales

Mon travail de thèse, effectué dans le cadre d'une collaboration avec cette équipe, s'inscrit dans cette démarche. Il a consisté:

- ▶ À faire une cartographie des cellules exprimant l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les tissus humains non tumoraux de façon à apprécier les risques pour les tissus sains d'une thérapie ciblée.
- ▶ Dans le cas des gliomes de haut grade, à participer à la recherche de variations d'expression des récepteurs en fonction du type tumoral et du grade de façon à évaluer la pertinence de la démonstration du récepteur comme marqueur diagnostique ou pronostique.
- ▶ À étudier l'expression différentielle de cette intégrine par les cellules tumorales et celles du stroma et notamment à vérifier l'existence d'une expression plus élevée de la protéine par les cellules endothéliales des vaisseaux tumoraux que par celle du tissu cérébral sain.
- ▶ Dans le cas de xénogreffes tumorales, de participer à la recherche de variations d'expression des récepteurs en fonction du modèle et de cartographier les cellules exprimant les intégrines en recherchant notamment l'expression des protéines par les cellules du micro environnement tumoral.

PARTIE I: RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

IV. Les intégrines.

IV.A. Définition

Les intégrines constituent une famille de récepteurs allostériques glycoprotéiques membranaires de type I, exprimés de façon constitutive ou après activation par toutes les cellules nucléées de l'organisme et par les plaquettes, les globules rouges en étant a priori dépourvus. Elles jouent un rôle d'adaptateurs entre les cellules d'une part, et la matrice extra cellulaire ou d'autres cellules d'autre part.

Ces récepteurs sont impliqués dans deux activités principales:

L'adhérence des cellules à la matrice extra cellulaire ou à d'autres cellules.

La transmission bidirectionnelle d'informations entre la cellule et son environnement.

Par la même, les intégrines jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'architecture tridimensionnelle des tissus et dans la motilité cellulaire en contrôlant les forces de traction cellulaire et en «interrogeant» en permanence l'environnement.(1)

Par ailleurs, elles régulent des fonctions essentielles telles que la migration, la prolifération, la différenciation et l'apoptose.(2)

Elles contribuent de façon essentielle au développement embryonnaire, à la réponse immune, au trafic leucocytaire, à l'hémostase et à de nombreuses maladies humaines telles que les maladies auto immunes et les cancers.(3)

IV.B. Biologie des intégrines.

IV.B.1. Structure hétérodimérique.

Les intégrines sont des hétérodimères obligatoires constitués de deux sous-unités, une α et l'autre β , liées de façon non covalente.(1)

Chaque sous-unité est constituée d'un domaine extracellulaire NH₂ terminal de grande taille (>700 résidus d'acides aminés), d'un domaine transmembranaire unique (>20 résidus) et d'un domaine intra cellulaire C terminal généralement court (13-70 résidus) qui forment des liens avec les protéines du cytosquelette par l'intermédiaire de protéines d'adaptation cytoplasmiques.(3)

Les sous-unités α et β n'ont pas d'homologie et sont donc totalement distinctes. L'identité de séquence des sous-unités α est d'environ 30%, l'homologie atteint 45% dans le cas des sous-unités β .(1) L'identité de séquence des sous-unités α détermine la spécificité de reconnaissance du ligand, les sous-unités β sont connectées au cytosquelette et interviennent dans de nombreuses voies de signalisation.(4)

Toutes les isoformes possibles ne sont pas observées. Chez l'homme 24 intégrines différentes sont décrites, résultant de la combinaison de 18 sous-unités α ($\alpha 1-11$; αM ; αL ; αX ; αD ; αE ; αV) et 8 sous-unités β ($\beta 1- \beta 8$). Enfin, l'épissage alternatif des ARNm de ces sous-unités augmente encore le nombre potentiel de ces récepteurs.(1)

Les chaînes se combinent dans le réticulum endoplasmique. Les interactions entre les chaînes sont complexes et les défauts d'appariement se traduisent par un déficit d'association. Habituellement il existe un excès intracellulaire de sous-unité β et la quantité de sous-unité α détermine la quantité de récepteurs à la surface. Des sous-unités libres au niveau de la membrane plasmique ne seraient pas observées.(5)

Les sous-unités α et β se lient à des cations divalents. Le rôle de ces derniers dans la physiologie des sous-unités α est inconnu. Ils stabiliseraient les repliements de la molécule. Dans le cas de la sous- unité β ils interviendraient directement dans la liaison au substrat.(6)

La nomenclature des différentes intégrines chez l'homme est résumée dans le tableau ci-dessous.

Gene symbol	Protein name	Synonyms	Gene accession number	Location (chromosome)	Protein accession number
<i>ITGA1</i>	$\alpha 1$	CD49a	NM_181501	5q11.2	P56199
<i>ITGA2</i>	$\alpha 2$	CD49b, $\alpha 2$ subunit of very late antigen 2 (VLA-2)	NM_002203	5q23-q31	P17301
<i>ITGA2B</i>	$\alpha 11b$	GTA, CD41, GP2B, HPA3, CD41b, GPIIb	NM_000419	17q21.32	P08514
<i>ITGA3</i>	$\alpha 3$	CD49c, $\alpha 3$ subunit of VLA-3	NM_002204, NM_005501	17q21.33	P26006
<i>ITGA4</i>	$\alpha 4$	CD49d, $\alpha 4$ subunit of VLA-4	NM_000885	2q31.3	AAB25486
<i>ITGA5</i>	$\alpha 5$	CD49e, fibronectin receptor alpha	NM_002205	12q11-q13	P08648
<i>ITGA6</i>	$\alpha 6$	CD49f, ITGA6B	NM_000210	2q31.1	P23229
<i>ITGA7</i>	$\alpha 7$		NM_002206	12q13	Q86W93
<i>ITGA8</i>	$\alpha 8$		NM_003638	10p13	P53708
<i>ITGA9</i>	$\alpha 9$		NM_002207	3p21.3	Q13797
<i>ITGA10</i>	$\alpha 10$		NM_003637	1q21	O75578
<i>ITGA11</i>	$\alpha 11$		NM_001004439, NM_012211	15q23	Q9UKX5
<i>ITGAD</i>	αD		NM_005353	16p11.2	Q13349
<i>ITGAE</i>	αE	CD103, human mucosal lymphocyte antigen 1 α	NM_002208	17p13	P38570
<i>ITGAL</i>	αL	CD11a (p180), lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) α subunit	NM_002209	16p11.2	P20701
<i>ITGAM</i>	αM	Mac-1, CD11b, complement receptor 3 (CR3) subunit	J03925, NM_000632,	16p11.2	P11215
<i>ITGAV</i>	αV	CD51, MSK8, vitronectin receptor α (VNR α)	NM_002210	2q31-q32	P06756
<i>ITGAX</i>	αX	CD11c, CR4 subunit	NM_000887	16p11.2	P20702
<i>ITGB1</i>	$\beta 1$	Fibronectin receptor β , CD29, MDF2, MSK12	BC020057	10p11.2	P05556
<i>ITGB2</i>	$\beta 2$	Leukocyte cell adhesion molecule, CD18, CR3 subunit, CR4 subunit	NM_000211	21q22.3	P05107
<i>ITGB3</i>	$\beta 3$	CD61; GP3A; GPIIIa, platelet glycoprotein IIIa	NM_000212	17q21.32	P05106
<i>ITGB4</i>	$\beta 4$	CD104	NM_000213	17q25	P16144
<i>ITGB5</i>	$\beta 5$		NM_002213	3q21.2	P18084
<i>ITGB6</i>	$\beta 6$		NM_000888	2q24.2	P18564
<i>ITGB7</i>	$\beta 7$		NM_000889	12q13.13	P26010
<i>ITGB8</i>	$\beta 8$		NM_002214	7p15.3	P26012

Tableau 1 : Les différentes sous-unités d'intégrines chez l'homme (emprunté à Takada et al, 2007)

Par ailleurs les associations entre les sous-unités α et β observées chez l'homme sont résumées dans le schéma ci-dessous. A noter que la sous-unité $\beta 1$ peut se lier à 12 sous-unités α différentes alors que la sous-unité $\alpha 5$ ne peut former de dimère qu'avec la sous-unité $\beta 1$.(1)

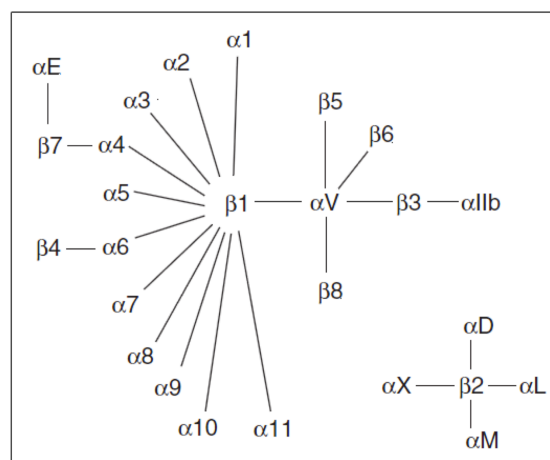


Schéma 1 : Emprunté à Takada et al, genome biol 2007: Représentation des différents hétérodimères d'intégrine possibles. Les sous-unités ayant la capacité de se lier les unes aux autres sont reliées par un trait continu.

IV.B.2. Les intégrines et leurs ligands.

La liste des ligands est longue et inclut les constituants majeurs de la matrice extra cellulaire tels que les collagènes, la fibronectine ou les laminines. La spécificité de la liaison des intégrines aux molécules de la matrice extra cellulaire résulte de cette combinatoire, de l'expression différentielle des différentes intégrines, de l'affinité de ces dernières pour leur(s) substrat(s), enfin, de l'accessibilité de ces derniers.

Certaines intégrines se lient aux mêmes ligands mais avec des affinités différentes alors qu'un même ligand peut se lier à différentes intégrines.

La liaison de l'intégrine avec son ligand assure la transmission du signal à l'intérieur de la cellule.(7)

Les intégrines $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$ et $\alpha 11\beta 1$ sont les récepteurs principaux du collagène, les intégrines $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$ et $\alpha 7\beta 1$ ceux de la laminine, enfin les intégrines $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$, $\alpha 11\beta 3$ et $\alpha v\beta 3$ les récepteurs majeurs de la fibronectine. La liaison des intégrines aux ligands est régulée par la présence dans ces derniers de courtes séquences peptidiques de reconnaissance. Le ligand prototypique, la fibronectine, contient la séquence RGD (arginine-glycine-acide aspartique). Cette dernière est également présente dans un tiers environ des ligands connus se liant aux intégrines comme la vitronectine et le fibrinogène.(4)

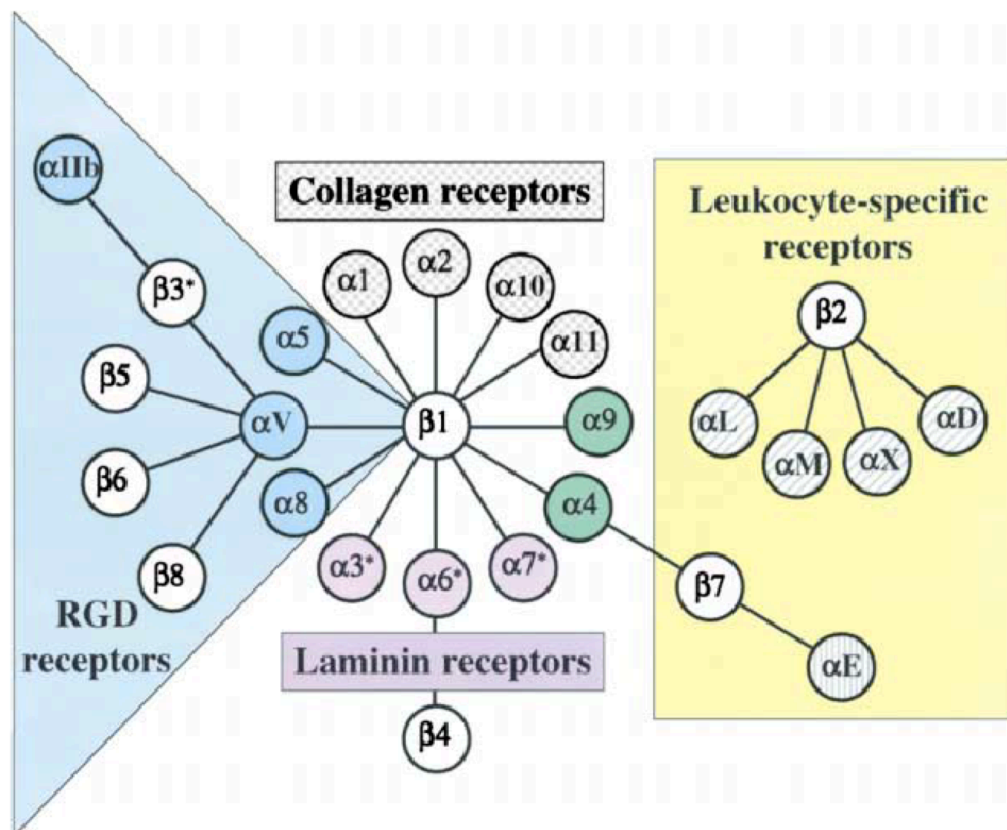


Schéma2: emprunté à Hynes 2002 représentant les intégrines et leurs ligands.

Les intégrines sont largement exprimées. Toute cellule nucléée possède une signature intégrine spécifique. L'expression des intégrines peut être restreinte à certains types cellulaires ou tissulaires : $\alpha 11\beta b$ aux niveau des plaquettes, $\alpha 6\beta 4$ au niveau des kératinocytes, $\alpha E\beta 7$ au niveau des lymphocytes T, des cellules dendritiques et des mastocytes des muqueuses, $\alpha 4\beta 1$ aux leucocytes, $\alpha 4\beta 7$ par une variété de lymphocytes T mémoire et la famille des intégrines $\beta 2$ aux leucocytes. D'autres intégrines sont plus largement distribuées. Dans tous les cas l'expression de l'intégrine est dynamique et se modifie lorsque les cellules sont extraites de leur environnement normal.(8)

IV.B.3.Conformation des intégrines.

Les études en microscopie électronique suggèrent que les deux sous-unités sont disposées de manière à former une tête globuleuse extracellulaire reliée à la membrane par une paire de «pattes»allongées qui s'étendent à travers la bicouche lipidique. Les études cristallographiques du domaine extracellulaire de l'intégrine $\alpha v\beta 3$ ont montré que la tête plutôt que de se tenir droite est fortement pliée en v renversé qui rapproche le site potentiel de liaison au ligand de la membrane. La structure cristallographique du même domaine obtenu après liaison d'un petit ligand contenant la séquence RGD, le cilengitide, est superposable. Bien que la liaison du ligand modifie peu la structure du récepteur, l'hypothèse actuellement privilégiée est que le fonctionnement des intégrines implique un changement de forme de leur domaine extracellulaire écartant le site de liaison de la membrane plasmique, rendant ce dernier plus accessible.(9)(10)

Les changements de conformation des domaines extracellulaires des récepteurs dépendent de la concentration des cations extracellulaires d'une part et de changements conformationnels du domaine cytoplasmique du récepteur, à la suite de la liaison de protéines intracellulaires telles que la taline et les kindlines 1 et 2 d'autre part.(6)

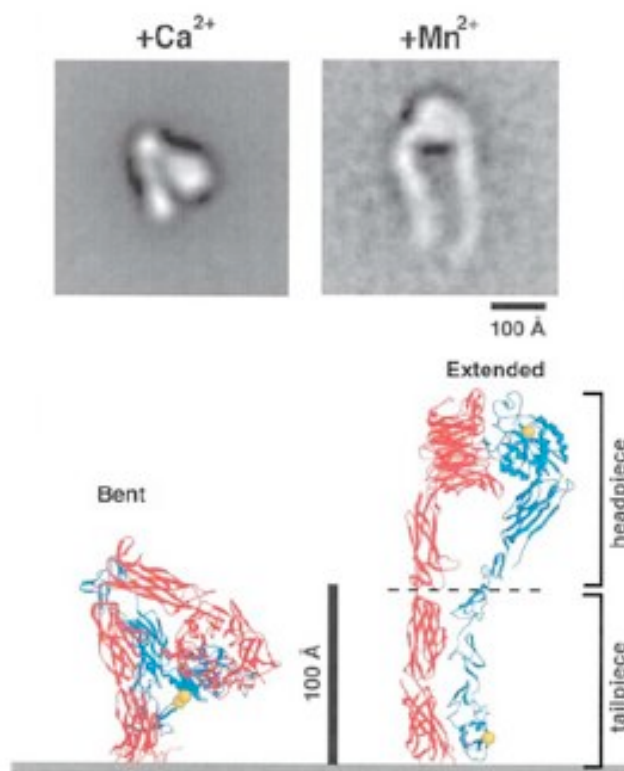


Schéma 3: emprunté à Takagi et Springer (2004): conformation de l'intégrine $\alpha\beta3$ en fonction de la présence de Ca^{2+} ou Mg^{2+} . En présence de Ca^{2+} l'intégrine est dans une conformation inactive, la tête courbée. En présence de Mg^{2+} , l'intégrine change de conformation, la tête se redresse. Cette activation permet la liaison au ligand.

IV.B.4. Signalisation des intégrines et points d'ancrage.

Des événements intracellulaires, eux-mêmes éventuellement sous contrôle extracellulaire, peuvent donc modifier l'affinité de l'intégrine pour son ligand. (signalisation inside-out).(11)

Le degré d'affinité à l'état basal d'une intégrine pour son substrat varie en fonction du type cellulaire. C'est ainsi que les récepteurs de la membrane des kératinocytes de l'assise basale épidermique qui participent à la jonction des cellules épithéliales aux membranes basales sont activés de façon constitutive alors que certains ne sont exprimés qu'après activation comme c'est le cas de nombreux récepteurs intégrines des cellules immunitaires.(12)

Outre une modulation d'affinité résultant de la modification de conformation des récepteurs, les cellules utilisent également pour contrôler l'intensité des liaisons établies entre les intégrines et leurs substrats, une modulation d'avidité résultant de variations du nombre de récepteurs impliqués dans la liaison et donc de l'état d'agrégation de ces derniers. Les molécules d'intégrine dispersées dans la membrane ont moins de chance de former des liaisons fortes avec leur ligand que lorsqu'elles sont agrégées (effet velcro) et ceci même si leur nombre et leur affinité individuelle pour leur substrat ne varient pas. Les voies de signalisation intracellulaires contrôlent également ce processus.(9)

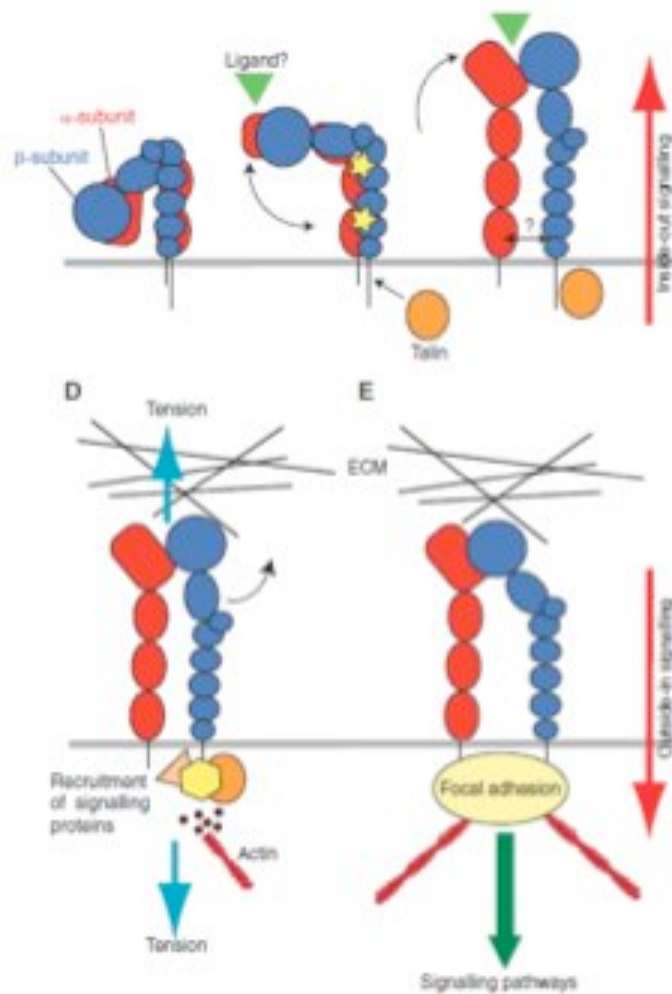


Schéma 4 emprunté à Janet(2011): L'intégrine est un hétérodimère constitué d'une sous-unité α (rouge) et une sous-unité β (bleue). Inactive, l'intégrine est repliée avec un site liant le ligand dans une conformation de basse affinité. La liaison du ligand entraîne une dissociation des interactions entre α et β au niveau du pied et l'activation du récepteur. La taline va se lier au domaine intracytoplasmique libéré de β . L'intégrine est alors active. Des protéines cytoplasmiques sont ensuite recrutées pour former les points focaux d'adhérence. La régulation de l'affinité de l'intégrine pour son ligand est régulée par un signal 'inside-out' qui met en jeu les partenaires cytoplasmiques de l'intégrine. Les interactions entre la matrice extra cellulaire et la cellule contribuent à la régulation outside-in.

IV.B.5.Intégrines et plateforme de signalisation.

L'interaction ligand/récepteur induit l'agrégation des intégrines au sein de complexes membranaires multiprotéiques focaux (<1µm), appelés complexes d'adhérence ou contacts focaux. Ces derniers servent non seulement de points d'ancrage de la cellule à la matrice extra cellulaire mais sont également des sites importants de transduction du signal.

Dépourvus d'activité enzymatique, les domaines cytoplasmiques des sous-unités α ont besoin de molécules adaptatrices pour l'intégration et la transmission des signaux.(13)

Un «adhésome» intégrine a récemment été défini comprenant 156 protéines et établissant entre elles près de 700 interactions. Quarante deux adaptateurs potentiels ont été identifiés. Ils se classent en trois grandes catégories:

- ▶ Des protéines de structures comme la taline, la filamine ou la tensine qui se lient à l'actine F couplant ainsi les intégrines au cytosquelette.
- ▶ Des protéines d'échafaudage comme la paxilline qui forment des sortes de plateformes permettant de lier d'autres composants des contacts focaux.
- ▶ Des adaptateurs possédant des activités catalytiques incluant entre autre des kinases FAK (focal adhesion kinase), ILK (integrin linked kinase) ou Src (sarcome viral oncogen homolog) ou des phosphatases telles que PP2A (protein phosphatase A2) ou SHP (domain-containing phosphatase 2).(14)

Ces structures très complexes permettent de coupler la matrice extra cellulaire et le cytosquelette et jouent un rôle primordial dans la migration cellulaire. Les points focaux d'adhérence sont des complexes dynamiques aux fonctions variées comprenant la migration cellulaire, la régulation de la survie cellulaire, la prolifération cellulaire, l'invasion.(15)

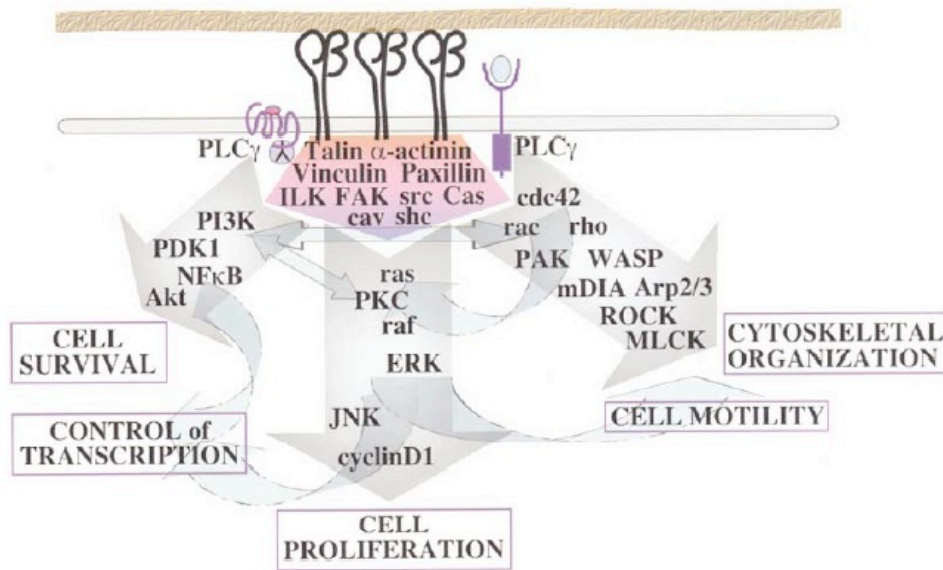


Schéma 5 emprunté à Hynes (2002): Structure d'un point focal d'adhérence, activation des voies de signalisation via ILK et FAK, transduction du signal et rôles de l'intégrine.

Par ailleurs les complexes multimoléculaires comportent d'autres récepteurs notamment ceux de facteurs de croissance comme ceux de l'EGF. L'activation de ces différents récepteurs se traduit par des fonctions uniques différentes de la simple addition des effets de l'activation de chacun des récepteurs.

IV.B.6.Intégrines et internalisation.

Les intégrines peuvent être internalisées par endocytose. Les vésicules internalisées fusionnent avec les endosomes précoces localisés à la périphérie de la cellule puis avec les endosomes tardifs juxta nucléaires. De là, elles sont recyclées vers la membrane plasmique ou dirigées vers les lysosomes pour être dégradées.

Quatre voies d'endocytose sont habituellement reconnues:

- ▶ l'endocytose médiée par la clathrine
- ▶ l'endocytose médiée par les cavéoles
- ▶ l'endocytose indépendante de la clathrine et de la cavéoline
- ▶ la micropinocytose.

L'endocytose des intégrines ferait appel principalement aux deux premières voies. Ce trafic moléculaire permet le contrôle directionnel par la cellule de son adhérence au substrat et pas là même de son étalement et de sa migration.(16)(17)

Il pourrait par ailleurs être utilisé pour la délivrance aux cellules tumorales de molécules thérapeutiques tels par exemple que des oligonucléotides antisens.(18)

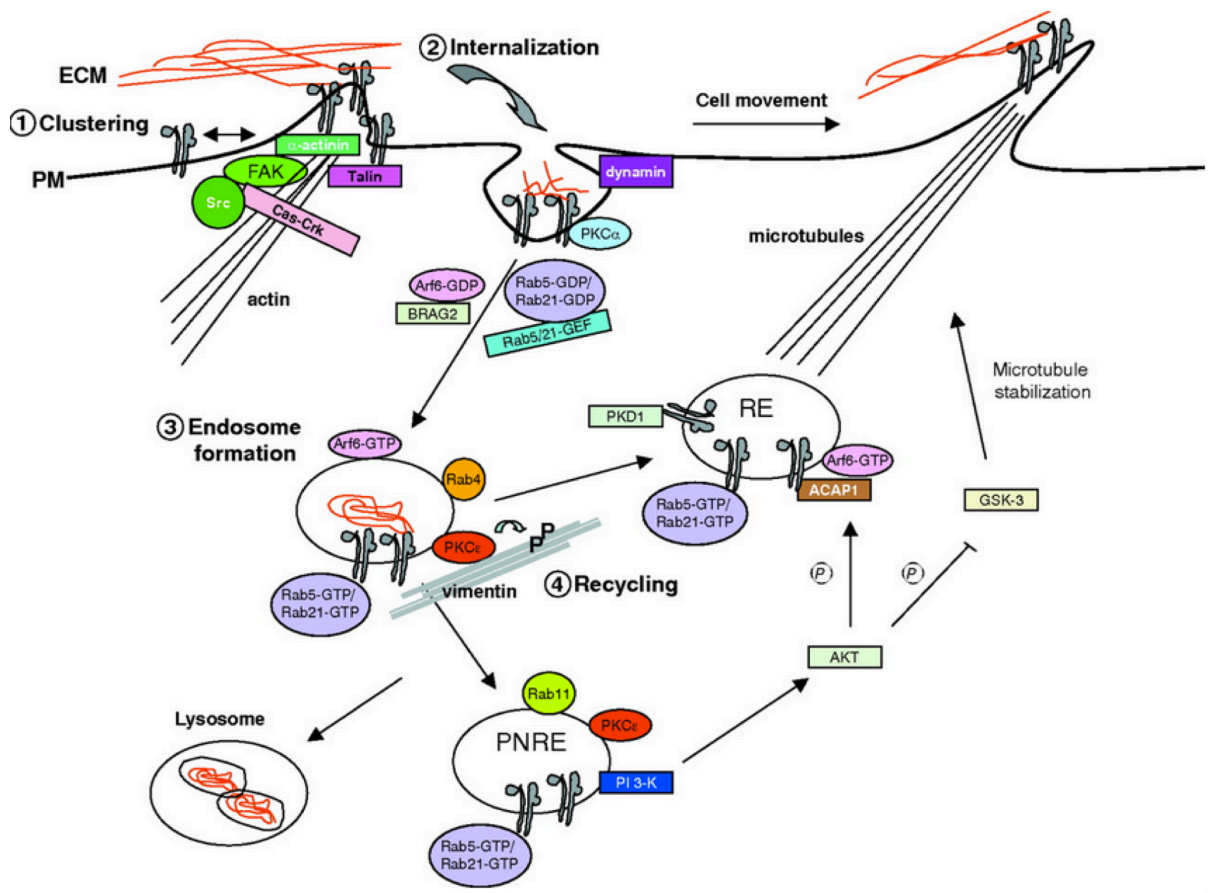


Schéma 6 emprunté à Pelligen (2006): Il représente un modèle de trafic des intégrines au sein de la cellule. L'internalisation pourrait être couplée au démontage des points focaux dans lesquels la connexion à l'actine est perdue. $\beta 1$ est internalisé à l'aide de PKC α activé qui se lie à la queue cytoplasmique. A partir de ces endosomes et des endosomes périnucléaires le retour de $\beta 1$ vers la membrane plasmique est régulé par des activités GTPase, Rab11, Rab21 et ARF6. Les intégrines peuvent aussi revenir à la membrane via une boucle courte impliquant Rab4 et PKD1. Le retour est de même dépendant de la voie PI-3-K-AKT_GSK3.

IV.C.Intégrines et cancer.

IV.C.1.Modifications de l'expression des intégrines.

Au cours de la progression tumorale, l'expression des intégrines est souvent dérégulée. Les altérations observées sont complexes et dépendent du tissu d'origine de la tumeur, du type histologique de cette dernière et du stade de la progression tumorale. Si les sur-expressions sont fréquentes, des pertes d'expression sont également observées.(19)

Les intégrines $\alpha 5\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha 6\beta 6$, habituellement faiblement exprimées ou non détectables dans la plupart des tissus épithéliaux, sont fortement surexprimées dans les tumeurs correspondantes.(20)

L'intégrine $\alpha 6\beta 4$ n'est pas exprimée par les thyrocytes normaux mais l'est dans les carcinomes thyroïdiens invasifs.(21) A l'inverse l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ disparaît de la surface de lignées cellulaires transformées par le virus de sarcome de Rous(22) et l'expression du récepteur réduit le caractère tumorigène de lignées carcinomateuses.(23)

Plusieurs études ont montré l'existence de corrélations entre le niveau d'expression de certaines intégrines, la progression tumorale et la survie des patients.(20)

Tumour type	Integrins expressed	Associated phenotypes
Melanoma	$\alpha v\beta 3$ and $\alpha 5\beta 1$	Vertical growth phase ^{35,172-174} and lymph node metastasis ^{173,175}
Breast	$\alpha 6\beta 4$ and $\alpha v\beta 3$	Increased tumour size and grade ¹⁷⁶ , and decreased survival ¹⁷⁷ ($\alpha 6\beta 4$). Increased bone metastasis ^{36-38,64} ($\alpha v\beta 3$)
Prostate	$\alpha v\beta 3$	Increased bone metastasis ³⁹
Pancreatic	$\alpha v\beta 3$	Lymph node metastasis ⁴⁰
Ovarian	$\alpha 4\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$	Increased peritoneal metastasis ¹⁷⁸ ($\alpha 4\beta 1$) and tumour proliferation ¹⁷⁹ ($\alpha v\beta 3$)
Cervical	$\alpha v\beta 3$ and $\alpha v\beta 6$	Decreased patient survival ^{41,100}
Glioblastoma	$\alpha v\beta 3$ and $\alpha v\beta 5$	Both are expressed at the tumour-normal tissue margin and have a possible role in invasion ¹⁸¹
Non-small-cell lung carcinoma	$\alpha 5\beta 1$	Decreased survival in patients with lymph node-negative tumours ¹⁸²
Colon	$\alpha v\beta 6$	Reduced patient survival ¹⁰⁹

Tableau 2 emprunté à Desgroseilliers (2010): implication des intégrines dans la progression tumorale.

IV.C.2.Anomalies génétiques

Au cours des cancers, les altérations des intégrines ne portent pas exclusivement sur des variations d'expression génique. En effet, des mutations ponctuelles ou des délétions/ amplifications ont également été décrites.

La lignée de carcinome épidermoïde peu différencié SCC4 qui provient d'un carcinome lingual, s'est révélé hétérozygote pour la mutation ponctuelle T188I (T: thréonine;I: isoleucine) dans la sous-unité $\beta 1$. Cette modification se traduit par une activation constitutive du récepteur indépendante de la liaison aux ligands. Après transfection du gène de l'intégrine $\beta 1$ sauvage, les cellules de la lignée SSC4 se différencient, indiquant par là que la mutation peut participer au phénotype néoplasique. (24)

Enfin, dans des modèles murins, une isoforme tronquée de l'intégrine plaquettaire αIIb , absente des tissus prostatiques normaux, est détectée dans les adénocarcinomes prostatiques et sur exprimée au niveau des métastases.(25)

IV.C.3.Intégrines et facteurs de croissance.

Tant au niveau des cellules tumorales que de celles de leur micro environnement , l'activité des intégrines est indissociable de celle des récepteurs des facteurs de croissance et des cytokines et de leur voies de signalisation respectives.(26) L'activité des intégrines dépend également des variations de composition de la matrice extracellulaire (signalisation outside – in).

IV.C.4.Coopération des intégrines et oncogènes.

Les intégrines ne sont pas des oncogènes mais pour initier la croissance et l'invasion tumorales certains de ces derniers requièrent pour s'exprimer l'implication des voies de signalisation des intégrines. Ceci pourrait s'expliquer par le rôle important des intégrines dans le maintien des cellules souche tumorales.(27)

IV.C.5.Rôle des intégrines dans l'angiogenèse et la lymphangiogenèse tumorale.

Les intégrines sont exprimées à la fois par les cellules tumorales et celles du stroma (cellules endothéliales vasculaires, cellules périvasculaires, fibroblastes, certaines cellules issues de la moelle hématopoïétique telles que celles de la lignée monocyte macrophage et les plaquettes). (20)

L'angiogénèse et la lymphangiogénèse, dont on connaît toute l'importance pour la croissance tumorale et la progression métastatique par voie sanguine et lymphatique, sont toutes deux régulées pour partie par les intégrines. L'angiogénèse dépend principalement des intégrines $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 9\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ and $\alpha v\beta 5$. Le rôle de chacune de ces intégrines est débattu.(28)

L'intégrine $\alpha 9\beta 1$ intervient dans la lymphangiogénèse normale au cours du développement. Les intégrines $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 1\beta 1$ sont pour leur part impliquées dans la régulation de la lymphangiogénèse tumorale.(29) Il est difficile de dire aujourd'hui laquelle des intégrines serait la meilleure cible pour une thérapie antivasculaire ciblée.

IV.C.6. Les intégrines dans la progression tumorale et développement des métastases.

Les intégrines exprimées par les cellules tumorales contribuent à la progression tumorale et au développement des métastases en augmentant les capacités de migration, d'invasion et de prolifération des cellules tumorales ainsi que leur survie.

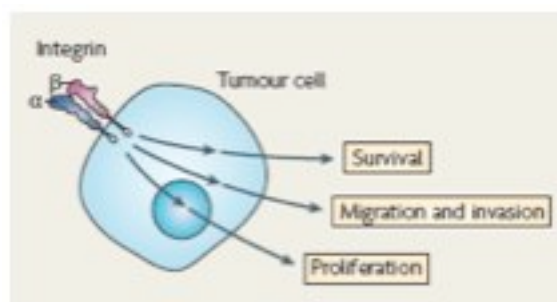


schéma 7 emprunté à Desgroseiller (2010) : rôles de l'intégrine dans la cellule tumorale.

L'adhérence des cellules à la matrice extracellulaire fournit les forces de traction nécessaires à l'invasion par les cellules tumorales. Les intégrines contribuent également à la migration cellulaire en régulant la localisation et l'activité des métalloprotéinases matricielles (MMP2) et de l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA). La migration cellulaire médiée par les intégrines fait habituellement appel à la voie de signalisation des kinases de la famille FAK et Src. La régulation du recyclage des récepteurs est également essentielle pour l'invasion. Des différences dans les voies impliquées dans le recyclage des intégrines peuvent faire la différence entre une migration au hasard plutôt qu'une migration persistante et dirigée. L'interaction des intégrines avec leurs ligands contrôle l'expression de protéines clés du cycle cellulaire comme la cycline D1 et la famille des inhibiteurs de s kinase cycline dépendant.(16)

Les intégrines contrôlent également la survie cellulaire. Les intégrines activées inhibent la cascade de signalisation pro apoptotique initiée par l'anoïkis ou la mort cellulaire médiée par les intégrines.(20)(30)

IV.C.7.Intégrines et hypoxie

Pour envahir localement ou pour former des métastases, les cellules tumorales doivent rompre leurs interactions avec les cellules environnantes, moduler leurs liaisons avec la matrice extracellulaire et prévoir le remodelage de cette même matrice. Des études suggèrent un rôle de l'hypoxie et du facteur de transcription HIF-1 α dans le contrôle de l'adhérence cellulaire aux protéines de la matrice .En effet, il a été mis en évidence une implication de l'hypoxie dans la modulation des voies de signalisation de l'adhérence cellulaire, particulièrement dans la signalisation médiée par les intégrines. Inversement, l'implication des voies de signalisation de l'adhérence cellulaire dans le contrôle de HIF-1 α et dans la régulation de la réponse et l'adaptation cellulaire en situation d'hypoxie n'est pas encore clairement établie. (31)(32)

V.Biologie des gliomes.

V.A.Définition

Les gliomes sont les tumeurs primitives encéphaliques les plus fréquentes chez l'adulte. Ils sont classés en fonction des ressemblances observées entre les cellules tumorales qui les constituent et les différentes variétés des cellules gliales normales.

C'est ainsi que l'OMS reconnaît (classification 2007) des astrocytomes, des oligodendrogliomes, des épendymomes et des tumeurs à différenciation mixte (oligoastrocytomes par exemple). Chez l'adulte, les gliomes les plus fréquents infiltrent le parenchyme cérébral de façon diffuse. Parmi ces derniers sont reconnus des gliomes de bas grade (OMS grade II) dont la croissance est habituellement lente et des gliomes de grade élevé (OMS grade III et IV) dont la croissance est rapide. La variété tumorale la plus agressive et la plus fréquente est également appelée glioblastome (OMS grade IV).(33)

Le système de grading est basé sur la reconnaissance de caractéristiques morphologiques relativement subjectives telles que les atypies nucléaires, le nombre des mitoses, la prolifération du lit micro circulatoire et la nécrose massive ou serpiginieuse, Le grade tumoral a une valeur pronostique importante mais paraît moins utile pour l'optimisation des thérapies. (33)

V.B.Hypothèses sur les origines des gliomes.

La question de l'origine des gliomes reste entière et des arguments existent tant en faveur de la transformation néoplasique de cellules gliales différenciées, en vertu de leurs ressemblances phénotypiques, que de celles de progéniteurs sur la base de caractéristiques communes telles que l'auto renouvellement, la différenciation et l'expression de marqueurs phénotypiques embryonnaires. De nombreuses données semblent cependant indiquer que les cellules tumorales reproduisent sur un mode pathologique la biologie des précurseurs.(36)

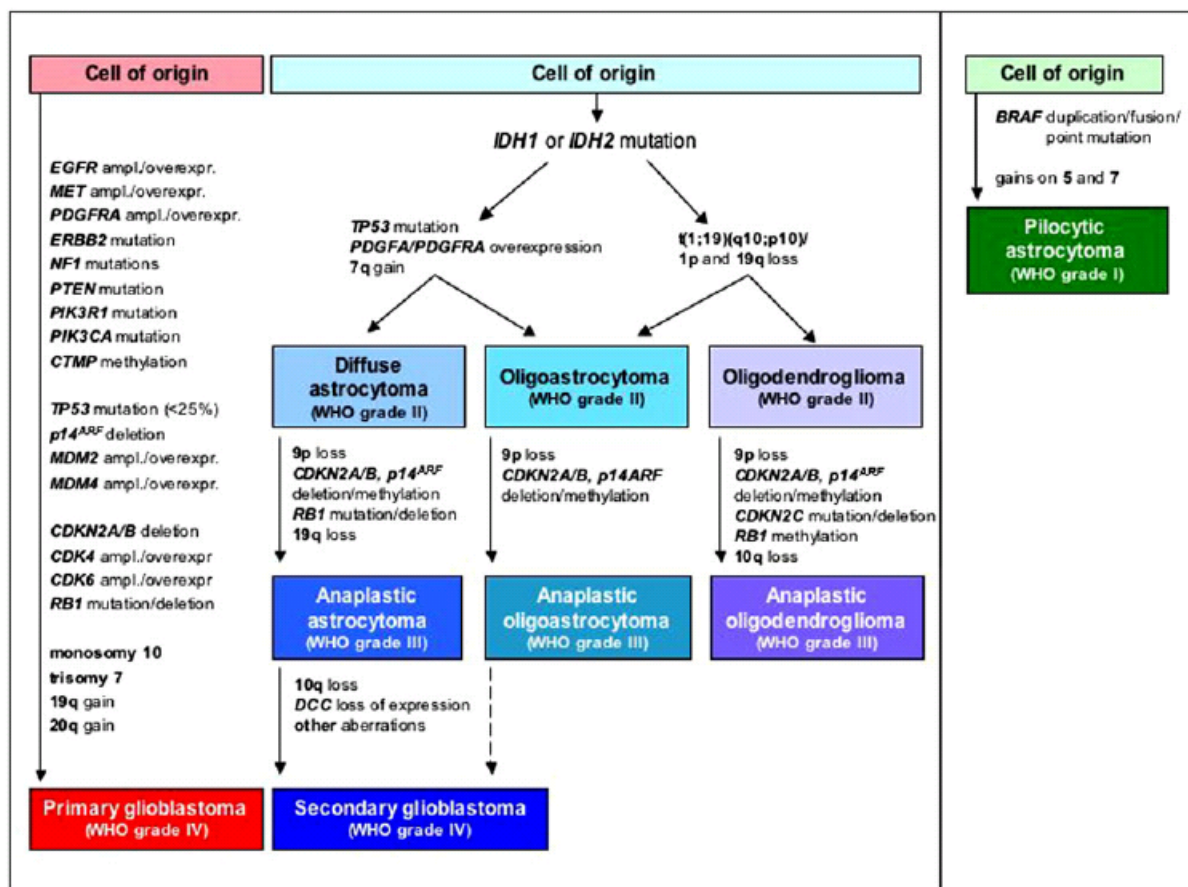


Tableau 3: emprunté à Riemenschneider (2010): origine des gliomes.

V.C.Gliomes malins et anomalies moléculaires

Depuis les années 1980, les travaux de recherche biologique menés dans les gliomes visent notamment leur caractérisation moléculaire. En effet, de nombreuses équipes s'efforcent de découvrir et de décrire les altérations du génome (acide désoxyribonucléique, ADN), du transcriptome (acide ribonucléique messagers, ARNm), du protéome (protéines) et de l'épigénome (modification épigénétique de l'ADN comme la méthylation des promoteurs des gènes), d'apprécier la fréquence de ces altérations moléculaires; et d'évaluer leur pertinence et leur intérêt bioclinique. L'analyse de l'ensemble de ces biomolécules permet ainsi d'établir une véritable carte d'identité moléculaire de la tumeur.

Au sein des glioblastomes, deux principaux types génétiques sont individualisés correspondant à deux entités évolutives:

Les glioblastomes primaires sont classiquement caractérisés par:

- ▶ Une amplification du gène du récepteur au facteur de croissance épithéliale (EGFR) ;
- ▶ Une trisomie du chromosome 7 ;
- ▶ Une délétion homozygote du gène CDKN2A impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire;
- ▶ La perte du chromosome 10

Les glioblastomes secondaires ont en commun avec les glioblastomes primaires :

- ▶ une trisomie du chromosome 7;

Les oligodendrogliomes sont caractérisés par les altérations moléculaires suivantes:

- ▶ Translocation t(1 ;19) (q10 ;p10).
- ▶ L'oligodendrogliome anaplasique combine habituellement la perte combinée 1p19q et les mêmes altérations moléculaires que celles observées dans les tumeurs astrocytaires de haut grade (délétion p16^{INK4A}, monosomie du 10 et mutations de PTEN).
- ▶ Une polysomie du 7 et une monosomie du 10 sont rencontrés dans les oligodendrogliomes anaplasiques sans perte 1p19q.(34)(35)(36)(37)

V.D.Gliomes malins et invasion

D'autres facteurs que le type cellulaire et le grade influencent la morbidité et la survie. La localisation de la tumeur qui commande les symptômes d'accompagnement et limite les possibilités de résection chirurgicale, les thérapies associées et l'âge sont d'autres facteurs pronostiques.(37) La croissance des gliomes de haut grade est à la fois expansive et infiltrante. Le caractère infiltrant constitue un obstacle thérapeutique majeur. Il se reflète dans les données autopsiques montrant que les glioblastomes s'étendent au de-là des limites du lobe d'origine dans 45% des cas, infiltrent tout un hémisphère dans 25% des cas et l'hémisphère controlatéral dans 25 % des cas Dans les récurrences, les cellules tumorales sont observées dans l'hémisphère controlatéral dans 80% des cas. Les gliomes de haut grade infiltrent sous la forme de cellules isolées ou en petits groupes, le long des faisceaux de substance blanche ou de la face abluminale des vaisseaux. Dans une étude autopsique, Burger a montré en 1989 que la zone périphérique d'infiltration sous la forme de cellules isolées ou en petits groupes est épaisse en moyenne de 3 centimètres. (38)

V.E.Gliomes malins et vascularisation.

Par ailleurs, les gliomes de haut grade sont parmi les tumeurs humaines les plus vascularisées et la prolifération endothéliale est une des caractéristiques essentielles de ces types tumoraux. Les études portant sur la vascularisation des glioblastomes révèlent cependant qu'au sein des plages tumorales compactes de vastes territoires peuvent être discernés dans lesquels la densité vasculaire n'est pas différente de celle de la substance blanche normale ou du cortex. Dans ces territoires des «points chauds», caractérisés par une densité vasculaire élevée, sont cependant observés. La vascularisation des glioblastomes est très hétérogène. Dans les territoires d'infiltration, l'hyperplasie vasculaire ne se développe que lorsque la densité des cellules tumorales devient élevée. Au niveau du cortex, l'angiogénèse ne se développe qu'après complète infiltration de ce dernier par la tumeur. Tous ces faits suggèrent que la croissance tumorale dépend du réseau vasculaire normal pré existant dans les territoires d'infiltration sous forme de cellules isolées et d'une néo angiogénèse dans les zones de croissance compacte.(39)

V.F.Traitements des gliomes de haut grade.

V.F.1.Principes généraux.

La prise en charge des gliomes malins repose non seulement sur des thérapies antitumorales mais également sur des traitements symptomatiques et des soins de support. Le traitement standard des glioblastomes multiformes consiste en une chirurgie de résection la plus large possible en fonction de la localisation tumorale suivie d'une radiothérapie associée à une chimiothérapie concomitante et adjuvante par le temozolomide. La localisation de la tumeur, le statut clinique du patient, le nombre de lésions, la présence de signes d'hypertension intra crânienne ou d'engagement cérébral sont autant de facteurs pris en considération dans la décision de réaliser une biopsie de la tumeur ou une résection large de cette dernière.(38)(40)

L'étendue de la résection tumorale et le volume tumoral résiduel étant corrélés à la survie, une chirurgie de résection est préférée chaque fois que réalisable.(41)

La prise en charge des gliomes de grade III est moins standardisée.

Traitements actuels des gliomes malins	
Type de tumeur	Thérapie
Tumeurs diagnostiquées primitives	
Glioblastome (grade IV)	Chirurgie d'exérèse maximale, radiothérapie et TMZ, implants imprégnés de carmustine dans la cavité d'exérèse.
Gliomes anaplasiques	Chirurgie d'exérèse maximale, puis pas de traitement standard : radiothérapie et TMZ, inclusion dans les essais thérapeutiques implants imprégnés de carmustine dans la cavité d'exérèse.
Gliomes récurrents	
	Discussion en RCP. Reprise neuro chirurgicale si possible, implants de carmustine (gliadel), ré-irradiation, chimiothérapie de deuxième ligne (bélustine, carmustine, schéma PCV, carboplatine +etoposide, irinotécan, bévacizumab, TMZ)

Tableau 4: inspiré de Wen PY (2008) représentant les modalités thérapeutiques actuelles des gliomes de haut grade(43)

V.F.2. Thérapies ciblées.

Le progrès des connaissances de la gliomagenèse, l'identification d'aberrations des voies de signalisation et de défauts moléculaires dans certains sous-types tumoraux, la reconnaissance du rôle du microenvironnement dans la progression et l'invasion tumorales conduisent à espérer qu'une thérapeutique raisonnée guidée par les anomalies moléculaires puisse améliorer le pronostic de ces tumeurs. Les voies de signalisation principales et les agents thérapeutiques correspondants sont résumés schéma 8.(21)(42)

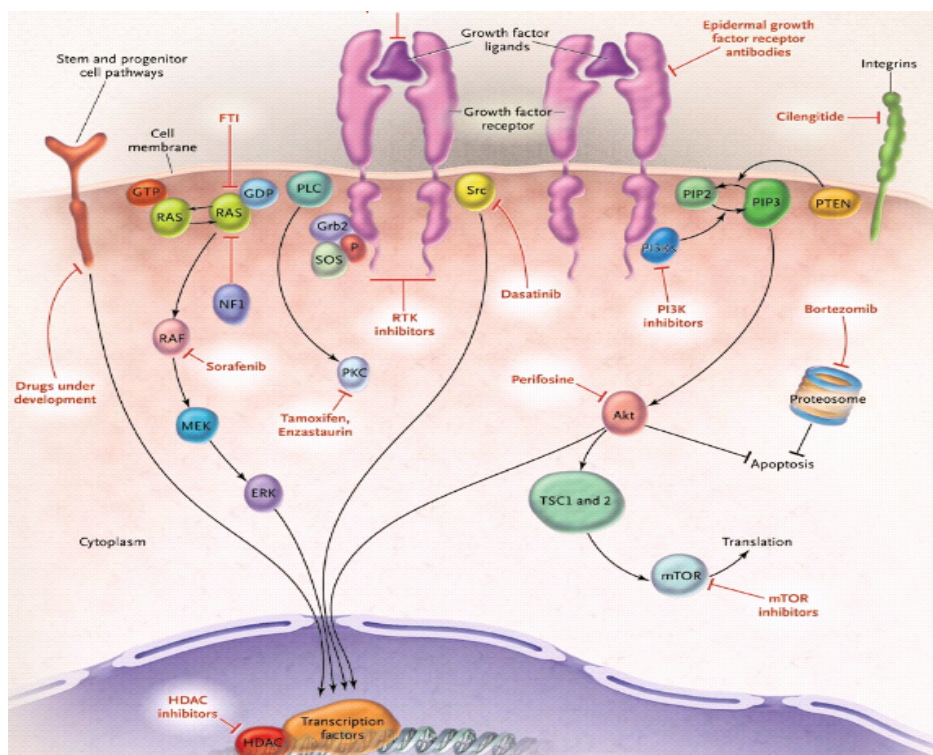


Schéma 8: nouvelles thérapies

Les thérapies ciblées les plus explorées sont les inhibiteurs des facteurs de croissance et de leurs récepteurs à activité tyrosine kinase et les agents antiangiogéniques.

V.F.2.a. Les inhibiteurs des facteurs de croissance et de leurs récepteurs à activité tyrosine kinase

Une des voies principales ciblée par les agents thérapeutiques développés ces dernières années dans les gliomes malins est représentée par les tyrosines kinases activées par l'EGF ou le PDGF.(42) Le degré de malignité des tumeurs gliales semble en effet corrélé à l'amplification de l'EGFR. Cette amplification s'accompagne souvent de réarrangements conduisant à l'expression d'une forme tronquée du récepteur (EGFRvIII), spontanément active. Le rôle du PDGF a été également souligné dans la progression tumorale des tumeurs

gliales malignes.(43)(44) Ces deux facteurs de croissance (EGF et PDGF), par le biais de leurs récepteurs, jouent un rôle important dans la transduction du signal mitotique et l'oncogénèse. L'imatinib est un inhibiteur de tyrosine kinase du récepteur au PDGF (PDGFR), de c-kit et de l'abl-receptor. Compte tenu de l'importance du PDGF dans la croissance des glioblastomes, cette molécule a donc suscité un intérêt en neuro-oncologie. Malheureusement, les résultats d'une phase II menée sur des glioblastomes en récurrence n'ont pas montré d'efficacité significative ni en termes d'intervalle libre de progression ni en termes de survie (45), peut-être en raison d'un faible passage au travers de la barrière hémato-encéphalique de la molécule.(46)

Le géfitinib (47) et l'erlotinib (48) sont deux inhibiteurs oraux de l'EGR. Ces molécules ont également suscité un grand intérêt pour le traitement des tumeurs gliales en raison du succès de ces molécules dans certains cancers poumon (49) et de l'importance de la voie de l'EGF dans les gliomes. Le gefitinib n'a pas donné de résultats convaincants en monothérapie dans les glioblastomes en récurrence (47)(49), et l'erlotinib a donné des résultats négatifs dans une phase 2 randomisée conduite sur des glioblastomes en récurrence (50). La découverte dans les cancers du poumon de mutations spécifiques de l'EGFR au niveau du site ATP se comportant comme des facteurs prédictifs de la réponse aux inhibiteurs de tyrosines kinases (51) a relancé l'espoir qu'une telle approche puisse s'appliquer à un sous-groupe de glioblastomes. En fait, aucune mutation du site ATP n'a été retrouvée dans une série de gliomes, et la surexpression de l'EGFR ou de son variant EGFRvIII semble n'avoir aucun impact sur le taux de réponse ou la survie sans progression dans un essai randomisé (52). Il a été suggéré que la surexpression de l'EGFR en association avec la perte du gène PTEN (qui est impliqué dans le contrôle de la voie Akt) constituerait un facteur de bonne réponse au traitement (53), mais cette étude n'a pas été confirmée (54)(55).

V.F.2.b.Les antiangiogéniques

L'angiogenèse est fortement activée dans les gliomes malins par des cytokines pro-angiogéniques sécrétées par les cellules tumorales en situation d'hypoxie, comme VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), le bFGF, l'angiopoïétine-1 ou le PDGF. L'activation des récepteurs membranaires correspondants (notamment le VEGFR2 pour le VEGF) entraîne une cascade de réactions conduisant à la formation de nouveaux vaisseaux. Les cellules endothéliales activées entrent en division et migrent pour créer les nouveaux vaisseaux, processus favorisé par la dégradation de la matrice extracellulaire par les protéases et la liaison à certaines intégrines, notamment $\alpha\beta3$. Les principaux médicaments actuellement en développement clinique ciblent le VEGF lui-même, son récepteur (principalement le VEGFR2, de façon sélective ou non), ou les intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$ (55). Même si aucun n'a encore fait la preuve de son efficacité dans le cadre d'un essai randomisé, le taux de réponses radiologiques très élevé laisse penser que ces traitements sont en train de modifier la prise en charge des gliomes malins.

Ainsi, dans un essai de phase II, l'association du bevacizumab (anticorps antiVEGF) et de l'irinotécan montre des résultats intéressants avec notamment une survie sans progression à six mois de 30 % et une réponse partielle (diminution de plus de 50 % du produit des plus grands diamètres) pour 57 % des patients (56), alors que l'irinotécan seul est dépourvu d'activité significative. Il faut tout de même noter une proportion non négligeable d'effets secondaires, avec notamment des complications thromboemboliques et de rares cas d'hémorragies intratumorales. D'autres études cliniques testant cette association confirment également un taux de réponse radiologique totale ou partielle aux alentours de 60 %, bien supérieur à celui rapporté avec les chimiothérapies conventionnelles (entre 5 et 10 % de réponses) (57)(58).

Ce fort taux de réponses radiologiques doit cependant être nuancé. La prise de contraste à l'imagerie est, en effet, un reflet de la rupture de la barrière hématoencéphalique (Cette altération de la barrière est en grande partie due à la sécrétion de VEGF par les cellules tumorales, comme cela a été démontré dans plusieurs modèles animaux (59)). Il est donc possible d'envisager l'hypothèse selon laquelle le bevacizumab modifie les images radiologiques par simple fermeture de la barrière, sans avoir d'effet antitumoral propre par inhibition de la néoangiogenèse.

D'autres agents anti-angiogéniques ciblant le VEGFR comme le catalanib (PTK/ZK), le cediranib, le sorafénib et le sunitinib sont particulièrement intéressants car ils inhibent également d'autres voies d'activation intracellulaire, notamment celle du PDGFR. Dans un essai de phase II par exemple, sur des glioblastomes en récurrence, l'administration orale de cediranib a induit un taux de réponses de 56 %. Ces réponses radiologiques sont très rapides, dès les 24 premières heures (60). La plupart de ces essais ont souligné l'effet transitoire de ces thérapies antiangiogéniques. La formation d'une gliomatose, c'est-à-dire d'une forme infiltrante diffuse sans prise de contraste a été récemment décrite avec les traitements anti-angiogéniques (61).

De multiples combinaisons devront être testées dans des essais cliniques randomisés avant de trouver l'association optimale avec un traitement anti-angiogénique qui est par nature cytostatique plus que cytotoxique. L'intérêt se porte naturellement sur le témozolomide et le BCNU, dont l'activité sur les gliomes est reconnue. L'association avec la radiothérapie est une voie intéressante qui est testée, actuellement. La tolérance semble correcte et les premiers résultats sont encourageants (62).

III. Intégrines et gliomes.

L'analyse de biopsies indique que le patron d'expression des intégrines dans les glioblastomes est dérégulé par rapport à celui du tissu cérébral normal. Les intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$ qui reconnaissent la vitronectine par l'intermédiaire d'un site de liaison Arg-Gly-Asp (RGD) sont les plus étudiées dans les gliomes malins. Dans ces tumeurs, elles sont exprimées par les cellules tumorales et les cellules endothéliales des néovaisseaux. L'expression de ces intégrines varie avec le type cellulaire, une expression plus intense étant observée dans les gliomes de plus haut grade.(63)(64) En général, le niveau d'expression de la sous-unité $\beta1$ est inférieur à la normale, les intégrines $\beta1$ étant impliquées dans l'adhérence des astrocytes à des composants de la matrice extracellulaire comme la laminine et la fibronectine. Ces intégrines agissent comme régulateurs négatifs de la mobilité cellulaire.(64) Enfin, l'intégrine $\alpha6\beta1$ est incriminée dans la progression des glioblastomes et jouerait un rôle important dans la régulation des cellules tumorales périvasculaires.(65)

Le cilengitide, un antagoniste peptidique spécifique d' $\alpha\beta3$ et d' $\alpha\beta5$, est actuellement évalué comme agent thérapeutique pour le traitement des glioblastomes récidivants ou nouvellement diagnostiqués. Cette molécule a montré des effets dans des modèles *in vitro* et pré cliniques. Son mode d'action est anti angiogénique mais comporterait un effet direct sur les cellules tumorales et tout particulièrement sur l'adhérence, la migration, l'invasion et la viabilité des cellules tumorales.(66)(67) Les intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$ contrôleraient l'hypoxie par l'intermédiaire de Fak et RhoB dans ces tumeurs. Les résultats obtenus avec cette molécule dans un essai clinique de phase II se sont avérés modestes. De plus, des études précliniques dans des modèles murins de mélanome et de carcinome pulmonaire de Lewis suggèrent qu'à faibles doses le cilengitide administrés isolément peut stimuler l'angiogénèse et la croissance tumorale. Ces divergences peuvent s'expliquer par des effets dépendant de la dose du cilengitide ou peuvent refléter des variations des propriétés fonctionnelles de la sous-unité α d'un tumeur l'autre.(68)(69) L'ambivalence des résultats a conduit l'équipe du laboratoire Biophotonique et Pharmacologie (Pr M. Dontenwill UMR CNRS 7213, Université Louis Pasteur, Strasbourg) a s'intéresser à un autre récepteur, l'intégrine $\alpha5\beta1$, et aux protéines associées comme marqueurs diagnostiques, pronostiques et cibles thérapeutiques originales pour les tumeurs cérébrales.

La preuve du concept de l'implication de l'intégrine $\alpha5\beta1$ dans l'agressivité et la résistance à la chimiothérapie des glioblastomes a été établie *in vitro* par l'Equipe précédente en manipulant les cellules de lignées de glioblastome humain pour exprimer des taux variables de la sous - unité $\alpha5$ (inhibition fonctionnelle de l'intégrine par un antagoniste non peptidique (le SJ749), inhibition de l'expression de l'intégrine par transfection de sHRNA spécifique de la sous unité $\alpha5$ ou surexpression de l'intégrine par transfection de pcDNA- $\alpha5$).(69)

De plus cette équipe a publié des arguments en faveur de l'implication du statut de la protéine p53 dans ces effets et mis en évidence un contrôle inverse de l'expression de l'intégrine et de la cavéoline-1 (protéine décrite comme suppresseur de tumeur), les effets phénotypiques obtenus par manipulation de la cavéoline-1 étant strictement médiés par l'intégrine $\alpha5\beta1$ dans les gliomes.(70)(71)

Les recherches de ce groupe se poursuivent avec les objectifs suivants:

- ▶ Valider l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ comme cible thérapeutique *in vivo* en étudiant: 1- l'expression de ce récepteur dans les tumeurs humaines, 2-les variations d'expression de ce dernier en fonction de la cinétique de croissance tumorale dans des modèles de xéno greffe, 3- en étudiant les mécanismes moléculaires impliqués dans ses effets pro tumoraux.
- ▶ Caractériser le rôle de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans la résistance des gliomes aux traitements.
- ▶ Vérifier la pertinence d'une thérapie ciblée sur l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ justifiant ainsi la poursuite des efforts de caractérisation d'antagonistes spécifiques.
- ▶ Vérifier l'hypothèse d'un rôle original de l'intégrine dans l'initiation et le maintien du phénotype des gliomes. Au sein du Cancéropole du Grand Est des liens étroits ont été établis entre le laboratoire strasbourgeois et l'Equipe d'Accueil 4421 Signalisation et Génomique en Recherche Translationnelle Oncologique (Professeur F Plénat) de l'Université Nancy 1 qui a acquis une bonne expérience des modèles hétérotopiques et orthotopiques de gliomes humains chez la souris immunodéficente et de leur utilisation pour la recherche préclinique.

Dans ce cadre, mon travail de thèse a consisté à:

- ▶ Développer des méthodes immunohistochimiques de détection des récepteurs tant au niveau de prélèvements de tumeurs humaines que des modèles murins.
- ▶ Faire une cartographie des cellules exprimant l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les tissus humains de façon à apprécier les risques pour les tissus sains d'une thérapie ciblée.
- ▶ Dans le cas des gliomes de haut grade, participer à la recherche de variations d'expression des récepteurs en fonction du type tumoral, du grade de façon à évaluer la pertinence de la démonstration du récepteur comme marqueur diagnostique ou pronostique.
- ▶ A étudier l'expression différentielle de l'intégrine par les cellules tumorales et celles du stroma et notamment à vérifier l'existence d'une expression plus élevée de la protéine par les cellules endothéliales des vaisseaux tumoraux que par celle du tissu cérébral sain.
- ▶ Dans le cas des xéno greffes de participer à la recherche de variations d'expression des récepteurs en fonction du modèle et de cartographier les cellules exprimant les intégrines en recherchant notamment l'expression des protéines par les cellules du micro environnement tumoral.

IV. La cavéoline-1

La cavéoline-1 est la protéine structurale principale des cavéoles. Sa capacité à contrôler la distribution, l'activité et l'expression de nombreuses protéines lui confère un rôle clef dans la régulation de nombreux processus altérés dans les cancers. Il n'est donc pas étonnant que les mutations sporadiques ou les modifications de l'expression de cette protéine soient observées à différentes étapes de la cancérogénèse. Bien qu'une expression accrue de la cavéoline-1 semble la norme dans les gliomes, les gliocytes tumoraux exprimant ou non la protéine coexistent dans de nombreux glioblastomes. En manipulant l'expression du gène de la cavéoline-1 dans des cellules tumorales en culture S Martin a montré que la perte l'expression du gène transforme la cellule vers un phénotype plus agressif. Cet auteur a par ailleurs démontré que la cavéoline -1 agit comme un répresseur transcriptionnel de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. En conséquence la cavéoline -1 et l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ sont inversement corrélés et les intégrines $\alpha 5\beta 1$ sont ainsi identifiées comme les médiateurs des transformations phénotypiques induites par la cavéoline-1.(70)(72)

PARTIE II: MATERIEL ET METHODES

I. Matériel

I.A. Les gliomes humains greffés chez la souris athymique.

Notre étude a tout d'abord porté sur 18 lignées différentes de glioblastomes humains (soit 42 greffons sous cutanés) maintenues *in vivo* par passage sous cutané séquentiel de fragments tumoraux chez la souris athymique femelle Swiss *Foxn1nu/Foxn1nu* (Harlan; Gannat, France). Quinze lignées nous ont été confiées par le docteur E Guerin (Unité Inserm U 682 Strasbourg). Les autres proviennent du laboratoire d'Histopathologie Expérimentale et Moléculaire (E9 4421, SiGReTO, Nancy). Toutes les expérimentations ont été réalisées en accord avec la Charte française de l'Expérimentation animale, les animaux étant anesthésiés par injection intra péritonéale de ketamine (60mg/kg) et de xylazine (8mg/kg).

Par ailleurs, dans la mesure où le comportement invasif des xénogreffes de fragments de gliomes malins varie avec le site d'implantation, trois lignées ont fait l'objet d'une greffe orthotopique selon des procédures antérieurement décrites (73). En bref, sous anesthésie générale, a été réalisée une incision coronale bifrontale du scalp comprenant le péricrâne. Le scalp a ensuite été récliné sur la face, puis un volet frontal droit a été pratiqué. Après incision de la dure-mère un fragment tumoral de 1mm³ a été implanté quelques millimètres en arrière de la scissure de Sylvius à 1,5 mm de profondeur. Le volet crânien a ensuite été refermé et le scalp suturé. La croissance des tumeurs intracrâniennes a été suivie par IRM (service commun d'IRM de la faculté des Sciences et Techniques de l'Université Nancy-1 (Pr D Canet) après injection dans la veine caudale des animaux de Gadopentétate de méglumine.

Tous les animaux ont été euthanasiés par surdosage anesthésique quand le diamètre tumoral atteignait un peu plus d'un centimètre pour les tumeurs sous cutanées et, pour les greffons orthotopiques, dès lors que les souris présentaient des signes de souffrance (amaigrissement ou modifications du comportement, de la posture, etc...). Les échantillons ont ensuite été fixés pendant au moins deux jours dans du formaldéhyde à 4% (v/v) tamponné pH 7,4 avant l'inclusion dans de la paraffine.

I.B. Les tumeurs humaines.

Des prélèvements de gliomes humains, opérés dans le Département de Neurochirurgie de l'Hôpital Central (Pr J Auque), ont été fournis par le Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques de l'Hôpital Central. (Pr JM Vignaud). Les observations cliniques sont issues de l'Unité de Neuro Oncologie (Pr L Taillandier) du Service de Neurologie.

Pour les études immunohistochimiques en paraffine n'ont été retenues que les tumeurs répondant aux définitions 2007 de l'OMS des astrocytomes anaplasiques, des glioblastomes, et des oligodendrogliomes anaplasiques.(33) Les observations ont été revues indépendamment par deux pathologistes. Seuls les cas typiques et pour lesquels le diagnostic était consensuel ont été sélectionnés. Pour les glioblastomes ont été exigées la présence de plage de nécrose serpiginieuse ou massive et / ou celle d'une hyperplasie endothéliale (structures gloméruloïdes ou hypertrophie et pseudostratification des cellules endothéliales). Le diagnostic d'oligodendrogliome n'a été porté qu'en présence de cellules tumorales à cytoplasme clair (halo périnucléaire). Les glioblastomes à cellules géantes ainsi que ceux présentant une composante à petites cellules ont été retenus. Au total 63 biopsies ou échantillons d'exérèse de tumeurs de patients hospitalisés entre 2000 et 2009 ont été retenus pour cette étude. Parmi elles, sept ont été éliminées du fait d'ininterprétabilité du signal. Cinq tumeurs ont été reclassées en glioblastome.

Les échantillons congelés ont été sélectionnés à partir de la base de données de la tumorothèque du Site Hautement Spécialisé en Cancérologie Lorrain CHU Centre Alexis Vautrin (Madame Sandra Lomazzi). L'étude transcriptionnelle a porté sur 33 échantillons congelés (19 oligodendrogliomes anaplasiques et 14 glioblastomes multiformes) de patients sélectionnés à partir de 76 observations sur les deux critères suivants: 1-la représentativité de l'échantillon ; 2-la qualité des ARNm extraits.

I.C. Les prélèvements servant de témoins positifs et d'étalons de niveau d'expression.

Les mises au point immunohistochimiques ont été réalisées sur des coupes successives d'un échantillon de placenta à terme fixé au formol à 10% (v/v) tamponné pH 7,4. Par ailleurs, dans la mesure où tous les prélèvements n'ont pu être techniqués le même jour, des coupes de placenta ont été incluses dans chaque série immunohistochimique, parallèlement aux prélèvements tumoraux, pour s'assurer de la stabilité de la technique au cours du temps.

I.D. Les prélèvements pour l'étude de la distribution de ces trois protéines dans les tissus normaux et de leur expression par les cellules des glioses réactionnelles.

Dans la mesure où la démarche de recherche pouvait conduire au développement d'une thérapie ciblant l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ il nous est paru nécessaire d'étudier la distribution du récepteur et de la cavéoline-1 dans l'organisme tout comme il nous est paru utile de rechercher l'expression de ces protéines par les cellules des glioses réactionnelles (astrocytes et microglie réactionnels). Cette étude a été réalisée sur des échantillons prélevés sur des pièces opératoires arrivées fraîches au laboratoire, en territoire non tumoral (foie, poumon, rein, pancréas, thymus, nœud lymphatique, moelle osseuse, peau, thyroïde, œsophage, estomac, duodénum, iléon, appendice, côlon, ovaire). L'étude de distribution au niveau encéphalique a été réalisée à partir de prélèvements de la première circonvolution frontale et de l'hippocampe de cerveaux prélevés chez quatre sujets décédés d'une cause traumatique sans atteinte cérébrale directe.

L'expression des protéines par les astrocytes des glioses réactionnelles et par les microgliocytes activés a été réalisée quant à elle sur sept prélèvements de tumeurs de patients comportant des territoires de parenchyme cérébral non envahi d'une part, ainsi que sur quatre prélèvements biopsiques (tableau 5). Sur ces derniers échantillons ont de plus été recherchés par méthode immunohistochimique et sur des coupes successives aux précédentes la protéine gliale fibrillaire acide, un marqueur principalement astrocytaire, et CD68, un marqueur macrophagique.

Numéro d'enregistrement	Diagnostic
09H15592	Gliose réactionnelle et dystrophies cytologiques post radiothérapie.
10H07728	Gliose réactionnelle.
10H10984	Abcès cérébral.
10H16938	Infarctus cérébral en voie d'organisation.

Tableau 4 : sélection de quatre échantillons pour étude immunohistochimique de l'expression des protéines d'intérêt au sein de la gliose réactionnelle.

II.Méthodes

II.A.Immunohistochimie.

La détection immunohistochimique des protéines d'intérêt a été réalisée sur des coupes épaisses de 5µm montées à l'eau distillée sur des lames de verre traitées à la polylysine (Polylysine™ ; Menzel-Glaser, Braunschweig, Allemagne). Après un séchage d'une heure sur une platine chauffée à 40°C, les lames ont été conservées un minimum d'une nuit à l'étuve à 37°C. Les anticorps primaires ont été appliqués sur coupes successives.

Les anticorps primaires utilisés ont été les suivants:

Protéine	Clone	Fournisseur	Spécificité	Contrôles +	Dilution	Démasquage
Sous-unité β1	Monoclonal de lapin EP1041Y	Abcam	Extrémité C terminale. Non spécifique d'espèce	placenta	1/500	EDTA
Sous-unité α5	Polyclonal de lapin	Santa cruz biotechnology, INC	Acides aminés 840-943 Non spécifique d'espèce	placenta	1/800	pH 9,9
Cavéoline-1	Polyclonal de lapin	Santa cruz biotechnology, INC	Extrémité N terminale de la protéine. Non spécifique d'espèce.	placenta	1/600 tumeur humaine 1/400 xenogreffe	pH 9,9
CD68 (KP1)	Monoclonal de souris	Thermo scientific	Epitope non déterminé. Non spécifique d'espèce	amygdale	1/999	EDTA
GFA	Monoclonal de souris	Thermo scientific	Epitope non déterminé. Non spécifique d'espèce	hémiphère cérébral.	1/400	EDTA

Tableau 5 résumant les anticorps utilisés, leur spécificité, leur dilution ainsi que la solution de démasquage utilisée.

Après déparaffinage, les coupes ont été soumises à une technique d'inversion des conséquences de la fixation formolique par incubation dans une solution chauffée à 120°C pendant 10 min suivi d'un refroidissement progressif à température du laboratoire de cette

dernière sur deux heures. La solution de démasquage était l'EDTA 0,1M pH 8 pour les anticorps anti-KP1, anti-GFA et anti sous-unité $\beta 1$. La solution de démasquage était un tampon pH 9,9 (High pH DAKO) pour les anticorps anti sous-unité $\alpha 5$ et anti-cavéoline-1.

Les anticorps primaires ont été dilués dans un tampon PBS 0,1M contenant 0,3%(m/v) d'albumine sérique bovine, 0,1%(m/v) d'acide de sodium, 0,06% (m/v) de n- éthylmaléimide et 20% (v/v) de glycérol.

La durée d'incubation des coupes avec les anticorps primaires était de 16 heures en chambre froide à 4°C. Après deux lavages de 10 minutes dans un tampon TBS, l'activité peroxydasique endogène était inhibée par une incubation des coupes de 10 minutes dans une solution de peroxyde d'hydrogène à 6% dans de l'eau distillée. Les coupes étaient alors lavées deux fois 5 minutes dans un tampon PBST et l'anticorps primaire détecté à l'aide du système de détection HISTOFINE Simple stain rabbit Max PO (Nicheiri, Micron, Francheville, France) dans le cas des sous-unités de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et de la cavéoline-1 et d'un montage anticorps secondaire biotinylé/ streptavidine peroxydase dans les cas de la protéine gliale fibrillaire acide et du CD68.

L'absence de bruit de fond lié au système de révélation a été recherchée en pratiquant les mêmes procédures en l'absence d'anticorps primaire. La spécificité des anticorps dirigés contre les sous unité $\alpha 5$, $\beta 1$ et la cavéoline-1 avait été antérieurement vérifiée par western blot (équipe du Pr Dontenwill).

Les images ont été acquises à l'aide d'une camera HRC CCD (Zeiss Jena ; Allemagne) contrôlée par le logiciel Axiovision 4,4 digital images. Des coupes de placenta ont servi de témoins positifs.

II.B.Interprétation de l'étude immunohistochimique..

Pour chaque tumeur (modèles murins et tumeurs humaines) et chaque anticorps ont été notés: 1- le site d'expression membranaire et/ou cytoplasmique du marquage; 2- L'intensité de ce dernier selon une échelle à quatre barreaux: immunoréactivité nulle, faible, modérée ou forte en comparaison avec les contrôles positifs; 3- Le pourcentage de cellules tumorales marquées exprimé de façon semi quantitative: 0 (pas de marquage); 1 (<10%); 2 (10-25%); 3 (26-50%); 4 (51-75%); 5 (76-100%).

II.C.Analyse transcriptionnelle.

II.C.1.Etapes d'extraction de l'ARN, qualité des ARNm.

Après vérification de la représentativité des échantillons étudiés, les prélèvements retenus ont été débités au cryostat (MICROM HM560) en trente copeaux de 50µm, tous recueillis dans un tube Eppendorf® stérile. La lyse des tissus a été réalisée par ajout de 500 à 600µL d'un tampon de lyse (mélange de 10µL de β mercapto éthanol pour 1mL de solution RLT Plus du kit Qiagen Allprep DNA/RNA). Les ARNm ont ensuite été extraits à l'aide du kit Qiagen Allprep DNA/RNA en suivant les recommandations du fabricant. La concentration de l'ARN total dans chaque extrait a ensuite été mesurée par spectrophotométrie (*BioSpec-nano*, *Shimadzu Scientific instruments*) et la qualité de ces derniers vérifiée à l'aide de puces AGILENT RNA 6000 NANO II. (Plateforme de Génétique Moléculaire Oncologique (Pr P Jonveaux). Seuls les ARNm de bonne qualité (RNA.Integrity.Number>5) ont été sélectionnés.

II.C.2.Etape de RT-PCR.

Une transcription inverse a ensuite été réalisée dans un thermocycleur (LightCycler® 2.0 laboratoire Roche, Mannheim, Allemagne) à l'aide du kit iScript™ cDNA Synthesis (Bio-Rad, Ivry sur Seine, France) en suivant les recommandations du fournisseur.

II.C.3.Etape de PCR quantitative.

Les techniques de PCR quantitatives ont ensuite été réalisées par l'équipe du Pr M Dontenwill en utilisant des techniques précédemment décrites. La méthode $2^{-\Delta\Delta CT}$ a été utilisée afin d'obtenir une quantification relative des ARNm.(70)(71)(74)

III.Statistiques

L'analyse statistique a pour but de rechercher une corrélation : 1- entre les ARNm des sous-unités $\alpha 5$, $\beta 1$ et de la cavéoline-1 et l'expression des protéines correspondantes au niveau des tumeurs humaines, 2- entre les ARNm des tumeurs de grade III (oligodendrogliome anaplasique) et des tumeurs de grade IV (glioblastome multiforme), 3- entre les ARNm de la sous-unité $\alpha 5$ et de la cavéoline-1. Les données quantitatives sont comparées à l'aide du coefficient de Spearman et de l'indice de Tau. Les tests sont considérés comme significatifs si la valeur de p est inférieure à 5%.

PARTIE III: RESULTATS

I. Le marquage des tissus témoins, vérification de la spécificité.

Dans un premier temps, les techniques immunohistochimiques ont été mises au point sur des coupes histologiques de placenta à terme, organe richement vascularisé où une forte expression des protéines d'intérêt est attendue. Les tampons de démasquage retenus étaient l'EDTA 0,1M pH 8 pour l'anticorps anti sous-unité $\beta 1$, un tampon pH 9,9 (High pH DAKO) pour les anticorps anti sous-unité $\alpha 5$ et anti-cavéoline-1. Aucun bruit de fond n'était observé après réalisation des techniques avec omission de l'anticorps primaire. Ces préparations permettaient par ailleurs de se familiariser avec la morphologie des signaux. (photos 1 et 2)

I.A. La cavéoline-1.

Au niveau du placenta, le marquage se présentait sous la forme d'un signal punctiforme très fin, intense, dont la forme et les dimensions étaient cohérentes avec une localisation cavéolaire. Le signal était observé au niveau des cellules endothéliales des vaisseaux fœtaux (capillaires et vaisseaux de plus grand calibre), des myocytes lisses des médias vasculaires, des myofibroblastes des axes villositaires, du trophoblaste des îlots intervilloux, de la plaque chorale et récurrent intravillositaire. En revanche, les syncytio et cyto trophoblastes recouvrant les villosités et les cellules d'Hofbauer n'exprimaient pas la protéine. Les granulations étaient réparties dans toutes les membranes avec un renforcement sous membranaire pour les cellules endothéliales. Il n'était pas observé de marquage cytoplasmique diffus ou nucléaire.

I.B. Sous-unité $\alpha 5$.

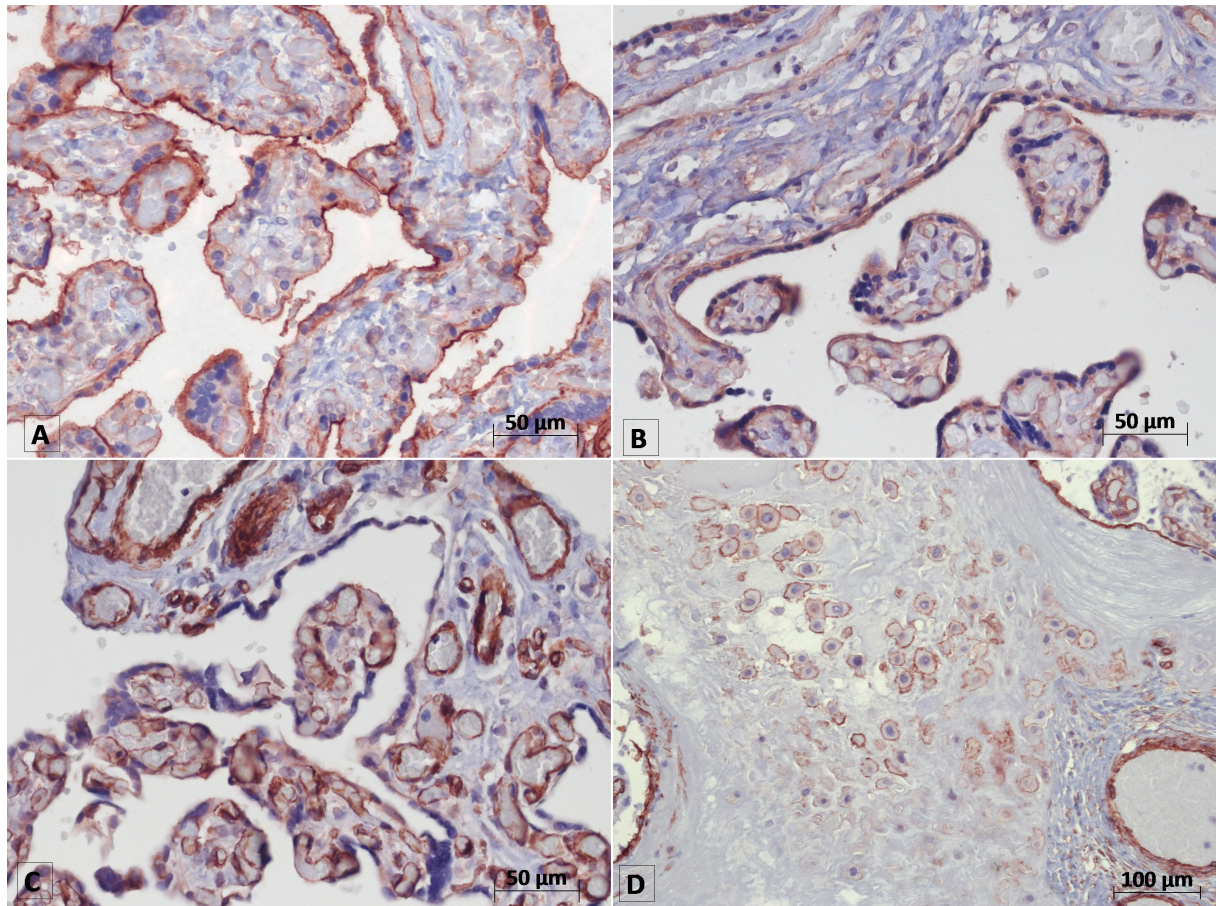
A l'opposé, le marquage observé avec l'anticorps sous-unité $\alpha 5$ était localisé de façon prédominante au niveau du revêtement trophoblastique villositaire. A ce niveau, le signal, membranaire, prenait un aspect plumeux correspondant aux microvillosités de surface avec renforcement punctiforme irrégulièrement réparti pouvant attester de l'agrégation du récepteur (points focaux d'adhérence). Le signal était continu au niveau du pôle apical, discontinu au niveau du pôle basal. Le cytoplasme était faiblement coloré et ceci de façon diffuse. Le marquage était discontinu et faible au niveau des cellules endothéliales des vaisseaux fœtaux, plus intense au niveau des artérioles et des veinules. Le trophoblaste des

flots intervilloux, de la plaque choriale et récurrent intravillósitaire était fortement marqué (marquage granuleux membranaire) sans marquage cytoplasmique associé. Les cellules de Hofbauer, les myocytes lisses de la paroi des vaisseaux et les myofibroblastes n'étaient pas marqués.

I.C.Sous-unité $\beta 1$.

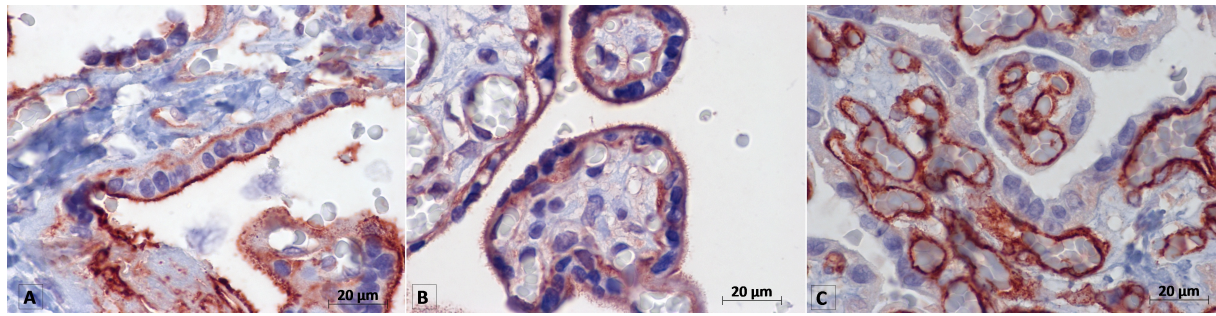
Le marquage au niveau du placenta était superposable à celui observé avec l'anticorps complémentaire de la sous-unité $\alpha 5$. L'intensité du signal était cependant plus intense au niveau du pôle basal que du pôle apical.

Photo 1: placenta.



A: sous-unité $\alpha 5$ (IHC, x 400) : marquage membranaire intense apical des cellules trophoblastiques, marquage variable des endothélicytes., B: sous-unité $\beta 1$ (IHC x 400) : marquage membranaire superposable à celui observé pour la sous-unité $\alpha 5$, C: cavéoline-1 (IHC, x 400) : marquage intense des endothélicytes, des myocytes lisses des médias vasculaires, D: cavéoline-1 (IHC, x 400) : marquage du trophoblaste intercurrent intravillósitaire.

Photo 2: Témoin placentaire, fort grossissement



A: sous-unité $\alpha 5$ (IHC, x 1000) : Marquage continu et granuleux au pôle apical des cellules trophoblastiques, discontinu au pôle basal. Signal endothélial faible. B: sous-unité $\beta 1$ (IHC, x 1000) : Marquage plus intense au pôle basal. C: cavéoline-1 (IHC, x 1000) : Marquage granuleux des endothéliocytes témoignant de la présence de nombreuses cavéoles.

II.Expression des protéines $\alpha 5$, $\beta 1$ et cavéoline-1 dans les tissus non tumoraux.

II.A.Introduction.

Avant de choisir une nouvelle cible thérapeutique, il est nécessaire de vérifier que cette dernière ne soit pas exprimée par d'autres types cellulaires que celui (ou ceux) visé par la thérapeutique. Nous avons donc réalisé une étude de distribution sur: 1- des prélèvements cérébraux et de nombreux viscères, 2- des échantillons cérébraux siège d'une gliose réactionnelle à la recherche d'une possible expression des protéines dans les gliomes par les cellules du micro-environnement tumoral, 3- un prélèvement colique siège d'une ulcération chronique dont le fond était constitué par un tissu de granulation, à la recherche d'une éventuelle modification d'expression de l'intégrine dans les endothéliocytes des tissus inflammatoires.

Au niveau de tous les prélèvements examinés, les signaux observés avec les anticorps dirigés contre les sous-unités $\alpha 5$ et $\beta 1$ étaient membranaires, avec des renforcements punctiformes visibles à fort grossissement (x 1000) dans les cas où le marquage était plus intense.

Avec l'anticorps dirigé contre la cavéoline-1, le marquage était granuleux, membranaire ou juxta membranaire.

II.B.Distribution de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et de la cavéoline-1: tableaux récapitulatifs (hors gliose réactionnelle et ulcération colique).

II.B.1.Prélèvements encéphaliques:

II.B.1.a.Hémisphère cérébral :

Tissus		Sous-unité $\alpha 5$	Sous-unité $\beta 1$	Cavéoline-1
Structure tissulaire	Cellules	Marquage	Marquage	Marquage
Substance grise	Neurones	-	-	-
Substance blanche	Astrocytes	-	-	-
	Oligodendrocytes	-	-	-
	Microgliocytes	-	-	-
Vaisseaux	Endothéliocytes	+	+	+
Plexus choroïdes	Endothéliocytes /myocytes lisses	+/-	++/++	+++/+++
	Ependymocytes	-	+	-
Leptoméninge	Fibroblastes	-	-	-
	Cellules méningothéliales	+++	+++	+++
	Endothéliocytes/myocytes lisses	+++/+++	+++/+++	+++/+++

Pour tous les tableaux : Intensité de marquage : - : pas de marquage, + : marquage faible, ++ : marquage modéré, +++ : marquage fort, NI : non identifié.

II.B.1.b.Cervelet :

Tissus		Sous-unité $\alpha 5$	Sous-unité $\beta 1$	Cavéoline-1
Structure tissulaire	Cellules	Marquage	Marquage	Marquage
	Neurones	-	-	-
	Astrocytes radiaires cérébelleux	-	-	-
	Microgliocytes	-	-	-
Substance blanche	Astrocytes	-	-	-
	Oligodendrocytes	-	-	-
Vaisseaux	Endothéliocytes	+	+	+++

II.B.2. Tissus normaux (hors encéphale).

II.B.2.a.Placenta : Les données sont reportées dans la première partie.

II.B.2.b.Foie :

Tissus		Sous-unité $\alpha 5$	Sous-unité $\beta 1$	Cavéoline-1
Structure tissulaire	Cellules	Marquage	Marquage	Marquage
Lobules hépatiques	Hépatocytes	-	-	-
	Macrophages étoilés des sinusoides	+++	+	-
	Endothéliocytes des sinusoides	+++	+	+++
	Cellules de Ito périsinusales	+++	+	+++
Espaces portes	Endothéliocytes des branches de la veine porte	+++	+++	+++
	Endothéliocytes des branches de l'artère hépatique	+	+	+++
	Endothéliocytes de la veine centrolobulaire	+	+	+++
	Myocytes lisses des branches de l'artère hépatique	-	+	+++
	Cholangiocytes des canaux biliaires	-	-	-
	Endothéliocytes des lymphatiques	+	+	+++
	Fibroblastes	-	-	-

II.B.2.c.Peau.

Tissus		Sous-unité $\alpha 5$	Sous-unité $\beta 1$	Cavéoline-1
Structure tissulaire	Cellules	Marquage	Marquage	Marquage
épiderme	Epithéliocytes de la strate basale	-	-	-
	Kératinocytes de la strate épineuse	-	-	-
	Kératinocytes de la strate granuleuse	-	-	-
	Kératinocytes squameux de la strate cornée	-	-	-
	Mélanocytes	-	-	-
derme	Fibroblastes/ dendrocytes	NI	NI	NI
	Endothéliocytes des vaisseaux sanguins	+	+	+++
	Endothéliocytes des vaisseaux lymphatiques	+	+	++
	Nerfs/ cellules périnerveuses	-	-	-
hypoderme	Adipocytes	-	-	+++
	Fibroblastes	-	-	-
	Endothéliocytes des vaisseaux sanguins	+	+	+++
	Endothéliocytes des lymphatiques	+	+	++
annexes	Matrice épithéliale du poil	-	-	-
	Gaine radiculaire épithéliale	-	-	-
	Muscle arrecteur du poil	+	++	+++
	Sébocytes	-	-	++
	Épithéliocytes des glandes mérocrines	-	-	-

II.B.2.d.Rein

Tissus		Sous-unité $\alpha 5$	Sous-unité $\beta 1$	Cavéoline-1
Structure tissulaire	Cellules	Marquage	Marquage	Marquage
Glomérule	Cellules pavimenteuses	+	+	-
	Podocytes	-	-	-
	Mésangiocytes	-	-	-
	Endothéliocytes des capillaires fenêtrés	+	++	+++
Tubules proximaux	Epithéliocytes	-	-	-
Tubules intermédiaires	Branches descendantes/ascendantes	-	+++	-
Tubules distaux	Epithéliocytes	-	-	-
tubules connecteurs	Epithéliocytes	-	+++	-
Tubules collecteurs	Epithéliocytes	-	+++	-
Vaisseaux arqués	Endothéliocytes/ myocytes lisses	++/+	++/++	+++/+++

II.B.2.e.Poumon

Tissus		Sous-unité $\alpha 5$	Sous-unité $\beta 1$	Cavéoline-1
Structure tissulaire	Cellules	Marquage	Marquage	Marquage
BRONCHIOLES				
épithélium	Epithéliocytes columnnaires ciliés	-	+	-
	Rares mucocytes	-	-	-
Lamina propria	Fibroblastes	-	-	-
	Endothéliocytes des vaisseaux sanguins	+	+	+
	Endothéliocytes des lymphatiques	+	+	+
Couche musculaire	Myocytes lisses	-	+	+
ALVEOLES				
Epithélium alvéolaire	Pneumocytes	-	-	-
Septum interalvéolaire	Fibroblastes	-	-	-
	Endothéliocytes des capillaires	+	+	+
	Endothéliocytes des lymphatiques	+	+	+
	Macrophages alvéolaires	+	+	-

II.B.2.f.Pancréas

Tissus		Sous-unité $\alpha 5$	Sous-unité $\beta 1$	Cavéoline-1
Structure tissulaire	Cellules	Marquage	Marquage	Marquage
PANCREAS ENDOCRINE				
Ilots pancréatiques	Endocrinocytes	-	-	-
	Endothéliocytes des capillaires fenêtrés	+	++	+++
PANCREAS EXOCRINE				
Acini	Pancréatocytes exocrines	-	-	-
Conduits intercalaires	Cellules centro acineuses	-	-	-
Conduits intralobulaires	Epithéliocytes cuboïdes	-	-	-
Conduits interlobulaires	Epithéliocytes columnaires	-	-	-
Capillaires	endothéliocytes	+	++	+++
CLOISONS CONJONCTIVES				
	Endothéliocytes des vaisseaux sanguins/ myocytes	++/+	++/++	+++/+++
	Endothéliocytes des lymphatiques	+	+	+
	Nerfs/ cellules périnerveuses	-	-	-

II.B.2.g.Ganglion lymphatique.

Tissus		Sous-unité $\alpha 5$	Sous-unité $\beta 1$	Cavéoline-1
Structure tissulaire	Cellules	Marquage	Marquage	Marquage
CAPSULE ET TRABECULES				
	Fibroblastes	-	-	-
	Endothéliocytes des vaisseaux afférents	++	++	+++
CORTEX : ZONE B				
Centre germinatif	Centroblastes	-	-	-
	Centrocytes	-	-	-
	Cellules dendritiques nodulaires	-	-	-
	Macrophages à corps colorable	+	-	-
	Cellules Th auxiliaires	-	-	-
Manteau	Lymphocytes	-	-	-
PARACORTEX : ZONE T				
	Lymphocytes T	-	-	-
	Endothéliocytes des veines altoendothéliales (hev)	-	-	+++
MEDULLA				
Cordons médullaires	Plasmocytes	-	-	-
	Macrophages	++	++	-
	Lymphocytes T	-	-	-
	Endothéliocytes	+	++	+++
SINUS				
	Macrophages	++	++	-
HILE				
	Endothéliocytes des vaisseaux efférents	++	++	+++

II.B.2.h.Glande thyroïde

Tissus		Sous-unité $\alpha 5$	Sous-unité $\beta 1$	Cavéoline-1
Structure tissulaire	Cellules	Marquage	Marquage	Marquage
LOBULES THYROIDIENS				
Follicules thyroïdiens	Thyrocytes T	-	-	-
Cell. parafolliculaires	Thyrocytes C	-	-	-
Capillaires fenêtrés	Endothéliocytes	-	-	-
SEPTA INTERLOBULAIRES				
	Fibroblastes	-	-	-
	Endothéliocytes des vaisseaux sanguins	+	+	+++
	Endothéliocytes des lymphatiques	+	+	+++
	Nerfs/cellules péri nerveuses	-	-	-

II.B.2.i.Moelle osseuse.

Tissus		Sous-unité $\alpha 5$	Sous-unité $\beta 1$	Cavéoline-1
Structure tissulaire	cellules	marquage	marquage	marquage
Os spongieux	Ostéocytes	-	-	-
	Ostéoblastes	-	-	-
Sinuxoïdes	endothéliocytes	++	++	+++
	Cellules réticulaires	-	-	-
	Cellules réticulaires adipeuses	-	-	+++
	Macrophages	++	++	-
	Cellules souches hématopoïétiques	-	-	-
	Ilots érythroblastiques	-	-	-
	Mégacaryocytes	+++	+++	-
	Granulocytes et précurseurs	-	-	-
	Cellules progénitrices lymphoïdes	-	-	-
Monocytes et précurseurs	-	-	-	

II.B.2.j.Thymus

Tissus		Sous-unité $\alpha 5$	Sous-unité $\beta 1$	Cavéoline-1
Structure tissulaire	Cellules	Marquage	Marquage	Marquage
Capsule et septums interlobulaires	Fibroblastes	-	-	-
	Endothéliocytes des capillaires	+	+	+++
Cortex	Thymocytes	-	-	-
	Epithéliocytes réticulaires thymiques	-	-	-
	Macrophages	+	+	-
	Adipocytes	-	-	+++
Médulla	Corpuscules thymiques	-	-	-
	Epithéliocytes réticulaires thymiques	-	-	-
	Thymocytes	-	-	-
	Cellules dendritiques	-	-	-
	Nerfs	-	-	-
	Macrophages	+	+	-
	Endothéliocytes des capillaires	+	+	+++

II.B.2.k.Oesophage.

Tissus		Sous-unité $\alpha 5$	Sous-unité $\beta 1$	Cavéoline-1
Structure tissulaire	Cellules	Marquage	Marquage	Marquage
Epithélium	Epithéliocytes de la couche basale	-	-	+++
	épithéliocytes	-	-	-
Lamina propria	Endothéliocytes des vaisseaux sanguins	+	++	+++
	Endothéliocytes des lymphatiques	+	++	+++
	fibroblastes	-	-	-
Musculaire muqueuse	Myocytes lisses	+	++	+++
Submuqueuse	Glandes et conduits excréteurs	-	-	-
	Plexus nerveux/neurones ganglionnaires	-/-	-/+	-/-
	Endothéliocytes/myocytes lisses des vaisseaux	++/-	++/++	+++/>+++
Musculaire	Myocytes lisses	-	-	+++
	Endothéliocytes	+	+	+++
	Cellules périnerveuses/ neurones ganglionnaires	-/-	-/+	-/-
Adventice	Adipocytes	-	-	+++
	fibroblastes	-	-	-
	Endothéliocytes/ myocytes lisses	+/-	++/++	+++/>+++

II.B.2.1.Estomac, fundus

Tissus		Sous-unité $\alpha 5$	Sous-unité $\beta 1$	Cavéoline-1
Structure tissulaire	Cellules	Marquage	Marquage	Marquage
Epithélium	Mucocytes	-	-	+
	Exocrinocytes cervicaux	-	-	-
	Exocrinocytes pariétaux	-	-	-
	Exocrinocytes principaux	-	-	-
Lamina propria	Endothéliocytes des vaisseaux sanguins	+	+	+++
	Endothéliocytes des lymphatiques	+	+	++
	fibroblastes	-	-	-
Musculaire muqueuse	Myocytes lisses	+	++	+++
Submuqueuse	Plexus nerveux/neurones ganglionnaires	-/-	-/+	-/-
	Endothéliocytes/myocytes lisses des vaisseaux	+/-	+/++	+++/>+++
Musculaire	Myocytes lisses	absence	absence	absence
	Endothéliocytes	absence	absence	absence
	Cellules périnerveuses/ neurones ganglionnaires	absence	absence	absence
Subséreuse	Adipocytes	absence	absence	absence
	Fibroblastes	absence	absence	absence
	Endothéliocytes/ myocytes lisses	absence	absence	absence
Séreuse	Cellules mésothéliales	absence	absence	absence

II.B.2.m.Estomac, antre

Tissus		Sous-unité $\alpha 5$	Sous-unité $\beta 1$	Cavéoline-1
Structure tissulaire	Cellules	Marquage	Marquage	Marquage
Epithélium	mucocytes	-	-	+
	Exocrinocytes cervicaux	-	-	-
	Exocrinocytes	-	-	-
Lamina propria	Endothéliocytes des vaisseaux sanguins	+	++	+++
	Endothéliocytes des lymphatiques	+	++	++
	fibroblastes	-	-	-
Musculaire muqueuse	Myocytes lisses	+	++	+++
Submuqueuse	Plexus nerveux/neurones ganglionnaires	-/-	-/+	-/-
	Endothéliocytes/myocytes lisses des vaisseaux	+/-	++/>++	+++/>+++
Musculaire	Myocytes lisses	+	++	+++
	Endothéliocytes	+	++	+++
	Cellules périnerveuses/ neurones ganglionnaires	-/-	-/+	-/-
Subséreuse	Adipocytes	-	-	+
	fibroblastes	-	-	-
	Endothéliocytes/ myocytes lisses	+/>+	++/>++	+++/>+++
Séreuse	Cellules mésothéliales	absence	absence	absence

II.B.2.n.Duodénum

Tissus		Sous-unité $\alpha 5$	Sous-unité $\beta 1$	Cavéoline-1
Structure tissulaire	Cellules	Marquage	Marquage	Marquage
Epithélium	entérocytes	-	-	+
	mucocytes	-	-	-
Lamina propria	Endothéliocytes des vaisseaux sanguins	+	++	+++
	Endothéliocytes des lymphatiques	+	++	++
	fibroblastes	-	-	-
Musculaire muqueuse	Myocytes lisses	+	++	+++
Submuqueuse	Glandes duodénales de Brünner	-	-	-
	Plexus nerveux/neurones ganglionnaires	-/-	-/+	-/-
	Endothéliocytes/myocytes lisses des vaisseaux	+/-	+/++	+++/>+
Musculaire	Myocytes lisses	+	++	+++
	Endothéliocytes	+	++	+++
	Cellules périnerveuses/ neurones ganglionnaires	-/-	-/+	-/-
Subséreuse	Adipocytes	-	-	+++
	fibroblastes	-	-	-
	Endothéliocytes/ myocytes lisses	+/+	+/++	+++/>+
Séreuse	Cellules mésothéliales	absence	absence	absence

II.B.2.o.Illéon

Tissus		Sous-unité $\alpha 5$	Sous-unité $\beta 1$	Cavéoline-1
Structure tissulaire	Cellules	Marquage	Marquage	Marquage
Epithélium	entérocytes	-	-	+
	Mucocytes calciformes	-	-	-
Lamina propria	Nœuds lymphoïdes agrégés :zone B/zone T	-/-	-/-	-/-
	lymphocytes	-	-	-
	Plasmocytes	-	-	-
	Endothéliocytes des vaisseaux sanguins	+	+	+
	Endothéliocytes des lymphatiques	+	+	+
	fibroblastes	-	-	-
Musculaire muqueuse	Myocytes lisses	-	+	+
Submuqueuse	Nœuds lymphoïdes agrégés :zone B/zone T	-	-	-
	Plexus nerveux/neurones ganglionnaires	-/-	-/+	-/-
	Endothéliocytes/myocytes lisses des vaisseaux	+/-	+/+	+/+
Musculaire	Myocytes lisses	-	+	+
	Endothéliocytes	+	+	+
	Cellules périnerveuses/ neurones ganglionnaires	-/-	-/+	-/-
Subséreuse	Adipocytes	-	-	+
	fibroblastes	-	-	-
	Endothéliocytes/ myocytes lisses	+/+	+/++	+++/>+
Séreuse	Cellules mésothéliales	absence	absence	absence

II.B.2.p.Appendice

Tissus		Sous-unité $\alpha 5$	Sous-unité $\beta 1$	Cavéoline-1
Structure tissulaire	Cellules	Marquage	Marquage	Marquage
Epithélium	colonocytes	-	-	+
	Mucocytes calciformes	-	-	-
Lamina propria	Nœuds lymphoïdes agrégés :zone B/zone T	-/-	-/-	-/-
	lymphocytes	-	-	-
	Plasmocytes	-	-	-
	Endothéliocytes des vaisseaux sanguins	+	+	+
	Endothéliocytes des lymphatiques	+	+	+
	fibroblastes	-	-	-
Musculaire muqueuse	Myocytes lisses	-	+	+
Submuqueuse	Nœuds lymphoïdes agrégés :zone B/zone T	-	-	-
	Plexus nerveux/neurones ganglionnaires	-/-	-/+	-/-
	Endothéliocytes/myocytes lisses des vaisseaux	+/-	+/+	+/+
Musculaire	Myocytes lisses	-	+	+
	Endothéliocytes	+	+	+
	Cellules périnerveuses/ neurones ganglionnaires	-/-	-/+	-/-
Subséreuse	Adipocytes	-	-	+
	fibroblastes	-	-	-
	Endothéliocytes/ myocytes lisses	-/+	-/+	-/+
Séreuse	Cellules mésothéliales	absence	absence	absence

II.B.2.q.Colon

Tissus		Sous-unité $\alpha 5$	Sous-unité $\beta 1$	Cavéoline-1
Structure tissulaire	Cellules	Marquage	Marquage	Marquage
Epithélium	entérocytes	-	-	+
	Mucocytes calciformes	-	-	-
Lamina propria	lymphocytes	-	-	-
	Plasmocytes	-	-	-
	Endothéliocytes des vaisseaux sanguins	+	++	+++
	Endothéliocytes des lymphatiques	+	++	+++
	fibroblastes	-	-	-
Musculaire muqueuse	Myocytes lisses	+	++	+++
Submuqueuse	Nœuds lymphoïdes agrégés :zone B/zone T	-	-	-
	Plexus nerveux/neurones ganglionnaires	-/-	-/+	-/-
	Endothéliocytes/myocytes lisses des vaisseaux	+/-	++/++	+++/>+++
Musculaire	Myocytes lisses	+	++	+++
	Endothéliocytes	+	++	+++
	Cellules périnerveuses/ neurones ganglionnaires	-/-	-/+	-/-
Subséreuse	Adipocytes	-	-	+++
	fibroblastes	-	-	-
	Endothéliocytes/ myocytes lisses	+/+	++/++	+++/>+++
Séreuse	Cellules mésothéliales	absence	absence	absence

II.B.2.r.Ovaire

Tissus		Sous-unité $\alpha 5$	Sous-unité $\beta 1$	Cavéoline-1
Structure tissulaire	Cellules	Marquage	Marquage	Marquage
CORTEX				
Stroma ovarien	fibroblastes	-	-	+++
	Myocytes lisses	-	-	+++
	endothéliocytes	+/-	+/-	+++/-
Follicules pré antraux	ovocyte	-	-	-
	Epithéliocytes	-	-	-
	Cellules thécales	-	-	-
Corps jaune	Luthéocytes granuleux	+++	+++	+++
	Luthéocytes thécaux	+++	+++	+++
	endothéliocytes	-	-	+++
MEDULLAIRE				
	Fibroblastes	-	-	-
	Myocytes lisses	+	++	+++
	Cellules du hile	-	-	-
	Cellules périnerveuses/ neurones ganglionnaires	-	-	-
	Endothéliocytes/ myocytes lisses	+	++	+++
	Nerfs/cellules péri nerveuses	-	-	-

II.B.3.Distribution: tissus sains.

II.B.3.a.Prélèvements encéphaliques.

Au niveau vasculaire un marquage par les anticorps anti sous-unités $\alpha 5$ et $\beta 1$ n'était observé qu'au niveau des endothéliocytes. Les péricytes n'exprimaient pas les protéines. Il en va de même des myocytes vasculaires à l'exception de ceux de la média des vaisseaux méningés et choroïdiens.

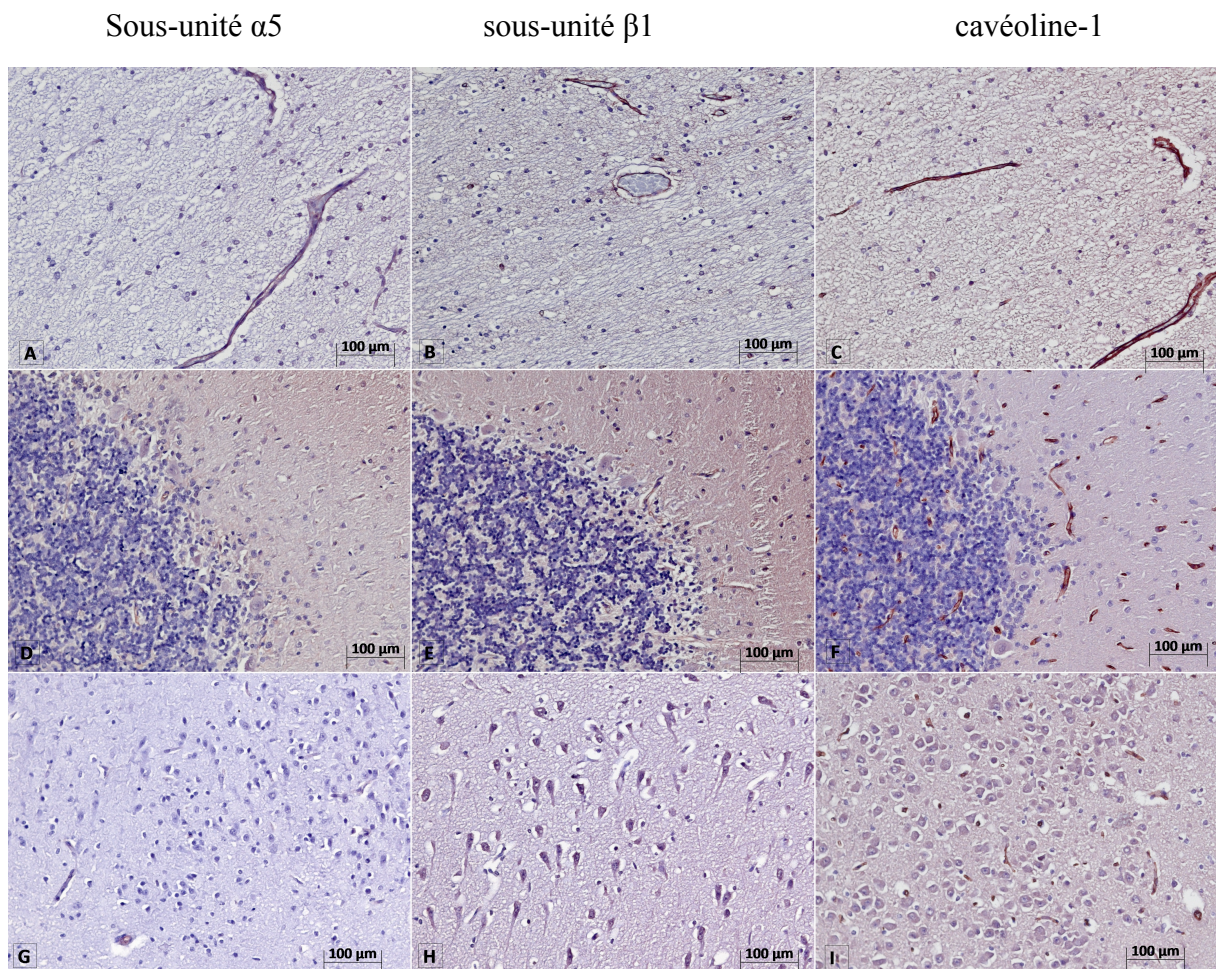
Au niveau endothélial, l'intensité du marquage variait d'un territoire à l'autre et avec le calibre des vaisseaux, le signal observé étant plus intense au niveau des vaisseaux de petit et moyen calibre que de la microcirculation et plus intense au niveau de l'hippocampe que du cortex cérébral. L'intensité du signal avec l'anticorps anti sous-unité $\beta 1$ était toujours plus forte que celle avec l'anticorps anti sous-unité $\alpha 5$. A fort grossissement, en immersion (x 1000), le marquage des sous-unités $\alpha 5$ et $\beta 1$ montrait un renforcement punctiforme irrégulièrement réparti pouvant attester de l'agrégation du récepteur (points focaux d'adhérence).

L'anticorps anti $\alpha 5$ ne donnait jamais lieu à un marquage des corps neuronaux et des cellules de la neuroglie. Les résultats étaient identiques avec l'anticorps anti $\beta 1$ à l'exception cependant avec cet anticorps d'un marquage des épendymocytes.

Enfin, les cellules leptoméningées exprimaient les sous-unités $\alpha 5$ et $\beta 1$.(photos 3, 4, 5, 6)

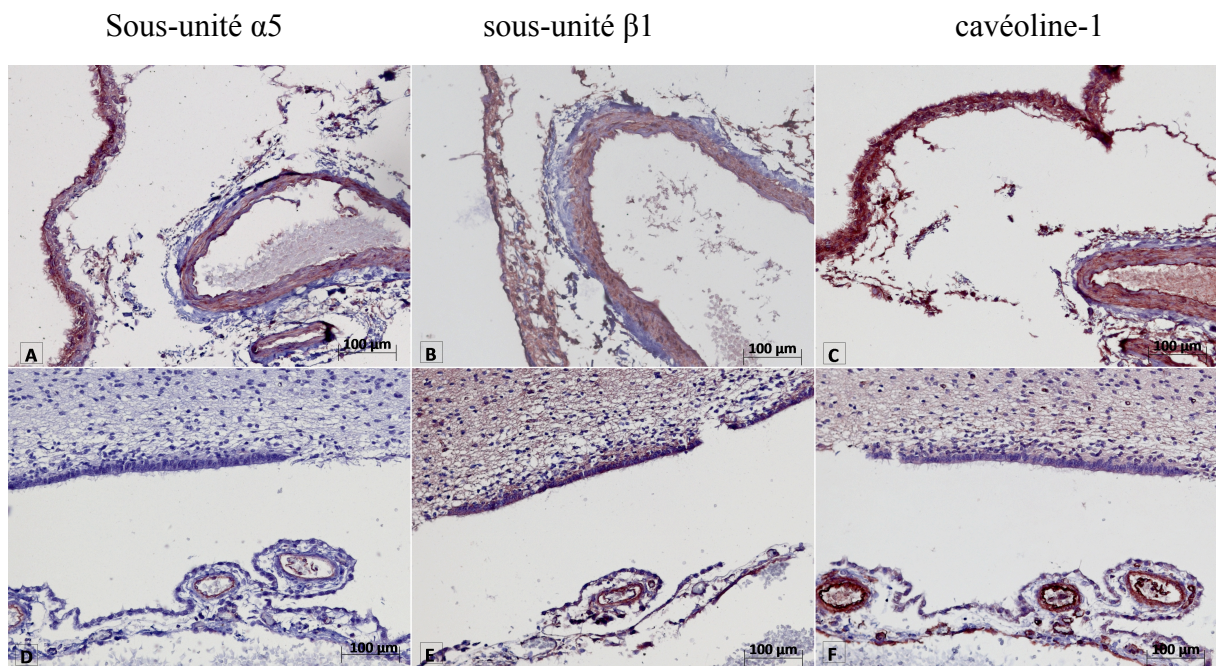
L'anticorps anti cavéoline-1 donnait lieu à un marquage intense et granulaire des endothéliocytes et des myocytes des parois vasculaires et ce quelque soit la topographie des prélèvements étudiés. Les cellules leptoméningées étaient également fortement marquées. (photos 3, 4)

Photo 3 :Expression des protéines d'intérêt dans le tissu cérébral normal



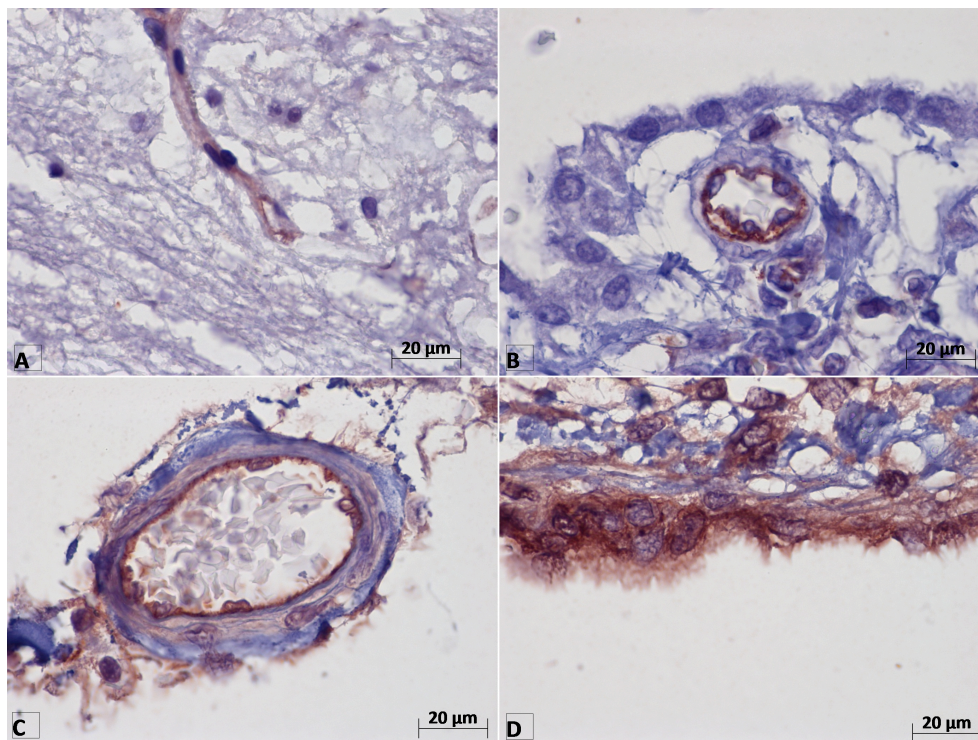
A, D, G : sous-unité $\alpha 5$ (IHC, x 200) : marquage faible et discontinu des endothéliocytes. ; B,E ,H : sous-unité $\beta 1$ (IHC, x 200) : marquage faible et discontinu des endothéliocytes ; C, F, I ; cavéoline-1 (IHC, x 200) : marquage intense de l'ensemble des endothéliocytes.

Photo 4: Expression des protéines au sein des plexus choroïdes et de la leptoméninge.



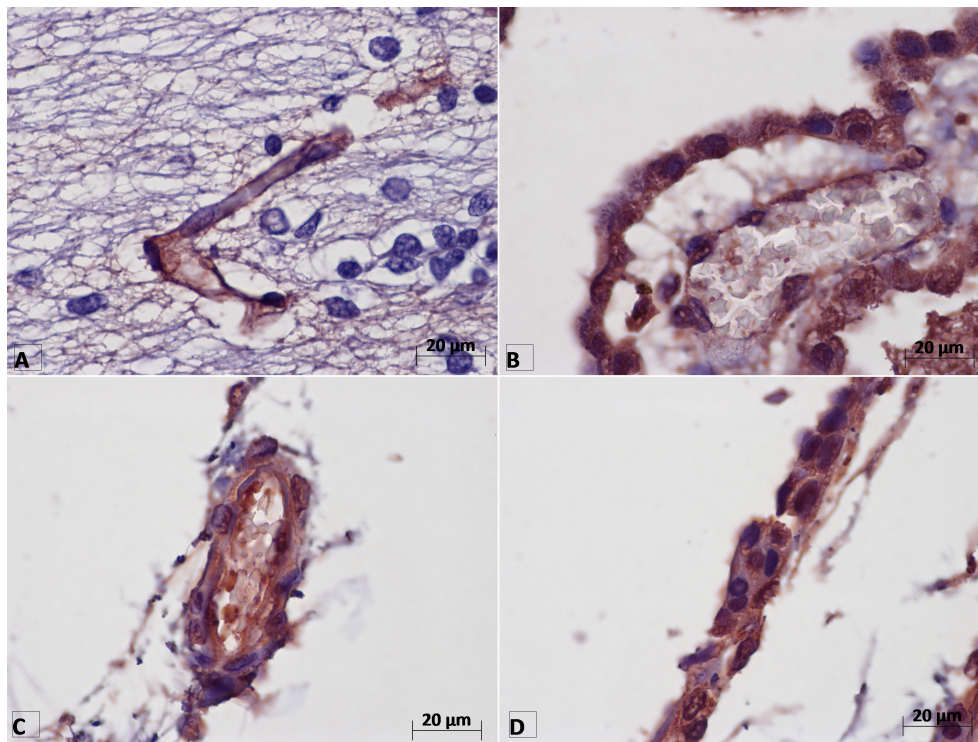
A, D : sous-unité $\alpha 5$ (IHC, x 200) : expression intense au niveau des cellules méningothéliales, des endothélicytes des vaisseaux de gros calibre. Marquage des myocytes lisses des medias vasculaires ; B, E : sous-unité $\beta 1$ (IHC, x 200) : expression identique à la sous-unité $\alpha 5$; C, F : cavéoline-1 (IHC, x 200) : expression intense des endothélicytes, des myocytes lisses des medias vasculaires ainsi que de cellules méningothéliales.

Photo 5: Marquage de la sous-unité $\alpha 5$ à fort grossissement



A: sous-unité $\alpha 5$ (IHC, x 1000) : substance blanche, B : sous-unité $\alpha 5$ (IHC, x 1000) : plexus choroïde, C : sous-unité $\alpha 5$ (IHC, x 1000) : vaisseau leptoméningé, D : sous-unité $\alpha 5$ (IHC, x 1000) : cellules méningothéliales.

Photo 6: Marquage de la sous-unité $\beta 1$ à fort grossissement



A: sous-unité $\beta 1$ (IHC, x 1000) : substance blanche, B : sous-unité $\beta 1$ (IHC, x 1000) plexus choroïde, C : sous-unité $\beta 1$ (IHC, x 1000) : vaisseau leptoméningé, D : sous-unité $\beta 1$ (IHC, x 1000) : cellules méningothéliales.

II.B.3.b.Prélèvements des tissus normaux (hors encéphale).

Au niveau de tous les prélèvements examinés la sous-unité $\alpha 5$ était fortement exprimée au niveau des endothélicytes des vaisseaux artériels et veineux. Le marquage était en règle plus faible au niveau des endothélicytes du lit microcirculatoire voire même parfois absent (thymus, thyroïde, veinules altoendothéliales des ganglions lymphatiques). Le lit microcirculatoire mis à part, l'intensité du signal variait d'un territoire à l'autre d'un même prélèvement et d'un prélèvement à l'autre. Le marquage des parois des sinusoides hépatiques était intense et continu, attestant de l'expression de la sous-unité à la fois par les endothélicytes et les macrophages étoilés des sinusoides. L'anticorps anti $\beta 1$ donnait lieu à un marquage endothélial superposable en intensité et en distribution à celui observé dans le cas de la sous-unité $\alpha 5$, le signal observé au niveau des cellules littorales des sinusoides hépatiques étant cependant faible ou discutable. Ce dernier anticorps marquait de plus les myocytes lisses des parois vasculaires ainsi que les myocytes des musculatures bronchiolaires, ceux des musculaires du tube digestif et ce quelque soit le niveau, enfin les cellules musculaires lisses des muscles arrecteurs des poils. L'anticorps dirigé contre la sous-unité $\alpha 5$ ne reconnaissait que les myocytes des muscles arrecteurs et parfois les myocytes lisses des

médias vasculaires et des musculaires muqueuses et musculaires du tube digestif. Les endothéliocytes des vaisseaux d'un corps jaune cyclique ne surexprimaient pas les deux sous unités.

Les anticorps dirigés contre les deux sous-unités donnaient lieu à un marquage intense de la membrane plasmique d'une majorité des macrophages et ce, quelque soit le site, à l'exception cependant des cellules de Hofbauer et de la microglie non réactionnelle. Par ailleurs les macrophages à corps tingibles des centres germinatifs des nœuds lymphatiques n'étaient pas reconnus par l'anticorps anti $\beta 1$. Enfin les deux anticorps reconnaissaient des cellules fusiformes dermiques dont la nature fibroblastique ou dendrocytaire n'a pas été déterminée.

Au niveau de la moelle hématopoïétique les sous-unités $\alpha 5$ et $\beta 1$ étaient exprimées au niveau des différents éléments la série mégacaryocytaire, plaquettes comprises, et des cellules endothéliales des sinusoides.

Les anticorps dirigés contre les deux sous-unités donnaient naissance à une coloration granuleuse du pôle apical des thyrocytes, d'interprétation délicate dans la mesure où la colloïde était le siège d'une coloration brunâtre diffuse, bien que peu intense.

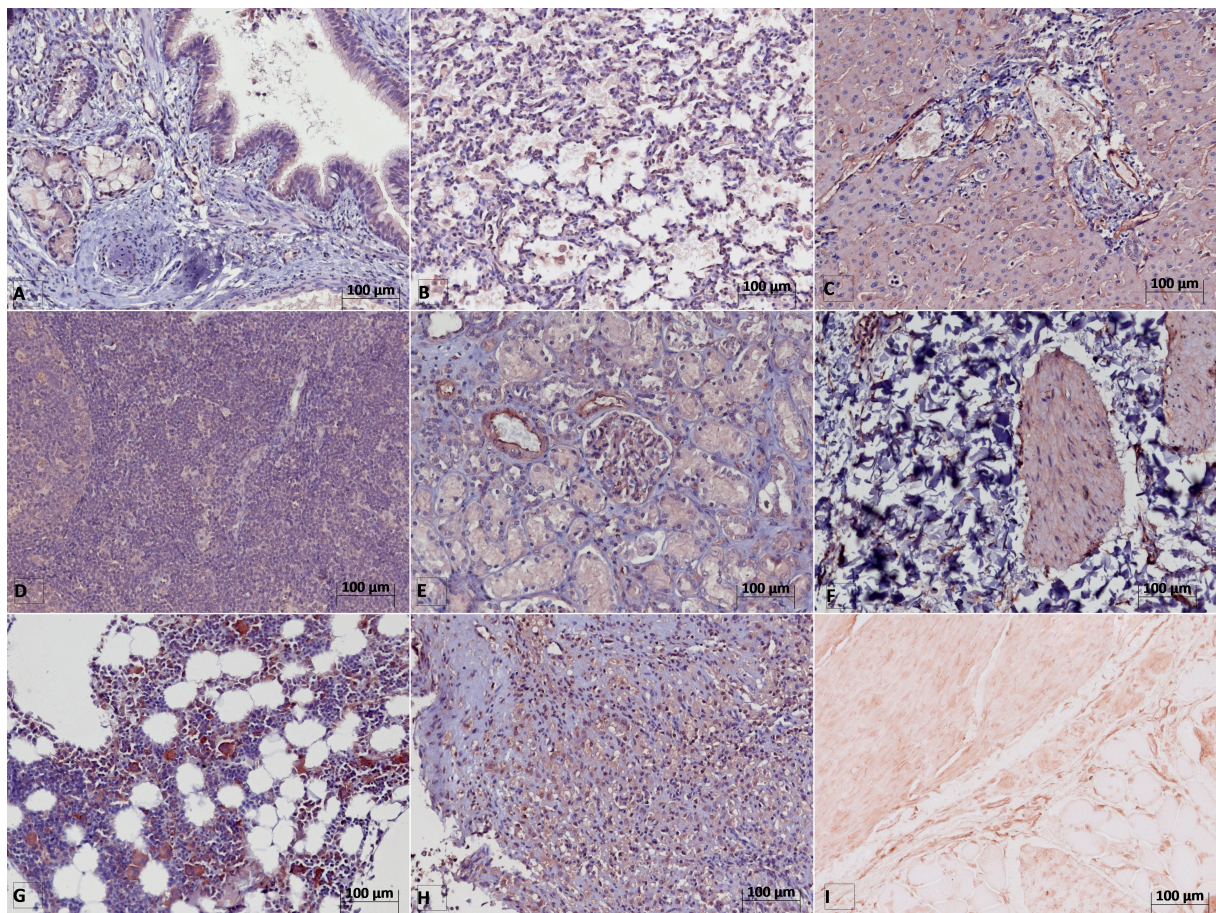
Au niveau du rein, les anticorps dirigés contre les deux sous-unités donnaient lieu à un marquage endothélial (touffe glomérulaire, capillaires péri tubulaires et vaisseaux de plus grande taille), l'anticorps anti sous-unité $\beta 1$ interagissant de plus avec les membranes plasmiques des cellules pavimenteuses glomérulaires et des cellules épithéliales de l'anse de Henlé.

Au niveau du pancréas le marquage était uniquement vasculaire pour la sous-unité $\alpha 5$, l'anticorps dirigé contre la sous-unité $\beta 1$ marquant en plus les canaux interlobulaires.

Les cellules épithéliales des muqueuses du tube digestif (œsophage, antre, fundus, duodénum, iléon, colon, appendice) n'étaient marquées par aucun des deux anticorps Les membranes plasmiques des corps neuronaux des plexus myentériques, étaient colorées par l'anticorps anti sous-unité $\beta 1$ mais pas par celui complémentaire de la sous unité $\alpha 5$. (photos 7 et 8)

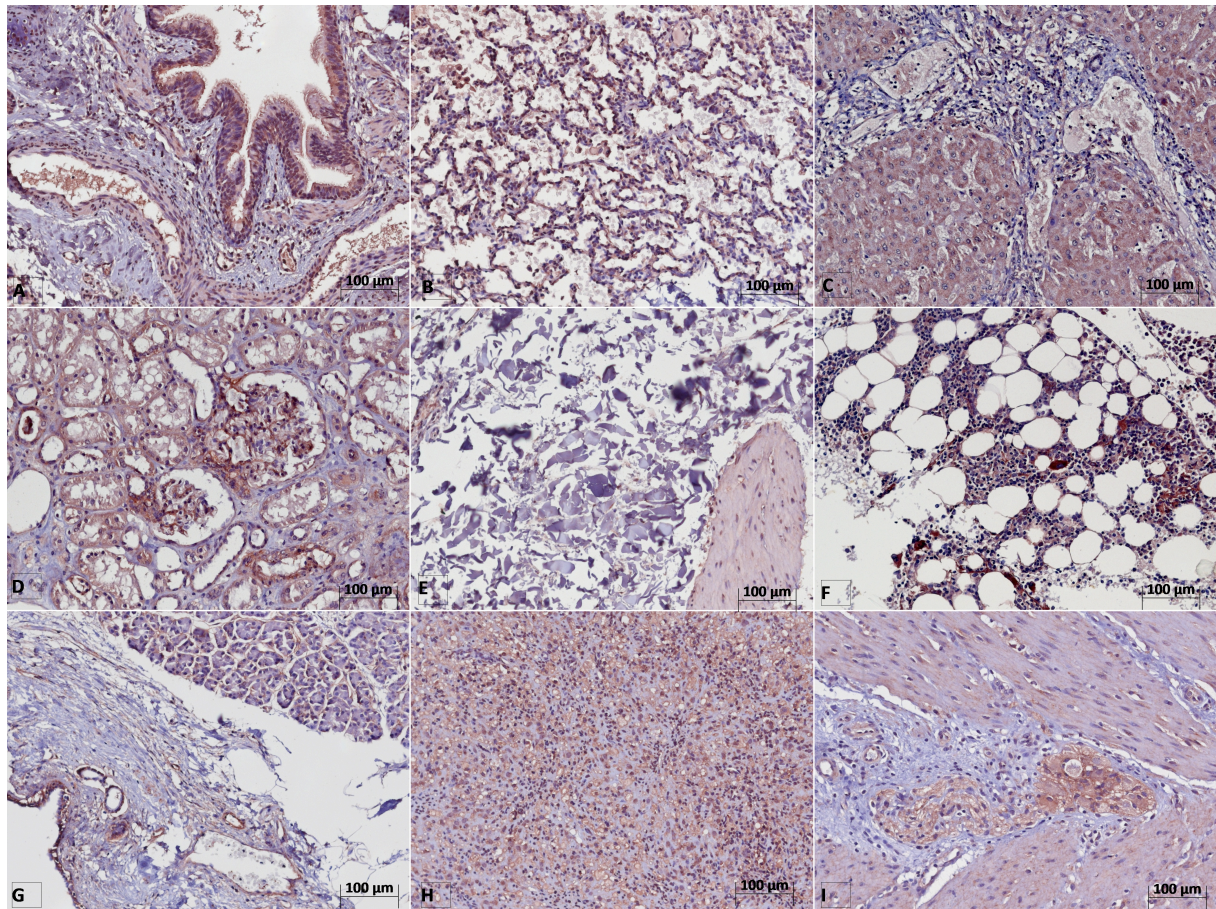
Pour ce qui concerne la cavéoline-1, le marquage des endothéliocytes était intense au niveau de l'ensemble du lit circulatoire et ce quelque soit le type de vaisseau et la taille de ce dernier. L'anticorps marquait également l'ensemble des myocytes lisses des médias vasculaires ainsi que ceux de toutes les musculaires muqueuses et toutes les musculaires, des muscles arrecteurs, ainsi que les adipocytes. Le signal était constamment intense et ce quelque soit le prélèvement étudié. De plus, les épithéliocytes de la couche basale de l'œsophage exprimaient l'antigène cavéoline-1.(photo 9)

Photo 7: expression de la sous-unité $\alpha 5$ dans les tissus normaux.



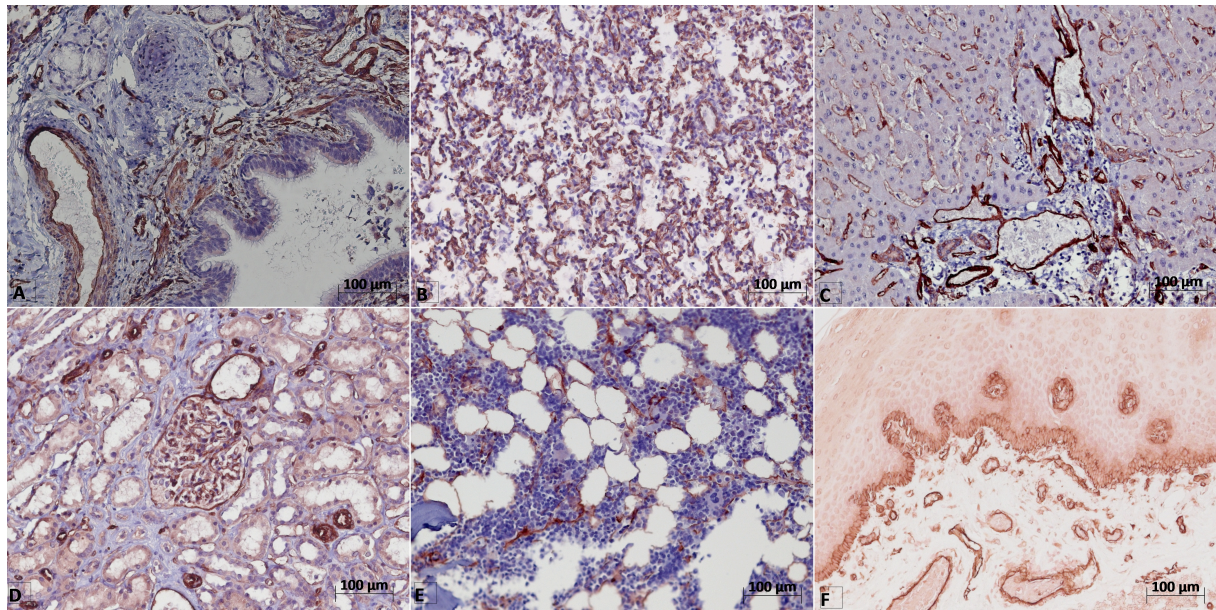
A: sous-unité $\alpha 5$ (IHC x200) : bronchioles, pas de marquage épithélial, ni des myocytes lisses ; B : sous-unité $\alpha 5$ (IHC x200), marquage membranaire et cytoplasmique des macrophages alvéolaires sans marquage pneumocytaire, C: sous-unité $\alpha 5$ (IHC x200) : foie, marquage des cellules littorales des sinus, D : sous-unité $\alpha 5$ (IHC x200) : nœud lymphatique : marquage des macrophages du centre germinatif et des sinus, absence de marquage lymphocytaire et des veines altoendothéliales, E : sous-unité $\alpha 5$ (IHC x200) : rein, marquage uniquement endothélial F : sous-unité $\alpha 5$ (IHC x200) : peau : marquage des cellules musculaires d'un muscle arrecteur, de cellules fusiformes dermiques et d'endothéliocytes G: sous-unité $\alpha 5$ (IHC x200), moelle osseuse, : marquage de la série mégakaryocytaire et de la paroi des sinus ; H : sous-unité $\alpha 5$ (IHC x200): corps jaune, marquage des cellules de la granulosa sans marquage vasculaire, I : sous-unité $\alpha 5$ (IHC sans contre coloration x200) : marquage des cellules endothéliales sans marquage des cellules périnerveuses ou des neurones.

Photo 8 : Expression de la sous-unité $\beta 1$ dans les tissus normaux



A: sous-unité $\beta 1$ (IHC x200) : bronchioles, marquage des myocytes lisses et des cellules endothéliales B : sous-unité $\beta 1$ (IHC x200), marquage des macrophages alvéolaires, C: sous-unité $\beta 1$ (IHC x200) : marquage discutable des sinusoides, marquage des endothéliocytes des vaisseaux de l'espace porte, absence de marquage des épithéliocytes, D : sous-unité $\beta 1$ (IHC x200), rein, marquage intense des capillaires glomérulaires, de l'ensemble des endothéliocytes ainsi que des myocytes lisses des parois vasculaires E : sous-unité $\beta 1$ (IHC x200) : marquage des myocytes lisses du muscle arrecteur, F : sous-unité $\beta 1$ (IHC x200) : moelle osseuse, marquage intense de la lignée mégakaryocytaire et des sinus G : sous-unité $\beta 1$ (IHC x200) : marquage des épithéliocytes des canaux interlobulaires pancréatique, marquage modéré des endothéliocytes, H: sous-unité $\beta 1$ (IHC x200): corps jaune, marquage des cellules de la granulosa sans surexpression au niveau des endothéliocytes, I : sous-unité $\beta 1$ (IHC x200) plexus myentérique, marquage des cellules de schwann et des neurones .

Photo 9 : Expression de la cavéoline-1 dans les tissus normaux

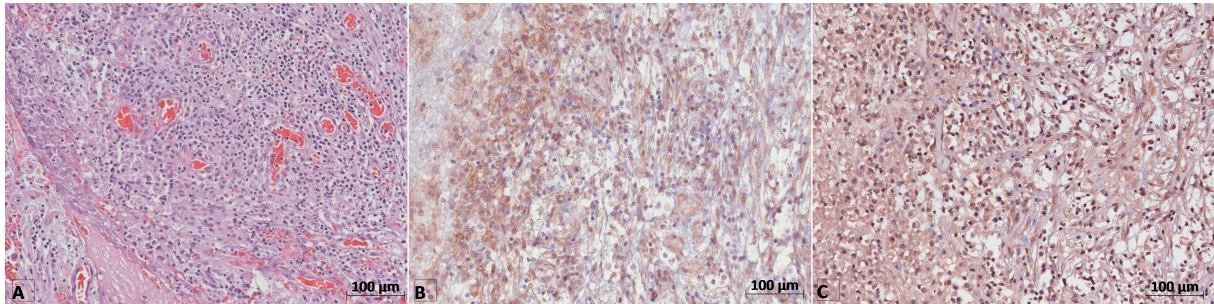


A: cavéoline-1 (IHC, x 200) : bronchiole, marquage intense des cellules endothéliales et de la musculature muqueuse, B :cavéoline-1 (IHC, x 200) : macrophages alvéolaires, absence de marquage, C : cavéoline-1 (IHC, x 200) : foie, marquage intense de tous les endothéliocytesD : cavéoline-1 (IHC, x 200) : rein, marquage intense des endothéliocytes et desmyocytes lisses des medias vasculaires E : cavéoline-1 (IHC, x 200) : moelle osseuse, marquage des endothéliocytes et des adipocytes F : cavéoline-1, oesophage (IHC sans contre coloration, x 200) : marquage des épithéliocytes basaux.

II.C.Expression des sous-unités $\alpha 5$ et $\beta 1$ dans la gliose et la microglie réactionnelles.

La recherche d'une expression de l'intégrine par les astrocytes des glioses a été réalisée sur quatre prélèvements cérébraux effectués dans le cadre d'intervention chirurgicale d'indication non tumorale ainsi que sur sept autres prélèvements intéressant la périphérie non envahie d'oligodendrogliomes. La réalité de la gliose réactionnelle a été vérifiée sur des coupes adjacentes colorées à l'aide d'un anticorps anti protéine gliale fibrillaire acide. Il apparaît de cette analyse que les astrocytes des glioses n'expriment pas $\alpha 5$ et n'expriment que faiblement $\beta 1$ d'une part et que tous les microglies expriment de façon nette les deux sous-unités d'autre part. Dans tous les cas, l'intensité du signal pour les deux sous-unités était plus intense au niveau des endothéliocytes du lit microcirculatoire que ceux des tissus cérébraux sains. (photo 10)

Photo 10: Expression des deux sous-unités au sein de la gliose.

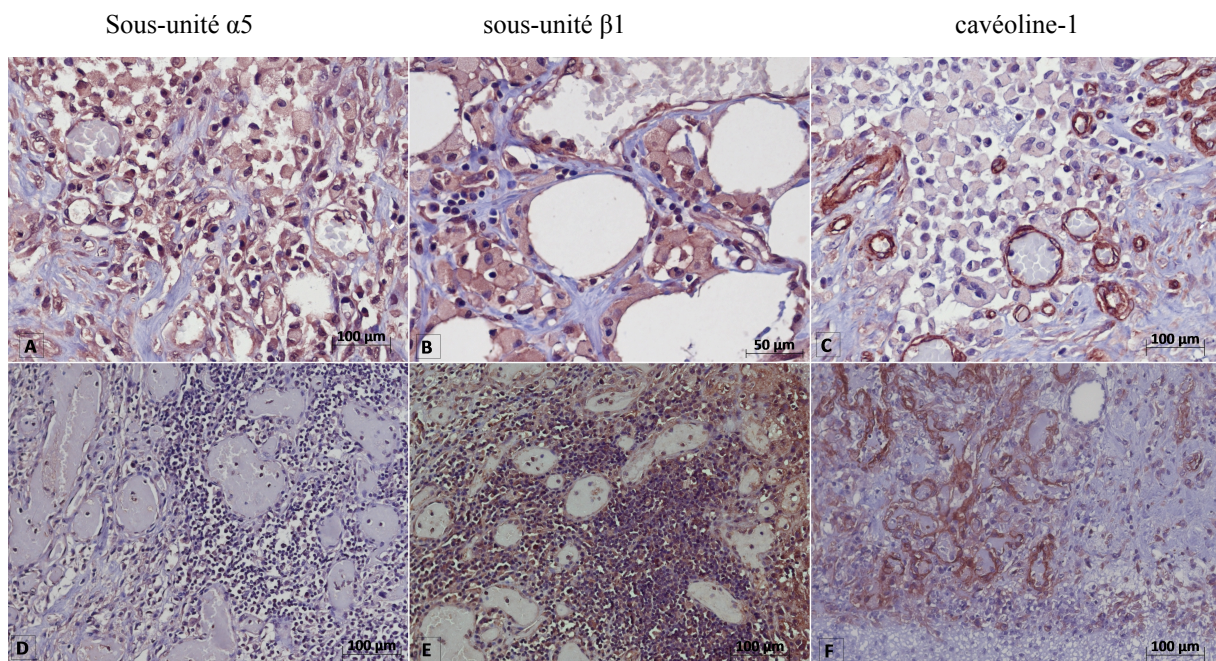


A: abcès cérébral (HES x 200) : B : sous-unité $\alpha 5$ (IHC x 200) : marquage intense des microglies et des cellules endothéliales, D : sous-unité $\beta 1$ (IHC x 200) : marquage identique à l'autre sous-unité.

II.D.Expression des sous-unités $\alpha 5$ et $\beta 1$ dans un tissu de granulation.

Au niveau de ce prélèvement il n'était pas observé de surexpression des sous-unités au niveau des endothélicytes du lit microcirculatoire. Les membranes des macrophages étaient en revanche fortement marquées par les deux anticorps. L'expression de la cavéoline-1 n'était pas modifiée. En particulier il n'était pas mis en évidence de marquage au niveau des macrophages.(photo 11)

Photo 11: Expression des trois protéines dans une ulcération.



A, B, C : macrophages (HIS, x 200) : expression membranaire et cytoplasmique des deux sous-unités $\alpha 5$ et $\beta 1$ sans expression de la cavéoline-1. D, E, F : néovascularisation (IHC, x 200) : absence d'expression de la sous-unité $\alpha 5$, expression de la sous-unité $\beta 1$ et de la cavéoline-1 par les cellules endothéliales.

III.Expression des sous-unités $\alpha 5$ et $\beta 1$ et de la cavéoline-1 dans les xénogreffes de souris athymiques.

III.A.Greffes hétérotopiques

L'étude a porté sur 42 xénogreffes de glioblastome (19 échantillons strasbourgeois, 23 nancéens). La recherche de la sous-unité $\beta 1$ n'a à ce jour été effectuée que sur les cas strasbourgeois.

Les résultats du travail sont reportés dans le tableau ci dessous. Une nécrose était observée dans 6 cas strasbourgeois (32%) et 19 cas nancéens (83%). En moyenne les xénogreffes nancéennes étaient plus volumineuses que les strasbourgeoises (1,8 cm en moyenne contre 1 cm).

N'ont été considérés comme positifs que les marquages membranaires granuleux. Il n'a pas été tenu compte des marquages cytoplasmiques diffus.

Lignée	cas	Sous-unité $\alpha 5$				Sous-unité $\beta 1$				cavéoline-1				nécrose	homogénéité	délai euthanasie
		T		vaisseaux		T		vaisseaux		T		vaisseaux				
		I	S	I	S	I	S	I	S	I	S	I	S			
TC7	315	2	5	2	5	3	5	0	0	3	3	3	3	non	homogène	
TC7	350	3	5	3	5	3	5	1	1	3	5	3	5	non	homogène	
TC7	358	2	5	1	4	2	2	0	0	3	5	3	4	oui	homogène	
TC10	388	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	3	5	oui	homogène	
TC10	433	3	1	3	5	3	1	0	0	3	1	3	5	non	homogène	
TC10	453	1	1	3	5	1	3	0	0	0	0	3	5	non	homogène	
TC14	352	1	5	1	5	3	5	0	0	3	1	3	5	non	homogène	
TC19	341	3	3	1	1	2	1	0	0	3	4	3	5	non	homogène	
TC20	382	0	0	1	5	3	5	0	0	2	5	1	5	non	homogène	
TC20	391	0	0	3	5	3	2	0	0	3	2	3	5	non	clusters $\beta 1$	
TC22	386	2	1	0	0	1	2	0	0	1	2	1	5	non	homogène	
TC22	430	1	1	0	0	0	0	0	0	3	3	3	5	non	homogène	
TC24	416	1	1	1	5	1	5	0	0	1	2	1	5	non	clusters $\beta 1$	
TCG4	06S763	0	0	1	1					0	0	1	5	oui	homogène	54
TCG4	07S111	0	0	1	1					0	0	2	5	oui	homogène	58
TCG4	08S311	0	0	2	1					0	0	1	5	oui	homogène	53
TCG4	08S364	0	0	1	4					1	1	3	5	oui	homogène	49
TCG9	06S113	3	1	2	5	3	3	1	1	3	3	3	5	oui	clusters cav	104
TCG9	06S871	2	2	2	2					3	3	3	5	oui	clusters cav	75
TCG9	07S604	3	3	3	5					3	3	3	5	non	clusters $\alpha 5$ et cav	47
TCG11	06S483	3	1	3	4					3	4	3	5	oui	périnécrotique cav	114
TCG11	06S876	2	2	3	5					3	1	3	5	non	homogène	174
TCG11	07S039	1	2	0	0					3	1	3	5	non	homogène	75
TCG13	06S619	0	0	3	2					3	2	3	5	oui	périnécrotique cav	56
TCG13	07S092	1	2	0	0					3	1	0	0	oui	homogène	58
TCG15	08S348	2	1	3	5					3	4	3	5	non	clusters cavéoline	31
TCG15	08S349	0	0	1	5					0	0	1	5	oui	homogène	42
TCG17	07S542	1	2	0	0					1	3	0	0	oui	homogène	43
	329	3	4	3	5	3	5	0	0	3	5	3	3	non	clusters $\alpha 5$	
	342	3	1	3	5	3	1	0	0	0	0	3	5	oui	homogène	
	369	3	1	0	0	3	4	0	0	1	5	1	1	oui	homogène	
	444	1	1	0	0	1	3	0	0	1	1	1	5	oui	périnécrotique $\alpha 5$	
	471	0	0	0	0	1	1	0	0	1	4	1	4	non	homogène	
TCG2	07S102	0	0	0	0					3	4	3	5	oui	homogène	69
TCG13	07S114	0	0	3	2					0	0	1	5	oui	homogène	144
TCG17	07S313	1	5	1	4					3	4	3	5	oui	homogène	19
TCG17	07S314	0	0	1	2					0	0	2	5	oui	homogène	39
TCG3	07S458	0	0	3	1					0	0	3	3	oui	homogène	28
TCG3	07S412	2	1	0	0					2	3	3	5	oui	clusters cav	33
TCG2	07S725	0	0	0	0					0	0	2	3	oui	homogène	30
TCG3	07S866	0	0	1	2					2	3	3	5	oui	clusters cav	31
TCG2	08S194	1	1	3	5					3	5	3	5	oui	homogène	42

Tableau résumant les différents résultats obtenu au niveau des échantillons de greffes hétérotopiques: I= intensité du marquage (de 0 à 3), S=score (de 0 à 5), T=cellules tumorales, délai euthanasie= nombre de jours entre l'implantation de la tumeur et le décès de la souris (reflet de la rapidité de croissance tumorale).

III.A.1.Observations au niveau des cellules tumorales:

Pour ce qui concerne les cellules tumorales, la sous unité $\alpha 5$ était détectée dans 27 cas sur 42 (soit 64%) et la cavéoline-1 dans 33 cas sur 42 (78%). La sous-unité $\beta 1$ était détectée dans 17 des 19 cas strasbourgeois (90%). Une surexpression dans les territoires périnécrotiques (25 cas) n'a été observée qu'une fois pour la sous-unité $\alpha 5$, et trois fois pour la cavéoline-1.

➤ Relations entre les sous-unités $\alpha 5$ et $\beta 1$.

Dans les xénogreffes strasbourgeoises, la coexpression d' $\alpha 5$ et $\beta 1$ était observée dans 13 cas (69%). Dans trois échantillons, la sous-unité $\alpha 5$ n'était pas détectée. Dans une observation il n'était observé d'expression ni de la sous-unité $\alpha 5$ ni de la sous-unité $\beta 1$, dans un cas la sous-unité $\beta 1$ n'était pas détectée, et ce malgré l'expression faible de la sous-unité $\alpha 5$, l'intensité du signal pour ces deux protéines était 11 fois identique (85%), celui correspondant à $\beta 1$ plus intense dans les deux échantillons restant (15%).

Le marquage pour les deux protéines était diffus dans dix fois, dans trois xénogreffes, le marquage était inhomogène, des clones exprimant les protéines alternant avec d'autres ne les exprimant pas. Un score variant de 0 à 5, tenant compte du pourcentage de cellules marquées, a été défini. Le score des deux sous-unités était similaire dans 4 cas (31%), celui de $\beta 1$ était plus élevé que celui d' $\alpha 5$ dans 6 cas (46%) enfin l'inverse était observé dans les trois cas restant (23%). Dans 31% des cas (4/13) le score de marquage des deux sous-unités était élevé (entre 4 et 5) attestant d'un grand nombre de cellules marquées.

Pour chaque lignée, plusieurs xénogreffes ont été étudiées, le score pour les tumeurs issues de la même lignée était globalement superposable pour la sous-unité $\alpha 5$ et plus variable pour la sous unité $\beta 1$.(photo 12)

➤ Relation entre la sous-unité $\alpha 5$ et la cavéoline-1.

Sur les 42 échantillons examinés, la sous-unité $\alpha 5$ n'était retrouvée que 26 fois (62%), la cavéoline-1 dans 33 cas (79%) et aucune des deux protéines n'était retrouvée dans 7 cas (17%). Dans 21 cas, la cavéoline-1 était faiblement exprimée (score entre 0 et 2), parmi ces derniers, une seule fois, le score correspondant de la sous-unité $\alpha 5$ était élevé (entre 4 et 5). Dans 21 autres tumeurs, le score de la cavéoline-1 se situait entre 3 et 5. Dans ces cas, 14 fois

sur 21 le score de la sous-unité $\alpha 5$ était faible et 6 fois on retrouvait des taux élevés d' $\alpha 5$ et de cavéoline-1 (entre 4 et 5).(photo 12)

III.A.2.Observation au niveau des cellules endothéliales.

Tous les anticorps utilisés dans ce travail reconnaissaient les antigènes murins et humains (pas de spécificité d'espèce). Il était donc possible d'analyser l'expression de ces protéines au niveau des cellules du micro environnement tumoral.

Trente fois sur 42 (71%) la recherche de la sous-unité $\alpha 5$ au niveau des endothéliocytes du réseau vasculaire s'est révélée positive. Quant présent, le marquage était homogène.

La cavéoline-1, quant à elle, était exprimée 40 fois sur 42 (95%). En revanche, pour la sous-unité $\beta 1$, il n'a été observé de marquage que dans deux cas sur 19. Le tissu conjonctif murin péri tumoral n'étant que peu représenté, il s'est avéré impossible de rechercher des variations d'expression des protéines en fonction de la topographie des vaisseaux, au sein même de la tumeur ou au niveau du front d'invasion.

Dans toutes les tumeurs les macrophages étaient marqués par les anticorps anti- $\alpha 5$ et anti- $\beta 1$ mais pas par celui dirigé contre la cavéoline-1. Les techniques utilisées ne permettaient pas de distinguer les myofibroblastes du stroma des cellules tumorales ni de reconnaître des péricytes au sein même des tumeurs.

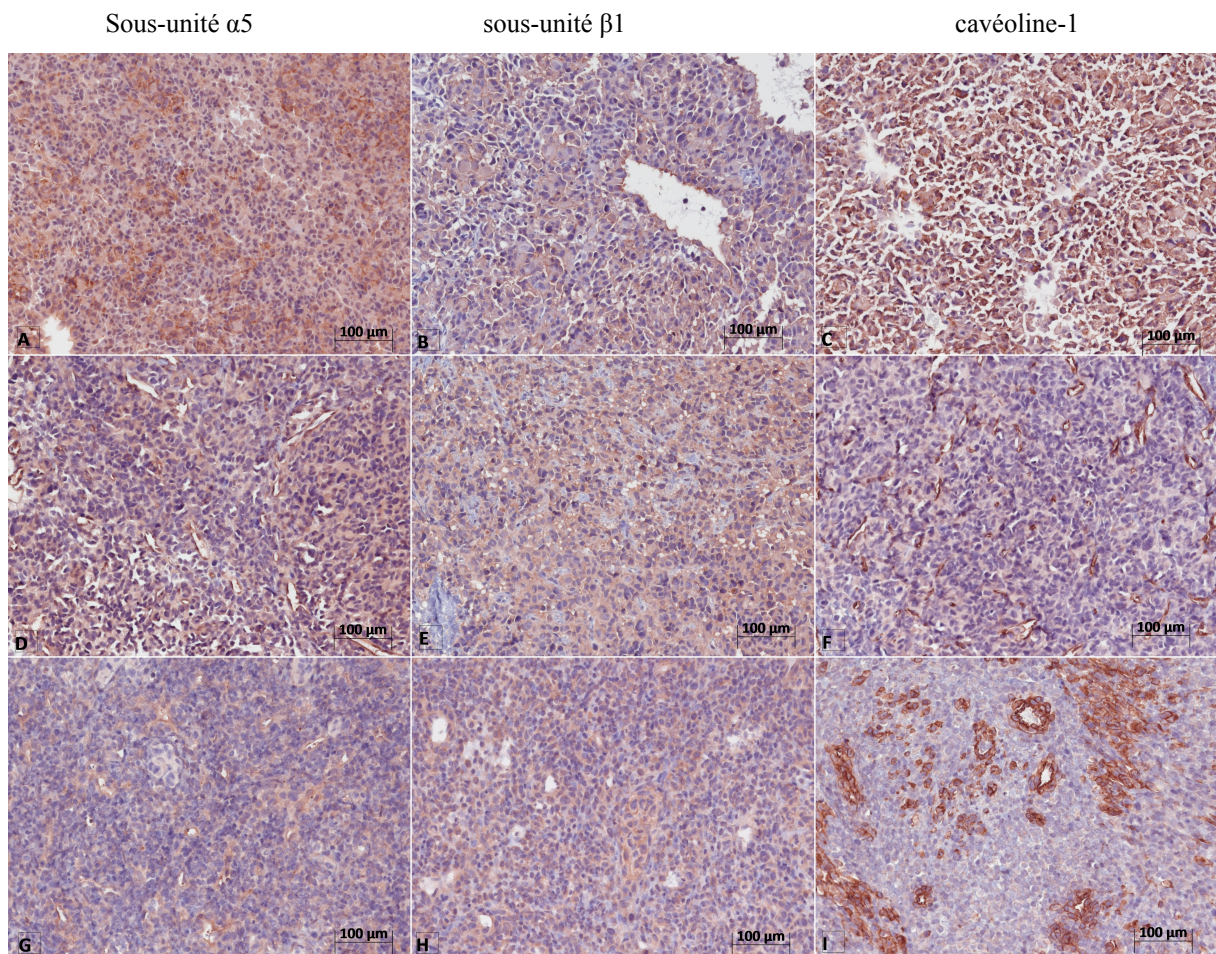
L'intensité de marquage des endothéliocytes par l'anticorps anti-cavéoline-1 était forte dans 27 cas (64%), modéré dans un cas et faible dans 14 cas. L'intensité de marquage entre la cavéoline-1 et la sous-unité $\alpha 5$ était identique dans 18 cas, plus intense dans 21 cas.

Le score de la cavéoline-1 était fort (entre 4 et 5) dans 36 cas (90%), celui d' $\alpha 5$ dans 20 cas (67%).

III.A.3.Analyse statistique.

Il n'a pas été mis en évidence d'influence du score de la sous-unité $\alpha 5$ ni de la cavéoline-1 sur la vitesse de progression tumorale (reflété par le délai d'euthanasie). Néanmoins, la principale cause d'échec est la faiblesse de puissance du test. Les données ne sont pas rapportées.

Photo 12: Trois principales différences concernant les greffes hétérotopiques.



A, B, C : cas 329 (IHC, x 200) : beaucoup de cellules tumorales marquées par les 3 protéines d'intérêt, D, E, F (IHC x 200) : cas 352: beaucoup de cellules tumorales positives avec la sous-unité $\alpha 5$, peu avec la cavéoline-1, G, H, I (IHC x 200) :cas 06S113: peu de cellules marquées avec l'anticorps anti sous-unité $\alpha 5$, nombreuses cellules marquées par l'anticorps anti cavéoline-1, en clusters périvasculaires.

Il n'existe pas de front d'invasion au niveau des greffes hétérotopiques chez la souris athymique, pour étudier l'expression des deux sous-unités $\alpha 5$ et $\beta 1$ au niveau des cellules du front d'invasion, trois modèles orthotopiques ont été étudiés.

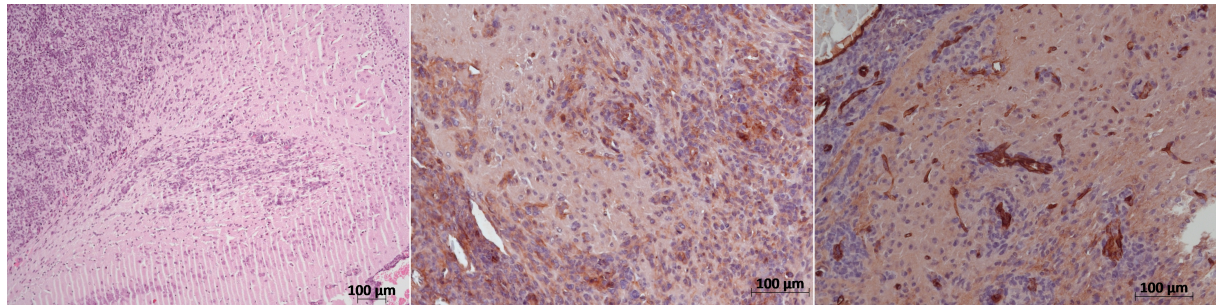
III.B.Greffes orthotopiques.

Trois greffes orthotopiques invasives ont été étudiées. Dans ces tumeurs, une majorité des cellules tumorales exprimaient les deux sous-unités du récepteur. Il n'était pas observé de surexpression du récepteur au niveau du front d'invasion. Au niveau des cellules tumorales, le marquage n'était pas polarisé. Les endothéliocytes étaient marqués plus intensément au niveau de la tumeur par rapport au lit microcirculatoire du parenchyme cérébral adjacent.

Par contre, la cavéoline montrait une nette prédominance d'expression au niveau des cellules tumorales à distance du front d'invasion. (photo 13)

Une étude sur un plus grand nombre de cas pourrait avoir un intérêt dans la caractérisation du profil des cellules tumorales au niveau du front d'invasion.

Photo 13: greffe orthotopique, front d'invasion.



A: Front d'invasion (HES x 100), B : sous-unité $\alpha 5$ (IHC, x 200) : cellules tumorales du front d'invasion fortement marquées, C : cavéoline-1 (IHC x 200) : Absence de marquage des cellules tumorales du front d'invasion.

IV. Analyse transcriptionnelle et immunohistochimique des sous-unités $\alpha 5$, $\beta 1$ et de la cavéoline-1 dans les gliomes malins humains.

IV.A. Résultats quantitatifs globaux.

Après relecture par deux pathologistes, 56 observations ont été retenues (22 oligodendrogliomes anaplasiques, 24 glioblastomes multiformes et 10 astrocytomes anaplasiques). Trente trois fois, des échantillons congelés correspondant aux tumeurs précédentes étaient accessibles.

Les résultats de l'étude d'expression tant transcriptionnelle que traductionnelle sont reportés dans les tableaux ci dessous.

Concernant les 24 cas de glioblastomes, la moyenne d'âge était de 55.6 ans et le ratio homme/ femme de 1.6.

Pour ce qui concerne les 22 oligodendrogliomes, la moyenne d'âge était de 46.8 ans et le ratio homme/ femme de 1.7.

Enfin, dans le cas des astrocytomes anaplasiques (10 observations), la moyenne d'âge était de 60.4 ans et le ratio homme/ femme de 1.

L'étude statistique a porté sur la recherche de corrélation entre la quantité d'ARNm mesurée et l'expression des protéines d'intérêt en immunohistochimie, et le lien entre les oligodendrogliomes anaplasiques et les glioblastomes.

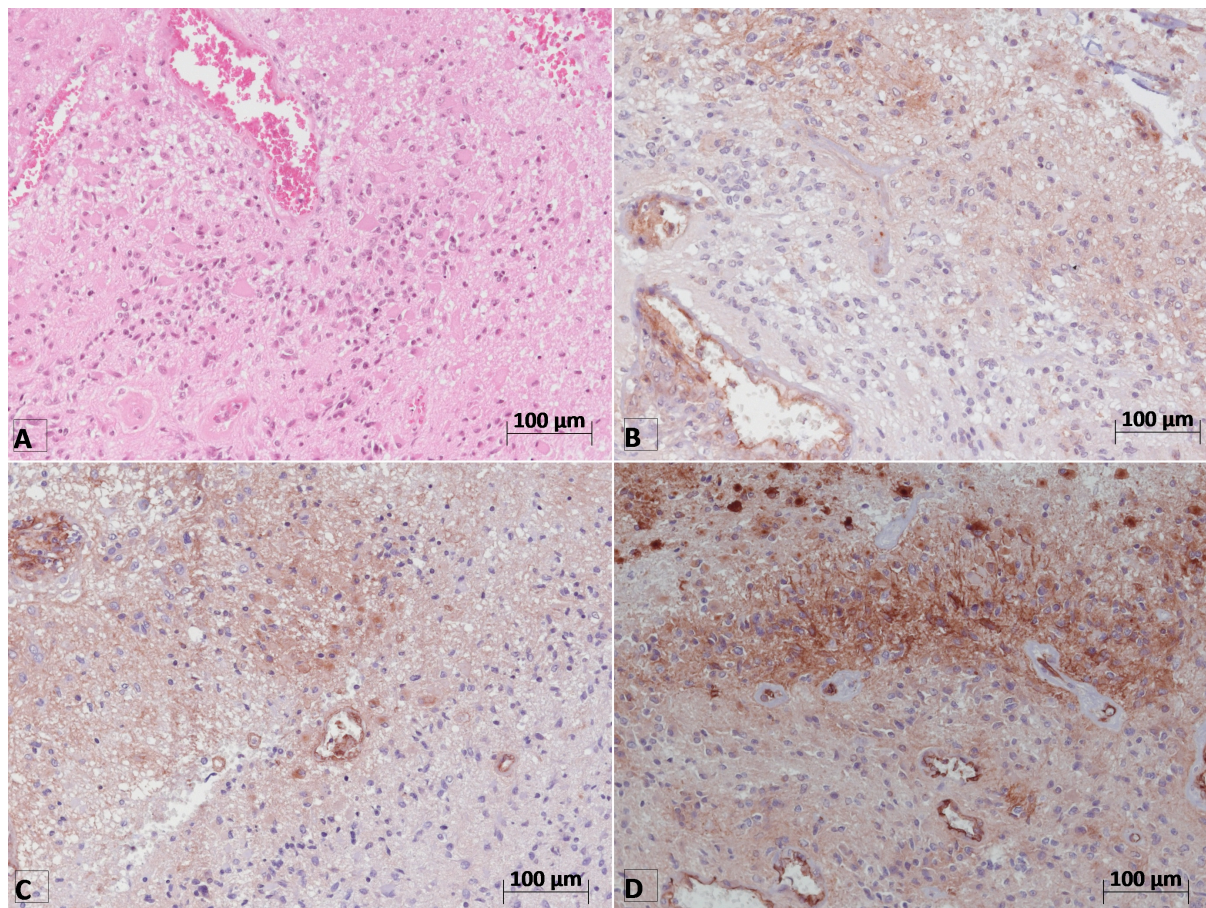
Les autres points d'observation ont été les expressions entre $\alpha 5$ et $\beta 1$ (notamment, l'absence d'expression de l'un ou l'autre) ainsi que la relation entre cavéoline-1 et $\alpha 5$ afin de le comparer aux modèles murins.

IV.B. Analyse morphologique.

Lorsque présent, le marquage des endothéliocytes par les anticorps dirigés contre les sous-unités $\alpha 5$ et $\beta 1$ était toujours membranaire et granulaire, celui des cellules tumorales quand présent, le plus souvent membranaire avec, dans les cas de plus forte intensité, un caractère granuleux. A la différence des modèles murins, un marquage cytoplasmique diffus d'intensité variable était également souvent observé. Au niveau de la cellule le signal était le plus souvent circonférentiel, jamais polarisé. Des plages de nécrose étaient détectées dans 27 des 56 observations. Une surexpression, toujours conjointe, des trois protéines, n'était observée dans les zones périnécrotiques que dans 12 cas (44%) (photo 14). L'intensité du signal était

toujours plus forte au sein des structures gloméruloïdes que du lit microcirculatoire ou de la gliose associée.

Photo 14: Marquage préférentiel des cellules tumorales dans les zones périnécrotiques.



A: Cas 01h13701: Oligodendrogliome anaplasique (HES, x 200), B : sous-unité $\alpha 5$ (IHC, x 200) : surexpression au niveau des cellules tumorales en périphérie de la nécrose, C : sous-unité β (IHC, x 200) : surexpression au niveau des cellules tumorales en périphérie de la nécrose, D : cavéoline-1 (IHC, x 200) : surexpression au niveau des cellules tumorales en périphérie de la nécrose,

				ALPHA5								
				ARNm	cellules T				vaisseaux			
					I		S		I	S		
Cas	diagnostic	H/F	age		cm	mb	cm	mb	mb	mb	distribution	
00H08620	OA	1	48	12,8	1	1	1	1	1	5	homogène	
00H10916	OA	2	23	2,57	1	0	1	0	1	2	homogène	
00H11134	OA	1	48	8,42	0	0	0	0	2	4	homogène	
00H10269	OA	2	44	2,48	0	1	0	1	1	2	homogène	
00H10393	OA	1	53	37,7	2	2	2	2	3	5	homogène	
00H11226	GBM	1	63	8,8	0	3	0	2	1	3	homogène	
00H14121	GBM	2	65	20,5	0	2	0	1	2	4	homogène	
00H05848	GBM	1	57	30,9	0	0	0	0	1	5	homogène	
00H05078	GBM	1	64	20,3	1	1	2	2	3	4	homogène	
00H07426	GBM	2	32	12,4	0	3	0	2	2	5	homogène	
00H13208	OA	2	47	2,82	0	0	0	0	3	5	homogène	
00H13468	OA	1	16	20,1	3	3	2	2	3	5	périnécrotique	
00H13835	GBM	1	53	27,7	0	2	0	2	2	5	périnécrotique	
01H11438	OA	1	63	3,8	2	2	2	2	2	5	homogène	
01H011789	GBM	1	44	10,81	3	3	4	4	3	5	périnécrotique	
01H01181	OA	2	34	9,12	0	0	0	0	3	3	homogène	
01H02448	GBM	1	58	24,4	3	3	1	1	3	5	homogène	
01H02653	GBM	2	44	28,14	1	1	1	1	1	4	homogène	
01H03604	OA	2	48	0,62	0	0	0	0	1	4	homogène	
01H08671	OA	1	61	6,98	1	3	3	3	3	5	périnécrotique	
01H03669	OA	1	60	9	0	3	0	3	3	5	homogène	
01H10365	OA	1	23	3,8	0	2	0	2	2	5	homogène	
01H12375	OA	2	40	10,19	2	2	2	1	3	5	homogène	
01h12702	OA	2	48	7,49	0	0	0	0	2	5	homogène	
01H13161	OA	1	53	5,71	0	3	0	2	2	5	périnécrotique	
01H14289	GBM	2	68	13,04	0	2	0	2	3	5	homogène	
01H13701	OA	1	49	5,71	0	3	0	2	3	5	périnécrotique	
02H07508	GBM	1	39	12,5	0	1	0	2	2	5	homogène	
02H07960	GBM	1	61	11,7	0	1	0	2	1	3	périnécrotique	
02H12060	GBM	2	76	33,3	3	3	2	3	3	5	périnécrotique	
02H12342	GBM	2	42	7,78	0	1	0	1	3	5	homogène	
02H00554	OA	1	55	2,96	0	0	0	0	2	5	périnécrotique	
06H13776	OA	1	56		2	2	1	1	2	2	homogène	
06H14639	OA	1	71		2	2	1	1	1	4	homogène	
06H11267	AA	2	60		0	1	0	1	1	3	homogène	
06H13985	AA	1	75		0	0	0	0	1	1	homogène	
06H11035	AA	1	40		0	0	0	0	1	4	homogène	
06H11379	AA	1	62		3	3	1	4	3	5	homogène	
07H10340	GBM	1	30		2	2	3	3	1	4	homogène	
07H10259	GBM	1	53		3	3	2	2	3	4	périnécrotique	
07H09948	GBM	2	58		3	3	3	3	3	4	homogène	
07H9558	GBM	2	44		1	1	3	3	1	4	homogène	
07H02063	OA	1	37		0	0	0	0	0	0	homogène	
07H01644	AA	1	71		3	3	1	1	2	4	homogène	
07H01700	AA	1	56		0	0	0	0	1	4	homogène	
07H11300	AA	1	78		2	0	1	0	2	5	homogène	
07H11819	AA	2	47		2	2	2	2	3	4	homogène	
07H09421	OA	2	54	19,5	0	0	0	0	0	0	homogène	
08H00607	GBM	2	72		0	2	0	2	3	4	périnécrotique	
08H01363	GBM	2	72		1	1	4	2	2	4	périnécrotique	
08H01591	GBM	1	64		3	3	2	2	3	4	homogène	
08H02158	GBM	1	61		2	2	2	2	2	4	homogène	
08H02503	GBM	1	65		3	3	2	2	3	4	homogène	
08h01421	GBM	1	69		2	2	2	2	3	4	homogène	
08H01739	AA	2	54		1	0	3	0	3	4	homogène	
08H02794	AA	1	61		0	0	0	0	1	4	homogène	

Tableau résumant les résultats de la sous-unité $\alpha 5$: AA= astrocytome anaplasique, OA= oligodendrogliome anaplasique, GBM= glioblastome multiforme, H=homme (1), F= femme (2), ARNm= quantification relative, cm= cytoplasme, mb= membrane, I=intensité du marquage (de 0 à 3), S= score de cellules marquées (de 0 à 5), cellules T= cellules tumorales, vaisseaux= endothéliocytes, remplissage cyan= cas sans nécrose.

Cas	diagnostic	H/F	age	BETA1							distribution
				ARNm	cellules T				vaisseaux		
					I		S		I	S	
					cm	mb	cm	mb	cm	mb	
00H08620	OA	1	48	4,73	0	1	0	1	1	5	homogène
00H10916	OA	2	23	3,35	3	3	1	1	1	2	homogène
00H11134	OA	1	48	2,61	0	0	0	0	3	5	homogène
00H10269	OA	2	44	2,17	0	0	0	0	1	4	homogène
00H10393	OA	1	53	9,07	2	3	2	2	3	5	homogène
00H11226	GBM	1	63	3,11	0	0	0	0	3	3	homogène
00H14121	GBM	2	65	8,3	0	1	0	1	2	4	homogène
00H05848	GBM	1	57	11,37	0	0	0	0	1	5	homogène
00H05078	GBM	1	64	9,87	1	1	2	2	3	4	homogène
00H07426	GBM	2	32	2,46	0	3	0	2	3	5	homogène
00H13208	OA	2	47	2,1	3	0	3	0	3	5	homogène
00H13468	OA	1	16	9,04	3	3	2	2	3	5	périnécrotique
00H13835	GBM	1	53	7,55	0	2	0	3	3	5	périnécrotique
01H11438	OA	1	63	4,07	2	2	2	2	2	5	homogène
01H011789	GBM	1	44	8,39	0	3	0	1	3	5	périnécrotique
01H01181	OA	2	34	2,14	3	0	1	0	3	3	homogène
01H02448	GBM	1	58	8,49	3	3	1	2	3	5	homogène
01H02653	GBM	2	44	6,39	1	1	1	1	2	4	homogène
01H03604	OA	2	48	0,81	0	0	0	0	1	4	homogène
01H08671	OA	1	61	3,94	0	3	0	2	3	5	homogène
01H03669	OA	1	60	4,58	0	3	0	4	3	5	homogène
01H10365	OA	1	23	2,18	1	1	1	3	3	5	homogène
01H12375	OA	2	40	4,032	3	2	3	1	3	5	homogène
01h12702	OA	2	48	5,39	0	0	0	0	2	5	homogène
01H13161	OA	1	53	3,22	0	3	0	2	3	5	périnécrotique
01H14289	GBM	2	68	7,92	0	2	0	1	3	5	homogène
01H13701	OA	1	49	3,22	0	3	0	2	3	5	périnécrotique
02H07508	GBM	1	39	8,4	0	1	0	2	2	4	homogène
02H07960	GBM	1	61	4,69	0	1	0	2	2	3	homogène
02H12060	GBM	2	76	14,18	3	3	4	5	3	5	périnécrotique
02H12342	GBM	2	42	4,27	0	1	0	1	3	5	homogène
02H00554	OA	1	55	3,07	3	3	5	5	1	2	périnécrotique
06H13776	OA	1	56		2	0	2	0	2	5	homogène
06H14639	OA	1	71		1	1	4	4	1	4	homogène
06H11267	AA	2	60		1	1	1	1	1	2	homogène
06H13985	AA	1	75		0	0	0	0	1	2	homogène
06H11035	AA	1	40		2	0	1	0	2	4	homogène
06H11379	AA	1	62		3	0	1	0	3	5	homogène
07H10340	GBM	1	30		0	3	0	2	2	3	homogène
07H10259	GBM	1	53		3	3	4	4	3	5	périnécrotique
07H09948	GBM	2	58		0	3	0	4	2	4	homogène
07H9558	GBM	2	44		2	2	2	2	1	4	homogène
07H02063	OA	1	37		0	0	0	0	0	0	homogène
07H01644	AA	1	71		0	1	0	1	1	3	homogène
07H01700	AA	1	56		0	0	0	0	1	4	homogène
07H11300	AA	1	78		0	0	0	0	1	4	homogène
07H11819	AA	2	47		1	1	2	2	1	4	homogène
07H09421	OA	2	54	6,11	0	0	0	0	0	0	homogène
08H00607	GBM	2	72		0	2	0	2	3	4	périnécrotique
08H01363	GBM	2	72		2	3	2	4	2	4	périnécrotique
08H01591	GBM	1	64		2	2	3	3	3	4	homogène
08H02158	GBM	1	61		2	2	2	2	2	4	homogène
08H02503	GBM	1	65		3	3	4	4	3	4	homogène
08h01421	GBM	1	69		1	1	2	4	3	4	homogène
08H01739	AA	2	54		3	0	2	0	3	4	homogène
08H02794	AA	1	61		0	0	0	0	2	4	homogène

Tableau résumant les résultats de la sous-unité $\beta 1$: AA= astrocytome anaplasique, OA= oligodendrogliome anaplasique, GBM= glioblastome multiforme, H=homme (1), F= femme (2), ARNm= quantification relative, cm= cytoplasme, mb= membrane, I=intensité du marquage (de 0 à 3), S= score de cellules marquées (de 0 à 5), cellules T= cellules tumorales, vaisseaux= endothéliocytes, remplissage cyan= cas sans nécrose.

Cas	diagnostic	H/F	age	Cavéoline-1					distribution
				ARNm	cellules T		vaisseaux		
					I mb	S mb	I mb	S mb	
00H08620	OA	1	48	4,07	0	0	3	5	homogène
00H10916	OA	2	23	7,3	3	2	3	5	homogène
00H11134	OA	1	48	2,12	0	0	3	5	homogène
00H10269	OA	2	44	1,4	1	1	3	5	homogène
00H10393	OA	1	53	32	3	2	3	5	homogène
00H11226	GBM	1	63	26,5	3	3	3	5	homogène
00H14121	GBM	2	65	9,97	3	2	3	5	homogène
00H05848	GBM	1	57	6,76	1	3	3	5	homogène
00H05078	GBM	1	64	15,49	3	3	3	5	homogène
00H07426	GBM	2	32	14,5	3	3	3	4	homogène
00H13208	OA	2	47	3,9	3	2	3	5	homogène
00H13468	OA	1	16	10,7	3	2	3	5	périnécrotique
00H13835	GBM	1	53	5,4	3	2	3	5	périnécrotique
01H11438	OA	1	63	2,5	3	2	3	5	homogène
01H011789	GBM	1	44	12,56	3	5	3	5	périnécrotique
01H01181	OA	2	34	3,01	3	2	3	5	homogène
01H02448	GBM	1	58	19,01	3	5	3	5	homogène
01H02653	GBM	2	44	17,8	2	2	3	5	homogène
01H03604	OA	2	48	0,67	0	0	3	5	homogène
01H08671	OA	1	61	5,5	3	5	3	5	périnécrotique
01H03669	OA	1	60	5,27	3	5	3	5	homogène
01H10365	OA	1	23	1,35	3	4	3	5	homogène
01H12375	OA	2	40	3,45	3	3	3	5	homogène
01h12702	OA	2	48	4,14	0	0	3	5	homogène
01H13161	OA	1	53	5,1	3	2	3	5	périnécrotique
01H14289	GBM	2	68	13,5	3	2	3	5	homogène
01H13701	OA	1	49	5,1	3	4	3	5	périnécrotique
02H07508	GBM	1	39	14,7	3	4	3	5	homogène
02H07960	GBM	1	61	10,7	0	0	1	2	périnécrotique
02H12060	GBM	2	76	47,7	3	4	3	5	périnécrotique
02H12342	GBM	2	42	5,29	3	2	3	5	homogène
02H00554	OA	1	55	2,16	0	0	3	5	périnécrotique
06H13776	OA	1	56		3	3	3	5	homogène
06H14639	OA	1	71		3	3	3	5	homogène
06H11267	AA	2	60		3	1	3	5	homogène
06H13985	AA	1	75		0	0	3	5	homogène
06H11035	AA	1	40		3	2	3	5	homogène
06H11379	AA	1	62		3	2	3	5	homogène
07H10340	GBM	1	30		3	2	3	4	homogène
07H10259	GBM	1	53		3	4	3	4	périnécrotique
07H09948	GBM	2	58		3	2	3	4	homogène
07H9558	GBM	2	44		3	4	3	4	homogène
07H02063	OA	1	37		0	0	3	5	homogène
07H01644	AA	1	71		3	4	3	4	homogène
07H01700	AA	1	56		3	2	3	5	homogène
07H11300	AA	1	78		0	0	3	5	homogène
07H11819	AA	2	47		3	4	3	5	homogène
07H09421	OA	2	54	2,65	0	0	0	0	homogène
08H00607	GBM	2	72		3	2	3	4	périnécrotique
08H01363	GBM	2	72		3	4	2	3	périnécrotique
08H01591	GBM	1	64		3	3	3	4	homogène
08H02158	GBM	1	61		3	4	3	4	homogène
08H02503	GBM	1	65		3	4	3	4	homogène
08h01421	GBM	1	69		3	3	3	4	homogène
08H01739	AA	2	54		2	2	3	5	homogène
08H02794	AA	1	61		1	3	3	5	homogène

Tableau résumant les résultats de lacavéoline-1: AA= astrocytome anaplasique, OA= oligodendrogliome anaplasique, GBM= glioblastome multiforme, H=homme (1), F= femme (2), ARNm= quantification relative, cm= cytoplasme, mb= membrane, I=intensité du marquage (de 0 à 3), S= score de cellules marquées (de 0 à 5), cellules T= cellules tumorales, vaisseaux= endothéliocytes, remplissage cyan= cas sans nécrose.

Pour ce qui concerne les oligodendrogliomes anaplasiques, la sous-unité $\alpha 5$ était détectée 11 fois sur 22 et la $\beta 1$ 14 fois sur 22. Dans deux cas une expression de la sous-unité $\alpha 5$ était observée sans sous-unité $\beta 1$ associée, dans deux autres la relation entre les deux sous-unités était inverse (photo 15). Dans sept tumeurs aucune des deux sous-unités n'était exprimée. Dans les échantillons où les deux sous-unités étaient exprimées: 1- les scores des deux protéines était identique dans 7 cas (64%), 2- le score de la sous-unité $\alpha 5$ était supérieur à celui de $\beta 1$ une fois (9%) et 3- une relation inverse était observée dans 3 cas (27%). Le pourcentage des cellules exprimant la sous-unité $\beta 1$ était élevé (scores 4 et 5) dans 3 cas. En revanche, celui des cellules exprimant la sous-unité $\alpha 5$ était toujours faible à modéré (score 1 à 3).

Pour ce qui concerne les glioblastomes multiformes la technique n'a donné lieu à aucun marquage deux fois sur 24 (8%). Dans une tumeur la sous-unité $\alpha 5$ était exprimée en l'absence d'expression de la sous-unité $\beta 1$ (photo 16). Six fois, les scores de marquage étaient identiques (27%). En revanche neuf fois, celui de la sous-unité $\beta 1$ était supérieur à celui de la sous-unité $\alpha 5$ (41%) et l'inverse était observé dans 3 cas (14%). Un pourcentage élevé de cellules tumorales était observé six fois dans le cas de $\beta 1$ et une fois seulement dans celui de la sous-unité $\alpha 5$.

Pour ce qui concerne les astrocytomes anaplasiques six fois aucun marquage pour les deux sous-unités n'a été observé (60%). Dans un cas on ne retrouvait pas d'expression de la sous-unité $\beta 1$, le score de marquage des deux sous-unités était identique dans les 3 cas restant. Un pourcentage élevé (score 5) de cellules tumorales était observé dans une observation pour la sous-unité $\alpha 5$ mais en revanche jamais pour la sous-unité $\beta 1$.

Pour ce qui concerne l'intensité du signal, dans les 42 cas où ces dernières étaient exprimées, celle-ci était 25 fois identique pour les deux sous-unités (60%), $\beta 1$ était plus intense qu' $\alpha 5$ sept fois (17%) et l'inverse était observé 10 fois (24%). Dans le cas d' $\alpha 5$, le signal était intense dans 37% des grades III (7/19) et 39% des grades IV (9/23). Les chiffres correspondant pour $\beta 1$ sont de 8 fois pour les grades III et 9 fois pour le grade IV.

Le marquage des cellules endothéliales et des cellules tumorales par l'anticorps dirigé contre la cavéoline-1 était constamment membranaire ou sous-membranaire et granuleux.

Dans huit observations de gliomes grade III (astrocytomes anaplasiques et oligodendrogliomes anaplasiques) aucun marquage tant pour la sous-unité $\alpha 5$ que pour la cavéoline-1 n'était observé. Pour les oligodendrogliomes anaplasiques le score des cellules tumorales était identique pour les deux protéines $\alpha 5$ et cavéoline-1 mais variable d'un cas à l'autre neuf fois sur 16 (56%). dans les 10 cas restant le score de la cavéoline-1 était largement supérieur à celui de la protéine $\alpha 5$. Pour les glioblastomes, les scores des deux protéines n'étaient quasiment jamais identique (2/24). Le score de la cavéoline-1 était supérieur à celui de la sous-unité $\alpha 5$ dans 17 cas (71%). Pour les astrocytomes anaplasiques, le score était identique une seule fois, les cas restant étaient caractérisés 6 fois sur 8 par à un score plus élevé de la cavéoline-1. Le pourcentage de cellules tumorales marquées avec l'anticorps dirigé contre la protéine cavéoline-1 (score 4 et 5) était de 38% (9/24) pour les glioblastomes, de 25% (2/8) pour les astrocytomes anaplasiques et de 21% (4/19) pour les oligodendrogliomes anaplasiques. Enfin, le marquage était intense pour la cavéoline-1, 20 fois dans les grades III et 14 fois dans les observations de glioblastomes.

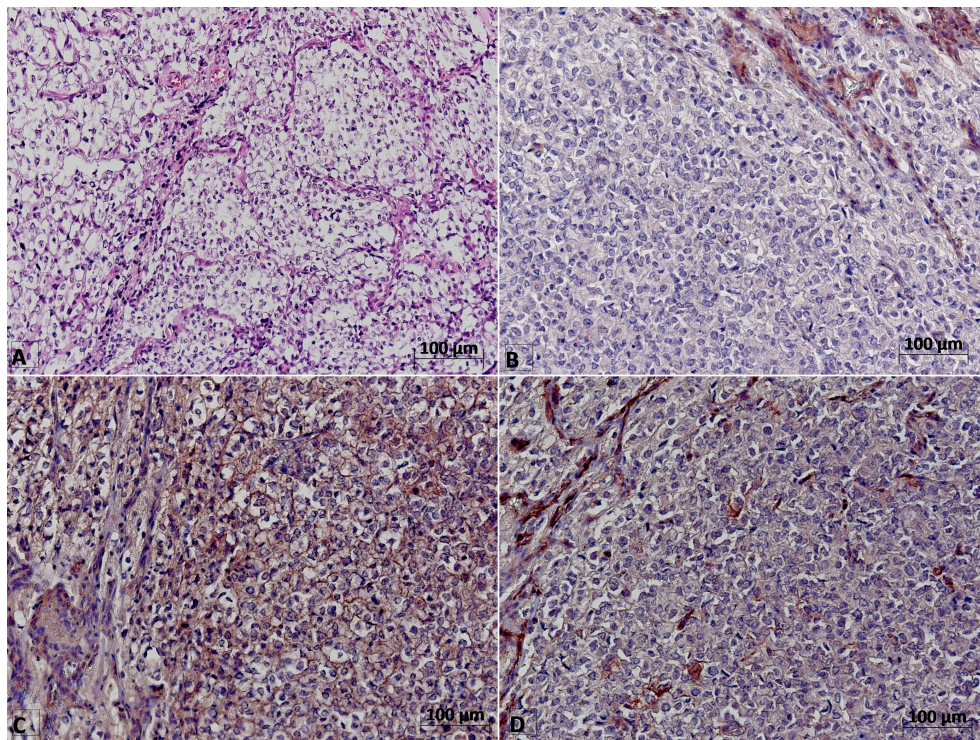
Concernant le marquage des cellules endothéliales, l'expression de la cavéoline-1 était: 1-toujours forte et intense à l'exception d'un glioblastome et d'un oligodendrogliome anaplasique 2-au niveau du front d'invasion des oligodendrogliomes, était identique au niveau du lit microcirculatoire tumoral et de celui du paranechyme cérébral adjacent. Dans l'observation d'oligodendrogliome anaplasique, $\alpha 5$ et $\beta 1$ n'étaient pas non plus exprimées.

Pour ce qui concerne $\alpha 5$, le pourcentage de marquage des endothéliocytes était élevé (scores 4 et 5) dans 22 des 24 glioblastomes (92%) ainsi que dans 16 des 22 oligodendrogliomes anaplasiques (73%) et 8 des 10 astrocytomes anaplasiques (80%).

Enfin pour ce qui concerne $\beta 1$, le pourcentage de cellules marquées était élevé (score 4 et 5) dans 21 glioblastomes (88%), 17 oligodendrogliomes anaplasiques (77%) et 7 astrocytomes anaplasiques (70%). Aucune expression de ces deux protéines n'était notée dans dans deux cas d'oligodendrogliomes anaplasiques. Le pourcentage de cellules marquées par les anticoprs anti $\alpha 5$ et anti $\beta 1$ était identique dans 43 cas (80%). Dans 9% des cas $\beta 1$ était supérieur à $\alpha 5$ et l'inverse était observé dans 6 cas (11%).

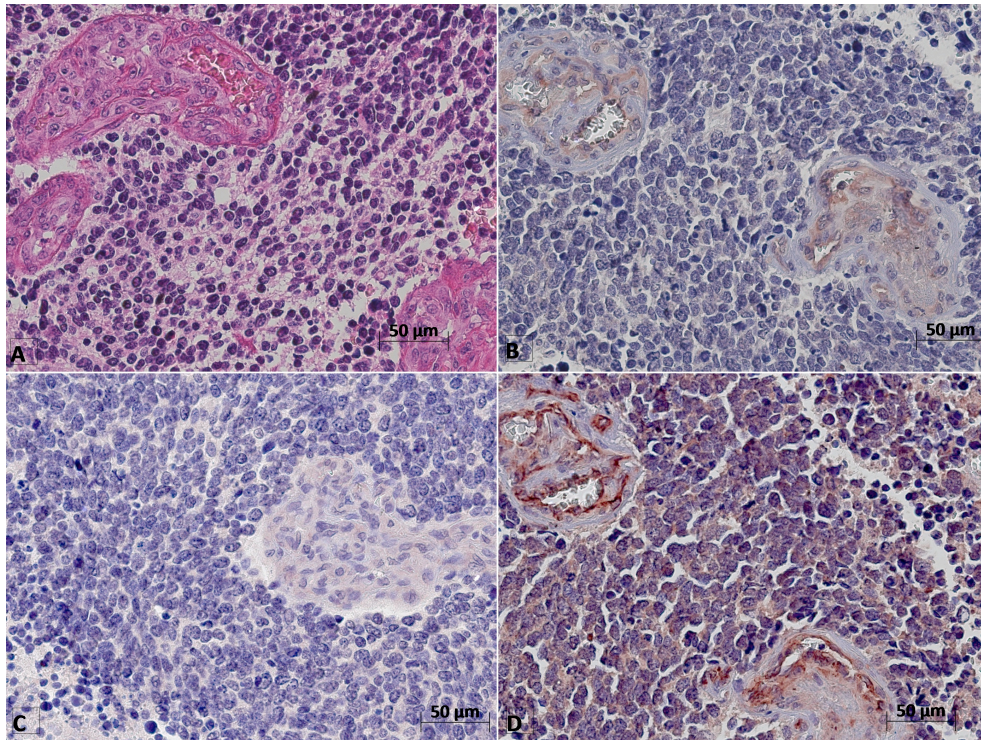
Pour ce qui est de l'intensité du marquage, dernière était identique pour les deux protéines dans 35 cas (65%), plus forte pour $\beta 1$ que pour $\alpha 5$ dans 20% des cas (11 observations). L'inverse était observé dans 8 cas.

Photo 15: Forte expression de la sous-unité $\beta 1$ sans expression de la sous-unité $\alpha 5$



A: cas 02H0554 (HES x 200) oligodendrogliome anaplasique, B: sous-unité $\alpha 5$ (IHC x 200): absence de cellules tumorales marquées, C: sous-unité $\beta 1$ (IHC x 200): marquage intense de nombreuses cellules tumorales, D: cavéoline-1 (IHC x 200): marquage de rares cellules tumorales.

Photo 16: Marquage intense des cellules endothéliales avec la sous-unité $\alpha 5$ sans marquage avec la sous-unité $\beta 1$.



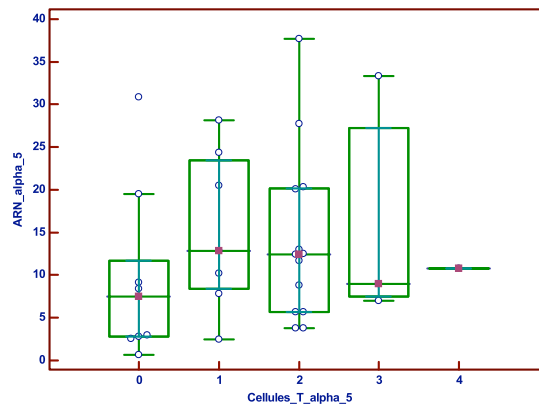
A: Cas 00h05848 (HES x 200): glioblastome; B: sous-unité $\alpha 5$ (IHC x 200): marquage d'intensité modérée des endothélicytes, C: sous-unité $\beta 1$ (IHC x 200): absence de marquage des endothélicytes, D: cavéoline-1 (IHC x 200): marquage intense des endothélicytes et de rares cellules tumorales.

IV.C.3. Analyse statistique.

Cette dernière porte sur les corrélations éventuellement existantes entre le taux d'ARNm mesuré et l'expression des trois protéines telles que quantifiées ci-dessus. Elle a été réalisée au niveau des cellules tumorales.

IV.C.a.Corrélation entre le ratio d'ARNm et l'expression de la sous-unité $\alpha 5$.

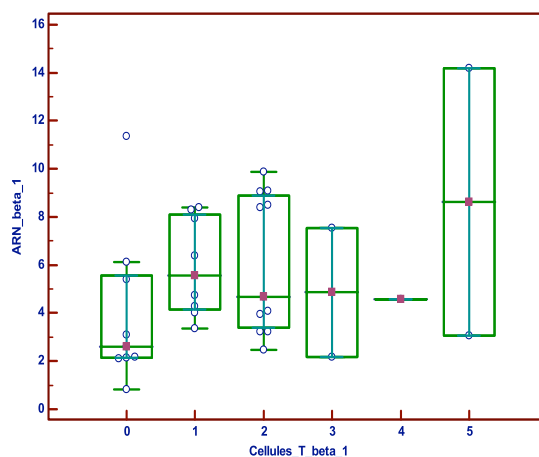
Variable Y	ARNm alpha5
Variable X	Cellules tumorales alpha5
Sample size	33
Spearman's coefficient of rank correlation (rho)	238
Significance level	P=0.1828
95% Confidence Interval for rho	-0.115 to 0.537
Kendall's Tau	172
Significance level	P=0.1643
95% Confidence Interval for Tau	-0.121 to 0.401



Il n'existe pas de corrélation significative entre le ratio d'ARNm calculé et l'expression de la sous-unité $\alpha 5$ au niveau des cellules tumorales.(photo 18)

IV.C.b. Corrélation entre le ratio d'ARNm et l'expression de la sous-unité $\beta 1$.

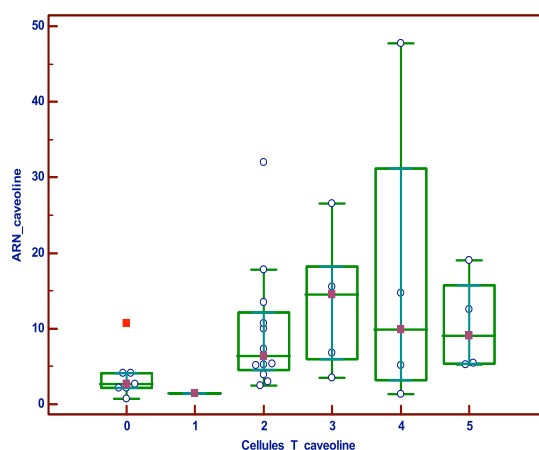
Variable Y	ARNm $\beta 1$
Variable X	Cellules tumorales $\beta 1$
Sample size	33
Spearman's coefficient of rank correlation (rho)	274
Significance level	P=0.1226
95% Confidence Interval for rho	-0.0763 to 0.564
Kendall's Tau	209
Significance level	P=0.0899
95% Confidence Interval for Tau	-0.125 to 0.492



Il n'existe pas de corrélation significative entre le ratio d'ARNm calculé et l'expression de la protéine.

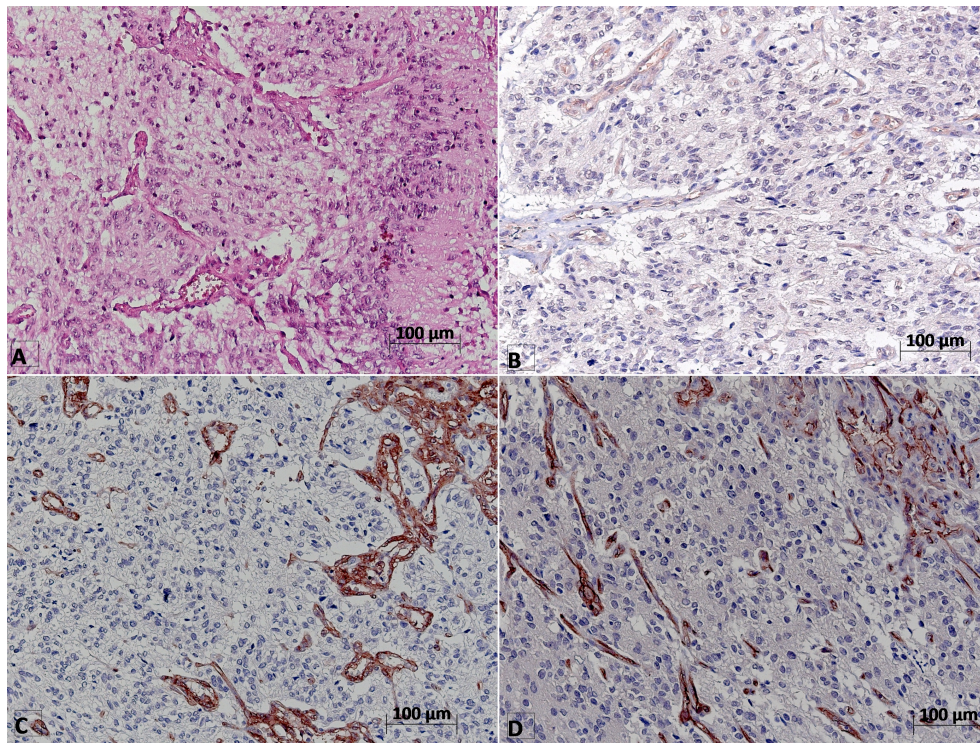
IV.C.c. Corrélation entre le ratio d'ARNm et l'expression de la cavéoline-1.

Variable Y	ARNm cavéoline-1
Variable X	Cellules tumorales cavéoline-1
Sample size	33
Spearman's coefficient of rank correlation (rho)	464
Significance level	P=0.0065
95% Confidence Interval for rho	0.143 to 0.696
Kendall's Tau	351
Significance level	P=0.0043
95% Confidence Interval for Tau	0.0547 to 0.581



Il existe une corrélation significative entre le ratio d'ARNm calculé et l'expression protéique.

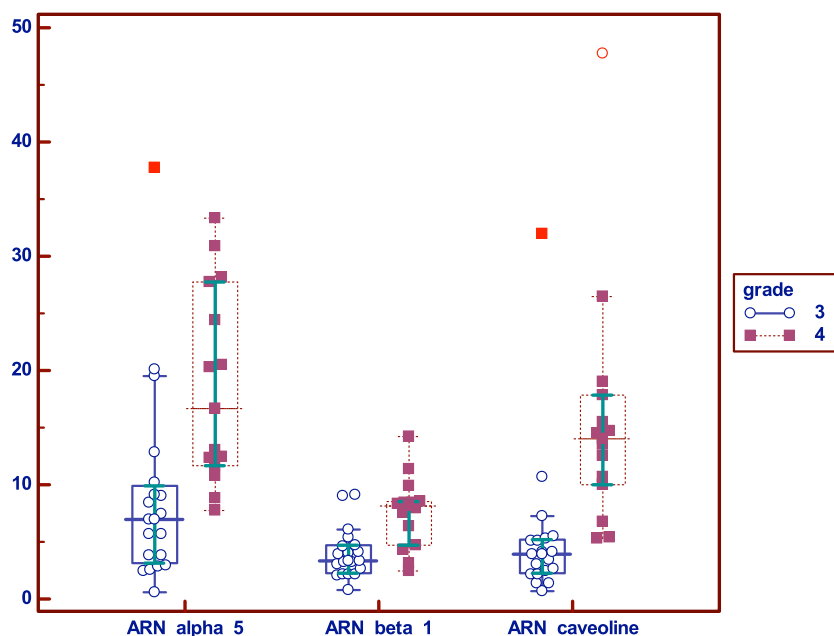
Photo 18: Absence de marquage des cellules tumorales malgré un ratio élevé d'ARNm.



A: cas 00H13835 (HES x 200), glioblastome, B: sous-unité $\alpha 5$ (IHC x 200): absence de marquage des cellules tumorales, C: sous-unité $\beta 1$ (IHC x 200): absence de marquage des cellules tumorales, D: cavéoline-1 (IHC x 200): absence de marquage des cellules tumorales et ratio bas d'ARNm.

IV.C.d.Lien entre le taux des différents ARNm et le grade tumoral.

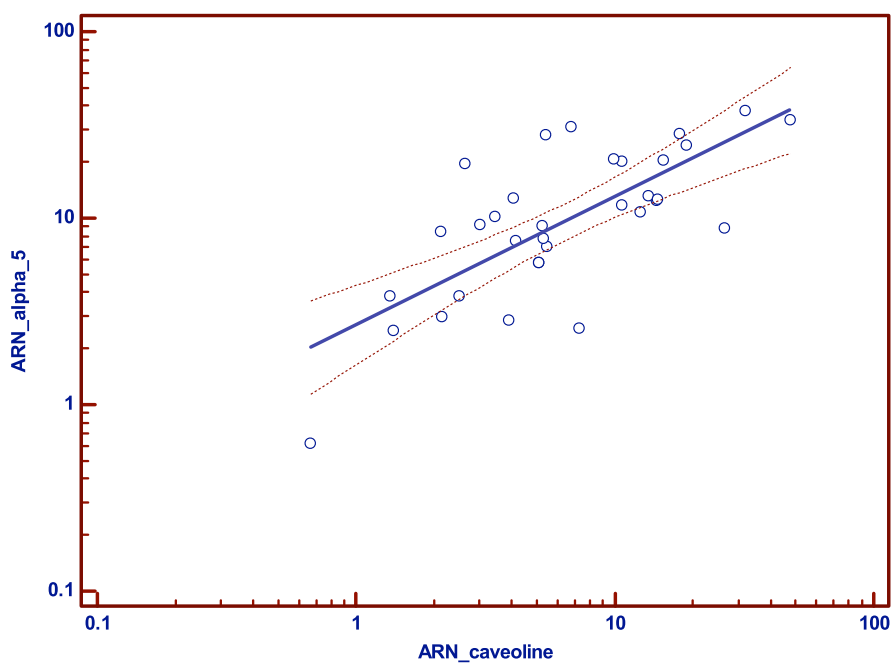
	Grade				P-value
	III		IV		
	Median	25 - 75 P	Median	25 - 75 P	
ARN_alpha_5	6.98	3.17 - 9.92	16.67	11.70 - 27.70	0.0008
ARN_beta_1	3.35	2.29 - 4.69	8.11	4.69 - 8.49	0.0028
ARN_cavéoline	3.90	2.25 - 5.23	14.00	9.97 - 17.80	0.0001



Il existe une différence significative entre le ratio d'ARNm et le grade tumoral. Il est plus élevé dans le cadre des glioblastomes multiformes que dans celui des oligodendrogliomes anaplasiques.

IV.C.e.Lien entre le ratio d'ARNm de la sous-unité $\alpha 5$ et celui de la cavéoline-1

Variable Y	ARNm alpha5
Variable X	ARNm caveoline-1
Sample size	33
Spearman's coefficient of rank correlation (rho)	0.691
Significance level	P<0.0001
95% Confidence Interval for rho	0.455 to 0.836



Il existe une corrélation significative entre le ratio d'ARNm de la sous-unité $\alpha 5$ et celui de la cavéoline-1. Ces deux valeurs vont dans le même sens. Il ne semble pas exister de réelle relation inverse.

PARTIE IV: DISCUSSION

I.Limites rencontrées lors de notre étude.

L'analyse des résultats ci-dessus doit tenir compte :

De difficultés liées à l'imparfaite reproductibilité de la classification des gliomes et à l'hétérogénéité moléculaire bien connue de ces tumeurs. (75) La reproductibilité inter observateur de l'histodiagnostic des gliomes est faible, 54% dans une étude de 1997 portant sur 244 gliomes.(76) L'apport de l'immunohistochimie dans ce domaine est faible. Dans ce travail préliminaire rétrospectif, nous n'avons pu inclure de critère moléculaire.

De difficultés liées à la diversité des prélèvements étudiés (tissus humains, modèles in vivo ou in vitro, des méthodologies mises en œuvre pour l'étude de l'expression du récepteur (étude transcriptionnelle, traductionnelle, western blot, immunohistochimie etc) conduisant à une véritable incertitude sur la distribution du récepteur dans les tissus tumoraux ou non tumoraux.

De difficultés inhérentes à l'impossibilité de démontrer avec une certitude absolue la spécificité de la liaison d'un anticorps à son antigène. Préalablement à ce travail, les anticorps dirigés contre les sous-unités $\alpha 5$ et $\beta 1$ tout comme celui complémentaire de la cavéoline-1 utilisés dans ce travail avaient été testés en western blot par l'équipe du Pr M. Dontenwill avec obtention des bandes de longueur attendue. Un autre critère de spécificité était la morphologie et la topographie du marquage. L'anticorps anti cavéoline -1 a donné lieu à un signal granuleux de topographie membranaire ou juxta membranaire tout à fait compatible avec la topographie cellulaire et les dimensions attendues des cavéoles. Dans le cas des deux sous-unités, la localisation membranaire du marquage et les renforcements punctiformes membranaires de ce dernier pouvant correspondre aux points d'ancrage focaux constituent de bons arguments en faveur de la spécificité de la technique. En revanche, plus difficiles sont à interpréter les signaux diffus observés dans le cytoplasme des macrophages et, à un niveau variable, dans celui des cellules tumorales des gliomes humains. Un tel marquage peut être artéfactuel. Il peut également témoigner d'une accumulation hyaloplasmique anormale de la protéine ou traduire la présence de la protéine, à faible concentration, dans des organites cytoplasmiques tels que ceux impliqués dans l'endocytose du récepteur.(17) Dans ce cas, en effet, la concentration du produit final de la réaction enzymatique n'est pas suffisante pour que la nucléation indispensable au développement d'un signal granuleux puisse survenir. Le marquage du cytoplasme des cellules de la série thrombocytaire s'explique par les

particularités de la thrombocytopoïèse. En tout état de cause dans ce travail n'ont été retenus comme spécifiques que les signaux membranaires pour les sous-unités $\alpha 5$ et $\beta 1$ et membranaires et para membranaires pour la cavéoline-1.

Pour l'interprétation des résultats il est par ailleurs important de se rappeler : 1- que la détection du récepteur intégrine n'atteste pas de son état d'activation. Il n'existe pas à ce jour d'anticorps spécifique de la conformation active d'une intégrine. Par ailleurs, l'activation de ces récepteurs ne s'accompagne pas d'une phosphorylation de leur portion cytoplasmique. Les anticorps spécifiques des formes phosphorylées actives ne peuvent donc pas dans ce cas être utilisés, 2- que l'intensité du marquage des réactions immunohistochimiques dépend non seulement de la concentration tissulaire des antigènes mais également de l'affinité ou de l'avidité des anticorps utilisés. En conséquence, une intensité de marquage identique dans le cas des sous unités $\alpha 5$ et $\beta 1$ n'est pas attendue et ce d'autant que $\beta 1$ participe à la constitution d'autres hétérodimères ce qui n'est pas le cas d' $\alpha 5$ (1), 3- que l'intensité du signal n'est pas proportionnelle à la concentration antigénique tout au long de l'échelle des concentrations, 4- enfin, il n'existe pas de méthode indiscutable de quantification du niveau d'expression immunohistochimique d'une protéine. Dans ce travail nous avons combiné une échelle qualitative d'intensité et un score en pourcentage de cellules marquées.

Enfin, l'interprétation des résultats est gênée par la pluralité des intégrines, leur redondance fonctionnelle et le peu de connaissances disponibles du répertoire intégrine (et protéines apparentées) de chacun des types cellulaires. Les cytomètres en flux moderne permettent aujourd'hui la détection de 10 épitopes différents sur la même cellule. Les méthodes immunohistochimiques ne sont pas adaptées à ce multiplexage.

II.Expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ au sein des tissus non tumoraux.

Avant de choisir une nouvelle cible thérapeutique, il est nécessaire de vérifier que cette dernière ne soit pas exprimée par d'autres types cellulaires que celui (ou ceux) visé(s) par la thérapeutique. Dans la littérature nous n'avons retrouvé en pathologie humaine que deux travaux antérieurs, le premier, très spécialisé, décrit l'expression, sous contrôle du VEGF, des intégrines $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$ dans les cellules de la granulosa ovarienne en voie de lutéinisation et la perte d'expression de ces récepteurs parallèlement à la régression du corps jaune cyclique. (77). Dans notre étude, nous retrouvons cette expression. La deuxième publication date de 1997. Elle rapporte la distribution dans divers tissus de l'organisme de plusieurs protéines membranaires dont la tétraspanine CD151 et l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Les résultats de cette étude et les nôtres sont comparés dans le tableau ci dessous. La lecture de ce dernier fait apparaître de nombreuses divergences portant notamment sur l'expression de la sous unité $\beta 1$ et du récepteur $\alpha 5\beta 1$ dans les tissus épithéliaux. Il est difficile d'interpréter ces divergences. Notons cependant que les méthodologies mises en œuvre dans les deux études divergent sur de nombreux points. L'étude citée porte sur des coupes de tissus congelés, prélevés pour la plupart au cours d'autopsies, fixées à l'éthanol. Les anticorps utilisés étaient des monoclonaux de souris dirigés pour l'un d'entre eux contre la chaîne $\beta 1$ et pour l'autre contre $\alpha 5\beta 1$. La technique utilisée était une technique en immunoperoxydase en deux couches.(78) Notre travail ne porte que sur un prélèvement par organe .Il serait nécessaire de le répéter sur d'autres échantillons de façon à s'assurer de la non intervention de facteurs pré analytiques dans la négativité d'expression au niveau de certains prélèvements comme par exemple à celui des veinules alto endothéliales des nœuds lymphatiques.

Tissus		Notre étude		Etude australienne	
		$\alpha 5\beta 1$	$\beta 1$	$\alpha 5\beta 1$	$\beta 1$
Foie	- sinusoides	+++	+/	+/	+++
	- canaux biliaires	-	-	++	+++
Nœud lymphatique	- HEV	-	-	++	+++
	-sinus				
pancréas	-canaux	-	+	+	+
Cellules de scwann		-	+++	++	+
iléon	Cellules épithéliales	-	-	-	++
	Myocytes lisses	+	++	+++	+++
	Villosités	+	-	+	++
	Musculaire muqueuse, musculaire	+	-	-	++
Peau	Épithéliocytes basaux	-	-	++	+++
	épithéliocytes	-	-	+/	+
Estomac	épithélium	-	-	-	+++
Thyroïde	Cellules parafolliculaires	-	-	-	+++
poumon	Epithélium	-	+	+	+
	Myocytes lisses	-	++	+	++
	Vaisseaux	+	++	+	++
	Macrophages alvéolaires	++	++	+	++
rein	Glomérules :	++	+++	+	+++
	endothéliocytes				
	T.collecteurs	-	+++	-	+++
	T proximaux/ distaux	-	+/	-	+++
moelle	Mégakaryocytes	+++	+++		
sang	Lymphocytes	-	-		
	plaquettes	+++	+++	++	+++
	Neutrophiles	-	-	-	+++
	monocytes	+	+	+	+
	Globules rouges	-	-	-	-
vaisseau	endothélium	+/	++	++	+++
	Myocytes lisses	+/	++	+	+++

Tableau résumant les différences majeures observées entre notre étude et l'étude publiée en 1997. Les différences majeures entre l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ sont soulignées en violet, celles majeures entre l'expression de la sous-unité $\beta 1$ en bleu.

Dans notre travail nous avons montré que dans les tissus humains non tumoraux les deux sous-unités sont exprimées au niveau des endothéliocytes des vaisseaux artériels et veineux, plus faiblement au niveau de ceux du lit microcirculatoire. Il n'a pas été observé d'expression au niveau de territoires vasculaires siège d'un remodelage actif comme celui du corps jaune cyclique ou d'un tissu de granulation au fond d'une ulcération colique. Une localisation apicale prédominante a été démontrée de façon indiscutable au niveau du trophoblaste villositaire. A ce même niveau le récepteur est également exprimé au niveau du pôle basal. Compte- tenu du peu d'épaisseur du cytoplasme des endothéliocytes, il n'était pas toujours aisé avec la méthodologie utilisée de localiser le signal au pôle apical ou basal de la cellule dans tous les types cellulaires. Une localisation apicale nous est cependant parue probable dans la plupart des localisations, ceci tant au niveau des tissus sains que des vaisseaux tumoraux, sans pouvoir éliminer une localisation basolatérale ou abluminale simultanée. Il paraît probable que l'expression au pôle apical des endothéliocytes des vaisseaux tumoraux ne

correspond pas une perte de polarité tel que suggéré récemment par Parsons-Wingter dans un travail préclinique chez la souris.(79) Une analyse en microscopie confocale serait nécessaire pour définitivement clarifier ce point.

Les fonctions des intégrines situées au pôle apical des cellules endothéliales sont inconnues. On ignore notamment si une telle localisation permet l'interaction du récepteur avec les fibronectines circulantes. Ces dernières, synthétisées par le foie, interviennent dans la formation du caillot . Suchiro a par ailleurs montré en culture qu' $\alpha 5\beta 1$ se comporte comme un récepteur du fibrinogène à la surface des cellules endothéliales.(79)(81) Ces faits paraissent cohérents avec la constance des dépôts fibrineux au contact de villosités placentaires.

III.Expression des protéines d'intérêt dans les tissus tumoraux.

Dans notre travail, que ce soit dans les modèles pré cliniques ou dans les tumeurs humaines il n'a pas été montré de surexpression du récepteur au niveau du lit microcirculatoire tumoraleni au niveau du front d'invasion à l'exception cependant des structures gloméruloïdes. $\alpha 5\beta 1$ est fortement exprimée par les cellules de la lignée thrombocytaire. Du fait de la redondance des intégrines au niveau plaquettaire, on peut s'attendre à ce que les effets sur l'hémostase de l'administration d'un inhibiteur du récepteur ne soit que faible .De fait, $\alpha 5\beta 1$ ne joue qu'un rôle de support dans l'adhérence plaquettaire. Les souris knock-out pour ce récepteur ne font pas de trouble hémorragique mais présentent au contraire une susceptibilité à la thrombose.(82)

Dans notre travail nous avons montré que l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ n'est pas exprimée par les neurones et la neuroglie en situation physiologique. 2-est faiblement exprimée par les vaisseaux intracérébraux et ceux des plexus choroïdes 3- l'est fortement par les cellules méningothéliales. Ce dernier résultat confirme les données d'un travail de Mme Figarella-Granger datant de 1997 décrivant une expression du récepteur dans les cellules méningothéliales.(83)

La présence du récepteur au pôle apical des cellules endothéliales rendant ce dernier accessible aux molécules administrées par voies veineuses, la surexpression d' $\alpha 5\beta 1$ au niveau endothélial au cours de l'angiogénèse tumorale et l'hyperplasie du lit microcirculatoire tumoral font de la protéine une cible thérapeutique potentielle attractive. Un certain nombre de faits viennent nuancer cette opinion: 1- comme rappelé dans le rappel bibliographique, les études portant sur la vascularisation des glioblastomes révèlent qu'au sein des plages tumorales compactes la densité vasculaire de territoires tumoraux étendus ne diffère pas de celle de la substance blanche normale ou du cortex et dans les territoires d'infiltration l'hyperplasie ne se développe que lorsque la densité des cellules tumorales devient élevée. Ces faits suggèrent que la croissance tumorale dépend du réseau vasculaire normal pré existant dans les territoires d'infiltration sous forme de cellules isolées et d'une néo angiogénèse dans les zones de croissance compacte. 2- l'expression endothéliale de la protéine n'est pas plus intense et ce, quelque soit le modèle étudié, au niveau de la microvascularisation tumorale que de celle de la circulation générale avec cependant pour exception une surexpression du récepteur au niveau des hyperplasies gloméruloïdes d'une part et de la microcirculation cérébrale dans les territoires péri tumoraux d'autre part. L'effet antivasculaire des inhibiteurs d' $\alpha 5\beta 1$ devrait donc être limité. En revanche ces derniers pourraient inhiber les récepteurs des cellules microgliales activées ce qui est intéressant puisque ces derniers contribuent au profil prolifératif et invasif des tumeurs par l'intermédiaire de la sécrétion de facteurs de croissance vasculaire, de cytokines et d'enzymes protéolytiques.(28)

Les approches thérapeutiques anticancéreuses peuvent s'adresser non seulement aux cellules tumorales mais également à celles du stroma: cellules endothéliales, myofibroblastes et macrophages. Une telle approche comporte des avantages puisque ces cellules contribuent au comportement prolifératif et invasif des tumeurs par l'intermédiaire de la sécrétion de facteur de croissance, de facteurs angiogéniques de cytokines et d'enzymes protéolytiques; à la prolifération des cellules tumorales.

Au niveau des cellules tumorales il est nécessaire d'insister sur l'absence de polarisation du signal. En effet quand présent ce dernier n'est pas plus intense à une extrémité de la cellule qu'à une autre et les cellules situées à la périphérie tumorale et dans les zones d'infiltration tumorale ne surexpriment pas la protéine. Dans ces conditions, il apparaît que le récepteur intervient de façon mineure dans l'invasion tumorale. La surexpression au niveau des

territoires périnécrotiques traduit l'existence d'un lien avec l'hypoxie et peut être médié par HIF-1 et HIF-2.(33)(34)(84) Ce point mériterait d'être exploré.

Pour ce qui concerne l'expression d' $\alpha 5\beta 1$ et de la cavéoline-1 par les cellules tumorales, les points suivant méritent d'être soulignés:

Une corrélation positive entre le ratio des ARNm mesurés par PCR quantitative et les scores immunohistochimiques pour les protéines correspondantes a été , dans le cas de la cavéoline-1, observée mais pas dans ceux des sous-unités $\alpha 5$ et $\beta 1$. L'absence de corrélation ne peut être attribuée à une puissance insuffisante du test statistique.Elle pourrait traduire l'hétérogénéité tumorale, les deux études n'ayant pas été réalisées sur les mêmes échantillons. Cependant, le fait qu'une corrélation entre la quantité d'ARNm et celles des protéines effectivement traduites n'est pas obligatoire est bien connue. Ceci illustre la complémentarité des études transcriptionnelles et traductionnelles.

Une corrélation significative a été mise en évidence entre la quantité d' ARNm des deux sous-unités, celui de la cavéoline-1 et le grade tumoral (III versus IV). Ce résultat conforte ceux publiés antérieurement par l'équipe strasbourgeoise.

En ce qui concerne les protéines, une première constatation est l'existence d'une grande hétérogénéité du niveau d'expression d'une tumeur à l'autre et ce quelque soit la nature des échantillons étudiés (modèles sous cutanés ou tumeurs de patients). Pour chaque protéine, le marquage des cellules tumorales dans une tumeur donnée était le plus souvent homogène. Cependant, dans un petit nombre de cas, des clones exprimant une protéine alternaient avec d'autres ne l'exprimant pas. Enfin dans 44% des 27 observations dans lesquelles une nécrose ischémique était observée, les trois protéines étaient surexprimées dans les territoires périnécrotiques. Des travaux en culture récents montrent que les voies biologiques contrôlées par les intégrines $\alpha v\beta 3$ et $\alpha v\beta 5$ sont impliquées dans le contrôle de l'hypoxie tumorale dans les glioblastomes.(33)(34) Dans cet esprit, il pourrait être intéressant d'étudier les corrélations existant entre le niveau d'expression d' $\alpha 5$ et $\beta 1$ et ceux d'HIF-1 et HIF-2.

Pour ce qui concerne l'intensité du marquage, le parallélisme entre l'intensité des signaux générés par la détection d' $\alpha 5$ et $\beta 1$ était inconstant. Dans 46% des modèles murins et humains, tant le score que l'intensité du marquage correspondant à $\beta 1$ étaient plus intenses que ceux d' $\alpha 5$. L'explication de ce déséquilibre tient probablement au fait que $\beta 1$ participe à la constitution de 12 intégrines différentes, potentiellement exprimées par un même type cellulaire alors qu' $\alpha 5$ n'est connu participer à la constitution que d'un seul hétérodimère (1). La situation inverse est également observée. Elle s'explique moins aisément. Classiquement, en effet, les sous-unités n'existent qu'à l'état d'hétérodimères dans les membranes plasmiques. Savoir si des monomères peuvent se rencontrer à l'état isolé dans les membranes en pathologie tumorale n'est pas à notre connaissance connu. Une dernière tentative d'explication tiendrait dans une erreur d'analyse des préparations immunohistochimiques. Dans cet esprit, il serait utile d'augmenter le nombre des tumeurs étudiées de façon à confirmer l'existence d'une telle situation.

Quelque soit la tumeur examinée le signal immunohistochimique n'était jamais regroupé à un pôle de la cellule tumorale. Par ailleurs, il n'était pas observé de surexpression dans les zones d'invasion des modèles orthotopiques, notamment au niveau de la composante de cellules infiltrantes. Il conviendrait de confirmer ce fait sur un plus grand nombre de modèles orthotopiques. S'il était avéré, le fait qu' $\alpha 5\beta 1$ participe activement à la migration des cellules tumorales pourrait être discuté.

CONCLUSION

Malgré des avancées significatives dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement des gliomes de haut grade, le pronostic de ces tumeurs reste sombre. Les progrès dans ce domaine passeront probablement par l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. Découvertes au début des années 1980, les intégrines, ont depuis été impliquées à toutes les étapes de la cancérogenèse. Les intégrines $\alpha v\beta 3$ et $\alpha v\beta 5$ sont les plus étudiées dans les gliomes malins. Notre travail a consisté en l'étude du patron d'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, un autre récepteur dont l'intérêt comme cible thérapeutique avait préalablement été suggéré dans des travaux *in vitro* réalisés par l'équipe du Pr Dontenwill. Nos résultats suggèrent qu' $\alpha 5\beta 1$, du fait de sa fréquente surexpression par les cellules tumorales, constitue une cible potentielle attractive et pourrait également être utilisée pour l'imagerie moléculaire des gliomes. L'analyse de la faisabilité d'une telle démarche passera nécessairement par la réalisation d'essais thérapeutiques pré cliniques, en sachant que la redondance des récepteurs intégrine et la complexité des voies de signalisation en aval de ces derniers rendent très vraisemblablement la nécessité de thérapies à cibles multiples.

BIBLIOGRAPHIE

1. Takada Y, Xiaojing Ye et Simon S. The Integrins. *Genome Biology*, 2007; 8: 215
2. Hannigan GE, Leung Hagesteijn C, Fitz-Gibbon L, Coppolino MG, Radeva G, Filmus J, Bell JC, Dedhar S. Regulation of Cell Adhesion and Anchorage-dependent Growth by a New Beta 1-integrin-linked Protein Kinase. *Nature*, 1996; 379(6560):91-96
3. Curley GP, Blum H et Humphries MJ. Integrin Antagonists. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1999 Oct 30; 56 (5-6): 427-441.
4. Hynes RO. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell*, 2002 Sep 20; 110(6): 673-687.
5. Barczyk M, Carracedo S et Gullberg D. Integrins. *Cell and Tissue Research*, 2009; 339: 269-280
6. Takagi J et Springer TA. Integrin Activation and Structural Rearrangement. *Immunological Reviews*, 2002 Aug; 186: 141-163.
7. Rüegg C et Mariotti A. Vascular Integrins: Pleiotropic Adhesion and Signaling Molecules in Vascular Homeostasis and Angiogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2003 Jun; 60 (6): 1135-1157
8. Lévesque JP, Takamatsu Y, Nilsson SK, Haylock DN, Simmons PJ. Rôle des intégrines et sélectines dans le développement et les régulations du système hématopoïétique. *Hématologie*, 2001 Avr; 7(2): 99-109
9. Askari JA, Buckley PA, Mould AP, Humphries MJ. Linking integrin conformation to function. *Journal of Cell Science*, 2009 Jan 15; 122(Pt2): 165-170
10. Xiong JP, Stehle T, Diefenbach B, Zhang R, Dunker R, Scott DL, Joachimak A, Goodman SL, Arnaout MA. Crystal Structure of the Extracellular Segment of Integrin Alpha Vbeta3. *Science*, 2001 Oct 12; 294(5541): 339-345
11. Jones JL et Walker RA. Integrins: A Role as Cell Signalling Molecules. *Molecular Pathology*; 1999 Aug; 52: 208-213
12. Watt FM. Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *The EMBO Journal* 2002; 21: 3919-3926
13. Tiwari A, Jung JJ, Inamdar SM, Brown CO, Goel A, Choudhoury A. Endothelial cell migration on fibronectin is regulated by syntaxin 6-mediated $\alpha_5\beta_1$ integrin recycling. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011 Aug 31

14. Zaidel-Bar R et Geiger B. The Switchable Integrin Adhesome. *Journal of Cell Science*, 2010 May 1; 123(Pt9): 1385-1388
15. Zamir E et Geiger B. Components of Cell-matrix Adhesions. *Journal of Cell Science*, 2001 Oct; 114(Pt 20): 3577-3579
16. Pellinen T et Ivaska J. Integrin Traffic. *Journal of Cell Science*, 2006 Sep 15; 119(Pt 18): 3723-3731
17. Caswell PT et Norman JC. Integrin Trafficking and the Control of Cell Migration. *Traffic*, 2006 Jan; 7 (1): 14-21
18. Juliano RL, Ming X, Nakagawa O, Xu R, Yoo H. Integrin Targeted Delivery of Gene Therapeutics. *Theranostics*, 2011 Mar 2; 1: 211-219
19. Mizejewski GJ. Role of Integrins in Cancer: Survey of Expression Patterns. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1999 Nov; 222 (2): 124-138
20. Desgrosellier JS et Cheresh DA. Integrins in Cancer: Biological Implications and Therapeutic Opportunities. *Nature Reviews Cancer*, 2010 Jan; 10 (1): 9-22
21. Serini G, Trusolino L, Saggiorato E, Cremona O, De Rossi M, Angeli A, Orlandi F, Marchisio PC. Changes in Integrin and E-cadherin Expression in Neoplastic Versus Normal Thyroid Tissue. *Journal of the National Cancer Institute*, 1996 Apr 3; 88 (7):442-449
22. Plantefaber LC et Hynes RO. Changes in Integrin Receptors on Oncogenically Transformed Cells. *Cell*, 1989 Janv 27; 56(2): 281-290
23. Varner JA, Emerson DA et Juliano RL. Integrin Alpha 5 Beta 1 Expression Negatively Regulates Cell Growth: Reversal by Attachment to Fibronectin. *Molecular Biology of the Cell*, 1995 Jun; 6 (6): 725-740
24. Evans RD, Perkins VC, Henry A, Stephens PE, Robinson MK, Watt FM. A Tumor-associated Beta 1 Integrin Mutation That Abrogates Epithelial Differentiation Control. *The Journal of Cell Biology*, 2003 Feb 17; 160 (4): 589-596
25. Trikha M, Cai Y, Grignon D, Honn KV. Identification of a Novel Truncated alphaIIb Integrin. *Cancer Research*, 1998 Nov 1; 58 (21): 4771-4775
26. Guo W et Giancotti FG. Integrin Signalling During Tumour Progression. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2004 Oct; 5: 816-826
27. Pylayeva Y, Gillen KM, Gerald W, Beggs HE, Reichardt LF, Giancotti F. Ras- and PI3K-dependent Breast Tumorigenesis in Mice and Humans Requires Focal Adhesion Kinase Signaling. *Journal of Clinical Investigation*, 2009 Feb; 119 (2): 252-256

28. Avraamides CJ, Garmy-Susini B et Varner JA. Integrins in Angiogenesis and Lymphangiogenesis. *Nature Reviews. Cancer*, 2008 Aug; 8 (8): 604-617
29. Garmy-Susini B, Avraamides CJ, Schmid MC, Foubert F, Ellies LG, Barnes L, Feral C, Papayannopoulou T, Lowy A, Blair SL, Cheresch D, Ginsberg M, Vaner JA. Integrin $\alpha 4\beta 1$ Signaling Is Required for Lymphangiogenesis and Tumor Metastasis', *Cancer Research*, 2010 Apr 15, 70; 3042-3051
30. Parise LV, Weon Lee J et Juliano RL. New Aspects of Integrin Signaling in Cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 2000; 10 (6): 407-414
31. Pouyssegur J, Dayan F et Mazure NM. Hypoxia Signalling in Cancer and Approaches to Enforce Tumour Regression. *Nature*, 2006 May 25; 441 (1792): 437-443
32. Rohwer N, Welzel M, Daskalow K, Pfander D, Wiedenmann B, Detjen K, Cramer T. Hypoxia-Inducible Factor 1 α Mediates Anoikis Resistance via Suppression of $\alpha 5$ Integrin. *Cancer Research*, 2008 Dec 15; 68: 10113-10120
33. Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System, Fourth Edition. IARC WHO Classification of Tumours, 2007.
34. Figarella-branger D, Colin C, Coulibaly B, Quilichini B, Maues de Paula A, Fernandez C, Bouvier C. Classification histologique et moléculaire des gliomes. *Revue Neurologique*, 2008 Jun; 164: 505-515
35. Janzer RC. Neuropathology and molecular pathology of gliomas. *Revue Médicale Suisse*, 2009 Jul 15; 5(211): 1501-1504
36. Riemenschneider MJ, Jeuken JW, Wesseling P, Reifenberger G. Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. *Acta Neuropathologica*, 2010 Nov; 120(5): 567-584
37. Westphal M et Lamszus K. The neurobiology of glioma: from cell biology to development of therapeutic approaches. *Nature review neuroscience* 2011 Sep; 12: 495-508
38. Halperin EC, Bentel G, Heinz ER, Burger PC. Radiation therapy treatment planning in supratentorial glioblastoma multiforme: an analysis based on post mortem topographic anatomy with CT correlations. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1989 Dec;17(6):1347-1350
39. Wesseling P, Ruitter DJ, Burger PC. Angiogenesis in brain tumors; pathobiological and clinical aspects. *J Neurooncol*. 1997 May;32(3):253-265
40. http://www.oncolor.org/referentiels/nerveux/neuro_onco_ttt_sympto.htm
41. Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, Lang FF, McCutcheon IE, Hassenbusch SJ, Holland E, Hess K, Michael C, Miller D, Sawaya R. A

Multivariate Analysis of 416 Patients with Glioblastoma Multiforme: Prognosis, Extent of Resection, and Survival. *Journal of Neurosurgery*, 2001 Aug, 95(2):190-198

42. Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med* 2008;359:492-507.
43. dbaih A, Ducray F, Sierra Del Rio M, Hoang Xuan K, Delattre JY. Therapeutic application of noncytotoxic molecular targeted therapy in gliomas: growth factor receptors and angiogenesis inhibitors. *Oncologist*, 2008 Sep; 13(9): 978-992
44. Holland EC. Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. *Nat Rev Genet*, 2001 Feb; 2(2): 120-139
45. Raymond E, Brandes AA, Dittrich C, Fumoleau P, Coudert B, Clement PM, Frenay M, Rampling M, Stupp R, Kros JM, Heinrich MC, Gorlia T, Lacombe D, Van den Bent MJ. Phase II study of imatinib in patients with recurrent gliomas of various histologies: a European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Group Study. *J Clin Oncol*, 2008 Oct 1; 26(28): 4659-4665
46. Kil KE, Ding YS, Lin KS et al. (2007) Synthesis and positron emission tomography studies of carbon-11-labeled imatinib (Gleevec). *Nucl Med Biol* 34:153-63
47. Rich JN, Reardon DA, Peery T, Dowell JL, Quinn JA, Penne KL, Wikstrand CJ, Van Duyn LB, Dancey JE, Mc Lendon RE, Kao JC, Stenzel TT, Ahmed Rasheed BK, Tourt-Uhling SE, Herndon JE, Vredenburgh JJ, Sampson JH, Friedman AH, Bigner DD, Friedman HS. Phase II trial of gefitinib in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol*, 2004 Jan 1; 22(1): 133-42
48. Prados MD, Chang SM, Butowski N, Butowski N, DeBoer R, Parvataneni R, Carliner H, Kabuubi P, Ayers-Ringler J, Rabbitt J, Page M, Federoff A, Sneed PK, Berger MS, McDermott MW, Parsa AT, Vanderberg S, James CD, Lamborn KR, Stokoe D, Haas-Kogan DA. Phase II study of erlotinib plus temozolomide during and after radiation therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme or gliosarcoma. *J Clin Oncol*, 2009 Feb 1; 27(4):579-84
49. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*, 2004 May 20; 350(21): 2129-2139
50. Van den Bent MJ, Brandes AA, Rampling R, Kouwenhoven MC, Kros JM, Carpentier AF, Clement PM, Frenay M, Campone M, Baurain JF, Armand JP, Taphoorn MJ, Tosoni A,

- Kletzl H, Klughammer D, Lacombe D, Gorlia T. Randomized phase II trial of erlotinib versus temozolomide or carmustine in recurrent glioblastoma: EORTC brain tumor group study 26034. *J Clin Oncol*, 2009 Mar 10; 27(8):1268-1274
51. Marie Y, Carpentier AF, Omuro AM, Sanson M, Thillet J, Hoang-Xuang K, Delattre JY. EGFR tyrosine kinase domain mutations in human gliomas. *Neurology*, 2005 Apr 26; 64(8): 1444-1445
52. Mellinghoff 1K, Wang MY, Vivanco I, Haas-Kogan DA, Zhu S, Dia EQ, Lu KV, Yoshimoto K, Huang JH, Chute DJ, Riggs BL, Horvath S, Liau LM, Cavenee WK, Rao PN, Beroukhi R, Peck TC, Lee JC, Sellers WR, Stokoe D, Prados M, Cloughesy TF, Sawyers CL, Mischel PS. Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *N Engl J Med*, 2005 Nov 10; 353(19):2012-2024
53. Brandes AA, Franceschi E, Tosoni A, Hegi ME, Stupp R. et al. Epidermal growth factor receptor inhibitors in neuro-oncology: hopes and disappointments. *Clin Cancer Res*, 2008 Feb 15; 14(4): 957-960
54. Omuro AM, Faivre S, Raymond E. Lessons learned in the development of targeted therapy for malignant gliomas. *Mol Cancer Ther*, 2007 Jul; 6(7): 1909-1919
55. Norden AD, Drappatz J, Wen PY. Novel anti-angiogenic therapies for malignant gliomas. *Lancet Neurol*, 2008 Dec; 7(12): 1152-1160
56. Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE 2nd, Marcello J, Reardon DA, Quinn JA, Rich JN, Sathornsumetee S, Gururangan S, Sampson J, Wagner M, Bailey L, Bigner DD, Friedman AH, Friedman HS. Bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma. *Clin Cancer Res*, 2007, Oct 20; 13: 1253-1259
57. Desjardins A, Reardon DA, Herndon JE 2nd, Marcello J, Quinn JA, Rich JN, Sathornsumetee S, Gururangan S, Sampson J, Bailey L, Bigner DD, Friedman AH, Friedman HS, Vredenburgh JJ. Bevacizumab plus irinotecan in recurrent WHO grade 3 malignant gliomas. *Clin Cancer Res*, 2008 Nov; 14(21): 7068-7073
58. Friedman HS, Prados MD, Wen PY, Mikkelsen T, Schiff D, Abrey LE, Yung WK, Paleologos N, Nicholas MK, Jensen R, Vredenburgh J, Huang J, Zheng M, Cloughesy T. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol* 27, 2009 Oct 1; 27(28): 4733-4740
59. Batchelor TT, Sorensen AG, di Tomaso E, Zhang WT, Duda DG, Cohen KS, Kozak KR, Cahill DP, Chen PJ, Zhu M, Ancukiewicz M, Mrugala MM, Plotkin S, Drappatz J, Louis DN, Ivy P, Scadden DT, Benner T, Loeffler JS, Wen PY, Jain RK. AZD2171, a pan VEGF

receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients. *Cancer Cell*, 2007 Janv; 11(1): 83-95

60. Nabors LB, Mikkelsen T, Rosenfeld SS, Hochberg F, Akella NS, Fisher JD, Cloud GA, Zhang Y, Carson K, Wittmer SM, Colevas AD, Grossman SA. Phase I and correlative biology study of cilengitide in patients with recurrent malignant glioma. *Clin Oncol*, 2007 May 1;25(13):1651-1657
61. Norden AD, Young GS, Setayesh K, Muzikansky A, Klufas R, Ross GL, Ciampa AS, Ebbeling LG, Levy B, Drappatz J, Kesari S, Wen PY. Bevacizumab for recurrent malignant gliomas: efficacy, toxicity, and patterns of recurrence. *Neurology*, 2008 Mar 4;70(10):779-787
62. Lai A, Filka E, McGibbon B, Nghiemphu PL, Graham C, Yong WH, Mischel P, Liau LM, Bergsneider M, Pope W, Selch M, Cloughesy T. Phase II pilot study of bevacizumab in combination with temozolomide and regional radiation therapy for up-front treatment of patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme: interim analysis of safety and tolerability. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2008 Aug 1;71(5):1372-1380
63. Schnell O, Krebs B, Wagner E, Romagna A, Beer AJ, Grau SJ, Thon N, Goetz C, Kretschmar HA, Tonn JC, Goldbrunner RH. Expression of integrin $\alpha v \beta 3$ in gliomas correlates with tumor grade and is not restricted to tumor vasculature. *Brain Pathol*, 2008 Jul;18(3):378-386.
64. Paulus W, Baur I, Schuppan D, Roggendorf W. Characterization of integrin receptors in normal and neoplastic human brain. *Am J Pathol*, 1993 Jul;143(1):154-163.
65. Delamarre E, Taboubi S, Mathieu S, Bérenguer C, Rigot V, Lissitzky JC, Figarella-Branger D, Ouafik L, Luis J. Expression of integrin $\alpha 6 \beta 1$ enhances tumorigenesis in glioma cells. *Am J Pathol*, 2009 Aug;175(2):844-855.
66. Reardon DA, Nabors LB, Stupp R, Mikkelsen T. Cilengitide: an integrin-targeting arginine-glycine-aspartic acid peptide with promising activity for glioblastoma multiforme. *Expert Opin Investig Drugs*, 2008 Aug;17(8):1225-1235.
67. Tabatabai G, Weller M, Nabors B, Picard M, Reardon D, Mikkelsen T, Ruegg C, Stupp R. Targeting Integrins in Malignant Glioma. *Targeted Oncology*, 2010 Sep;5(3):175-81.
68. Andrea Carter. Integrins as target: first phase III trial launches, but questions remain. *Journal of the National Cancer Institute*, 2010; 102:675-677
69. Martinkova E, Maglott A, Leger DY, Bonnet D, Stiborova M, Takeda K, Martin S, Dontenwill M. $\alpha 5 \beta 1$ integrin antagonists reduce chemotherapy-induced premature

- senescence and facilitate apoptosis in human glioblastoma cells. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 2010 Sep; 127:1240-1248
70. Martin S, Cosset EC, Terrand J, Maglott A, Takeda K, Dontenwill M. Caveolin-1 regulates glioblastoma aggressiveness through the control of $\alpha(5)\beta(1)$ integrin expression and modulates glioblastoma responsiveness to SJ749, an $\alpha(5)\beta(1)$ integrin antagonist. *Biochim Biophys Acta*, 2009 Feb;1793(2):354-367
 71. Cosset EC, Godet J, Entz-Werlé N, Guérin E, Guenot D, Froelich S, Bonnet D, Pinel S, Plenat F, Chastagner P, Dontenwill M, Martin S. Involvement of TGF β pathway in the regulation of $\alpha(5)\beta(1)$ integrins by caveolin-1 in human glioblastoma. *Int J Cancer*. 2011 Sep 7 (accepté pour publication).
 72. Cohen AW, Hnasko R, Schubert W, Lisanti MP. Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiol Rev*, 2004 Oct;84(4):1341-1379
 73. Taillandier L, Antunes L et Angioi-Duprez KS. Models for neuro-oncological preclinical studies: solid orthotopic and heterotopic grafts of human gliomas into nude mice. *Journal of Neuroscience Methods*, 2003;125:147-157.
 74. Livak KJ et Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001; 25: 402-408
 75. Figarella-Branger D et Bouvier C. Histological classification of human gliomas: state of art and controversies. *Bulletin Du Cancer*, 2005; 92: 301-309.
 76. Coons SW, Johnson PC, Scheithauer BW, Yates AJ, Pearl DK. Improving diagnostic accuracy and interobserver concordance in the classification and grading of primary gliomas. *Cancer*, 1997 Apr 1; 79(7): 1381-1393.
 77. Rolaki A, Coukos G, Loutradis D, DeLisser HM, Coutifaris C, Makrigiannakis. Luteogenic Hormones Act through a Vascular Endothelial Growth Factor-Dependent Mechanism to Up-Regulate $\alpha5\beta1$ and $\alpha v\beta3$ Integrins, Promoting the Migration and Survival of Human Luteinized Granulosa Cells. *The American Journal of Pathology*. 2007 May; 170(5):1561-1572
 78. Sincock PM, Mayrhofer G, Ashman KL. Localization of the Transmembrane 4 Superfamily (TM4SF) Member PETA-3 (CD151) in Normal Human Tissues: Comparison with CD9, CD63, and $\alpha5\beta1$ Integrin. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1997 Apr; 45(4):515-25
 79. Parsons-Wingerter P, Kasman IM, Norberg S, Magnussen A, Zanivan S, Rissone A, Baluk P, Favre CJ, Jeffry U, Murray R, McDonald DM. Uniform overexpression and rapid

accessibility of alpha5beta1 integrin on blood vessels in tumors. *The American Journal of Pathology*. 2005 Jul;167(1):193-211

80. Suchiro K, Mizuguchi J, Nishiyama K, Iwagana S, Farrel DH, Ohtaki S. Fibrinogen binds to integrin alpha(5)beta(1) via the carboxyl-terminal RGD site of the Alpha-chain. *J Biochem*, 2000 Oct;128(4):705-10

81. To WS et Midwood KS. Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2011 Sep 16;4:21

82. Ruggeri ZM, Mendolicchio GL. Adhesion mechanisms in platelet function. *Circ Res*, 2007 Jun 22; 100(12): 1673-1685

83. Figarella-Branger D, Roche PH, Daniel L, Dufour H, Bianco N, Pellissier JF. Cell-adhesion molecules in human meningiomas: correlation with clinical and morphological data. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1997 Apr;23(2):113-122

84. Skuli N, Monferran S, Delmas C, Favre G, Bonnet J, Toulas C, Cohen-Jonathan Moyal E. Alpha5beta3/alpha5beta5 integrins-FAK-RhoB: a novel pathway for hypoxia regulation in glioblastoma. *Cancer Research*, 2009 Apr 15;69(8):3308-3316

VU

NANCY, le 13 septembre 2011
Le Président de Thèse

NANCY, le 13 septembre 2011
Le Doyen de la Faculté de Médecine

Professeur F. PLENAT

Professeur H. COUDANE

AUTORISE À SOUTENIR ET À IMPRIMER LA THÈSE 3742

NANCY, le 16/09/2011

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY 1
Par délégation

Madame C. CAPDEVILLE-ATKINSON