



HAL
open science

Effet antitumoral du bortezomib dans un modèle pré clinique de gliome malin chez la souris nude

Aude Bressenot

► **To cite this version:**

Aude Bressenot. Effet antitumoral du bortezomib dans un modèle pré clinique de gliome malin chez la souris nude. Sciences du Vivant [q-bio]. 2006. hal-01732779

HAL Id: hal-01732779

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01732779>

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>

THESE



Pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN MEDECINE

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

par

Aude MARCHAL épouse BRESSENOT

Le 24 mars 2006

**EFFET ANTITUMORAL DU BORTEZOMIB DANS UN MODELE
PRE CLINIQUE DE GLIOME MALIN CHEZ LA SOURIS NUDE**

Examineurs de la thèse :

M. F. PLENAT	Professeur	Président
M. J-M VIGNAUD	Professeur)
M. P. CHASTAGNER	Professeur) Juges
M. J.L MERLIN	Professeur)

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 Patrick NETTER

Vice-Doyen de la Faculté de Médecine : Professeur Henry COUDANE

Assesseurs :

du 1^{er} Cycle :

du 2^{ème} Cycle :

du 3^{ème} Cycle :

de la Vie Facultaire :

M. le Docteur François ALLA

M. le Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI

M. le Professeur Marc BRAUN

M. le Professeur Bruno LEHEUP

DOYENS HONORAIRES

Professeur Adrien DUPREZ – Professeur Jean-Bernard DUREUX

Professeur Jacques ROLAND

=====

PROFESSEURS HONORAIRES

Louis PIERQUIN – Jean LOCHARD – René HERBEUVAL – Gabriel FAIVRE – Jean-Marie FOLIGUET

Guy RAUBER – Paul SADOUL – Raoul SENAULT – Marcel RIBON

Jacques LACOSTE – Jean BEUREY – Jean SOMMELET – Pierre HARTEMANN – Emile de LAVERGNE

Augusta TREHEUX – Michel MANCIAUX – Paul GUILLEMIN – Pierre PAYSANT

Jean-Claude BURDIN – Claude CHARDOT – Jean-Bernard DUREUX – Jean DUHEILLE – Jean-Pierre GRILLIAT

Pierre LAMY – Jean-Marie GILGENKRANTZ – Simone GILGENKRANTZ

Pierre ALEXANDRE – Robert FRISCH – Michel PIERSON – Jacques ROBERT

Gérard DEBRY – Pierre TRIDON – Michel WAYOFF – François CHERRIER – Oliéro GUERCI

Gilbert PERCEBOIS – Claude PERRIN – Jean PREVOT – Jean FLOQUET

Alain GAUCHER – Michel LAXENAIRE – Michel BOULANGE – Michel DUC – Claude HURIET – Pierre LANDES

Alain LARCAN – Gérard VAILLANT – Daniel ANTHOINE – Pierre GAUCHER – René-Jean ROYER

Hubert UFFHOLTZ – Jacques LECLERE – Francine NABET – Jacques BORRELLY

Michel RENARD – Jean-Pierre DESCHAMPS – Pierre NABET – Marie-Claire LAXENAIRE – Adrien DUPREZ – Paul VERT

Philippe CANTON – Bernard LEGRAS – Pierre MATHIEU – Jean-Marie POLU – Antoine RASPILLER – Gilbert THIBAUT

Michel WEBER – Gérard FIEVE – Daniel SCHMITT – Colette VIDAILHET – Alain BERTRAND – Hubert GERARD

Jean-Pierre NICOLAS – Francis PENIN – Michel STRICKER – Daniel BURNEL – Michel VIDAILHET – Claude BURLET

=====

**PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS
PRATICIENS HOSPITALIERS**

(Disciplines du Conseil National des Universités)

42^{ème} Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

1^{ère} sous-section : (Anatomie)

Professeur Jacques ROLAND – 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 Luc PICARD – 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

2^{ème} sous-section : (Physiologie)

Professeur Jean-Pierre CRANCE – Professeur Jean-Pierre MALLIE

Professeur François MARCHAL – Professeur Philippe HAOUZI

4^{ème} sous-section : (Nutrition)

Professeur Olivier ZIEGLER

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

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

Professeur Alain LOZNIOWSKI

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

Professeur Bernard FORTIER

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

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

Professeur Guy PETIET – 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 ALBUSSON

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

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

Professeur Christian JANOT – Professeur Thomas LECOMPTE – Professeur Pierre BORDIGONI

Professeur Pierre LEDERLIN – Professeur Jean-François STOLTZ

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

Professeur François GUILLEMIN – Professeur Thierry CONROY

Professeur Pierre BEY – Professeur Didier PEIFFERT

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)

Professeur Claude MEISTELMAN – Professeur Dan LONGROIS – Professeur Hervé BOUAZIZ

Professeur Paul-Michel MERTES

2^{ème} sous-section : (Réanimation médicale)

Professeur Henri LAMBERT – Professeur Alain GERARD

Professeur Pierre-Édouard BOLLAERT – Professeur Bruno LÉVY

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

Professeur Patrick NETTER – Professeur Pierre GILLET

4^{ème} sous-section : (Thérapeutique)

Professeur François PAILLE – Professeur Gérard GAY – Professeur Faiez ZANNAD

**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

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

Professeur Jean-Claude MARCHAL – Professeur Jean AUQUE

Professeur Thierry CIVIT

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

Professeur Jean-Pierre KAHN

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

Professeur Daniel SIBERTIN-BLANC

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

Professeur Jean-Marie ANDRE

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

1^{ère} sous-section : (Rhumatologie)

Professeur Jacques POUREL – Professeur Isabelle VALCKENAERE – Professeur Damien LOEUILLE

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

Professeur Jean-Pierre DELAGOUTTE – Professeur Daniel MOLE

Professeur Didier MAINARD – Professeur François SIRVEAUX

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

Professeur Jean-Luc SCHMUTZ – Professeur Annick BARBAUD

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

Professeur François DAP

51^{ème} Section : PATHOLOGIE CARDIORESPIRATOIRE et VASCULAIRE

1^{ère} sous-section : (Pneumologie)

Professeur Yves MARTINET – Professeur Jean-François CHABOT

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 – Professeur Loïc MACE

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

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

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

Professeur Marc-André BIGARD

Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI

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

3^{ème} sous-section : (Néphrologie)

Professeur Michèle KESSLER – Professeur Dominique HESTIN (Mme) – Professeur Luc FRIMAT

4^{ème} sous-section : (Urologie)

Professeur Philippe MANGIN – Professeur Jacques HUBERT – Professeur Luc CORMIER

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

1^{ère} sous-section : (Médecine interne)

Professeur Denise MONERET-VAUTRIN – Professeur Denis WAHL

Professeur Jean-Dominique DE KORWIN – Professeur Pierre KAMINSKY

Professeur Athanase BENETOS - Professeur Gisèle KANNY – Professeur Abdelouahab BELLOU

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

Professeur Patrick BOISSEL – Professeur Laurent BRESLER

Professeur Laurent BRUNAUD

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

1^{ère} sous-section : (Pédiatrie)

Professeur Danièle SOMMELET – Professeur Pierre MONIN
Professeur Jean-Michel HASCOET – Professeur Pascal CHASTAGNER – Professeur François FEILLET

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

Professeur Michel SCHMITT – Professeur Gilles DAUTEL – Professeur Pierre JOURNEAU

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

Professeur Michel SCHWEITZER – Professeur Jean-Louis BOUTROY
Professeur Philippe JUDLIN – Professeur Patricia BARBARINO – Professeur Bruno DEVAL

4^{ème} sous-section : (Endocrinologie et maladies métaboliques)

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

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

=====

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

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 Béatrice MARIE

Docteur Laurent ANTUNES

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 – Docteur Amar NAOUN

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 Bernard NAMOUR – Docteur Marc MERTEN

2^{ème} sous-section : (Physiologie)

Docteur Gérard ETHEVENOT – Docteur Nicole LEMAU de TALANCE – Docteur Christian BEYAERT

Docteur Bruno CHENUUEL

4^{ème} sous-section : (Nutrition)

Docteur Didier QUILLIOT

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

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

Docteur Francine MORY – Docteur Christine LION

Docteur Michèle DAILLOUX – Docteur Véronique VENARD

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

Docteur Marie-France BIAVA – Docteur Nelly CONTET-AUDONNEAU

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

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

Docteur François ALLA

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

Docteur Pierre GILLOIS

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

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

Docteur François SCHOONEMAN

3^{ème} sous-section : (Immunologie)

Docteur Anne KENNEL

4^{ème} sous-section : (Génétique)

Docteur Christophe PHILIPPE

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

1^{ère} sous-section : (Anesthésiologie et réanimation chirurgicale)

Docteur Jacqueline HELMER – Docteur Gérard AUDIBERT

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

Docteur Françoise LAPICQUE – Docteur Marie-José ROYER-MORROT

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

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

Docteur Jean PAYSANT

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

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

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 Franck DALIGAULT

65^{ème} section : BIOLOGIE CELLULAIRE

Mademoiselle Françoise DREYFUSS – Monsieur Jean-Louis GELLY
Madame Ketsia HESS – Monsieur Pierre TANKOSIC – Monsieur Hervé MEMBRE

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

Madame Nadine MUSSE

68^{ème} section : BIOLOGIE DES ORGANISMES

Madame Tao XU-JIANG

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES ASSOCIÉS

Médecine Générale

Docteur Alain AUBREGE
Docteur Francis RAPHAEL
Docteur Jean-Marc BOIVIN

=====

PROFESSEURS ÉMÉRITES

Professeur Michel BOULANGE – Professeur Alain LARCAN – Professeur Michel WAYOFF – Professeur Daniel ANTHOINE
Professeur Hubert UFFHOLTZ – Professeur Adrien DUPREZ – Professeur Paul VERT
Professeur Jean PREVOT – Professeur Jean-Pierre GRILLIAT - Professeur Philippe CANTON – Professeur Pierre MATHIEU
Professeur Gilbert THIBAUT – Professeur Daniel SCHMITT – Mme le Professeur Colette VIDAILHET
Professeur Jean FLOQUET – Professeur Claude CHARDOT – Professeur Michel PIERSON – Professeur Alain BERTRAND
Professeur Daniel BURNEL – Professeur Jean-Pierre NICOLAS – Professeur Michel VIDAILHET

=====

DOCTEURS HONORIS CAUSA

Professeur Norman SHUMWAY (1972)
Université de Stanford, Californie (U.S.A)
Professeur Paul MICHIELSEN (1979)
Université Catholique, Louvain (Belgique)
Professeur Charles A. BERRY (1982)
Centre de Médecine Préventive, Houston (U.S.A)
Professeur Pierre-Marie GALETTI (1982)
Brown University, Providence (U.S.A)
Professeur Mamish Nisbet MUNRO (1982)
Massachusetts Institute of Technology (U.S.A)
Professeur Mildred T. STAHLMAN (1982)
Wanderbilt University, Nashville (U.S.A)
Harry J. BUNCKE (1989)
Université de Californie, San Francisco (U.S.A)

Professeur Théodore H. SCHIEBLER (1989)
Institut d'Anatomie de Würzburg (R.F.A)
Professeur Maria DELIVORIA-PAPADOPOULOS (1996)
Université de Pennsylvanie (U.S.A)
Professeur Mashaki KASHIWARA (1996)
Research Institute for Mathematical Sciences de Kyoto (JAPON)
Professeur Ralph GRÁSBECK (1996)
Université d'Helsinki (FINLANDE)
Professeur James STEICHEN (1997)
Université d'Indianapolis (U.S.A)
Professeur Duong Quang TRUNG (1997)
*Centre Universitaire de Formation et de Perfectionnement des
Professionnels de Santé d'Hô Chi Minh-Ville (VIËTNAM)*

REMERCIEMENTS

A notre Maître et Président de Thèse,

**Monsieur le Professeur F. Plénat,
Professeur d'anatomie et de Cytologie Pathologiques (Option biologie)**

Vous nous avez fait le grand honneur de présider et de diriger cette thèse.

*En nous confiant ce travail, vous nous avez fait découvrir les versants techniques et scientifiques de cette spécialité, qui sont passionnants.
Par vos compétences médicales et pédagogiques, vous avez su nous montrer l'exemple, et nous guider attentivement.*

Veillez trouver dans ce travail l'expression de notre profond respect et de notre sincère reconnaissance.

A notre Maître et Juge,

Monsieur le Professeur J-M VIGNAUD
Professeur d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques

Vous nous faites l'honneur de juger ce travail,

Vous nous avez fait découvrir et apprécier cette belle spécialité qu'est l'anatomie pathologique.

Vos compétences médicales, scientifiques et pédagogiques, nous ont permis de progresser.

Veillez trouver dans ce travail le témoignage de notre profond respect et d'une grande admiration.

A nos juges,

Monsieur le Professeur P.CHASTAGNER
Professeur de pédiatrie.

*Vous nous faites l'honneur de juger ce travail,
Veuillez trouver dans ce travail l'expression de notre haute considération et de
notre sincère reconnaissance.*

Monsieur le Professeur J.L MERLIN
Professeur de pharmacie.

*Vous nous faites l'honneur de juger cette thèse,
Veuillez trouver ici l'expression de notre plus profond respect et de nos
remerciements pour votre participation.*

A nos maîtres successifs d'internat,

Monsieur le Professeur P.LEDERLIN

Monsieur le Professeur Y.MARTINET

Monsieur le Professeur J-M. VIGNAUD

Monsieur le Professeur F.PLENAT

Madame le Docteur A.LEROUX

DEDICACES PARTICULIERES

A ma chère maman,

Du début jusqu'à la fin de ces longues études, tu as été à mes côtés, dans les bons et les mauvais moments.

Ta présence et ton soutien m'ont permis d'avancer et de réaliser le plus cher de mes désirs : celui d'être médecin.

Ton aide a été indispensable pour la réalisation de cette thèse.

Que ce travail soit le témoignage de mon profond respect et de tout mon amour.

Nous remercions tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail :

Madame Muriel ANFRYE,

Ton aide, ta gentillesse et tes compétences ont largement contribué à la réalisation de ce travail.

Ta collaboration a été un réel plaisir.

Je te remercie pour ton aide précieuse et ta disponibilité.

Mesdemoiselles Marianne LABUSSIÈRE, Sophie PINEL,

Votre participation a largement contribué à la réalisation de ce travail, pour lequel vos compétences scientifiques ont été indispensables.

Je vous remercie pour votre chaleureux et sympathique soutien.

Travailler avec vous a été une véritable joie.

Madame Corinne BONNET,

Merci pour votre aide, votre disponibilité et vos judicieux conseils.

A tous les membres des services d'Anatomie et de cytologie Pathologiques des sites de Brabois et de Central du CHU de Nancy ainsi que du Centre Alexis Vautrin (Professeurs F.Plénat et J.M Vignaud et Docteur A.Leroux.)

A Virginie et Juliette,

Qui ont été témoins de mes débuts en anatomie pathologique et qui sont parties. Merci pour tous ces bons moments passés ensemble.

A mes collègues et amis,

Nathalie, Amandine R, Karine, Sébastien, Nelle, Amandine P, Pierre...

Merci pour votre bonne humeur, vos conseils et votre soutien.

A Yannick et Guillaume,

Les deux hommes de ma vie, je vous aime.

A mon père, ma sœur et Eric,

A ma belle famille,

Merci pour votre gentillesse et votre aide.

A mes grands parents,

A tonton Milou,

Malheureusement disparu trop tôt, je sais que tu aurais été fier,

A myrtille et chabadi,

A toute ma famille,

A mes amis,

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 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



REMERCIEMENTS	8
SERMENT	16
TABLE DES MATIERES	18
<i>LISTE DES ABREVIATIONS</i>	22
<i>TABLEAUX</i>	23
<i>FIGURES</i>	25
<i>PLANCHES PHOTOGRAPHIQUES</i>	26
<i>GRAPHIQUES</i>	27
INTRODUCTION	28
PREMIERE PARTIE : RAPPELS ANATOMO-CLINIQUES	31
I-LES TUMEURS GLIALES.	32
I.1-Données épidémiologiques.	32
I.2-Classifications anatomopathologiques.	33
<i>I.2.1-Classification OMS des tumeurs gliales.</i>	33
<i>I.2.2-Classification de l'hôpital Sainte-Anne des tumeurs gliales.</i>	35
I.3-Classification moléculaire	36
I.4-Stratégies thérapeutiques actuelles.	40
<i>I.4.1-Les tumeurs gliales de bas grade.</i>	40
<i>I.4.2-Les tumeurs gliales de haut grade.</i>	40
<i>I.4.2.1-Les glioblastomes</i>	41
<i>I.4.2.2-Les astrocytomes anaplasiques.</i>	41
<i>I.4.2.3-Les oligodendrogliomes et les oligoastrocytomes anaplasiques.</i>	42
I.5-Conclusion.....	42
II-LE BORTEZOMIB (VELCADE®) ET LE SYSTEME UBIQUITINE-PROTEASOME	43
II.1-Le système ubiquitine-protéasome.	43
<i>II.1.1-Définition et fonction</i>	43
<i>II.1.2-Structure du protéasome</i>	44
<i>II.1.3-Mécanisme d'action</i>	44
<i>II.1.3.1-Ubiquitinylation</i>	45
<i>II.1.3.2-Dégradation de la protéine par le protéasome.</i>	45
<i>II.1.4-Implication du système ubiquitine-protéasome en pathologie humaine.</i>	48
II.2-Le bortezomib.	49
<i>II.2.1-Généralités.</i>	49
<i>II.2.2-Pharmacocinétique.</i>	50
<i>II.2.3-Toxicité.</i>	50
<i>II.2.4-Efficacité préclinique.</i>	50
<i>II.2.5-Efficacité clinique.</i>	51
III-LA MORT CELLULAIRE EN PATHOLOGIE TUMORALE.	53
III.1-L'apoptose.	53
<i>III.1.1-Définition.</i>	53
<i>III.1.2-Manifestations du processus apoptotique.</i>	54
<i>III.1.3-La machinerie apoptotique.</i>	56

III.1.3.1-La signalisation.....	56
III.1.3.2-La régulation.....	56
III.1.3.3-La dégradation.....	57
III.1.4-Implication de l'apoptose en cancérologie.....	61
III.1.5-Méthodes de détection de l'apoptose.....	62
III.1.5.1-Méthodes basées sur la reconnaissance d'altérations de la forme cellulaire.....	62
III.1.5.2-Méthodes basées sur la fragmentation de l'ADN.....	63
III.1.5.3-La mise en évidence des signaux de transduction.....	65
III.1.5.4-La cytométrie en flux.....	66
III.1.5.5-L'annexine V.....	67
III.1.5.6-Autres méthodes.....	67
III.2 Autres mécanismes de mort cellulaire dans les cancers.....	69
DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES.....	73
I-LES OUTILS.....	74
I.1-Les lignées cellulaires.....	74
I.2-Les souris nude.....	75
I.3-Les anticorps.....	75
II-CHOIX DE LA TECHNIQUE DE MISE EN EVIDENCE DE L' APOPTOSE SUR COUPES HISTOLOGIQUES.....	77
II.1-Introduction.....	77
II.2-La culture cellulaire et l'induction de l'apoptose.....	77
II.3-Analyses par cytométrie de flux.....	78
II.3.1-Appréciation de la mort cellulaire non apoptotique par technique d'exclusion au bleu de Trypan.....	78
II.3.2-Détection des cellules apoptotiques par mise en évidence de la PARP clivée et de la caspase-3 activée.....	78
II.3.3-Détection des anticorps par cytométrie en flux.....	79
II.4-Détection des cellules apoptotiques dans des culots cellulaires inclus en paraffine.....	79
II.4.1- Inclusion en paraffine des cellules en cultures.....	79
II.4.2-Les techniques immunohistochimiques.....	80
II.4.3-Mise en évidence des cellules apoptotiques par la méthode TUNEL.....	82
II.4.4-Les techniques effectuées.....	83
III-ETUDE DE L'INFLUENCE DU BORTEZOMIB SUR LA CINETIQUE CELLULAIRE DANS LES TUMEURS GLIALES XENOGREFFEES CHEZ LA SOURIS NUDE.....	84
III.1-Développement du modèle animal.....	84
III.2-Répartition des animaux et traitement.....	86
III.3-Le suivi des animaux.....	86
III.4-Le recueil des échantillons tumoraux.....	87
IV-COMPTAGE.....	88
IV.1- Choix de la technique pour détection de l'apoptose sur cellules en culture.....	88
IV.2-Etude de l'influence du bortezomib sur l'équilibre de la population cellulaire dans les tumeurs gliales xéno greffées.....	88
V-ETUDE STASTISTIQUE.....	89

TROISIEME PARTIE : RESULTATS	90
I- CHOIX DE LA TECHNIQUE EVALUANT L'ACTIVITE APOPTOTIQUE.	91
I.1-Résultats de la cytométrie en flux.	91
I.2-Lecture des colorations standards HES.....	92
I.3-Résultats de l'étude immunohistochimique.	93
I.4-Résultats de la technique TUNEL.....	96
I-5- Récapitulatifs des indices apoptotiques en fonction des techniques.....	98
II-ETUDE DE L'INFLUENCE DU BORTEZOMIB SUR LA CROISSANCE TUMORALE DANS LES TUMEURS GLIALES XENOGREFFES CHEZ LA SOURIS NUDE.....	99
II-1- Résultats généraux de l'étude.	99
II-2-Résultats de l'étude de l'évolution du volume tumoral.	100
II-3-Etude morphologique sur coloration standard HES.	100
II-4-Etude immunohistochimique de l'activité apoptotique : caspase-3 activée.	102
II-5-Etude immunohistochimique de la prolifération cellulaire : Ki-67.	104
QUATRIEME PARTIE : DISCUSSION.....	110
CONCLUSION	119
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	121
ANNEXES	130

LISTE DES ABREVIATIONS



ADN	Acide Désoxyribonucléique
ARN	Acide RiboNucléique
Gy	Gray
HES	Hématoxyline-Eosine-Safran
MIB1	Antigène nucléaire Ki-67
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PARP	Poly ADP-Ribose Polymérase
MGG	May grünwald-Giemsa
QSP	Quantité suffisante pour
ATCC	American Type Culture Collection
IHC	Immunohistochimie

TABLEAUX

	Page :
Tableau I : Principe du grading des gliomes selon l’OMS -----	34
Tableau II : Principales cibles moléculaires du bortezomib et participation à l’effet antitumoral -----	51
Tableau III : Modifications morphologiques de la cellule au cours du processus apoptotique -----	55
Tableau IV : Indices apoptotiques et survie dans les cancers -----	62
Tableau V : Résumé des différentes techniques utilisées pour détecter l’apoptose -----	68
Tableau VI : Milieu de culture des cellules U87 -----	82
Tableau VII : Anticorps utilisés en immunohistochimie et conditions techniques -----	85
Tableau VIII : Résultats des pourcentages en cytométrie de flux -----	92
Tableaux IX : Résultats des techniques histologiques détectant l’apoptose.	
• Tableau IX-a : Les modifications morphologiques en HES -----	93
• Tableau IX-b : Détection de la caspase-3 activée en IHC -----	94
• Tableau IX-c : Détection de la PARP clivée en IHC -----	95
• Tableau IX-d : Détection de M 30 en IHC -----	96
• Tableau IX-e : Détection des cellules apoptotiques par la méthode TUNEL -----	97

Tableaux X : Résultats de l'étude sur les tumeurs gliales xéno greffées.

- Tableau X-a : Récapitulatifs des données d'inclusion -----99
- Tableau X-b : Evaluation du score de nécrose -----101
- Tableaux X-c : Détection de la caspase-3 activée
dans les groupes témoins -----102
- Tableau X-d : Détection de la caspase-3 activée
dans les groupes traités -----103
- Tableau X-e : Détection de Ki-67
dans les groupes témoins -----104
- Tableau X-f : : Détection de Ki-67
dans les groupes traités -----105

Tableau XI : Avantages et inconvénients des différentes

techniques histologiques détectant l'apoptose -----116

FIGURES

Page :

Figure I : Résumé des différentes mutations moléculaires lors de la progression des tumeurs gliales -----	39
Figure II : Structure moléculaire du protéasome -----	46
Figure III : Architecture des sous unités béta constituant le protéasome -----	46
Figure IV : Etapes du fonctionnement de la protéolyse protéasomique -----	47
Figure V : Différences morphologiques entre apoptose et nécrose -----	55
Figure VI : Principales voies initiatrices et effectrices du processus apoptotique -----	59
Figure VII : Ensemble des voies initiatrices et effectrices du signal de transduction de l'apoptose -----	60
Figure VIII : Comparaison des techniques TUNEL et ISEL -----	65
Figure IX : Résumé des différentes étapes du processus apoptotique et des signaux utilisés pour sa détection -----	71
Figure X : Principe de l'immunohistochimie en trois couches -----	81

PLANCHES PHOTOGRAPHIQUES

Page :

Planche I : Rappels anatomo-cliniques -----72

Planche II : Choix de la technique de détection de l'apoptose (1) -----107

Planche III : Choix de la technique de détection de l'apoptose (2) -----108

Planche IV : Etude microscopique des tumeurs gliales -----109

GRAPHIQUES

Page :

Graphique I : Résultats de la cytométrie en flux -----	91
Graphique II : Comparaison des indices apoptotiques obtenus en cytométrie en flux et en immunohistochimie -----	98
Graphique III : Comparaison des indices apoptotiques obtenus en IHC, avec la méthode TUNEL et la morphologie -----	98
Graphique IV : Influence du bortezomib sur l'évolution du volume médian des tumeurs xénogreffées -----	100
Graphique V : Evolution des indices apoptotiques moyens dans les groupes témoins et traités -----	103
Graphique VI : Evolution des indices de prolifération moyens dans les groupes témoins et traités -----	105
Graphique VII : Comparaison de la croissance du volume tumoral des groupes témoins au cours de trois études différentes -----	117

INTRODUCTION

Les tumeurs gliales demeurent de nos jours un des cancer dont le pronostic est le plus sombre, la médiane de survie étant de l'ordre de quelques mois et la qualité de vie souvent mauvaise. Les possibilités thérapeutiques sont encore limitées avec un bénéfice de quelques mois seulement sur la survie. De plus, développer de nouveaux traitements reste difficile, puisqu'il s'agit de tumeurs dont la localisation anatomique particulière rend parfois difficile l'exérèse chirurgicale ainsi que la diffusion des substances cytotoxiques à cause du passage de la barrière hémato-tumorale. Ceci implique de rester vigilant quant au rapport bénéfices/risques apporté.

Bien que décrit depuis de nombreuses années, l'importance du système ubiquitine-protéasome dans le fonctionnement intracellulaire n'a été réalisée que récemment et a fait l'objet de nombreuses études, avec en particulier la mise en évidence de son rôle central dans la cancérogénèse. C'est donc logiquement que de nouvelles molécules cherchant à bloquer son activité ont été développées : le bortezomib est le premier inhibiteur réversible du système ubiquitine-protéasome commercialisé. Ces effets sur la croissance cellulaire sont multiples, avec essentiellement une action pro-apoptotique, antimitotique et antiangiogénique ainsi que radiopotentialisante. Il a déjà donné des résultats prometteurs dans le traitement de certains cancers tels que le myélome avec une bonne efficacité antitumorale et surtout une très bonne tolérance, ce qui a permis l'obtention d'une autorisation de mise sur le marché dans le traitement du myélome évolutif après une première ligne thérapeutique. Il fait actuellement l'objet de nombreuses études cliniques chez l'Homme dans le cadre d'autres types de tumeur. En ce qui concerne son action sur les tumeurs gliales, seule une étude a été réalisée, démontrant une action antiproliférative et pro-apoptotique sur les cellules en culture. Il nous a donc paru logique d'étudier l'efficacité thérapeutique de cette nouvelle molécule sur un modèle animal afin d'envisager par la suite une administration chez l'Homme en concomitance avec la radiothérapie pour en potentialiser l'effet.

Notre travail, réalisé dans le cadre de cette étude, a consisté à évaluer l'effet de l'administration du bortezomib sur la croissance de tumeurs gliales humaines xéno greffées, en comparant d'une part l'évolution des volumes tumoraux entre les groupes de souris traitées et non traitées et d'autre part celle de deux paramètres fondamentaux de la croissance cellulaire : les activités mitotique et apoptotique.

Du point de vue technique, la prolifération des cellules au sein d'un tissu est facilement évaluable par la morphologie et également par la mise en évidence de protéine du cycle cellulaire. Par contre, la détection du processus apoptotique sur coupe tissulaire est moins bien maîtrisée : en effet, la technique de référence actuelle qui est la méthode TUNEL, fait

l'objet de nombreuses controverses et de nombreux scientifiques s'accordent à dire qu'elle restent peu spécifique et donc peu fiable. De plus, la morphologie cellulaire en microscopie optique est peu sensible. La mise en évidence par immunohistochimie de certains signaux de transduction activés lors du processus apoptotique pourrait être une approche plus sensible et plus spécifique pour détecter ce mécanisme.

Notre travail a donc consisté à mettre au point et comparer différentes techniques de détection de l'apoptose sur coupe tissulaire, afin de déterminer la méthode la plus sensible. Celle-ci étant ensuite appliquée à chaque tumeur gliale xénotransplantée pour le calcul de l'indice apoptotique.

PREMIERE PARTIE

RAPPELS ANATOMO-CLINIQUES

I-Les tumeurs gliales.

Les tumeurs gliales sont constituées de cellules dont la morphologie est proche de celle des cellules gliales. Celles-ci sont, avec les neurones, les deux principales composantes du parenchyme cérébral et comprennent 4 types de cellules : les astrocytes, les oligodendrocytes, les cellules épendymaires et les cellules microgliales. Les cellules tumorales présentent les caractéristiques morphologiques proche d'un de ces types cellulaires amenant à définir 3 sous-types de tumeurs gliales : astrocytaire, oligodendrocytaire ou épendymaire. De plus, au sein d'une même tumeur, plusieurs contingents cellulaires différents peuvent être associés aboutissant à des lésions mixtes.

Des difficultés diagnostiques particulières pour ces tumeurs peuvent être rencontrées du fait de leur hétérogénéité et de l'absence de marqueur en immunohistochimie. La biologie moléculaire pourrait dans un avenir proche devenir une aide précieuse pour classer ces lésions.

Nous n'aborderons dans ce chapitre que les tumeurs gliales de type astrocytaire et oligodendrocytaire.

I.1-Données épidémiologiques.

Les tumeurs cérébrales primitives malignes font partie des dix premières causes de décès par cancer et leur incidence en France est estimée entre 6 et 7 pour 100000.[1]

Les tumeurs gliales représentent environ 70 % des tumeurs cérébrales primitives.

La plus fréquente et la plus maligne des tumeurs gliales est le glioblastome qui représente à elle seule 65 % des tumeurs cérébrales primitives. Son incidence est en augmentation surtout dans les pays industriels. Certaines populations apparaissent plus exposées que d'autre avec une incidence plus élevée chez les caucasiens puis les populations noires et enfin les asiatiques.[2]. Il est quatre fois plus fréquent que les astrocytomes anaplasiques avec un âge médian de 53 ans et un pic d'incidence situé entre 65 et 75 ans, touchant plus fréquemment les hommes que les femmes (sex ratio :3/2).[3]

Les facteurs de risque de ces tumeurs sont mal connus et le seul qui soit prouvé est la radiothérapie.

I.2-Classifications anatomopathologiques.

La classification anatomopathologique des gliomes demeure en 2006 un challenge dont le principal but est d'établir des groupes morphologiques à valeur pronostique, qui sont déterminés par le type histologique du gliome et son grade afin de proposer une thérapeutique adaptée.[4]

I.2.1-Classification OMS des tumeurs gliales.

- **Classification OMS des tumeurs gliales (2000).[5]**

Tumeurs astrocytaires :

- Astrocytome pilocytique = grade I
- Astrocytome diffus = grade II

Deux principales variantes : fibrillaire et gémistocytaire.

- Astrocytome anaplasique = grade III
- Glioblastome multiforme = grade IV

De novo ou secondaire à des astrocytomes de grade II ou III.

- Xanthoastrocytome pléiomorphe (PXA) de grade II ou anaplasique de grade III.
- Astrocytome à cellules géantes sous-épendymaire = grade I.

Tumeurs oligodendrogiales

- Oligodendrogliome de grade II.
- Oligodendrogliome anaplasique de grade III.

Tumeurs oligoastrocytaires [6]

- Oligo-astrocytome de grade II
- Oligo-astrocytome de grade III

Existence de tumeurs mixtes glio-neurales.

Les principes de grading des tumeurs gliales selon l'OMS sont résumés dans le tableau I.

Tableau I : Principe du grading des gliomes selon l'OMS [5]

	Différenciation	Densité cellulaire	Atypies nucléaires	Activité mitotique	Nécrose	Prolifération microvasculaire
Astrocytomes diffus de grade II	Haut degré de différenciation	Modérée	Occasionnelles	Absente ou 1 mitose	Absente	Absente
Astrocytomes anaplasiques grade III	Anaplasie focale ou dispersée	Augmentée diffusément ou focalement	Présentes	Présente	Absente	Absente
Glioblastomes grade IV	Faible	Elevée	Marquées	Marquées	Présente	Présente
Oligodendrogliomes grade II	Bien différenciés	Modérée	Possiblement marquées	Absente ou mitoses occasionnelles	Absente ou faible	Non proéminente
Oligodendrogliomes anaplasiques grade III	Anaplasie focale ou diffuse	Eventuellement augmentée	Eventuellement marquées	Eventuellement forte	Possible	Possible
Oligoastrocytomes grade II	Bien différenciés	Faible ou modérée	?	Absente ou faible	Absente	Absente
Oligoastrocytomes anaplasiques grade III	?	Eventuellement forte	Eventuellement présentes	Eventuellement forte	Possible	Possible

Cette classification anatomopathologique reste actuellement la référence internationale, mais souffre d'un défaut majeur de reproductibilité [7] puisque le taux de discordance diagnostique interobservateur et intraobservateur varie de 20% à 60%.[8, 9] Elle repose uniquement sur la morphologie sans tenir compte des données cliniques et de l'imagerie. Elle ne distingue pas les cellules tumorales du parenchyme résiduel infiltré et ne tient pas compte de l'hétérogénéité tumorale. Ainsi, la validité du diagnostic est entièrement dépendante de la représentativité des prélèvements, qui devrait être vérifiée par les données de l'imagerie.

Au contraire, la classification proposée par l'hôpital Sainte-Anne (Paris) essaie de pallier le défaut de reproductibilité en intégrant les données cliniques et de l'imagerie.[4]

1.2.2-Classification de l'hôpital Sainte-Anne des tumeurs gliales.

Cette classification découle pour l'essentiel de l'étude de biopsies étagées stéréotaxiques corrélées à l'imagerie (scanner ou IRM). Ces travaux ont permis de définir la structure spatiale des gliomes (infiltrants purs, solides purs ou mixtes), de préciser le mode de croissance des gliomes, de redéfinir les critères diagnostiques des oligodendrogliomes.[4]

- **Classification de l'hôpital Sainte-Anne (2000) des formes communes de gliome chez l'adulte. [10, 11]**

- Oligodendrogliome ou Oligo-astrocytome de Grade A
- Oligodendrogliome ou Oligo-astrocytome de Grade B
- Glioblastome
- Tumeurs glioneuronales malignes (TGNM) : nouvelle entité que nous n'aborderons pas.

- **Principes de grading des oligodendrogliomes ou oligo-astrocytomes de l'Hôpital Sainte-Anne [5]**

Cette classification intègre les données clinique et de l'imagerie et repose sur l'analyse de la structure histologique des gliomes avec distinction de deux composantes : le tissu tumoral solide (TT) et les cellules tumorales isolées (CTI). Elle s'appuie également sur le mode de croissance tumoral qui tient compte de la néoangiogénèse.

Elle ne reconnaît pas l'existence d'astrocytome diffus de grade II ou anaplasiques de grade III. En conséquence, elle ne reconnaît pas les glioblastomes secondaires.

Un système de grading n'est utilisé que pour les oligodendrogliomes ou oligo-astrocytomes.

- **Structure spatiale des gliomes :**

Les cellules tumorales isolées (CTI) infiltrent un parenchyme morphologiquement et fonctionnellement intact (trame axonale préservée, pas de déficit neurologique), mais induisent une gliose réactionnelle. Il n'y a pas de microangiogénèse donc pas de prise de contraste. Par contre il existe un oedème ce qui se traduit par une hypodensité au scanner, un hyposignal T1 et un hypersignal T2 à l'IRM.

Le tissu tumoral solide (TT) est constitué uniquement de cellules tumorales adossées les unes aux autres, associées à une abondante microvascularisation. Il détruit le parenchyme cérébral (absence ou diminution de la trame axonale et possible déficit neurologique.)

Les astrocytomes pilocytiques sont composés uniquement de tissu tumoral solide (TT), les glioblastomes de tissu tumoral solide (TT) et de cellules tumorales isolées (CTI), les oligodendrogliomes et les oligoastrocytomes peuvent également présenter une structure mixte mais sont le plus souvent, au début de leur évolution composés de cellules tumorales isolées (CTI).

- Néoangiogénèse :

En radiologie, les gliomes astrocytaires (formes bénignes ou malignes) sont richement vascularisés et prennent constamment le contraste, contrairement aux oligodendrogliomes et aux oligo-astrocytomes qui peuvent croître pendant des années sous forme de cellules tumorales isolées sans entraîner de prise de contraste. Le phénomène de néoangiogénèse est un évènement tardif dans l'évolution des oligodendrogliomes caractérisant le passage du grade A au grade B.

Cette néoangiogénèse s'apprécie de façon indirecte avec en histologie une hyperplasie endothéliale (définie par la présence dans au moins un champs au microscope x10 de capillaires dont les cellules endothéliales sont hyperplasiques possédant ponctuellement des noyaux côte à côte).

Cette classification pose également de nombreux problèmes dans la pratique quotidienne, puisqu'elle exige un changement dans la prise en charge des prélèvements avec intégration obligatoire des données de l'imagerie. De plus, certaines difficultés émergent pour certains diagnostics tel que celui de l'oligodendrogliome où la distinction entre un grade A et B peut être difficile à apprécier.

La classification paraît parfaitement adaptée pour les tumeurs hémisphériques mais beaucoup moins pour les tumeurs du tronc cérébral.

Enfin, sa reproductibilité entre pathologistes n'a pas encore été testée.[4]

I.3-Classification moléculaire

Des progrès importants ont été réalisés ces dernières années dans le recensement des altérations moléculaires présentes dans les gliomes. Des profils d'altérations moléculaires ont été identifiés et certains d'entre eux ont pu être corrélés avec les données histologiques et cliniques de sous-groupes tumoraux, contribuant à améliorer la classification histopronostique des gliomes.[12]

Les premières altérations décrites dans les gliomes concernent les tumeurs astrocytaires avec la mise en évidence d'une amplification du proto-oncogène EGFR (Epidermal growth factor) et des altérations de P53 (mutation du gène suppresseur de tumeur et/ou accumulation de la protéine p53). Ces deux anomalies sont très rarement mises en évidence en même temps dans une même tumeur [13, 14], suggérant qu'elles appartiennent à des voies de tumorigénèse distinctes. En effet, l'amplification de l'EGFR est quasi exclusivement observée dans les glioblastomes, ce qui suggère qu'il s'agit d'un événement tardif dans la progression tumorale. En revanche, la mutation du gène P53 s'observe dans les tumeurs gliales de tout grade, ce qui suggère qu'il s'agit d'un événement précoce dans la tumorigénèse, qui s'associe aux tumeurs qui progressent vers la malignité en plusieurs étapes. L'amplification de l'EGFR serait donc l'apanage des glioblastomes de novo, alors que la mutation du gène P53 serait le témoin d'un glioblastome « secondaire », c'est-à-dire provenant de la transformation d'une tumeur astrocytaire de plus bas grade.[15] D'autres mutations ont été mises en évidence (PTEN, MDM2, délétion 19q) et pourraient également être rattachées à l'un ou l'autre des sous-groupes.

Pour l'instant, la valeur pronostique des altérations de P53 et de l'amplification/surexpression de EGFR dans les tumeurs astrocytaires reste controversée. (valeur pronostique défavorable de l'accumulation de p53 ? radiorésistance des tumeurs quand surexpression de l'EGFR ?)

La méthylation du promoteur de l'O6 méthylguanine ADN méthyl transférase dans les glioblastomes est également un facteur prédictif de réponse au traitement par des agents alkylants, et de survie.[16]

Les oligodendrogliomes se distinguent des tumeurs astrocytaires par la rareté des mutations du gène P53 et surtout par la présence de délétions récurrentes du chromosome 1p et q19. Celles-ci sont quasiment toujours associées, suggérant qu'elles sont intimement liées du point de vue fonctionnel. Ces deux altérations sont très spécifiques des oligodendrogliomes et sont trouvées dans moins de 10% des tumeurs astrocytaires. Elles sont présentes aussi bien dans les grades II que III, suggérant une intervention précoce dans la tumorigénèse. D'autres altérations génétiques ont été mises en évidence mais avec une moindre fréquence (délétion homozygote de p16/CDKN2A, délétion du chromosome 10q, amplification de l'EGFR, amplification du PDGFRA). D'un point de vue histologique, certaines études suggèrent que les tumeurs présentant une délétion des chromosomes 1p/19q de façon isolée correspondraient aux aspects « typiques » des oligodendrogliomes dits en nid d'abeille [17]; les oligodendrogliomes sans perte 1p/19q présenteraient des aspects « moins classiques » et un

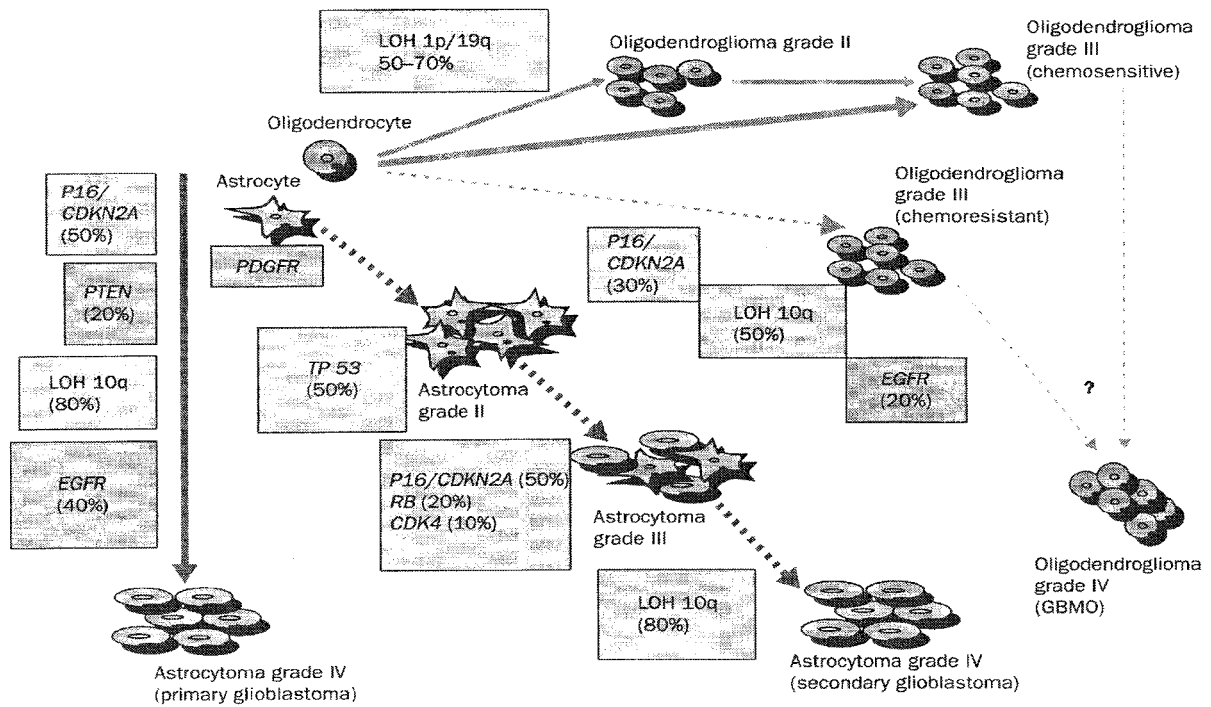
comportement plus agressif. Les tumeurs combinant les pertes 1p/19q et les autres altérations (délétion homozygote de p16/CDKN2A et/ou délétion du chromosome 10q et/ou amplification de l'EGFR) présenteraient plus volontiers des caractéristiques morphologiques de glioblastome (nécrose pseudopalisadique, prolifération endothéliocapillaire) associées à d'authentiques plages de différenciation oligodendrogliale (glioblastome à composante oligodendrogliale). Du point de vue clinique, une corrélation a été mise en évidence entre le profil génétique et la localisation tumorale ainsi qu'entre le profil moléculaire et la valeur pronostique : en effet, la perte du chromosome 1p est associée à une augmentation de la survie des oligodendrogliomes anaplasiques et à une meilleure réponse à la chimiothérapie [18] (taux de réponse de 100% à la chimiothérapie en cas de perte de 1p et 23,5% en cas de non perte). Ces résultats pourraient également s'appliquer aux oligodendrogliomes de bas grade.[19] Par contre, aucune étude n'a été réalisée concernant la radiosensibilité. D'autres altérations semblent avoir un rôle pronostique défavorable : la perte du chromosome 10q, les délétions de p16/CDKN2A et l'amplification de l'EGFR. De plus, lorsque ces altérations sont associées à une perte de 1p/q19, elles annulent son impact favorable sur le pronostic.

Les études faites sur les oligoastrocytomes rapportent des pertes des chromosomes 1p et 19q, en nombre moins important que dans les oligodendrogliomes. Des mutations TP53, des délétions de p16/CDKN2A et des amplifications de l'EGFR sont observées plus fréquemment dans les oligo-astrocytomes que dans les oligodendrogliomes. D'un point de vue évolutif, ces tumeurs se rapprochent des oligodendrogliomes, avec une bonne chimiosensibilité. Cependant la valeur pronostique des délétions 1p n'est pas prouvée. La figure I illustre les différentes mutations observées lors de la progression des tumeurs gliales.

En conclusion, une réflexion urgente doit se mettre en place pour aboutir à l'élaboration d'une classification unique des gliomes afin d'améliorer la reproductibilité entre pathologistes et permettre d'homogénéiser la prise en charge thérapeutique.[12]

Cette nouvelle classification devra sans doute tenir compte de différents éléments : l'histologie, l'imagerie, la clinique et les données de biologie moléculaires.

Figure I : Résumé des différentes mutations moléculaires lors de la progression des tumeurs gliales.[3]



LOH=loss of heterozygosity; GBM=glioblastoma multiforme; GBMO=glioblastoma multiforme with oligodendroglial component. Orange squares correspond to genetic alterations of cell cycle control. TP53=mutation; RB=mutation; P16/CDKN2A=homozygous deletion; CDK4=amplification. Green squares correspond to genetic alterations affecting signal transduction pathway. EGFR=amplification; PDGFR=overexpression; PTEN=mutation. Blue squares correspond to loss of heterozygosity on chromosomes 1p/19q or 10q.

D'après Behin et al.

I.4-Stratégies thérapeutiques actuelles.

Nous aborderons brièvement le traitement des tumeurs gliales de bas grade et insisterons sur les différentes thérapeutiques des tumeurs gliales de haut grade, qui sont celles concernées par nos essais thérapeutiques.

I.4.1-Les tumeurs gliales de bas grade.

Les gliomes de bas grade comprennent selon la classification OMS : les astrocytomes pilocytiques, les astrocytomes diffus de grade II, les oligodendrogliomes de grade II et les oligo-astrocytomes de grade II.[3]

Les astrocytomes pilocytiques sont des tumeurs gliales de l'enfant et de l'adulte jeune, localisés essentiellement au niveau du cervelet et des voies optiques. Leur traitement repose sur la résection chirurgicale ou, en cas de tumeur non opérable sur la radiothérapie et/ou la chimiothérapie.

Les autres formes de gliomes de bas grade sont traitées dans un premier temps par chirurgie avec une exérèse macroscopiquement totale, si possible. La radiothérapie est indiquée dans un second temps. L'essai thérapeutique comparant l'administration de la radiothérapie en postopératoire avec celle réalisée à la récurrence, a montré l'absence d'impact sur la survie globale, mais toutefois un bénéfice sur la survie sans progression.[20] Le moment auquel doit être effectuée la radiothérapie doit être discuté en fonction des facteurs pronostiques. Certains essais sont en cours afin de comparer une chimiothérapie néoadjuvante (témozolomide) avec une radiothérapie conventionnelle dans les gliomes de grade II agressifs. La chimiothérapie n'est préconisée actuellement que chez l'adulte pour les oligodendrogliomes de grade II symptomatiques, qui sont les seuls pour lesquels la chimiosensibilité est prouvée. Chez l'enfant de moins de 5 ans, la chimiothérapie est, après la chirurgie, le traitement de choix afin de retarder voire d'éviter la radiothérapie.[21]

I.4.2-Les tumeurs gliales de haut grade.

Le traitement des gliomes de haut grade repose également dans un premier temps sur la chirurgie [22], avec une exérèse la plus large possible, lorsque celle-ci est possible.

1.4.2.1-Les glioblastomes

Le traitement standard de première ligne des glioblastomes [1] a longtemps reposé sur la radiothérapie associée à une chimiothérapie à base de nitroso-urées, aboutissant à un bénéfice de l'ordre de 9 mois sur la médiane de survie. Depuis 2004, l'essai de l'EORTC et du NCI Canada a défini un nouveau standard thérapeutique, reposant sur l'administration de témozolomide en traitement concomitant et au décours du schéma conventionnel de radiothérapie.[23] Les patients reçoivent ainsi une irradiation fractionnée et focale de 2 Gray par jour, 5 jours par semaine, pendant 6 semaines. Le témozolomide y est associé pendant la radiothérapie en administration continue à la dose de 75 mg/m²/jour, poursuivie après la radiothérapie sous la forme de 6 cycles utilisant le schéma de 5 jours à 200 mg/m²/jour tous les 28 jours. Le témozolomide est un agent alkylant de deuxième génération, qui possède une activité antitumorale par altération de l'ADN et par une action antiangiogénique.[24] Ce schéma thérapeutique possède une bonne tolérance avec une toxicité acceptable (hématologique essentiellement). Le bénéfice de ce nouveau standard est principalement observé pour les tumeurs présentant une hyperméthylation du promoteur de MGMT.[16, 25] En terme de survie, les résultats de l'étude de phase III de ce nouveau standard thérapeutique montrent une médiane de survie à 14,6 mois contre 12,1 pour la radiothérapie seule après chirurgie.[1]

Pour les tumeurs inopérables, l'essai EORTC-NCIC suggère que cette nouvelle combinaison n'apporte pas clairement de bénéfices. La radiothérapie reste le standard thérapeutique associée ou non à une chimiothérapie. Plusieurs agents thérapeutiques ont fait l'objet d'études cliniques mais sans impact sur la survie.

Plusieurs protocoles de seconde ligne sur des glioblastomes en récurrence sont à l'étude.

1.4.2.2-Les astrocytomes anaplasiques.

Le standard thérapeutique pour ces tumeurs repose sur la chirurgie et la radiothérapie. Bien que plus chimiosensibles que les glioblastomes, le bénéfice d'une chimiothérapie adjuvante n'est pas clairement établi et reste en cours d'essais. Deux schémas de chimiothérapie adjuvante pourraient augmenter la survie globale : il s'agit des nitroso-urée en monothérapie ou du protocole PCV (procarbazine-lomustine-vincristine). Ces deux schémas auraient une efficacité comparable.[1]

Le témozolomide a été évalué dans le traitement des astrocytomes anaplasiques en récurrence, ne montrant pas de différence significative sur le taux de survie sans progression à 6 mois et la survie globale.[26]

1.4.2.3-Les oligodendrogliomes et les oligoastrocytomes anaplasiques.

Le standard thérapeutique repose sur la résection chirurgicale dans un premier temps, puis la radiothérapie et une chimiothérapie par le protocole PCV (procarbazine-lomustine-vincristine). Là aussi, des études ont été réalisées avec le témozolomide, en première ligne ou en seconde ligne à la récurrence : des résultats encourageants sont obtenus surtout lorsque la délétion 1p19q est présente, et sont d'autant plus intéressants qu'il s'agit d'un produit présentant une faible toxicité.[1]

1.5-Conclusion

Le traitement des tumeurs gliales, surtout pour celles de haut grade, reste décevant, malgré le développement des techniques chirurgicales, de la radiothérapie et des chimiothérapies. Leur échec s'explique par le caractère très infiltrant de ces tumeurs, excluant toute exérèse totale, et une relative résistance à la radiothérapie et aux chimiothérapies actuelles.[27]

De nombreuses molécules sont en cours d'étude, avec des approches thérapeutiques différentes, directement issues des recherches fondamentales menées sur ces tumeurs.

Ces nouveaux traitements peuvent schématiquement être divisés entre immunothérapie, thérapie génique, agents anti-angiogéniques et inhibiteurs des voies de la carcinogénèse.

L'autre axe de recherche repose sur la meilleure diffusion des molécules dans le système nerveux central, avec le développement de nouvelles formes galéniques (vectorisation) afin de passer la barrière hémato-encéphalique et d'augmenter la concentration des molécules dans le tissu cérébral.[27, 28]

Actuellement, malgré toutes ces nouvelles approches thérapeutiques, les glioblastomes restent des tumeurs incurables, dont la médiane de survie est médiocre : environ 14 mois pour les glioblastomes opérables traités par témozolomide.

II-Le Bortezomib (VELCADE[®]) et le système ubiquitine-protéasome.

II.1-Le système ubiquitine-protéasome.

Ce système a été décrit en plusieurs étapes avec tout d'abord en 1975, la découverte de l'ubiquitine par Goldstein et *al* [29], puis en 1988, la description du protéasome par Arrigo et *al*. [30] Ce n'est que depuis 4 ou 5 ans que l'importance de ce système dans la régulation cellulaire a été mise en évidence, débouchant ainsi sur une possible cible thérapeutique.

II.1.1-Définition et fonction

La dégradation des protéines au sein des cellules normales se fait par deux mécanismes principaux :

- la voie lysosomale qui assure 10 à 20 % de la protéolyse cellulaire totale, intervenant uniquement dans la dégradation des protéines extracellulaires internalisées après endocytose ou pinocytose (par exemple, les facteurs de coagulation, les immunoglobulines et l'albumine.)
- le système ubiquitine-protéasome qui assure plus de 80 % de la protéolyse cellulaire totale.

Il assure essentiellement la dégradation des protéines intracellulaires telles que par exemple les protéines régulatrices du cycle cellulaire.[31]

Le protéasome est un système multi-enzymatique jouant un rôle majeur dans la protéolyse intracellulaire. Il est indispensable à la vie et la délétion des gènes codant pour ses sous-unités est incompatible avec la vie. Son fonctionnement harmonieux participe au maintien du fonctionnement normal de la cellule.

On parle de système ubiquitine-protéasome, puisque le protéasome ne reconnaît les protéines à dégrader que si celles-ci sont ubiquitinylées.[31]

Localisé tant au niveau du noyau que dans le cytoplasme, ce système est impliqué aussi bien dans l'élimination des protéines anormales ou surnuméraires que dans la transformation de précurseurs en protéines biologiquement actives. Il assure également la destruction organisée et séquentielle de nombreuses protéines régulatrices telles que par exemple les cyclines ou encore les activateurs et inhibiteurs transcriptionnels. De ce fait, il est impliqué dans tous les processus cellulaires majeurs tels que la prolifération, l'apoptose, la différenciation et la réponse aux stimuli extracellulaires.[32]

Il est également impliqué dans la destruction de certaines protéines extracellulaires. Il assure ainsi la dégradation des protéines d'origine exogène et permet la production des peptides antigéniques qui seront présentés par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I, assurant une réponse immune spécifique.[33] (photo n°2)

II.1.2-Structure du protéasome

Le protéasome 26S est constitué de deux unités régulatrices de masse moléculaire 19S et d'une unité catalytique de masse moléculaire 20S.

Chaque unité catalytique 20S est constituée de l'empilement de quatre anneaux, identiques deux à deux : deux anneaux alpha et de deux anneaux bêta, définissant une cavité interne. Chaque anneau est constitué de 7 sous unités.

Les anneaux alpha permettent la fixation des unités régulatrices 19S. De plus, leur extrémité NH₂-terminale obstrue à l'état basal les orifices d'entrée de la chambre catalytique et protègent les protéines d'une dégradation incontrôlée.

Les anneaux bêta possèdent une activité catalytique avec trois variétés enzymatiques : une activité trypsine-like qui permet la séparation des acides aminés hydrophobes, une activité PGPH (post-glutamyl peptide hydrolysing) qui dissocie les acides aminés acides et une activité chymotrypsine-like qui agit sur les acides aminés basiques. Les sites actifs présentent tous la particularité d'attaquer leurs substrats par un résidu thréonine amino-terminal.[34]

Chacune des unités régulatrices 19S est composée de 18 sous unités. Par leur fixation sur l'unité catalytique 20S, elles permettent son activation en ouvrant les anneaux alpha, elles assurent la reconnaissance de la chaîne d'ubiquitine, elles dénaturent la protéine cible et recyclent les molécules d'ubiquitine et enfin, elles injectent la protéine cible au niveau du protéasome 20S.

II.1.3-Mécanisme d'action

La première étape de la protéolyse par le protéasome se fait en règle par la fixation sur la protéine à dégrader d'une chaîne de poly-ubiquitine, véritable système de reconnaissance pour le protéasome.[32] Cependant, une fraction des protéines ne nécessiterait pas d'être ubiquitinylée pour être détruite par le protéasome. Les mécanismes et les éléments régulateurs de cette voie de dégradation restent à préciser.[35]

La deuxième étape est l'hydrolyse de la protéine par le protéasome.

II.1.3.1-Ubiquitinylation

L'ubiquitine est une protéine cytosolique de 76 acides aminés, décrite pour la première fois en 1975 par *Goldstein et al* dans le thymus de bœuf. Elle a ensuite été mise en évidence dans des cellules d'origine diverse, que ce soit chez les mammifères ou chez les végétaux, constituant ainsi une composante cellulaire universelle, d'où le nom d'ubiquitine qui lui a été attribué. Ce n'est que quelques années plus tard que son intervention obligatoire dans le processus de dégradation protéasomique par la reconnaissance de la protéine à dégrader a été mise en évidence par *Ciaechanover et Herchko*. [36]

Cette opération se déroule en quatre étapes :

- Activation de l'ubiquitine (enzyme d'activation ou E1).
- Conjugaison de l'ubiquitine activée (enzyme de conjugaison ou E2).
- Fixation de l'ubiquitine sur la protéine cible (ubiquitine-ligase ou E3).
- Elongation de la chaîne d'ubiquitine (E4).

L'ubiquitinylation nécessite de l'énergie sous forme d'ATP. [31]

II.1.3.2-Dégradation de la protéine par le protéasome.

Une fois ubiquitinylée, la protéine est reconnue par un des complexes régulateurs 19S qui la dénature et l'injecte dans la chambre catalytique du protéasome 20S. Elle est ensuite progressivement clivée puis dégradée sous forme de peptides de 3 à 22 acides aminés, qui peuvent subir un clivage ultérieur par d'autres protéases cytoplasmiques. L'ubiquitine est recyclée.

Figure II : Structure moléculaire du protéasome.

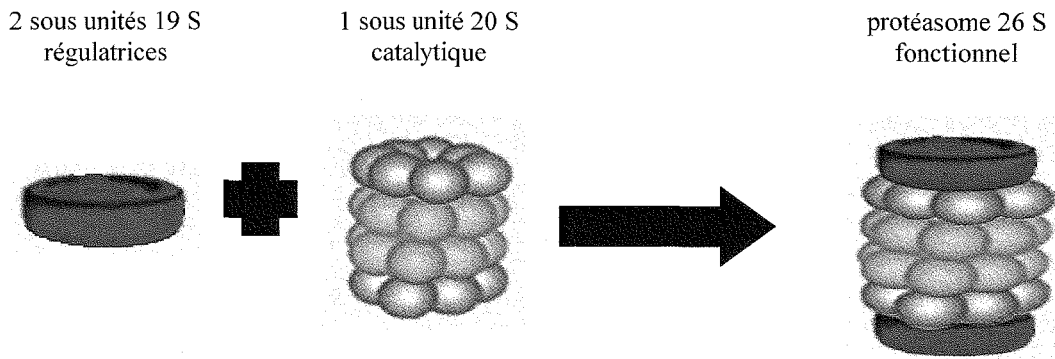


Figure III : Architecture des sous unités bêta constituant le protéasome.

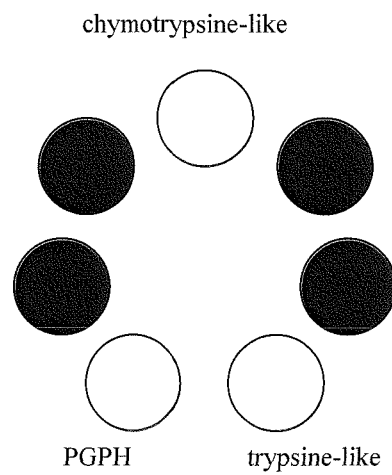
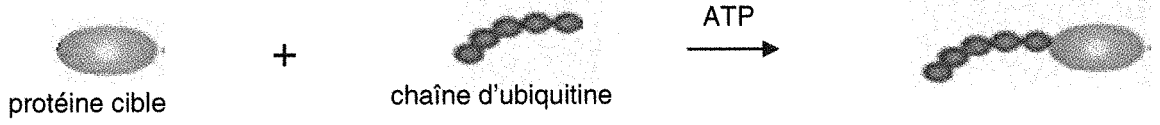
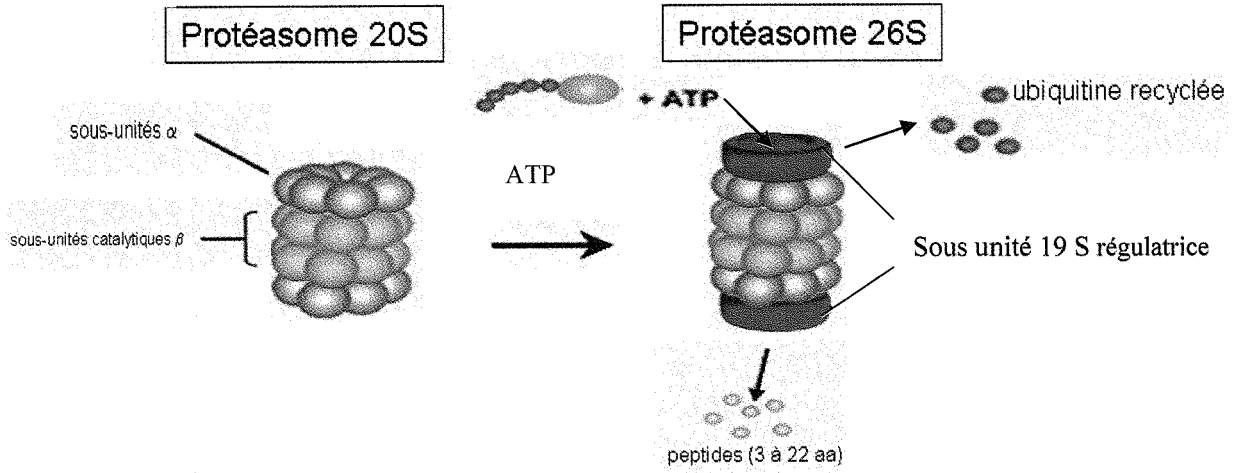


Figure IV : Etapes du fonctionnement de la protéolyse protéasomique.

ETAPE I



ETAPE II



II.1.4-Implication du système ubiquitine-protéasome en pathologie humaine.

La dégradation des protéines intracellulaires est un processus indispensable au maintien de l'homéostasie cellulaire. Le système ubiquitine-protéasome fait partie intégrante de toutes les cascades de signalisation intracellulaire, il n'est donc pas étonnant de constater une altération de la dégradation protéasomique dans de nombreuses maladies telles que les cancers, les maladies neurodégénératives (maladies d'Alzheimer et de Parkinson) et les désordres métaboliques (mucoviscidose, maladie de Wilson).[37]

Pour les syndromes neurologiques et les maladies métaboliques, la principale perturbation observée est le défaut de dégradation de la ou des protéines responsables des troubles cliniques, soit à cause d'une anomalie de la protéine qui n'est pas reconnue par le système de dégradation, soit à cause d'un mauvais fonctionnement du système ubiquitine-protéasome.

A l'inverse, dans le cas du cancer, le système ubiquitine-protéasome participe, par une protéolyse accélérée, à l'emballage du cycle cellulaire et à la prolifération anarchique des cellules tumorales. Là aussi, les facteurs supresseurs de tumeurs seraient trop dégradés.

Par exemple, il a été démontré dans de nombreuses tumeurs telles que les gliomes ou les sarcomes, une diminution de la protéine p53 est retrouvée, essentiellement due à une surexpression de MDM2, qui, par l'intermédiaire de l'ubiquitine-ligase E3, induit une ubiquitinylation et donc une dégradation exagérée de p53.[31, 38]

Dans le cadre des glioblastomes, il est démontré que dans environ 40% des tumeurs, l'EGFR est muté et n'est pas reconnu par le système de dégradation cellulaire. Il s'accumule et une faible proportion de cellules subit une activation permanente de ses récepteurs[38]. Dans la plupart des cas, c'est une anomalie de l'ubiquitinylation qui est à l'origine du trouble de la dégradation des protéines.

Certaines études ont cependant démontré un taux d'unité catalytique 20S plasmatique (plus) élevé dans certaines maladies cancéreuses telles que la leucémie myéloïde aigue, la maladie de Hodgkin, les syndromes myélo prolifératifs chroniques et quelques tumeurs solides.[39]

Cependant, il n'est pas sûr que toutes les unités protéasomiques soient actives.

D'autres auteurs ont démontré que le niveau d'activité du protéasome est nettement plus élevé dans les cellules tumorales que dans leurs homologues cellulaires bien différenciés, c'est le cas pour le tissu prostatique.[40]

C'est dans le domaine de la cancérologie que les recherches sont actuellement les plus avancées, le système ubiquitine-protéasome constituant une cible prometteuse.

II.2-Le bortezomib.

Le bortezomib est une molécule cytotoxique, qui agit par inhibition transitoire du protéasome. C'est le seul inhibiteur du protéasome actuellement commercialisé.

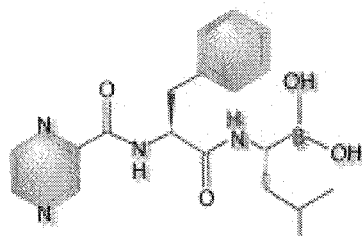
II.2.1-Généralités.

Le protéasome faisant partie intégrante de la machinerie cellulaire et participant au développement tumoral, la recherche s'est naturellement tournée vers la synthèse d'inhibiteurs de l'activité protéolytique du protéasome.[40]

Plusieurs séries de molécules ont été étudiées : les dérivés naturels (lactacystine, époxomicine, macrolides) et les dérivés synthétiques (aldéhydes peptidiques, amides, dérivés de l'acide boronique).

Les inhibiteurs irréversibles de l'activité protéolytique du protéasome sont des produits excessivement toxiques et incompatibles avec la vie. Les molécules utilisables en vue d'une administration chez l'Homme sont les inhibiteurs réversibles du protéasome.

Le produit le plus développé actuellement est un dérivé peptidique de l'acide boronique, le **bortezomib**, commercialisé sous le nom Velcade®. Cette molécule inhibe transitoirement l'activité chymotrypsine-like de l'anneau béta de l'unité catalytique 20S du protéasome.



II.2.2-Pharmacocinétique.

L'administration du traitement se fait par voie intra-veineuse. Le bortezomib est rapidement et largement distribué, sauf au niveau des yeux, du testicule et du système nerveux central lorsque la barrière hémato-tissulaire est intacte.

L'activité normal protéasomique est restaurée 2 à 3 jours après l'administration du bortezomib.[41]

II.2.3-Toxicité.

Les principaux effets indésirables observés chez l'Homme sont : l'asthénie, les nausées, les diarrhées, la thrombopénie et les neuropathies périphériques.

II.2.4-Efficacité préclinique.

Une première étude réalisée par l'Institut National du Cancer Américain (NCI) a montré que le bortezomib exerçait une action cytotoxique sur plus de 60 lignées de cellules tumorales humaines *in vitro*.[40] De nombreuses études précliniques *in vitro* ou *in vivo* sur des modèles de xéno greffes tumorales humaines ont été réalisées. Elles ont confirmé le large spectre d'activité cytotoxique du bortezomib[40]. Il a également été démontré que le bortezomib est capable de potentialiser l'effet antitumoral d'autres agents anticancéreux tels que la chimiothérapie ou la radiothérapie.[42, 43]

L'activité antitumorale du bortezomib est aujourd'hui attribuée principalement à sa capacité d'induire l'apoptose des cellules tumorales, avec une activation des voies pro-apoptotiques (relargage du cytochrome c et activation de la caspase 8). [44]

Etant donné la multiplicité des substrats du protéasome, il n'est pas étonnant que l'inhibition des fonctions protéolytiques du protéasome affecte de multiples voies de signalisation intracellulaire. Les mécanismes par lesquels le bortezomib induit ses effets restent donc mal définis. Ces mécanismes sont très divers et variables en fonction des lignées cellulaires étudiées.[41] Les cibles moléculaires les plus fréquemment évoquées sont NF-kappaB, p53, p21, et p27 ainsi que les voies de signalisation dépendant des MAPkinases. Ces différentes cibles sont résumées dans le tableau II.

Une seule étude a été publiée concernant les effets antitumoraux du bortezomib sur des lignées cellulaires de glioblastome.[45] Celle-ci met en évidence un arrêt de la prolifération

cellulaire et une induction de l'apoptose. Au niveau moléculaire, une augmentation de l'expression de p21, de p27 et de la cycline B1 est retrouvée, associée à une diminution de l'expression de CDK2, CDK4 et E2F4, ce qui induit un arrêt du cycle cellulaire. L'effet pro-apoptotique a également été mis en évidence (induction de l'apoptose pour 35 à 40 % des cellules tumorales), associé à une diminution de l'expression de Bcl-2 et de Bcl-x1, du taux de NF-kappaB et une augmentation du taux de TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) et de TNF alpha (tumor necrosis factor alpha).

Tableau II : Principales cibles moléculaires du bortezomib et participation à l'effet antitumoral[41]

Cibles	Conséquences de L'inhibition du protéasome	Contribution à l'effet antitumoral
NF-kappaB	Pas de translocation nucléaire de NF-kappaB	Diminution de la transcription des gènes dépendant de NF-kappaB impliqués dans la survie des cellules tumorales, la prolifération, l'invasion, la formation de métastases et l'angiogénèse.
P21 et p 27	Accumulation de p21 et de p27	Induction d'arrêt en G1/S et G2/M
p44/p42 MAPK	Inactivation de p44/p42	Diminution de la prolifération cellulaire et des signaux de survie.
p53	Accumulation de p53	Augmentation des inhibiteurs du cycle (p21) et des facteurs pro-apoptotiques.
Bax	Accumulation de Bax	Augmentation de la libération de cytochrome c par les mitochondries et induction d'apoptose.

II.2.5-Efficacité clinique.

Les essais cliniques de phase I et II ont rapporté la tolérance et l'efficacité antitumorale du bortezomib chez l'Homme et ont amené la FDA (Food and Drug Administration) à accorder à ce produit une autorisation de mise sur le marché (AMM) accélérée pour le traitement du myélome multiple en progression après deux lignes de chimiothérapie. Une extension de

l'AMM a été apportée en septembre 2005 pour le traitement du myélome après la première récurrence, en association avec la dexaméthasone

Dans une grande étude de phase II portant sur des malades porteurs d'un myélome multiple en progression après plusieurs lignes de chimiothérapie, une réponse dans 35% des cas a été observée dont environ 10% de réponse très importante voire complète. La durée moyenne de réponse a été de 12 mois. De plus la toxicité était minime.[41]

De nombreux essais sont en cours concernant le cancer du sein, le cancer de la prostate, le cancer du poumon, les lymphomes (notamment lymphome du manteau)

Plusieurs études tentent également d'évaluer l'intérêt d'association à d'autres agents anticancéreux tels que la chimiothérapie (irinotécan, gemcitabine, taxanes, sels de platine, doxorubicine) ou la radiothérapie.[41]

III-La mort cellulaire en pathologie tumorale.

Les mécanismes impliqués dans la mort cellulaire, spontanée ou induite par la thérapeutique en pathologie tumorale sont multiples. Compte tenu des connaissances acquises sur le mode d'action du bortezomib, nous nous intéresserons dans notre travail principalement à l'apoptose.

III.1-L'apoptose.

III.1.1-Définition.

En 1971, J.F.R Kerr [46], un pathologiste expérimentateur britannique, étudiant les conséquences sur le parenchyme hépatique de la ligature des branches de la veine porte, constata que dans ces circonstances, il n'est pas observé de mort cellulaire massive. Dans ce cas, en effet, la souffrance cellulaire s'exprime sous la forme de la mort de cellules isolées et disséminées. Cette mort cellulaire se caractérise par la condensation et la compaction de la chromatine et une fragmentation cellulaire. Les cellules qui meurent par apoptose implorent plutôt que d'exploser comme dans la nécrose. Kerr qualifia ce phénomène de « mort par rétraction ». Une année plus tard, Kerr , A.H. Currie et A.R. Willie proposèrent pour cette variété de mort cellulaire un nom plus porteur : apoptose, terme qui évoque la chute des feuilles, une allusion au fait que dans ce processus les cellules meurent isolement tout comme les feuilles tombent une par une en automne.[47]

L'apoptose est une variété de mort cellulaire programmée, une sorte de suicide ou d'autosacrifice qui met en jeu un ensemble de gènes spécifiques dont l'existence n'a été révélée qu'au cours des années 1980. Il existe, en effet, dans chaque cellule vivante, un programme génétique de mort qui, s'il est mis en oeuvre, entraîne sa disparition dans la plus grande discrétion.[47] Sa mise en œuvre peut être programmée dans le temps, notamment au cours de l'ontogénèse pour éliminer des populations cellulaires excédentaires, ou induite par des signaux extérieurs. Toutes les morts cellulaires programmées, cependant, ne présentent pas les critères morphologiques de l'apoptose. Il en va ainsi, par exemple de celle des kératinocytes au cours de la maturation de l'épiderme (photo 4a) et des chondrocytes du cartilage hypertrophique lors de l'ossification enchondrale diaphysaire (photo n°4b). *Clark*

reconnaît deux modalités supplémentaires de mort cellulaire programmée : l'autophagie et la mort cellulaire cytoplasmique.[48, 49] Pour certains auteurs, la morphologie cellulaire varierait avec le stimulus inducteur.[50] Les notions de mort cellulaire programmée et d'apoptose ne sont donc pas superposables.[48]

Un nouveau pas a été franchi avec la découverte de la cascade des gènes mis en oeuvre dans l'apoptose d'abord chez *Caenorhabditis elegans* un petit ver transparent qui avait fait son apparition sur les paillasses de quelques laboratoires grâce au non conformisme et au génie créatif d'un chercheur anglais Sydney Brenner dans les années 1960-70 puis chez les mammifères.[47] Les voies de régulations protectrices et activatrices des molécules qui participent à la destruction cellulaire impliquées dans l'apoptose ont été disséquées.

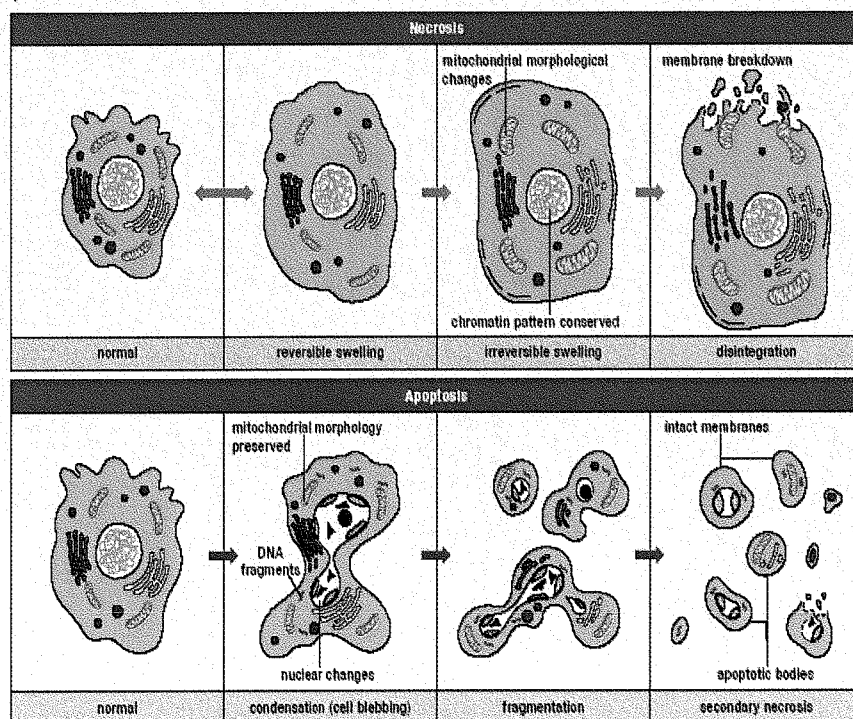
III.1.2-Manifestations du processus apoptotique.

La mort apoptotique est constituée d'un ensemble de processus de digestion interne affectant d'abord le cytoplasme puis le noyau. La dégradation du cytosquelette fait perdre à la cellule sa polarité, la détache de ses voisines, l'arrondit et diminue son volume. De nombreuses protubérances apparaissent à sa surface. La polarité phospholipidique de la membrane cellulaire est perdue, avec passage de la phosphatidylsérine du feuillet interne au feuillet externe. A un stade ultérieur, irréversible, le noyau est également atteint. Il se condense et devient pycnotique en particulier du fait de la dégradation des lamines, protéines de la face interne de l'enveloppe nucléaire. L'ADN est attaqué par diverses endonucléases, générant, selon les cellules, de grands fragments d'ADN ou des multiples des unités nucléosomiques (fragments d'ADN de 180 paires de bases enroulées autour de protéines histones et non histones). Le point important est que, lors de l'apoptose, la membrane cellulaire reste intacte. Le phénomène se signale, par l'exposition de lipides et de sucres normalement situés à la face interne, à l'attention des phagocytes ou de cellules épithéliales de voisinage qui endocytent avec une efficacité remarquable soit la cellule entière soit des fragments de celle-ci. L'intégrité membranaire, la rapidité de l'élimination cellulaire font que l'apoptose, même massive, n'induit aucune inflammation contrairement à ce qui peut se produire dans un phénomène nécrotique, où les différents compartiments cellulaires se rompant, déversent leur contenu enzymatique au sein même des tissus. [51, 52]

Tableau III : Résumé des modifications morphologiques de la cellule au cours du processus apoptotique [53].

CONSTITUANTS CELLULAIRES	MODIFICATIONS MORPHOLOGIQUES
Noyau	Condensation, désintégration.
Structure et forme cellulaire	Détachement, désassemblage en corps apoptoptiques.
Mitochondries	Gonflement ? Condensation ?
Réticulum endoplasmique	Dilatation.
Hyaloplasme	Vacuolisation.
Membrane Plasmique	Perte des microvilli ; formation de blebs.

Figure V : Différences morphologiques entre apoptose et nécrose.[54]



III.1.3-La machinerie apoptotique.

Le processus apoptotique peut être modélisé en 3 étapes : la signalisation qui peut se faire par des voies afférentes à la cellule très diverses, la régulation ou phase de décision intégrant des mécanismes pro et anti apoptotiques, enfin, la dégradation ou phase d'exécution commune à toutes les formes d'apoptose.[59]

III.1.3.1-La signalisation

Il existe de multiples voies d'initialisation de l'apoptose. Celle-ci peut survenir du fait du retrait d'un signal de survie tel que le tarissement d'une hormone, d'un facteur de croissance ou la rupture d'un contact intercellulaire. L'apoptose peut également être déclenchée par un très grand nombre de stimuli comme la sollicitation de récepteurs membranaires (Fas, TNF-R) ou nucléaires (glucocorticoïdes) ou l'exposition à des stress divers (radiations ionisantes, hypoxie, hyperthermie, xénobiotiques comme les agents anticancéreux).[55]

III.1.3.2-La régulation.

Les cellules d'un tissu ne sont pas également sensibles à un agent apoptogène mais différent selon l'ensemble des signaux issus de leur environnement qu'elles intègrent afin de décider entre les deux options de vie et de mort. Par exemple, les lymphocytes au repos non stimulés par un antigène sont très résistants à l'égard de l'apoptose alors qu'ils deviennent sensibles après quelques jours d'activation, permettant ainsi la terminaison d'une réponse immune. Les cellules cancéreuses sont d'emblée ou secondairement résistantes à l'effet apoptotique des nombreux médicaments anticancéreux utilisés pour les détruire.

Un organe joue un rôle central dans cette régulation, la mitochondrie. Cette dernière peut, en effet, ouvrir dans sa membrane interne des mégacanaux laissant échapper des petites molécules et dissipant le potentiel de membrane que crée l'expulsion permanente de protons hors de la matrice mitochondriale, d'où l'arrêt de la synthèse d'ATP. De nombreux mécanismes semblent pouvoir provoquer l'ouverture de ces canaux comme l'hypoxie, l'absence d'un facteur de croissance, une attaque de la chaîne respiratoire par des radicaux oxygénés comme NO.[47]

L'accroissement de perméabilité de la membrane interne permet l'entrée d'eau dans le stroma mitochondrial, hyperosmotique, entraînant le gonflement de la mitochondrie et une altération de la membrane externe suffisante pour libérer des produits de l'espace intermembranaire.

Sont libérés ainsi au moins deux produits apoptotiques : le cytochrome c (transporteur d'électron soluble, faisant la navette entre les complexes membranaires CoQ-cytochrome c réductase et cytochrome c oxydase) et l'AIF (Apoptosis Inducing Factor). Si le mode d'action de ce dernier qui agit sur les noyaux n'est pas connu, on connaît par contre celui du cytochrome c. En se liant à une protéine cytoplasmique, APAF-1 (Apoptotic Protease Activating Factor), le complexe peut activer une protéase, la caspase-9 qui active à son tour la caspase-3, l'une des protéases effectrices majeures de l'apoptose. Physiologiquement ces mégacanaux sont étroitement régulés, en particulier par des molécules de la famille Bcl2. Cette grande famille est composée de molécules à effets antiapoptotiques comme Bcl2 et Bcl-xL et proapoptotiques tels que Bax et Bad. Bcl2 et Bcl-xL sont des protéines membranaires du réticulum endoplasmique, du noyau et de la membrane externe mitochondriale. Les autres protéines sont solubles dans le cytoplasme.[47, 56, 57]

Ces molécules peuvent se dimériser en homodimères ou hétérodimères, par exemple Bcl2-Bax. Tant que prédominent dans la cellule les homodimères anti apoptotiques ou les hétérodimères contenant un membre antiapoptotique, le résultat net est la résistance à l'apoptose. Au contraire, si les dimères, par exemple Bax-Bax sont prédominants, la voie apoptotique est ouverte.[47]

On pense que les protéines membranaires comme Bcl2 et Bcl-xL inhibent l'apoptose en contrôlant d'une part l'ouverture des mégacanaux et la fuite des produits tels que le cytochrome c, d'autre part, lorsque celle-ci se produit, en piégeant le complexe APAF-1/Caspase-9 sur la paroi mitochondriale, empêchant l'activation de la protéase.[47, 55]

III.1.3.3-La dégradation.

La protéolyse des divers substrats cellulaires (filaments d'actine du cytosquelette, lamines), de nombreuses enzymes indispensables à l'intégrité cellulaire (par exemple, PARP, poly ADP ribose polymérase), de protéines régulatrices comme Bcl2, ainsi que la protéolyse limitée conduisant à l'activation par exemple d'endonucléases (CAD, caspase activated Dnase), paraît être sous le contrôle sinon exclusif du moins prédominant d'une classe particulière de protéases, les caspases.[55, 58, 59] Il s'agit d'enzymes dont le site catalytique contient une

séquence conservée avec une cystéine et coupant la chaîne peptidique au niveau d'un résidu aspartate.[58, 60]

Elles existent sous forme de proenzymes et nécessitent une maturation sous forme d'une coupure catalytique libérant 2 sous unités qui s'associent en 1 hétérodimère, l'enzyme active finale étant formée par l'association de 2 dimères.[55, 60]

De part leur structure, il existe en fait 2 catégories de caspases [60, 61]:

- les Caspases initiatrices, comme les caspases-2, 8 et 10 qui possèdent l'aptitude de se lier à des protéines cytoplasmiques et se lient elles-mêmes à la queue intracytoplasmique de récepteurs membranaires. Ces protéines qui placent les caspases à proximité l'une de l'autre, facilitent leur dimérisation et donc leur autoactivation.

- les Caspases effectrices, comme la caspase-3 qui sont directement ou indirectement responsables des lésions cellulaires. Elles sont obligatoirement activées par les précédentes. La cascade d'activation des caspases est inhibée par l'aptitude de certaines d'entre elles à se lier aux protéines Bcl2 ou Bcl-xL.

Figure VI : Principales voies initiatrices et effectrices du processus apoptotique.

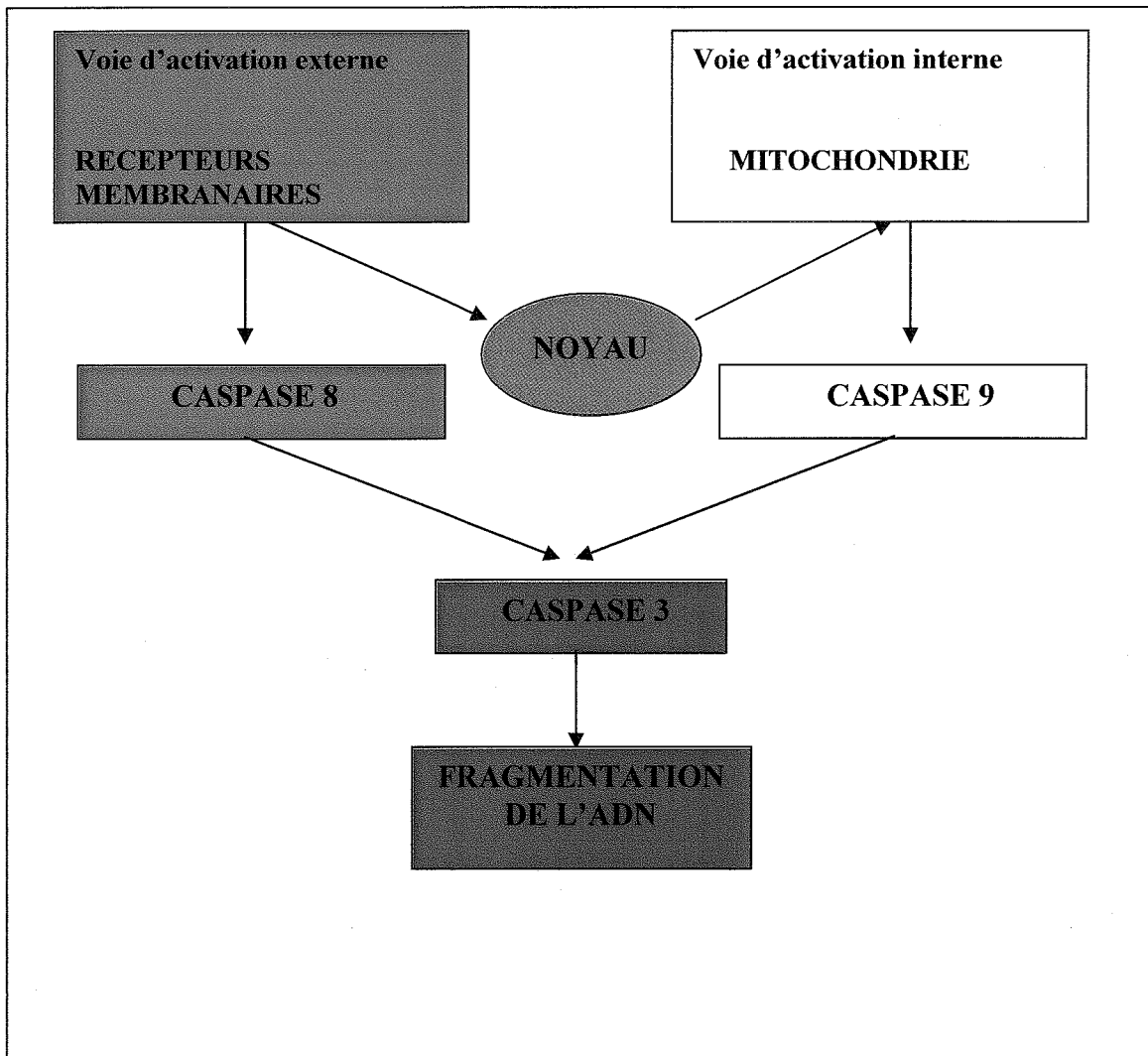
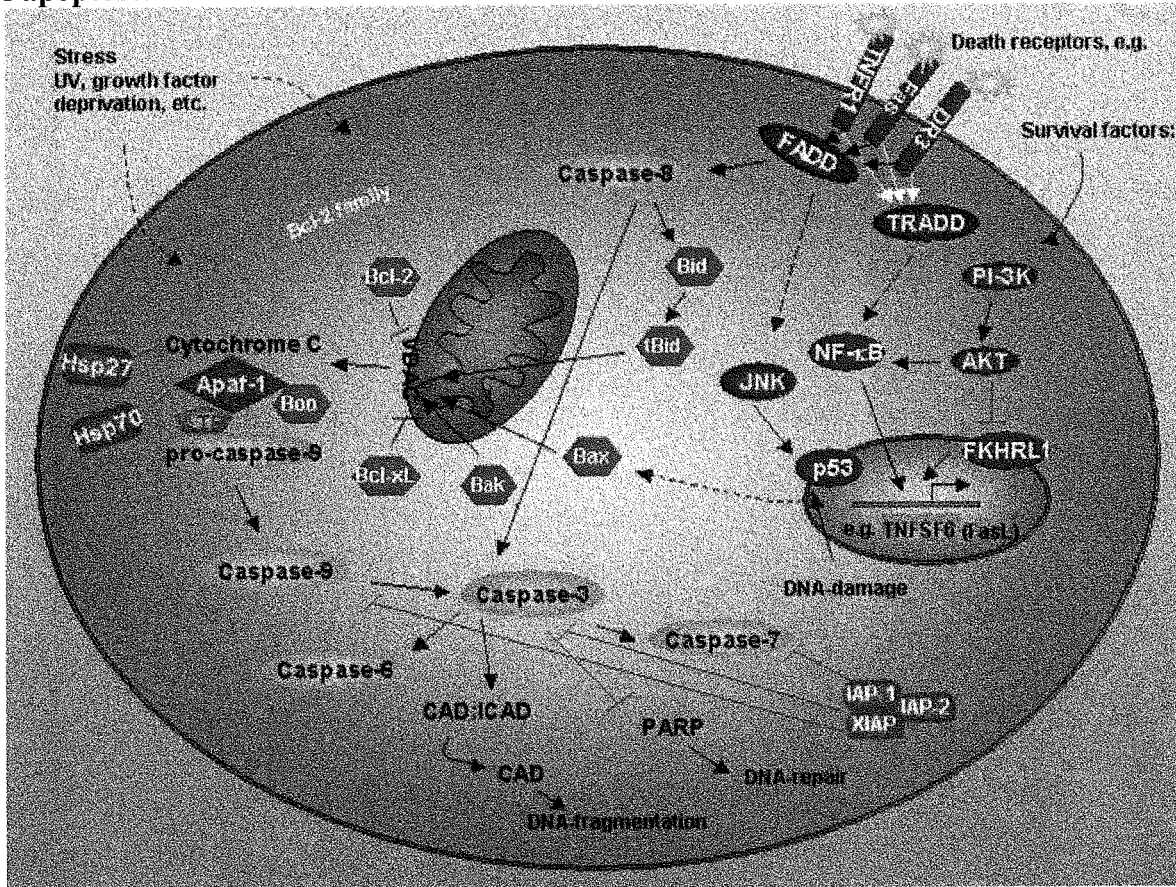


Figure VII : Ensemble des voies initiatrices et effectrices du signal de transduction de l'apoptose.



III.1.4-Implication de l'apoptose en cancérologie.

Certaines mutations permettent à la cellule de résister à la mort cellulaire et par la même leur fournit un avantage de croissance sélectif.[59] Pour croître les cellules tumorales doivent en effet résister aux signaux de mort induits par la dérégulation des oncogènes et par les modifications du micro environnement (insuffisance des apports en oxygène et en nutriment par exemple). L'étude du gène anti apoptotique BCL2 et du gène suppresseur de tumeur TP 53 souligne l'importance pour la cellule tumorale de court circuiter l'apoptose.[59] Il est aujourd'hui démontré que dans les lymphomes folliculaires, l'activité oncogénique de BCL2 dépend de son activité anti apoptotique.[62] La surexpression de BCL2 induit également une lymphomagénèse Myc-dépendante *in vitro*. [63] Le gène suppresseur de tumeur TP53 est un important gène de régulation de l'apoptose. Quand TP 53 fonctionne normalement, les stress génotoxiques à l'origine de lésions de l'ADN irréversibles induisent l'apoptose par une voie p53 dépendante. Au cours des cancers d'autres stress tels que les déficits en facteur de croissance, l'hypoxie ou la dérégulation d'oncogène mitogène peuvent induire une apoptose par l'intermédiaire de p53 *in vitro*. [59, 64]

Les études tant cliniques que fondamentales ont clairement établi que la plupart des agents anticancéreux sont inducteurs d'apoptose.[65] Et que l'inhibition des programmes pro apoptotiques peut réduire la susceptibilité des cellules tumorales aux traitements anticancéreux.[66] Cependant la susceptibilité des cellules tumorales isolées en culture n'est pas toujours corrélée à la réponse tumorale en clinique. C'est ainsi par exemple que les mutations de TP53 ne sont pas toujours associées à une réduction de la toxicité des agents anticancéreux et la perte de p53 peut même augmenter la mort cellulaire dans certaines conditions. [67-69] De même la surexpression de BCL2 n'augmente pas la résistance à la radiothérapie dans tous les contextes.[70] La proportion de cellules qui meurent en apoptose après irradiation, est très variable selon le type cellulaire. Ainsi l'apoptose radio-induite est fréquemment observée dans les cellules et tissus pour lesquels l'apoptose a un rôle physiologique important, exemple : les cellules embryonnaires, les précurseurs hématopoïétiques, les cellules cryptiques jéjunales, les lymphocytes et les cellules germinales des deux sexes. A l'inverse, pour le fibroblaste, l'épithélium cutané ou l'hépatocyte, l'apoptose radio-induite est rare et difficile à détecter, même après une irradiation à haute dose. De plus, sa fréquence n'augmente pas sensiblement avec le débit de dose .

Enfin, plusieurs auteurs ont tenté d'évaluer la signification pronostique et le caractère prédictif de la réponse au traitement des variations de l'indice apoptotique. Les résultats de ces études sont variables d'une étude à l'autre et avec le type histogénétique tumoral, le grade et la localisation de la tumeur.[71]

Tableau IV : Indices apoptotiques et survie dans les cancers.[71]

Pronostic non associé à un indice apoptotique élevé.	Mauvais pronostic associé à un indice apoptotique élevé.	Mauvais pronostic associé à un faible indice apoptotique.
<ul style="list-style-type: none"> - Carcinomes bronchiques non à petites cellules. (2 études) - Carcinomes bronchiques à petites cellules. - Adénocarcinomes gastriques. - Adénocarcinomes thyroïdiens. - Carcinomes hépatocellulaires. 	<ul style="list-style-type: none"> - Adénocarcinomes mammaires. - Carcinomes bronchiques non à petites cellules. (1 étude) 	<ul style="list-style-type: none"> - Adénocarcinomes coliques.

III.1.5-Méthodes de détection de l'apoptose.

Dans notre travail nous nous sommes intéressés principalement aux méthodes de détection de l'apoptose

Elles sont nombreuses, et nous ne citerons que les principales.

III.1.5.1-Méthodes basées sur la reconnaissance d'altérations de la forme cellulaire.

En dépit d'importants progrès dans la compréhension des mécanismes biochimiques impliqués dans la régulation et la médiation de l'apoptose, la définition de cette dernière demeure aujourd'hui encore morphologique. Pleinement développées, les modifications nucléaires et cytoplasmiques, décrites précédemment, peuvent être aisément observées sur coupes tissulaires ou en culture cellulaire par un examen simple en microscopie optique en lumière blanche après réalisation d'une coloration « ordinaire » comme l'hématoxyline éosine safran (coupes tissulaires), ou le May Grunwald Giemsa (cytologie) et ou en fluorescence après coloration de l'ADN (DAPI).[72, 73] La reconnaissance des cellules apoptotiques peut être moins aisée à un stade précoce du processus de mort cellulaire, lorsque les plans de coupe

ne sont pas optimaux et après fixation tissulaire imparfaite. Ces difficultés d'analyse sont tout particulièrement rencontrées dans les populations de cellules dont les noyaux sont, à l'état physiologique, condensés comme les lymphocytes non activés et les oligodendrocytes.[72] Les altérations morphologiques sont plus aisément et spécifiquement reconnues lorsque l'examen est réalisé en microscopie électronique (photo n° 2). Cette dernière méthode est chronophage, coûteuse et nécessite l'examen d'un très grand nombre d'échantillons pour s'assurer de la représentativité de l'analyse.[53, 74]

III.1.5.2-Méthodes basées sur la fragmentation de l'ADN.

III.1.5.2.1-L'électrophorèse de l'ADN.

L'électrophorèse de l'ADN permet la mise en évidence des fragments d'ADN de tailles variables (échelles).[52] En effet comme nous l'avons vu précédemment, les endonucléases fragmentent l'ADN au niveau de sites localisés entre les unités nucléosomales, générant des fragments d'ADN caractéristiques de l'apoptose de bas poids moléculaire, mono- (180 bp) ou oligonucléosomaux (multiples de 180 bp). Ces « échelles » d'ADN se répartissent dans toute la cellule étant donné la fragmentation de l'enveloppe nucléaire. A l'état normal, l'ADN se trouve uniquement dans le noyau sous forme de fragment de haut poids moléculaire.[74]

Cette technique est difficilement quantifiable et surtout le processus apoptotique doit concerner au minimum 5% des cellules totales pour pouvoir être détecté.[74] De plus, dans quelques cas, certaines cellules en apoptose ne génèrent que des fragments d'ADN de masse moléculaire élevée, détectables seulement par électrophorèse en champs pulsé, et sont donc considérées à tort comme non apoptotiques.[75]

Des techniques complémentaires doivent être utilisées.

III.1.5.2.2-Les techniques TUNEL et ISEL.

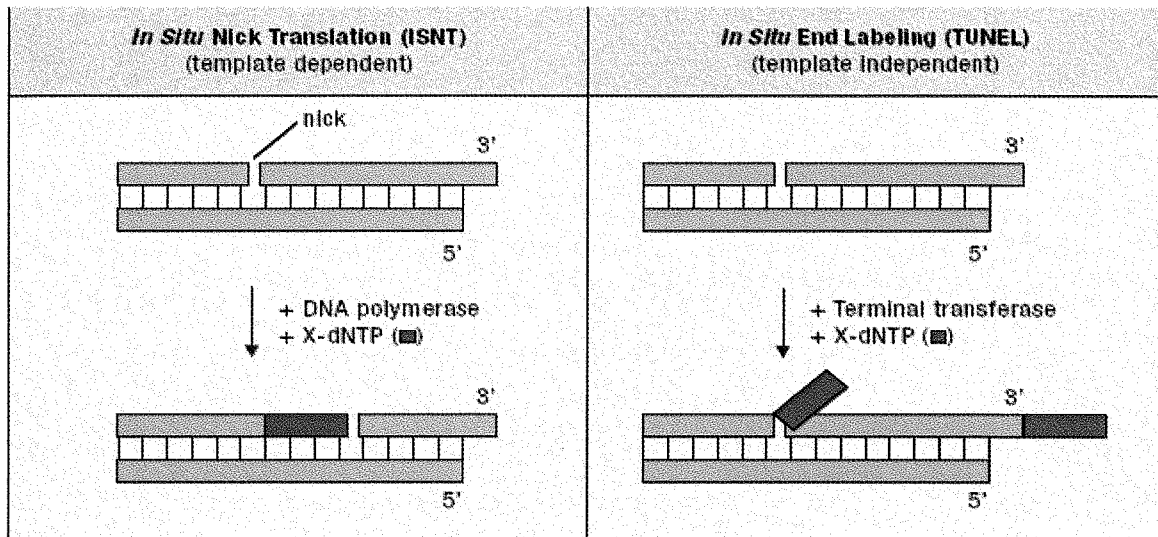
L'ADN des cellules apoptotique est fragmenté. Il est donc possible d'ajouter des désoxynucléotides sur les fonctions alcool 3'OH terminales libres à l'aide de l'enzyme transférase terminale (TdT) qui catalyse préférentiellement l'addition sur les extrémités 3' OH sortantes (Figure IX). La composition du milieu réactionnel est choisie de telle sorte qu'un des désoxynucléotides soit porteur d'une molécule traceuse. Cette dernière est le plus souvent la biotine ou de la digoxigénine. Les sites d'incorporation de ces molécules traceuses sont

alors détectés par méthodes immunohisto (cyto) chimiques. Cette méthode porte le nom de TUNEL pour TdT (Terminal déoxynucléodityl Transférase) médiated dUTP-biotin Nick End Labelling.[76, 77]

Il est également possible d'utiliser la DNA polymérase I d'Escherichia Coli pour incorporer dans l'ADN des cellules en voie d'apoptose des désoxynucléotides dont l'un est porteur d'une molécule traceuse pouvant être détectée dans un deuxième temps par méthode immunohisto chimique. Dans cette technique, au niveau des cassures de l'ADN, l'enzyme détruit le DNA par son activité exonucléasique qui s'exerce de 5' en 3' et le resynthétise par son activité polymérasique. Cette technique porte le nom d'ISNT pour In Situ Nick Translation technic.[77]

En pratique, de façon à faciliter l'accès des polymérase à l'ADN cible, les cellules ou les coupes tissulaires sont dans un premier temps soumis à un traitement protéolytique à l'aide d'une enzyme n'ayant pas d'activité nucléasique, le plus souvent la protéinase K. Les réactions de polymérisation sont ensuite réalisées. Enfin, après élimination des nucléotides non incorporés par un lavage, les sites d'incorporation de la molécule traceuse sont détectés par méthode immunohisto chimique.

La sensibilité de ces méthodes est bonne mais leur reproductibilité et leur spécificité plus discutables.[76, 78, 79] Il est clair que le marquage obtenu est très dépendant des conditions de réalisation de la protéolyse d'une part et de polymérisation de l'ADN d'autre part. Il est donc nécessaire de prendre de grandes précautions pour assurer la reproductibilité de la technique. Par ailleurs, des coupures de l'ADN sont observées dans d'autres circonstances que l'apoptose, notamment au cours des nécroses. Pour l'interprétation des signaux, il est donc nécessaire de tenir compte de la morphologie.[76]

Figure VIII : Comparaison des techniques TUNEL et ISEL. [54]

III.1.5.3-La mise en évidence des signaux de transduction.

III.1.5.3.1-Le western blot.

Dans cette technique, les protéines d'un échantillon tissulaire ou d'une culture sont séparées par électrophorèse puis extraites du gel et transférées sur une membrane. La protéine d'intérêt est alors mise en évidence par immunochimie. Des témoins de masse moléculaires techniques dans le même temps permettent, par comparaison, de définir la masse de la protéine détectée. Si des anticorps spécifiques sont à disposition, les formes activées des différentes protéines constituant les voies de transduction du signal [57, 79] peuvent être détectées. La technique n'est que semi quantitative et ne fournit bien entendu pas d'informations topographiques.

III.1.5.3.2-Les techniques immunohistochimiques.

Ces techniques reposent également sur la détection des formes activées de certaines des protéines des voies de transduction impliquées dans l'apoptose. Les antigènes les plus recherchés sont la cytokératine 18 et la caspase-3 activée.[76] La détection de la forme clivée de la PARP est encore peu développée mais semble être une approche prometteuse.[80]

- La caspase-3 est une caspase effectrice, jouant un rôle central dans la transduction du signal lors de l'apoptose. Son activation par les voies intrinsèques et/ou extrinsèques

du processus apoptotique permet d'une part l'activation de la caspase-6 qui induira les modifications au niveau du cytosquelette et d'autre part le clivage de certaines protéines telle que PARP qui entraîneront la fragmentation de l'ADN.[59]

- La protéine PARP (Poly ADP-Ribose Polymérase) est présente à l'état normal dans le noyau de la cellule et permet la réparation de l'ADN.[81] Lors de l'activation du signal de mort cellulaire, la PARP est clivée soit par la caspase-3 activée, soit par la caspase-7 activée. Une fois clivée, celle-ci est inapte à réparer l'ADN.[80] La PARP clivée active alors d'autres protéines et entraîne la fragmentation de l'ADN par diverses endonucléases.[82]
- La cytokératine 18 est à l'état normal dans la cellule épithéliale le principal composant des filaments intermédiaires. Elle est le substrat de la caspase-6 activée, elle-même clivée par les caspases-3 et 7 activées. Le clivage de la cytokératine lors du processus apoptotique génère un épitope spécifique reconnu par l'anticorps M30 (Mab M30). Cependant cet anticorps ne peut pas être utilisé sur toutes les populations cellulaires, puisque la cytokératine 18 n'est pas exprimée dans tous les tissus.[76]

III.1.5.4-La cytométrie en flux.

Il est maintenant relativement aisé de repérer et quantifier l'apoptose dans une culture cellulaire. La cytométrie en flux, que nous décrirons plus en détail dans la partie matériel et méthodes, a un intérêt pour la quantification des cellules apoptotiques.

Elle permet en effet un comptage précis des cellules sur lesquelles un marqueur s'est préalablement fixé, celui-ci étant secondairement détecté grâce à un signal fluorescent.

Différents marqueurs peuvent être utilisés :

- Le TUNEL.
- L'annexine V.
- L'immunocytochimie, permettant la détection de protéines activées lors du processus apoptotique (caspase-3 activée ou PARP clivé).

Cette technique est cependant plus difficilement applicable à partir d'échantillons tissulaires car elle impose l'isolement habituellement protéolytique des cellules, ce qui influe sur la qualité cytologique du prélèvement.

III.1.5.5-L'annexine V.

Comme nous l'avons vu précédemment, la modification du cytosquelette lors de l'apoptose fait perdre à la cellule la polarité des phospholipides de la membrane plasmique, ce qui entraîne le passage des phosphatidylsérines du feuillet interne au feuillet externe de celle-ci. L'annexine se fixe sur ces phosphatidylsérines avec une grande sélectivité et une grande affinité en présence de calcium.[83]

La détection de l'annexine V couplée à un marqueur, après injection *in vivo*, peut être effectuée, selon le traceur, soit par technique immunohistochimique si l'annexine est biotinylée, soit par fluorescence si l'annexine est directement couplée à un traceur fluorescent.[73] L'utilisation de marqueurs radioactifs (technetium, iode...) est actuellement en cours de développement, la radioactivité pouvant être détectée sur coupe tissulaire par un béta-imageur [84] ou par PET scan *in vivo*. [85, 86]

Dans la mesure où sur les coupes histologiques, il n'est pas possible de distinguer les phosphatidylsérines de la face externe de celles situées au niveau de la face interne, la détection tissulaire implique donc l'administration de l'annexine par voie vasculaire.[72] Le principal problème rencontré étant alors essentiellement la distribution intratumorale de la protéine, qui dépend de la perméabilité des vaisseaux et de la diffusion de la molécule, gênée par les protéines en grand nombre dans la matrice extracellulaire.

Certains auteurs pensent que l'externalisation des phosphatidylsérines ne serait pas un mécanisme spécifique de l'apoptose et pourrait survenir dans des cellules viables.[75, 87]

De plus l'injection d'annexine exogène peut ne pas être sans conséquence au niveau de l'organisme. En effet, cette molécule intervient dans de nombreux processus physiologiques tels que la coagulation sanguine, l'inflammation et la phagocytose. Cependant pour l'instant aucune interférence n'a été mise en évidence.[75]

III.1.5.6-Autres méthodes.

Les principales méthodes utilisées sont résumées ci-dessus. Il en existe d'autres, moins utilisées et surtout non applicables sur coupe tissulaire. L'ensemble de ces techniques est résumé dans le tableau V.

Tableau V : Résumé des différentes techniques utilisées pour détecter l'apoptose

Technique	Matériel	Utilisation	Avantages	Inconvénients
Modifications morphologiques :				
- Microscopie optique.	Tissu fixé	<i>In vitro</i>	Préservation de l'histologie.	Phase tardive de l'apoptose.
- Microscopie électronique.	Tissu fixé	<i>In vitro</i>	Toutes les phases de l'apoptose Forte spécificité.	Procédure lourde, coûteuse
- Cytométrie en flux.	Cellules intactes	<i>In vitro</i>	Analyse quantitative, rapide.	Faible spécificité.
Modifications cytoplasmiques :				
- Activité des caspases.	Tissu fixé Cellules lysées	<i>In vitro</i>	Forte spécificité	Information sur la population de base.
- Flux calcique.	Cellules intactes	<i>In vitro</i>		Faible spécificité
-Dysfonctionnement mitochondrial.	Cellules intactes	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	Phase précoce de l'apoptose	Faible spécificité
Fragmentation de l'ADN :				
- Echelles d'ADN.	Cellules lysées Tissu homogène	<i>In vitro</i> <i>In vitro</i>		Phase tardive de l'apoptose Hétérogénéité cellulaire
- Contenu d'ADN par cytométrie en flux.	Cellules fixées	<i>In vitro</i>	Analyse quantitative, rapide.	Phase tardive de l'apoptose
- Marquage des extrémités coupées de l'ADN.	Tissu fixé	<i>In vitro</i>	Préservation de l'histologie	Phase tardive de l'apoptose Peu spécifique
Altérations membranaires :				
- Perméabilité membranaire.	Cellules intactes	<i>In vitro</i>		Phase tardive de l'apoptose Marquage des cellules nécrotiques
- Modifications membranaires.	Tissu intact Cellules intactes	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	Toutes les phases de l'apoptose Image à l'état viable	Faible spécificité
Transduction du signal :				
- Immunohistochimie	Tissu fixé Cellules fixées	<i>In vitro</i>	Analyse quantitative Morphologie préservée	
- Cytométrie en flux	Cellules fixées	<i>In vitro</i>	Analyse quantitative, rapide.	
- Western blot	Tissu Cellules	<i>In vitro</i>	Nombreux marqueurs	Pas de quantification Perte de la morphologie Peu spécifique

III.2 Autres mécanismes de mort cellulaire dans les cancers

En pathologie tumorale, des morts cellulaires non apoptotiques sont également observés. Les mécanismes impliqués dans ces morts cellulaires sont incomplètement compris mais ils ne semblent pas impliquer la voie des caspases. Certains d'entre eux peuvent être activés par les traitements anticancéreux.

Il s'agit notamment :

- de « l'oncose ».

L'oncose est une mort cellulaire accidentelle d'origine exogène, souvent qualifiée de désordonnée. Elle aboutit à la nécrose. L'oncose affecte le plus souvent non pas une cellule isolée mais des populations de cellules. Ces dernières commencent par gonfler (d'où le terme d'oncose proposé par G Majno pour décrire cette mort par gonflement, la dénomination de nécrose étant pour cet auteur réservé au processus de cadavérisation cellulaire post mortem), puis elles éclatent et projettent autour d'elles des enzymes qui altèrent les cellules voisines et les amènent à se nécroser à leur tour. Ainsi, la nécrose se propage par vagues successives en entraînant une inflammation qui s'accompagne de phénomènes de réparation et de cicatrisation.[48, 88] Dans une majorité de tumeurs, notamment celles à croissance rapide et en dehors de tout traitement, il se développe une nécrose dans les territoires situés à une distance critique des petits vaisseaux. Cette nécrose est quasi constante dans les xénogreffes d'un certain volume. Les cellules situées à proximité des vaisseaux sont le plus souvent respectées. L'étendue de la zone non nécrotique autour des vaisseaux est fonction de la pression partielle en oxygène, du diamètre des vaisseaux, du coefficient de diffusion de l'oxygène et du niveau de consommation de l'oxygène par les cellules tumorales.[89] La nécrose tumorale n'est pas toujours aussi ordonnée. En effet, en plus de la nécrose par déficit de diffusion de l'oxygène se développent des territoires systématisés de nécrose engendrée par des phénomènes d'hypoperfusion. La mort cellulaire constituée est aisée à reconnaître histologiquement. A la jonction entre tissu nécrotique et tissu sain sont observées un petit nombre de cellules tumorales présentant les caractéristiques morphologiques de l'apoptose. Les mécanismes de la mort cellulaire au cours de l'ischémie ne sont donc pas univoques

- de la sénescence reproductive au cours de laquelle les cellules tout en conservant l'intégrité de leur membrane plasmique ont perdu leurs propriétés de croissance et de clonogénicité. En culture ces cellules sont aplaties et leur granularité est accentuée.[90] Les modifications biochimiques associées à l'apoptose sont complexes. L'induction d'une activité galactosidasique est à l'origine d'une méthode de détection sur coupes à congélation.[91, 92]
- de la mort par autophagie.[82] Comme nous l'avons rappelé ci-dessus, dans les cellules normales les protéines non souhaitées ou qui ne sont plus utiles au fonctionnement cellulaire sont dégradées par deux mécanismes indépendants. Le premier est la protéolyse des protéines ubiquitinylées qui se développe dans le protéasome et le deuxième l'autophagie, processus au cours duquel les organelles et les protéines à vie longue sont détruites par le système lysosomal.[31] L'autophagie est activée par des facteurs variés comme le retrait de facteurs de croissance, l'induction de la différenciation au cours de l'ontogénèse. Les cellules d'un adénocarcinome galactophorique traitées par un antagoniste des récepteurs des œstrogènes, le tamixophène, accumulent les vacuoles autophagiques peu de temps avant leur mort. Le golgi, les polyribosomes et le réticulum endoplasmique sont extensivement dégradés et la morphologie des cellules mourantes n'est pas celles de l'apoptose.[67, 93]
- de la mort par catastrophe mitotique [94] : le terme de catastrophe mitotique est utilisée pour dénommer une modalité de mort cellulaire associée à des mitoses aberrantes. Au cours de ce processus sont observés des cellules géantes comportant des chromosomes non condensés. La mort par catastrophe mitotique est surtout observée après radiothérapie.[95]

Figure IX : Résumé des différentes étapes du processus apoptotique et des signaux utilisés pour sa détection.

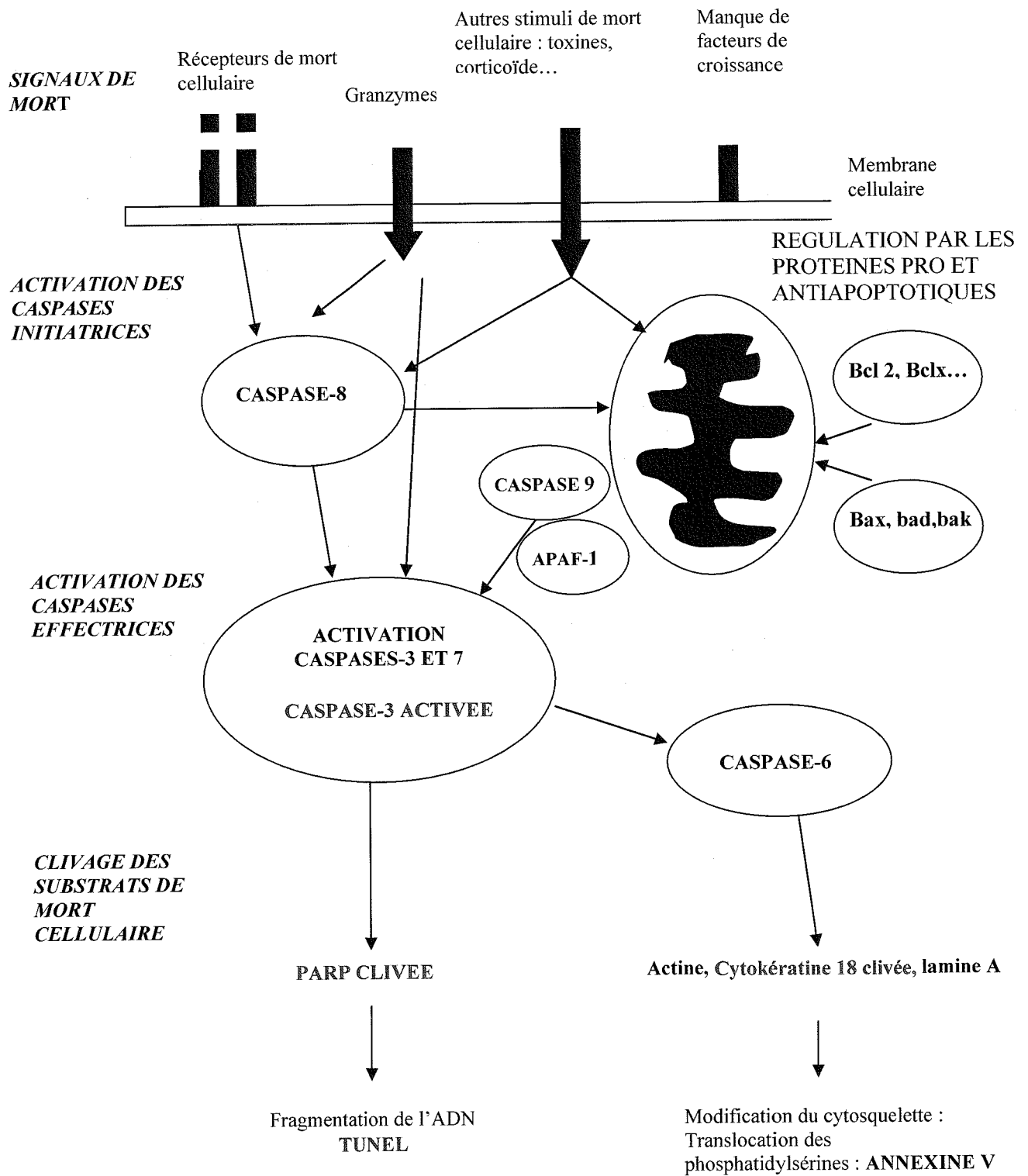


PLANCHE I

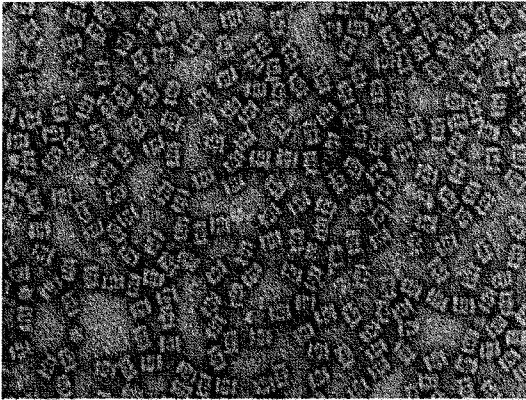


Photo n° 1 : Protéasome en microscopie électronique.

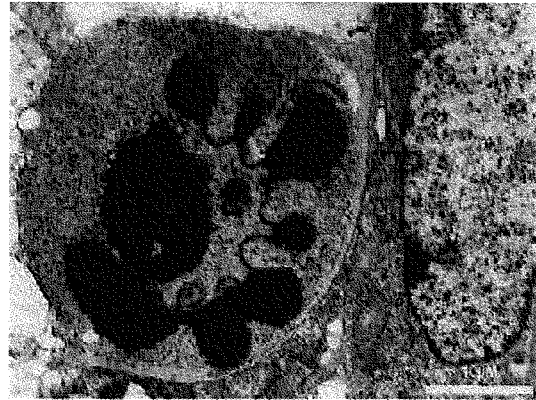


Photo n° 2 : Condensation nucléaire d'une cellule en apoptose en microscopie électronique.

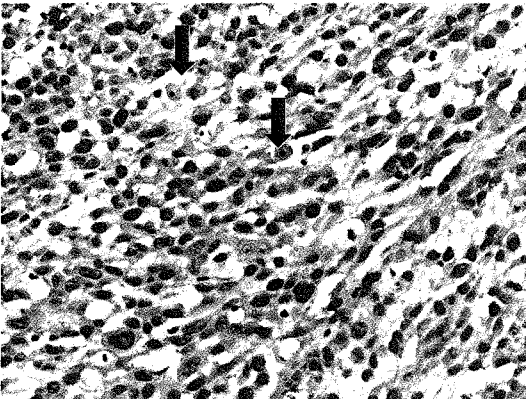


Photo n° 3a : Cellules apoptotiques (repérées par les flèches) en microscopie optique au sein d'un tissu tumoral. (x 200)

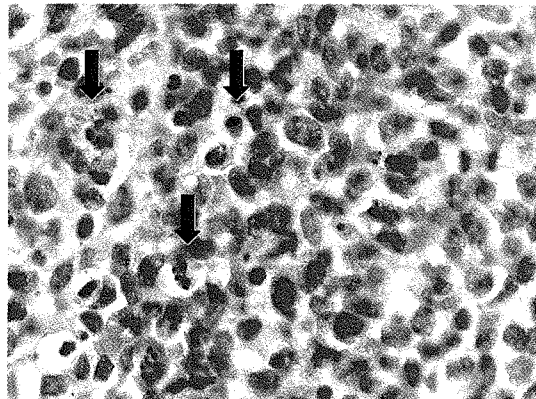


Photo n° 3b : Cellules en apoptose et corps apoptotiques (repérées par les flèches) en microscopie optique au sein d'un tissu tumoral. (x 1000)

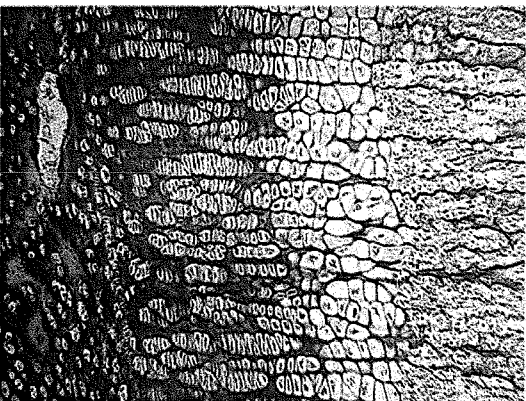


Photo n° 4a : Cartilage de croissance et ossification enchondrale avec mort des chondrocytes sans apoptose.

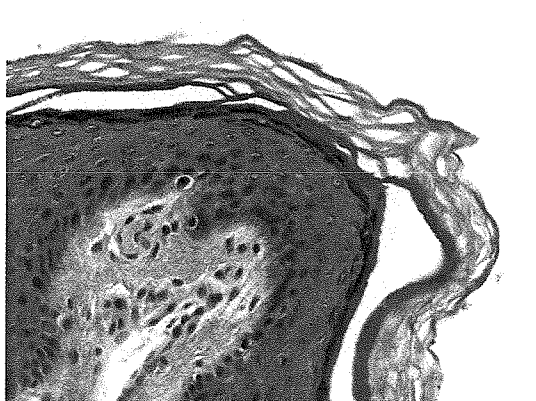


Photo n° 4b : Tissu cutané avec mort des kératinocytes en surface de l'épiderme sans processus apoptotique..

DEUXIEME PARTIE

MATERIEL ET METHODES

La première étape de notre travail consiste à choisir la ou les techniques de détection de l'apoptose la (les) plus sensible(s) pour l'analyse de notre modèle. Pour ce faire, les résultats de techniques de détection de l'apoptose réalisées en cytométrie de flux, considérés comme référence, sont comparés à ceux obtenus sur coupes de culots des mêmes cellules en culture avec les mêmes outils, les techniques étant cependant adaptées au travail sur coupes histologiques.

La seconde partie de notre travail consiste à apprécier un éventuel effet du bortezomib sur la croissance tumorale dans un modèle pré clinique de gliome malin humain xéno greffé chez la souris nude, la croissance tumorale étant appréciée à la fois sur les modifications des volumes tumoraux mais également par l'observation d'éventuels déséquilibres des cinétiques de prolifération et de mort cellulaire.

I-Les outils.

I.1-Les lignées cellulaires.

Les cultures cellulaires et leur analyse par cytométrie de flux sont effectuées par Mme Sophie Marchal dans le laboratoire de Recherche du Centre de Lutte Régionale contre le Cancer dirigé par Monsieur le Professeur J.L Merlin.

La lignée utilisée pour le choix des techniques morphologiques de mise en évidence de l'apoptose est la lignée référencée à l'ATCC HT 29, issue d'un adénocarcinome colique. Elle est connue pour être sensible à l'agent pro apoptotique taxol.

Le modèle pré clinique de glioblastome fait quant à lui appel à la lignée U87, également référencée à l'ATCC (Ponten et al,) établie à partir d'un astrocytome anaplasique de grade III. Cette lignée est très fréquemment utilisée pour les études pré cliniques sur les gliomes malins. Elle est sensible au bortezomib en culture cellulaire.

I.2-Les souris nude.

Les greffes sont réalisées sur des souris *Swiss-nu/nu* mâles, âgées de 6 à 8 semaines, provenant du centre d'élevage Charles River (Charles River Laboratories, Saint-Germain-sur l'Arbresle, France). Ce modèle est préférentiellement utilisé pour les xéno greffes de tumeurs humaines, car ces animaux souffrent d'un déficit de l'immunité cellulaire secondaire à une absence totale ou subtotale de thymus ce qui rend ces animaux tolérants à la majorité des allo- et xéno greffes. Il n'est donc pas nécessaire, pour réaliser la greffe, d'induire une dépression de l'immunité cellulaire, susceptible de modifier le développement du greffon. De plus, l'absence complète de poil constitue un énorme avantage tant pour la mise en œuvre de la microchirurgie que pour la surveillance des greffons.

I.3-Les anticorps.

Pour notre travail nous utilisons les anticorps primaires suivants :

1) Des anticorps dirigés contre le grand fragment (89kd) de la PARP humaine résultant du clivage de la pro enzyme par la caspase 3 activée.

En cytométrie de flux, il s'agit d'un anticorps monoclonal de souris marqué à la fluorescéine, complémentaire d'un peptide synthétique correspondant à des résidus d'acides aminés situés à l'extrémité carboxy terminale autour de l'asparagine 214. Cet anticorps ne reconnaît pas la PARP non clivée.

Pour éviter le bruit de fond lié à la présence des immunoglobulines endogènes dans les tissus de souris observées lors de l'utilisation d'anticorps secondaire anti Ig de souris, un anticorps polyclonal de lapin non marqué est utilisé pour les techniques immunohistochimiques. Le peptide ayant servi à la préparation de l'anticorps est le même que celui utilisé pour la production du monoclonal. Cet anticorps ne reconnaît que la forme humaine de PARP clivée.

2) Pour la mise en évidence de la forme activée de la caspase-3 est utilisé tant en cytométrie de flux qu'en immunohistochimie un antisérum de lapin purifié par affinité, préparé à partir d'un fragment de la caspase-3 humaine activée. Cet anticorps reconnaît un épitope conformationnel exposé après activation ou dénaturation de la pro enzyme humaine et murine. Cet anticorps peut donc reconnaître la forme non activée quand la concentration de cette dernière est élevée ou lorsque la protéine est dénaturée au cours de la technique (western

blot par exemple). En immunohistochimie, l'anticorps ne détecte pas la protéine native après fixation formolique et inversion de cette dernière par hydrolyse alcaline des conséquences de la fixation formolique accélérée par la chaleur.

3) L'anticorps M30 (M30 cytodeath, Boehringer, Manheim, Allemagne) est une IgG2b de souris reconnaissant spécifiquement un épitope conformationnel de la cytokératine 18 exposé après clivage de la protéine par la caspase-3. La cytokératine 18 est exprimée par les cellules épithéliales mais non par la glie normale ou tumorale. Dans notre travail, il n'est donc utilisé que comme élément de comparaison avec la cytométrie de flux.

4) L'étude de la prolifération cellulaire se fait à l'aide de l'anticorps anti Ki-67 (Clone SP6) qui est un monoclonal de lapin. Celui-ci reconnaît préférentiellement la protéine Ki-67, clone SP6 chez l'Homme ainsi que dans d'autres espèces telles que le rat, la souris, le chien

L'antigène Ki-67 est une protéine nucléaire, exprimée durant toutes les phases actives de la prolifération cellulaire (G_1 , S, G_2 et durant la mitose), mais reste absente au cours de la phase cellulaire G_0 . Durant l'interphase, l'antigène est exprimé au niveau du noyau, alors qu'il est localisé à la surface des chromosomes pendant la mitose. La protéine est rapidement dégradée lorsque la cellule entre en phase non proliférative.

II-Choix de la technique de mise en évidence de l'apoptose sur coupes histologiques.

II.1-Introduction.

Les techniques habituelles pour mesurer le pourcentage des cellules apoptotiques d'une culture cellulaire font appel à la cytométrie de flux, les cellules apoptotiques étant au préalable spécifiquement marquées à l'aide d'un traceur fluorescent. La technique de marquage fluorescent permettant l'identification des cellules apoptotiques la plus utilisée repose alors sur la mise en évidence immunocytochimique d'antigènes dont l'apparition dans les cellules apoptotiques résulte de l'activation de la voie des caspases (caspase-3 activée, PARP clivé, cytokératine clivée etc). Pour choisir la méthode d'étude sur coupes histologiques nous avons comparé les données acquises par cytométrie de flux à celles de techniques immunohistochimiques réalisées sur des coupes de culots cellulaires fixés et inclus dans de la paraffine en suivant les protocoles habituels d'une part et ceux obtenus sur des coupes des mêmes culots après réalisation de la technique TUNEL d'autre part.

II.2-La culture cellulaire et l'induction de l'apoptose.

Pour leur culture en monocouche, les cellules HT29 sont maintenues dans un incubateur à 37°C, sous une atmosphère de 5% (v/v) de CO₂ et 90% d'humidité, dans un milieu de culture constitué de RPMI 1640 (Gibco BRL, France) sans rouge de phénol, supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Dutscher, France), 200 UI/L de pénicilline/streptomycine (Gibco BRL, France) et 200 mmol/L de L-glutamine (Gibco BRL, France).

Une fois par semaine, les cellules à confluence sont détachées de leur support (flacon de culture de 25 cm², Falcon, USA) par une incubation de 5 minutes avec 1 mL d'une solution de trypsine-EDTA (0,05%-m/v-0,53 mM) (Gibco BRL, France). L'activité de la trypsine est neutralisée avec 10 mL de milieu de culture complet. Les cellules sont alors récupérées par une centrifugation de 10 minutes à 1000 g. Le culot est alors resuspendu dans une solution de PBS contenant 1% (v/v) de sérum de veau fœtal et la concentration cellulaire mesurée à l'aide d'un hémocytomètre de Thoma (Dutscher, France). Elles sont ensuite réensemencées dans une boîte de culture de 25 cm².

Pour les expériences d'induction d'apoptose, les cellules sontensemencées à raison de 3×10^4 cellules/mL (volume total = 4 mL) dans deux boites de Pétri de 6 cm de diamètre, 4 jours avant la mise en route du traitement apoptotique. L'une des boites sert de témoin et la deuxième est traitée par du taxol de la façon suivante : dans un premier temps, une solution de taxol (Paclitaxel, Sigma Saint-Quentin Fallavier, France) 50 μ M est préparée dans de l'éthanol à 96 %. Quatre μ L de cette solution mère sont alors ajoutés dans la boite de façon à obtenir une concentration finale de 50 nM de taxol et une dilution de l'éthanol au 1000^{ème}. Ce dernier n'est ainsi plus toxique pour les cellules. Ces dernières sont alors incubées pendant 48 h avant analyse.

La moitié des cellules traitées et non traitées est utilisée pour l'étude en cytométrie de flux. La seconde moitié du matériel est récupérée pour être incluse en paraffine.

II.3-Analyses par cytométrie de flux.

II.3.1-Appréciation de la mort cellulaire non apoptotique par technique d'exclusion au bleu de Trypan.

La viabilité des cellules en suspension est alors déterminée sur chaque suspension cellulaire. Un échantillon de cellules est prélevé (450 μ L), auquel sont ajoutés 50 μ L d'un colorant d'exclusion, le bleu trypan (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France), la concentration cellulaire est déterminée par numération des cellules non colorées à l'aide d'un hémocytomètre (Polylabo, VWR, Fontenay sous Bois, France).

II.3.2-Détection des cellules apoptiques par mise en évidence de la PARP clivée et de la caspase-3 activée

5 10^5 cellules sont déposées dans un tube à hémolyse puis centrifugées. Les cellules sont alors lavées deux fois avec une solution de PBS contenant 1% (v/v) de sérum de veau fœtal. Après centrifugation, les cellules sont fixées par ajout de 250 μ L de la solution Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences Franklin Lakes, USA) pendant 20 minutes à 4°C. Après deux lavages avec 1 mL de Perm/Wash solution 1x (BD Biosciences Franklin Lakes, USA), les culots cellulaires sont conservés à 4°C jusqu'au marquage.

Pour la mise en évidence de la PARP clivée, 0,5 µL de l'anticorps monoclonal de souris complémentaire de cette protéine, (clone F21-852, BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA) sont dilués dans 50 µL de Perm/Wash. Après une incubation à 4°C de 30 minutes, les cellules sont lavées deux fois avec 1 mL de Perm/Wash. Les anticorps primaires fixés sont alors détectés à l'aide d'un anticorps secondaire de lapin anti IgG de souris marqué à la fluorescéine (Dakocytomation, Trappes, France) dilué au 1/10^{ème}. Une procédure similaire est suivie pour la détection de la caspase-3 activée. Dans ce cas, l'anticorps primaire (anticorps monoclonal de lapin, clone C92-605 (BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA) est également dilué au 1/10^{ème}.

II.3.3-Détection des anticorps par cytométrie en flux.

Le culot est repris par 500 µL de Perm/Wash. Les cellules préalablement marquées sont comptés par un cytomètre en flux FacsCalibur (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) possédant un laser argon permettant une excitation de la fluorescéine à 488 nm. La fluorescence émise à 530 ± 30 nm étant ensuite détectée. L'acquisition est réalisée sur 10 000 cellules. Les résultats sont présentés sous forme d'histogrammes monoparamétriques représentant l'intensité de fluorescence en abscisse (FL1) sur une échelle logarithmique et le nombre de cellules en ordonnée.

II.4-Détection des cellules apoptotiques dans des culots cellulaires inclus en paraffine.

II.4.1- Inclusion en paraffine des cellules en cultures.

Après trypsinisation et inhibition de l'activité trypsique, les cellules sont récupérées dans du tampon PBS. La suspension est alors centrifugée à 1500 g pendant 10 minutes dans un tube Falcon stérile de 15 mL. Le culot est décanté puis sont déposés dans le tube 2 mL de formol à 10% (v/v) tamponné pH 7,4, pour une fixation de 12 heures à 4°C. Le culot, une fois fixé, est rincé à deux reprises au PBS. La suspension cellulaire est ensuite centrifugée 10 minutes à 1500 g et décantée. Le culot ainsi obtenu est alors inclus dans de l'agarose à 2% (m/v). La solution d'agarose est préparée par dissolution de 0,1g d'agar (Réf.A-4018, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) dans 5 mL de PBS, sur un agitateur chauffant, en évitant toute ébullition. Au culot, une fois égoutté, 200 µL d'agarose sont donc ajoutés en décollant celui-ci du fond du tube avec une pipette en verre à bout rond. Le tube est laissé au réfrigérateur

pendant une heure, pour laisser prendre l'agarose. Le culot est ensuite démoulé et placé dans de l'éthanol à 70° pendant une heure, puis déshydraté et imprégné de paraffine dans un automate de type V.I.PTM (Sakura) selon les procédures habituelles.

II.4.2-Les techniques immunohistochimiques.

La mise en évidence immunohistochimique de la PARP clivée, de la caspase activée et de la cytokeratine 18 clivée est réalisée grâce à une technique immunohistochimique classique dite en trois couches. (figure X) Celle-ci se fait sur des coupes de 5 µm d'épaisseur, étalées à l'eau sur des lames prétraitées à la polysine (PolysineTM, Menzel-Glaser, Braunschweig, Allemagne). Les coupes sont déparaffinées par passages successifs dans un bain de toluène de 10 minutes, puis dans deux bains d'éthanol de concentration décroissante (absolu puis 95). Elles sont ensuite immergées dans de l'eau désionisée, puis disposées dans un porte-lames et plongées dans une solution aqueuse de citrate de sodium pH 6 (voir annexes). L'ensemble est ensuite disposé dans un autoclave (Retriever 2100, Protéogénix, Strasbourg, France) qui permet de porter la solution à une température de 120°C pendant 10 minutes. La solution est ensuite ramenée à température du laboratoire en 2 heures. Cette étape permet l'inversion des conséquences de la fixation formolique par hydrolyse alcaline accélérée par la chaleur humide des liaisons formaldéhyde/macromolécules tissulaires. Les coupes sont ensuite cerclées au crayon hydrophobe afin de limiter l'écoulement des solutions d'anticorps. Elles sont ensuite immergées dans du tampon PBS-Tween pH 7.5, puis égouttées et enfin disposées à l'horizontal dans des chambres humides. Les solutions d'anticorps primaires, diluées aux concentrations rapportées tableau VI, dans un diluant dit pour anticorps primaires (voir annexes) sont déposées et les coupes sont incubées à 4°C, à l'abri de la lumière pendant 16 heures.

L'incubation des anticorps primaires une fois réalisée, les coupes sont brièvement rincées à la pissette au PBST. Elles sont ensuite recouvertes pendant 1 heure d'une solution d'anticorps secondaires, à l'abri de la lumière et à température ambiante. L'anticorps secondaire est un sérum de chèvre anti IgG (H+L) de lapin biotinylé (E0432, Dakocytomation, Trappes, France) dilué au 1/200^{ème} dans un tampon PBST pour les anticorps anti caspase-3 activée, PARP clivée et Ki-67. Pour l'anticorps anti M30, l'anticorps secondaire utilisé est un sérum anti souris biotinylé (Réf. E 0434, Dakocytomation, Trappes, France). Après deux brefs rinçage à la pissette des coupes au PBST, l'activité des peroxydases endogènes est inhibée par

une incubation des lames à température ambiante, pendant 15 minutes, dans une solution de peroxyde d'hydrogène à 20% (v/v) dans de l'eau déminéralisée. Les lames sont de nouveau rincées brièvement à l'aide d'une pissette au PBST. Elles sont ensuite incubées à température ambiante, à l'abri de la lumière, pendant 1 heure dans une solution au 1/200^{ème} de streptavidine-peroxydase (P0397, Dakocytomation, Trappes, France) diluée dans du tampon PBST. Après un dernier lavage bref à la pissette au PBST, l'activité peroxydasique est révélée en déposant sur les lames la solution commerciale prête à l'emploi, NOVAREDTM (Vector, Burlingame, USA), pendant 4 minutes à l'abri de la lumière. Les coupes sont ensuite contre-colorées à l'aide d'une solution commerciale d'Hématoxyline de Harris, diluée au 1/2, pendant 20 secondes, puis rincées à l'eau courante et bleuies dans du tampon Tris-HCl 0,1M pH 8. Après déshydratation dans l'éthanol et passage dans le toluène, les lamelles sont montées à l'Eukitt^R.

Pour chaque anticorps, un témoin négatif est réalisé. Pour ce faire, la technique est effectuée en omettant l'anticorps primaire afin de vérifier que les signaux observés ne sont pas liés au système de révélation de l'anticorps primaire.

Figure X : Principe de l'étude immunohistochimique en trois couches.

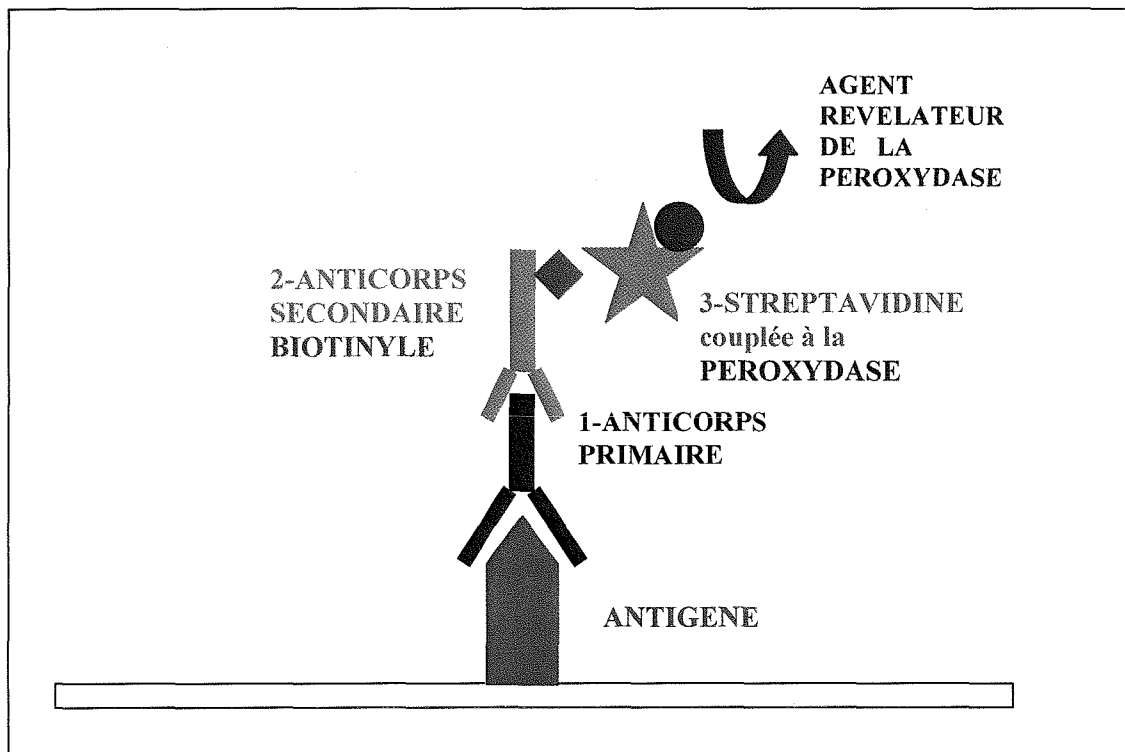


Tableau VI : Anticorps utilisés en immunohistochimie et conditions techniques.

Anticorps	Caractéristiques	Dilutions	Références commerciales
Caspase-3 activée	Polyclonal de lapin	1/1000	Réf.557035, BD Biosciences, Franklin Lakes, USA.
PARP clivée	Polyclonal de lapin	1/25	Réf.9541, Cell Signaling Technology, Danvers, USA
M30	Monoclonal de souris	1/50	Réf.2 140 322, Boehringer, Mannheim, Allemagne.
Ki-67 clone SP6	Monoclonal de lapin	1/100	RM-9106-R7, Lab vision corporation Westhingham, USA.
Anti-IgG (H+L) de lapin	Anticorps de chèvre biotinylé, purifié par affinité.	1/200	E 0432, Dakocytomation, Trappes, France.
Anti-Ig G et M de souris	Anticorps de chèvre biotinylé, purifié par affinité.	1/200	E 0433, Dakocytomation, Trappes, France.

II.4.3-Mise en évidence des cellules apoptotiques par la méthode TUNEL.

La technique est réalisée de la façon suivante. Les coupes sont tout d'abord déparaffinées et les conséquences de la fixation formolique sont inversées par hydrolyse basique catalysée par la chaleur comme décrit précédemment. Les lames sont ensuite disposées dans un porte-lame et rincées dans du TBST. Elles sont alors immergées dans une solution de Protéinase K à la concentration de 0,03 Unités/mL dans un tampon Tris-HCL 0,1M, EDTA 0,5M pH 8 (voir Annexe) pendant 10 minutes à 37°C. Après un rinçage dans du Tris-HCL 0,1M pH 7.4, les lames sont placées en position horizontale sur les plaques à effet Peltier d'un thermocycleur pour coupes histologiques (HYBAID, Schleicher & Schuell CERA-LABO, Ecqueville, France). Quelques gouttes d'une solution réactionnelle (voir annexe) comportant de la

transférase terminale, du dATP, du dUTP marqué à la digoxigénine sont déposées sur les coupes. Ces dernières sont ensuite recouvertes d'une lamelle afin d'obtenir une répartition uniforme de la solution de marquage. L'incubation est effectuée pendant 30 minutes à 37°C, une chambre humide étant réalisée en déposant sur les plaques à effet Peltier un couvercle en plastique dont les dimensions sont adaptées. Une fois terminée, les lames sont rincées sous agitation dans du TBST pendant 10 minutes à 37°C. Les coupes sont ensuite encerclées par un trait de crayon hydrophobe et recouvertes d'une solution au 1/200^{ème} dans un tampon Tris-HCL pH 9,4 d'un anticorps de chèvre antidigoxigénine marqué à la phosphatase alcaline/A (Réf. 1426/338, ROCHE). L'incubation avec cet anticorps est de 45 minutes à température ambiante. Les lames sont ensuite rincées brièvement dans du TBST puis immergées dans un tampon Tris HCL 0,1 M pH 9,4 contenant du MgCL2. La révélation de l'activité phosphatasique s'effectue par dépôt sur la coupe de quelques gouttes de NBT-BCIP (réf.1681 541, ROCHE) diluée au 1/50^{ème} dans le tampon Tris-HCL pH 9,4. La révélation est de quatre minutes. La réaction est arrêtée par rinçage des lames dans le tampon pH 9,4. Les coupes sont ensuite contre colorées par passage rapide dans une solution de rouge nucléaire puis rincées à l'eau osmosée avant d'être montées à l'aide d'un milieu de montage à base d'alcool polyvinylique (voir annexes). Les coupes tissulaires sont ensuite observées au microscope optique. Le signal nucléaire, qu'il soit faible ou intense est considéré comme positif.

II.4.4-Les techniques effectuées.

Pour chacun des prélèvements, une coloration standard HES est réalisée, une étude immunohistochimique à l'aide des anticorps anti PARP clivée, anti caspase-3 activée, anti M 30 ainsi que la méthode TUNEL. Chaque technique a été réalisée sur trois niveaux de coupe séparés de 50 µm pour les populations cellulaires traitées et non traitées.

III-Etude de l'influence du bortezomib sur la cinétique cellulaire dans les tumeurs gliales xénogreffées chez la souris nude.

Les greffes ainsi que le suivi des souris nude sont effectués par Marianne Labussière au sein du laboratoire d'Histopathologie Expérimentale et Moléculaire de la faculté de Médecine de Nancy.

III.1-Développement du modèle animal

Des tumeurs sous cutanées sont obtenues dans un premier temps par injection sous cutanée chez deux souris d'une suspension de cellules U87. Afin d'obtenir un nombre suffisant de cellules pour la greffe, la culture cellulaire est préalablement amplifiée. Pour se faire, les cellules sontensemencées à J1 à la concentration de $4 \cdot 10^4$ cellules/mL, dans des flacons de culture de 225 cm² (Falcon, Dutcher, Brumath, France) contenant 45 mL de milieu de culture. La composition du milieu de culture est résumée dans le tableau VII. A J₅, une suspension cellulaire à 10^7 cellules/mL est préparée dans du glucose 5% (v/v) (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France). Après rinçage du tapis de cellules adhérentes au PBS (*Phosphate-buffered saline*) (Invitrogen corporation, Cergy pontoise, France), les cellules sont décollées de leur support par digestion à la trypsine, à l'aide de 1 mL de solution de trypsine-EDTA (Invitrogen corporation, Cergy pontoise, France). Après cinq minutes d'exposition à 37°C, l'activité enzymatique est arrêtée par addition de milieu de culture (3 à 5 mL). La suspension cellulaire ainsi obtenue est centrifugée (1500 g, 10 minutes) et le culot cellulaire est ensuite remis en suspension dans du milieu (5 à 10 mL). La viabilité cellulaire est ensuite établie par un test d'exclusion au bleu trypan. Pour se faire, 450µL de la suspension cellulaire sont ajoutés 50 µL de bleu trypan (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France). La concentration en cellules vivantes est alors déterminée par numération des cellules non colorées à l'aide d'un hémocytomètre (Polylabo, VWR, Fontenay sous Bois, France). La quantité à diluer dans le glucose 5% (m/v) est alors calculée.

Tableau VII : Milieu de culture des cellules U87.

Composants	Concentration	Fournisseurs
Sérum de Veau Fœtal inactivé (SVF)	9%	Dutcher
Pyruvate de sodium	1,25 mM	Invitrogen
Acides aminés essentiels	0,5 X	Invitrogen
Acides aminés non-essentiels	0,5 X	Invitrogen
Vitamines	0,4 X	Invitrogen
L-glutamine	2 mM	Invitrogen
L-serine	10,8 µg/mL	Invitrogen
L-asparagine	20 µg/mL	Invitrogen
Pénicilline	100 UI/mL	Invitrogen
Streptomycine	100 µg/mL	Invitrogen
DMEM	qsp	Invitrogen

DMEM : Milieu de Eagle modifié par Dulbecco.

Une fois la lignée cellulaire amplifiée, une suspension cellulaire à 10^7 cellules/mL est préparée dans du glucose 5% (m/v).

La greffe est alors réalisée, sans anesthésie, par injection sous-cutanée de 10^6 cellules (100 µL) au niveau de la face externe des pattes postérieures droite et gauche. La souris « porte-greffe » est sacrifiée lorsque la tumeur atteint un volume d'environ 1000 mm³. Le tissu tumoral est prélevé, puis plongé dans du sérum physiologique (NaCl 0,9%). Il est alors coupé finement, à l'aide d'une lame à rasoir, afin d'obtenir des fragments de 1 à 2 mm de diamètre et de 0,5 à 1 mm d'épaisseur. Ceux-ci constituent les greffons qui sont aussitôt implantés chez les souris receveuses. Ces dernières sont anesthésiées par injection intrapéritonéale d'un mélange de xylazine à 0,8 mg/mL (Rompun^R 2% Bayer Pharma, Puteaux, France) et de kétamine à 6 mg/mL (kétamine Panpharma, Fougère, France) à la dose de 10 µL/g de poids corporel. Ceci permet d'obtenir une anesthésie de 20 à 30 minutes. L'animal endormi est ensuite fixé sur une planchette en plastique par ses quatre membres, en décubitus dorsal, au moyen de ruban adhésif de type Micropore, 3M. Les greffons sont implantés en sous-cutané au niveau des plis inguinaux. La peau et le tissu conjonctif sont incisés, dégageant les pédicules fémoraux, en regard desquels les fragments tumoraux sont déposés. La peau est ensuite suturée à l'aide de fil de suture Prolène 5/0 stérile (Ethicon, Issy-les-Moulineaux, France)

A l'issue de l'intervention, les animaux sont replacés individuellement dans leur cage et surveillés jusqu'au réveil.

III.2-Répartition des animaux et traitement.

Pour la réalisation de ce travail, les souris sont greffées selon la méthode décrite ci-dessus. Elles sont ensuite réparties aléatoirement en 4 groupes avec dans chaque groupe des souris traitées (groupes B comme bortezomib) et des souris non traitées (groupes C comme contrôle), servant de témoins. Le bortezomib est injecté à la dose de 0,25 mg/kg par jour, dose préalablement validée par une étude de toxicité. Le traitement est débuté lorsque les tumeurs atteignent un volume de $250 \pm 50 \text{ mm}^3$. Il se fait sous la forme d'injections intrapéritonéales, après reconstitution du bortezomib à l'aide de sérum physiologique. Cette voie d'administration est aussi efficace que la voie intraveineuse.[96] La solution ainsi injectée est à une concentration de 1mg/mL. Le bortezomib nous est fourni par le laboratoire Janssen-Cilag. Les souris, de chaque groupe, non traitées par le bortezomib reçoivent des injections de sérum physiologique selon le même protocole.

- Répartition des animaux :

Groupe 1 : souris sacrifiées après 3 injections quotidienne successives (B3 et C3).

Groupe 2 : souris sacrifiées après 5 injections quotidienne successives (B5 et C5).

Groupe 3 : souris sacrifiées après 8 injections (5 injections quotidiennes successives, 2 jours sans injection puis 2 injections quotidiennes successives) (B8 et C8).

Groupe 4 : souris sacrifiées après 10 injections (5 injections quotidiennes successives pendant deux semaines séparées de deux jours) (B10 et C10).

III.3-Le suivi des animaux.

L'activité antitumorale du bortezomib est appréciée sur les variations du volume tumorale .La mesure du volume tumoral est effectué à l'aide d'un pied à coulisse. Chaque tumeur est mesurée en millimètres selon deux axes : le plus grand (D) et le plus petit (d) diamètre. Le volume tumoral est ensuite calculé selon la formule :

$$V = (D \times d^2) / 2.$$

Les souris sont sacrifiées après une durée de traitement variant avec le groupe.

III.4-Le recueil des échantillons tumoraux.

Une fois les souris sacrifiées, les tumeurs sont prélevées et sont immédiatement fixées dans du formol à 10% (v/v) préparé par dilution au 1/10^{ème} dans un tampon phosphate 0,1M pH 7,4 d'une solution mère commerciale contenant 40% (v/v) de formaldéhyde et 10% (v/v) d'alcool méthylique. Après une fixation de 24 heures, les prélèvements sont mis en cassette, déshydratés et imprégnés de paraffine dans un automate de type V.I.PTM (Sakura) par passages dans une série de bains successifs de formol, d'alcool, de toluène et de paraffine. Les blocs de paraffine ainsi obtenus, sont ensuite débités en coupes de 5 µm d'épaisseur qui sont montées à l'eau albumineuse sur des lames de verre dégraissées pour les colorations ordinaires ou à l'eau désionisée pour celles traitées à la polylysine (PolylysineTM; Menzel-Glaser, Braunschweig, Allemagne) pour les techniques immunohistochimiques. Après un séchage d'une heure sur une platine chauffée à 40°C, les lames sont conservées un minimum d'une nuit à l'étuve à 37°C.

L'étude morphologique des prélèvements tumoraux est effectuée sur des coupes colorées à l'hématoxyline éosine safran selon les techniques utilisées en routine au Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques du CHU de Nancy.

Pour chaque tumeur, une étude immunohistochimique à l'aide des anticorps anti caspase-3 activée et anti Ki-67 est réalisée, selon le protocole décrit précédemment.

IV-Comptage.

IV.1- Choix de la technique pour détection de l'apoptose sur cellules en culture.

Chaque technique (HES, IHC à l'aide des anticorps anti caspase-3 activée, anti PARP clivée et anti cytkératine 18 clivée, TUNEL) a été réalisée sur trois niveaux de coupe séparés de 50 µm pour les populations cellulaires traitées et non traitées. Le comptage est effectué au grossissement x 1000, sur 10 champs consécutifs à chaque niveau. Les corps apoptotiques rapprochés, rattachés entre eux, sont considérés comme issus d'une même cellule. L'indice apoptotique correspond au rapport du nombre de cellules présentant un marquage sur le nombre de cellules totales, exprimé en pourcentage.[76]

$$\text{IA (Indice apoptotique)} = \frac{\text{nombre de cellules marquées} \times 100}{\text{nombre de cellules totales}}$$

En ce qui concerne l'étude morphologique standard après coloration HES, l'indice apoptotique est calculé selon la formule ci-dessus, en comptant les cellules présentant les caractéristiques morphologiques essentiels du processus apoptotique : la formation de corps apoptotiques et/ou la condensation périphérique de la chromatine nucléaire.

IV.2-Etude de l'influence du bortezomib sur l'équilibre de la population cellulaire dans les tumeurs gliales xénogreffées.

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés principalement à la mort apoptotique et à la nécrose, la mort dite catastrophique ou par sénescence reproductive étant des événements plus difficiles à apprécier.

Pour chaque tumeur, une étude de la mort cellulaire est réalisée :

- la nécrose ischémique est quantifiée selon une analyse semi quantitative, exprimée par un score de nécrose déterminé en fonction du pourcentage de nécrose par rapport à la surface totale de la lésion.

- 0 : absence de nécrose.
- I : territoire nécrosé < à 25 % de la surface totale de la lésion.
- II : territoire nécrosé compris entre 25 % et 50 % de la surface totale.
- III : territoire nécrosé > à 50 % de la surface totale de la lésion.

- IV : lésion totalement nécrosée ne permettant pas le calcul des indices apoptotique et de prolifération.

- l'apoptose est mise en évidence par détection de la caspase-3 activée en immunohistochimie. L'indice apoptotique est calculé à l'aide de la formule citée précédemment, le nombre de cellules présentant un signal étant compté sur dix champs consécutifs au grossissement x 1000 sur un total de 2000 cellules. Nous avons exclu les cellules marquées au contact de la nécrose ischémique, inductrice du processus apoptotique. (photo 11c)

La détermination de l'indice de prolifération est réalisée par comptage des cellules détectées à l'aide de l'anticorps anti Ki-67. La procédure est identique à celle utilisée pour la détermination de l'indice apoptotique, le comptage étant également réalisé uniquement sur les zones tumorales solides, non nécrotiques, afin de ne pas inclure les cellules inflammatoires, nombreuses en périphérie des zones nécrotiques.

V-Etude statistique.

L'étude statistique des résultats obtenus concernant la croissance tumorale des tumeurs gliales est réalisée par Sophie Pinel au sein du laboratoire d'Histopathologie Expérimentale et Moléculaire de la faculté de Médecine de Nancy.

Le calcul de la moyenne et de l'écart type est effectué dans chaque groupe.

Une analyse statistique non paramétrique est réalisée, utilisant le test de Mann-Whitney. Le seuil de significativité retenu est de $P < 0,05$.

TROISIEME PARTIE

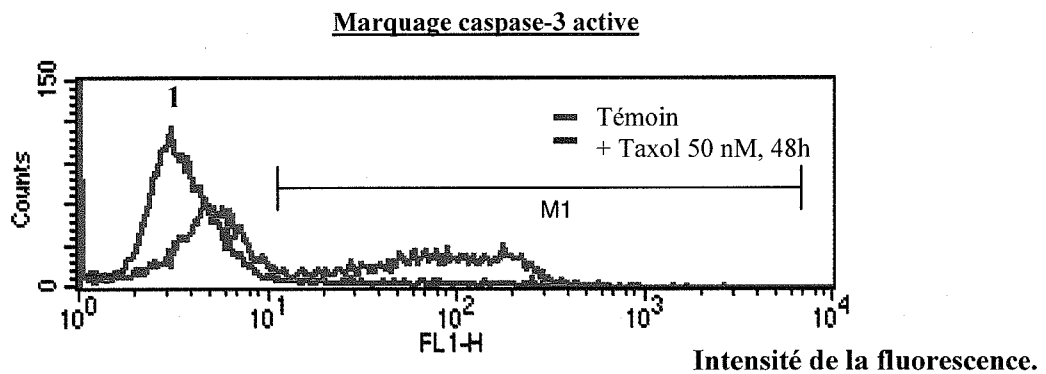
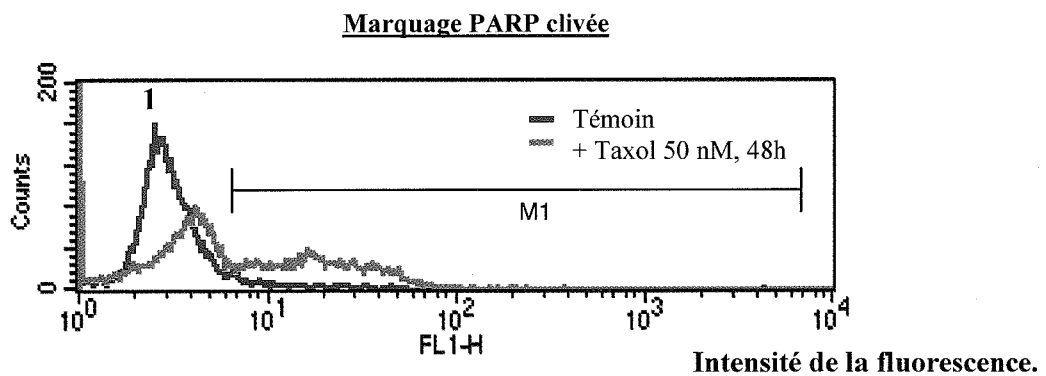
RESULTATS

I- Choix de la technique évaluant l'activité apoptotique.

I.1-Résultats de la cytométrie en flux.

Les résultats obtenus sont représentés sous la forme d'histogrammes monoparamétriques présentant l'intensité de fluorescence en abscisse (FL1) sur une échelle logarithmique et le nombre de cellules en ordonnée.

Graphique I : Résultats de la cytométrie en flux



M1 : fenêtre de sélection correspondant aux cellules marquées.

Pic 1 : population cellulaire non marquée.

Counts : nombre de cellules.

Tableau VIII : Pourcentages de cellules marquées avec les anticorps anti caspase-3 activée et anti PARP clivée en cytométrie en flux.

	Numération bleu trypan			Apoptose	
	vivantes	mortes	viabilité	Caspase 3 activée	PARP clivé
Cellules non traitées (T)	236	40	86%	1,74%	3,75%
Cellules traitées (Tax)	72	7	91%	30,37%	15,82%

I.2-Lecture des colorations standards HES.

Les résultats de l'étude morphologique sur coloration standard HES sont résumés dans le tableau n°10a sous forme d'un rapport a/N, a étant le nombre de cellules présentant un des deux critères morphologiques du processus apoptotique et N étant le nombre total de cellules comptées par champs au grossissement x1000 sur 10 champs consécutifs. (photos 5a et 5b)

Tableau IX-a : Indices apoptotiques calculés en fonction des modifications morphologiques cellulaires sur coloration standard HES.

	Cellules témoins (T) a/N			Cellules traitées (Tx) a/N		
	1 ^{er} niveau	2 ^{ème} niveau	3 ^{ème} niveau	1 ^{er} niveau	2 ^{ème} niveau	3 ^{ème} niveau
1 ^{er} champ	0/198	0/57	0/65	14/59	6/44	21/109
2 ^e champ	1/167	0/100	0/156	13/75	17/81	19/71
3 ^e champ	0/51	1/82	1/179	13/30	17/86	34/169
4 ^e champ	1/128	0/110	1/154	17/84	14/76	25/122
5 ^e champ	1/154	0/106	0/185	20/102	30/116	13/91
6 ^e champ	0/67	2/115	0/179	13/77	34/139	24/87
7 ^e champ	0/97	1/151	0/177	7/65	40/126	18/104
8 ^e champ	2/142	0/128	0/170	13/73	24/118	20/72
9 ^e champ	1/114	1/115	2/132	19/97	18/96	24/113
10 ^e champ	0/107	0/144	0/153	9/86	8/52	16/59
Total champs a/N	6/1225	5/1108	4/1550	138/748	208/934	214/997
Indice apoptotique	0,38%			20,9%		

a/N : a étant le nombre de cellules présentant un des deux critères morphologiques du processus apoptotique et N étant le nombre total de cellules comptées par champs au grossissement x1000 sur 10 champs consécutifs

I.3-Résultats de l'étude immunohistochimique.

L'anticorps anti caspase-3 activée révèle un marquage cytoplasmique. (photos 6a et 6b)
Cependant quelques cellules morphologiquement en fin d'apoptose présentent un marquage des corps apoptotiques. (voir photo 6b)

En ce qui concerne l'anticorps anti PARP clivée, le signal est nucléaire, parfois situé au niveau des corps apoptotiques lorsque la cellule est en phase d'apoptose avancée. (photos 8a et 8b)

Cependant, de façon exceptionnelle, nous avons observé l'absence de marquage au niveau de certaines cellules morphologiquement en apoptose. (photo 8c)

L'anticorps anti cytokératine 18 clivée (M 30) donne un signal cytoplasmique dense. (photos 7a et 7b)

Les résultats sont résumés dans les tableaux 10b, 10c et 10d, notés sous forme c/N pour la caspase-3 activée (c = nombre de cellules présentant un signal et N = nombre de cellules totales), k/N pour l'anticorps M30 (k=nombre de cellules présentant un signal et N=nombre de cellules totales) et p/N pour la PARP clivée (p = nombre de cellules présentant un signal et N = nombre de cellules totales).

Tableau IX-b : Indices apoptotiques calculés à partir du marquage cellulaire par l'anticorps anti caspase-3 activée en immunohistochimie.

	Cellules témoins (T) c/N			Cellules traitées (Tax) c/N		
	1 ^{er} niveau	2 ^{ème} niveau	3 ^{ème} niveau	1 ^{er} niveau	2 ^{ème} niveau	3 ^{ème} niveau
1 ^{er} champ	1/173	1/112	1/169	30/109	29/118	43/164
2 ^e champ	1/118	1/114	0/185	19/88	14/70	25/135
3 ^e champ	0/163	0/142	2/163	18/113	14/66	22/82
4 ^e champ	0/157	0/123	2/155	11/93	18/70	19/54
5 ^e champ	1/102	2/147	1/190	37/130	18/89	11/63
6 ^e champ	1/129	2/197	0/184	26/139	10/56	7/39
7 ^e champ	1/135	0/171	1/175	23/93	28/117	12/49
8 ^e champ	2/123	0/183	0/131	15/75	33/128	31/122
9 ^e champ	0/61	2/127	0/166	21/54	25/108	22/67
10 ^e champ	1/77	0/147	0/114	12/37	14/50	34/125
Total champs	8/1238	8/1463	7/1632	212/926	203/872	226/900
Indice apoptotique.	0,53%			23,7%		

c = nombre de cellules présentant un signal cytoplasmique et N = nombre de cellules totales

Tableau IX-c : Indices apoptotiques calculés à partir du marquage cellulaire par l'anticorps anti PARP clivée en immunohistochimie.

	Cellules témoins (T) p/N			Cellules traitées (Tx) p/N		
	1 ^{er} niveau	2 ^{ème} niveau	3 ^{ème} niveau	1 ^{er} niveau	2 ^{ème} niveau	3 ^{ème} niveau
1 ^{er} champ	0/144	0/179	1/93	8/80	17/90	2/42
2 ^e champ	2/142	0/171	1/135	3/73	12/75	11/97
3 ^e champ	0/115	1/188	1/165	12/111	21/88	5/74
4 ^e champ	1/89	1/119	1/137	8/105	28/117	14/100
5 ^e champ	0/81	1/183	1/149	5/66	13/88	10/86
6 ^e champ	0/111	0/150	1/110	5/62	14/74	6/92
7 ^e champ	1/123	3/168	2/166	17/84	26/129	5/53
8 ^e champ	0/120	0/162	1/160	17/110	10/93	9/61
9 ^e champ	0/78	1/138	0/144	6/82	13/78	14/110
10 ^e champ	2/133	1/166	1/154	6/95	19/114	10/79
Total champs	6/1136	8/1624	10/1413	87/868	173/946	86/794
Indice apoptotique.	0,57%			13,2%		

p = nombre de cellules présentant un signal nucléaire et N = nombre de cellules totales

Tableau IX-d : Indices apoptotiques calculés à partir du marquage cellulaire par l'anticorps anti M30 en immunohistochimie.

	Cellules témoins (T) k/N			Cellules traitées (Tax) k/N		
	1 ^{er} niveau	2 ^{ème} niveau	3 ^{ème} niveau	1 ^{er} niveau	2 ^{ème} niveau	3 ^{ème} niveau
1 ^{er} champ	2/148	1/162	1/194	13/65	23/119	16/66
2 ^e champ	1/185	3/178	0/185	19/91	12/91	18/79
3 ^e champ	2/172	1/155	3/122	18/74	18/100	28/116
4 ^e champ	2/178	1/157	1/145	16/85	17/99	13/114
5 ^e champ	1/106	2/83	1/101	29/118	12/73	10/93
6 ^e champ	0/115	0/77	0/158	13/89	24/125	22/134
7 ^e champ	0/135	0/167	0/110	23/97	28/134	16/98
8 ^e champ	1/135	0/146	1/117	15/95	34/143	10/51
9 ^e champ	1/91	1/157	0/88	22/80	19/133	17/83
10 ^e champ	1/72	0/84	1/186	17/72	20/85	29/121
Total champs	11/1337	9/1366	8/1406	185/866	207/1102	179/955
Indice apoptotique.	0,68%			19,5%		

k=nombre de cellules présentant un marquage cytoplasmique et N=nombre de cellules totales

I-4-Résultats de la technique TUNEL.

La technique TUNEL entraîne un marquage intense, noir des cellules en apoptose Les résultats sont résumés dans le tableau IX-e, notés sous forme m/T (m = nombre de cellules présentant un signal dense ; T = nombre de cellules totales). (photo 9a et 9b)

Au sein de la population cellulaire non traitée, certaines cellules en amas présente un marquage dense nucléaire. (photo 9c)

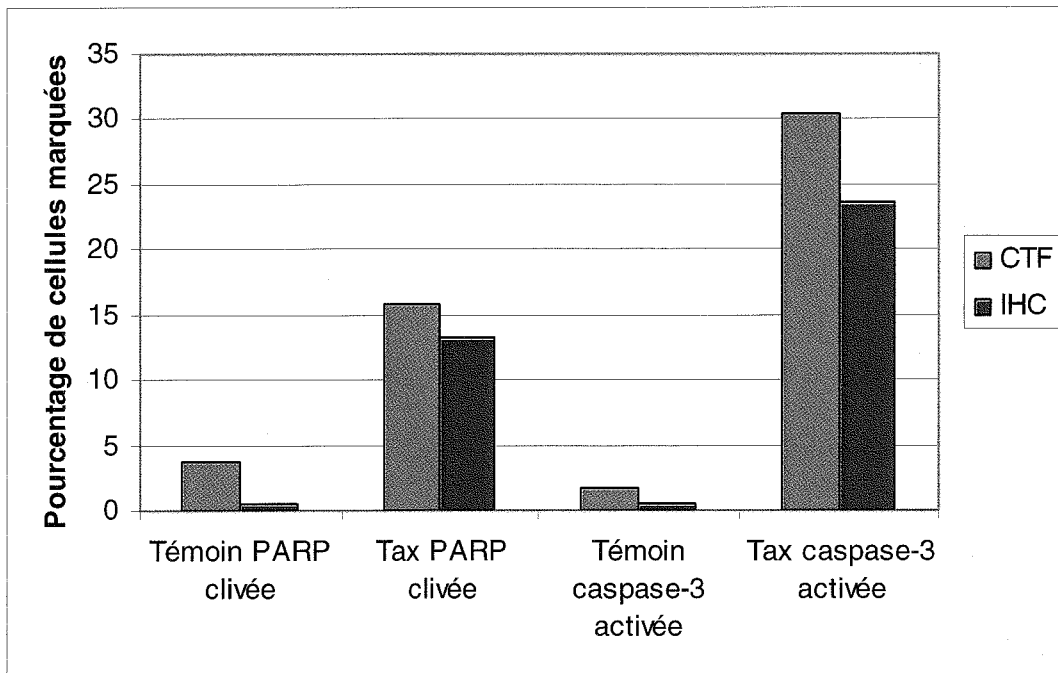
Tableau IX-e : Indices apoptotiques calculés à partir du marquage cellulaire par la technique TUNEL.

	Cellules témoins (T) m/N			Cellules traitées (Tax) m/N		
	1 ^{er} niveau	2 ^{ème} niveau	3 ^{ème} niveau	1 ^{er} niveau	2 ^{ème} niveau	3 ^{ème} niveau
1 ^{er} champ	21/143	3/98	3/120	16/83	19/95	14/52
2 ^e champ	6/99	19/149	17/162	18/102	11/86	12/77
3 ^e champ	19/105	23/168	7/127	24/98	9/47	12/47
4 ^e champ	18/157	15/206	10/97	16/75	14/84	22/124
5 ^e champ	15/172	18/121	7/157	12/71	12/58	12/45
6 ^e champ	28/180	20/140	9/165	20/102	17/63	27/114
7 ^e champ	18/177	17/132	11/71	17/81	16/70	10/59
8 ^e champ	15/181	16/151	8/110	18/86	19/76	19/68
9 ^e champ	13/150	15/97	7/114	13/73	12/59	16/70
10 ^e champ	8/149	15/119	24/151	24/97	21/79	11/54
Total champs	161/1513	160/1381	102/1274	178/868	150/717	155/710
Indice apoptotique.	10,12%			21,04%		

m = nombre de cellules présentant un signal nucléaire ; T = nombre de cellules totales

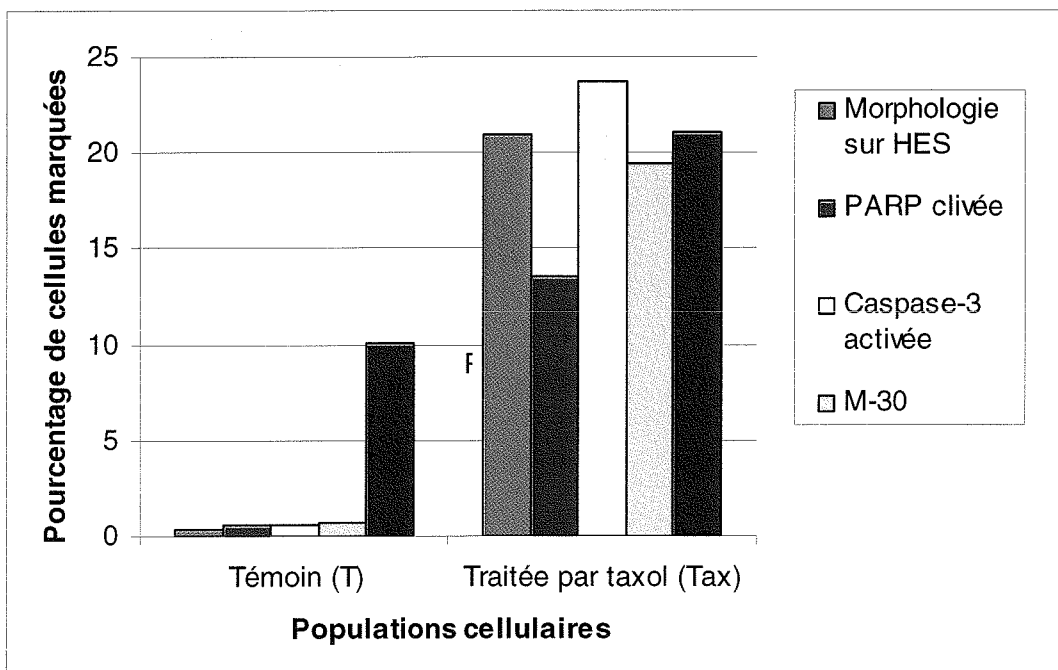
I-5- Récapitulatifs des indices apoptotiques en fonction des techniques.

Graphique II : Comparaison des indices apoptotiques obtenus en cytométrie en flux et en immunohistochimie.



CTF : cytométrie en flux ; IHC : immunohistochimie.
Tax : population cellulaire traitée par taxol.

Graphique III : Comparaison des indices apoptotiques calculés à partir des techniques immunohistochimiques, TUNEL et de la morphologie.



II-Etude de l'influence du bortezomib sur la croissance tumorale dans les tumeurs gliales xénogreffées chez la souris nude.

II-1- Résultats généraux de l'étude.

Une tumeur a été greffée par souris sur un nombre total de 47 animaux répartis en huit groupes distincts : les groupes « B » concernent les souris ayant été traitées par bortezomib, les groupes « C » concernent les souris ayant eu des injections de sérum physiologique. Les nombres 3, 5, 8 et 10 déterminent le nombre d'injections reçues. Au total 47 souris ont été greffées (une tumeur par souris) : 23 tumeurs ont servi de témoins (groupe contrôle « C ») et 24 tumeurs ont été traitées par bortezomib (groupe traité « B »).

Tableau X-a : Récapitulatif des données d'inclusion.

Groupe	Nombre de souris incluses (tumeurs)	Nombre de souris décédées	Nombre de tumeurs évaluables	Volume médian à J0* (mm ³)
C3	5	0	5	233
C5	6	0	6	229
C8	6	3	3	239
C10	6	2	5	221
B3	6	0	6	221
B5	7	0	7	225
B8	5	1	4	239
B10	6	2	4	227

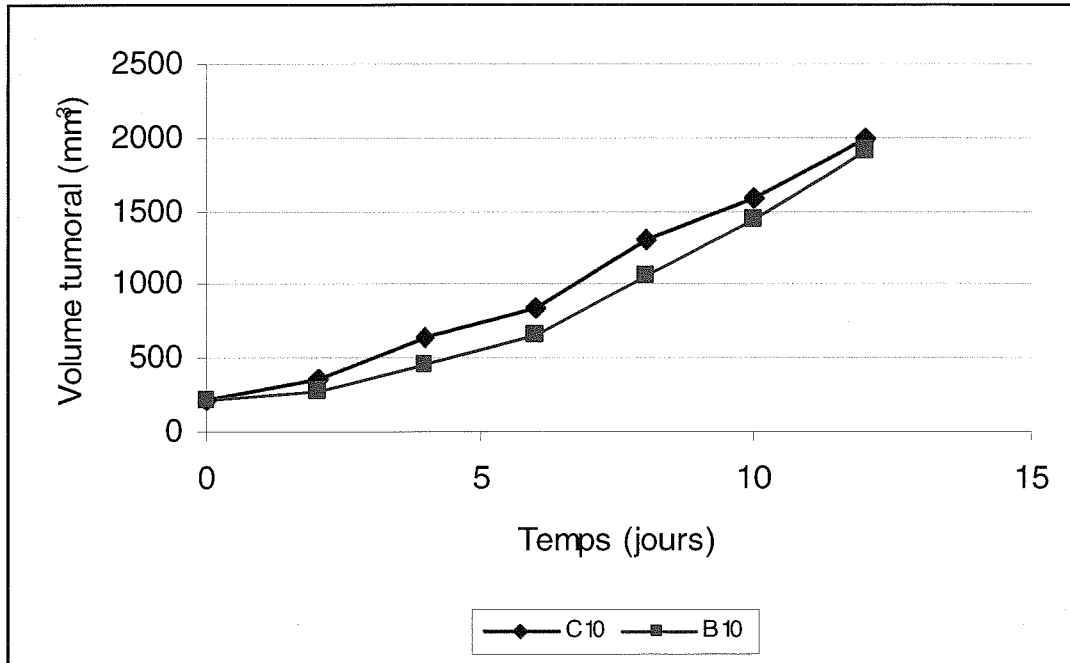
* J0 : jour où le volume tumoral atteint $250 \pm 50 \text{ mm}^3$ = jour où le traitement débute.

- C : groupes témoins ; B : groupes traités par le bortezomib ; 3 : groupe traité par 3 injections, 5 : 5 injections, 8 : 8 injections et 10 : 10 injections.

II-2-Résultats de l'étude de l'évolution du volume tumoral.

L'évolution des volumes tumoraux est représentée par le graphique n°IV en fonction des volumes médians afin d'obtenir deux courbes régulières, pour une analyse plus facile.

Graphique IV : Influence du bortezomib sur l'évolution du volume médian des tumeurs xénogreffées.



*n = nombre de tumeurs par groupe : C10 n = 5 ; B10 n = 4.
 C10 : groupe traité par 10 injections de sérum physiologique.
 B10 : groupe témoin traité par 10 injections de bortezomib.*

L'étude des volumes tumoraux des tumeurs U87 xénogreffées ne permet pas de mettre en évidence une différence de croissance significative entre les groupes traité et témoin après 10 injections (groupes B10 et C10). Ceci est également observé pour l'ensemble des groupes traités et témoins après 3, 5 et 8 injections (groupes B3/C3, B5/C5 et B8/C8).

II-3-Etude morphologique sur coloration standard HES.

Pour chaque tumeur, une semi-quantification de la nécrose est effectuée (photo n°10), classant chaque lésion en fonction du pourcentage de nécrose par rapport à la surface totale. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau X-b.

Tableau X-b : Evaluation du pourcentage des territoires de nécrose dans les différents groupes.

	C3	C5	C8	C10	B3	B5	B8	B10
Nombre de tumeur total	5	6	3	4	6	7	4	4
Evaluation de la nécrose pour chaque tumeur.	-n ₁ = I -n ₂ = II -n ₃ = I -n ₄ = I -n ₅ = III	-n ₁ = 0 -n ₂ = II -n ₃ = III -n ₄ = III -n ₅ = II -n ₆ = III	-n ₁ = III -n ₂ = III -n ₃ = III	-n ₁ = IV -n ₂ = III -n ₃ = III -n ₄ = III	-n ₁ = I -n ₂ = I -n ₃ = I -n ₄ = II -n ₅ = III -n ₆ = II	-n ₁ = III -n ₂ = III -n ₃ = III -n ₄ = I -n ₅ = III -n ₆ = III -n ₇ = I	-n ₁ = III -n ₂ = III -n ₃ = IV -n ₄ = III	-n ₁ = III -n ₂ = III -n ₃ = IV -n ₄ = III
Score moyen de nécrose.	1,5	2,16	3	3,25	1,6	2,42	3,25	3,25
Nombre de tumeurs exclues.*	0	0	0	1	0	0	1	1

*Tumeurs totalement nécrosées dont les activités apoptotiques et prolifératives ne peuvent être évaluées.

- **C** : groupes témoins ; **B** : groupes traités par le bortezomib ; **3** : groupes traités par 3 injections, **5** : 5 injections, **8** : 8 injections et **10** : 10 injections.

L'étude statistique réalisée ne permet pas de mettre en évidence une différence significative du score de nécrose moyen entre les groupes traités et non traités après le même nombre de jours de traitement. (P>0,05)

Par contre une différence significative du score de nécrose est observée entre les groupes en début de traitement (C3, B3, C5 et B5) et les groupes en fin de traitement (C8, B8, C10, B10).

Au total, 36 tumeurs ont pu faire l'objet d'une évaluation de leur activité apoptotique et proliférative par étude immunohistochimique à l'aide des anticorps anti Ki-67 et caspase-3 activée.

II-4-Etude immunohistochimique de l'activité apoptotique : caspase-3 activée.

Le signal obtenu avec l'anticorps anti caspase-3 activé est cytoplasmique (voir photo 11a et 11b).

Les résultats obtenus sont résumés dans les tableaux X-c et X-d.

Tableau X-c : Résultats des indices apoptotiques pour chaque tumeur dans les groupes contrôles.

	C3	C5	C8	C10
Indice apoptotique pour chaque tumeur.	-n ₁ = 1,5% -n ₂ = 2,0% -n ₃ = 3,0% -n ₄ = 1,2% -n ₅ = 0,6%	-n ₁ = 1,5% -n ₂ = 1,2% -n ₃ = 1,2% -n ₄ = 0,5% -n ₅ =0,8% -n ₆ = 1,4%	-n ₁ = 1,5% -n ₂ = 0,2% -n ₃ = 0,3%	-n ₂ = 0,3% -n ₃ = 0,4% -n ₄ = 0,2%
Indice apoptotique moyen	1,6%	1,1%	0,6%	0,3%
Ecart Type	0,90	0,37	0,72	0,1

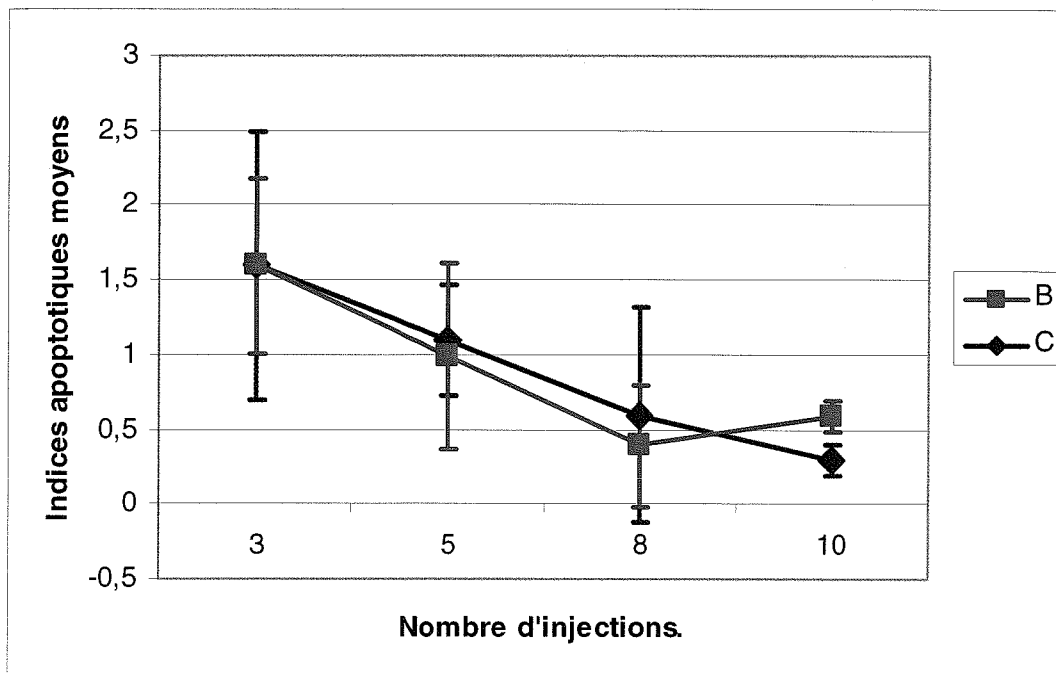
C : groupes témoins, 3 : groupe traité par 3 injections de sérum physiologique, 5 : 5 injections, 8 : 8 injection et 10 : 10 injections.

Tableau X-d : Résultats des indices apoptotiques moyens pour chaque tumeur dans les groupes traités.

	B3	B5	B8	B10
Indice apoptotique pour chaque tumeur.	-n ₁ = 2,3%	-n ₁ = 0,2%	-n ₁ = 0,9%	-n ₁ = 0,5%
	-n ₂ = 2,4%	-n ₂ = 1,3%	-n ₂ = 0,1%	-n ₂ = 0,7%
	-n ₃ = 1,8%	-n ₃ = 0,7%	-n ₄ = 0,3%	-n ₄ = 0,6%
	-n ₄ = 0,9%	-n ₄ = 1,0%		
	-n ₅ = 1,5%	-n ₅ = 0,5%		
	-n ₆ = 1,2%	-n ₆ = 2,1%	-n ₇ = 1,3%	
Indice apoptotique moyen.	1,6%	1,0%	0,4%	0,6%
Ecart type	0,59	0,62	0,41	0,1

B : groupes traités par le bortezomib ; *3* : groupe traité par 3 injections
5 : 5 injections, *8* : 8 injection et *10* : 10 injections.

Graphique V : Evolution de l'indice apoptotique moyen dans les groupes contrôles et traités.



C : groupes témoins ; *B* : groupes traités par le bortezomib.

L'étude statistique réalisée ne permet pas de mettre en évidence une différence significative de l'évolution de l'indice apoptotique moyen entre les groupes traités et non traités après le même nombre de jours de traitement ($P > 0,05$).

II-5-Etude immunohistochimique de la prolifération cellulaire : Ki-67.

Le signal obtenu est nucléaire, plus ou moins dense (photos 12a et 12b).

Les résultats des indices de prolifération sont résumés dans les tableaux X-e et X-f.

Tableau X-e : Résultats des indices de prolifération moyens pour chaque tumeur dans les groupes témoins.

	C3	C5	C8	C10
Pourcentage de cellules marquées pour chaque tumeur.	-n ₁ = 64,3%	-n ₁ = 76,1%	-n ₁ = 60,7%	-n ₂ = 58,8%
	-n ₂ = 63,0%	-n ₂ = 68,3%	-n ₂ = 74,3%	-n ₃ = 71,8%
	-n ₃ = 63,6%	-n ₃ = 64,1%	-n ₃ = 67,0%	-n ₄ = 67,3%
	-n ₄ = 72,0%	-n ₄ = 69,0%		
	-n ₅ = 75,7%	-n ₅ = 71,6%		
		-n ₆ = 82,9%		
Pourcentage moyen.	67,7%	72%	67,3%	65,9%
Ecart type	5,76	6,64	6,85	6,60

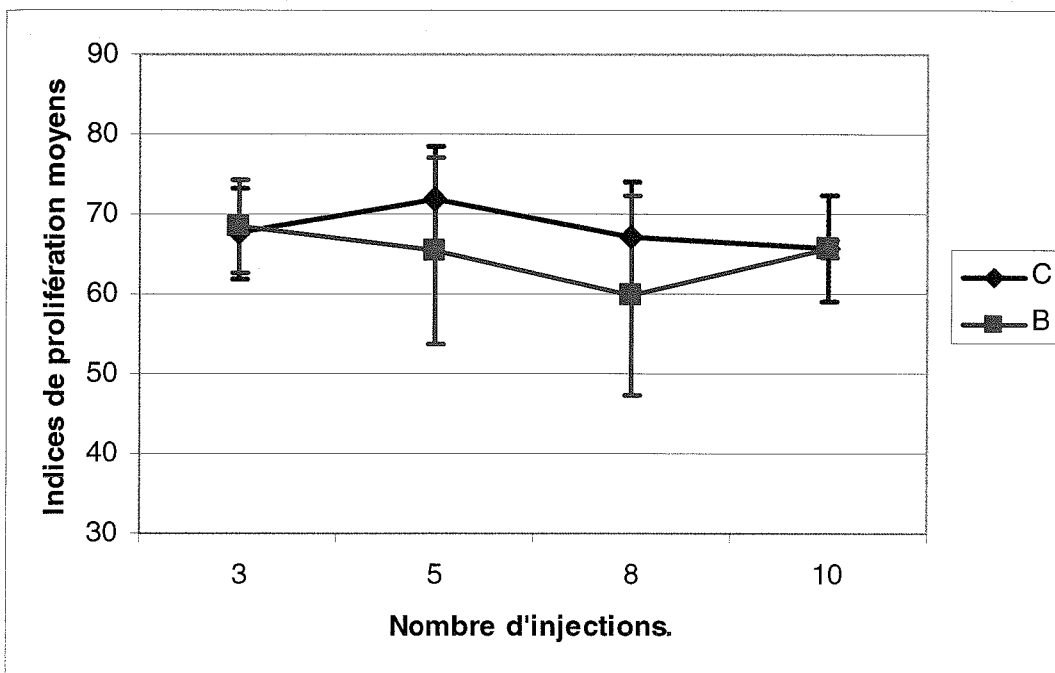
C : groupes témoins ; 3 : groupe traité par 3 injections de sérum physiologique, 5 : 5 injections, 8 : 8 injection et 10 : 10 injections.

Tableau X-f : Résultats des indices de prolifération moyens pour chaque tumeur dans les groupes traités.

	B3	B5	B8	B10
Pourcentage de cellules marquées pour chaque tumeur.	-n ₁ = 73,5%	-n ₁ =54,7%	-n ₁ = 50,7%	-n ₁ = 67,0%
	-n ₂ = 68,8%	-n ₂ = 56,9%	-n ₂ = 74,3%	-n ₂ = 65,8%
	-n ₃ = 72,7%	-n ₃ = 50,1%	-n ₄ = 55,2%	-n ₄ = 64,7%
	-n ₄ = 64,3%	-n ₄ = 76,8%		
	-n ₅ = 59,5%	-n ₅ =79,3%		
	-n ₆ = 73,2%	-n ₆ = 68,2%		
	-n ₇ = 73,5%			
Pourcentage moyen.	68,6%	65,6%	60,0%	65,8%
Ecart type	5,71	11,64	12,53	1,15

*B : groupes traités par le bortezomib ; 3 : groupe traité par 3 injections
5 : 5 injections, 8 : 8 injection et 10 : 10 injections.*

Graphique VI : Evolution de l'indice de prolifération moyen dans les groupes contrôles et traités.



C : groupes témoins ; B : groupes traités par le bortezomib.

L'étude statistique réalisée ne permet pas de mettre en évidence une différence significative de l'évolution de l'indice de prolifération moyen entre les groupes traités et non traités après le même nombre de jours de traitement ($P > 0,05$).

PLANCHE II

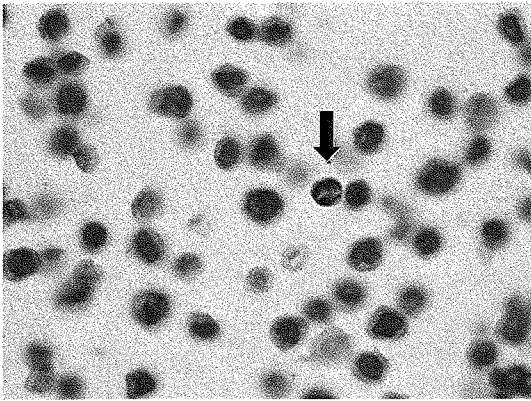


Photo 5 a : Etude morphologique de la population cellulaire non traitée
Présence d'une cellule apoptotique repérée par la flèche. (HES x1000)

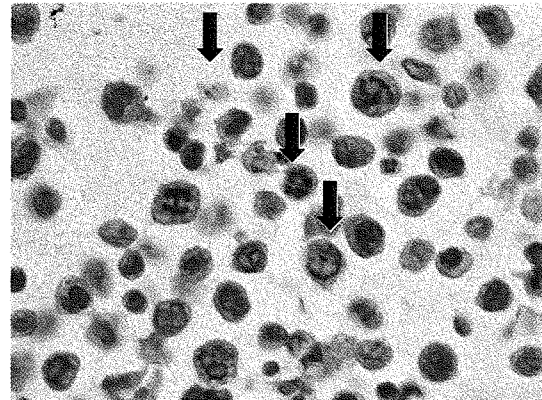


Photo 5 b : Etude morphologique de la population cellulaire traitée
Présence de plusieurs cellules apoptotiques repérées par les flèches. (HES x1000)

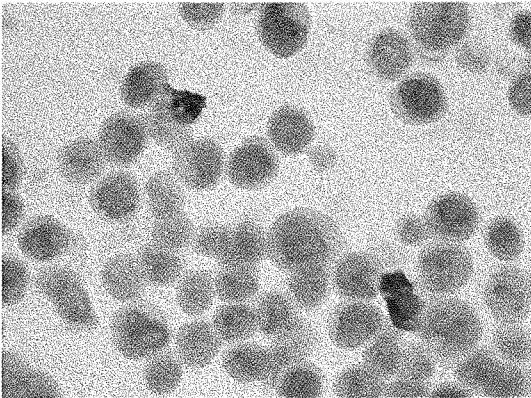


Photo n°6a : Détection de l'antigène caspase-3 activée en immunohistochimie sur cellules en culture non traitées (x1000).

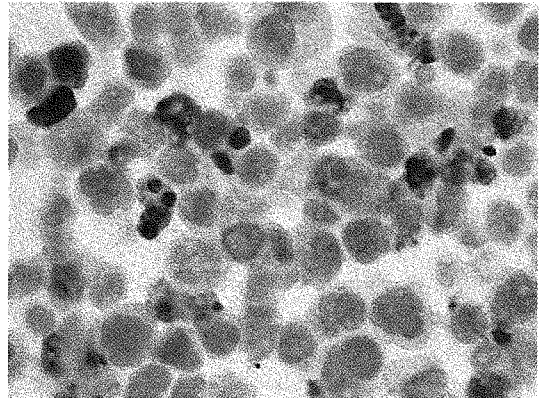


Photo n°6b : Détection de l'antigène caspase-3 activée en immunohistochimie sur cellules en culture traitées par taxol (x1000).

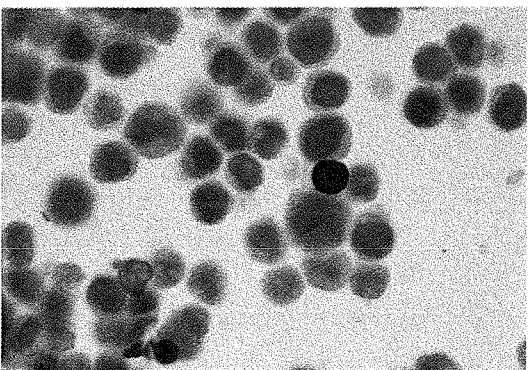


Photo n°7a : Détection de l'antigène M 30 en immunohistochimie sur cellules en culture non traitées (x1000)

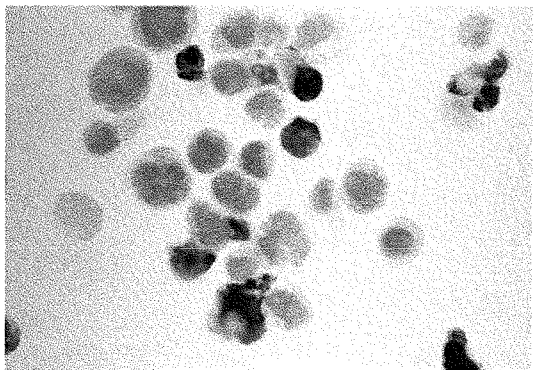


Photo n°7b : Détection de l'antigène M 30 en immunohistochimie sur cellules en culture traitées par taxol (x1000)

PLANCHE III

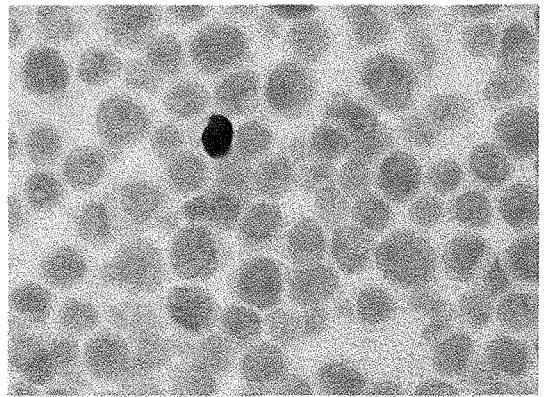


Photo n°8a : Détection de l'antigène PARP clivée en immunohistochimie sur cellules en culture non traitées (x1000)

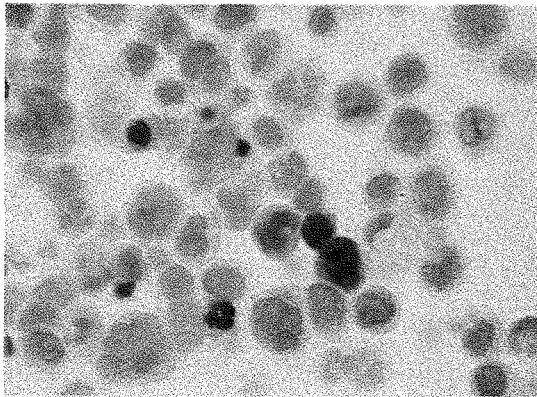


Photo n°8b : Détection de l'antigène PARP clivée en immunohistochimie sur cellules en culture traitées par taxol (x1000).

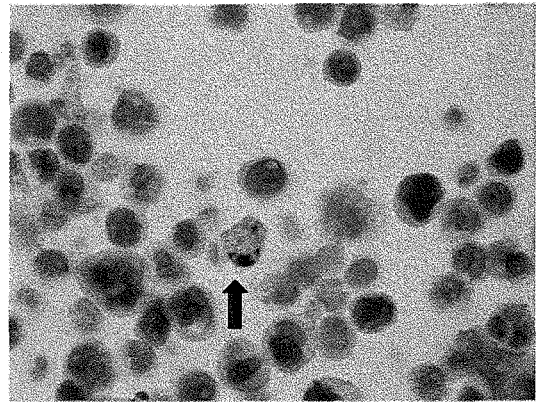


Photo n°8c : Détection de l'antigène PARP clivée en immunohistochimie sur cellules en culture traitées par taxol. Absence de signal en apoptose (x1000).

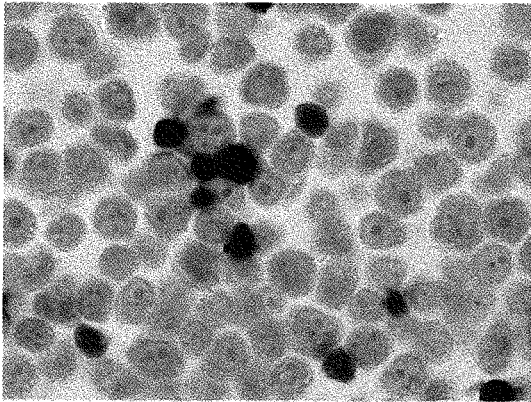


Photo n°9a : Détection des cellules apoptotiques par la méthode TUNEL sur cellules en culture non traitées. (x1000)

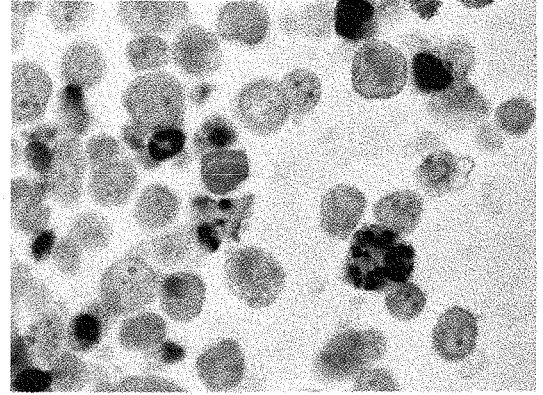


Photo n°9b : Détection des cellules apoptotiques par la méthode TUNEL sur cellules en culture traitées par taxol (x1000).

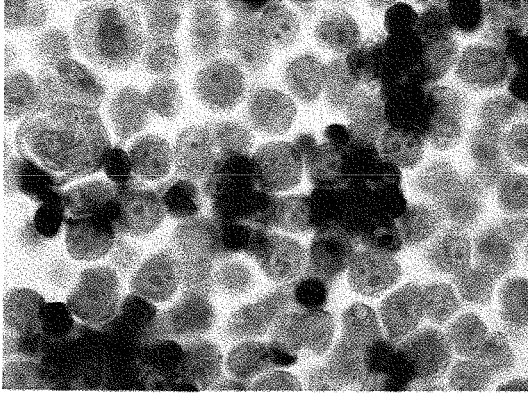


Photo n°9c : Détection des cellules apoptotiques par la méthode TUNEL sur cellules en culture non traitées. Visualisation de nombreuses cellules marquées en amas. (x1000)

PLANCHE IV

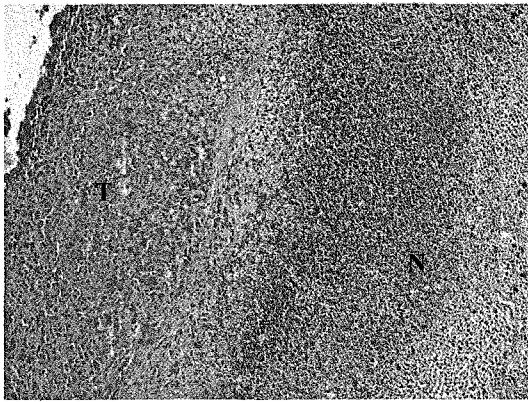


Photo n° 10 : Présentation morphologique d'une tumeur gliale greffée non traitée. (T : tumeur solide, N : nécrose) (HES x 200)

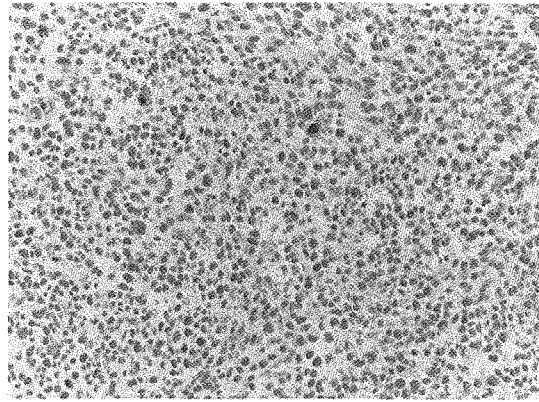


Photo n° 11a : Détection de l'antigène caspase-3 activée au sein d'une tumeur gliale greffée non traitée. (x 200)

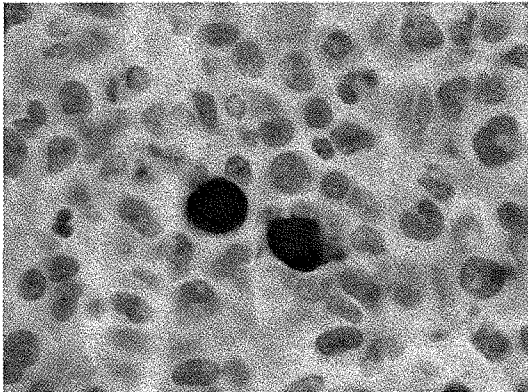


Photo n° 11b : Détection de l'antigène caspase-3 activée au sein d'une tumeur gliale greffée traitée par le bortezomib. (x 1000)



Photo n° 11c : Détection de l'antigène caspase-3 activée au sein d'une tumeur gliale greffée non traitée. Mise en évidence de nombreuses cellules apoptotiques en périphérie de la nécrose. T : tumeur solide, N : nécrose. (x 200)

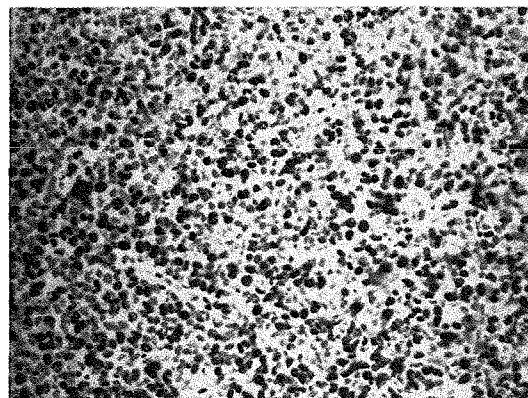


Photo n° 12a : Détection de l'antigène Ki-67 au sein d'une tumeur gliale greffée non traitée. (x 200)

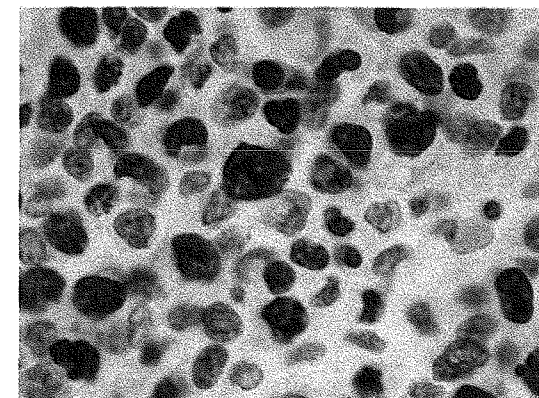


Photo n° 12b : Détection de l'antigène Ki-67 au sein d'une tumeur gliale greffée traitée. (x 1000)

QUATRIEME PARTIE

DISCUSSION

L'utilisation de doses d'irradiations élevées pour le traitement des tumeurs n'est pas réalisable en clinique, en raison de la mauvaise tolérance des tissus sains. L'administration concomitante d'agents de chimiothérapie susceptibles de potentialiser l'effet antitumoral des radiations ionisantes, sans aggraver leur toxicité, constitue une alternative attractive. Pour cela, il est indispensable d'identifier des cibles thérapeutiques pouvant intervenir dans la réponse à la radiothérapie. L'apoptose occupe une place importante dans la réponse de certaines cellules tumorales (cellules leucémiques ou lymphomes) aux médicaments anticancéreux. Le fait que des agents anticancéreux soient capables d'induire la mort par apoptose sur de nombreuses lignées de cellules tumorales issues de tumeurs solides en culture suggère par ailleurs que l'utilisation de tels agents inducteurs devrait permettre d'améliorer l'efficacité de la radiothérapie. Savoir si l'apoptose est bien la mort cellulaire induite dans les cellules tumorales des tumeurs solides par les agents cytotoxiques lorsqu'ils sont utilisés en thérapeutique humaine reste cependant débattu. En effet, la machinerie apoptotique est la cible de nombreuses mutations participant au développement tumoral de telle sorte que de nombreuses cellules tumorales en particuliers dans les tumeurs solides sont intrinsèquement résistantes à l'apoptose.

Le protéasome est un complexe multienzymatique responsable de la dégradation de nombreuses protéines cellulaires polyubiquitinylées. Sa structure est très propice à un ciblage pharmacologique par des molécules, dont le bortezomib (PS-341), affines et extrêmement spécifiques de l'activité catalytique du protéasome. Il peut paraître à première vue illogique d'espérer détruire sélectivement les cellules tumorales avec ces produits et ce d'autant que les protéines cibles des activités protéolytiques du protéasome appartiennent à des voies métaboliques très diverses. Cependant, des études initiales réalisées *in vitro* avec le bortezomib démontre sa capacité d'induire l'apoptose de cellules tumorales, surtout issues d'hémopathies lymphoïdes (myélome, lymphome) en culture.[97]

Le rôle du protéasome dans la réponse à la radiothérapie reste mal connu. Un certain nombre d'arguments expérimentaux suggèrent que le système ubiquitine/protéasome intervient dans les réponses moléculaire et cellulaire à l'irradiation.[98] D'une part, l'activité du protéasome est très sensible aux variations minimales du statut redox de la cellule, variations pouvant être causées par une irradiation. De ce fait, certains auteurs présentent le système ubiquitine/protéasome comme un détecteur du stress oxydatif servant à déclencher une réponse adaptée.[98] D'autre part, il a été démontré que le protéasome 26S est lui-même une

cible directe de l'irradiation. En effet, lorsque le protéasome 26S est soumis *in vitro* à des doses de radiations ionisantes < 2 Gy, son activité protéolytique est réduite de 40 % .Par ailleurs, la plupart des protéines clés qui contrôlent la progression dans le cycle cellulaire (*p21, cyclines A, D et E, p53, mdm2, ...*), la transcription de l'ADN (*couple IκBα/NF-kappaB, p53, AP-1*), la réparation de l'ADN (*DNA-PKcs*), et l'apoptose (*p53, Bcl-2, Bax, caspase-3*) notamment après irradiation sont elles-mêmes dégradées par le protéasomes 26S.[99] Enfin, *in vitro*, l'exposition de cellules irradiées à un inhibiteur de protéasome, le MG-132, conduit à une augmentation de l'activité cytotoxique de la radiothérapie . *In vivo*, des résultats similaires ont été obtenus avec le bortezomib, autre inhibiteur du protéasome, lorsque des greffes de carcinome mammaire murin et des carcinomes colo-rectaux humains étaient irradiées avec une seule fraction d'irradiation > 5 Gy .[98]

En vue de mieux comprendre ces faits, une étude de radiopotentialisation *in vivo* par le bortezomib, faisant appel à un modèle pré clinique de gliome malin, a été initiée au sein de l'EA 4001 : Radiopotentialisation : de la préclinique à la clinique. Cette étude comporte :

- 1) l'analyse des effets de l'administration du médicament sur l'activité protéolytique du protéasome 26S et ce, après 1 fraction d'irradiation (pour référence) ou 5 fractions d'irradiation.
- 2) l'analyse comparée de l'activité du médicament administré seul ou conjointement à la radiothérapie fractionnée.
- 3) une étude des altérations de certaines voies métaboliques impliquées dans les remaniements éventuellement observés.

Notre participation à cette recherche a consisté en la mise en place des techniques nécessaires à la détection de l'apoptose sur coupes tissulaires dans ces modèles et dans l'étude des effets du bortezomib administré seul sur la croissance tumorale et l'éventuelle régression tumorale sous traitement.

La première partie de notre travail a consisté à tester différentes méthodes de mise en évidence de l'apoptose sur coupes de greffons tumoraux fixés au formaldéhyde et inclus dans de la paraffine. Pour ce faire nous avons utilisé comme modèle des coupes de culots de centrifugation de cellules HT29 en culture, fixés et inclus dans de la paraffine, l'apoptose dans ces cultures étant préalablement induite de façon synchrone et reproductible par le taxol, un médicament stabilisateur des microtubules polymérisés.[68] Dans la mesure où la condensation et la fragmentation nucléaire sont des événements tardifs et brefs dans le processus d'apoptose, et parce que la reconnaissance en histologie standard des cellules apoptotiques peut faire l'objet de difficultés, les méthodes de détection de l'apoptose faisant appel à la mise en évidence d'évènements biologiques spécifiques autres que la fragmentation de l'ADN sont particulièrement utiles.

Le TUNEL est une des méthodes de détection des cassures des brins d'ADN qui surviennent pendant l'apoptose. Bien que les enzymes utilisées dans les milieux réactionnels soient différentes, les techniques ISNT et TUNEL reposent sur des principes similaires. Nous avons choisi cette dernière parce que, dans l'expérience du laboratoire, elle donne naissance aux signaux les plus intenses. Ces deux techniques sont potentiellement moins reproductibles que les méthodes immunohistochimiques classiques puisqu'elles mettent en œuvre au moins deux traitements enzymatiques successifs. De plus, le TUNEL est une technique onéreuse (Coût d'une lame en immunohistochime : 0,62 E TTC, coût d'une lame avec la méthode TUNEL : 2,65 E)

Parce que l'activation de la voie des caspases est un indicateur spécifique (mais non exclusif) de l'apoptose, la mise en évidence de produits de clivage spécifiques de proenzymes ou de protéines non enzymatiques constitue une alternative intéressante. Dans le commerce, sont disponibles des anticorps complémentaires d'épitopes générés par l'action des caspases sur la caspase 3, la cytokératine 18 et la PARP. La caspase-3 et la PARP sont exprimées par quasiment toutes les lignées cellulaires alors que l'expression de la cytokératine 18 est limitée à un plus petit nombre de lignées. La détection et la quantification des cellules apoptotiques à l'aide d'anticorps anti caspase-3 activée et anti cytokératine 18 activée a fait l'objet de plusieurs travaux rapportés dans la littérature.[76, 100] L'anticorps anti caspase-3 donne de bons résultats sur les coupes de tissus fixés au formol et inclus dans la paraffine. L'immunoréactivité est observée dans le cytoplasme de cellules présentant les altérations morphologiques classiques de l'apoptose mais également dans un certain nombre de cellules

apparemment saines qui pourraient ainsi correspondre à des cellules venant d'entrer dans le processus apoptotique. L'observation de la protéine dans les phases tardives de l'apoptose témoigne d'une certaine résistance à la dégradation. Il pourrait correspondre à la translocation nucléaire de la protéine clivée. Ce marquage a été décrit avec d'autres anticorps anti caspase que celui utilisé dans notre travail.[76]

L'anticorps polyclonal de souris que nous avons testé n'est pas spécifique d'espèce. Il est donc particulièrement bien adapté à l'étude de la croissance et de la régression tumorale dans les modèles murins du fait de l'absence de bruit de fond avec les anticorps polyclonaux d'une part et de la possibilité d'apprécier l'effet pro apoptotique des traitements sur les cellules stromales, notamment vasculaires qui, après les premiers jours sont toutes d'origine murine.

La cytokératine 18 quant à elle est exprimée dans de nombreux épithéliums stratifiés et non stratifiés. L'anticorps M30 donne lieu à un signal granulaire cytoplasmique des cellules pré apoptotiques et apoptotiques. Le produit de clivage peut être détecté dès la deuxième heure après l'induction de l'apoptose. Il atteint son maximum au bout de 4 à 6 heures. L'anticorps détecte donc des événements plus précoces que la technique TUNEL dont les indices de marquage correspondant atteignent leur maximum à la 12^{ème} heure. L'activation de la cytokératine prend place avant le début de l'hydrolyse de l'ADN. L'indice apoptotique établi à l'aide de l'anticorps M30 baisse dans les phases tardives de l'apoptose probablement par dégradation progressive de la protéine. L'anticorps M30 est spécifique d'espèce et ne reconnaît pas la cytokératine 18 murine. Nos résultats sont donc en accord avec ceux rapportés dans la littérature.[76, 101]

Notre travail est l'un des premiers à tester en culture et sur modèles pré clinique la sensibilité de la détermination de l'indice apoptotique établi à partir de la mise en évidence immuno histochimique de la PARP clivée.

Entre nos mains, le pourcentage des cellules mises en évidence par les anticorps anti caspase-3 et anti PARP activées sur coupes histologiques sont voisins quoiqu'un peu inférieurs à ceux détectés par la cytométrie en flux. L'infériorité des chiffres obtenus en immunohistochimie peut s'expliquer par le fait qu'en cytométrie en flux les débris cellulaires ou les corps apoptotiques dont la taille est supérieure à 0,8µm sont considérés comme des cellules à part entière alors qu'en immunohistochimie elles ne sont ou bien pas reconnues ou bien, si elles sont proches les unes des autres, comptées comme issues d'une même cellule. L'inversion des conséquences de la fixation formolique par hydrolyse basique des liaisons formaldéhyde

macromolécules accélérée par la chaleur peut conduire également au détachement des cellules les plus rétractées des lames portes objet.

La valeur de l'indice apoptotique dans les cultures traitées ou non par le taxol sont, en première approximation, sensiblement identiques quelque soit l'anticorps utilisés (anti Caspase-3 activés ou anti PARP activée). Notre travail ne donne pas d'indications sur la cinétique d'activation de la PARP au cours de l'apoptose. Il convient, cependant, de noter que quelques cellules présentant les remaniements typiques de l'apoptose en histologie standard n'étaient pas colorées. La localisation nucléaire de la protéine constitue par ailleurs un inconvénient. En effet, les colorations nucléaires non spécifiques sont des artéfacts fréquents lors de l'utilisation d'anticorps à des concentrations un peu élevées. Par ailleurs, le marquage nucléaire masque les altérations chromatinienne concomitantes de l'apoptose servant souvent de contrôles internes. Cette difficulté est observée également avec la technique TUNEL.

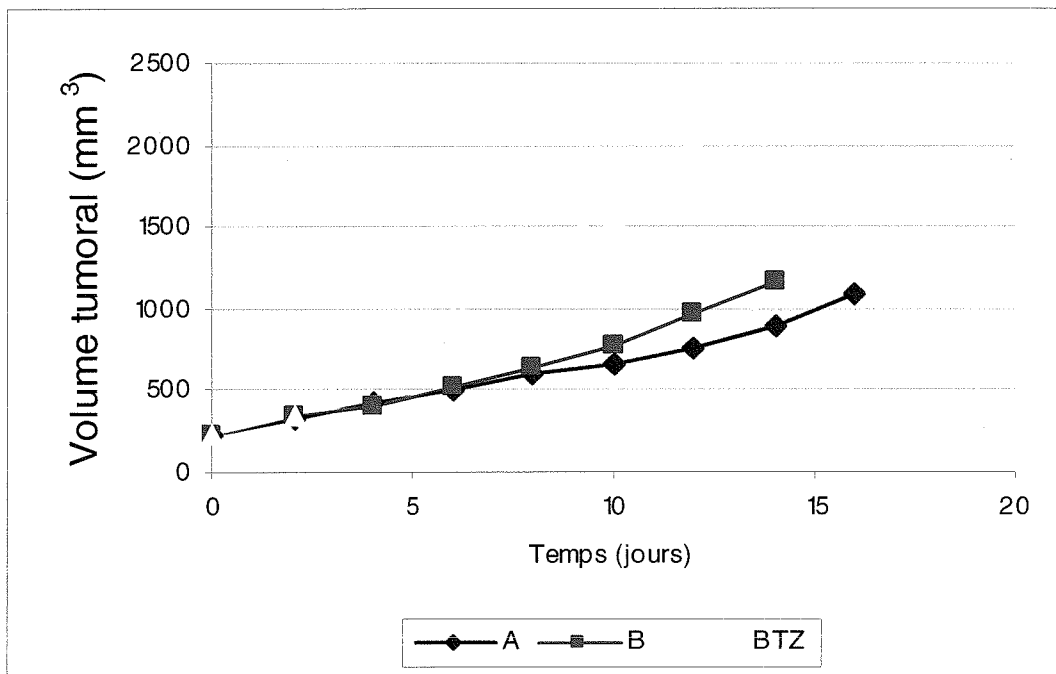
Toutes les observations décrites dans la première partie de notre travail, doivent être confirmées en multipliant ces mêmes techniques sur des populations cellulaires présentant des taux d'apoptose variables, afin de prouver la reproductibilité de nos résultats. Cependant ces premières données nous donnent déjà une indication sur les avantages et les inconvénients des différentes techniques testées. Ceux-ci sont résumés dans le tableau XI.

Tableau XI : Avantages et inconvénients des différentes techniques de détection histologique détectant l'apoptose.

		Avantages	Inconvénients
Modifications morphologiques		<ul style="list-style-type: none"> - Très bonne spécificité. - Faible coût. - Détection des apoptoses non caspase dépendante. 	<ul style="list-style-type: none"> - Stade tardif de l'apoptose. - Fastidieux
TUNEL		<ul style="list-style-type: none"> - Bonne sensibilité. 	<ul style="list-style-type: none"> - Stade tardif de l'apoptose. - Dépend des conditions techniques. - Coûteux.
IHC	Caspase-3 activée	<ul style="list-style-type: none"> - Bonne spécificité et sensibilité. - Phases précoce et tardive de l'apoptose. 	<ul style="list-style-type: none"> - Pas de détection de l'apoptose non caspase 3 dépendante.
	PARP clivée		<ul style="list-style-type: none"> - Faible sensibilité.
	Cytokératine 18 clivée (M30)	<ul style="list-style-type: none"> - Bonne sensibilité. 	<ul style="list-style-type: none"> - Non exprimé par certains types cellulaires..

En préalable à une étude de radiopotentialisation par le bortezomib dans les gliomes malins humains, nous avons étudié l'effet du bortezomib sur la croissance et l'éventuelle régression de xénogreffes chez la souris nude. Ces dernières ont été établies à partir de la lignée U87, une lignée de glioblastome humain bien caractérisée, connue pour exprimer la caspase-3. Ce modèle s'est caractérisé par une croissance très rapide avec le développement progressif d'une nécrose de coagulation (voir graphique VII). Comme nous l'avons constaté, l'importance de la nécrose n'est pas corrélée à l'administration du bortezomib, mais à l'augmentation des volumes tumoraux. Celle-ci étant aussi importante dans les groupes témoins et traités en fin de traitement. Cette constatation est en accord avec les données de la littérature qui démontrent l'importance de l'hypoxie dans les tumeurs gliales xénogreffées lorsque les vaisseaux sont trop distants les uns des autres.[89]

Graphique VII : Comparaison de la croissance du volume tumoral des groupes témoins au cours de trois études différentes avec la lignée U87.



Etude A et B : autres études. ; BTZ : étude bortezomib, correspondant à notre étude.

Le traitement par le bortezomib s'est révélé inactif sur la croissance tumorale. Une étude immunohistochimique à l'aide de l'anticorps anti caspase-3 activée a démontré la présence d'une densité élevée de cellules marquées au contact de la nécrose ischémique. Par analogie avec les connaissances acquises en pathologie myocardique, il est possible de rattacher

l'apoptose périnérotique à l'ischémie et non à l'effet direct de la chimiothérapie.[102] C'est la raison pour laquelle nous n'avons compté dans notre travail que les cellules marquées situées à distance des territoires nécrosés. Ainsi compté, nous n'avons pas observé de différences significatives entre les indices apoptotiques des groupes d'animaux traités ou non traités. Il n'a pas par ailleurs été reconnu de différences dans la cinétique de prolifération telle qu'apprécier par la mise en évidence de la protéine Ki-67.

Savoir si la nécrose s'explique pour partie par une apoptose préférentielle des cellules du lit microcirculatoire nécessiterait la mise en œuvre de techniques immunohistochimiques en fluorescence couplant la détection des cellules endothéliales par un anticorps anti CD31 par exemple et celle de la caspase-3 activée. La lignée U 87 s'est révélée résistante au taxol en culture. Le mode d'action de ce dernier médicament est très différent de celui supposé du bortezomib. Il serait important de comprendre les mécanismes de cette résistance.

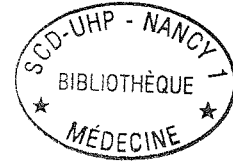
L'absence de réponse au bortezomib ne démontre pas que ce dernier ne puisse, dans ce modèle, exercer un effet radiopotentialisant. Il paraît souhaitable, cependant, d'étudier l'effet antitumoral de ce médicament dans d'autres modèles de gliome malin de façon à disposer de modèles sensibles.

CONCLUSION

La première partie de notre travail permet de déterminer que l'utilisation de l'anticorps anti caspase-3 activée est actuellement une des meilleures techniques dont nous disposons pour détecter le processus apoptotique sur coupe tissulaire : nous avons en effet montré la bonne sensibilité de notre anticorps quant à la détection de cette protéine lorsqu'elle est exprimée. De plus, selon les connaissances actuelles, il s'agit d'une des principales molécules intervenant précocément dans la transduction du signal lors du processus apoptotique, lorsque celui-ci est caspase-3 dépendant.

D'autres séries, comparant les différentes techniques de détection de l'apoptose seront réalisées afin de confirmer nos premières observations. De plus, d'autres paramètres peuvent également être modifiés tels que la diversité des populations cellulaires et la méthode d'induction de l'apoptose, pour ne pas méconnaître d'autres voies d'activation de ce processus, ce qui pourrait redonner un intérêt aux autres techniques de détection de la mort cellulaire par apoptose.

En ce qui concerne l'efficacité du bortezomib sur les tumeurs gliales, notre étude ne met pas en évidence d'inhibition de la croissance tumorale. Cependant, d'autres essais doivent être réalisés, en utilisant des modèles de gliomes malins dont la croissance tumoral est plus lente, et en y associant la radiothérapie, pour en potentialiser les effets.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 - Chinot O. (2005) [New place of the chemotherapy in gliomas], *Bull Cancer* 92, 343-54
- 2 - Ohgaki H and Kleihues P. (2005) Epidemiology and etiology of gliomas, *Acta Neuropathol (Berl)* 109, 93-108
- 3 - Behin A, Hoang-Xuan K, Carpentier AF and Delattre JY. (2003) Primary brain tumours in adults, *Lancet* 361, 323-31
- 4 - Figarella-Branger D and Bouvier C. (2005) [Histological classification of human gliomas: state of art and controversies], *Bull Cancer* 92, 301-9
- 5 - Miquel C. (2004) in *Mémento de pathologie* (Vernazobres-Grego E, ed.), pp. 384-398
- 6 - He J, Mokhtari K, Sanson M, Marie Y, Kujas M, Huguet S, Leuraud P, Capelle L, Delattre Jy, Poirier J and Hoang-Xuan K. (2001) Glioblastomas with an oligodendroglial component: a pathological and molecular study, *J Neuropathol Exp Neurol* 60, 863-71
- 7 - Daumas-Duport C. (1992) Histological grading of gliomas, *Curr Opin Neurol Neurosurg* 5, 924-31
- 8 - Coons SW, Johnson PC, Scheithauer BW, Yates AJ and Pearl DK. (1997) Improving diagnostic accuracy and interobserver concordance in the classification and grading of primary gliomas, *Cancer* 79, 1381-93
- 9 - Mittler Ma, Walters Bc and Stopa Eg. (1996) Observer reliability in histological grading of astrocytoma stereotactic biopsies, *J Neurosurg* 85, 1091-4
- 10 - Daumas-Duport C, Varlet P, Tucker Ml, Beuvon F, Cervera P and Chodkiewicz JP. (1997) Oligodendrogliomas. Part I: Patterns of growth, histological diagnosis, clinical and imaging correlations: a study of 153 cases, *J Neurooncol* 34, 37-59
- 11 - Daumas-Duport C, Tucker ML, Kolles H, Cervera P, Beuvon F, Varlet P, Udo N, Koziak M and Chodkiewicz JP. (1997) Oligodendrogliomas. Part II: A new grading system based on morphological and imaging criteria, *J Neurooncol* 34, 61-78
- 12 - Hoang-Xuan K, Idbah A, Mokhtari K and Sanson M. (2005) [Towards a molecular classification of gliomas], *Bull Cancer* 92, 310-6
- 13 - Watanabe K, Tachibana O, Sata K, Yonekawa Y, Kleihues P and Ohgaki H. (1996) Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas, *Brain Pathol* 6, 217-23; discussion 23-4
- 14 - Bouvier-Labit C, Chinot O, Ochi C, Gambarelli D, Dufour H and Figarella-Branger D. (1998) Prognostic significance of Ki67, p53 and epidermal growth factor receptor immunostaining in human glioblastomas, *Neuropathol Appl Neurobiol* 24, 381-8
- 15 - Kleihues P and Ohgaki H. (1999) Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis, *Neuro-oncol* 1, 44-51

- 16 - Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB and Herman JG. (2000) Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents, *N Engl J Med* 343, 1350-4
- 17 - Godfraind C, Rousseau E, Ruchoux MM, Scaravilli F and Vikkula M. (2003) Tumour necrosis and microvascular proliferation are associated with 9p deletion and CDKN2A alterations in 1p/19q-deleted oligodendrogliomas, *Neuropathol Appl Neurobiol* 29, 462-71
- 18 - Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, Lisle DK, Finkelstein DM, Hammond RR, Silver JS, Stark PC, Macdonald Dr, Ino Y, Ramsay DA and Louis DN. (1998) Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas, *J Natl Cancer Inst* 90, 1473-9
- 19 - Hoang-Xuan K, Capelle L, Kujas M, Taillibert S, Duffau H, Lejeune J, Polivka M, Criniere E, Marie Y, Mokhtari K, Carpentier AF, Laigle F, Simon JM, Cornu P, Broet P, Sanson M and Delattre JY. (2004) Temozolomide as initial treatment for adults with low-grade oligodendrogliomas or oligoastrocytomas and correlation with chromosome 1p deletions, *J Clin Oncol* 22, 3133-8
- 20 - Karim AB, Afra D, Cornu P, Bleehan N, Schraub S, De Witte O, Darcel F, Stenning S, Pierart M and Van Glabbeke M. (2002) Randomized trial on the efficacy of radiotherapy for cerebral low-grade glioma in the adult: European Organization for Research and Treatment of Cancer Study 22845 with the Medical Research Council study BRO4: an interim analysis, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 52, 316-24
- 21 - Perilongo G. (2005) Consideration on the role of chemotherapy and modern radiotherapy in the treatment of childhood low grade glioma., *J Neurooncol* 75, 301-307
- 22 - Sawaya R. (1999) Extent of resection in malignant gliomas: a critical summary, *J Neurooncol* 42, 303-5
- 23 - Stupp R, Mason WP, Van Den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MI, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E and Mirimanoff RO. (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma, *N Engl J Med* 352, 987-96
- 24 - Kurzen H SS, Naher H, Mohler T. (2003) Inhibition of angiogenesis by non-toxic doses of temozolomide., *Anticancer Drugs* 14, 515-22
- 25 - Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, De Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC and Stupp R. (2005) MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma, *N Engl J Med* 352, 997-1003
- 26 - Yung WK. (2000) Temozolomide in malignant gliomas, *Semin Oncol* 27, 27-34
- 27 - Carpentier AF (2005) [New therapeutic approaches in glioblastomas], *Bull Cancer* 92, 355-9

- 28 - Avgeropoulos NG and Batchelor TT. (1999) New treatment strategies for malignant gliomas, *Oncologist* 4, 209-24
- 29 - Goldstein G, Scheid M, Hammerling U, Schlesinger DH, Niall HD and Boyse EA. (1975) Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 11-5
- 30 - Arrigo AP, Tanaka K, Goldberg AL and Welch WJ. (1988) Identity of the 19S 'prosome' particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome), *Nature* 331, 192-4
- 31 - Burger AM and Seth AK. (2004) The ubiquitin-mediated protein degradation pathway in cancer: therapeutic implications, *Eur J Cancer* 40, 2217-29
- 32 - Glickman MH and Ciechanover A. (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction, *Physiol Rev* 82, 373-428
- 33 - Kloetzel PM. (2004) The proteasome and MHC class I antigen processing, *Biochim Biophys Acta* 1695, 225-33
- 34 - Almond JB and Cohen GM. (2002) The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy, *Leukemia* 16, 433-43
- 35 - Andermarcher E, Bossis G, Farras R, Jariel-Encontre I and Piechaczyk M. (2005) [Proteasomal degradation: from addressing of substrates to therapeutical perspectives], *Med Sci (Paris)* 21, 141-9
- 36 - Herschko A, Ciechanover A. (1998) The ubiquitin system, *Annu Rev Biochem* 67, 425-79
- 37 - Sakamoto KM. (2002) Ubiquitin-dependent proteolysis: its role in human diseases and the design of therapeutic strategies, *Mol Genet Metab* 77, 44-56
- 38 - Mani A and Gelmann EP (2005) The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer, *J Clin Oncol* 23, 4776-89
- 39 - Dutaud D, Aubry L, Henry L, Levieux D, Hendil KB, Kuehn L, Bureau JP and Ouali A. (2002) Development and evaluation of a sandwich ELISA for quantification of the 20S proteasome in human plasma, *J Immunol Methods* 260, 183-93
- 40 - Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, Johnson J, Destree A, Lazarus DP, Maas J, Pien CS, Prakash S and Elliott PJ. (1999) Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents, *Cancer Res* 59, 2615-22
- 41 - Voorhees PM, Dees EC, O'neil B and Orlowski RZ. (2003) The proteasome as a target for cancer therapy, *Clin Cancer Res* 9, 6316-25
- 42 - Sunwoo JB, Chen Z, Dong G, Yeh N, Crowl Bancroft C, Sausville E, Adams J, Elliott P and Van Waes C. (2001) Novel proteasome inhibitor PS-341 inhibits activation of nuclear factor-kappa B, cell survival, tumor growth, and angiogenesis in squamous cell carcinoma, *Clin Cancer Res* 7, 1419-28

- 43 - Adams J. (2003) Potential for proteasome inhibition in the treatment of cancer, *Drug Discov Today* 8, 307-15
- 44 - Adams J and Kauffman M. (2004) Development of the proteasome inhibitor Velcade (Bortezomib), *Cancer Invest* 22, 304-11
- 45 - Yin D, Zhou H, Kumagai T, Liu G, Ong JM, Black KL and Koeffler HP. (2005) Proteasome inhibitor PS-341 causes cell growth arrest and apoptosis in human glioblastoma multiforme (GBM), *Oncogene* 24, 344-54
- 46 - Kerr JFR, Wyllie AH. And Currie AR. (1972) Apoptosis :a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics., *Br. J. Cancer* 26, 239-257
- 47 - Mignotte B and Vayssiere JL. (1998) Mitochondria and apoptosis, *Eur J Biochem* 252, 1-15
- 48 - Van Cruchten S and Van Den Broeck W. (2002) Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis, *Anat Histol Embryol* 31, 214-23
- 49 - Clarke PG. (1990) Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms, *Anat Embryol (Berl)* 181, 195-213
- 50 - Schwartz LM, Smith SW, Jones ME and Osborne BA. (1993) Do all programmed cell deaths occur via apoptosis?, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 980-4
- 51 - Saraste A. (1999) Morphologic criteria and detection of apoptosis, *Herz* 24, 189-95
- 52 - Woodle ES and Kulkarni S. (1998) Programmed cell death, *Transplantation* 66, 681-91
- 53 - Liptay S, Bachem M, Hacker G, Adler G, Debatin KM and Schmid RM. (1999) Inhibition of nuclear factor kappa B and induction of apoptosis in T-lymphocytes by sulfasalazine, *Br J Pharmacol* 128, 1361-9
- 54 - Roche L. Apoptosis and cell proliferation
- 55 - Mignon A, Rouquet N, Joulin V. (1998) Les caspases, les protéases à cystéine de l'apoptose : un enjeu thérapeutique pour demain ?, *médecine/sciences* 14, 9-17
- 56 - Johnson DE. (2000) Programmed cell death regulation: basic mechanisms and therapeutic opportunities, *Leukemia* 14, 1340-4
- 57 - Mercie P and Belloc F. (2001) [Physicopathologic mechanisms and methods of analysis of cellular apoptosis], *Rev Med Interne* 22, 90-6
- 58 - Fadeel B, Orrenius S and Zhivotovsky B. (2000) The most unkindest cut of all: on the multiple roles of mammalian caspases, *Leukemia* 14, 1514-25
- 59 - Biola. A Breard J, Demerlé-Pallardy C, Pallardy M. (1999) Implications de l'apoptose en pathologie., *Immunoanal Biol Spéc* 14, 16-31

- 60 - Boatright KM and Salvesen GS. (2003) Mechanisms of caspase activation, *Curr Opin Cell Biol* 15, 725-31
- 61 - Knowles M, Selby P. (2005) Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer, OXFORD University Press.
- 62 - Solary E. (2006) in Société française du cancer, pp. 43-55, . Paris
- 63 - Zornig M, Busch G, Beneke R, Gulbins E, Lang F, Ma A, Korsmeyer S and Moroy T. (1995) Survival and death of prelymphomatous B-cells from N-myc/bcl-2 double transgenic mice correlates with the regulation of intracellular Ca²⁺ fluxes., *Oncogene* 11, 2165-2174
- 64 - Selivanova G. (2004) p53 : fighting cancer, *curr cancer drug targets* 4, 385-402
- 65 - Mow BM, Blajeski AL, Chandra J and Kaufmann SH. (2001) Apoptosis and the response to anticancer therapy, *Curr Opin Oncol* 13, 453-62
- 66 - Gottesman MM. (2002) Mechanisms of cancer drug resistance, *Annu Rev Med* 53, 615-27
- 67 - Bursch W, Hochegger K, Torok L, Marian B, Ellinger A, Hermann RS. (2000) Autophagic and apoptotic types of programmed cell death exhibit different fates of cytoskeletal filaments., *J Cell Sci.* 113, 1189-1198
- 68 - Hawkins DS, Demers GW, Galloway Da. (1996) Inactivation of p53 enhances sensitivity to multiple chemotherapeutic agents., *Cancer Res* 56, 892-898
- 69 - Soddu S and Sacchi A. (1998) p53 : prospects for cancer gene therapy, *Cytokines Cell Mol Ther* 4, 177-185
- 70 - Conci N, Zeillinger C, Stimpfel M, Schiebel I, Tong D, Woll U, Reiner a, Leodolter S, Zeillinger R. (2000) p-53 dependant radioresistance in ovarian carcinoma cell lines., *Cancer Lett* 150, 191-199
- 71 - Soini.Y, Pääkkö P, and V-P.Lehto. (1998) Histopathological Evaluation of Apoptosis in Cancer., *American Journal of Pathology.* 153, 1041-1053
- 72 - Stadelmann C and Lassmann H. (2000) Detection of apoptosis in tissue sections, *Cell Tissue Res* 301, 19-31
- 73 - Van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B and Reutelingsperger CP. (1998) Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure, *Cytometry* 31, 1-9
- 74 - Mirakian R, Nye K, Palazzo FF, Goode AW and Hammond LJ. (2002) Methods for detecting apoptosis in thyroid diseases, *J Immunol Methods* 265, 161-75

- 75 - Van Heerde WL, Robert-Offerman S, Dumont E, Hofstra L, Doevendans PA, Smits JF, Daemen MJ and Reutelingsperger CP. (2000) Markers of apoptosis in cardiovascular tissues: focus on Annexin V, *Cardiovasc Res* 45, 549-59
- 76 - Duan WR, Garner DS, Williams SD, Funckes-Shippy CL, Spath IS and Blomme EA. (2003) Comparison of immunohistochemistry for activated caspase-3 and cleaved cytokeratin 18 with the TUNEL method for quantification of apoptosis in histological sections of PC-3 subcutaneous xenografts, *J Pathol* 199, 221-8
- 77 - Lesauskaite V, Epistolato MC, Ivanoviene L and Tanganelli P. (2004) Apoptosis of cardiomyocytes in explanted and transplanted hearts. Comparison of results from in situ TUNEL, ISEL, and ISOL reactions, *Am J Clin Pathol* 121, 108-16
- 78 - Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W and Schulte-Hermann R. (1995) In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note, *Hepatology* 21, 1465-8
- 79 - Saraste A and Pulkki K. (2000) Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis, *Cardiovasc Res* 45, 528-37
- 80 - Duriez PJ and Shah GM. (1997) Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: a sensitive parameter to study cell death, *Biochem Cell Biol* 75, 337-49
- 81 - Guillou P-J. (2001) in Champagne-Ardennes., pp. 106, Faculté de médecine., Reims.
- 82 - Blagosklonny MV (2000) Spotlight on apoptosis. Introduction, *Leukemia* 14, 1500-1
- 83 - Hanshaw RG and Smith BD. (2005) New reagents for phosphatidylserine recognition and detection of apoptosis, *Bioorg Med Chem* 13, 5035-42
- 84 - Johnson LL, Schofield L, Donahay T, Narula N and Narula J. (2005) 99mTc-annexin V imaging for in vivo detection of atherosclerotic lesions in porcine coronary arteries, *J Nucl Med* 46, 1186-93
- 85 - Belhocine TZ and Blankenberg FG. (2005) 99mTc-Annexin A5 uptake and imaging to monitor chemosensitivity, *Methods Mol Med* 111, 363-80
- 86 - Dekker B, Keen H, Lyons S, Disley L, Hastings D, Reader A, Ottewell P, Watson A and Zweit J. (2005) MBP-annexin V radiolabeled directly with iodine-124 can be used to image apoptosis in vivo using PET, *Nucl Med Biol* 32, 241-52
- 87 - Elliott JI, Surprenant A, Marelli-Berg FM, Cooper JC, Cassady-Cain RL, Wooding C, Linton K, Alexander DR and Higgins CF. (2005) Membrane phosphatidylserine distribution as a non-apoptotic signalling mechanism in lymphocytes, *Nat Cell Biol* 7, 808-16
- 88 - Majno G and Joris I. (1995) Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death, *Am J Pathol* 146, 3-15

- 89 - Rijken PF, J W MS, Hans JJ, Bernsen A, P H.D.,Johannes P, Peters W. (2000) Spatial relationship between hypoxia and the (perfused) vascular network in a human glioma xenograft : a quantitative multi-parameter analysis., *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 48, 571-582
- 90 - Wang X, Tsao SW, Wong YC, Cheung AL. (2003) Induction of senescent-like growth arrest as a new target in anticancer treatment, *curr cancer drug targets* 3, 153-159
- 91 - Yang NC and Hu ML. (2005) The limitation and validities of senescence associated-beta-galactosidase activity as an aging marker for human foreskin fibroblast Hs68 cells., *Exp Gerontol* 40, 813-819
- 92 - Dimri GP et al. (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo., *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9363-9367
- 93 - Bilir A,Altinoz MA,Erkan M,Ozmen V and Aydiner A. (2001) Autophagy and nuclear changes in FM3A breast tumor cells after epirubicin, medroxyprogesterone and tamoxifen treatment in vitro, *Pathobiology* 69, 120-6
- 94 - Viktorsson K,Lewensohn R and Zhivotovsky B. (2005) Apoptotic pathways and therapy resistance in human malignancies, *Adv Cancer Res* 94, 143-96
- 95 - Jo WS,Jeong MH,Jin YH,Jang JY,Nam BH,Son SH,Choi SS,Yoo YH,Kang CD, Lee JD and Jeong SJ (2005) Loss of mitochondrial membrane potential and caspase activation enhance apoptosis in irradiated K562 cells treated with herbimycin A, *Int J Radiat Biol* 81, 531-43
- 96 - Nawrocki ST,Bruns CJ,Harbison MT,Bold RJ,Gotsch BS,Abbruzzese JL,Elliott P,Adams J and Mcconkey DJ. (2002) Effects of the proteasome inhibitor PS-341 on apoptosis and angiogenesis in orthotopic human pancreatic tumor xenografts, *Mol Cancer Ther* 1, 1243-53
- 97 - Montagut C, Rovira A, Mellado B, Gascon P, Ross JS, Albanell J. (2005) Preclinical and clinical development of the proteasome inhibitor bortezomib in cancer treatment., *Drugs today* 41, 299-315
- 98 - McBride WH, Iwamoto KS, Syljuasen R, Pervan M, Pajonk F. (2003) The role of ubiquitin/proteasome system in cellular responses to radiation., *Oncogene* 22, 5755-5773.
- 99 - Pajonk F, McBride WH. (2001) Ionizing radiation affects 26s proteasome function and associated molecular responses, even at low doses., *Radiother Oncol.* 59, 203-212
- 100 - Gown AM and Willingham MC. (2002) Improved detection of apoptotic cells in archival paraffin sections: immunohistochemistry using antibodies to cleaved caspase 3, *J Histochem Cytochem* 50, 449-54

- 101 - Koornstra JJ, Rijcken FE, De Jong S, Hollema H, De Vries EG and Kleibeuker JH. (2004) Assessment of apoptosis by M30 immunoreactivity and the correlation with morphological criteria in normal colorectal mucosa, adenomas and carcinomas, *Histopathology* 44, 9-17
- 102 - Black SC, Huang JQ, Rezaiefar P, Radinovic S, Eberhart A, Nicholson DW, Rodger IW. (1998) Co-localization of the cysteine protease caspase-3 with apoptotic myocytes after in vivo myocardial ischemia and reperfusion in the rat., *J Mol Cell Cardiol.* 30, 733-742.

ANNEXES

HISTOLOGIE

> Coloration par l'Hématoxyline-Eosine-Safran :

Solution d'hématoxyline :

Hématoxyline stabilisée SPECI (réf.00911) diluée au tiers (1/3) dans une solution diluante : eau distillée 1000 mL, Alun potassique 100g (PROLABO réf. 21 110 296).

Solution d'éosine :

Solution aqueuse d'érythrosine à 1% (érythrosine B réf. 1.15936, Merck) à acidifier par quelques gouttes d'acide acétique avant utilisation.

Solution alcoolique de safran à 1% :

Faire sécher 10g de safran à 56° pendant 24 heures (Safran réf. 1.1507736, Labonord). Réduire le safran en poudre et ajouter 1000mL d'éthanol absolu. Laisser infuser à l'étuve plusieurs jours.

Protocole :

Hématoxyline	6 minutes
Eau distillée	
Alcool chlorhydrique	3 secondes
Eau distillée	
Eosine	5 minutes
Eau distillée	3 minutes
Alcool 95°	3 minutes
Alcool absolu	3 minutes
Safran	5 minutes
Alcool absolu	5 minutes
Toluène	5 minutes
Montage à l'Eukitt ^R	

IMMUNOHISTOCHEMIE**>Tampon EDTA 10 mM :**

Solution EDTA 0,5 M	20 mL
Eau osmosée QSP 1L	800 mL

>Tampon citrate de sodium pH 6

Acide citrique 21,01 g/L	36 mL
Citrate de sodium 29,41 g/L	164 mL
Eau osmosée QSP 2 litres	1800 mL

>Tampon PBS-Tween (PBST):

Solution PBS 10 X	500 mL
Tampon Tween	5 mL
Eau osmosée	QSP 5 litres

>Diluant pour anticorps primaire :

Azide de sodium	0,30 g
N-éthyl-maleimide	0,18 g
Glycérol	60 mL
Sérum albumine bovine à 30%	9,9 mL
Tampon PBS 1/10 (sans tween)	QSP 300 mL

>Solution de révélation préparée extemporanément (Kit de coloration NovaRED, Vector, Burlingame, USA)

Eau distillée	5 mL
Réactif 1	3 gouttes
Réactif 2 puis Réactif 3	2 gouttes chacun
Solution de peroxyde d'hydrogène	2 gouttes

Elle est ensuite déposée sur la lame, puis rincée après 4 à 5 minutes à l'eau courante.

TECHNIQUE TUNEL

>TBST

Tris HCl 1 M pH 7,6	50 mL
NaCl 5 M	30 mL
Eau BM	920 mL
Ajuster le pH à 7,6.	

>Solution de Protéinase K

- Préparation du tampon de solution Protéinase K :

Tris-HCl 1 M	50 mL
Eau BM	950 mL
CaCl ₂	0,147g

- Ajouter la Protéinase K (réf.161519, ROCHE) à la dose de 1 mg pour 1 mL de tampon de solution.

- La solution ainsi obtenue est fractionnée en conditionnement de 100 µL et conservée au congélateur à -20°C.

- Préparation du tampon de dilution :

Tris-HCl 1 M pH 8	100 mL
EDTA 0,5 M	100 mL
Eau BM	800 mL

- La solution finale de protéinase K est préparée extemporanément par dilution au 1/1000 dans le tampon de dilution.

>Tampon pH 9,4

Tris HCl 1 M pH 8	100 mL
Na Cl 5 M	20 mL
MgCl ₂ 1 M	50 mL
Eau BM	830 mL

>Solution enzymatique

Tampon 5X	10 μ L
Digoxigénine 11 dUTP (Réf.1093 088, ROCHE)	1 μ L
dATP (1/4)	3,5 μ L
rTdt	2,5 μ L
Eau BM + Tween (0,1%) (Réf.P 1379, SIGMA)	80 μ L

>Préparation de la solution Kernechtrot

Kernechtrot (rouge nucléaire) (réf. 4072969, MERCK, 5g)	0,5g
Sulfate d'aluminium	25g
Eau distillée	500 mL

Chauffer jusqu'à ébullition et filtrer.

>Milieu de montage à base d'alcool polyvinylique.

- Mélanger 5 mL de TRIS-HCl 1M pH 8 (NABET) dans 95 mL d'eau osmosée pour obtenir du tampon TRIS HCl 50 mM pH 8,5.
- Ajouter 12g de PVA (Polyvinyl Alcohol Wt. 30,000-70,000) (Réf. P-8136, SIGMA) dans 90 mL de tampon TRIS HCl 50 mM pH 8,5.
- Chauffer légèrement sur l'agitateur sans dépasser 60°C. Ajuster le pH à 8,5. Laisser reposer la nuit à + 4°C.
- Le lendemain, placer la solution dans un bain Marie pendant 45 minutes. Ajouter 30 g de glycérol (=23 mL) lorsque la température atteint 50°C.



VU

NANCY, le **9 février 2006**

Le Président de Thèse

Professeur F. PLENAT

NANCY, le **10 février 2006**

Le Doyen de la Faculté de Médecine

Professeur P. NETTER

AUTORISE À SOUTENIR ET À IMPRIMER LA THÈSE

NANCY, le **13 février 2006**

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY 1

Professeur J.P. FINANCE

RESUME DE LA THESE :

Les tumeurs gliales malignes représentent à l'heure actuelle un véritable challenge thérapeutique. Les armes thérapeutiques demeurent en effet peu nombreuses, n'apportant qu'un bénéfice limité en terme de survie. Le bortezomib est le premier inhibiteur réversible du protéasome commercialisé. Ses actions antiproliférative, pro apoptotique et radio potentialisante ont été démontrées sur plusieurs types de tumeurs. En ce qui concerne les tumeurs gliales, seule une étude a été publiée à ce jour, démontrant une inhibition de la croissance cellulaire sur la lignée tumorale gliale U 87 en culture cellulaire. Notre étude a donc consisté à évaluer l'efficacité antitumorale de cette nouvelle molécule sur un modèle pré clinique de gliomes malins greffés chez la souris nude. Nous avons donc dans un premier temps comparé l'évolution des volumes tumoraux entre un groupe de souris traitées et non traitées. Dans un second temps, chaque tumeur a fait l'objet d'une évaluation microscopique de la cinétique cellulaire, par détermination des indices apoptotique et de prolifération. Pour se faire, nous avons été amenés à mettre au point et comparer différentes techniques de détection des cellules apoptotiques sur coupes tissulaires : la détection de la caspase-3 activée par technique immunohistochimique est apparue être la méthode la plus sensible. Elle a donc été appliquée aux tumeurs gliales afin de déterminer l'activité apoptotique, la prolifération cellulaire étant quant à elle mise en évidence par l'anticorps anti Ki-67. Nos résultats démontrent que l'évolution des indices apoptotique et de prolifération, entre les groupes témoins et traités, n'est pas modifiée par l'administration de bortezomib, ce qui concorde avec l'évolution des volumes tumoraux. Cependant, les investigations doivent être poursuivies en association avec la radiothérapie afin de ne pas méconnaître un effet radiopotentialisant du bortezomib.

TITRE EN ANGLAIS :

Bortezomib antitumoral effect on pre-clinical model of malignant glioma in nude mice.

THESE : MEDECINE SPECIALISEE ANNEE 2006

MOTS CLEFS :

Gliomes malins, bortezomib, caspase-3 activée, PARP clivée, immunohistochimie, cytométrie de flux.

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR :

Faculté de Médecine de Nancy

9, avenue de la Forêt de Haye

54505 VANDOEUVRE-LES-NANCY Cedex