



HAL
open science

Réponse transcriptomique des tissus cérébraux sains et tumoraux à la radiothérapie par microfaisceaux synchrotron

Audrey Bouchet

► **To cite this version:**

Audrey Bouchet. Réponse transcriptomique des tissus cérébraux sains et tumoraux à la radiothérapie par microfaisceaux synchrotron. Sciences agricoles. Université de Grenoble, 2012. Français. NNT : 2012GRENV027 . tel-00906766

HAL Id: tel-00906766

<https://theses.hal.science/tel-00906766>

Submitted on 20 Nov 2013

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : Biologie cellulaire

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Audrey BOUCHET

Thèse dirigée par **Géraldine Le Duc** et **Laurent Pelletier**

préparée au sein de l'**European Synchrotron Radiation Facility** et de
l'**Institut des Neurosciences de Grenoble** dans l'École Doctorale **Chimie
Science du Vivant**

Réponse transcriptomique des tissus cérébraux sains et tumoraux à la radiothérapie par microfaisceaux synchrotron

Thèse soutenue publiquement le **31 octobre 2012**, devant le jury composé de :

Mr François BERGER

PU-PH, UFR médecine, Grenoble, Président du jury

Mme Marie DUTREIX

Directeur de recherche (DR2), Institut Curie, Paris, Rapporteur

Mr Pascal RIHET

Professeur des universités (PR1), TAGC/INSERM(U1090), Aix-Marseille, Rapporteur

Mme Géraldine LE DUC

Chercheur HDR, ESRF, Grenoble, co-directeur de thèse

Mr Laurent PELLETIER

MCU-PH, UFR médecine, Grenoble, co-directeur de thèse

Mme Claire RODRIGUEZ-LAFRASSE

PU-PH, UFR de Médecine Lyon 1, examinateur

Mr Jeffrey CROSBIE

Visiteur scientifique GIN équipe 6, University of Melbourne, Department of
Obstetrics & Gynaecology, examinateur

Mr Alberto BRAVIN

Chercheur en charge de la ligne Biomédicale, ESRF, Grenoble, membre invité



SOMMAIRE

INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
I - LES TUMEURS CÉRÉBRALES PRIMITIVES	2
A - Les cellules du système nerveux central	2
B - Classification des tumeurs du système nerveux central	4
B - I - Classification des gliomes selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).....	4
B - II - Classification des gliomes selon l'hôpital Sainte-Anne/Mayo	6
B - III - Apports de la caractérisation moléculaire pour la classification des gliomes.....	8
B - III - 1 - Analyses supervisées	8
a - L'utilisation de marqueurs moléculaires individuels.....	8
b - Vers un modèle de progression tumorale : la gliomagenèse.....	11
c - L'utilisation des microRNAs.....	12
d - L'utilisation de profils moléculaires étendus	13
B - III - 2 - Analyses non supervisées des profils d'expression pangénomique: Propositions de nouvelles classifications.....	14
a - Classification de Phillips <i>et al.</i> 2006.....	14
b - Classification de Li <i>et al.</i> 2009	14
C - Épidémiologie.....	15
C - I - En France	16
C - II - Aux États-Unis.....	17
C - II - 1 - L'organisme de référence : CBTRUS	17
C - II - 2 - L'incidence	17
C - II - 3 - La mortalité.....	19
II - PRISE EN CHARGE THÉRAPEUTIQUE DES TUMEURS CÉRÉBRALES	19
A - Prise en charge symptomatique	20
B - La chirurgie	21
C - La chimiothérapie.....	22
C - I - Chimiothérapies locales.....	23
C - II - Chimiothérapies systémiques	24
C - III - Les thérapies ciblées	26
D - Protocole thérapeutique de référence pour les gliomes de grade IV.....	29
E - La radiothérapie.....	30
E - I - Des origines des traitements par rayonnement à la radiothérapie contemporaine ...	30
E - I - 1 - Découverte des rayons X	30
E - I - 2 - Premières applications thérapeutiques.....	32
E - I - 3 - Radiothérapie moderne.....	33
a - Radiothérapies externes	33
b - Radiochirurgie	34
c - Radiothérapie interne	34
E - I - 4 - Volumes et doses conventionnelles recommandées	34
E - II - Effets des rayonnements X	35
E - II - 1 - Effets physiques des rayonnements X.....	35
E - II - 2 - Effets biologiques des rayonnements X.....	37
a - Effets de l'irradiation à l'échelle moléculaire.....	37
b - Effets des rayonnements X à l'échelle cellulaire	42
c - Effets des rayonnements X à l'échelle tissulaire	45
E - III - Facteurs influençant les effets biologiques d'une irradiation	46
E - III - 1 - Dose et type de rayonnement	46
E - III - 2 - Influence du volume irradié.....	46
E - III - 3 - Etalement et fractionnement temporel de l'irradiation	47

III - LA RADIOTHÉRAPIE PAR MICROFAISCEAU (MRT)	48
A - Le rayonnement synchrotron	48
B - Effet « dose / volume » et naissance de la MRT.....	51
C - La technique de MRT	53
C - I - La production des microfaisceaux	53
C - II - Notion de pic et de vallée	54
C - III - Dosimétrie.....	55
D - Expériences fondatrices.....	57
D - I - Optimisation des paramètres d'irradiation en MRT	60
D - II - Couplage de la MRT à des stratégies adjuvantes.....	64
D - III - Compréhension des mécanismes d'action	65
 PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....	 71
 MATÉRIELS ET MÉTHODES	 73
I - Séquence expérimentale	73
II - Modèle tumoral syngénique 9L.....	74
A - Choix du modèle tumoral syngénique 9L implanté orthotopiquement chez le rat Fischer	74
B - Cellules 9L, culture et préparation pour l'implantation	74
C - Implantation des tumeurs chez le rat.....	75
D - Randomisation par IRM	76
III - Irradiation synchrotron MRT et en champ plein	77
A - MRT.....	77
A - I - Choix des paramètres d'irradiation par MRT.....	77
A - II - Protocole d'irradiation par radiothérapie par microfaisceaux	78
A - III - Protocole de dosimétrie.....	79
B - Irradiation synchrotron en champ plein.....	81
B - I - Choix des caractéristiques d'irradiation en champ plein.....	81
B - II - Protocole d'irradiation par champ plein.....	81
C - Vérification des configurations d'irradiation	82
IV - Survie et préparation des échantillons	83
A - Survie et sacrifice des animaux.....	83
B - Préparation des échantillons pour analyses transcriptomiques et histologiques.....	83
V - Analyses transcriptomiques.....	84
A - Émergence des techniques de hauts débits pour l'étude du transcriptome et choix de puces Affymetrix.....	84
B - Extraction et évaluation de la qualité des ARN totaux	87
B - I - Protocole d'extraction	87
B - II - Évaluation de la pureté et de la quantité des ARN extraits.....	88
C - Préparation et hybridation des échantillons	90
C - I - Amplification et marquage des ARN pour l'analyse par microarray	90
C - II - Hybridation sur puce.....	93
D - Traitement des données de transcriptomique	94
D - I - Traitement du signal	94
D - II - Traitements statistiques et sélections des données.....	95
D - III - Analyses fonctionnelles.....	97
E - Validation par PCR	98
VI - Analyses histologiques et immunohistologiques	100
A - Coloration hématoxyline/éosine	100
A - I - Mesure des surfaces tumorales.....	101
A - II - Caractéristiques histologiques	101
B - Immunomarquages.....	104

B - I - Marquage des cellules apoptotiques par la méthode Tunel	104
B - II - Immunomarquages fluorescents	104
RÉSULTATS.....	107
I - Caractérisation du modèle tumoral 9L	107
A - Prise tumorale, croissance et survie associée	109
A - I - Efficacité de la prise tumorale	109
A - II - Une croissance tumorale exponentielle et reproductible	109
A - III - Une survie très reproductible	110
B - Un modèle tumoral hypervascularisé.....	112
C - Evolution dans le temps des caractéristiques histologiques du modèle 9L	113
C - I - Description macroscopique	113
C - II - Un modèle infiltrant.....	114
C - III - Une densité cellulaire tumorale élevée et une prolifération intense.....	115
C - IV - Réaction immunitaire.....	118
D - Discussion	119
II - Réponse transcriptomique précoce des tumeurs 9L et des tissus cérébraux sains à la MRT.....	124
A - Survie des animaux	126
B - Réponse transcriptomique des tissus sains et tumoraux 6 h après MRT.....	127
C - Identification des fonctions biologiques impliquées dans la réponse à la MRT des tumeurs 9L et des tissus cérébraux controlatéraux	131
D - Identification des voies de signalisation impliquées dans la réponse des tumeurs 9L et des tissus cérébraux controlatéraux à la MRT.....	133
D - I - Exemple de l'apoptose : une même voie, des gènes différents	134
D - II - Voies de signalisation modulées dans un seul des deux tissus.....	138
III - Modifications transcriptomiques spécifiques de la tumeur après MRT.....	140
A - Sélection des gènes répondant uniquement dans le tissu sain et absent du tissu tumoral ..	141
B - Identification des fonctions et voies de signalisation associées.....	144
C - Cinétique d'expression des gènes sélectionnés	147
C - I - Des variations d'expression communes pour 13 gènes.....	147
C - II - Cas particulier de la cinétique d'expression de 4 transcrits	150
D - Des variations transcriptomiques aux modifications cellulaires et tissulaires	152
D - I - Croissance tumorale et cellules en division.....	152
D - II - Réaction inflammatoire/immunitaire	155
E - Discussion partie II et III.....	158
IV - Influence de la présence des microfaisceaux lors de la MRT	171
A - Effet des microfaisceaux sur animaux porteurs de tumeur 9L.....	173
B - Influence de la configuration d'irradiation sur les paramètres histologiques.....	175
C - Effets des microfaisceaux sur les gènes sélectionnés.....	177
D - Identification des gènes modulés spécifiquement par la présence des microfaisceaux.....	179
E - Discussion	180
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	185
RÉFÉRENCES.....	189
ANNEXE	214

LISTE DES ABRÉVIATIONS et ACRONYMES

ADN :	Acide DésoxyriboNucléique
AMM :	Autorisation de Mise sur le Marché
ANOCEF :	Association des Neuro-Oncologues d'Expression Française
ANOVA :	ANalysis Of VAriance
ARN :	Acide RiboNucléique
BCNU :	bis-chloroethylnitrosourea
BER :	base excision repair
bFGF :	basic Fibroblast Growth Factor
BHE :	barrière hémato-encéphalique
BNL :	Brookhaven National Laboratory
CEC :	Convection-Enhanced Delivery
CBTRUS :	Central Brain Tumor Registry of the United States
CTV :	Clinical Target Volume
DMEM :	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DSB :	Double Strand Break
EGFR :	Epidermal Growth Factor Receptor
EMSC :	ESRF MSC
ESRF :	European Synchrotron Radiation Facility
FBTDB :	French Brain Tumors Data Bank
GMCSF :	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
GST :	Gène supresseur de tumeur
GTV :	Gross Tumor Volume
Gy :	Gray
HE :	Hématoxyline et éosine (ou érythrosine)
HIF-1 :	Hypoxia Inducible Factor
HTIC :	Hypertension intracrânienne
IDH :	Isocitrates déshydrogénases
IECAWR :	Internal Evaluation Committee for Animal Welfare in Research
IHC :	Immunohistochimie
ILS :	Increase of life span
IRM :	Imagerie par Résonance Magnétique
LCR :	Liquide Céphalo-Rachidien
LINAC :	LINear ACcelerator
MEC :	Matrice extracellulaire
MGMT :	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
MMP :	matrice métalloprotéase

MSC :	MultiSlit Collimator
MST:	Median survival time
MRT :	Microbeam Radiation Therapy
M&W :	Mann & Withney
NDS :	Normal Donkey Serum
NFP :	neurofilament protein
NER :	nucleotide excision repair
NHEJ :	non homologous end joining
NSLS :	National Synchrotron Light Source
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
PBS :	Phosphate Buffered Saline
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PDGF :	Platelet Derived Growth Factor
PTEN :	Phosphatase and tensin homolog
PTV :	Planning Target Volume
RCMI :	Radiothérapie Conformationnelle avec Modulation d'Intensité
SAM :	Significance Analysis for Microarrays
SN :	Système Nerveux
SNC :	Système Nerveux Central
SNP:	Système Nerveux Périphérique
SSC :	Single Slit Collimator
SSB :	Single Strand Break
SVF:	Sérum de veau foetal
TGNM :	Tumeurs glioneurales malignes
TMeV :	Tigr Multi Experiment Viewer
TUNEL :	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labelling
UV :	Ultra Violet
VEGF :	Vascular Endothelial Growth Factor

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Le système nerveux central (SNC) contrôle la plupart des fonctions de l'organisme. De fait, les pathologies qui le touchent ont généralement des conséquences dramatiques. L'encéphale (cerveau, tronc cérébral et cervelet) et la moelle épinière constituent le SNC composé du tissu nerveux, glial et vasculaire. Cet ensemble est entouré par les méninges et par une protection osseuse (vertèbres ou boîte crânienne). Les tumeurs qui se développent au sein du SNC se subdivisent selon leur localisation en tumeurs intrarachidiennes et intracrâniennes. Les tumeurs intracrâniennes se divisent en tumeurs des structures limitantes (méningiomes, neurinomes, adénomes), tumeurs intraventriculaires (épendymomes, médulloblastomes) et tumeurs intracérébrales (gliomes, métastases). Parmi ces dernières se distinguent les métastases, tumeurs secondaires issues d'organes autres que le cerveau (25 à 30% de l'ensemble des cancers) et les tumeurs cérébrales primaires ou primitives qui se développent à partir des cellules composant le SNC (2% de l'ensemble des cancers).

L'incidence globale des tumeurs cérébrales primaires est de moins de 20 cas pour 100 000 habitants dans les pays industrialisés [Bauchet Luc *et al.* 2007; CBTRUS 2012]. Parmi elles, 30% sont des gliomes et 16% des glioblastomes qui représentent les gliomes au pronostic le plus sombre. Bien que les traitements actuels (associant chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie) aient permis une augmentation significative de la qualité et de l'espérance de vie des patients porteurs d'un gliome, la médiane de survie des patients porteurs d'un glioblastome est de seulement 12 à 15 mois après diagnostic [Wen PY *et al.* 2008] et la médiane de survie à 5 ans n'excède pas 5% [CBTRUS 2012]. Cette impasse thérapeutique souligne le besoin de nouveaux traitements.

Dans cette optique est développée depuis une 20aine d'années la radiothérapie par microfaisceaux ou MRT pour *Microbeam Radiation Therapy*, une radiothérapie atypique utilisant une source de rayonnement synchrotron fractionnée spatialement. Cette technique a notamment démontré une grande capacité à préserver les tissus cérébraux sains et permet d'envisager de nouvelles perspectives thérapeutiques [Dilmanian F. A. *et al.* 2002; Laissue J. A. *et al.* 1999; Slatkin D. N. *et al.* 1992].

Cette partie introductive regroupe les méthodes de classification des différents types de tumeurs cérébrales primitives, des données épidémiologiques et les stratégies thérapeutiques actuellement mises en place en clinique. Elle s'achève par une présentation détaillée de la technique de MRT,

dans le cadre du traitement des tumeurs solides et particulièrement des gliomes, cette technique ayant fait l'objet de notre travail expérimental.

I - LES TUMEURS CÉRÉBRALES PRIMITIVES

A - Les cellules du système nerveux central

Le système nerveux central est un tissu très dense dont le volume sanguin est faible (3 à 5% contre 20 à 30% dans le foie). Il est composé de deux grands types de cellules :

- les neurones sont les unités fonctionnelles du SNC (Figure 1). Ces cellules spécialisées sont excitables, produisent et transmettent le signal nerveux sous forme d'influx électrique.

- les cellules gliales sont les cellules de soutien du SNC. Elles isolent, soutiennent et nourrissent les neurones. Plus petites que les neurones, elles sont environ dix fois plus nombreuses. La conservation de leur capacité de division et leur nombre élevé expliquent que ces cellules soient à l'origine de la majorité des tumeurs du SNC. Elles sont composées de quatre types cellulaires (Figure 1):

- les astrocytes sont les plus grosses et les plus abondantes des cellules gliales. L'extrémité des prolongements, ou pieds astrocytaires, des astrocytes de type I entourent les capillaires sanguins, participant ainsi à la formation de la barrière hémato-encéphalique (BHE) et régulant les échanges entre les capillaires sanguins et les neurones. Ils jouent ainsi un rôle de soutien métabolique des neurones, leur apportant les nutriments (glucose et oxygène) et évacuant leurs déchets métaboliques. Les pieds astrocytaires des astrocytes de type II entourent les synapses (Figure 1) délimitant hermétiquement la fente synaptique et permettant d'une part de garantir l'homéostasie du milieu neuronal et d'autre part de réguler l'intensité de la transmission synaptique par recapture des neurotransmetteurs. Des filaments intermédiaires composés principalement de la protéine gliofibrillaire acide (GFAP pour *Glial fibrillary acidic protein*) sont présents au niveau du cytoplasme des deux

types astrocytaires mais en plus grande quantité dans les astrocytes de types II et permettent d'identifier ces cellules par immunomarquage. Lors de lésions traumatiques du parenchyme cérébral, les astrocytes peuvent devenir réactifs et entourer la zone de lésion. Ils présentent alors une augmentation de la transcription de la GFAP et accumulation de la protéine.

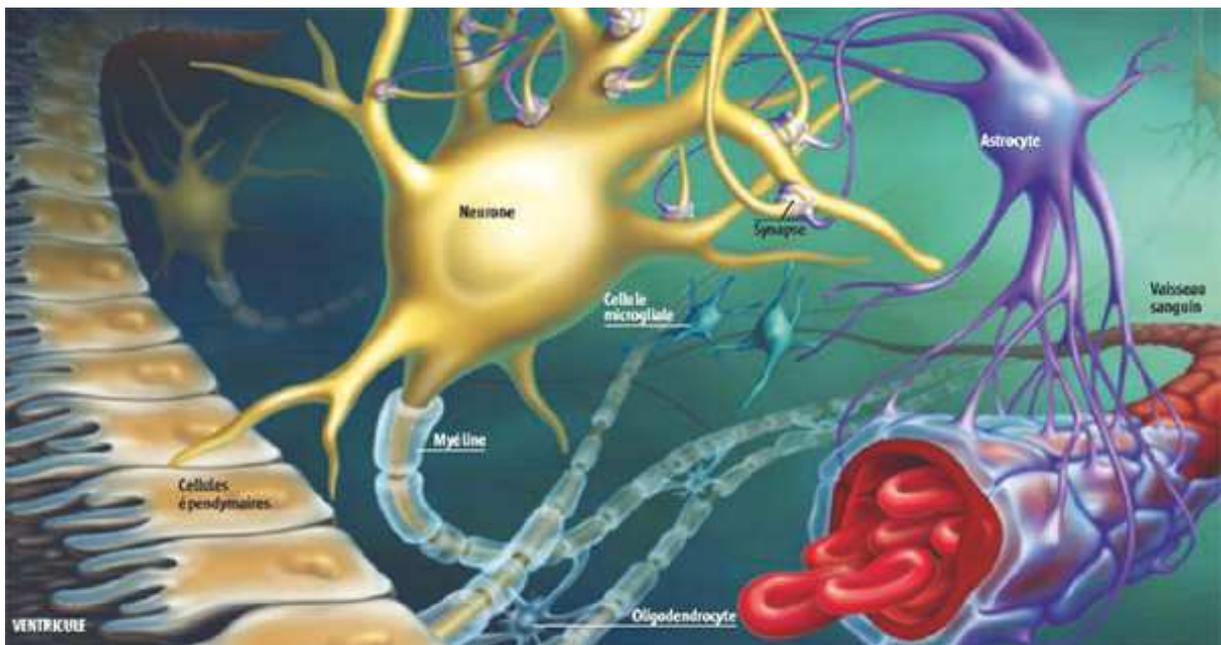


Figure 1: Représentation schématique des principales cellules composant le tissu cérébral. © 2011 Sylvie Dessert.

- les oligodendrocytes dont les prolongements entourent ceux des neurones en formant une gaine de myéline qui joue à la fois un rôle de soutien et d'optimisation de la transmission du message nerveux.
- les cellules microgliales ou microglie dérivent des monocytes, représentent les macrophages résidents du SNC et jouent un rôle de surveillance, de protection et de nettoyage du tissu cérébral en repérant et détruisant les microorganismes, cellules mortes, débris cellulaires et certaines molécules exogènes. En cas de modification pathologique du SNC, la microglie est activée et peut être visualisée par l'immunomarquage de l'antigène Ed1 alors présent à leur surface.

- les cellules épendymaires tapissent les cavités ventriculaires de l'encéphale et constituent une barrière à perméabilité sélective entre le liquide céphalo-rachidien (LCR) et le liquide interstitiel dans lequel baignent les cellules du SNC.

B - Classification des tumeurs du système nerveux central

Dans ce travail, nous nous focaliserons sur les gliomes ou tumeurs gliales qui se définissent comme des tumeurs primitives du SNC composées de cellules à prolifération anarchique présentant des ressemblances avec le tissu normal homologue (adulte ou embryonnaire). Ils représentent la classe la plus importante des tumeurs cérébrales par leur morbidité et mortalité.

B - I - Classification des gliomes selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS)

En 1926, Bailey et Cushing proposent pour la première fois un modèle de classification des gliomes basé sur la morphologie histologique des cellules tumorales et sur la théorie des restes embryonnaires [Bailey P *et al.* 1926]. Selon ces auteurs, les gliomes seraient issus de cellules embryonnaires arrêtées à différents stades de l'embryogenèse. En 1949, Kernohan *et al.* suggèrent que les tumeurs gliales se développent à partir de cellules adultes spécialisées, capables de se différencier. Ils ajoutent la notion de classification en grade (ou stadification) en fonction de la malignité des lésions [Kernohan JW *et al.* 1949]. L'OMS adopte en 1979 un consensus issu de ces deux classifications *via* un groupe d'experts neuropathologistes pour créer la première classification officielle basée essentiellement sur la localisation tumorale, l'histo-morphologie et le grade de la tumeur [Zülch K.J. (ed) 1979]. Près de quinze ans sont nécessaires avant la première révision de cette classification menée par Paul Kleihues en 1993 [Kleihues P *et al.* 1993], suivie de deux autres adaptations en 2000 [Kleihues P *et al.* 2000; Kleihues P *et al.* 2002] et 2007 [Brat DJ *et al.* 2008; Louis David N. *et al.* 2007]. L'édition de 2000 incorpore les premières données moléculaires en tant que marqueurs pronostiques ou prédictifs associées aux gliomes telle l'hyperméthylation du promoteur du gène MGMT pour les glioblastomes ou la détection de pertes de régions chromosomiques 1p et/ou 19q pour les tumeurs oligodendrogiales.

La quatrième version de la classification de l'OMS date de 2007 [Kros Johan M. 2011] et représente le standard international actuel. Elle distingue plusieurs catégories de tumeurs gliales :

- les épendymomes provenant de cellules épendymaires et se développant à partir des parois des ventricules.
- les oligodendrogliomes aux caractéristiques oligodendrogiales,
- les astrocytomes composés de cellules à parenté astrocytaire,
- les oligoastrocytomes, tumeurs mixtes oligo-astrocytaires.

Parmi ces catégories tumorales, une stadification est effectuée en fonction de l'analyse de critères morphologiques dont le degré de différenciation, la densité cellulaire, l'atypie nucléaire, l'activité mitotique, le caractère nécrotique et la prolifération des micro-vaisseaux. Ces différents critères permettent d'obtenir quatre grades (Tableau 1), définis comme suit :

- le grade I : tumeurs bénignes à croissance lente et généralement bien circonscrites.
- le grade II : tumeurs pré-malignes, à croissance lente mais à limites imprécises.
- le grade III : tumeurs malignes composées de cellules anaplasiques, à croissance modérée.
- le grade IV : tumeurs hautement malignes, contenant divers types cellulaires se multipliant rapidement et ayant une forte propension à la nécrose. Les contours tumoraux sont mal définis et angiogéniques.

Grade I
Astrocytome à cellules géantes sous-épendymaire
Astrocytome pilocytique
Gliome angiocentrique
Grade II
Astrocytome pilocytique, variante pilomyxoïde
Astrocytome diffus (variantes fibrillaire, protoplasmique, gémistocytique)
Xanthoastrocytome pléiomorphe
Oligodendrogliome ou O II
Oligoastrocytome ou OA II
Grade III
Astrocytome anaplasique ou A III
Oligodendrogliome anaplasique ou O III
Oligoastrocytome anaplasique ou OA III
Grade IV
Glioblastome à composante oligodendrogiale
Glioblastome à petites cellules
Glioblastome à cellules géantes
Gliosarcome

Tableau 1 : Principaux types de gliomes au sein de chaque grade selon la classification de l'OMS 2007 [Louis David N. et al. 2007].

La classification de l'OMS pose un problème de reproductibilité inter- et même intra-observateur [Bruner JM *et al.* 1997; Coons SW *et al.* 1997; Mittler MA *et al.* 1996] dû à l'utilisation de critères subjectifs. De plus, le mode de prélèvement (biopsie) utilisé pour cette classification ne permet pas d'assurer avec certitude que l'échantillon analysé est représentatif de l'ensemble de la tumeur, notamment pour les tumeurs gliales de haut grade qui sont très hétérogènes. Au sein d'une même lésion, plusieurs grades peuvent cohabiter et une sous-évaluation du grade le plus élevé dans la tumeur est possible dans le cas de simples biopsies. Les neuropathologistes de l'hôpital de Sainte-Anne (Paris) proposent une classification alternative pour pallier ce défaut.

B - II - Classification des gliomes selon l'hôpital Sainte-Anne/Mayo

La classification française actuelle de l'hôpital Sainte-Anne [Catherine Daumas-Duport *et al.* 1997a; Catherine Daumas-Duport *et al.* 1997b] repose sur l'intégration des données cliniques et d'imagerie dans les critères de classification des gliomes [Kelly PJ *et al.* 1987].

L'imagerie offre une vision macroscopique de la lésion et de son hétérogénéité et permet donc d'apprécier la représentativité des prélèvements analysés en histologie. Elle renseigne également sur le degré d'infiltration de la lésion (infiltrante pure, solide pure ou mixte) du fait de l'œdème fréquemment associé, observable en imagerie par résonance magnétique (IRM) par un hypersignal en T₂. Enfin la vascularisation tumorale peut être appréciée *via* la prise de contraste observable en IRM par un hypersignal en T₁ après injection d'un chélate de gadolinium.

L'apport de la classification des gliomes selon l'hôpital de Sainte-Anne repose sur deux critères : l'hyperplasie des cellules endothéliales et la prise de contraste en imagerie. L'hyperplasie endothéliale est définie par la présence dans un champ du microscope (objectif 10) de vaisseaux dont les cellules endothéliales possèdent des noyaux qui se touchent [Figarella-Branger D. *et al.* 2005]. Cette hyperplasie, comme la prise de contraste en IRM, sont caractéristiques de l'angiogenèse tumorale. Selon ces caractéristiques, seules quatre catégories sont distinguées parmi les gliomes :

a- les oligodendrogliomes (et oligoastrocytomes) de grade A : caractérisés par une absence d'hyperplasie endothéliale et de prise de contraste en IRM. La présence de cellules tumorales isolées à noyaux caractéristiques en « bouton » permet de confirmer la classe. Les tumeurs de grade A sont généralement associées à une survie médiane de 11 ans.

b- les oligodendrogliomes (et oligoastrocytomes) de grade B : caractérisés par une hyperplasie endothéliale en histologie et/ou prise de contraste modérée et/ou multicentrique en IRM. Les contours visualisés par un hypersignal en T₂ présentent des limites nettes. Les oligodendrogliomes de grade B sont corrélés à une survie médiane de 3,5 ans.

Les oligoastrocytomes représentent un type de tumeur à part dans la classification de l'OMS mais ne constituent pas une classe indépendante dans celle de l'hôpital Sainte-Anne. Selon cette dernière, la composante astrocytaire des oligoastrocytomes pourrait être d'origine réactive principalement. En IRM, les oligoastrocytomes et les oligodendrogliomes présentent un aspect similaire et la survie des patients est identique pour les deux types tumoraux. Les critères cliniques et d'imagerie étant similaires, la classification de l'hôpital Sainte-Anne ne sépare pas strictement oligodendrogliomes et oligoastrocytomes.

c- les glioblastomes, classés en grade B, présentent une prise de contraste massive et unique en anneau, entourée d'un œdème. Le diagnostic doit être confirmé par la présence de tissu tumoral à différenciation astrocytaire exclusive et/ou grâce à l'aspect cytologique non oligodendrogial de la composante tumorale isolée [Figarella-Branger D. *et al.* 2005].

d- les tumeurs glioneuronales malignes (TGNM) : ce sous-groupe de glioblastomes a été identifié en 2000 [Daumas-Duport C *et al.* 2000]. Comme les glioblastomes, il présente également une prise de contraste massive en IRM. Il se caractérise par l'expression de marqueurs neuronaux comme la protéine du neurofilament (NFP), la synaptophysine ou la protéine NeuN, détectables en immunohistochimie (IHC) au niveau de cellules tumorales d'aspect non neuronal.

Cependant le marquage NFP semble inconstant et hétérogène selon le centre d'étude et le protocole appliqué [Moroch Julien 2009]. Les TGNM présentent des signatures génomiques et transcriptomiques identiques aux glioblastomes, sans argument pour une différenciation neuronale. Aucune différence significative de survie par rapport aux glioblastomes (p=0,35), aucune caractéristique clinique, radiologique, morphologique propre, ne permet de distinguer les TGNM des autres tumeurs gliales de haut grade. Selon le même auteur, l'individualisation d'un sous-groupe de tumeurs gliales malignes en fonction du résultat seul de l'étude IHC anti-NFP apparaît non justifiée et sans impact sur le pronostic et la survie [Moroch Julien 2009].

Si la classification de l'hôpital de Sainte-Anne permet bien de définir au moins trois classes tumorales cohérentes, la corrélation avec la classification de l'OMS peut être difficile, voire impossible dans le cas des astrocytomes de bas grade. Les difficultés à classer une tumeur en astrocytome, oligodendrogliome ou tumeur mixte pourraient découler du fait que les tumeurs dérivent de cellules progénitrices possédant les capacités de se différencier dans le sens astrocytaire et/ou oligodendrogial [Figarella-Branger D. *et al.* 2005].

B - III - Apports de la caractérisation moléculaire pour la classification des gliomes

À partir de 2000, de nombreuses études de biologie moléculaire proposent de compléter, préciser voire remplacer les classifications basées sur la morphologie histologique ou sur les données d'imagerie. Ces études peuvent être divisées en:

- analyses supervisées cherchant à caractériser sur le plan moléculaire les différents types de tumeurs gliales composant les classifications habituelles [Faury Damien *et al.* 2007; French PJ *et al.* 2005; Godard Sophie *et al.* 2003; Nutt Catherine L. *et al.* 2003; Rickman David S. *et al.* 2001; Shai Ruty *et al.* 2003; Shirahata M *et al.* 2007; Tso CL *et al.* 2006; van den Boom Jörg *et al.* 2003]. Ce type d'approche a permis d'identifier des marqueurs moléculaires individuels mais également des profils d'expressions plus étendus caractérisant certains sous-types tumoraux.

- analyses non supervisées consistant à analyser le profil d'expression génique de tout type de gliome afin de proposer des classifications basées uniquement sur l'identification de sous-types moléculaires et faisant abstraction de la notion de groupes tumoraux prédéfinis [Cooper LA *et al.* 2010; Li A *et al.* 2009; Phillips Heidi S. *et al.* 2006; Verhaak RG *et al.* 2010]. Mark Vitucci et ses collègues ont établi en 2011 un bilan des profils d'expression de gènes menés sur les gliomes humains pour leur classification (pour revue [Vitucci M *et al.* 2011]).

B - III - 1 - Analyses supervisées

a - L'utilisation de marqueurs moléculaires individuels

Les altérations moléculaires peuvent représenter une aide pour la classification lorsqu'elles sont corrélées aux différents types histo-morphologiques des tumeurs gliales (Tableau 2). Cependant, les biomarqueurs permettant un réel diagnostic et/ou pronostic univoque sont peu nombreux

(pour revue Riemenschneider *et al.* 2010 [Riemenschneider Markus J. *et al.* 2010] et Lages *et al.* 2012[Lages E *et al.* 2012]) :

- Perte et gain des chromosomes 7 et 10

Le gain du chromosome 7 et la perte du chromosome 10 sont des marqueurs diagnostiques puisqu'ils sont la signature des glioblastomes *de novo* et qu'ils sont retrouvés dans 36 à 75% des tumeurs de grades IV [Idbaih A *et al.* 2010]. Ces modifications chromosomiques peuvent être également considérées comme des marqueurs pronostiques hautement défavorables puisque les patients porteurs d'un glioblastome présentant ces anomalies génomiques ont une survie plus courte [Idbaih A *et al.* 2008; Korshunov A *et al.* 2006; Maher EA *et al.* 2006; Misra A *et al.* 2005; Nigro JM *et al.* 2005].

- Co-délétion des bras chromosomiques 1p/19q :

Cette co-délétion est un marqueur diagnostique puisque 61 à 89% des oligodendrogliomes de grades II et III [Bromberg JE *et al.* 2009], 30 à 60% des oligoastrocytomes et 13 à 20% oligoastrocytomes anaplasiques [Reifenberger J *et al.* 1994] la présentent et qu'elle est absente des astrocytomes. Cette co-délétion peut aussi être considérée comme un marqueur de bon pronostic et ce, quel que soit le type de traitement proposé au patient (radiothérapie, chimiothérapie ou radio/chimiothérapie) [Cairncross G *et al.* 2006; van den Bent MJ *et al.* 2006b; Wick W *et al.* 2009].

- L'hyperméthylation du promoteur de la O-6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT):

Le gène de la MGMT code pour une enzyme de réparation de l'ADN qui enlève les groupes alkyles greffés sur les guanines de l'ADN lors des chimiothérapies alkylantes (composants nitrosurés ou temozolomide) [Gerson Stanton L. 2004]. L'hyperméthylation des îlots CpG du promoteur de la MGMT est corrélée à une diminution de la réparation de l'ADN. Le statut épigénétique de ce gène de réparation représente un marqueur pronostique et prédictif de la réponse aux chimiothérapies alkylantes. Lors d'administration de témozolomide concomitante à la radiothérapie, la survie moyenne des patients porteurs d'un glioblastome à statut MGMT hyperméthylé est significativement plus élevée que pour les patients porteurs d'un glioblastome à statut MGMT non-hyperméthylé (21,7 vs 12,7 mois de survie moyenne) [Janzer RC 2009].

- L'oncogène B-Raf:

L'oncoprotéine B-Raf, codée par le gène BRAF, est un membre de la famille des protéines kinases cytoplasmiques Raf impliquée dans les processus physiologiques de croissance, différenciation et survie cellulaire [Wan PT *et al.* 2004]. La mutation du gène BRAF permet une activation de la voie de signalisation Ras-Raf de manière indépendante de la signalisation située en amont. Cela entraîne une prolifération et une survie cellulaire excessives et indépendantes des facteurs de croissance [McCubrey JA *et al.* 2006; McCubrey JA *et al.* 2007; Wan PT *et al.* 2004].

La voie de signalisation de B-Raf est altérée dans 60 à 85% des astrocytomes pilocytiques [Ducray François *et al.* 2009; Jones DT *et al.* 2009]. Cette altération peut être issue de la duplication de l'oncogène BRAF au niveau du bras chromosomique 7q (dans 66% des astrocytomes pilocytiques [Ducray François *et al.* 2009; Jones DT *et al.* 2008; Jones DT *et al.* 2009]), de la mutation du gène de la neurofibromatose de type 1 (NF1), aboutissant à la surexpression de la protéine B-Raf ou encore de la mutation activatrice du gène BRAF. Ces altérations peuvent servir de marqueur diagnostique en aidant à distinguer les astrocytomes pilocytiques des astrocytomes diffus.

- Mutations des isocitrates déshydrogénases 1 et 2 (IDH1 et IDH2) :

En conditions physiologiques, les protéines IDH1 et 2, enzymes clefs du cycle de Krebs, catalysent la décarboxylation oxydative de l'isocitrate en alpha-cétoglutarate. Les fonctions exactes des formes mutées des protéines IDH1 et 2 restent encore à définir avec certitude mais pourraient aboutir à une stabilisation du facteur *HIF-1* (Hypoxia Inducible Factor), à une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans l'angiogenèse et le transport de glucose, et à une inhibition de l'apoptose [Fu Y *et al.* 2012; Reitman Zachary J. *et al.* 2010; Zhao S *et al.* 2009]. Ces mutations peuvent aider au diagnostic puisqu'elles sont retrouvées dans environ 75% des gliomes de bas grade et 60% des gliomes anaplasiques [Nobusawa S *et al.* 2009; Sanson M *et al.* 2009; Watanabe T *et al.* 2009]. Elles peuvent également aider à différencier les glioblastomes primaires (diagnostiqués sans évidence de lésions antérieures) des glioblastomes secondaires (issus de l'évolution de gliomes de plus bas grades). Les mutations IDH1 et IDH2 sont en effet détectées dans 85% des glioblastomes secondaires contre seulement 5% des glioblastomes primaires. Ces mutations sont également associées à un meilleur pronostic lorsqu'elles sont présentes dans les glioblastomes primaires.

Entité	Grade OMS	Aberration moléculaire				
		Altération de BRAF [Riemenschneider Markus J. et al. 2010]	Codélétion de 1p/19q [Ducray François et al. 2009]	Mutation IDH1 [Ducray François et al. 2009]	Méthylation de MGMT [Ducray François et al. 2009]	Amplification de EGFR [Riemenschneider Markus J. et al. 2010]
Astrocytome pilocytique	I	X				
Oligodendrogliome	II		X	X	X	
Oligoastrocytome	II		x	x	x	
Oligodendrogliome anaplasique	III		x	x	x	
Astrocytome anaplasique	III			X	x	
Astrocytome diffus	II			X	X	
Oligoastrocytome anaplasique	III		x	x	X	
Glioblastome secondaire	IV			X	x	
Glioblastome primaire	IV				x	x

Tableau 2: Classification histo-moléculaire d'après Ducray et al. 2009 [Ducray François et al. 2009; Jones DT et al. 2009] et Riemenschneider et al. 2010 [Riemenschneider Markus J. et al. 2010].

b - Vers un modèle de progression tumorale : la gliomagenèse.

Si peu d'altérations moléculaires peuvent servir de marqueurs diagnostiques ou pronostiques, les anomalies récurrentes retrouvées au sein des différents gliomes permettent de proposer des modèles de progression tumorale (figure 2) difficiles à utiliser malgré tout dans le cadre d'une activité hospitalière de routine.

L'activation de certaines voies de signalisation associée à l'amplification d'oncogènes, tels que le récepteur de l'*Epidermal growth factor* (EGFR) ou certaines mutations comme celle de la protéine *Phosphatase and tensin homolog* (PTEN) sont retrouvées principalement lors du développement de glioblastomes primaires. Ces types d'altérations moléculaires suggèrent une origine distincte pour les glioblastomes primaires et secondaires, issus de patrons génétiques différents. Les glioblastomes secondaires peuvent dériver d'astrocytomes anaplasiques ou d'oligoastrocytomes anaplasiques après notamment la perte du bras chromosomique 10q ou la perte de l'expression de la protéine *deleted in colorectal cancer* (DCC). Dans ce modèle, les lésions de grade III n'apparaissent pas *de novo* et possèdent leur propre schéma de progression génétique à partir de gliomes de grade II qui dérivent eux-mêmes directement de cellules saines. Les gliomes de grade I représentent une entité singulière ne pouvant progresser vers un stade plus agressif (Figure 2).

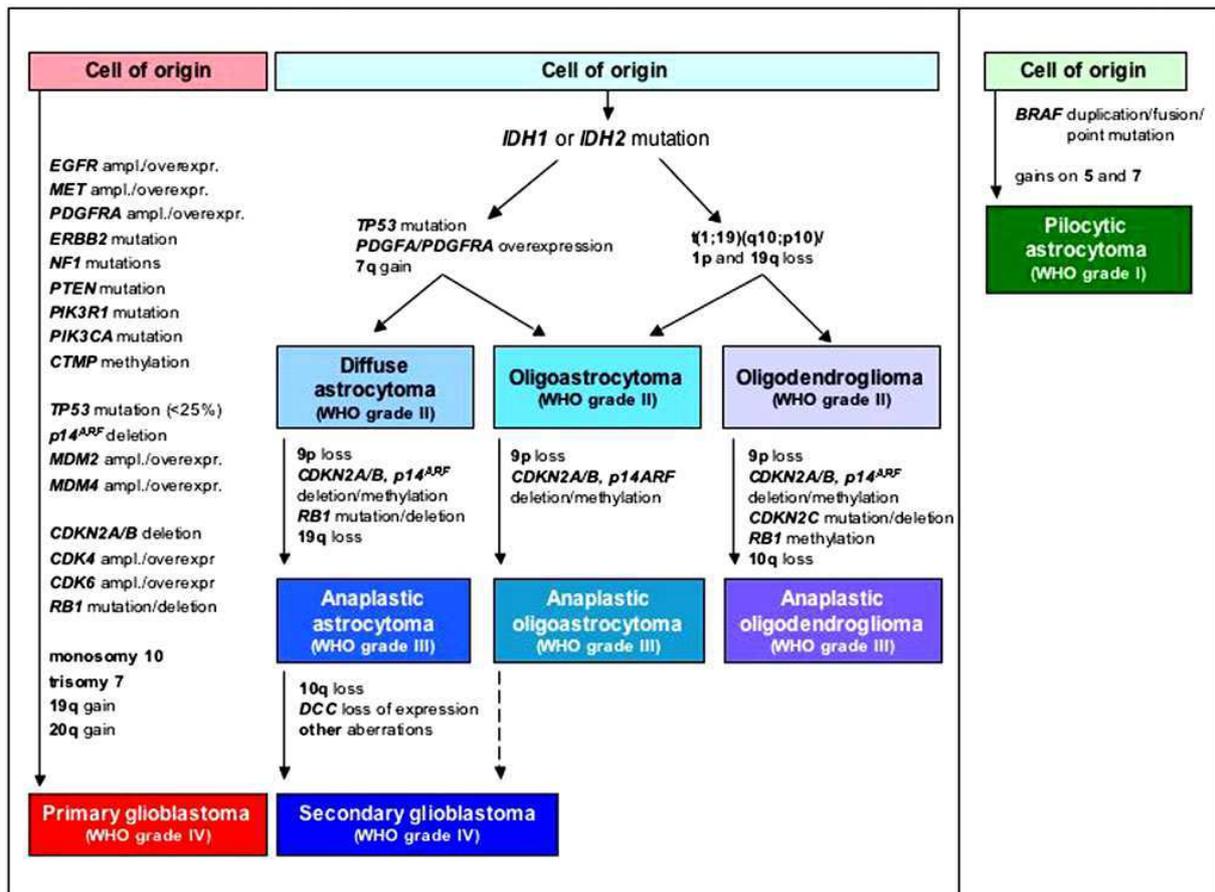


Figure 2: Résumé des altérations moléculaires les plus fréquentes chez les gliomes de type astrocytique, oligodendrogliale et oligoastrocytaire et mécanismes de progression tumorale d'après Riemenschneider et al. 2010 [Riemenschneider Markus J. et al. 2010].

c - L'utilisation des microRNAs

Les microRNAs ou miRNAs sont des ARN non codants d'environ 21 nucléotides, qui modulent l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel, en inhibant sa traduction en protéine [Couzin Jennifer 2002]. À l'heure actuelle, près d'une quarantaine d'études ont proposé certains miRNAs comme marqueurs potentiels des gliomes. L'expression différentielle des miRNAs miR-21 [Chan JA et al. 2005; Conti A et al. 2009; Silber J et al. 2008], miR221/222 [Ciafrè SA et al. 2009; Gillies JK et al. 2007], miR-181 [Ciafrè SA et al. 2009; Shi L et al. 2008], miR-26a [Huse JT et al. 2009; Kim H et al. 2010], miR296, miR-15b, miR146b, miR-125b, miR-10b, miR-153, miR-17, miR-184, miR-196a, miR-195, miR-455-3p, miR-10a, Let-7, miR-182 sont différenciellement exprimés entre gliomes et tissu cérébral sain (pour revue [Zhang Ying et al. 2012]). De plus, certains microRNAs se sont révélés pertinents pour discriminer les différents types de gliomes. En 2010, Rao et al. ont identifié 23 miRNAs constituant une signature permettant de distinguer les glioblastomes des astrocytomes anaplasiques avec une certitude de 95% [Rao SA et al. 2010]. Parmi eux, la

dérégulation de l'expression des miR-21, miR-34a, miR-128 et miR-451 avait déjà été décrite dans des lignées cellulaires de glioblastomes. D'autres comme miR-886-3p, miR-886-5p, miR-16, miR-24 n'avaient jamais été reliés aux gliomes [Rao SA *et al.* 2010]. En 2011 Lages *et al.* ont identifié 26 miRNAs dérégulés dans les gliomes par rapport au tissu sain, dont 6 n'ayant jamais été décrits (let-7a, let-7b, let-7f, miR-374a, miR-339-5p et miR-409-5p). Ces auteurs ont également proposé un jeu de 7 marqueurs (miR-21, miR-128, miR-132, miR-134, miR-155, miR-210 et miR-409-5p) permettant de différencier les oligodendrogliomes des glioblastomes [Lages E *et al.* 2011].

Même si leur implication dans la gliomagenèse reste à définir, l'utilisation des microRNAs comme marqueurs diagnostiques se révèle de plus en plus pertinente.

d - L'utilisation de profils moléculaires étendus

Les approches pangénomiques permettent de proposer des classifications des gliomes reposant sur une carte d'identité génétique globale. Dès 2000, en comparant des classes tumorales pré-établies, basées sur des critères histo-morphologiques, des différences moléculaires ont été identifiées entre les astrocytomes de bas et de haut grade [Rickman David S. *et al.* 2001], les oligodendrogliomes de haut grade et les glioblastomes [Nutt Catherine L. *et al.* 2003; Shirahata M *et al.* 2007], les glioblastomes primaires et secondaires [Godard Sophie *et al.* 2003; Shai Ruty *et al.* 2003; Tso CL *et al.* 2006], les glioblastomes de l'adulte et de l'enfant [Faury Damien *et al.* 2007], ou entre divers sous-types de gliomes définis par leur histo-morphologie [Godard Sophie *et al.* 2003; Shai Ruty *et al.* 2003; van den Boom Jörg *et al.* 2003]. Pour les lésions néoplasiques bien définies sur le plan morphologique (comme les astrocytomes de bas grade), l'identification moléculaire est relativement homogène. Les entités tumorales ayant une histo-morphologie plus hétérogène, présentent plus d'hétérogénéité moléculaire [Kros Johan M. 2011]. Nutt *et al.* ont illustré en 2003 le potentiel clinique de l'utilisation des profils d'expression de gènes comme test diagnostique secondaire pour obtenir une classification plus précise [Nutt Catherine L. *et al.* 2003]. Les jeux de gènes corrélés avec les sous-types morphologiques de glioblastomes ou d'oligodendrogliomes se sont révélés prédictifs avec 86% d'exactitude sur un autre groupe d'échantillons de gliomes. De plus, ils ont mis en évidence une meilleure corrélation entre survie et profil d'expression génique qu'entre survie et morphologie surtout pour les gliomes de haut grade à morphologie ambiguë. Ceci a été confirmé par Shirahata *et al.* [Shirahata M *et al.* 2007], qui ont identifié 168 gènes différentiellement exprimés entre glioblastomes et oligodendrogliomes anaplasiques. Ces auteurs ont développé un test diagnostique composé d'un set de 67 gènes présentant 96,6% de fiabilité

pour discriminer deux gliomes de haut grade à pronostic distinct à partir du set de données publié par Nutt *et al.* en 2003 [Nutt Catherine L. *et al.* 2003]. Ces approches ne sont cependant pas utilisées en routine et nécessitent encore une validation par étude clinique.

B - III - 2 - Analyses non supervisées des profils d'expression pangénomique: Propositions de nouvelles classifications

a - Classification de Phillips *et al.* 2006

En 2006, Phillips *et al.* ont réalisé une analyse sur 76 astrocytomes de haut grade (III et IV) [Phillips Heidi S. *et al.* 2006]. Cent huit gènes différentiellement exprimés ont permis de discriminer trois sous-types nommés tumeurs proneurales, prolifératives et mésenchymateuses. Le sous-type proneural défini par la présence de gènes impliqués dans la neurogenèse est composé à 69% de types tumoraux autres que les glioblastomes et est associé à une survie moyenne de 3,6 ans. La signature génique des groupes « prolifératifs » et « mésenchymateux » est enrichie en gènes impliqués dans la prolifération et l'invasion cellulaire et est corélée à une survie plus faible (environ 1,3 ans). Ces sous-types tumoraux correspondent aux groupes HC1A, HC2A et HCA2B décrits par Frieje *et al.* en 2004 [Freije William A. *et al.* 2004]. La pertinence pronostique de ces sous-types moléculaires a été validée sur une cohorte indépendante de 184 gliomes de tous types histologiques confondus [Phillips Heidi S. *et al.* 2006].

b - Classification de Li *et al.* 2009

En 2009 Aiguo Li et ses collègues ont proposé une classification moléculaire non supervisée des gliomes à partir de l'analyse de l'expression de l'intégralité du génome [Li A *et al.* 2009] sur un échantillonnage de 159 gliomes de grade II à IV selon la classification de l'OMS. Six sous-types regroupés en deux catégories principales (catégorie O et G) ont été identifiés. La première catégorie contient deux sous-groupes (OA et OB), la deuxième en regroupe quatre (GA1, GA2, GB1 et GB2). Les groupes principaux O et G et les sous-groupes OA et OB du groupe O, ont des pronostiques de survie différents (Tableau 3). Les quatre sous-groupes G ne sont au contraire pas différenciables par la survie qui leur est associée. Les différences de pronostic des deux principaux

groupes ont été confirmées sur des groupes de données indépendantes issus du The Cancer Genome Atlas (TCGA), composés entièrement de glioblastomes [Verhaak RG *et al.* 2010].

	<i>Type histologique (OMS)</i>	<i>Grade histologique (OMS)</i>	<i>Pronostic clinique</i>	<i>Age des patients</i>
Type principal O	<i>Oligodendrogliome et astrocytome (96%)</i>	<i>Grade II et III (96%)</i>	<i>2365 jours</i>	<i>~ 43 ans</i>
<i>Sous type OA</i>	<i>Astrocytome (79%)</i>	<i>Grade II (71%)</i>	<i>1479 jours</i>	<i>~41,5 ans</i>
<i>Sous type OB</i>	<i>Astrocytome (75%)</i>	<i>Grade II (65%)</i>	<i>924 jours</i>	<i>~ 43 ans</i>
Type principal G	<i>Glioblastome (68%)</i>	<i>Grade IV (68%)</i>	<i>348 jours</i>	<i>~ 57 ans</i>
<i>Sous type GA1</i>	<i>Glioblastome (73%)</i>	<i>Grade IV majoritaire</i>	<i>269,5 jours</i>	<i>56,8 ans</i>
<i>Sous type GA2</i>	<i>Glioblastome (64%)</i>	<i>Grade IV majoritaire</i>	<i>389 jours</i>	<i>59,1 ans</i>
<i>Sous type GB1</i>	<i>Glioblastome (53%)</i>	<i>Grade IV majoritaire</i>	<i>381 jours</i>	<i>59,3 ans</i>
<i>Sous type GB2</i>	<i>Glioblastome (70%)</i>	<i>Grade IV majoritaire</i>	<i>395 jours</i>	<i>61,8 ans</i>

Tableau 3: *Caractéristiques cliniques majeures associées aux six sous types de gliomes identifiés à partir des profils d'expression génique globale, adaptée de Li et al. 2009 [Li A et al. 2009].*

L'analyse des profils d'expression de gènes grâce aux puces à ADN permet de caractériser des sous-types moléculaires et d'accéder à un système de classification reflétant les bases cellulaires, génétiques et moléculaires de la gliomagenèse. Cette classification peut mener à l'identification des sous-ensembles répondant de manière unique à des thérapies spécifiques et permet d'avancer vers la personnalisation des traitements cliniques. Même si à l'heure actuelle, le standard international reste la classification de l'OMS basée essentiellement sur des critères histomorphologiques, les classifications futures devraient incorporer les données issues des techniques moléculaires et d'imagerie permettant d'approcher au mieux le pronostic, voire être récréées sur des bases moléculaires.

C - Épidémiologie

Malgré un effort d'harmonisation et de centralisation des études épidémiologiques, les données sur les tumeurs cérébrales restent difficiles à synthétiser et à comparer du fait de protocoles variant d'un centre d'étude à un autre : choix de la classification des tumeurs, diversité des groupes d'études (tranches d'âge analysées différentes, nombre d'individus dans l'étude), périodes d'analyse et moyens diagnostiques.

C - I - En France

Au début des années 2000, un recensement à l'échelon national des tumeurs chez l'adulte a été entrepris en rapprochant l'Association des Neuro-Oncologues d'Expression Française (ANOCEF), la Société Française de Neurochirurgie, la Société Française de Neuropathologie et le Groupe de Neuro-Oncologie de la Fédération des Centres de Lutte Contre le Cancer. En 2007, un travail préliminaire a testé, à partir de ce rapprochement, la faisabilité de la création d'une banque de données nationale pour les tumeurs primaires du système nerveux central : la French Brain Tumors Data Bank (FBTDB) [Bauchet Luc *et al.* 2007]. Les résultats obtenus à partir de 10 093 cas enregistrés sont d'abord une incidence annuelle de 15,8 tumeurs primaires du système nerveux central pour 100 000 habitants dont 49,6% sont des gliomes, soit 2% de l'ensemble des cancers. La distribution des différents sous-types de gliome en France, est comparable à celle des États-Unis en 2006 [CBTRUS], à l'exception des tumeurs oligodendrogiales (Tableau 4). Cette divergence peut en partie être expliquée par une plus grande influence en France de la classification proposée par le Professeur Catherine Daumas-Duport [Daumas-Duport C. *et al.* 2000].

	N	%
Astrocytomes	3066	61,3
Astrocytome pilocytique	249	5
Astrocytome de grade II	81	1,6
Astrocytome anaplasique	140	2,8
Glioblastome	2421	48,3
Autres types d'astrocytome	175	3,5
Oligodendrogliomes	1061	21,2
Oligodendrogliome grade II	470	9,4
Oligodendrogliome anaplasique	591	11,8
Tumeurs gliales mixtes	542	10,8
Oligoastrocytome grade II	170	3,4
Oligoastrocytome anaplasique	372	7,4
Autres tumeurs gliales	341	6,8

Tableau 4: *Distribution (nombre (N) et pourcentage (%)) des sous types de gliomes (n=5010) parmi les 10093 cas de tumeurs primaires du système nerveux central recensés entre 2004 et 2006 en France. (Adaptation simplifiée de [Bauchet Luc et al. 2007]).*

En 2012, une seconde étude basée sur la FBTDB et portant sur un plus grand nombre de cas (n=43 929) a permis d'établir la première base de données d'envergure nationale, comportant les données cliniques, chirurgicales et histologiques recueillies en France de 2004 à 2009 [Zouaoui S.

et al. 2012]. En France, le taux de mortalité liée aux tumeurs cérébrales a augmenté entre les années 1980 et 2010, passant de 3,8 à 5,3 cas chez les hommes et de 2,3 à 3,6 chez les femmes, pour 100 000 habitants [Hill Catherine *et al.* 2005]. Cette augmentation peut en partie être expliquée par l'amélioration des techniques diagnostiques et l'augmentation de l'espérance de vie. Elle ne représente pas nécessairement un réel accroissement du nombre de tumeurs cérébrales dans la population française.

De manière plus focalisée, les données concernant les cancers de l'enfant et de l'adolescent ont été regroupées par le Registre National des Hémopathies malignes de l'Enfant depuis 1990 puis par le Registre National des Tumeurs Solides de l'Enfant depuis 2000. Si les tumeurs cérébrales se situent au 16^{ième} rang des cancers en termes d'incidence chez l'adulte, c'est le 2^{ième} cancer le plus fréquent chez l'enfant (23% de tous les cancers de l'enfant) après les leucémies (29%). Cependant, alors que la mortalité liée aux leucémies et lymphomes a été divisée par quatre depuis 1968, elle a peu évolué pour les tumeurs cérébrales qui reste la première cause de décès par cancer chez l'enfant (37%) [Hill Catherine *et al.* 2007].

C - II - Aux États-Unis...

C - II - 1 - L'organisme de référence : CBTRUS

Le *Central Brain Tumor Registry of The United States* (CBTRUS (www.cbtrus.org)) regroupe les données de 285 294 cas diagnostiqués entre 2004 et 2008 provenant du *National Program of Cancer Registries* (NPRC) et de 11 800 cas issus du programme *Surveillance, Epidemiology and End Results* (SEER) du *National Cancer Institute*. Une uniformisation de la collecte et de la classification des données a débuté en 2004 pour les tumeurs cérébrales bénignes et en 2005 pour les malignes. Les analyses effectuées par le CBTRUS sont ainsi menées sur 295 986 cas recensés de manière homogène à partir de 49 registres. Le rapport du CBTRUS paru en février 2012, constitue à ce jour la base d'information la plus étendue et cohérente [CBTRUS 2012].

C - II - 2 - L'incidence

L'incidence des tumeurs primaires du système nerveux central est de 19,89 pour 100 000 personnes et par an pour une période s'étalant de 2004 à 2008. La fréquence d'apparition est de

5,05 cas pour 100 000 habitants par an pour les enfants de 0 à 19 ans, 4,92 pour les enfants de moins de 15 ans, 25,86 au-delà de 20 ans et 71,06 au-delà de 85 ans [CBTRUS 2012]. Si l'incidence des tumeurs du SNC s'élève avec l'âge, la proportion de tumeurs malignes est inférieure à celle des tumeurs bénignes chez l'adulte alors qu'elle représente près des deux tiers chez les individus de moins de 19 ans (Tableau 5).

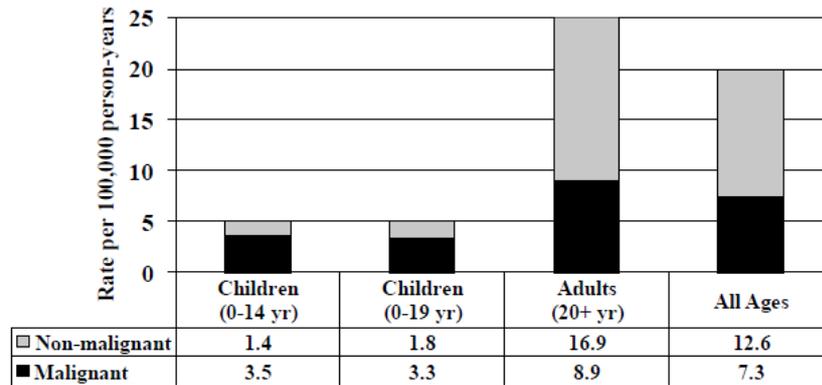


Tableau 5: Incidence annuelle moyenne des tumeurs primaires du système nerveux central, bénignes et malignes, en fonction de l'âge des patients de 2004 à 2008 aux États Unis. (Extrait du rapport CBTRUS 2012, [CBTRUS 2012]).

Trente pourcent des tumeurs primaires du SNC sont des gliomes (Figure 3a) avec une fréquence d'apparition de 6,04 cas par an pour 100 000 habitants, tous âges confondus. Parmi eux, la majorité est des glioblastomes (53,9%) qui représentent environ 71% des astrocytomes (Figure 3b) avec une incidence de 3,20/100 000. Les autres astrocytomes représentent la deuxième classe la plus fréquente des gliomes (22,3%) [CBTRUS 2012].

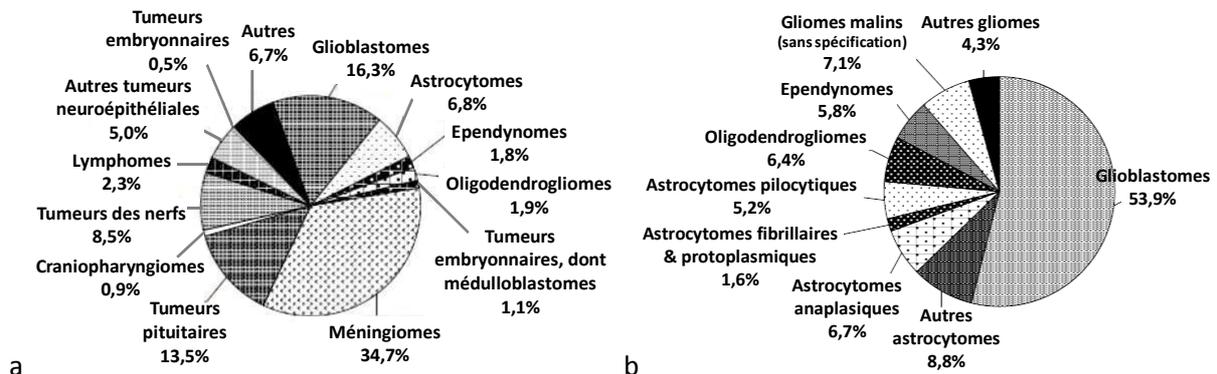


Figure 3 : a – Distribution des tumeurs primaires du SNC en fonction du type histologique selon la classification de l'OMS. b - Distribution des gliomes en fonction du type histologique selon la classification de l'OMS. Adapté du rapport [CBTRUS 2012].

C - II - 3 - La mortalité

De 2004 à 2008, la mortalité de l'ensemble des tumeurs cérébrales primaires représente respectivement 5,6 et 3,7/100 000 habitants/an pour les hommes et les femmes aux États-Unis. La survie à 5 ans n'est que de 29,1% et 25,3% à 10 ans. Mais le pronostic associé aux tumeurs cérébrales primaires est extrêmement variable en fonction de la malignité tumorale. Le taux de survie à 5 ans des patients porteur d'un gliome de bas grade (astrocytomes pilocytiques, oligodendrogliomes (grade II)) peut dépasser 70%. Pour les astrocytomes anaplasiques et les oligodendrogliomes anaplasiques (grade III) la survie à 5 ans n'excède pas 30 et 50%, respectivement (Tableau 6). Le pronostic pour les patients porteurs d'un glioblastome est encore plus sombre puisque seuls 4,7% des patients diagnostiqués entre 2004 et 2008 ont survécu 5 ans après le diagnostic [CBTRUS 2012].

Grades de l'OMS	Nom	Incidence (% de gliomes)	Survie à 1 an (%)	Survie à 5 ans (%)	Survie à 10 ans (%)
Grade I					
	Astrocytomes pilocytiques	5,2	97,6	94,1	91,3
Grade II					
	Astrocytomes	9,4	70,1	46,8	36,2
	Oligodendrogliomes	6,4	94,2	79,2	62,6
Grade III					
	Astrocytomes anaplasiques	6,7	61	27	19
	Oligodendrogliomes anaplasiques	2,6	80,3	48,4	33,2
Grade IV					
	Glioblastome	53,9	35,2	4,7	2,3

Tableau 6 : Incidence et pronostic des principales classes de gliomes; d'après CBTRUS 2012 [CBTRUS 2012].

II - PRISE EN CHARGE THÉRAPEUTIQUE DES TUMEURS CÉRÉBRALES

La prise en charge des gliomes est multidisciplinaire et vise généralement dans un premier temps à réduire les symptômes provoqués par la masse tumorale et à soulager le patient. Le traitement repose sur une stratégie associant la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie et ce en fonction du grade et de la localisation et du stade tumoral (Tableau 7).

Entité tumorale	Options thérapeutiques actuelles	
	Nouvellement diagnostiquée	Récurrence ou progression
Gliome de grade II	Traitement de référence : résection complète si possible. Traitement complémentaire : - Radiothérapie envisagée en cas d'inopérabilité ou de résection partielle : 54 Gy en 27 fractions de 2Gy ou en 30 fraction de 1,8 Gy (EORTC 22884). - Témzolomide ou PCV envisagée.	Nouvelle résection éventuelle. En cas de non accessibilité à un second geste d'exérèse, chimiothérapie ou radiothérapie si non réalisée en première intention.
Astrocytome anaplasique (grade III)	Résection la plus large possible (ou biopsie) et radiothérapie ou témzolomide ou radiothérapie + témzolomide.	Nouvelle résection éventuelle. Témzolomide ou radiothérapie (ou ré-irradiation) ou bevacizumab.
Oligodendrogliome anaplasique et oligoastrocytome anaplasique (grade III)	Résection la plus large possible (ou biopsie) et radiothérapie ou témzolomide ou radiothérapie + témzolomide.	Nouvelle résection éventuelle. Témzolomide ou radiothérapie (ou ré-irradiation) ou bevacizumab.
Glioblastome (grade IV)	Résection la plus large possible (ou biopsie) et radiothérapie + témzolomide selon le protocole de Stupp (Figure 5).	Nouvelle résection éventuelle. Chimiothérapie (témzolomide à dose supérieure ou nitrosurée) ou ré-irradiation ou bevacizumab.

Tableau 7: Options thérapeutiques actuelles pour les patients atteints de gliomes de grades II à IV, d'après Weller 2011 [Weller Michael 2011].

A - Prise en charge symptomatique

Les tumeurs cérébrales peuvent rester longtemps asymptomatiques. Cependant la plupart des diagnostics de lésions néoplasiques font suite à une suspicion induite par différents symptômes tels que des crises d'épilepsie, des céphalées, des troubles fonctionnels (vision, parole, mouvements) ou une dégradation de l'état clinique général du patient, dérivant généralement d'une hypertension intracrânienne (HTIC). Le diagnostic de tumeur cérébrale est effectué par imagerie médicale (examen de type scanner couplé à une injection d'agent de contraste iodé, ou IRM couplé à une injection de chélate de gadolinium).

L'œdème péri-tumoral peut être diminué par l'utilisation de différents anti-œdémateux. Les corticoïdes (Médrol®, Solupred®, Cortancyl®, Solumédrol®) par leur action anti-inflammatoire agissent notamment en réduisant la perméabilité vasculaire. Le mannitol augmente l'osmolarité du liquide céphalorachidien entraînant une diminution du contenu cérébral en eau et éventuellement une vasoconstriction. La réduction de l'hypertension intracrânienne qui résulte de

l'utilisation d'anti-œdémateux, permet une diminution de la douleur et généralement une amélioration fonctionnelle rapide. Des anticonvulsivants et antiépileptiques comme le Keppra®, le Dépakine®, le Lamictal®, le Tégrétol® peuvent être également administrés chez les patients ayant eu une crise inaugurale ou en prophylaxie péri-opératoire.

B - La chirurgie

L'exérèse des gliomes constitue le geste thérapeutique de première intention lorsque la taille et la localisation de la lésion le permettent. L'ablation chirurgicale est exclue pour les lésions profondes et/ou multiples mais reste cependant possible pour plus de 75% des gliomes [Zouaoui S. *et al.* 2012]. A l'heure actuelle, la chirurgie est le traitement qui permet les meilleures améliorations de survie et le résidu tumoral post-opératoire influence directement la survie [Stummer W *et al.* 2011]. L'exérèse doit donc être réalisée de manière la plus complète possible en fonction des possibilités.

Les gliomes de bas grade, pas ou peu infiltrants sont généralement enlevés dans leur quasi-intégralité avec une marge opératoire la plus limitée possible afin de préserver les tissus avoisinants et de limiter les séquelles fonctionnelles. Les lésions de haut grade, présentant des limites plus diffuses, ne peuvent être que partiellement retirées, laissant ainsi des cellules tumorales infiltrantes dans le parenchyme cérébral. Une cellule sur dix peut être maligne dans une région de 2 cm autour de la masse tumorale résécable et une sur cent à 4 cm de celle-ci [Wilson CB 1992] (Figure 4).

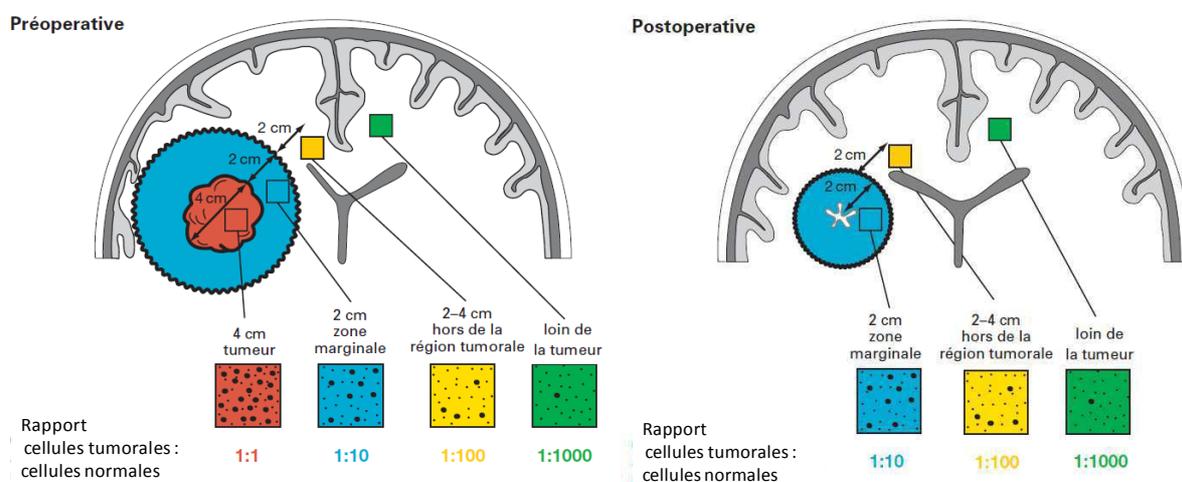


Figure 4: Représentation des propriétés infiltrantes des tumeurs gliales de haut grade (III et IV de l'OMS) en situation pré- et post-opératoire. Figure extraite de [Hofera S *et al.* 2002].

Des biopsies pratiquées plusieurs centimètres au-delà des marges délimitées par l'IRM dévoilent la présence des cellules tumorales dans les zones macroscopiquement saines [Giese A *et al.* 2008]. Les récurrences surviennent dans plus de 90% des cas dans une marge de 2 cm autour des bords de l'exérèse [Hochberg FH *et al.* 1980]. Dans le cas de patients porteurs d'une tumeur de haut grade, la survie n'est augmentée que de 8 à 14 semaines [Chatel M. *et al.* 2005]. L'exérèse partielle ou totale de la masse tumorale améliore cependant l'état clinique général du patient en diminuant la compression des tissus cérébraux, augmentant ainsi la qualité de vie et la réponse pour la suite des traitements. Elle permet également l'ablation des tissus tumoraux peu vascularisés et/ou hypoxiques, généralement peu sensibles aux chimiothérapies ou radiothérapies. Le bénéfice de l'intervention chirurgicale par rapport aux risques péri-opératoires a ainsi longtemps été discuté. Les progrès techniques réalisés au cours des deux dernières décennies la rendent actuellement plus largement utilisée. L'anticipation du geste chirurgical grâce à la qualité de l'imagerie, l'amélioration de la précision du geste grâce aux nouvelles techniques chirurgicales (microscope opératoire, instruments chirurgicaux laser, neuro-navigation assistée par ordinateur [Enchev YP *et al.* 2008], stimulation électrique per-opératoire) et la qualité de l'environnement opératoire rendent l'intervention moins risquée [Lefranc F *et al.* 2006] et plus efficace. La chirurgie guidée par fluorescence avec l'acide 5-aminolévulinique (Gliolan®) augmente la proportion de cellules tumorales résécables en permettant leur visualisation sous lumière bleue [Stummer W *et al.* 2006]. La mortalité péri-opératoire est actuellement inférieure à 5% [Moiyadi Aliasgar V. *et al.* 2012].

La chirurgie des tumeurs cérébrales poursuit également un but diagnostique. Même lorsque l'exérèse est impossible, une biopsie est réalisée pour accéder à un échantillon tumoral si l'état général du patient le permet. La caractérisation des tissus réséqués permet d'établir un diagnostic anatomopathologique et éventuellement moléculaire, afin d'établir, préciser ou confirmer la classification de la lésion voire d'orienter les choix thérapeutiques.

C - La chimiothérapie

Le traitement standard des gliomes a longtemps associé exérèse chirurgicale et radiothérapie. Il a fallu attendre les années 1990 pour que la chimiothérapie soit utilisée en traitement de première ligne. La chimiothérapie désigne toutes les thérapies utilisant une approche médicamenteuse pour

le traitement d'une pathologie et peut être délivrée de façon locale ou systémique. L'administration de molécules est limitée dans le cerveau par la présence de la BHE. Cette barrière est altérée au niveau de la tumeur, ce qui est à l'origine de la prise de contraste en IRM et en scanner. Si cette altération de l'intégrité de la BHE pourrait sembler de prime abord favorable au passage d'agents chimiothérapeutiques, elle induit également un œdème qui réduit le débit sanguin cérébral et accroît la pression interstitielle, supérieure à la pression intravasculaire, limitant le passage extravasculaire d'agents chimiothérapeutiques et donc leur passage dans les tissus tumoraux.

C - I - Chimiothérapies locales

La chimiothérapie locale ou intratumorale est appliquée directement dans le lit tumoral après la résection tumorale chirurgicale. Cette administration présente l'avantage de délivrer une concentration élevée d'agent chimiothérapeutique à proximité de la zone de récurrence tout en limitant la toxicité systémique. L'application de l'agent chimique directement au niveau de la masse tumorale permet de plus de contourner la BHE et la pression tumorale interstitielle qui limitent la distribution de l'agent au niveau tumoral.

À l'heure actuelle seuls les implants de Gliadel[®] possèdent une autorisation de mise sur le marché pour ce type d'administration (AMM : 10/12/1998). Ces implants sont des polymères biodégradables imprégnés de 7,7 mg de carmustine ou bis-chloroethylnitrosourea (BCNU) par pastille. Jusqu'à huit implants, soit 61,6mg, peuvent être déposés dans la cavité d'exérèse. Cette approche est indiquée en traitement de première ligne pour les patients porteurs de gliomes de haut grade (III et IV de l'OMS) et dans le cas de récurrences de glioblastomes attestés histologiquement et pour lesquels une résection chirurgicale est indiquée. Dans le traitement des gliomes de haut grade (III et IV de l'OMS), la médiane de survie des patients a augmenté de 11,6 à 13,9 mois avec l'ajout d'implants de carmustine lors de la chirurgie [Attenello FJ *et al.* 2008]. La place du Gliadel[®] dans le traitement des glioblastomes n'est pas clairement définie par rapport au schéma de Stupp, décrit ci-après (§ II D -). Leur combinaison est cependant possible et semble bien tolérée [Attenello FJ *et al.* 2008; Chaichana KL *et al.* 2011; McGirt MJ *et al.* 2009; Salvati M *et al.* 2011].

Un autre type d'administration locale est l'injection directe de l'agent chimiothérapeutique au niveau de la masse tumorale grâce à une pompe osmotique (reliée à un ou plusieurs cathéters) qui crée une pression positive continue permettant d'atteindre des tissus souvent inaccessibles par une chimiothérapie systémique. La drogue est ainsi délivrée par convection plutôt que par diffusion (CED pour *convection-enhanced delivery*). Cette technique est mise en place dans de nombreux essais cliniques utilisant des agents chimiothérapeutiques conventionnels mais également des produits issus des biothérapies (pour revue [Petit S *et al.* 2008; Rainov NG *et al.* 2008]). On peut entre autre citer les travaux utilisant ce type d'administration pour la cintredexine besudotox (CB ou IL13-PE38QQR), une cytotoxine chimérique recombinante composée d'interleukine-13 fusionnée avec une forme mutée d'exotoxine A de *Pseudomonas aeruginosa* [Debinski W *et al.* 1999; Kawakami M *et al.* 2002]. Une récente étude de phase III comparant la cintredexine administrée par CED aux implants Gliadel® a montré une efficacité équivalente entre les deux approches [Kunwar S *et al.* 2010].

C - II - Chimiothérapies systémiques

Une grande variabilité de réponses en fonction du type tumoral a été observée pour les chimiothérapies systémiques. Les oligodendrogliomes, présentant une co-délétion chromosomique 1p et 19q, sont particulièrement sensibles aux nitrosourées, au Témzolomide et à la combinaison de Procarbazine-CCNU-Vincristine (PCV). À l'inverse, les glioblastomes ne le sont pas. Au cours des 20 dernières années, environ 250 études en relation avec des protocoles chimiothérapeutiques de phase II ou III pour le traitement des glioblastomes ont été publiées. Malgré le grand panel de molécules et de protocoles testés, seules quelques molécules possèdent une AMM pour le traitement des gliomes et sont actuellement utilisées en médecine clinique.

Le témzolomide

La molécule la plus utilisée pour le traitement des gliomes, avec ou sans association, est le témzolomide (Temodal®). Il s'agit d'un agent alkylant administré par voie orale ayant la capacité de passer la BHE [Friedman HS *et al.* 2000]. En contact avec le sang (pH neutre), le témzolomide subit spontanément une conversion non-enzymatique en 3-méthyl-(triazén-1-yl)imidazole-4-carboxamide (MTIC). Cet alkylant induit principalement la méthylation des guanines en position O⁶ et N⁷ et des adénines en position O³ [Denny BJ *et al.* 1994] qui altèrent la capacité de division de la

cellule. Depuis 1999, le témozolomide a obtenu une AMM européenne pour le traitement des patients souffrant d'un gliome malin, tel que le glioblastome multiforme ou un astrocytome anaplastique, avec récurrence ou progression après administration du traitement classique. En 2005 cette AMM a été étendue au traitement des glioblastomes *de novo*. Le Temodal® fait actuellement partie du protocole thérapeutique standard utilisé contre les gliomes de grade IV en association concomitante et adjuvante à la radiothérapie (schéma de Stupp décrit § E-VI).

Les chimiothérapies de deuxième ligne

En cas de contre-indication de l'utilisation du témozolomide ou de récurrence, des molécules plus anciennes pour la plupart alkylantes sont utilisées en traitement de deuxième ligne. Cependant aucune indication standard n'existe pour leur utilisation. Ces molécules sont liposolubles, capables de traverser la BHE, et elles ont la capacité de fixer un groupement alkyle sur les bases de l'ADN (guanines). Ceci bloque la réplication de l'ADN et donc la division cellulaire. Elles sont largement représentées par la famille des nitroso-urées, comprennent la nimustine (ACNU), la carbomustine (BCNU), lomustine (CCNU) et le fotémustine (Muphoran®). Une méta-analyse réalisée à partir de 12 essais cliniques randomisés a permis de mettre en évidence une augmentation de la survie en cas de couplage des nitroso-urées à une radiothérapie par rapport à une radiothérapie seule (pour revue Stewart LA 2002 [Stewart LA 2002]). L'association de certaines de ces nitroso-urées avec la procarbazine (Natulan®), inhibiteur de la polymérisation de l'ADN, a été largement utilisée sous la dénomination de cocktail PCV à partir du milieu des années 1990. L'avantage de cette association n'a pas été démontré en termes de survie dans le cas de récurrence de gliomes de grade IV. Il reste cependant utilisé pour les gliomes de grade II et III [van den Bent MJ *et al.* 2006a]. Les sels de platine comme le Cisplatine et le Carboplatine, génèrent également des adduits au niveau des guanines de l'ADN. Leur association avec une radiothérapie n'entraîne pas d'augmentation de la survie par rapport à une radiothérapie seule [EORTC Brain Tumor Group 1991; Freeman CR *et al.* 2000]. Une amélioration de la survie a cependant pu être observée dans le cas de protocoles incluant une radiothérapie couplée à la carmustine et à des sels de platine [Boiardi A *et al.* 1997]. Au sein de l'arsenal thérapeutique disponible en deuxième ligne pour le traitement des gliomes, les sels de platines sont actuellement préconisés uniquement pour les glioblastomes récidivants. De façon innovante, ils font actuellement l'objet de recherches précliniques en vue d'un protocole de recherche clinique géré par le CHU de Grenoble sur le site du synchrotron, où au-delà de leurs propriétés cytotoxiques, ils agissent comme radiosensibilisants en augmentant localement la dose déposée du fait de leur numéro atomique élevé [Biston MC *et al.* 2004].

D'autres molécules peuvent être citées : les inhibiteurs de la topoisomérase I tels que l'irinotécan (CPT-11 Campto®) et le topotécan (Hycamtin®), les inhibiteurs de la topoisomérase II comme l'Étoposide, qui bloquent la réplication et la transcription de l'ADN en perturbant la topologie de l'ADN, les antimétabolites qui inhibent la synthèse des acides nucléiques nécessaire à la multiplication cellulaire ou encore des alcaloïdes (Vincristine) et leurs analogues les taxanes (Taxol) qui inhibent la formation du fuseau mitotique lors de la division cellulaire.

Les agents chimiothérapeutiques décrits précédemment n'agissent généralement pas sur des mécanismes spécifiques de la tumeur et ils touchent toutes les cellules en division, incluant les cellules des tissus sains. De ce fait, les effets secondaires limitent leur utilisation. La différence de rendement mitotique des tissus sains et tumoraux est exploitée pour obtenir un effet sur la tumeur.

C - III - Les thérapies ciblées

Au cours de cette dernière décennie, la mise en évidence d'anomalies moléculaires ou physiologiques au sein des différents gliomes a conduit à la mise en place de nouvelles approches thérapeutiques visant spécifiquement certains mécanismes tumoraux. Ces thérapies dites « ciblées » reposent sur la connaissance des spécificités biologiques des tumeurs. Les cibles potentielles se multiplient donc au fur et à mesure de l'avancée des connaissances sur la physiopathologie tumorale. Mao H *et al*, ont réalisé un travail de synthèse sur les processus biologiques et les voies de signalisation dérégulées les plus pertinentes et sur les stratégies thérapeutiques potentielles ciblant ces voies (pour revue Mao H et al. [Mao H *et al*. 2012]). Dans le cas des gliomes, ces nouvelles thérapies visent principalement le microenvironnement tumoral, les récepteurs de surface des cellules tumorales et les voies de signalisation.

Le microenvironnement tumoral diffère de celui du tissu sain notamment en ce qui concerne l'angiogenèse tumorale. Certains facteurs angiogéniques comme le VEGF (*vascular endothelial growth factor*), le bFGF (*basic fibroblast growth factor*) et le PDGF (*platelet-derived growth factor*) sont ainsi ciblés. Le Bevacizumab (Avastin®) est un anticorps humanisé monoclonal qui séquestre le VEGF. Certains inhibiteurs de thyrosines kinases agissent entre autres en bloquant l'activité des récepteurs comme le Cediranib pour le VEGFR et l'Imatinib (Glivec®) pour le PDGFR. La formation

des vaisseaux et l'invasion des tissus par les cellules tumorales nécessitent la dégradation de la matrice extracellulaire par les matrices métalloprotéases (MMP) ainsi qu'une participation des intégrines responsables de l'adhérence des cellules aux protéines matricielles. Ces mécanismes sont ciblés par des inhibiteurs des MMP et des intégrines (Cilengitide).

Les cellules tumorales présentent à leur surface une modification du niveau d'expression de certains récepteurs qui peuvent être utilisés pour atteindre spécifiquement ces cellules. Le fonctionnement du récepteur à l'EGF, surexprimé dans les glioblastomes *de novo*, est ainsi ciblé par le Gefitinib (Iressa®) et l'Erlotinib (Tarceva®). L'utilisation préliminaire de ces inhibiteurs est décevante. Leur efficacité est en cours d'évaluation dans le cadre de combinaisons avec d'autres inhibiteurs ciblant des voies de signalisation prépondérantes dans la biologie des gliomes.

De nombreuses voies de signalisation sont perturbées dans les gliomes et des molécules inhibant les protéines Ras (ou leur farnésylation), mTOR, Akt, p53 ou PKC font l'objet de nombreux essais cliniques dont les plus pertinents sont recensés par Mao H et al. (Tableau 8) [Mao H *et al.* 2012].

Pathway	Target	Therapy	Trial specifications	Outcomes	Reference
p53	p53	Ad-53 adenovirus	Phase I (15 patients with recurrent GBM)	Exogenous p53 detected within tumor; no systemic dissemination	Lang <i>et al.</i> 2003 (24)
	p53	Ad5CMV-p53	Phase I (patients with recurrent GBM)	Completed; not published (NCT00004041)	
	p53	Ad-p53 SCH-58500	Phase I (patients with recurrent GBM or AA)	Completed; not published (NCT00004080)	
pRB	CDK4/6	PD 0332991	Phase II (patients with recurrent pRB-positive GBM)	Recruiting (NCT01227434)	
PI3K-mTOR-Akt-PTEN	EGFR	Erlotinib + RT + TMZ	Phase II (65 patients with newly diagnosed GBM vs. historical control)	Median OS 19.3 vs. 14.1 months ($p = 0.01$); Median PFS 8.2 vs. 4.9 months ($p = 0.001$)	Prados <i>et al.</i> 2009 (59)
	EGFR	Gefitinib	Phase II (98 patients with newly diagnosed GBM vs. historical control)	OS-1 yr 54.2% vs. 48.9% ($p > 0.05$); PFS-1 yr 16.7% vs. 30.3% ($p > 0.05$)	Uhm <i>et al.</i> 2011 (63)
	EGFRvIII	EGFRvIII vaccination	Phase II (21 patients with EGFRvIII-expressing newly diagnosed GBM)	PFS-6 67%; Median PFS 14.2 vs. 6.3 months in control group ($p = 0.041$); Median OS 26.0 vs. 15.0 months ($p = 0.001$)	Heimberger <i>et al.</i> 2009 (91)
	mTOR	Temsirolimus	Phase II (65 patients with recurrent GBM)	Median PFS 2.3 months; Median OS 4.4 months	Galanis <i>et al.</i> 2005 (68)
	mTOR + PI3K VEGFR	XL765 + TMZ Bevacizumab	Phase I (patients with AA or GBM) Phase II (50 patients with recurrent GBM)	Recruiting (NCT00704080) PFS-6 25%; Median OS 25.6 weeks	Raizer <i>et al.</i> 2010 (78)
	VEGFR	Cediranib	Phase II (31 patients with recurrent GBM vs. historical control)	PFS-6 25.8% vs. 15%; Median PFS 117 vs. 63 days; Median OS 227 vs. 175 days	Batchelor <i>et al.</i> 2010 (79)
	VEGFR + PDGFR	Sorafenib + TMZ	Phase II (32 patients with recurrent GBM)	PFS-6 9.4%	Reardon <i>et al.</i> 2011 (82)
	VEGFR + PDGFR	Pazopanib	Phase II (35 patients with recurrent GBM)	Median PFS 12 weeks; Median OS 35 weeks	Iwamoto 2010 (92)
	PDGFR	Imatinib + hydroxyurea	Phase II (231 patients with recurrent GBM)	PFS-6 10.6%; Median OS 26.0 weeks	Reardon <i>et al.</i> 2009 (84)
	Akt	Enzastaurin	Phase III (266 patients with recurrent GBM)	PFS 1.5 vs. 1.6 months in lomustine control; OS 6.6 vs. 7.1 months)	Wick <i>et al.</i> 2010 (88)
	Akt	Nelfinavir + RT + TMZ	Phase I	Recruiting (NCT01020292)	
	Akt	Perifosine	Phase II	Ongoing (NCT00590954)	
	RAS	RAS	Reovirus	Phase I (12 patients with recurrent GBM)	Median PFS 4.3 weeks; Median OS 21 weeks
RAS		Reolysin	Phase I/II	Completed; not published (NCT00528684)	
RAS		Zarnestra + TMZ	Phase I/II	Completed; not published (NCT00050986)	

The majority of clinical trials involving therapies targeting commonly deregulated signaling pathways in GBM have shown little to no clinical efficacy. Abbreviations: AA, WHO Grade III anaplastic astrocytoma; GBM, WHO Grade IV glioblastoma multiforme; OS, Overall survival; OS-1 yr, Overall survival one year after initiation of treatment; PFS, Progression-free survival; PFS-6, Progression-free survival six months after initiation of treatment; RT, Radiation therapy; TMZ, Temozolomide.

Tableau 8: Essais cliniques actuels ciblant des voies de signalisation clefs présentant des aberrations chez les glioblastomes. Extrait de Mao H *et al.* [Mao H *et al.* 2012].

D - Protocole thérapeutique de référence pour les gliomes de grade IV

Face à une prise en charge très hétérogène, décrite dans les chapitres précédents, il existe cependant un protocole thérapeutique de référence standard actuel pour les gliomes de grade IV consistant en une combinaison de la chirurgie, la radiothérapie et chimiothérapie concomitante et adjuvante. L'association radio-chimiothérapie repose sur le schéma dit de Stupp proposé en 2005 (protocole EORTC 26981/NCIC) [Stupp R. *et al.* 2005]. En fonction des possibilités, le premier acte reste une exérèse la plus large possible. Il est suivi d'une radiothérapie débutant 4 à 6 semaines après le geste chirurgical et qui se compose de 30 fractions de 2Gy par jour délivrées 5 jours par semaine pour atteindre une dose totale de 60 Gy déposée sur la masse tumorale et une marge de 2 à 3 cm. Le protocole de Stupp associe à cette radiothérapie un traitement concomitant avec le témozolomide (Figure 5) qui est administré quotidiennement à la dose de $75\text{mg}/\text{m}^2$, une à deux heures avant les séances de radiothérapie.

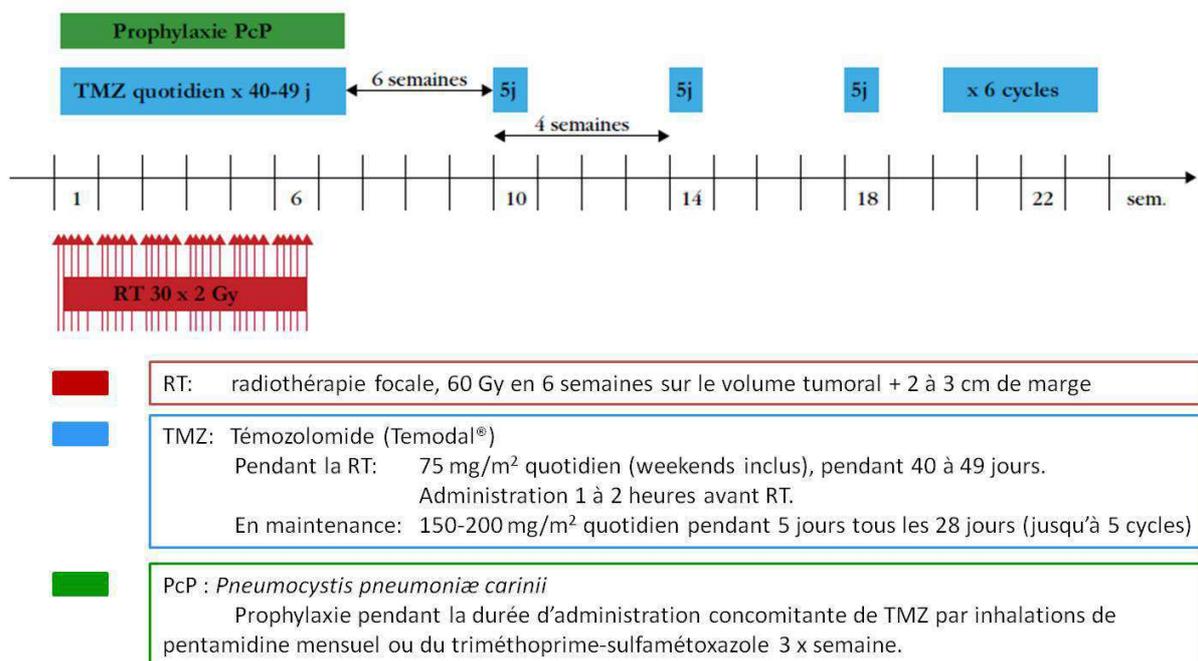


Figure 5: Schéma EORTC/NCIC de traitement des glioblastomes ou schéma dit de Stupp. Abréviations: PCP, pneumocystis carinii pneumonia; RT, radiothérapie; TMZ, témozolomide. Adapté de [Stupp R *et al.* 2006; Stupp R *et al.* 2007].

Une lymphopénie, secondaire aux effets du témozolomide, est fréquente pendant cette période. Le schéma de Stupp préconise un hémogramme hebdomadaire et une antibio-prophylaxie si la

numération lymphocytaire se révèle anormale afin d'éviter les fréquentes pneumopathies à *Pneumocystis carinii*. (Figure 5).

Une période de maintenance est entamée 6 semaines après la fin de cette chimio-radiothérapie. Elle se compose de 6 cycles de 5 jours de traitement tous les 28 jours. Le témozolomide est alors administré oralement à une dose de 150 mg/m²/jour lors de la première cure puis à 200mg/m²/jour lors des cures suivantes (Figure 5).

L'ajout de témozolomide a permis une amélioration de la médiane de survie de 2,5 mois mais surtout une augmentation très significative de la proportion de patients survivant 2 ans après le diagnostic, passant de 10 à 27% [Stupp R *et al.* 2006]. Les dommages à l'ADN causés par le témozolomide (méthylation de l'oxygène 6 des guanines de l'ADN) étant rapidement réparés par l'enzyme MGMT, Stupp et al. suggèrent que le statut épigénétique du promoteur de la MGMT peut être un facteur prédictif pour l'efficacité de la chimiothérapie avec des agents alkylants [Stupp R *et al.* 2006]. Une comparaison de cohortes de patients présentant ou non une méthylation des îlots CpG du promoteur de la MGMT, a révélé une réponse au traitement hautement plus favorable pour les patients à statut MGMT méthylé, avec une médiane de survie de 23,4 (vs 12,6 mois) et une survie à 2 ans de 48.9% (vs 14,8%) [Stupp R. *et al.* 2009]. Ce protocole constitue une avancée majeure des 30 dernières années dans la prise en charge des glioblastomes.

E - La radiothérapie

La radiothérapie regroupe l'ensemble des traitements utilisant les effets des radiations ionisantes sur les tissus biologiques. Elle est actuellement utilisée pour le traitement de la moitié des cancers et presque systématiquement de façon post-opératoire pour les tumeurs cérébrales de haut grade [Frappaz D *et al.* 2003].

E - I - Des origines des traitements par rayonnement à la radiothérapie contemporaine

E - I - 1 - Découverte des rayons X

En 1895, Wilhem Conrad Röntgen fait une découverte majeure pour la médecine moderne. Travaillant sur le rayonnement cathodique, il isole un tube de Crookes dans l'obscurité et observe

lors de sa mise sous tension, deux phénomènes : la fluorescence d'un écran en papier recouvert de platinocyanure de baryum placé fortuitement à proximité en parallèle avec l'apparition sur cet écran d'une ombre qui se déplace en fonction du positionnement d'une tige métallique placée entre le tube et l'écran. Wilhem Conrad Röntgen relate ainsi son expérience (Rontgen, Mc. Clure Magazine, 6 avril 1896.):

« Je m'intéressais déjà depuis longtemps aux rayons cathodiques, qui avaient été étudiés spécialement par Hertz et Lenard. ... (Je) me proposais, dès que j'en aurais le temps, de réaliser quelques travaux personnels... Je trouvais le temps pour cela à la fin d'octobre 1895. ... Je travaillais (le 8 novembre 1895 au soir) avec un tube de Hittorf-Crookes, lequel était entièrement entouré de papier noir. Un morceau de papier au platinocyanure de baryum se trouvait à côté sur la table. J'envoyais un courant à travers le tube et remarquais, en travers du papier, une ligne noire, particulière. Il était exclu que la lumière puisse venir du tube car il était entièrement recouvert de papier, et ce dernier ne laissait passer aucune lumière... Je pensais qu'il s'agissait... de quelque chose de nouveau, mais encore inconnu. »

Le professeur Röntgen venait de découvrir un rayonnement qui lui vaudrait le tout premier prix Nobel de physique en 1901. Ne connaissant pas la nature des rayons qu'il venait d'observer, il leur donna le nom de « rayons X » et soupçonna, à juste titre, leur nature ondulatoire. Ce rayonnement avait la capacité d'impressionner les plaques photographiques et son absorption différait en fonction de la nature la matière traversée. Il permit ainsi de réaliser la première radiographie de la matière vivante (Figure 6), donnant ainsi naissance à la radiologie.



Figure 6: Photographie de la main d'Anna Bertha Ludwig Roentgen, épouse de Wilhem Conrad Röntgen, prise le 22 décembre 1895. Au développement apparaissent des différences d'intensité d'impression de l'image en fonction de la matière traversée par le rayonnement : les os sont entourés d'une pénombre correspondant à la chair de la main et l'alliance y est largement visible.

La nature électromagnétique des rayons X a été établie en 1912 par Max von Laue grâce à la diffraction des rayons X par les cristaux [Friedrich W *et al.* 1912]^{*}. Les rayons X sont donc des

^{*} La découverte de Max von Laue est à l'origine des techniques de diffraction qui permettront à J. Watson, un biologiste et F. Crick, un physicien, de définir la structure de l'ADN en 1953 à l'aide de rayons X.

ondes électromagnétiques, au même titre que les ondes radio, la lumière visible ou les infrarouges et présentent de courte longueur d'onde de l'ordre de 0,01 à 10 nm (Figure 7).

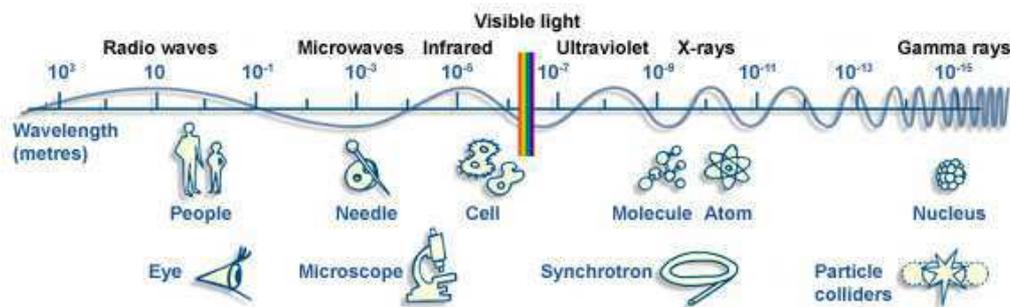


Figure 7 : Ensemble du spectre électromagnétique. Les longueurs d'ondes croissent vers la gauche, tandis que la fréquence du rayonnement augmente vers la droite. Les ordres de grandeur et les outils permettant de visualiser ces échelles sont symbolisés sous le spectre.

E - I - 2 - Premières applications thérapeutiques

Dès 1896, les premiers essais de traitement des cancers sont réalisés par le français Victor Despeignes puis par l'américain Emil Herman Grubbe. C'est le début de la radiothérapie externe. Un premier cas de guérison est rapporté en 1899 pour un cancer de la peau par Thor Stenbeck. Les premiers tubes à rayons X alors utilisés produisaient un rayonnement de faible énergie et très divergent, limitant leur utilisation aux lésions superficielles.

En 1897, Pierre et Marie Curie débutent un travail sur la radioactivité naturelle découverte un an plus tôt par Henri Becquerel sous le nom de rayonnement uranique. Ces travaux aboutiront à l'utilisation de radioéléments pour la curiethérapie qui consiste en l'application directe d'une source de rayonnement au niveau du site cancéreux. De nombreux cancers de surface ou cavitaire ont ainsi été traités par radiothérapie interne (langue, utérus, sein...).

Il fallut cependant attendre les années 1950 pour l'apparition des premières « bombes » de radiothérapie pour irradier par voie externe des tumeurs un peu plus profondes. Ce nouveau mode d'irradiation utilisait deux radioéléments (Cobalt 60 et Césium 137). Ces sources artificielles de haute énergie avaient l'avantage de présenter des bordures de champ mieux définies et une meilleure pénétration que les rayons X. Le maximum de dose n'étant plus délivré à la surface de la peau mais quelques millimètres en dessous, l'utilisation des bombes transcutanées permettait d'augmenter le nombre de cancers traités mais restait limitée aux tumeurs relativement peu profondes.

E - I - 3 - Radiothérapie moderne

A la fin des années 1960, apparaissent les accélérateurs linéaires de particules (électrons, protons, etc.). De taille plus restreinte, ils vont progressivement remplacer les bombes transcutanées.

Ces générateurs plus performants produisent de plus hautes énergies et permettent de créer des faisceaux de rayonnement extrêmement fins et collimatés, orientables avec une grande précision. Ceux-ci permettent d'utiliser des faisceaux multidirectionnels focalisés sur une zone cible et de déposer des doses plus importantes au niveau de la tumeur tout en épargnant les tissus les plus superficiels. De plus, les rayonnements générés présentant une grande capacité de pénétration des tissus, ils permettent d'accéder à tous les types de tumeurs même les plus profondes. Leur utilisation pour le traitement de tumeurs cérébrales est établie dans les années 1970.

De nombreuses évolutions ont amélioré l'appareillage initial pour aboutir aux techniques de radiothérapie actuellement utilisées en clinique [Kantor G *et al.* 2008]. L'application de plusieurs faisceaux d'irradiation distincts est actuellement permise grâce à des générateurs de plus en plus compacts (X-Knife®, Trilogy®, SynergyS®, Novalis®, et CyberKnife®) qui tournent autour des patients, s'arrêtant dans les positions (angulations) pré-établies pour délivrer à chaque fois une partie de l'irradiation planifiée.

a - Radiothérapies externes

La radiothérapie externe conformationnelle en trois dimensions (3D) est la technique de radiothérapie externe la plus utilisée [Hermanto U *et al.* 2005]. Elle consiste à faire faire converger des faisceaux non coplanaires sur le volume tumoral préalablement imagé en 3D. L'utilisation de plusieurs ports augmente la dose efficace au niveau de la tumeur tout en limitant la dose délivrée aux tissus sains adjacents (Figure 8a). La radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité (RCMI) est une forme spécialisée de la première : un collimateur multilame adapté plus précisément la forme du faisceau à celle de la tumeur. L'intensité de l'irradiation peut également être modulée pour chaque direction d'irradiation afin d'épargner au mieux les structures saines traversées (Figure 8b).

Après exérèse complète et radiothérapie à 60 Gy, le taux de survie à 5 ans est inférieur à 10% pour les glioblastomes et est de 26% pour les astrocytomes de grade III. La médiane de survie d'un glioblastome traité par radiothérapie est de 10 à 12 mois.

b - Radiochirurgie

La radiochirurgie ou radiothérapie en condition stéréotaxique permet d'administrer (généralement par Gamma Knife®) de très hautes doses d'irradiation (12 à 25 Gy) au niveau de la tumeur avec une précision stéréotaxique (Figure 8c). Le tissu tumoral est ciblé par de fins rayons multidirectionnels convergents sur le centre de la tumeur et délivrés en une seule séance. Le volume cible est critique et limite l'utilisation de cette technique aux lésions bien délimitées et dont la taille n'excède généralement pas 4 cm de diamètre. Elle a cependant montré son efficacité sur des récidives de glioblastomes de petite taille [Combs SE *et al.* 2005].

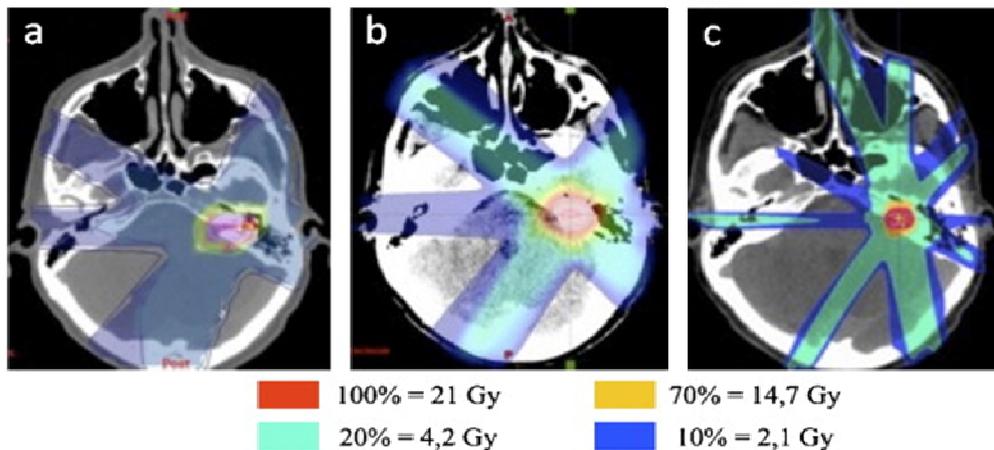


Figure 8: Exemple de distribution de dose selon les trois principales modalités de radiothérapie externe a- radiothérapie conformationnelle 3D; b- radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité; c- radiothérapie conformationnelle en conditions stéréotaxiques. Adapté d'après [Spasica E *et al.* 2011].

c - Radiothérapie interne

La curiethérapie, également appelée brachythérapie, consiste à déposer de petites sources radioactives au contact de la tumeur de façon stéréotaxique. Les radioéléments les plus utilisés sont les fils d'iridium 192, les minitubes de césium 137 et les grains d'iode 125. Cette méthode offre une irradiation maximale des tissus tumoraux et une préservation du tissu sain grâce à l'atténuation physique de la dose dans les tissus traversés. Elle est principalement indiquée pour des lésions de volume inférieur à 30 cm³ [Simon JM *et al.* 2002].

E - I - 4 - Volumes et doses conventionnelles recommandées

La zone irradiée en clinique est identifiée grâce à la détermination de trois volumes. Le volume standard macroscopique (GTV pour *Gross Tumor Volume*) est défini par la prise de contraste en

IRM avant et/ou après la chirurgie. Le volume cible anatomique (CTV pour *Clinical Target Volume*) prend en compte la possibilité de présence de cellules anormales au-delà du GTV. Dans le cas de gliomes de haut grade le CTV correspond généralement au GTV additionné d'une marge de 2 cm. Le volume cible prévisionnel (PTV pour *Planning Target Volume*) comprend le CTV augmenté d'une extension de l'ordre millimétrique pour tenir compte notamment des incertitudes de repositionnement entre les séances d'irradiation et de l'impression de précision des équipements de contention (de 5 mm pour les masques à 1 mm dans le cas d'irradiation en condition stéréotaxique).

La dose déposée, exprimée en Gy (c. à d. Joule par kilogramme) dépend du type tumoral mais est dans tous les cas limitée par la dose maximale tolérée par les tissus cérébraux sains [Haberer S *et al.* 2010]. En pratique, la dose totale administrée varie de 54 Gy pour les gliomes de grade II (27 fractions de 2 Gy ou 30 de 1,8 Gy) à 60 Gy à raison de 30 fractions de 2 Gy, 5 fractions par semaine dans le cas de glioblastome.

E - II - Effets des rayonnements X

E - II - 1 - Effets physiques des rayonnements X

Les rayons X interagissent avec la matière qu'ils traversent en lui transférant une partie de leur énergie. Ces rayons sont dits ionisants puisque des électrons peuvent être arrachés à la matière. Lorsque l'énergie du photon incident est supérieure aux énergies de liaison sub-atomique*, plusieurs effets peuvent se produire et dépendent essentiellement de l'énergie du photon incident (E) et du numéro atomique de la matière qu'il traverse (Z) (Figure 9). En considérant l'énergie qui est utilisée en radiothérapie, l'interaction entre les rayons X et la matière vivante passe par un effet photoélectrique et un effet Compton.

* L'énergie de liaison des électrons au noyau est de l'ordre de 10 eV.

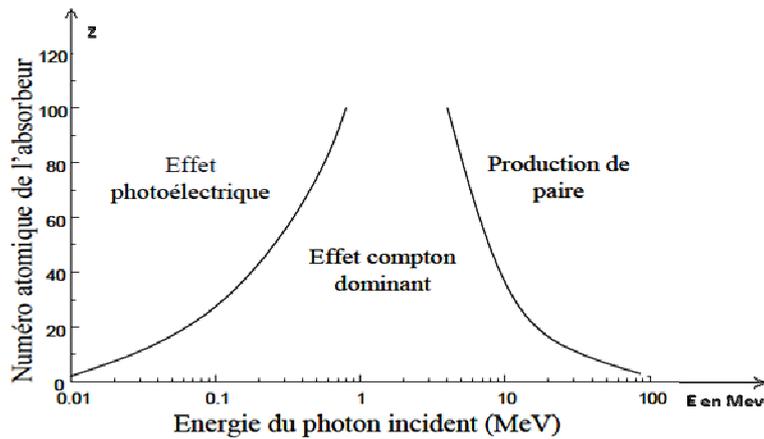


Figure 9 : Prédominance des différents types d'interactions entre les photons X et la matière en fonction du numéro atomique de la matière traversée et de l'énergie des photons incidents.

Lors de la perte d'énergie par **effet photoélectrique**, l'énergie du photon est intégralement transférée à un électron d'une orbite interne, qui est expulsé hors de l'atome emportant une énergie cinétique équivalente à celle du photon incident amputée de l'énergie de liaison de l'électron à l'atome. Un électron d'une couche superficielle vient prendre la place de l'électron éjecté provoquant l'émission d'un rayonnement X de très faible énergie (Figure 10a).

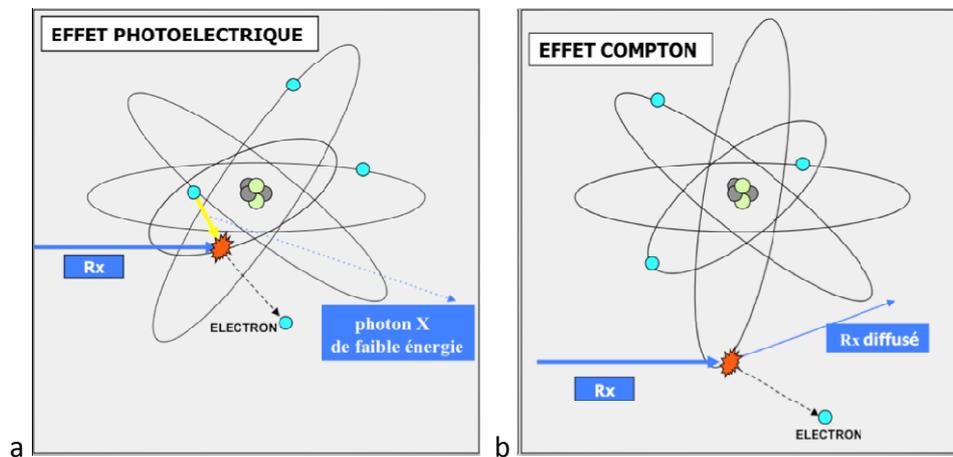


Figure 10 : Interactions photons/matière se produisant notamment lors de radiothérapie. a - Effet photoélectrique où l'arrachement d'un électron d'une couche électronique interne aboutit à son remplacement par un électron de couche superficielle et l'émission d'un photon de faible énergie b - Effet Compton lors duquel l'arrachement d'un électron d'une orbite atomique externe aboutit à la formation d'un rayonnement diffusé.

Lors de la perte d'énergie par **effet Compton**, le photon incident provoque l'arrachement d'un électron d'une orbite externe et l'émission d'un photon de moindre énergie (dit photon diffusé) pouvant interagir avec les atomes voisins. Cet effet est responsable du rayonnement diffusé.

E - II - 2 - Effets biologiques des rayonnements X

Peu après la découverte de rayons X, des effets sur les tissus vivants furent observés allant de la simple rougeur de peau à l'apparition de cancer, en passant par des brûlures graves pouvant entraîner l'amputation. L'étude de ces phénomènes donna naissance à une nouvelle discipline : la radiobiologie, qui étudie les effets des rayons X à l'échelle moléculaire, cellulaire, tissulaire et de l'organisme. Les conséquences s'étalent de la fraction de seconde à plusieurs dizaines d'années après l'exposition aux rayonnements, voire peuvent conduire à des anomalies héréditaires se répercutant sur plusieurs générations d'individus (Figure 11).

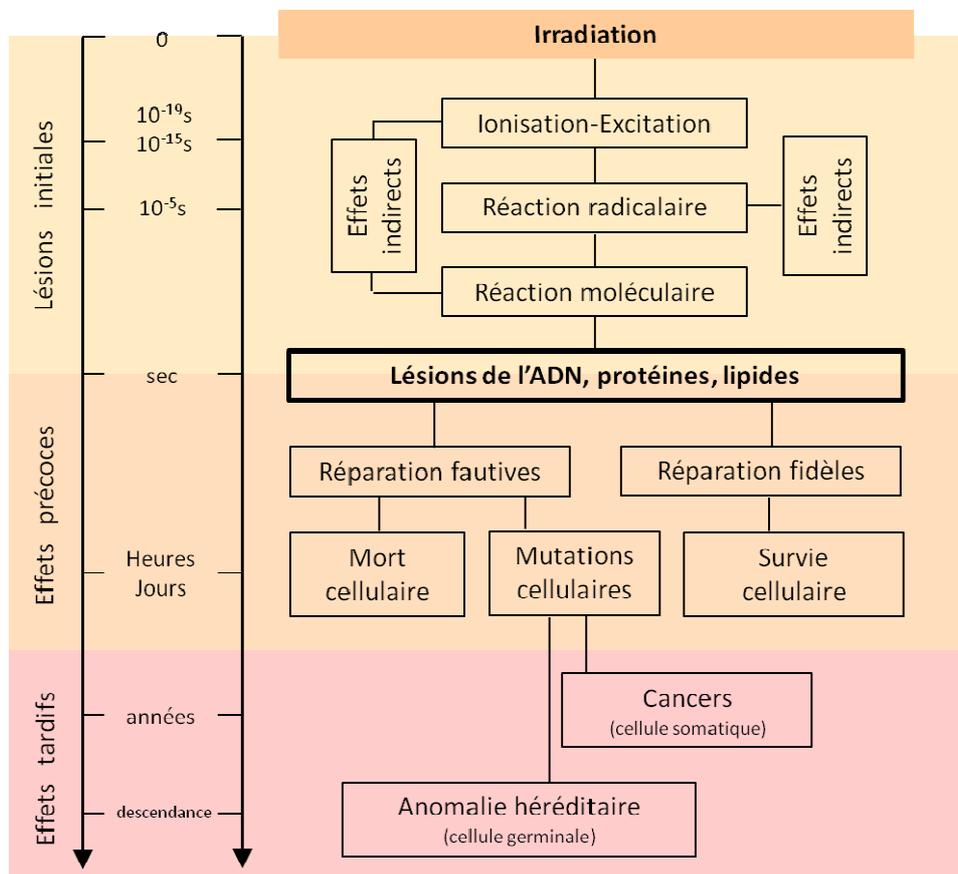


Figure 11 : Évènements moléculaires et cellulaires consécutifs à une irradiation de tissus vivants, adaptée de [Maurice Tubiana et al. 1986].

a - Effets de l'irradiation à l'échelle moléculaire

Les rayonnements utilisés en radiothérapie ont la caractéristique de transférer tout ou partie de leur énergie à la matière qu'ils rencontrent sur leur trajet (cf § E - II - 1 -). Ceci a pour

conséquences d'ioniser ou d'exciter les molécules. L'excès d'énergie accumulée par ces molécules est expulsé sous forme de photon de fluorescence ($M^* \rightarrow M + h\nu$) ou par transfert de l'énergie à une liaison chimique pouvant conduire à la production d'espèces radicalaires ($R\bullet$) par rupture d'une liaison covalente ($(R-R)^* \rightarrow R\bullet + R\bullet$). Les rayonnements ionisants peuvent directement créer des lésions aux niveaux des molécules composant le tissu traversé. Cet **effet direct** du rayonnement est sans spécificité moléculaire. Toutefois, les tissus étant composés à 70% d'eau, l'effet prédominant de l'irradiation est un **effet indirect**, passant par l'intermédiaire des produits de la radiolyse de l'eau. D'un point de vue biologique les lésions radio-induites atteignant la molécule d'ADN sont les plus préjudiciables pour le devenir de la cellule.

(i) Radiolyse de l'eau

Sous l'effet des rayonnements ionisants, la molécule d'eau se dissocie en moins de 10^{-12} s pour former des radicaux libres. De manière simplifiée, lors de ce phénomène appelé radiolyse de l'eau, les molécules d'eau sont soit **excitées** soit **ionisées**, à raison de trois excitations pour une ionisation. Les molécules d'eau, sous forme énergiquement instable, vont dans un premier temps aboutir à la formation de radicaux libres. Dans un deuxième temps, jusqu'à 10^{-6} s après l'irradiation, les radicaux produits peuvent (i) se recombiner, formant une nouvelle molécule d'eau, de dihydrogène (H_2) et d'eau oxygénée (H_2O_2) pouvant être toxiques pour les cellules, (ii) réagir avec des molécules organiques, ce qui lèse les molécules à activité biologique comme l'ADN. Toutes les molécules organiques constituant les cellules et leur environnement (acides nucléiques, lipides, protéines, sucres...) peuvent être des cibles directes ou indirectes des rayonnements. Les radicaux libres formés sont à l'origine de lésions touchant les membranes, les organites, le noyau et l'ADN qu'il contient. Les lésions cytoplasmiques sont essentiellement protéiques et engendrent une déstabilisation de l'architecture cellulaire. Au niveau membranaire, la peroxydation des acides gras provoque notamment des altérations des récepteurs membranaires, des systèmes de transport moléculaire et de flux ioniques. Ceci modifie la mobilité et la perméabilité membranaire. L'ensemble se traduit par un phénomène de type inflammatoire bien décrit en radiobiologie.

(ii) Lésions de l'ADN

La molécule d'ADN, du fait de son rôle fondamental de support de l'hérédité et des conséquences d'une minime modification de sa structure, est la cible pour laquelle les conséquences de l'irradiation sont les plus néfastes.

Les différents types de lésion

Un Gray seulement peut aboutir à 3 000 anomalies de nature différente au sein d'un noyau. Ces altérations touchent les différents constituants des nucléotides de l'ADN : les bases (puriques ou pyrimidiques), les sucres et les radicaux phosphates. Toutes ne sont pas équivalentes en termes de mécanisme d'apparition, de fréquence et de conséquences. Elles peuvent être regroupées selon trois types (Figure 12):

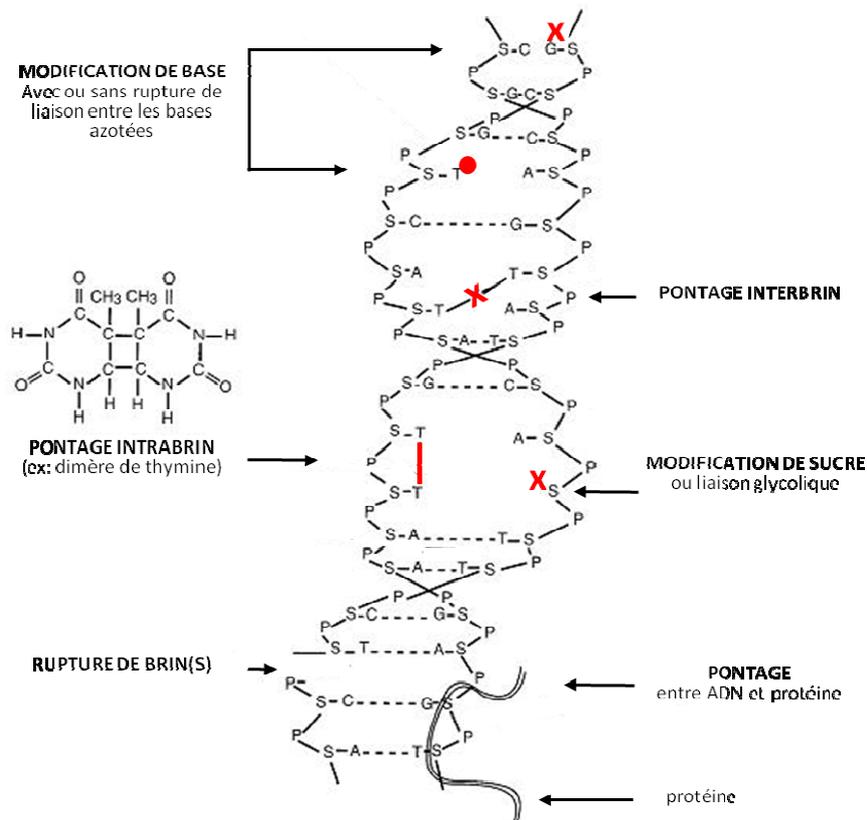


Figure 12 : Représentation des différentes lésions de la molécule d'ADN pouvant être induites par les effets directs ou indirects d'une irradiation.

- Modifications chimiques des bases et des sucres

Les radicaux libres, principalement les radicaux hydroxyles, provoquent la création de bases modifiées avec une fréquence de 800 à 2 000 par Gray par noyau (Tableau 9). Les bases pyrimidiques sont plus sensibles aux modifications que les bases puriques. Ces modifications peuvent être uni- ou bilatérales et aboutissent à la distorsion de la structure de l'ADN voire à la rupture entre les deux brins de l'ADN.

Les sucres et les liaisons glycosiques, qui permettent la cohésion entre les bases et le squelette de l'ADN, subissent également 800 à 1600 modifications par Gray par noyau. Leur oxydation ou hydrolyse libèrent des bases et créent des sites abasiques au sein de la chaîne d'ADN.

	Nombre/ Gy / Noyau
Rupture double brin	40
Rupture simple brin	500 – 1000
Altérations des bases	800 – 2000
Altérations des sucres	800 – 1600
Pontage ADN-ADN	30
Pontage ADN-Protéine	150

Tableau 9 : Fréquence d'apparition des lésions radio-induites au niveau de la molécule d'ADN. Les nombres représentent le nombre d'évènements engendrés par 1 Gray au niveau d'un noyau.

- Pontages intra- ou inter-moléculaires de l'ADN

Le pontage, réalisé par liaisons covalentes, peut intervenir entre deux chaînes issues de la même double hélice (pontage inter-brins) ou entre des bases azotées d'un même brin (pontage intra-brins). On dénombre environ 30 de ces liaisons ADN-ADN par noyau exposé à 1 Gy. La formation de liaisons covalentes peut également intervenir entre molécules d'ADN et protéines (histones et protéines chromosomiques) à une fréquence de 150 anomalies par Gray appliqué à un noyau.

- Les cassures des chaînes d'ADN

Elles surviennent au niveau de la liaison désoxyribose-base ou désoxyribose-phosphate. Elles peuvent concerner un seul brin et sont nommées cassures simple brin (SSB pour *Single Strand Break*) ou les deux brins de la double hélice et sont nommées cassure double-brin (DSB pour *Double Strand Break*). Pour constituer une DSB, les lésions des deux chaînes d'ADN ne doivent pas être distantes de plus d'une dizaine de nucléotides. Les cassures simple-brin représentent la quasi-intégralité des cassures de l'ADN. Une dose de seulement 1 Gy provoque entre 500 et 1 000 SSB (Tableau 9). Elles sont efficacement réparées en quelques minutes par des processus d'excision-resynthèse. La fréquence d'apparition des DSB est largement plus faible, 40 par noyau pour un Gray. Cependant leurs conséquences sont bien plus significatives puisqu'elles sont difficilement réparables et peuvent, si elles persistent, induire la mort cellulaire.

Mécanismes de réparation

En condition physiologique, l'ADN subit en permanence des lésions liées à un stress d'origine endogène, principalement dû aux effets des espèces réactives de l'oxygène (ROS pour *Reactive Oxygen Species*) issues de la respiration cellulaire et à des stress exogènes comme les ultra-violets (UV) produits par le rayonnement solaire ou encore la radioactivité terrestre. Ces lésions sont de même nature que celles induites lors d'une radiothérapie et font l'objet de mécanismes de réparation naturels continuels et efficaces. Ce sont ces mêmes mécanismes qui prennent en charge les dégâts engendrés par une radiothérapie et permettent de détecter et d'éliminer les altérations de l'ADN.

Les bases azotées modifiées, les sites abasiques, les pontages et les cassures simple-brin sont principalement réparés par des mécanismes d'excision-resynthèse. Ce processus consiste dans un premier temps en l'élimination de bases (BER pour *base excision repair*) ou de nucléotides (NER pour *nucleotide excision repair*) par des endonucléases (Figure 13 a). La partie éliminée est ensuite resynthétisée par l'action de l'ADN polymérase I à partir du brin complémentaire puis reliée par une ligase aux extrémités libre du brin initialement lésé (Figure 13 b).

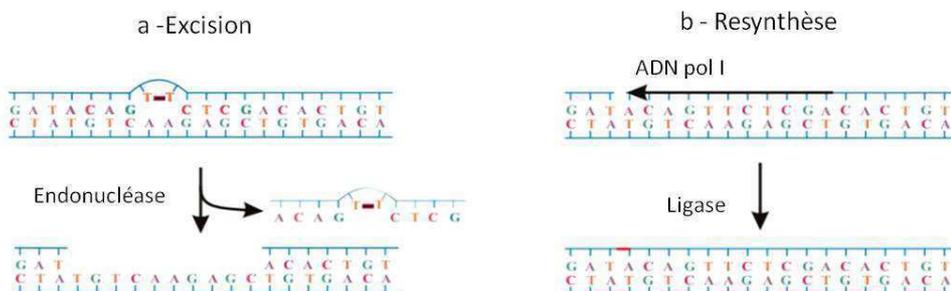


Figure 13 : Mécanisme de réparation par excision-resynthèse. Le processus se compose de a - une excision des entités anormales par les systèmes BER ou NER respectivement dans le cas de bases ou de nucléotides anormaux, b - une resynthèse du brin d'ADN lésé à partir du brin complémentaire comme matrice.

Les cassures double-brin sont réparées par deux mécanismes de recombinaison (Figure 14) (i) la recombinaison homologue, mécanisme assez lent mais assurant une réparation fidèle à partir du chromosome homologue ; (ii) la recombinaison non homologue ou réparation par jonction d'extrémités (NHEJ pour *non homologous end joining*), beaucoup plus rapide mais pouvant conduire à une réparation fautive avec insertion ou délétion de quelques nucléotides. Pour ces deux mécanismes, l'acte initial de reconnaissance de la lésion par les molécules ATM (*ataxia*

telangectasia mutated) et ATR (*ataxia telangectasia-related protein*) active la phosphorylation de l'histone H2AX. Notons que le marquage par immuno-histochimie de la forme phosphorylée de cette histone permet de localiser sur un tissu les zones irradiées et de maîtriser leur configuration, outil dont nous nous sommes servis pour ce travail de thèse.

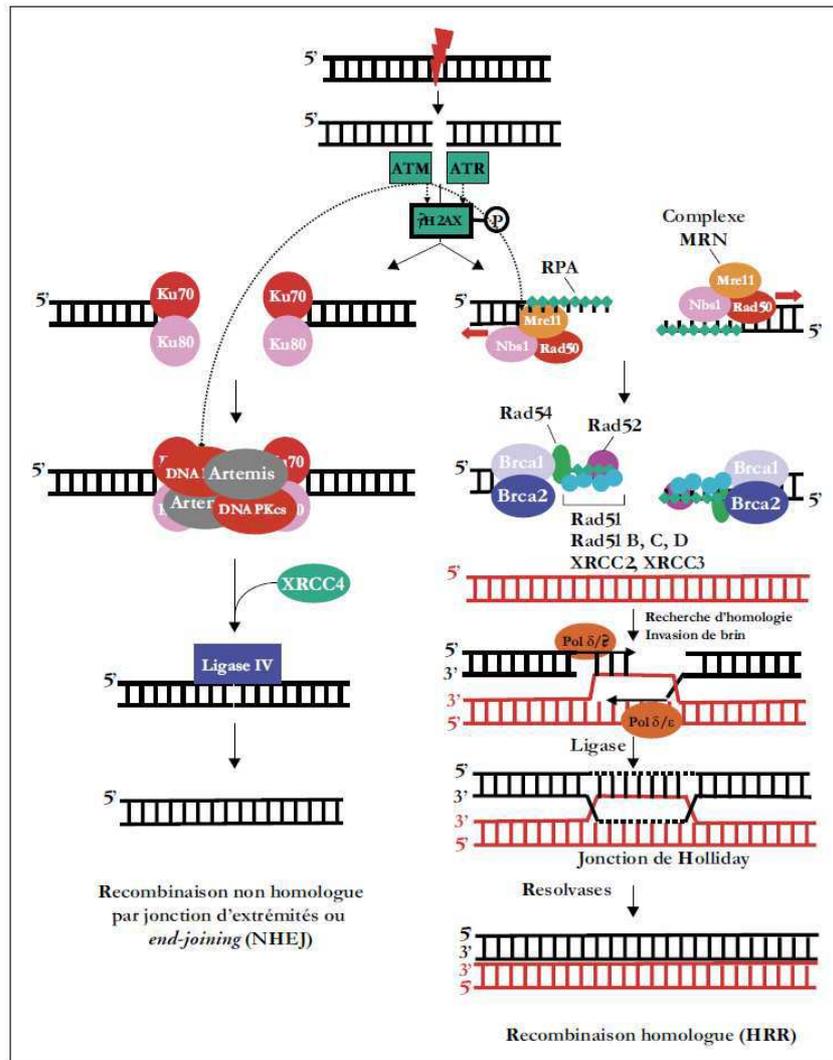


Figure 14 : Mécanisme de réparation de l'ADN par recombinaison homologue et par recombinaison non-homologue par jonction d'extrémités (NHEJ). Extrait de Pourquoi P, 2006 [Pourquier Philippe 2006].

b - Effets des rayonnements X à l'échelle cellulaire

Les réparations fidèles ou fautive de l'ADN engendrent plusieurs conséquences au niveau cellulaire (Figure 11).

(i) Survie des cellules réparées

Les mécanismes de réparation peuvent mener à des réparations fidèles de la totalité des lésions notamment en cas de stress endogène ou exogène naturel et pour des irradiations de faible dose. Les cellules survivent alors et sont considérées comme normales.

(ii) Survie des cellules mutées

Les réparations fautives, ainsi que les lésions échappant aux systèmes de surveillance de la cellule, sont à l'origine de mutations géniques non létales pour la cellule. Elles peuvent n'avoir aucune conséquence puisque la grande majorité du génome est non codant. *A contrario*, les anomalies atteignant les parties codantes vont se manifester sous de nombreux phénotypes. Les lésions touchant les cellules somatiques, peuvent notamment conduire à une évolution vers une cellule cancéreuse. Si les anomalies ont atteint des cellules des lignées germinales, elles peuvent se transmettre de manière héréditaire à toutes les cellules de la descendance.

(iii) Mort cellulaire radio-induite

Si les réparations fautives et les lésions échappant aux systèmes de surveillance de la cellule aboutissent à des lésions létales : la mort cellulaire radio-induite qui en découle peut survenir par plusieurs mécanismes comprenant la mort mitotique, la mort différée, l'oncose et l'apoptose [Favaudon V 2000].

Mort cellulaire immédiate

La mort cellulaire immédiate est un phénomène rare pouvant se produire après une irradiation de très haute dose (supérieure à 100 Gy). Elle intervient de quelques minutes à quelques heures après l'irradiation. Les mécanismes moléculaires sous-jacents sont peu connus mais se traduisent par la lyse rapide des organites intracellulaires et des membranes. Une inflammation est généralement observable suite à cette mort.

Oncose

Aussi appelé nécrose cellulaire, l'oncose est un phénomène considéré comme passif résultant d'une incapacité de la cellule à maintenir son homéostasie. L'augmentation de la perméabilité

membranaire conduit à une entrée massive d'eau et d'électrolytes dans la cellule qui se traduit par une lyse nucléaire et un gonflement du cytoplasme.

Mort mitotique ou mort cellulaire différée

La mort cellulaire différée peut intervenir lors d'expositions à des doses modérées. Elle correspond à l'incapacité à achever un processus mitotique. Les effets visibles surviennent à plus ou moins long terme en fonction de la vitesse de renouvellement du tissu.

- Cette mort peut ainsi survenir à la première mitose. La cellule meurt en tentant de se diviser alors que des lésions chromosomiques majeures ne sont pas réparées.

- La mort cellulaire différée peut également intervenir au bout de plusieurs cycles cellulaires anormaux. Les cellules présentent alors différents phénotypes : (i) des micro-noyaux issus d'une division non équitable des chromosomes dans les cellules filles, (ii) des cellules géantes mono- ou poly-nucléées provenant de cellules ayant entamées la réplication de leur matériel génétique mais incapable de se diviser (endoreplications et/ou mitoses abortives). Il en résulte une anisonucléose marquée.

Apoptose radio-induite

L'apoptose est le système de mort cellulaire le mieux compris. Ce programme de mort cellulaire, également appelé suicide cellulaire, est un processus actif qui se démarque des autres types de mort cellulaire par sa présence lors de l'évolution physiologique de l'organisme (embryogenèse, *turn-over* cellulaire...). L'apoptose passe par deux mécanismes : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque ou voie mitochondriale. Dans les deux cas, l'activation de caspases conduit à des modifications morphologiques organisées : la condensation (pycnose) puis la fragmentation nucléaire (caryorrhexis), la condensation et vacuolisation du cytoplasme, enfin le bourgeonnement de la membrane contenant des éléments nucléaires et cytoplasmiques conduisant à la formation de corps apoptotiques. L'exposition de phosphatidyl-sérines à la surface de ces derniers permet leur phagocytose et cette mort n'engendre donc aucune réaction inflammatoire.

c - Effets des rayonnements X à l'échelle tissulaire

(i) Sensibilité des tissus

Les effets de l'irradiation sur les organes sont aussi divers que l'organisation des tissus qui les composent et peuvent s'observer de plusieurs jours à plusieurs années après l'irradiation (effets tissulaires précoces et tardifs) en fonction notamment du taux de renouvellement cellulaire des tissus qui conditionne leur sensibilité. De manière très schématique les tissus peuvent être classés en :

- *tissus à fort pouvoir de prolifération*, comme la moelle osseuse, les épithéliums, la peau, les spermatogonies... Les effets consécutifs à l'irradiation sont très précoces, apparaissent en quelques heures ou jours et sont généralement très visibles.

- *tissus à pouvoir de prolifération modéré*, comme les tissus hépatiques ou rénaux. Les cellules de ces tissus sont très différenciées et se renouvellent faiblement en condition physiologique. Lors de l'irradiation peu de cellules sont en situation mitotique ce qui offre le temps d'une réparation relativement efficace. L'expression des lésions est tardive, pouvant survenir jusqu'à plusieurs années après l'irradiation.

- *tissus statiques*, comme les tissus nerveux et cérébraux. Certaines cellules de ces tissus ne se renouvellent quasiment pas en condition physiologique (ex : neurone). Il existe un pool initial de cellules qui n'est pas remplacé en cas de disparition. La mort mitotique différée a très peu d'influence dans ces tissus. Le déficit cellulaire dû aux effets de l'irradiation peut se révéler des mois, voire des années, après l'irradiation.

Le principe fondamental sur lequel repose la radiothérapie est que l'irradiation entraîne une mortalité cellulaire plus importante sur une tumeur (à prolifération rapide) que sur les tissus sains adjacents également irradiés (à prolifération lente ou modérée). Le rapport bénéfique/risque est donc particulièrement favorable dans le cas des tissus cérébraux matures.

(ii) Effets sur le tissu cérébral

Les effets précoces de l'irradiation sur le tissu cérébral sont l'inflammation, l'œdème et une hypertension intracrânienne consécutive aux lésions reçues par les cellules endothéliales des vaisseaux.

Les effets plus tardifs se composent principalement de radionécrose et de leucoencéphalopathies qui correspondent à la destruction des gaines de myéline ou démyélinisation.

À l'échelle de l'organisme, les effets secondaires d'une irradiation céphalique peuvent se manifester transitoirement par un amaigrissement, une somnolence, des nausées et vomissements et de manière plus définitive par une modification de la personnalité et des déficits hormonaux en fonction des zones irradiées.

E - III - Facteurs influençant les effets biologiques d'une irradiation

Les facteurs influençant les effets biologiques d'une irradiation sont principalement la dose, le type de rayonnement utilisé, le volume irradié, le type cellulaire irradié, l'étalement et le fractionnement de la dose.

E - III - 1 - Dose et type de rayonnement

L'énergie communiquée à la matière lors d'un rayonnement est la dose absorbée et s'exprime en Gray. À dose absorbée similaire, les effets produits par un rayonnement varient en fonction, entre autres, du type de rayonnement et du type de tissu irradié. Un facteur de pondération, qui tient compte de la nature du rayonnement (photons, électrons, neutrons, alpha, débit de dose), permet donc de passer de la dose absorbée à la dose équivalente. Un second facteur de pondération (dépendant de la sensibilité des tissus traversés) permet de passer de la dose équivalente à la dose efficace. Ces deux doses sont des grandeurs calculées et sont exprimées en Sievert (Sv). Dans le cadre de ce travail de thèse nous travaillerons avec un rayonnement synchrotron dont le facteur d'efficacité est de 1. Les doses absorbée et équivalente sont donc identiques.

E - III - 2 - Influence du volume irradié

Les effets secondaires délétères apparaissent à des doses dépendantes du volume total irradié et des tissus touchés. Ainsi une dose de seulement 5 Gy est létale pour une irradiation du corps entier. Pour les tissus cérébraux, les doses maximales tolérées, avec une probabilité de risque calculée de 5% de complication sévère à 5 ans (TD5/5), sont de 60 Gy pour l'irradiation d'un tiers de l'encéphale, de 50 Gy pour des 2/3 et de 45 Gy pour la totalité de l'encéphale [Haberer S *et al.* 2010].

E - III - 3 - Étalement et fractionnement temporel de l'irradiation

La radiosensibilité cellulaire dépend de l'état physiologique de la cellule. Le cycle cellulaire est composé de différentes phases : G1 (croissance et préparation à la réplication qui dure 6 à 12h chez les mammifères), S (réplication de l'ADN, 6 à 8h), G2 (croissance et préparation à la mitose, 3 à 4h) et M (division cellulaire, 1h). La radiosensibilité des cellules est minimale lorsqu'elles sont quiescentes (hors cycle cellulaire) ou en phase S et est maximale durant les phases G2 et M du cycle cellulaire. Les cellules tumorales à fort rendement de division sont donc plus sensibles que les cellules saines. En fractionnant l'irradiation dans le temps, la différence de réponse entre les deux types cellulaires est amplifiée. Les cellules tumorales accumulent les lésions d'une irradiation à l'autre, alors que les cellules saines ont la capacité de retour à une quasi-normalité. La dose totale est déposée en fractions de 2 Gy journaliers. À terme, l'alternance d'irradiation et de période de restauration permet d'augmenter l'effet différentiel entre le tissu sain et le tissu tumoral (Figure 15).

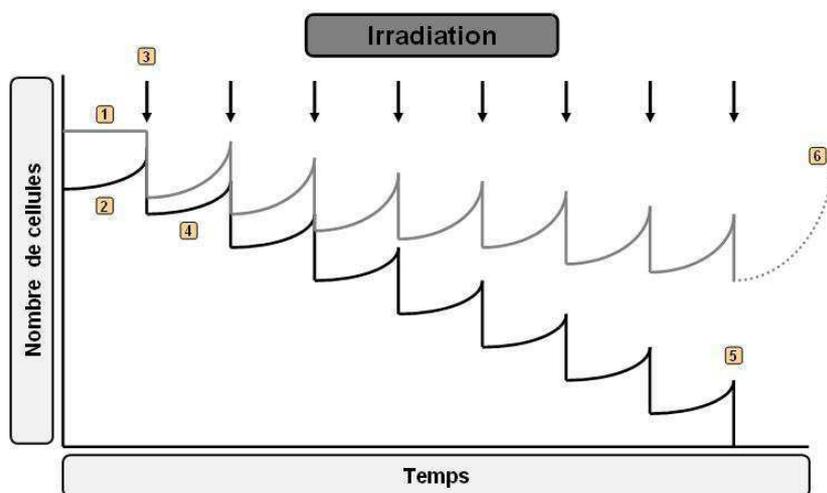


Figure 15 : Principe de l'étalement et du fractionnement de dose. 1 - Tissu sain non prolifératif. 2 - Tissu tumoral prolifératif. 3 - Application d'une première séance de radiothérapie qui élimine des pourcentages identiques de cellules saines et tumorales. 4 - Régénérations cellulaires saine et tumorale entre deux séances de radiothérapie. Les cellules saines présentent une réparation plus efficace que les cellules tumorales. Au bout de plusieurs fractions, se dessine un effet différentiel entre les deux types de tissu, aboutissant à terme à l'élimination des cellules tumorales (5) et à la restauration du tissu sain à l'arrêt des séances d'irradiation (6). Figure extraite de [Serduc R 2006].

III - LA RADIOTHÉRAPIE PAR MICROFAISCEAU (MRT)

Malgré une prise en charge thérapeutique réunissant chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie (cf chapitre II -), les gliomes de haut grade restent mortels à court ou moyen terme, justifiant pleinement le développement de nouveaux axes de traitement. C'est dans ce cadre qu'a été développée depuis les années 1990 la **radiothérapie par microfaisceaux** ou **MRT pour *Microbeam Radiation Therapy***, comme une alternative potentielle. Cette technique faisant l'objet de ce travail de thèse, le chapitre suivant lui est consacré.

A - Le rayonnement synchrotron

Les premiers accélérateurs de particules ont été mis au point dans les années 1930 avec pour application la physique des particules. Leur évolution dans les années 1940 en cyclotron puis synchrocyclotron, a amélioré la puissance des premiers accélérateurs mais a limité leur utilisation, du fait d'une énergie produite n'excédant pas 1 GeV. Dès 1943, le professeur Marcus Oliphant propose le concept de synchronisation d'un champ magnétique (pour déplacer les particules de manière circulaire) et d'un champ électrique (pour les accélérer), à l'origine du terme « synchrotron ».

Ces installations initialement dédiées à l'étude de la collision de particules chargées et de particules élémentaires résultantes, présentent une énorme perte d'énergie sous forme d'un rayonnement observé pour la première fois par Herb Pollock, Robert Langmuir, Franck Elder et Anatole Gourevitch en 1947. Ce rayonnement photonique appelé rayonnement (ou lumière) synchrotron, est dit de courbure car il est produit de manière tangentielle aux trajectoires circulaires décrites par les particules chargées. À partir de 1960, il n'est plus considéré comme un artefact et ses caractéristiques sont exploitées sur des installations dédiées pour explorer la matière en général et développer des applications médicales en particulier [Gil S *et al.* 2011a; Suortti P *et al.* 2003].

Depuis 1994, l'ESRF exploite une quarantaine de lignes de lumière capable de produire un rayonnement d'une grande brillance dans un spectre s'étalant des ultraviolets (UV) aux rayons X. Il fait partie des synchrotrons les plus puissants actuellement en utilisation, avec *Spring 8* au Japon et *Advanced Photon Source* aux Etats-Unis. Un ambitieux programme d'amélioration du synchrotron de l'ESRF, devant s'étaler de 2009 à 2018, vise à le maintenir comme l'une des sources

de rayons X les plus performantes et à créer huit nouvelles lignes de lumière aux capacités uniques. Pour produire un rayonnement d'une telle intensité, les électrons sont émis par un canon à électrons et sont accélérés de façon linéaire dans le LINAC (*LINear ACcelerator*), les amenant à une énergie de 200 MeV. Ils sont ensuite transférés dans un accélérateur circulaire de 300 mètres de circonférence, le booster. Cette succession d'accélération amène les électrons à une énergie de 6 GeV. Lorsque les électrons ont atteint ce niveau énergétique, ils sont véhiculés vers un anneau de stockage de 844 mètres de circonférence (Figure 16).

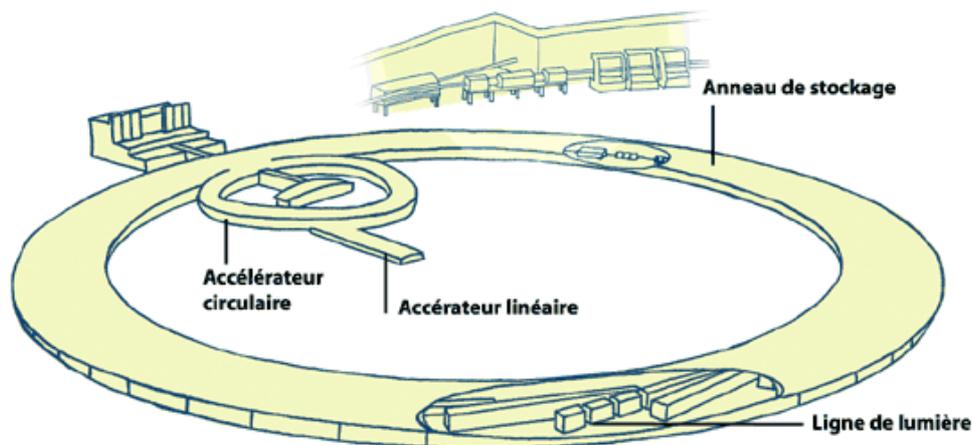


Figure 16 : Structure générale d'un synchrotron. Les électrons sont propulsés par un canon d'électron, successivement accélérés par un accélérateur linéaire et un accélérateur circulaire, puis envoyés dans l'anneau de stockage où ils produiront la lumière synchrotron qui sera utilisée par les lignes de lumière placées tangentiellement à l'anneau de stockage.

Cet anneau est constitué d'une alternance de 64 sections courbes et droites qui possèdent chacune des aimants de nature différente. Au niveau des **sections courbes**, un « aimant de courbure » permet la déviation des électrons de plusieurs degrés de leur trajectoire initiale. Ce changement de direction provoque l'émission tangentielle du rayonnement synchrotron (Figure 17a) qui est transmis sur les lignes de lumière (Figure 16).

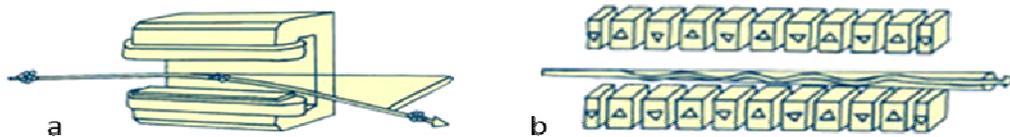


Figure 17 : Schéma des aimants utilisés dans l'anneau de stockage au sein de l'ESRF. a - Aimant de courbure servant à dévier la trajectoire des électrons. b – Élément d'insertion, pouvant être un onduleur ou un wiggler et permettant d'obtenir un rayonnement de haute brillance.

Au niveau des **sections droites**, on retrouve des éléments d'insertion, de type « wigglers » et « onduleurs », servant à concentrer le faisceau d'électrons. Ils sont constitués d'une alternance de rangées d'aimant de polarité inversée qui forcent les électrons à suivre une trajectoire ondulatoire sinusoïdale (Figure 17b). Lors de chaque changement de trajectoire se forme un rayonnement synchrotron qui s'ajoute à la lumière identiquement produite en amont. Il en résulte un faisceau de lumière à l'origine de la grande brillance des synchrotrons et bien plus intense que celui créé par les aimants de courbure. Les onduleurs utilisent de faible champ magnétique, créant de faible amplitude d'oscillation menant à de petites déviations des électrons autour de la trajectoire initiale. Ceci a pour effet de produire un spectre de lumière très intense pour des bandes d'énergie étroites. Les Wigglers induisent une amplitude d'oscillation des électrons plus importante et produisent un spectre de rayonnement blanc déplacé vers les plus courtes longueurs d'ondes.

La ligne de lumière 17 (ID17 pour *insertion device*) de l'ESRF est placée en aval d'un wiggler et est dédiée à la recherche biomédicale en général et plus particulièrement à la mise en place de nouvelles techniques d'imagerie et de radiothérapie pour la pathologie cancéreuse et cela, de la cellule à l'Homme. Cette ligne de lumière, comme toutes les lignes de l'ESRF, accueillent des chercheurs du monde entier et mène en parallèle ses propres travaux de recherche, conjointement avec l'équipe 6 du GIN (Grenoble Institute of Neurosciences – U836) hébergée sur le site. L'avenir de l'utilisation médicale du rayonnement synchrotron est intimement lié à l'émergence des sources compactes de rayonnement synchrotron, qui devraient permettre un transfert technologique vers les centres de recherche ou hôpitaux (Thomx, projet Equipex de source compact de rayonnement synchrotron, géré par le Laboratoire des accélérateurs linéaires à Paris).

B - Effet « dose / volume » et naissance de la MRT

La radiothérapie par microfaisceaux repose sur « l'effet dose-volume » : plus le volume irradié est faible, plus la dose d'irradiation peut être importante. Ce principe, prolongé à l'échelle millimétrique est expérimenté par Wolfgang Zeman et ses collaborateurs en 1961, lors d'une expérience de la NASA traitant des effets du rayonnement cosmique sur les tissus cérébraux [Zeman W *et al.* 1961] : une irradiation de 280 Gy déposée par un rayon de deutérium d'un millimètre abouti à une destruction des tissus cérébraux, s'étendant même au-delà de la zone irradiée (Figure 18a). De manière opposée, une irradiation près de 15 fois plus intense (4000 Gy) mais déposée à une échelle micrométrique (25 μm) n'induit pas de dégât macroscopique au-delà de la zone irradiée et respecte l'organisation tissulaire macroscopique malgré la perte de noyaux (Figure 18b).

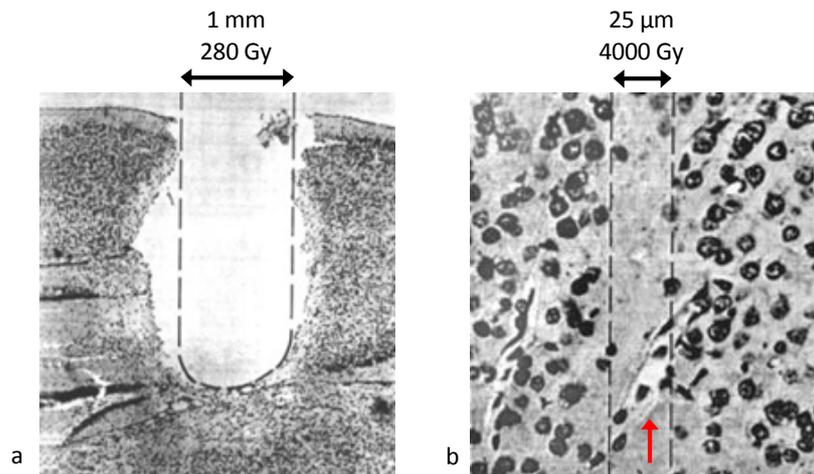


Figure 18 : Coupes histologiques de cortex de souris irradiées par a - un faisceau de 1 mm avec une dose de 280 Gy et b - un faisceau de 25 μm déposant une dose de 4000 Gy. La flèche rouge indique la présence de cellules endothéliales dans la zone irradiée. Extrait de [Zeman W *et al.* 1961].

La disparition des cellules nerveuses se limite au passage du microfaisceau et la présence de cellules endothéliales dans la zone irradiée laisse suspecter le maintien de vaisseaux fonctionnels (indiqué par la flèche rouge Figure 18b). L'hypothèse historiquement avancée pour expliquer cette extraordinaire radiorésistance des tissus cérébraux, fut celle d'une préservation d'un réseau vasculaire fonctionnel grâce à une régénération rapide des vaisseaux après le passage des microfaisceaux.

La faible pénétration des ions lourds utilisés pour ces expériences (1,5 mm de profondeur sous la peau) a longtemps empêché l'utilisation de ces faisceaux de taille micrométrique à des fins

biomédicales mais furent rendues possibles grâce à l'avènement des synchrotrons dédiés (années 1980). A l'instar des sources de radiothérapie conventionnelles, le rayonnement synchrotron possède un fort pouvoir pénétrant. Il est de plus caractérisé par un haut débit de dose et une quasi non divergence, rendant possible la production de microfaisceaux non divergents et suffisamment puissants pour envisager des applications thérapeutiques. Leur découverte a été réalisée au *National Synchrotron Light Source* (NSLS, *Brookhaven National Laboratory*, USA) à la fin des années 1980 [Bräuer-Krisch E *et al.* 2010]. Per Spanne, Daniel N. Slatkin et leurs collègues réalisent un essai de microtomographie sur la tête d'une souris en utilisant un faisceau de 30 μm d'un rayon X synchrotron. La dose utilisée est de 10 Gy et le contraste reste faible. Ils augmentent la dose délivrée par le microfaisceau jusqu'à 200 Gy : la souris se réveille normalement de l'anesthésie et récupère sans trouble neurologique apparent. Un mois après l'irradiation, une étude histopathologique du cerveau ne montre aucun dommage apparent induit par le passage du faisceau de 200 Gy. Lors d'une irradiation ultérieure, utilisant un ensemble de plusieurs faisceaux quasiment parallèles de 25 μm espacés entre eux de 50 à 200 μm , des lésions ressemblant à celles induites par les microfaisceaux de deutérium des expériences de Zeman et Curtis sont observées [Slatkin D. N. *et al.* 1992]. De manière surprenante, les animaux supportent des centaines voire des milliers de Grays au niveau du SNC et ne présentent aucune nécrose tissulaire [Laissue J. *et al.* 1992]. Rappelant une proposition qui suggérait déjà en 1983 d'utiliser les rayons X synchrotron pour la radiochirurgie [Larsson B 1983], le potentiel radiothérapeutique des microfaisceaux synchrotron est suggéré en 1992 dans un travail de simulation [Slatkin D. N. *et al.* 1992]. En 1994, la technique d'irradiation par microfaisceaux générés par rayonnement synchrotron fait l'objet d'un dépôt de brevet [Slatkin DN *et al.* 1994]. Un an plus tard débutent les premiers essais pré-cliniques à l'ESRF. Avancées physiques, optimisations techniques et compréhension biologique font l'objet d'un nombre croissant d'études depuis deux décennies (Figure 19).

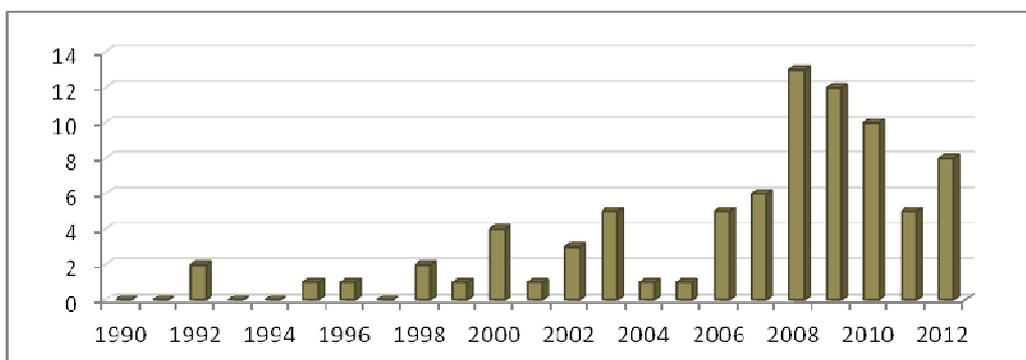


Figure 19 : Nombre de publications annuelles en rapport avec la MRT (mots clefs dans pubmed: *microbeam radiation therapy, microplanar beam ou array of microbeam*).

C - La technique de MRT

C - I - La production des microfaisceaux

Lors de son arrivée sur la ligne de lumière le faisceau est traité par une succession d'éléments symbolisés sur la Figure 20 (lecture de droite à gauche).

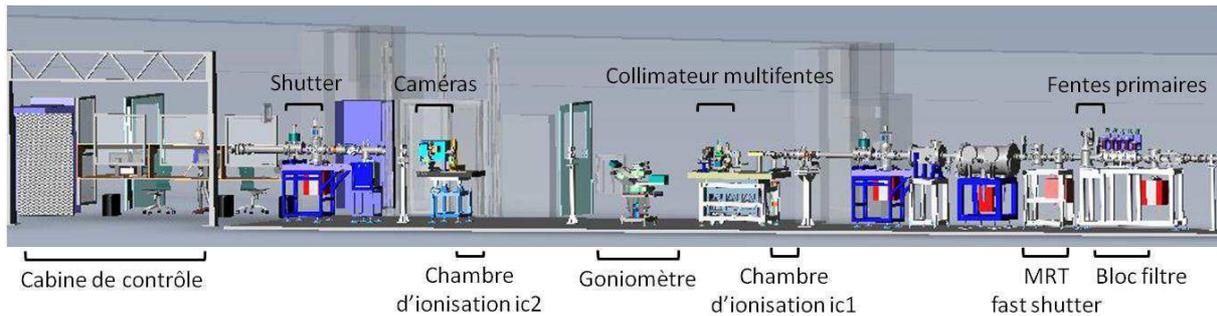


Figure 20 : Représentation schématique du traitement du rayonnement synchrotron par différents éléments physiques ou mécaniques pour l'irradiation par microfaisceaux sur Id17.

Le faisceau est atténué par une série de filtres ou bloc filtre (0,5 mm de béryllium, 1,5 mm d'aluminium et 1mm de cuivre) afin d'éliminer les photons de faibles énergies, non-pénétrants donc inutiles en terme de traitement mais néanmoins toxiques pour la peau et les tissus peu profonds. La taille du faisceau subit un premier ajustement spatial au niveau des fentes primaires, puis le faisceau est condamné (ou non) en quelques millisecondes par un obturateur (MRT fast shutter) constitué de cuivre et de deux lames de tungstène. Le mouvement des deux lames peut être synchronisé avec les mouvements du porte-échantillon (goniomètre dans ce cas précis) situé en aval, au moment de l'irradiation [Renier M. *et al.* 2002]. Le faisceau se propageant jusque là dans le vide rencontre une fenêtre de béryllium avant d'atteindre l'air. La fenêtre d'ionisation (ic1) qui fait suite permet de vérifier la présence du faisceau, sert à l'alignement des éléments en amont. Le faisceau traverse ensuite un collimateur multifentes (MSC pour *MultiSlit Collimator*). L'ESRF a développé son propre collimateur (EMSC) composé de deux pièce mécanique, alternant chacune des éléments de numéro atomique élevé (tungstène) puis faible (azote) permettant le microfractionnement du faisceau [Bräuer-Krisch E *et al.* 2009a]. C'est le positionnement décalé des deux pièces mécaniques qui permet ensuite de faire varier la taille des faisceaux (Figure 21). Ce collimateur est l'aboutissement d'années de développement pour générer les microfaisceaux au mieux : initialement l'échantillon était déplacé devant une fente fixe (SSC pour *Single Slit Collimator*), chaque déplacement correspondant à un microfaisceau. Puis deux collimateurs de

type Archer en 1998 [Archer DW 1998], ou Tecomet [Bräuer-Krisch E. *et al.* 2005a] furent utilisés. Dans le cas des expériences menées lors de cette thèse, nous avons utilisé un *single* EMSC, soit un collimateur de type EMSC constitué d'un seul élément mécanique générant des microfaisceaux de largeur fixe (50 μm), espacés entre eux de 400 μm . Pour effectuer des irradiations avec des espaces interfaisceaux intermédiaires (200 μm), une seconde exposition est réalisée après une translation de l'échantillon de 200 μm .

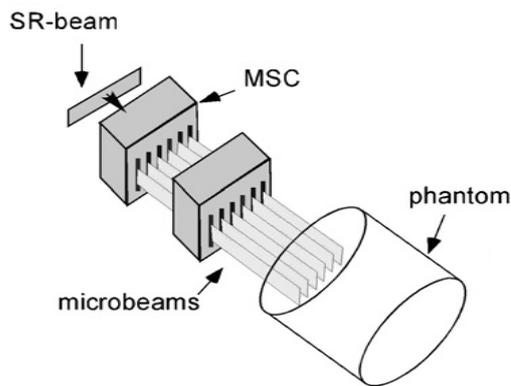


Figure 21: Représentation schématique de la production de microfaisceaux au travers d'un collimateur multifentes (MSC). Le décalage entre les deux pièces coulissantes du collimateur permet d'obtenir des microfaisceaux de taille variable. Figure extraite de [Siegbahn E, A. *et al.* 2006].

L'échantillon est positionné sur un goniomètre motorisé qui sert à la fois à positionner la cible par rapport au faisceau et à réguler le temps d'exposition de l'échantillon devant le faisceau. La vitesse de balayage du goniomètre est en effet adaptée à la dose à administrer et ajustée au débit de dose mesurée. En aval du goniomètre, le faisceau rencontre une 2^{ème} chambre d'ionisation (ic2) servant à l'alignement du collimateur. L'ensemble de ces éléments est confiné dans une cabine de plomb du fait d'un niveau de rayonnement dangereux pour l'expérimentateur lorsque le shutter est ouvert et est commandé à distance depuis la cabine de contrôle.

C - II - Notion de pic et de vallée

Le passage des microfaisceaux à travers les tissus provoque une forte irradiation dans une zone micrométrique appelée « zone pic ». La dose déposée dans cette zone est définie comme la « dose pic ». Au-delà du pic, le rayonnement diffuse dans l'espace sur des zones fines dites « zones de transition », puis des « zones vallées » qui reçoivent une dose dite « dose vallée » (Figure 22). Cette dose vallée est issue d'un rayonnement diffusé provenant des zones pics adjacentes. Elle est beaucoup plus faible que la dose pic (d'un facteur 20 à 30) mais reste néanmoins une dose significative pour un tissu biologique.

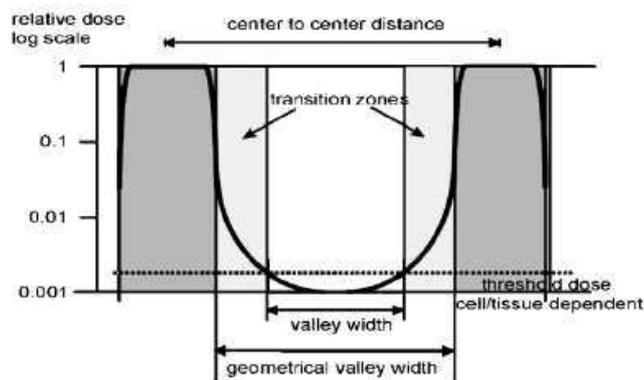


Figure 22: Représentation schématique du profil de dose de deux microfaisceaux avec les régions caractéristiques du pic (gris foncé), de la zone de transition (gris clair) et de la vallée (blanc). Extrait de [Blattmann H. et al. 2005].

La valeur de la dose vallée est dépendante de plusieurs paramètres :

- la dose pic déposée
- la distance interfaisceaux
- la largeur des microfaisceaux
- l'énergie du faisceau
- la profondeur dans le tissu
- la composition chimique de la cible traversée
- le nombre de microfaisceaux et par la même le volume cible/taille du champ d'irradiation

Pour chaque condition d'irradiation, le *peak valley dose ratio* (PVDR) permet d'indiquer le rapport entre la dose pic et la dose vallée qui varie donc selon les mêmes paramètres que la dose vallée. L'espacement entre deux centres de microfaisceaux ou distance dite « crête-à-crête » ou « *centre-to-centre* » (c-t-c) est indépendante de la taille des microfaisceaux. Les conditions d'irradiation sont par convention notées ainsi :

Dose pic (Gy) / largeur des microfaisceaux (μm) / distance interfaisceaux (μm).

C - III - Dosimétrie

L'évaluation de la valeur absolue des doses utilisées en MRT (pics et vallées) s'avère beaucoup plus complexe que dans le cas de radiothérapie conventionnelle. En effet, les approches de dosimétrie expérimentale et théorique traditionnelles se heurtent à des paramètres inhabituels : un débit de dose élevé, une résolution spatiale de l'ordre du micromètre et une gamme de doses s'étalant du Gy aux kGy sur un même volume d'irradiation (zones pic et vallée).

Des profils de doses relatives peuvent être obtenus de manière expérimentale grâce à l'utilisation de films radiochromiques de haute résolution spatiale. Les films GafChromic® MD-55 et HD-810 ont la capacité de s'opacifier, en prenant une teinte bleue, de manière proportionnelle à la dose, dans des gammes allant respectivement de 1 à 100 Gy et de 10 à 300 Gy. Leur lecture peut être réalisée grâce à un microdensitomètre qui permet de façon optimale d'obtenir une résolution de 20 microns. L'utilisation d'un scanner commercial permet également d'obtenir des profils de dose et permet une analyse quantitative des doses vallées pour les espacements interfaisceaux d'au moins 400 μm . Les calculs de dose théorique obtenus par simulation Monte Carlo corrént de manière satisfaisante avec les mesures de dose obtenues à l'aide des films Gafchromiques [Bräuer-Krisch E. 2005; Bräuer-Krisch E *et al.* 2009c; Crosbie J. C. *et al.* 2008; Martínez-Rovira I *et al.* 2012] et d'autres détecteurs haute-résolution [Bräuer-Krisch E. *et al.* 2010; Bräuer-Krisch E *et al.* 2009b; Ptaszkiewicza M. *et al.* 2008; Rosenfeld A. *et al.* 2005].

L'obtention de doses absolues ou des PVDR des doses relatives a fait l'objet de nombreux travaux de dosimétrie théorique depuis les premiers calculs de Daniel Slatkin et ses collaborateurs en 1992 [Slatkin D. N. *et al.* 1992]. En 2000, l'utilisation des programmes de simulation de Monte Carlo, amène à des doses vallées plus hautes que celles initialement envisagées [Stepanek J. *et al.* 2000]. Les calculs de doses présentent en effet une forte dépendance aux paramètres de simulation engagés et donc aux perfectionnements des programmes utilisés. De nombreux groupes ont publié des résultats de dosimétrie théorique pour différentes configurations de MRT et utilisant différents programmes Monte Carlo dont les codes PENELOPE et GEANT4 [De Felici M. *et al.* 2005; Gokeri G *et al.* 2010; Martínez-Rovira I *et al.* 2010; Orion I. *et al.* 2000; Prezado Y *et al.* 2009a; Siegbahn E. *et al.* 2005; Siegbahn E. A. *et al.* 2009; Spiga J. *et al.* 2007]. L'incorporation de paramètres de plus en plus réalistes et de nouveaux modèles plus détaillés permettent de perpétuelles améliorations des simulations.

Ainsi, un effort de comparaison et de mise en commun entre dosimétrie expérimentale et théorique permet depuis quelques années l'obtention de dose avec une certitude croissante [Martínez-Rovira I. *et al.* 2012; Prezado Y *et al.* 2012a]. Ces avancées sont essentielles pour comparer de façon objective la MRT avec d'autres techniques d'irradiation.

Une approche de dosimétrie biologique, utilisant la quantification des cassures double-brins de l'ADN, est également utilisée depuis peu pour mieux comprendre la répartition de la dose dans les tissus et les implications biologiques [Priyadarshika RC *et al.* 2011; Rothkamm K *et al.* 2012].

D - Expériences fondatrices

La première publication concernant les effets de la MRT sur un tissu biologique date de 1995 et présente une étude relative aux tissus cérébraux de rongeurs irradiés par des microfaisceaux, générés par un collimateur uni-fente (SSC) et déposant entre 312 et 10 000 Gy sur leur passage [Slatkin D. N. *et al.* 1995]. Cinquante pourcent des animaux irradiés avec la plus haute dose, ont subi des dommages tissulaires, imputés à l'époque à un mouvement physiologique des tissus lors de l'irradiation. Les tissus cérébraux irradiés par des triplets de microfaisceaux, avec une dose allant jusqu'à 5 000 Gy, ne présentent aucune nécrose tissulaire, ni dégât macroscopique. Les dommages cellulaires restent confinés au passage des microfaisceaux (Figure 23).

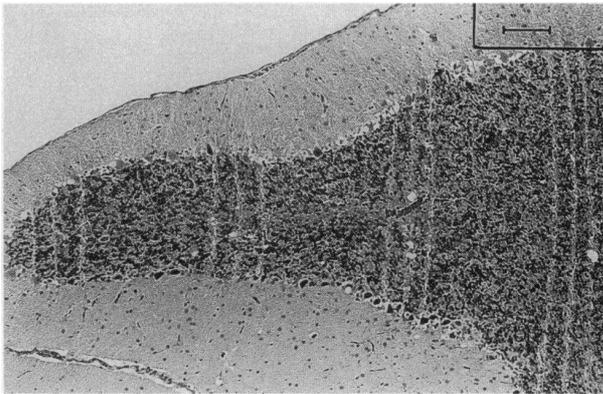


Figure 23: Photographie d'une coloration HE de coupe coronale de cervelet de rat sacrifié 30 jours après irradiation [Slatkin D. N. *et al.* 1995]. Quatre triplets de stries verticales sont visibles dans la couche granulaire du cortex sur le passage de microfaisceaux de $37 \pm 3 \mu\text{m}$ espacés de $75 \mu\text{m}$, appliqués avec une dose d'entrée à la peau de 2500 Gy. Barre d'échelle = $100 \mu\text{m}$.

La relative innocuité des microfaisceaux sur les tissus cérébraux sains ainsi illustrée, l'intérêt de la communauté MRT, alors naissante, se tourne en 1998 vers une tentative de traitement de tumeurs cérébrales de haut grade implantées chez le rat [Laissue J. A. *et al.* 1998]. Lors de ce premier essai, des rats Fischer 344 porteurs de gliosarcomes 9L orthotopiques, sont irradiés 14 jours après implantation, par 101 microfaisceaux de $25 \mu\text{m}$, espacés de $100 \mu\text{m}$ c-t-c et générés comme précédemment par un SSC. L'effet d'une irradiation unidirectionnelle déposant 625 Gy aux niveaux des pics (625-1) et deux irradiations bi-directionnelle, croisés orthogonalement au niveau de la tumeur et déposant 312 (312-2) ou 625 Gy (625-2) a été testé sur la survie des animaux (Figure 24a).

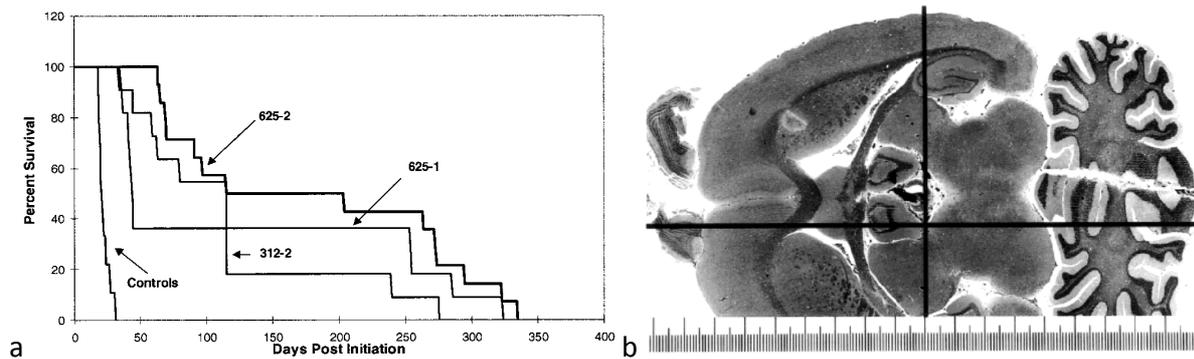
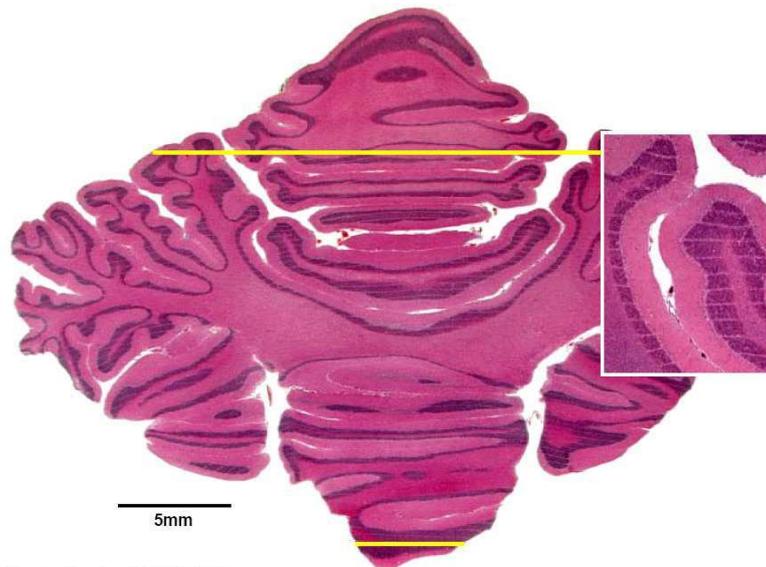


Figure 24: Résultats de la première expérience de MRT sur animaux porteurs de gliosarcomes 9L implantés 14 jours avant irradiation, extrait de [Laissue J. A. et al. 1998]. a- Courbes de survie de rats porteurs de tumeur 9L associées à une irradiation à 625/25/100 tirs croisés (625-2), 312/25/100 tirs croisés (312-2) et 625/25/100 unidirectionnels (625-1). b- Coloration à l'hématoxyline/éosine d'une coupe horizontale de cerveau, 310 jours après une irradiation antéro-postérieure par 101 microfaisceaux de 25 μm espacés de 100 μm et déposant 625 Gy.

Une augmentation significative de la survie a été observée quel que soit le protocole d'irradiation considéré. Alors que la survie maximum des animaux non irradiés était de 31 jours, la médiane de survie des rats irradiés par un tir croisé de 625 Gy a atteint 139 jours. Outre l'efficacité de la MRT sur le contrôle tumoral, cette étude met en évidence les dommages induits sur le tissu cérébral par un nombre élevé de microfaisceaux. D'importants dommages cellulaires ont été observés au niveau du croisement des microfaisceaux pour les tirs bi-directionnels. Dans le cas d'exposition à une seule direction de microfaisceaux, le tissu cérébral sain ne présente, à nouveau, aucun dégât macroscopique, même plusieurs mois après l'irradiation (Figure 24b). Il est alors envisagé que la radiorésistance des tissus sains soit soutenue par le maintien du réseau vasculaire, permis grâce à une recolonisation des zones pics par les cellules endothéliales des zones vallées, encore viables.

La résistance des tissus sains aux microfaisceaux, a permis d'envisager la MRT comme une alternative pour le traitement des tumeurs cérébrales de l'enfant et du jeune adulte, chez qui le tissu cérébral sain est très radiosensible. Cependant la dose pic subit une atténuation plus importante que la dose vallée à la traversée des tissus, entraînant ainsi une diminution du PVDR. La conservation d'une alternance de zones pics et vallées très marquée devait donc être vérifiée sur un cerveau de taille conséquente. Une incertitude résidait également dans la tolérance de tissus cérébraux non matures. En 2001, Jean Laissue et ses collaborateurs réalisent une irradiation de cerveaux de porcelets sevrés, d'ordre de grandeur comparable à l'humain et dont les tissus sont encore immatures. Le cervelet des porcelets a été irradié transversalement sur un champ de 1,5 \times 1,5 cm par des microfaisceaux de 25 μm , séparés de 210 μm et déposant des doses de 150, 300,

425 et 600 Gy. Le comportement des animaux a ensuite été observé dans une ferme pendant une quinzaine de mois et aucun trouble neurologique, moteur, de développement musculaire ou de locomotion n'a été mis en évidence. Les analyses histologiques réalisées sur les cerveaux d'animaux sacrifiés 465 jours après l'irradiation révèlent des dégâts cellulaires confinés aux zones de passage des microfaisceaux, une conservation de l'alternance de zones pics et vallées très distincte à plusieurs centimètres de profondeur dans le tissu et aucun dégât tissulaire ou signe d'hémorragie (Figure 25).



Laissue et al., Proceedings of SPIE 4508 (2001) 35

Figure 25: Coloration d'une coupe horizontale de cervelet de porcelet 15 mois après MRT administrée avec une dose pic d'entrée à la peau de 300 Gy par des microfaisceaux de 25 μm espacés crête à crête de 210 μm . Extrait de [Laissue JA et al. 2001].

Le même type d'étude fut réalisé sur des embryons de canards [Dilmanian F. A. et al. 2001] et des rats non sevrés [Laissue J. A. et al. 1999].

Ces observations montrant à la fois la relative innocuité de la MRT pour les tissus cérébraux immatures et la conservation de la configuration d'irradiation après plusieurs centimètres de tissus traversés, ont permis d'envisager la MRT comme une technique de radiothérapie chez l'humain, voire chez l'enfant. En parallèle, des travaux de simulation présentent une conservation nette du gradient de dose entre pics et vallées et ce jusqu'à une profondeur d'irradiation de 15 cm [Siegbahn E. et al. 2005]. Les résultats de cette expérience sur le porcelet furent le point de départ et la justification essentielle aux développements précliniques menés depuis à l'ESRF, principalement sur des modèles de rongeurs, sains ou porteurs de tumeurs.

D - I - Optimisation des paramètres d'irradiation en MRT

L'espacement inter-microfaisceaux

En 2002, Dilmanian *et al.* réalisent une étude de l'influence des paramètres d'irradiation en MRT sur la survie de rats porteurs de gliomes 9L [Dilmanian F. A. *et al.* 2002]. Des microfaisceaux de 27 μm sont utilisés avec un espacement c-t-c de 50, 75 ou 100 μm et déposant des doses de 150, 250, 300 ou 500 Gy. Pour toutes les configurations, l'utilisation de la MRT augmente significativement la survie des animaux (les médianes de survie, MST pour *median survival time*, associées aux configurations 250/27/50, 250/27/75 et 500/27/100, sont respectivement de 136, 171 et 170 jours contre 19 jours pour les animaux non traités). Les configurations impliquant les espaces interfaisceaux les plus faibles obtiennent les moins bonnes MST pour toutes les doses testées. La taille des vallées, ainsi que la dose qui est déposée, semblent clairement influencer l'efficacité de la MRT. En 2008, Pierric Régnerd et ses collaborateurs, utilisant un ensemble de microfaisceaux de 25 μm déposant 625 Gy lors d'un tir unidirectionnel, comparent les effets d'un espacement c-t-c de 100 et 200 μm [Regnard P. *et al.* 2008]. Ils mettent en évidence une meilleure médiane de survie des animaux porteurs de tumeurs 9L, lors de l'utilisation du plus petit espacement (67 jours contre 40). Cependant, 72% de ces animaux perdent du poids et ont des signes cliniques anormaux, contre seulement 12% des rats irradiés avec un espacement inter-faisceaux de 200 μm . L'analyse histologique associée, illustre des dommages du tissu sain beaucoup plus importants et fréquents avec un espacement de 100 μm . Le protocole utilisant un espacement de 200 μm permet donc une meilleure préservation du tissu sain et semble donc être un meilleur compromis entre le contrôle tumoral et protection du tissu sain. Cet espacement optimisé de 200 μm c-t-c est actuellement celui utilisé au sein de notre équipe et pour ce travail de thèse.

La taille des microfaisceaux

L'influence de l'épaisseur des microfaisceaux a également été étudiée. En 2009, Serduc *et al.* comparent 3 tailles de microfaisceaux (25, 50 et 75 μm) sur des rats porteurs ou non de tumeurs 9L [Serduc R *et al.* 2009a]. Deux irradiations croisées orthogonalement sur l'emplacement théorique de la tumeur sont réalisées avec un espacement interfaisceaux de 211 μm . Des doses pics de 860, 480 et 320 Gy sont respectivement utilisées pour les microfaisceaux de 25, 50 et 75 μm afin d'obtenir une dose vallée identique pour chaque configuration d'irradiation (soit 18 Gy pour une irradiation uni-directionnelle). À dose vallée équivalente, les microfaisceaux de 50 μm conduisent à la médiane de survie la plus longue (entre 13 et 35 jours par rapport aux

microfaisceaux de 75 et 25 μm) et apparaissent comme le meilleur compromis entre le contrôle tumoral et la toxicité du tissu cérébral sain. Cette taille de microfaisceaux de 50 μm est actuellement utilisée au sein de notre équipe et pour ce travail de thèse. Notons que de récents travaux menés par Uyama *et al.* sur un modèle de gliome humain (U251) implanté de manière sous-cutanée, démontrent une efficacité tumoricide supérieure pour des microfaisceaux de 20 μm comparés à des faisceaux de 100 μm et ce malgré des doses vallées déposées au niveau de la tumeur assez proches (respectivement 8,2 et 9,6 Gy) [Uyama A *et al.* 2011].

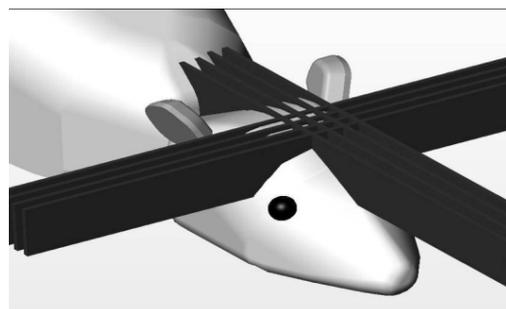
Le fractionnement temporel de l'irradiation MRT

La faisabilité technique d'un fractionnement temporel de la dose d'irradiation, apportée par MRT, a été évaluée sur des rats porteurs de tumeurs 9L [Serduc R *et al.* 2009b]. Une augmentation significative de la survie des animaux (216%, $p < 0,0001$) est obtenue lorsque trois fractions d'irradiation ont été appliquées à 24h d'intervalle, par trois ports différents, perpendiculaires les uns aux autres. L'augmentation de survie est l'une des meilleures obtenues sur ce modèle de tumeur particulièrement agressive et est significativement plus importante que celle décrite par Kim *et al.* (78%) [Kim J. H. *et al.* 1999] pour un traitement similaire en radiothérapie conventionnelle. Cependant il n'y a eu aucun survivant à long terme et les analyses immunohistologiques révèlent qu'aucune tumeur 9L n'a été éradiquée.

L'utilisation de directions d'irradiation multiples

A l'instar de la radiothérapie conventionnelle, l'usage de plusieurs directions d'irradiation a été rapidement testé en MRT. Dès 1998, Laissue *et al.* comparent la survie de rats porteurs de tumeurs 9L associée à l'irradiation de 625 Gy uni- ou bi-directionnelle [Laissue J. A. *et al.* 1998]. L'irradiation croisée est largement plus efficace (Figure 24a). Ce type d'irradiation (Figure 26) a été utilisé lors de nombreuses autres études [Bouchet A *et al.* 2010; Dilmanian F. A. *et al.* 2003; Le Duc G *et al.* 2011; Miura M. *et al.* 2006; Serduc R. *et al.* 2009].

Figure 26: Représentation schématique d'une irradiation croisée orthogonalement au niveau de la position théorique de la tumeur. Extrait de [Serduc R. *et al.* 2008a].



La géométrie particulière des microfaisceaux permet d'imaginer d'autres configurations d'irradiation. En 2004, Daniel Slatkin proposait de manière théorique deux conformations croisées uni- ou bi-axiale [Slatkin D. N. 2004]. L'absence de schéma complique cependant la visualisation de ces propositions. À notre connaissance aucune étude n'a testé ces configurations.

Un mode d'irradiation croisée, co-planaire, qui permet dans la zone cible de réduire par deux la taille de la vallée (Figure 27a) et d'augmenter la dose vallée, est proposé de manière théorique en 2005 [Bräuer-Krisch E. *et al.* 2005b]. Peu après, la même équipe démontre la faisabilité technique sur des rats irradiés avec 2 ensembles de 42 microfaisceaux de 25 μm , espacés entre eux 211 μm c-t-c et déposant différentes doses (450, 550 et 625 Gy) [Bräuer-Krisch E. *et al.* 2005c]. Le croisement co-planaire des microfaisceaux au niveau de la tumeur est observé sur coupe histologique des tissus irradiés (Figure 27b).

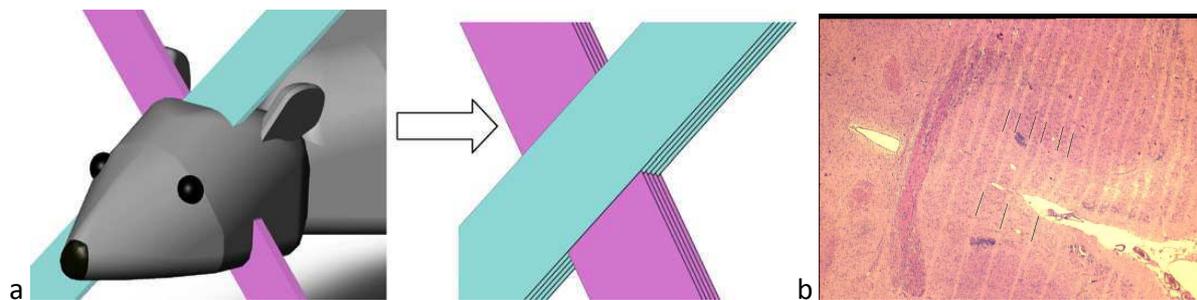


Figure 27: Irradiation MRT croisée co-planaire. a - Modélisation de deux ensembles de microfaisceaux co-planaires se croisant au niveau de la tumeur. b - Coloration HE d'une coupe horizontale d'un cerveau porteur de tumeur 9L, trois semaines après une irradiation par deux ensembles de microfaisceaux de 25 μm , se croisant de manière coplanaire au niveau de la tumeur et déposant 625 Gy sur leur passage. Extrait de [Bräuer-Krisch E. *et al.* 2005c].

Sur le même principe, Dilmanian *et al.* proposent en 2006 l'utilisation de 2 ensembles de faisceaux spatialement fractionnés, d'une largeur de 650 μm équivalente à la moitié de la distance interfaisceaux [Dilmanian F. A. *et al.* 2006]. Leur croisement engendre ainsi un dépôt de dose uniforme, équivalent à la dose pic sur tout le volume où les faisceaux se croisent. Aucun effet secondaire n'a été mis en évidence par IRM 6 mois après l'irradiation à 90 Gy. Par contre, une nécrose radique, une atrophie du cortex et des signes d'hémorragie sont repérés au niveau de la zone de croisement pour une dose plus élevée de 150 Gy. La taille des faisceaux employés semble cependant dépasser le cadre de la MRT et rapproche plutôt cette étude du domaine de radiothérapie par minifaisceaux (MBRT pour *Minibeam Radiation Therapy*) récemment développée [Gil S *et al.* 2011b; Prezado Y *et al.* 2009b; Prezado Y *et al.* 2012b].

La production d'une zone d'irradiation homogène par des microfaisceaux a été réalisée en exposant des tissus cérébraux de rats sains à 4 ensembles de 10 microfaisceaux co-planaires (200/52/200), entrecroisés au niveau d'une zone cible (Figure 28 A-C). Un recalage entre chaque direction d'irradiation permet de déposer une dose homogène au niveau d'une zone cible de 7 mm³ dans le noyau caudé (Figure 28 D et E) [Serduc R. *et al.* 2010b].

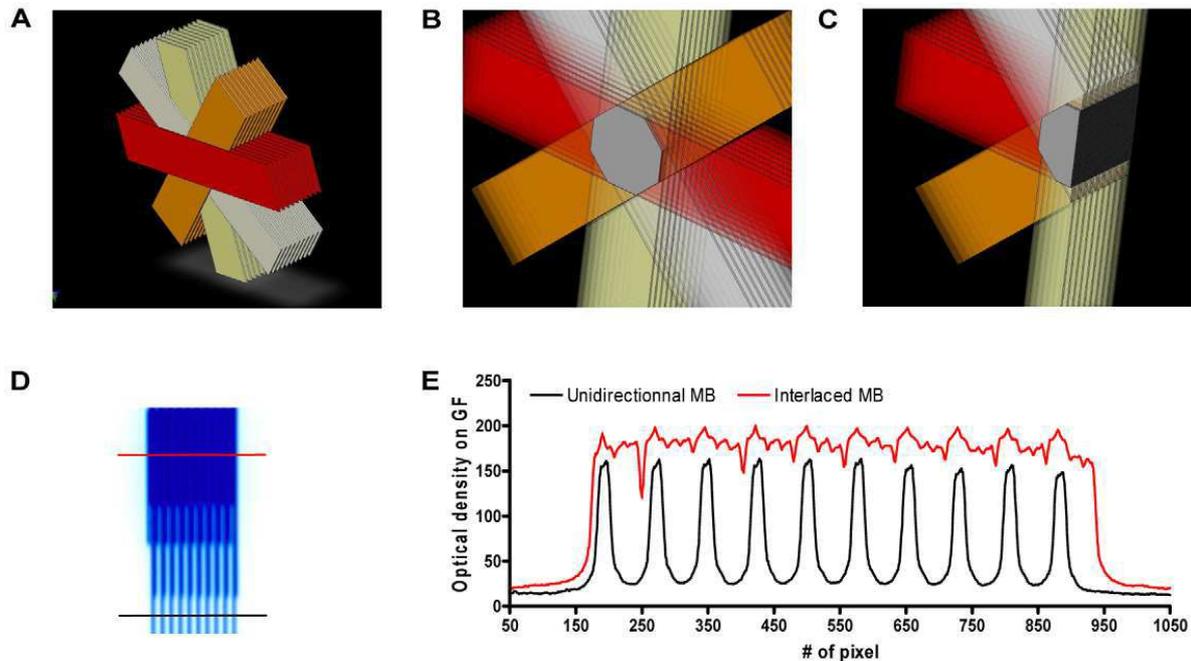


Figure 28: Représentation schématique de la géométrie d'irradiation utilisant des microfaisceaux entrecroisés. A à C – Quatre ensemble de 10 microfaisceaux (200/50/200) sont entrecroisés de manière à créer un volume cible dans lequel la dose d'irradiation est homogène et équivalente à la dose pic. D- Film Gafchromic ayant reçu une irradiation par des microfaisceaux intercroisés. De bas en haut peuvent être observés l'ajout successif des 4 directions d'irradiation. E- Profils de dose mesurée sur le film Gafchromic présenté en D. La ligne rouge correspond à la dose déposée dans la région de croisement ; la ligne noire, à celle déposée par une seule direction de microfaisceaux. Extrait de [Serduc R. *et al.* 2010b].

Cette configuration d'irradiation par MRT présente l'énorme avantage de déposer un champ plein de plusieurs centaines de Grays sur une zone cible, tout en exposant le tissu cérébral sain à une seule direction d'irradiation n'engendrant pas de dégâts importants. L'application aux tumeurs cérébrales de cette procédure d'alignement est en cours d'étude, couplée à l'imagerie à rayons X [Serduc R. *et al.* 2010a].

L'ensemble de ces configurations d'irradiation ont permis des améliorations significatives de la survie d'animaux porteurs de tumeurs, notamment cérébrales, tout en conservant la préservation

des tissus sains décrite lors des premières utilisations de la MRT. Une autre approche pour améliorer l'efficacité de la MRT consiste à coupler cette irradiation à un adjuvant.

D - II - Couplage de la MRT à des stratégies adjuvantes

Un des premiers essais de couplage de thérapie à la MRT a été réalisé en 2006 par Henri Smilowitz *et al.* sur des rats porteurs de tumeurs 9L [Smilowitz H. M. *et al.* 2006]. Dans ce travail, les auteurs décrivent une synergie positive entre une irradiation unidirectionnelle sub-optimale (625/39/211) et l'injection sous-cutanée répétée de cellules 9L stérilisées par une irradiation de 50 Gy et transfectées par le gène GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*). Un doublement du taux de survie à 1 an des animaux ainsi traités est obtenu par rapport à l'utilisation de la MRT seule (44 vs 20%).

En 2008, Regnard *et al.* rapportent l'effet du couplage d'une irradiation MRT unidirectionnelle (625/25/200) et de 3 molécules chimiques utilisées chez l'Homme (Gd-DTPA (Magnevist®), Cisplatine et témozolomide) sur des rats porteurs de tumeurs 9L orthotopiques [Regnard P *et al.* 2008]. Ces traitements appliqués 14 jours après l'implantation tumorale augmentent la MST par rapport aux animaux non traités (30 à 44 jours vs 19 jours). L'administration intra-veineuse de Gd-DTA et l'injection intracrânienne de cisplatine ou de témozolomide avant MRT ne permettent aucune augmentation de la médiane de survie des animaux par rapport à la MRT seule (Figure 29). L'injection intracrânienne de Gd-DTPA, quelques 10^{aines} de minutes avant l'irradiation, augmentent en revanche l'efficacité de la MRT sur le temps médian de survie des animaux (44 vs 30,6 jours). L'effet de cet agent de contraste initialement dédié au diagnostic par IRM, semble passer par une augmentation du dépôt local de dose au niveau de la tumeur par les particules de gadolinium.

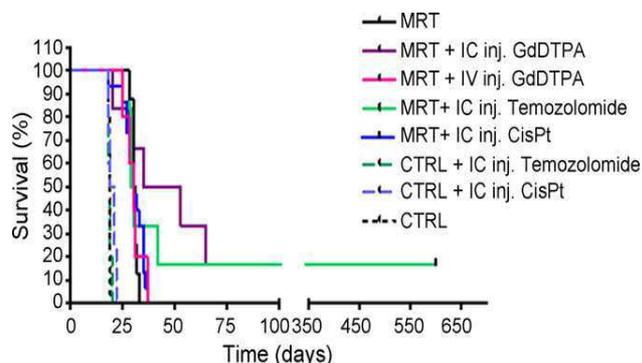


Figure 29 : Courbes de survie d'animaux porteurs de tumeurs 9L, non traités (CTRL), traités par une irradiation MRT unidirectionnelle 625/25/200 (MRT), une administration de molécules chimiques seules (CTRL+) ou un couplage de molécules chimiques et de MRT (MRT+). Extrait de [Regnard P *et al.* 2008].

Le couplage de la MRT à un élément lourd (Z élevé) a été amélioré en utilisant des nanoparticules composées notamment d'oxyde de gadolinium [Le Duc G *et al.* 2011]. Ces nanoparticules sont administrées par voie intra-veineuse (1,4 ml à 40 mM), 5 ou 20 minutes avant une irradiation MRT appliquée en 2 tirs croisés (400/50/211). Les nanoparticules ont une taille suffisamment élevée pour éviter une extravasation au niveau des vaisseaux normaux et suffisamment faible pour remplir la tumeur par accumulation passive. Vingt minutes après l'injection, la tumeur contient une quantité optimale de nanoparticules, observables en IRM. L'irradiation à ce délai augmente significativement la survie des animaux par rapport aux rats non traités, traités par MRT seule ou par MRT 5 min après l'injection des nanoparticules (Figure 30). Les médianes de survie étant respectivement de 90, 19, 47 et 34 jours.

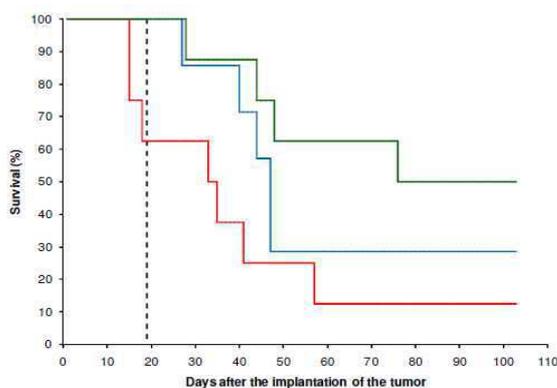


Figure 30 : Courbes de survie de rats porteurs de tumeurs 9L sans traitement (ligne pointillée noire, n=4), traités par MRT seule (ligne bleue, n=7), traités par MRT 5 min (ligne rouge, n=8) et 20 min (ligne verte, n=8) après une injection intraveineuse de nano-particules de gadolinium. Extrait de [Le Duc G *et al.* 2011].

L'effet radiosensibilisant de ces nanoparticules ainsi que la possibilité de les utiliser en imagerie illustrent leur potentiel théranostique et permettent d'envisager leur utilisation pour une radiothérapie guidée.

D - III - Compréhension des mécanismes d'action

Tissu sain

L'hypothèse d'une régénérescence rapide du réseau vasculaire sain, à la base de la préservation du tissu sain en cas d'irradiation par microfaisceaux, était déjà avancée lors des expériences de Zeman en 1961 [Zeman W *et al.* 1961]. Elle fut consolidée lors des premiers essais de la MRT sur le tissu cérébral sain par une seconde hypothèse suggérant une efficacité différentielle de la MRT sur les vaisseaux sains et tumoraux [Dilmanian F. A. *et al.* 2002; Laissue J. A. *et al.* 1998].

En 2003, il est démontré qu'une sonde fluorescente (FITC-dextran) de 70 kDa, injectée par voie intra-veineuse, peut diffuser au travers des vaisseaux tumoraux irradiés par MRT (800/27/200), alors que la BHE des tissus sains reste intacte [Dilmanian F.A. *et al.* 2003]. De plus, une irradiation unidirectionnelle du tissu sain avec une dose de 312 ou 1000 Gy (312 ou 1000/25/211) ne provoque aucune modification du volume vasculaire et de la densité des capillaires sanguins (observés par marquages immunohistochimiques) pendant les trois mois suivant l'irradiation [Serduc R. *et al.* 2006]. Des vaisseaux sont présents dans le trajet des microfaisceaux alors que les cellules autres qu'endothéliales ne sont plus détectables après irradiation, quel que soit le délai d'observation (Figure 31).

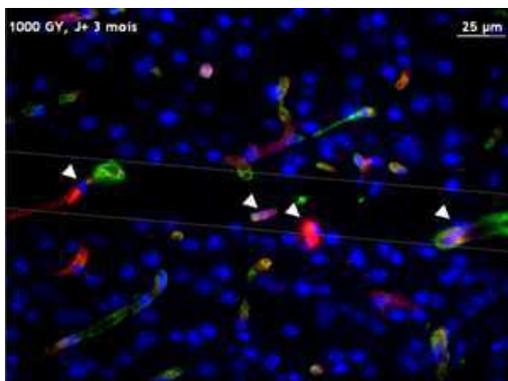


Figure 31: Immunohistochimie des protéines PECAM-1 (rouge) et collagène IV (vert) sur une coupe congelée de cerveau de souris 3 mois après MRT (1000/25/211). Les noyaux sont marqués au DAPI. Le passage des microfaisceaux est visualisé par une absence quasi complète des noyaux. Les têtes de flèches indiquent les cellules endothéliales dans le trajet d'un microfaisceau. Extrait de [Serduc R. *et al.* 2006].

Un suivi en microscopie biphotonique intravitale révèle que le réseau vasculaire cérébral sain reste perfusé après irradiation par microfaisceaux pour des doses d'entrées allant jusqu'à 1000 Gy. L'injection intra-veineuse d'un mélange de deux sondes fluorescentes de poids moléculaires différents (70 et 0.6 kDa) indique une augmentation de la perméabilité de la BHE uniquement pour les doses de rayonnement les plus fortes (1000 Gy) et ce de manière très transitoire (premiers jours après irradiation). Ces résultats ont été corrélés à la formation précoce et temporaire d'un œdème cérébral, mesurée par IRM ou par microgravimétrie mais disparaissant dans les premiers jours suivant l'irradiation [Serduc R. *et al.* 2008b].

L'effet de la MRT sur des structures vasculaires saines de plus grande taille ont été décrits dans le travail de Boudewijn Van der Sanden *et al.* de 2010 [Van der Sanden B. *et al.* 2010]. L'irradiation d'artères saphènes par 26 microfaisceaux (de 50 µm de large, espacés de 400 µm c-t-c, déposant une dose de 312 ou 2000 Gy) entraîne une atrophie, dose-dépendante de la couche musculaire lisse sur le passage des microfaisceaux jusqu'à 3 mois post-irradiation (Figure 32).

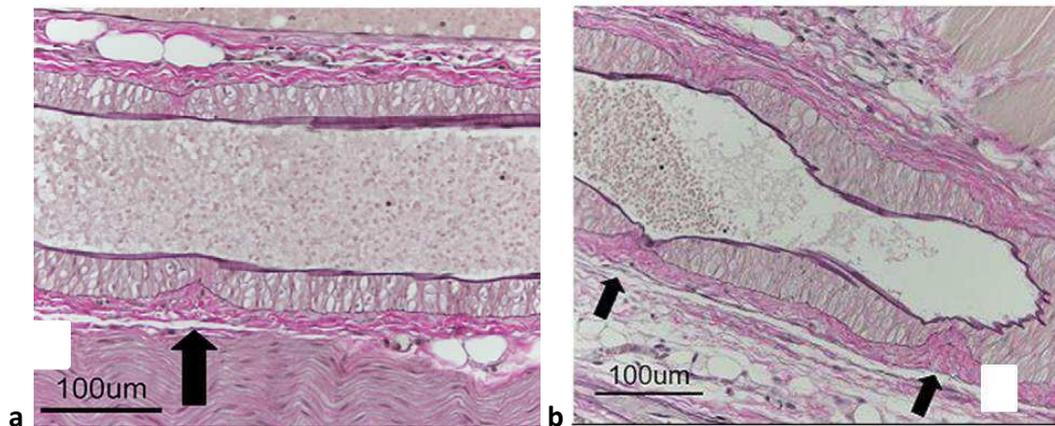


Figure 32: Coloration (Elastica–van Gieson) de coupe longitudinale d'artère saphène, 3 mois après irradiation MRT à 312 Gy (a) ou 2 000 Gy (b). Dans le passage des microfaisceaux, indiqué par les flèches, la couche musculaire lisse (rose-orangée) est affinée de manière dose-dépendante. Extrait de [Van der Sanden B. et al. 2010].

La disparition des cellules musculaires lisses irradiées par des doses pics de 312 ou 2 000 Gy semble entraîner un effondrement de la couche limitante élastique externe sur la limitante interne. Aucun effet n'est visible dans les zones vallées. Malgré une légère modification de leurs parois, les artères tolèrent jusqu'à 2 000 Gy appliqués par MRT sans développer d'occlusion.

La préservation de la continuité du réseau vasculaire représente un bénéfice en termes d'apport en nutriments et en oxygène aux tissus sains lors du traitement d'une tumeur cérébrale par MRT. Cette préservation du système vasculaire constitue un atout majeur qui permettrait d'expliquer la résistance surprenante des tissus sains face à la MRT.

Autour du tissu tumoral

Blattmann *et al.* rapportent en 2005 l'effet des microfaisceaux sur des membranes chorioallantoïdiennes d'embryons de poulets (CAM pour *chorioallantoic membrane*) [Blattmann H. *et al.* 2005]. Ils décrivent des dommages massifs sur la microvascularisation, un flux sanguin ininterrompu pour les vaisseaux larges pour toutes les doses testées (300 à 1200 Gy apportés par des microfaisceaux de 27 µm, espacés crête à crête de 200 µm) et une réparation rapide du réseau vasculaire dans les 24h suivant l'irradiation. Cependant, les CAM présentent un réseau vasculaire aux propriétés différentes selon leur stade de développement : servant de modèle de vasculogénèse / angiogénèse lors des stades précoces, puis de réseau vasculaire stable plus tardivement. Dans cette étude le stade utilisé n'est pas spécifié, rendant l'interprétation des résultats ambigus.

En 2008 Serduc *et al.* caractérisent par IRM la réponse vasculaire des tumeurs 9L portées par des souris Nude à une irradiation par 2 ensembles de 28 microfaisceaux de 25 μm , espacés de 211 μm c-t-c et déposant 500Gy [Serduc R. *et al.* 2008a]. Dans le tissu sain, la MRT est responsable d'une ouverture de la BHE 24h après exposition se traduisant en IRM par une augmentation significative du coefficient de diffusion apparent. En revanche, la MRT n'aurait pas un effet suffisant pour inhiber l'angiogenèse tumorale. En effet, le volume sanguin tumoral mesuré par IRM n'est pas modifié après irradiation. L'évolution morphologique des vaisseaux observée par immunohistochimie et caractérisée en IRM par une augmentation de l'index de taille des vaisseaux[†] dans le groupe contrôle, n'est différée que d'une semaine dans le groupe traité par MRT. Cette étude menée sur des temps courts post-irradiation (inférieurs ou égaux à 2 semaines) ne présente que des effets limités sur la vascularisation tumorale.

En 2010, un suivi IRM et histologique à plus long terme des effets de la MRT est mené simultanément sur les tissus sains et tumoraux de rats porteurs de tumeurs 9L orthotopiques [Bouchet A *et al.* 2010]. L'utilisation d'une irradiation croisée et de nouveaux paramètres d'irradiation (400/50/200) entraîne une diminution du volume sanguin tumoral et du diamètre moyen des vaisseaux à partir de la 2^{ème} semaine post-MRT. Précédant ceci, une perte des cellules endothéliales d'une partie des vaisseaux tumoraux est observable dès le 5^{ème} jour-post irradiation (Figure 33) et s'accroît jusqu'aux temps les plus longs étudiés (45 jours post MRT).

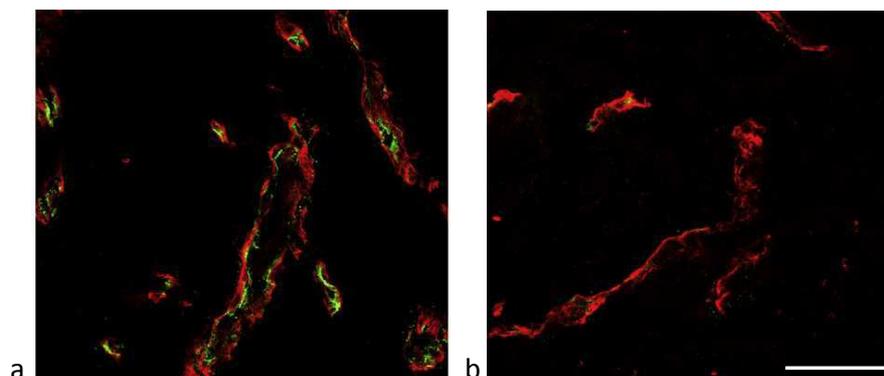


Figure 33 : Image de microscopie confocale de vaisseaux de tumeur 9L de 18 jours, (a) non irradiés ou (b) irradiés par MRT (2x 400/50/200). Sont immunomarqués en rouge le collagène de type-IV de la lame basale des vaisseaux et en vert la protéine RECA-1 pour Rat Endothelial Cell Antigen-1. Les vaisseaux tumoraux irradiés ne présentent plus de marquage des cellules endothéliales 8 jours après MRT. Barre d'échelle : 70 μm . Extrait de [Bouchet A *et al.* 2010].

[†] L'index de taille des vaisseaux représente le rayon moyen des vaisseaux représenté dans le volume d'intérêt IRM [Tropres I, Grimault S, Vaeth A, Grillon E, Julien C, Payen JF, Lamalle L and Decors M, *Vessel size imaging*, Magn Reson Med, **2001**. vol 45 (3) p397-408.

En revanche, l'irradiation unidirectionnelle n'a pas d'effet sur la morphologie et les paramètres vasculaires au niveau des tissus sains. Cette étude a permis de mettre en évidence un effet différentiel de ce mode de radiothérapie sur les tissus vasculaires tumoraux et sains d'un même animal.

Il a aussi été démontré que l'effet préférentiel de la MRT (200/25/200 et 300/25/200) sur des CAM (observés *in vivo* et par microscopie optique et électronique) dépend du stade de maturation au moment de l'irradiation [Sabatasso S *et al.* 2011]. Sur des CAM de 8 jours, le réseau vasculaire en construction est quasiment intégralement détruit 6h après MRT à 200 Gy, alors que sur la vascularisation mature des CAM de 12 jours, les lésions restent limitées aux passages des microfaisceaux et sont rapidement réparées (24h). Ces résultats soutiennent l'hypothèse selon laquelle l'effet différentiel de la MRT sur les vaisseaux sains et tumoraux provient d'une différence de maturité vasculaire. Les analyses en microscopie électronique révèlent une vacuolisation des cellules endothéliales des vaisseaux matures dans le passage des microfaisceaux et une ouverture des jonctions inter-endothéliales permettant d'expliquer l'œdème tissulaire transitoire après une irradiation de 300 Gy et corrélant avec l'augmentation précoce et transitoire de la perméabilité des vaisseaux observés dans d'autres études [Dilmanian F.A. *et al.* 2003; Serduc R. *et al.* 2008b].

Outre les effets vasculaires, d'autres conséquences de la MRT ont été proposées au cours de différentes études. Après une irradiation de moelle épinière de rat par un microfaisceau de 270 μm déposant 750 Gy, une perte d'oligodendrocytes, astrocytes et myéline sur le passage des microfaisceaux en deux semaines, une repopulation et remyélinisation quasi-complète dans les 3 mois suivants ont été décrites [Dilmanian F. A. *et al.* 2007]. Les auteurs émettent l'hypothèse que les processus de réparation impliquent des effets indirects du rayonnement sur les cellules non irradiées (effet bystander) probablement au travers de relargage de facteurs de croissance. Cependant aucune donnée ne supporte ou réfute cette théorie et la taille du faisceau de 270 μm s'apparente plus à un minifaisceau qu'à un microfaisceau.

L'observation à court terme d'effets limités sur les vaisseaux tumoraux dans le travail de Serduc *et al.* 2008, amène les auteurs à suggérer que l'efficacité de la MRT observée aux temps courts, est associée à un effet cytotoxique direct des rayonnements ionisants sur les cellules tumorales. Une inhibition de la croissance tumorale et une diminution de l'index mitotique observable plus précocement que les effets vasculaires dans l'étude de Bouchet *et al.* 2010 conforte l'hypothèse de la participation de mécanismes non vasculaires dans l'efficacité de la MRT [Bouchet A *et al.*

2010]. Crosbie *et al.* réalisent en 2010 un suivi du devenir des cellules tumorales et saines irradiées par les microfaisceaux [Crosbie J. C. *et al.* 2010]. Au niveau de la peau saine, les cellules irradiées par les doses pics semblent quasi-immobiles, le passage des microfaisceaux restant visibles plusieurs jours après irradiation. *A contrario*, les cellules tumorales présentent une migration importante lors des 24 premières heures post MRT (Figure 34).

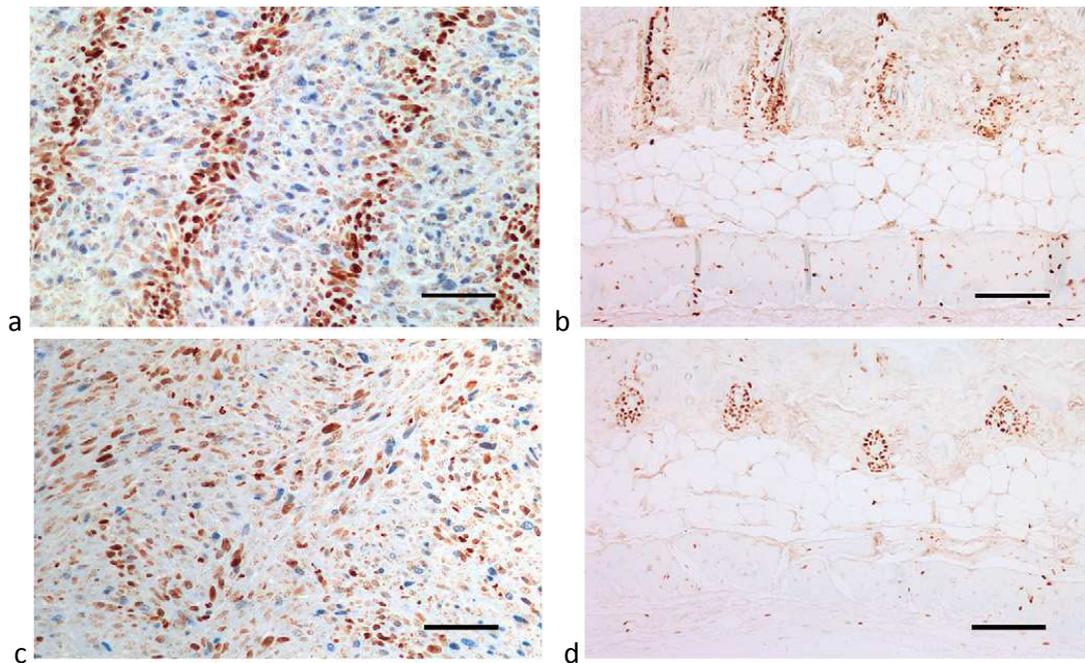


Figure 34 : Visualisation des cassures double-brin par marquage de la protéine pH2AX (en brun) sur des sections de tumeur EMT-6.5 (a et c) et de peau (b et d), 4h (a et b) ou 24h (c et d) après MRT. Migration et mélange cellulaire sont observés dans la tumeur dès 24h après MRT (c). Bare d'échelle : 100 µm. Extrait de [Crosbie J. C. *et al.* 2010].

Ce mélange rapide des cellules recevant les doses pic avec les cellules sub-létalement endommagées augmenterait la communication inter-cellulaire. Ceci expliquerait que même si moins de la moitié des cellules tumorales sont létalement irradiées, la MRT présente une efficacité élevée. Enfin il a aussi été démontré que la différence de survie obtenue par deux configurations d'irradiation utilisant des microfaisceaux de tailles différentes (20 ou 100 µm) n'est pas corrélée avec une différence de mort cellulaire évalué par un marquage TUNEL 72 heures suivant l'irradiation [Uyama A *et al.* 2011]. Les mécanismes biologiques supportant cette différence d'efficacité restent à définir, mais semblent selon les auteurs plus complexes que dommages directs induits par le passage des microfaisceaux.

L'ensemble de ces observations amène à reconsidérer les bases de l'efficacité de cette radiothérapie en proposant l'ajout de mécanismes non vasculaires intervenant notamment dans les premiers jours suivants la MRT.

PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

La MRT est une méthode de radiothérapie alternative pour les tumeurs cérébrales, qui présente l'exceptionnel avantage de pouvoir déposer de très hautes doses d'irradiation (plusieurs 100^{aines} de Grays) au niveau de la masse tumorale. En effet, le fractionnement spatial des rayons X en microfaisceaux parallèles de quelques dizaines de micromètres s'est montré efficace dans le traitement des tumeurs cérébrales du rongeur tout en préservant le tissu cérébral péri-tumoral. L'optimisation des paramètres d'irradiation (dose, taille et espacement des microfaisceaux, géométrie tridimensionnelle et multiplication des fenêtres de tir...) ainsi que le couplage de la MRT à des thérapies adjuvantes ont permis d'augmenter l'index thérapeutique de cette nouvelle modalité d'irradiation. Pour autant, son mode d'action sur le plan biologique n'est qu'en partie connu. Si l'effet différentiel de cette irradiation sur les vaisseaux sains et tumoraux a pu être démontré ces dernières années, il ne peut expliquer à lui seul l'efficacité de la MRT. Une meilleure connaissance des phénomènes biologiques, impliqués dans la réponse des tissus sains et tumoraux après MRT, semble aujourd'hui primordiale pour progresser dans le développement de cette technique et envisager des couplages thérapeutiques de manière plus éclairée. Dans ce contexte, nous avons cherché d'une part à décrire les mécanismes moléculaires mis en place suite à la MRT et d'autre part à isoler cibles thérapeutiques potentielles pouvant être utilisées pour augmenter l'efficacité de la MRT tout en conservant son apparente innocuité sur le tissu sain.

Pour réaliser ce travail nous avons tout d'abord caractérisé le modèle tumoral (gliosarcome 9L) sur le plan *in vivo* et histologique. Dans un deuxième temps, la réponse précoce à la MRT des tissus cérébraux sains et tumoraux a été caractérisée par une approche transcriptomique. À partir de la réponse différentielle obtenue, les voies de signalisation ainsi que les fonctions moléculaires et cellulaires mobilisées après MRT ont été identifiées par l'analyse fonctionnelle des profils d'expression génique. Un intérêt particulier a été porté sur un groupe de gènes répondant spécifiquement dans les tissus tumoraux en absence de toute expression dans les tissus sains. Leur suivi dans le temps a été réalisé dans le but de déterminer d'éventuelles fenêtres d'action des mécanismes associés à ces gènes. Enfin, nous avons évalué l'influence et l'apport des microfaisceaux dans le traitement radiothérapeutique des tumeurs cérébrales en comparant la survie des animaux, la réponse transcriptomique et histologique des tissus après MRT et une irradiation similaire en champ plein (non fractionnée).

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Les expériences réalisées dans l'ensemble de ce travail de thèse ont été conduites sous le certificat d'autorisation d'expérimentation animale n°380825, au sein d'établissements agréés (ESRF : B3818510002 et GIN : A3851610004) et ont été déclarées à l'IECAWR de l'ESRF (*Internal Evaluation Committee for Animal Welfare in Research*).

I - Séquence expérimentale

La Figure 35 met en évidence la séquence expérimentale utilisée pour toutes les expériences effectuées pendant les 3 années de thèse.

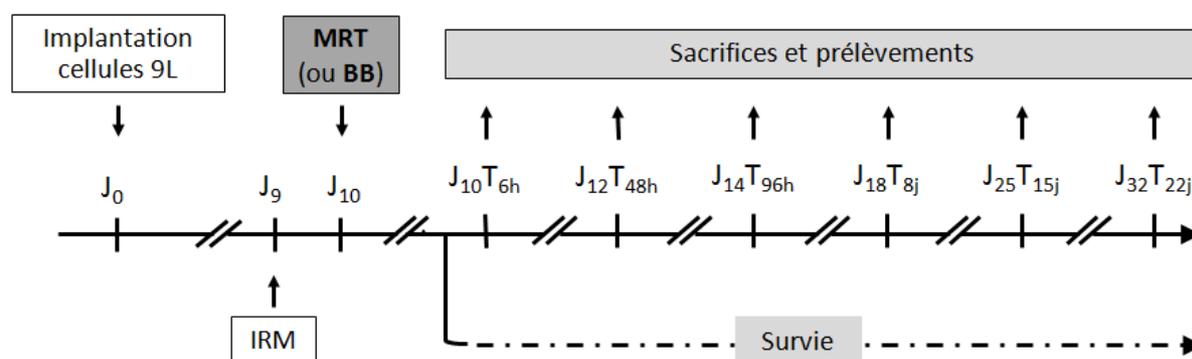


Figure 35 : Schéma récapitulatif du déroulement des expériences réalisées lors de cette thèse. Le nombre de jours post implantation et post irradiation sont représentés respectivement par un J et un T.

Les cellules 9L de gliome sont implantées dans le noyau caudé droit des animaux (J₀). Neuf jours après (J₉), une IRM anatomique est réalisée sur l'ensemble des rats afin de les répartir en groupes homogènes en fonction de la taille et la localisation de la tumeur. Le lendemain (J₁₀), les animaux des 2 groupes traités (MRT et BB) sont irradiés comme décrit ci-après. Pour chacun des groupes (non irradié, MRT et BB), une partie des animaux est gardée en observation pour établir des courbes de survie, l'autre partie est sacrifiée pour prélèvement des tissus cérébraux en vue d'analyses transcriptomiques et histologiques, à différents délais après l'implantation ou l'irradiation respectivement représentés par un « J » et un « T » (J₁₀T_{6h}, J₁₂T_{48h}, J₁₄T_{96h}, J₁₈T₈, J₂₅T₁₅ et J₃₂T₂₂). Le nombre de rats des groupes de survie ou de sacrifice, utilisés pour les différentes parties de cette thèse, sont précisés au début de chacune de celles-ci.

II - Modèle tumoral syngénique 9L

A - Choix du modèle tumoral syngénique 9L implanté orthotopiquement chez le rat Fischer

Les puces d'expression génique étant spécifiques à l'espèce animale, le modèle tumoral doit être allogénique. De plus l'utilisation d'animaux immunocompétents est primordiale pour modéliser l'ensemble des processus pouvant être mis en place après irradiation. Cette contrainte nous a orientés vers le choix d'un modèle tumoral syngénique. Enfin, l'attribution de temps de faisceaux synchrotron à date fixe, impose l'utilisation d'un modèle reproductible et maîtrisé.

Le modèle tumoral 9L implanté orthotopiquement chez le rat Fischer répond à l'ensemble de ces exigences. Il présente de plus l'avantage d'avoir été largement utilisé dans de nombreuses études de MRT [Bouchet A *et al.* 2010; Dilmanian F. A. *et al.* 2002; Laissue J. A. *et al.* 1998; Le Duc G *et al.* 2011; Regnard P *et al.* 2008; Regnard P. *et al.* 2008; Serduc R *et al.* 2009a; Serduc R *et al.* 2009b] et permet ainsi d'avoir des points de comparaison pour nos expériences.

B - Cellules 9L, culture et préparation pour l'implantation

La lignée cellulaire 9L a été établie au début des années 1970 par Benda *et al.* à partir de gliosarcomes de rat induits par administration intraveineuse répétée de N-méthylnitrosurée (5 mg/kg hebdomadaire pendant 8 mois) à des rats Fischer [Benda P. *et al.* 1971]. Les cellules 9L utilisées lors de l'intégralité de ce travail de thèse provient du *Brookhaven National Laboratory* de New York d'où elles ont été rapportées par Géraldine Le Duc en 1997.

Les cellules 9L sont cultivées en flasque dans du milieu de culture Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (41965, Gibco-Invitrogen-France, Cergy-Pontoise, France) sans pyruvate, complété avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et 1% d'antibiotique (pénicilline/streptomycine) sous atmosphère composée à 95% d'air et 5% de CO₂ dans un incubateur maintenue à 37°C.

Les cellules sont récoltées pour l'implantation lorsqu'elles sont confluentes. Les boîtes de culture sont alors rincées deux fois avec du *Phosphate Buffered Saline* (PBS) pour éliminer les traces de

milieu. Les cellules sont incubées pendant 5min dans 1mL de trypsine à 37°C. Une fois les cellules décollées de la surface de la flasque, 9mL de DMEM contenant 10% de SVF (DMEM-SVF) sont ajoutés au surnageant afin d'inhiber l'action de la trypsine. Le mélange est transféré dans un tube Falcon de 30mL, complété à 20mL avec du DMEM-SVF et centrifugées 5 min à 1500 tours.min⁻¹. Le culot cellulaire est suspendu dans 20 mL de DMEM-SVF puis centrifugé une seconde fois dans les mêmes conditions. Un comptage de la densité cellulaire est effectué au moyen d'une cellule de Neubauer, placé sous un microscope inversé. En fonction de la densité de cellules dans le culot ; une redilution est effectuée, cette fois ci avec du milieu de culture sans SVF, afin d'obtenir une suspension contenant 10⁴ cellules.μl⁻¹ prête à être inoculée au animaux.

C - Implantation des tumeurs chez le rat.

La totalité de la procédure, comprenant l'implantation et l'hébergement, a lieu au niveau de l'animalerie contrôlée de l'ESRF. Les animaux recevant les cellules 9L sont des rats Fischer 344 mâles, de 180 à 220 g, achetés chez *Charles River Laboratory* (Domaine des Oncins, Charles River, L'Arbresle, France).

L'anesthésie des animaux est induite par un mélange air/isoflurane (3%). Elle est suivie d'une anesthésie générale réalisée par injection intrapéritonéale d'un mélange xylazine/kétamine (64.5/5.4 mg.kg⁻¹). Le crâne du rat est rasé, puis l'animal est fixé sur un cadre stéréotaxique (KOPF, modèle 900) à l'aide de barres d'oreille et d'une pièce de gueule permettant la fixation des incisives (Figure 36a). Après désinfection à l'alcool, la peau est incisée sur quelques millimètres selon le plan médian. Le bregma est repéré et sert de point de référence pour une translation de 3.5 mm sur l'hémisphère droit où est effectuée une craniotomie à l'aide d'une broche osseuse de 27 gauges (Figure 36b). L'extrémité d'une seringue Hamilton est positionnée au niveau du trou percé dans la boîte crânienne de et est descendue à 6 mm de profondeur dans le noyau caudé, puis remontée de 0,5 mm afin de ménager un espace où sont injectées 10⁴ cellules 9L contenues dans 1μl de milieu DMEM, en 5 à 10 secondes (Figure 36c). La seringue de précision est lentement remontée au bout d'1 minute. Un coton-tige imbibé d'alcool est délicatement apposé sur l'ouverture osseuse pendant quelques secondes afin d'éliminer les éventuelles cellules 9L déposées hors du site d'implantation. La craniotomie est alors rebouchée

à la cire de Horsley puis la peau est refermée à l'aide de 1 à 3 points de sutures et passée à la Bétadine. Les animaux sont placés jusqu'à leur réveil dans une couveuse maintenue à 27°C.

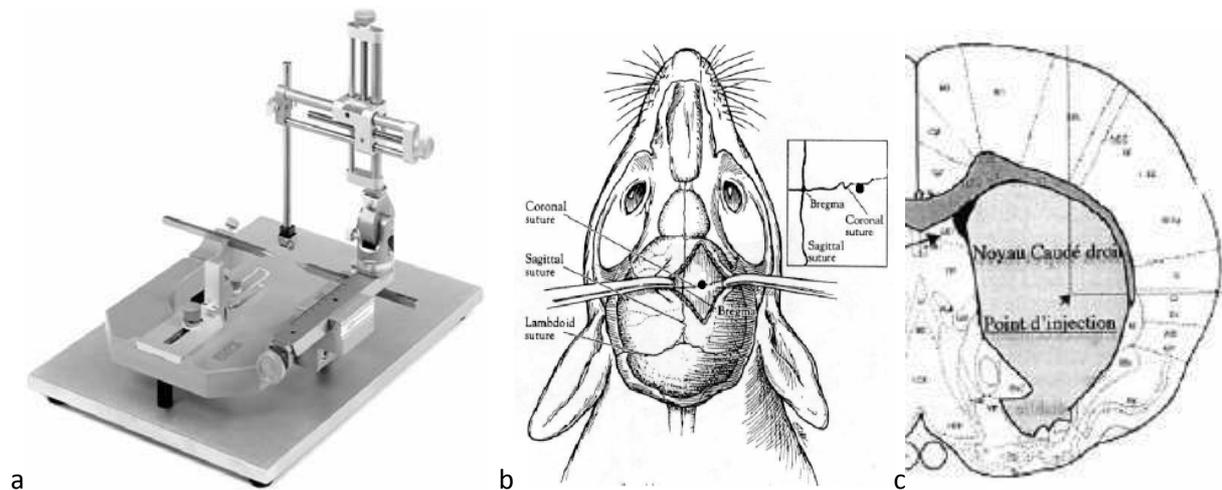


Figure 36 : Matériel et points de repère anatomiques permettant l'implantation tumorale. a - Cadre stéréotaxique de type Kopf (modèle 900) permettant l'immobilisation du crâne du rat pendant la chirurgie stéréotaxique. b - Localisation du Bregma et de la craniotomie. c - Positionnement du point d'injection des cellules au niveau du noyau caudé droit [Paxinos G et al. 1998].

D - Randomisation par IRM

Neuf jours post-implantation une IRM est réalisée sur chaque rat, au sein de la plateforme IRM du GIN dédié au petit animal, afin de confirmer la présence tumorale et d'homogénéiser la taille et le positionnement des tumeurs parmi les groupes de traitement. Les images anatomiques sont réalisées sur un aimant Bruker 7T ou 4,7T suivant les disponibilités (tous deux Bruker Advance III systems) avec un couples d'antenne volumique/surfacique (émission/réception).

En résumé, une antenne de volume est installée au centre de l'IRM pour l'émission du signal. Les rats sont installés individuellement sur un berceau, leur tête est immobilisée grâce à une barre à dents et 2 barres d'oreilles. Le maintien de la température corporelle des animaux sous anesthésie est assuré grâce à un circuit d'eau chaude (38°C) intégrée au berceau. Une antenne de surface est installée au dessus du crâne pour la réception du signal. Le berceau est ensuite placé au centre de l'antenne de volume.

L'acquisition d'images axiales, coronales et sagittales permet de vérifier le positionnement adéquat de la tête du rat au sein du dispositif. L'entrée et la sortie du berceau supportant l'animal est automatisé et le positionnement se fait par conséquent une seule fois pour tous les animaux. L'exploration du volume tumoral est réalisée au moyen d'une séquence d'écho de spin pondérée en T_2 (TR/TE = 4000/33 ms, 10 coupes de 1 mm avec un champ de vue de 3x3 cm, matrice: 256x256°). La durée d'acquisition est de moins de 4 min. Ces images anatomiques révèlent l'œdème péri-tumoral et donc indirectement la présence de la masse cancéreuse. La taille de la tumeur est évaluée pendant l'acquisition des images du rat suivant. Les deux premières dimensions de la tumeur sont mesurées sur la coupe coronale présentant la section maximum de la tumeur. La 3^{ème} dimension tumorale est estimée par comptage du nombre de coupes présentant une tumeur. Cette méthode, bien qu'approximative, présente l'avantage de pouvoir être réalisée en parallèles des acquisitions et donc de randomiser les animaux (entre 50 à 100 par temps de faisceau) pour les irradiations réalisées moins de 24h après l'IRM.

III - Irradiation synchrotron MRT et en champ plein

A - MRT

A - I - Choix des paramètres d'irradiation par MRT

Les meilleures survies rapportées dans la littérature après une irradiation MRT ont été obtenues en configuration d'irradiation croisée au niveau de la tumeur [Bouchet A *et al.* 2010; Laissue J. A. *et al.* 1998]. Dans le cas de notre étude où l'approche est fondamentale et non préclinique, il était important de choisir une configuration d'irradiation simple, au détriment de la survie. L'irradiation unidirectionnelle latérale présente l'avantage de se reproduire à l'identique dans chaque hémiphère (Figure 37).

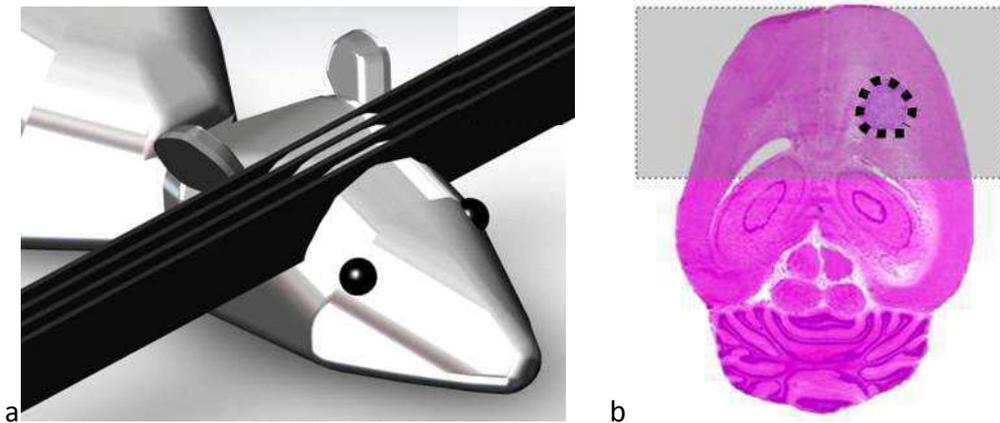


Figure 37 : Configuration d'irradiation unidirectionnelle permettant une irradiation similaire dans les tissus sains et tumoraux. a - Représentation schématique du champ d'irradiation pour une irradiation unidirectionnelle antéropostérieure des deux hémisphères. L'ensemble des 40 microfaisceaux est symbolisé par les 4 faisceaux noirs. b - Représentation de la zone irradiée (en gris clair) sur une coupe histologique axiale. La zone tumorale est délimitée par les pointillés noirs.

Cette irradiation sub-optimale est appliquée, 10 jours après l'inoculation des cellules 9L, sur la ligne de lumière biomédicale ID17 de l'ESRF, par un champ de 8 x 10 mm composé de 40 microfaisceaux de 50 μm de large, espacés c-t-c[‡] de 200 μm et déposant sur leur passage 400 Gy au positionnement tumoral théorique. De précédents travaux ont guidé le choix de l'espacement entre les microfaisceaux [Regnard P. *et al.* 2008] et de la largeur des microfaisceaux [Serduc R *et al.* 2009a] qui ont présenté le meilleur compromis entre radiotolérance des tissus sains et contrôle tumoral, et qui permettent de plus un ajustement aisé du collimateur.

A - II - Protocole d'irradiation par radiothérapie par microfaisceaux

La MRT est une technique d'irradiation liée aux caractéristiques du rayonnement synchrotron comme nous l'avons expliqué III-C - . Les photons produits en sortie du wiggler sont filtrés pour obtenir un spectre compris entre 50 et 350 keV. Le débit de dose est d'environ 17 000 $\text{Gy}\cdot\text{s}^{-1}$. Le faisceau est fractionné spatialement en ensemble de microfaisceaux parallèles grâce au collimateur multifente E-MSD [Bräuer-Krisch E *et al.* 2009a] positionné 33 mètres après la source de lumière et 80 cm en amont des animaux. Dix jours après implantation, les rats sont anesthésiés à l'extérieur de la cabine d'irradiation par un mélange à 2,5% d'isoflurane dans

[‡] Pour rappel l'abréviation c-t-c signifie center to center et correspond à l'espacement présent entre le centre de 2 microfaisceaux.

l'air, puis positionnés face à la source de rayons X sur un support en plexiglas fixé au goniomètre motorisé. Un dispositif d'anesthésie gazeuse est adapté au support plexiglas et permet de maintenir l'animal endormi pendant la durée de l'irradiation. L'animal est incliné d'un angle de 10° dans le sens antéropostérieur. La tête de l'animal est fixée à l'aide d'une barre à dent, le corps est maintenu par une bande de contention élastique. Le positionnement de l'animal (hauteur, positionnement latéral et perpendicularité par rapport au faisceau) est réalisé depuis la cabine de contrôle à l'aide de caméras.

Avant de commencer l'irradiation unidirectionnelle latérale des animaux, leur alignement avec le faisceau est vérifié à l'aide d'un film GafChromic (de type HD-810) qui a la caractéristique de bleuir de manière proportionnelle à la dose appliquée lors de l'irradiation. Le film est placé devant la tête de l'animal qui est enlevé avant l'irradiation puis repositionné à sa place initiale. La corrélation entre la zone colorée sur le film et la tête de l'animal est évaluée visuellement. Après cette vérification, le positionnement de l'installation est validé pour l'ensemble des rats à irradier.

A - III - Protocole de dosimétrie

Pour obtenir la dose absolue, la démarche expérimentale actuellement utilisée à l'ESRF, consiste à mesurer la dose absolue du faisceau non fractionné par une chambre d'ionisation de type PTW 31010 et à y appliquer les facteurs de corrections adéquats [Prezado Y *et al.* 2012a]. Le protocole de dosimétrie rapporté dans ce paragraphe a été développé pour les besoins de cette thèse par Yolanda Prezado et Elke Brauer à partir d'un travail déjà publié [Prezado Y *et al.* 2011].

La dosimétrie absolue a été réalisée avec une chambre d'ionisation Semiflex (PTW 31010) à 2 cm de profondeur dans un fantôme homogène RW3 (30 x 30 x 12 cm³) avec un champ d'irradiation de 2 x 2 cm² (que nous appellerons champ d'irradiation de référence par la suite).

Dans le cas de notre travail, le champ d'irradiation est de 0.8 x 1 cm². La dose déposée dans ce champ est issue de la dose mesurée dans les conditions de référence citées plus haut en appliquant le facteur de rayonnement diffusé correspondant [Prezado Y *et al.* 2012a]. Les simulations Monte Carlo (PENELOPE 2008 [Salvat F *et al.* 2008]) sont utilisées pour passer de la

dose absorbée par l'eau dans des conditions de référence ($D_{\text{référence}}$) au sein du fantôme RW3 à la dose équivalente dans la tête du rat ($D_{\text{BB, rat}}$) à 7 mm de profondeur latérale (i.e. position tumorale théorique). En suivant cette procédure l'expression suivante est obtenue:

$$D_{\text{BB, rat}} = D_{\text{référence}} \times 0.97$$

Pour évaluer la dose déposée dans des conditions de référence par un microfaisceau à partir de la dose de référence, le facteur de diffusé ou scatter factor (Sp) est utilisé [Prezado Y *et al.* 2012a] :

$$D_{\text{pic};2 \text{ cm}; 1 \text{ faisceau}} = D_{\text{référence}} \times Sp = D_{\text{référence}} \times 0.7$$

Pour un ensemble de microfaisceaux, la dose pic au centre de cette ensemble est donnée par :

$$D_{\text{pic};2 \text{ cm}} = D_{\text{pic};2 \text{ cm}; 1 \text{ faisceau}} \times f_{\text{array}}$$

Le facteur f_{array} prend en compte la contribution des zones de transition entre pic et vallée lorsque plusieurs pics sont utilisés.

La dose pic absolue à 7mm de profondeur latérale (centre théorique de la tumeur) dans le fantôme tête de rat ($D_{\text{pic},0.7 \text{ cm},\text{rat}}$) est obtenu à partir de la dose pic à 2 cm de profondeur dans le fantôme « solid water » ($D_{\text{pic};2 \text{ cm}}$) grâce a un factor de calibration pré-calculé (MC) ($f_{\text{swater},\text{rat}}$), comme exprimé ci dessous:

$$D_{\text{pic}, 0.7 \text{ cm}, \text{rat}} = D_{\text{pic};2 \text{ cm}} \times f_{\text{swater},\text{rat}}$$

La dose dans le pic central d'un ensemble de pics couvrant une surface de $0.8 \times 1 \text{ cm}^2$ à 7 mm de profondeur dans la tête du rat peut finalement être exprimée comme :

$$D_{\text{pic}, 0.7 \text{ cm}, \text{rat}} = D_{\text{référence}} \times 0.87$$

Le PVDR (obtenu en utilisant des simulations Monte Carlo) à 7 mm de profondeur dans le fantôme de rat pour cette configuration est de 23,1.

Dans nos conditions d'irradiation soit un champ d'irradiation ($8 \times 10 \text{ mm}$), composé de 40 microfaisceaux (μf) de $50 \mu\text{m}$ de largeur et espacés de $200 \mu\text{m}$, la dose déposée dans le passage des μf (dose pic) est de 400 Gy. La dose que reçoit le tissu entre les μf (dose vallée) calculée par simulations Monte Carlo est de 17,3 Gy.

B - Irradiation synchrotron en champ plein

B - I - Choix des caractéristiques d'irradiation en champ plein

Pour comparer la MRT avec une irradiation synchrotron non fractionnée, le problème du choix de la dose se pose. En effet une irradiation MRT peut être caractérisée par 3 doses : la dose pic, la dose vallée et la dose totale reçue par les tissus (dose intégrée). Dans nos conditions elles correspondent respectivement à 400 Gy, 17,3 Gy (comme défini § III - A - III -) et à ~120 Gy (calculs réalisés en interne par Elke Bräuer-Krish à partir de données expérimentales). L'utilisation d'une dose de 400 ou 120 Gy pour une irradiation en champ plein est exclue puisqu'elle dépasse la dose maximale tolérée par les tissus cérébraux (dose maximale de 60 Gy dans le cas d'irradiation focalisée de l'encéphale, 45 Gy dans le cas d'irradiation complète de l'encéphale) [Haberer S *et al.* 2010]. La dose choisie pour les irradiations plein champ (=BB, *Broad Beam* pour faisceau large) sera donc l'équivalent de la dose vallée appliquée à l'ensemble de la fenêtre d'irradiation (Figure 38).

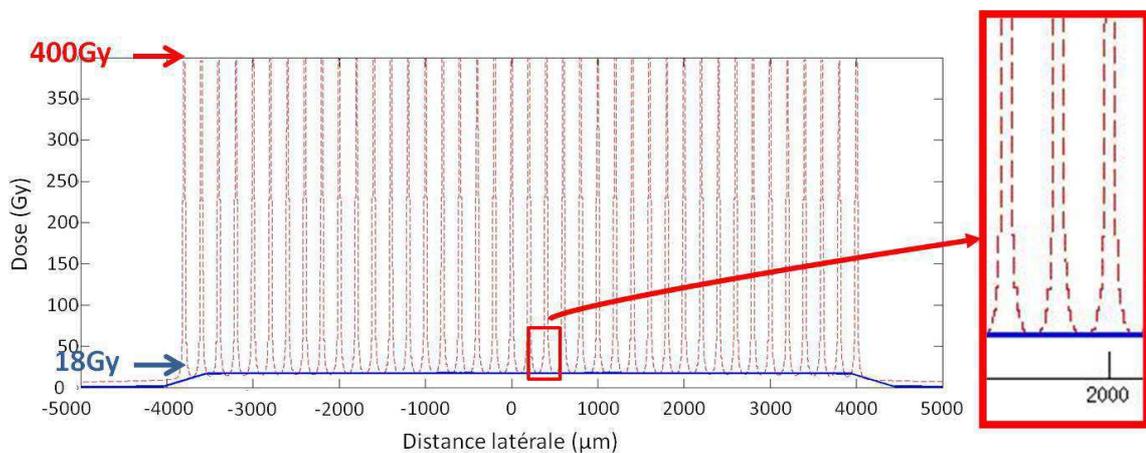


Figure 38 : Représentation graphique des profils de distribution de dose au niveau de la tumeur pour une irradiation MRT (ligne rouge) et pour une irradiation en champ plein (ligne bleue) avec une dose correspondant à la dose vallée déposée en MRT.

B - II - Protocole d'irradiation par champ plein

L'installation des animaux et leur positionnement par rapport au faisceau sont strictement identiques à ce qui est décrit pour l'irradiation MRT (§III - A - II -). L'irradiation BB est réalisée en

ôtant le collimateur MSC. La vitesse du goniomètre est adaptée pour que le temps d'exposition de l'animal devant le faisceau permette un dépôt de dose équivalent à la dose vallée. En pratique, des doses de 18,6 et 17,4 Gy ont été déposées lors des 2 sessions d'irradiation en champ plein réalisées lors de cette thèse.

C - Vérification des configurations d'irradiation

Le maintien de l'alignement des microfaisceaux (MRT) et du positionnement des animaux (MRT et BB) sont régulièrement vérifiés à l'aide de films GafChromic HD-810. Pour les animaux sacrifiés 6 ou 48h après l'irradiation, un immunomarquage des cassures doubles (antigène pH2AX) est réalisé pour vérifier la bonne irradiation des tissus (protocole détaillé ci-après, §VI-B - II - p104). Des configurations optimales donnent le type de films et de marquages illustrés ci après (Figure 39).

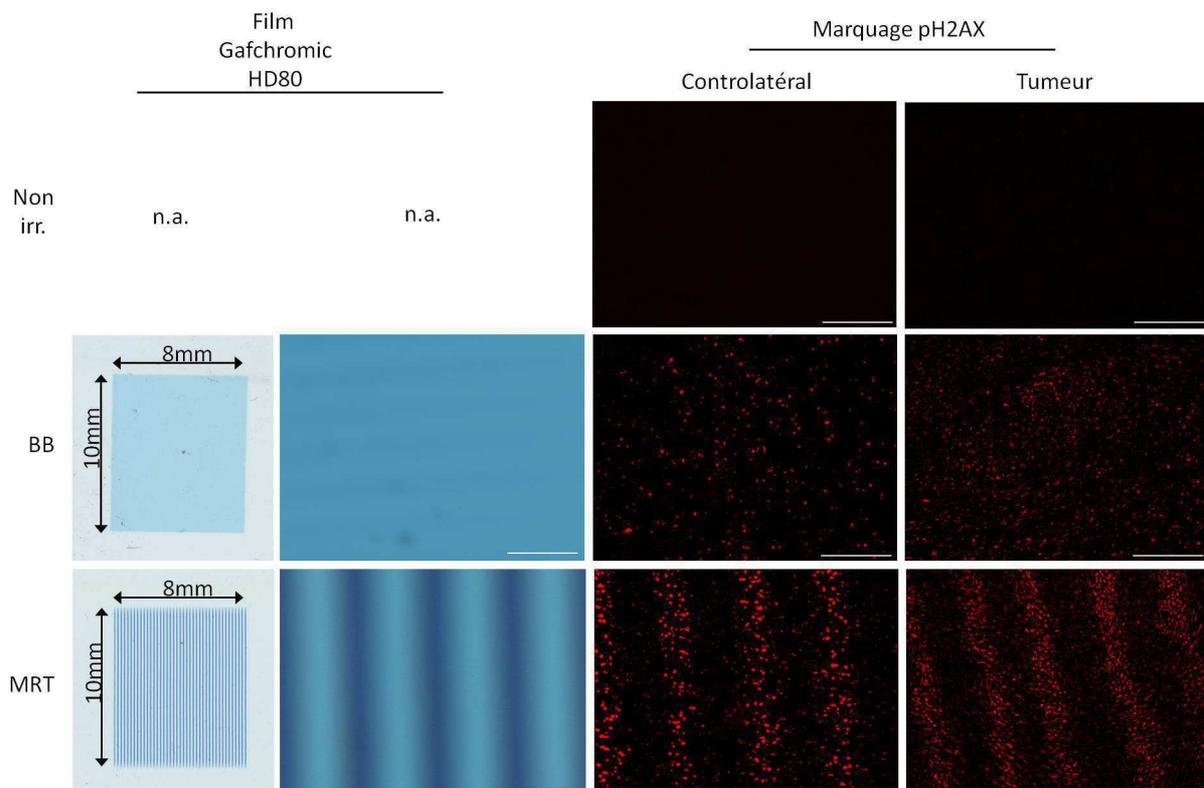


Figure 39 : a - Visualisation du champ d'irradiation sur film GafChromic HD-810 placé devant la tête des animaux irradiés. b - Visualisation des cassures doubles brins de l'ADN par marquage de l'histone phosphorylée pH2AX (rouge) sur de tissus cérébraux sains prélevé 6h après l'irradiation. Barre d'échelle : 200µm.

IV - Survie et préparation des échantillons

A - Survie et sacrifice des animaux

Les animaux du protocole de survie reintègrent l'animalerie de l'ESRF où ils sont suivis. Une journée de survie est rajoutée pour les animaux euthanasiés lorsque le point limite défini à l'ESRF pour ces expériences (amaigrissement, perte d'appétit, suivi du poids...) est atteint. Les courbes de survie de type Kaplan-Meier de chaque groupe de traitement [Kaplan EL *et al.* 1958] et les statistiques associées sont réalisées via le logiciel Prism GraphPad 4®. L'efficacité du traitement est également évaluée par la médiane de survie (MST pour *Median Survival Time*) et l'augmentation de la durée de vie (ILS pour *Increase of Life Span*) calculé par la formule suivante :

$$ILS = \left[\frac{MST_{\text{contrôle}} - MST_{\text{traité}}}{MST_{\text{contrôle}}} \right] \times 100$$

Le sacrifice des animaux ayant atteint le point limite ou rentrant dans le protocole d'analyse transcriptomique et histologique est réalisé par injection intracardiaque de 0,1mL de Doléthal®, après induction anesthésique avec 5% d'isoflurane. Le cerveau est prélevé en quelques minutes (<5 min), immédiatement plongé dans de l'isopentane liquide à -50°C et stocké à -80°C.

B - Préparation des échantillons pour analyses transcriptomiques et histologiques

Les cerveaux dont sont issus les échantillons sont maintenus à -80°C pour leur conservation. Puis les cerveaux sont coupés sur un cryotome (Microm HM 560) dont la température de l'enceinte de coupe est stabilisée à environ -20°C. L'appareil comporte une lame de rasoir inclinée à 10°, un porte-objet où est fixé un bloc permettant de déplacer l'échantillon horizontalement et verticalement. Les cerveaux sont fixés au portoir à l'aide d'une colle Neg-50 (Richard Alla Scientific) qui se solidifie à froid.

Les premiers millimètres du tissu cérébral sont éliminés jusqu'à atteindre la tumeur. Les coupes sont ensuite récupérées de manière alternée pour les analyses histologiques ou transcriptomiques. Pour l'histologie, des coupes de 18 µm sont réalisées, déposées sur des

lames Superfrost pré-encollées, puis stockées à -80°C. Pour les échantillons dédiés aux analyses transcriptomiques, des coupes 20 à 25 coupes de 60µm sont réalisées, déposées sur un support maintenu à -20°C. Sur chaque coupe les tissus tumoraux sont prélevés à l'aide d'un micro-punch de 3 mm de diamètre (Z708712-1EA, Harris Sigma-Aldrich) ou par découpe directe à la lame de rasoir quand la taille de la tumeur le permet (Figure 40).

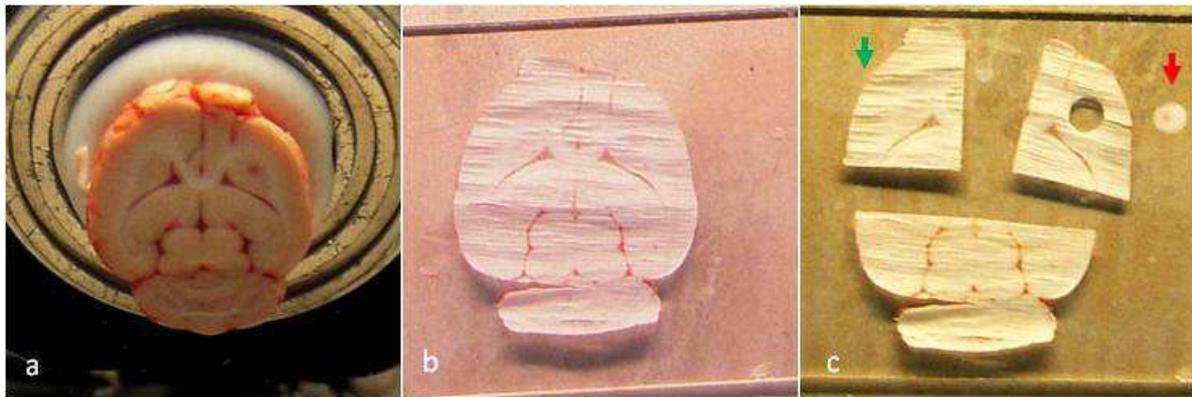


Figure 40 : Méthode de récupération des tissus tumoraux et cérébraux controlatéraux utilisés pour étude transcriptomique de ce travail. a – Cerveau congelé, fixé sur un support mobile de cryotome dont l'enceinte est maintenue à -20°C. b – Coupe axiale congelée de 60µm déposée sur support de verre pré-refroidi à -20°C. c - Délimitation sur coupe des tissus controlatéraux (flèche verte) et tumoraux (flèche rouge).

La partie potentiellement irradiée des tissus controlatéraux est isolée à l'aide d'une lame de rasoir (Figure 40). Les tissus sont ensuite récupérés dans un Eppendorf RNase free, complétés avec 200µl de tampon de lyse issu du kit *mirVana*[™] RNA Isolation (Ambion[®]) pour les tumeurs et 500µl pour les tissus controlatéraux, puis stockés à -80°C en attendant l'extraction de l'ARN.

V - Analyses transcriptomiques

A - Émergence des techniques de hauts débits pour l'étude du transcriptome et choix de puces Affymetrix

En 1975 Edwin Southern montre qu'une molécule d'ADN simple brin peut servir de sonde pour détecter une autre molécule d'ADN simple brin par complémentarité de base. Ceci sera la base d'une des premières techniques de biologie moléculaire : le Southern blot [Southern EM 1975]. Deux ans plus tard, le northern blot est créé en se basant sur une hybridation ADN/ARNm et

permet les premières études de transcriptomiques [Alwine J C *et al.* 1977]. Dès le début des années 1980, l'utilisation des ADNc est proposé pour mettre en évidence et étudier l'expression de gène [Putney SD *et al.* 1983]. En 1995, la première étude d'expression de gènes est publié en utilisant la technologie de microarray [Schena Mark *et al.* 1995]. Ces premières puces permettent de comparer le niveau d'expression de 45 gènes de la plante *Arabidopsis thaliana*. Un an plus tard, l'expression de plusieurs milliers de gènes peut être détectée simultanément grâce au développement de la technique de puce à oligonucléotides par la société Affymetrix [Lockhart David J. *et al.* 1996]. Le nombre de publication utilisant la technologie du microarray a connu une croissance exponentielle la décennie suivante, pour atteindre au moins 6000 publications par an depuis 2009 (Figure 41).

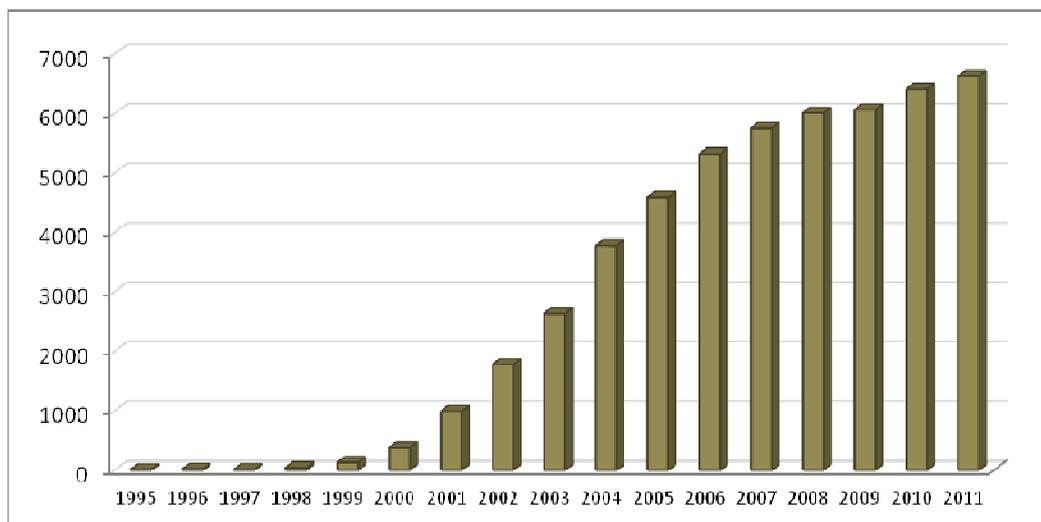


Figure 41 : Nombre de publications annuelles en rapport avec les puces à ADN. (Mots clefs : microarray, DNA chip, expression array, gene chip ou gene array).

Parmi l'ensemble des puces existantes, notre choix pour cette thèse s'est porté sur les puces d'expression GeneChip® Rat Genome 230 2.0 Arrays développées par Affymetrix® qui sont spécifiques des séquences de gènes de rat. Elles permettent d'obtenir simultanément l'expression de 31 100 séquences d'oligonucléotides ou *probe sets* correspondant à 28 000 gènes. Ces puces sont compatibles avec la station (GeneChip® Fluidics Station 450) disponible localement sur la plateforme microarray Affymetrix de l'équipe 7 du GIN.

Caractéristiques des puces GeneChip® Rat Genome 230 2.0

Les séquences d'oligonucléotides de 25 bases sont synthétisées *in situ* sur la puce par photolithographie (brevet de la société Affymetrix® 66). Un support solide est recouvert de

molécules de liaison portant à leur extrémité un groupement protecteur photolabile. La lumière est appliquée au travers d'un masque comportant des « ouvertures » laissant passer la lumière de manière localisée jusqu'aux nucléotides sélectionnés pour être démasqués (Figure 42).

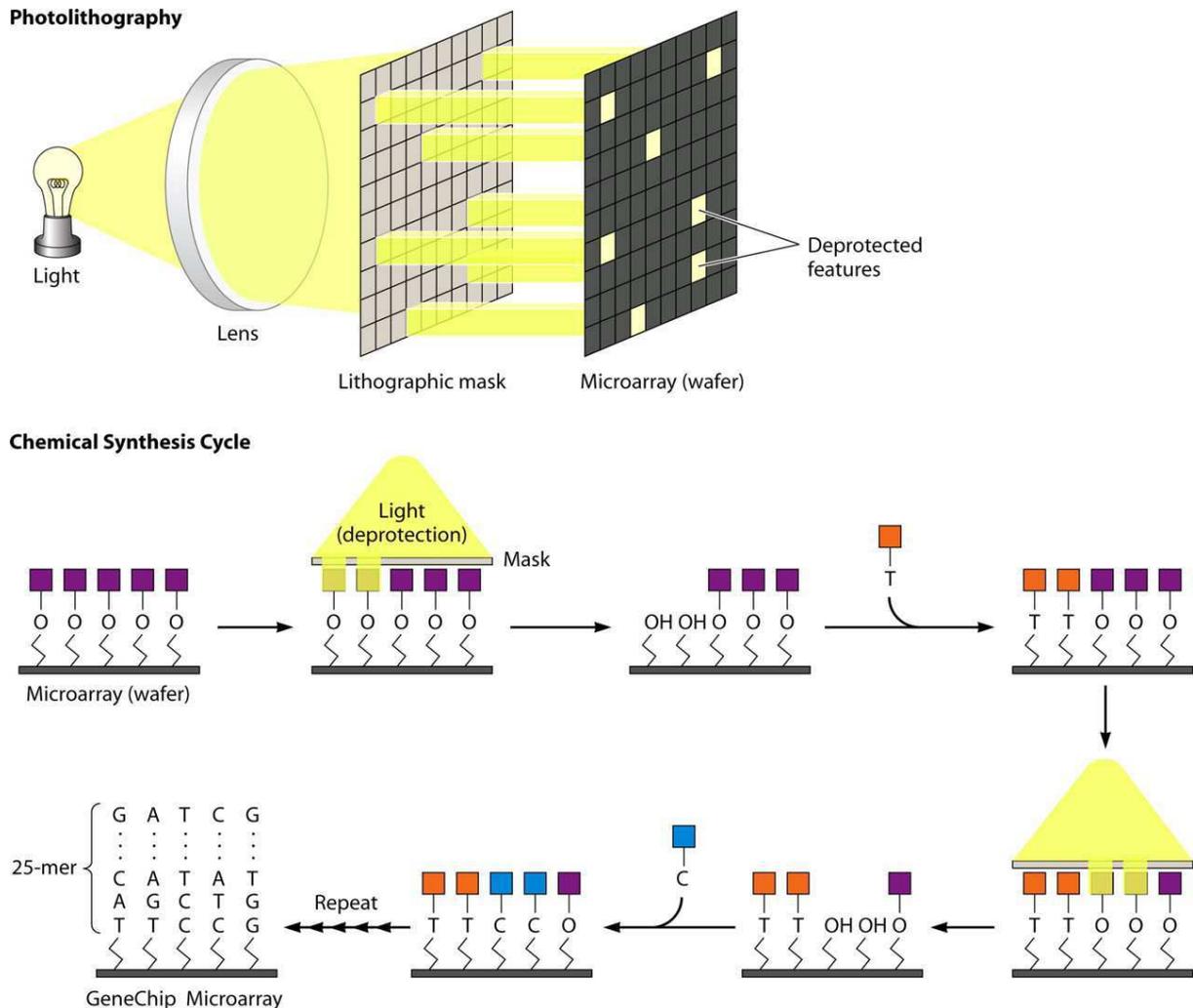


Figure 42 : Principe de fabrication des puces à oligonucléotides d’Affymetrix par photolithosynthèse. Extrait de [Miller MB et al. 2009]). La lumière UV est appliquée au travers d’un masque qui agit comme un filtre bloquant ou laissant passer la lumière jusqu’à la surface protégée de la puce. La lumière UV enlève le groupement chimique de protection de l’extrémité de l’oligonucléotide en formation, permettant l’ajout d’un nouveau nucléotide protégé. Les applications successives de masques spécifiques déterminent l’ordre de synthèse de la séquence des oligonucléotides à partir de la surface de la puce.

Sur chaque extrémité ainsi déprotégée peut se fixer un nouvel oligonucléotide protégé. Le procédé est répété, activant différentes combinaison de sites et couplant différentes bases jusqu’à la synthèse d’oligonucléotides de 25 bases (Lipshutz et al. 1999 [Lipshutz RJ et al. 1999]).

Onze types de paires d'oligonucléotides sont utilisés pour mesurer le niveau d'expression de chaque transcrit. Dans ces paires, on distingue 2 types de sondes : les sondes « *Perfect match* » (PM) et les sondes « *Mismatch* » (MM) (Figure 43).

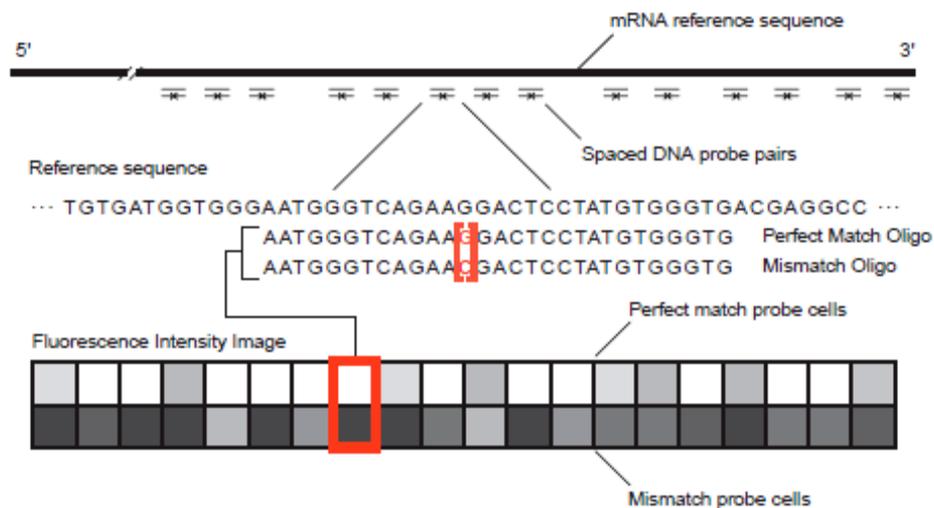


Figure 43: Exemple de sonde « *Perfect Match* » et « *Mismatch* » (PM et MM) utilisée pour la détection de l'expression d'un transcrit, d'après [Lipshutz RJ et al. 1999].

Les sondes PM correspondent à une séquence de référence s'hybridant avec la séquence cible du transcrit à quantifier. Les sondes MM diffèrent par une seule base située au milieu de la séquence nucléotidique (Figure 43). Lorsque l'échantillon à quantifier est hybridé sur la puce, la comparaison d'intensité entre les sondes PM et MM permet d'éliminer le bruit de fond correspondant à l'hybridation non spécifique de chaque transcrit.

B - Extraction et évaluation de la qualité des ARN totaux

B - I - Protocole d'extraction

Les ARN totaux sont extraits par le *mirVana™* RNA Isolation Kit (Ambion®, Applied Biosystems, Foster City, CA) à partir des prélèvements réalisés précédemment. Schématiquement, les coupes de tissus sont lysées par vortex dans du tampon de lyse dénaturant (Lysing/Binding Buffer). Une fois l'intégralité des tissus lysés, une solution de miRNA Homogenate Additive est ajoutée à hauteur de 10% du volume total. Une extraction organique est ensuite réalisée en ajoutant l'équivalent du volume total en acide phénol-chloroforme, puis le mélange est centrifugé 20 min

à 10 000g. Les ARN totaux sont retrouvés dans la phase aqueuse, les protéines dans la phase organique et l'ADN à l'interphase. Après récupération, le volume de la phase aqueuse est évalué (V₀). Un volume de 1,25 x V₀ d'éthanol absolu est ajouté à cette phase. Le mélange est déposé sur les colonnes de silice du kit pour la purification des ARN totaux. Les ARN sont retenus sur la colonne alors que le reste du mélange est éliminé par rinçages successifs avec les solutions 1, 2 et 3 du kit. Les ARN sont enfin élués par 100 µL de la solution d'éluion.

B - II - Évaluation de la pureté et de la quantité des ARN extraits

Vérification de la pureté des ARN :

La pureté de l'ARN extrait (absence de contamination par des protéines ou par des sels) est évaluée par mesure de la densité optique. Les acides nucléiques, les protéines (acides aminés aromatiques) et les molécules organiques (tampons, etc...) absorbant respectivement à 260 nm, 280 nm et 230 nm, seuls sont conservés les échantillons présentant un rapport DO (260/280) supérieur à 1,7 et un rapport DO (260/230) supérieur à 1,4. En effet, la présence excessive de contaminant pourrait biaiser l'amplification des ARN extraits réalisée par la suite. Une 1^{ère} détermination de la concentration des échantillons d'ARN peut être déterminée par la DO à 260 nm.

Vérification de la qualité des ARNs:

L'intégrité et la concentration des ARN extraits sont contrôlées par une migration électrophorétique miniaturisée (ou électrophorèse en capillaire) réalisée sur puce de type RNA Nano 6000 Lab Chip® par un bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA).

Cette technologie dite de « lab-on-a-chip » permet de détecter une éventuelle dégradation des ARN et de déterminer leur concentration à partir de seulement 1µl d'échantillon. Chaque puce est composée de 16 puits dont 12 permettent le dépôt de 12 échantillons à analyser, 3 pour le remplissage du réseau de capillaire qui parcourt la puce et 1 pour le dépôt des marqueurs de poids. La préparation de la puce et des échantillons est réalisée à partir des réactifs du kit RNA Nano 6000 reagents. La 1^{ère} étape consiste en la préparation de la puce en elle-même. Un mélange de 65µl de gel matrice filtré et de 1µl de marqueur fluorescent (intercalant des acides nucléiques) est réalisé, puis 9µl de ce mélange est déposé dans un puits de

remplissage. Le gel est ensuite poussé par une pompe d'amorçage à l'intérieur de réseau de capillaires qui relie les puits (Figure 44).

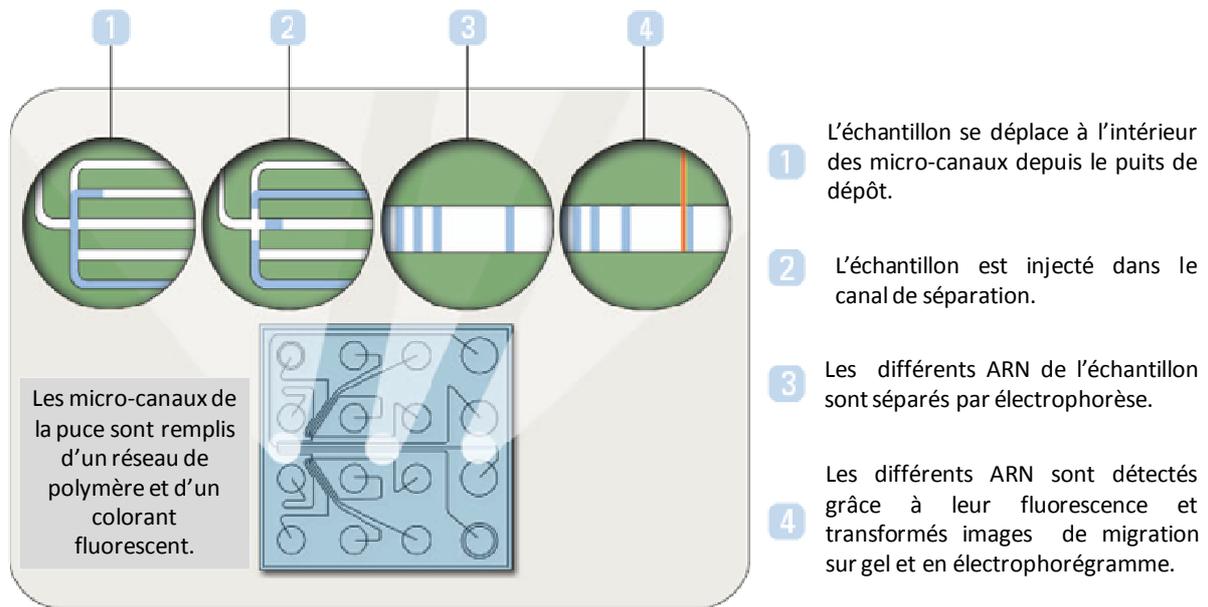


Figure 44 : Schéma représentant le réseau de capillaire (ou micro-canaux) parcourant la puce (carré bleu). Les vignettes 1 à 4 sont des zooms de différentes zones du réseau de capillaire dont les fonctions sont décrites ci-dessus. Adapté de <http://www.gene-quantification.de/rna-integrity.html>.

Parallèlement à la préparation de cette puce, 1 μ L de chaque échantillon et de marqueur de poids moléculaire (RNA 6000 ladder) est dénaturé pendant 2 min à 70°C. La concentration des ARN déterminée précédemment par spectrophotométrie permet de diluer les échantillons (dans du tampon Tris-HCl 0,1 M) de façon à obtenir une concentration comprise entre 25-500 ng/ μ L. Le marqueur de taille dénaturé et chaque échantillon sont respectivement déposés dans le puits « marqueur » et un des 12 puits « échantillons », préalablement remplis par 5 μ L d'un tampon (Nano Marker). La puce remplie est agitée pendant 1 min afin d'homogénéiser le tampon et les échantillons, puis lue par le bioanalyseur dans les 5 min suivantes pour éviter l'évaporation des échantillons. Sous l'influence d'un champ électrique, les brins d'ARN migrent au sein du réseau de polymère (Figure 44 (1 et 2)) et sont séparés en fonction de leur taille (Figure 44 (3)). Lors du passage des ARN dans le gel, le marqueur fluorescent s'intercale entre leurs bases. Lorsque les ARN marqués atteignent l'extrémité du capillaire de séparation, le bioanalyseur mesure, en temps réel, l'intensité de la fluorescence émise en fonction du temps de rétention de l'échantillon au sein du capillaire de séparation. Les temps de rétention (données qualitatives) et les intensités de fluorescence (données quantitatives) sont représentés en fonction de la

calibration réalisée grâce au marqueur de poids moléculaire. Les résultats obtenus sont visualisés sous la forme d'un gel de migration (Figure 45a) et sous forme d'un profil d'intensité de fluorescence en fonction de la taille de l'ARN (Figure 45b).

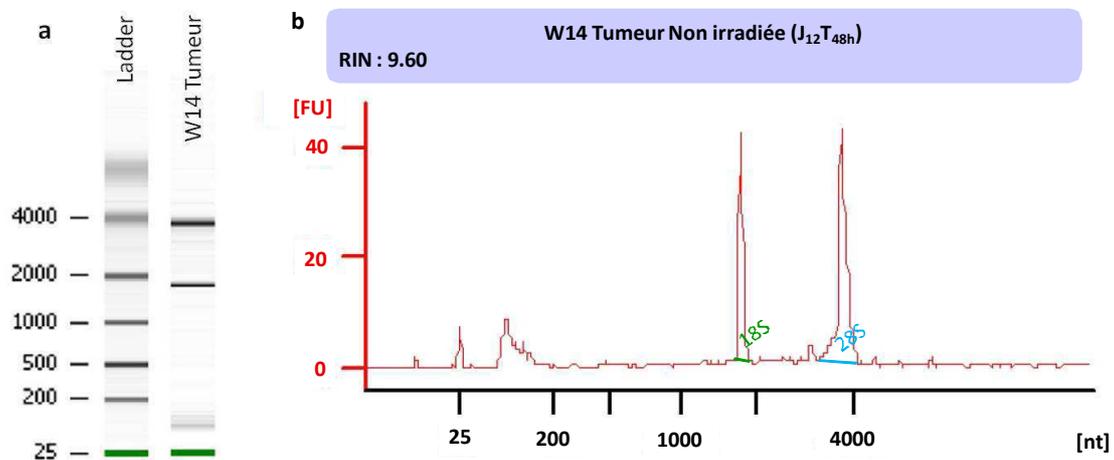


Figure 45 : Analyse des ARN par une migration électrophorétique en micro-capillaires sur puce de type RNA Nano Lab Chip® par un bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). a - Résultats représentés sous la forme conventionnelle de migration électrophorétique sur gel. b - Résultats représentés sous forme de profil d'intensité de fluorescence en fonction de la taille de l'ARN.

Le ratio de l'aire des pics correspondant aux ARN ribosomiaux 28S et 18S est proche de 2 lorsque l'intégrité de l'ARN est parfaite. Le logiciel 2100 Expert, couplé au bioanalyseur, réalise le calcul automatique d'un coefficient d'intégrité des ARN ou RNA *Integrity Number* (RIN). Ce calcul prend en compte l'ensemble du profil et pas uniquement le ratio des pics ribosomiaux 18 et 28S, ce qui le rend plus précis [Schroeder A *et al.* 2006]. Sa valeur, comprise entre 1 et 10, est proportionnelle à la qualité des ARN. Les ARN présentant un RIN inférieur à 7,5 ne répondent pas au standard de qualité et sont exclus de la suite de l'analyse.

C - Préparation et hybridation des échantillons

C - I - Amplification et marquage des ARN pour l'analyse par microarray

La préparation des échantillons à analyser se fait grâce aux réactifs du kit *GeneChip® 3' IVT Express Kit Labeling Assay* d'Affymetrix et selon la procédure recommandée par le fournisseur disponible à l'adresse : <http://www.affymetrix.com> et illustrée Figure 46.

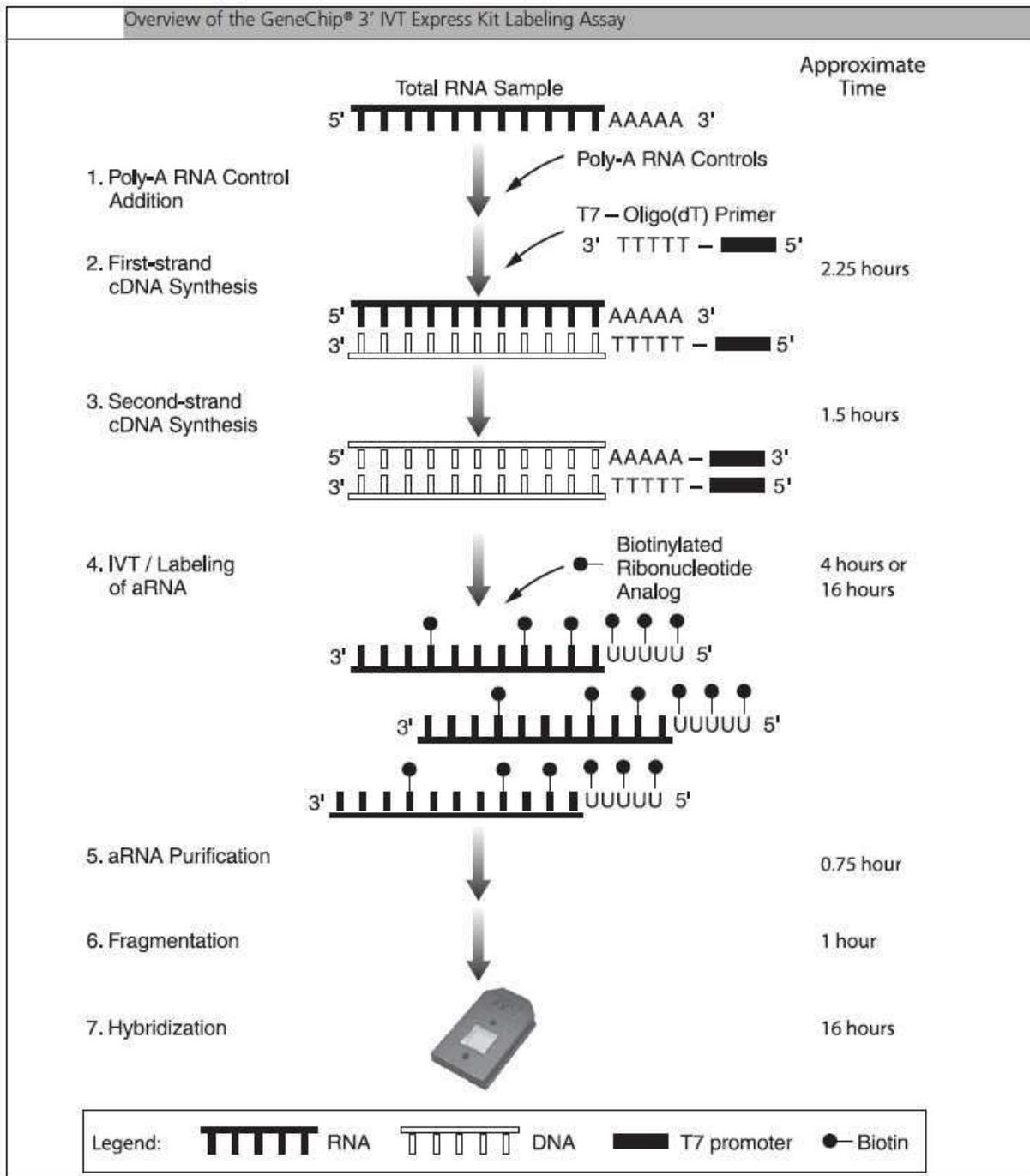


Figure 46 : Amplification et marquage des échantillons par la procédure associée au kit GeneChip® 3' IVT Express Kit Labeling Assay. Extrait de <http://www.affymetrix.com>.

Les étapes suivantes sont appliquées à 250 ng d'ARN de chaque échantillon :

- *Rétrotranscription pour synthétiser le premier brin d'ADN complémentaire (ADNc) :*

La rétrotranscription est initiée par des amorces oligo(dT)-promoteur T7 synthétisant des ADNc comportant la séquence promotrice de la T7 RNA polymérase. Expérimentalement, l'échantillon à analyser est dilué dans de l'eau afin d'obtenir 250 ng d'ARN dans 3 µl, auxquels sont ajoutés

2 µl de poly-A control dilué au 1/20 000, 4 µl de first strand buffer mix (contenant des dNTP et des amorces oligo(dT) T7) et 1 µl de first strand enzyme mix. Le mélange est incubé 2 h à 42°C dans un thermocycler.

- Synthèse des seconds brins d'ADNc :

Le couple ARN-ADNc précédemment synthétisé est converti en ADN double brin nécessaire pour la transcription à venir. La réaction emploie la RNase H qui dégrade lentement l'ARN et l'ADN polymérase qui simultanément synthétise l'ADN complémentaire du brin en utilisant l'ADNc laissé libre comme matrice et l'ARN résiduel comme primers. Une ligase permet de lier les séquences d'ADN néo-synthétisées entre elles. On obtient finalement un ADN double brin comportant le promoteur de la T7 RNA polymérase. Expérimentalement, le mélange précédent est additionné de 13 µl d'eau sans RNase, 5 µl de second strand buffer mix et 2 µl de second strand enzyme mix, puis incubé 1 h à 16°C et 10 min à 65°C dans un thermocycler.

- Amplification et biotinylation :

Des ARN biotinylés sont générés en copies multiples (amplification d'environ 100 fois) par la T7 RNA polymérase à partir de la matrice d'ADN complémentaire double brin. Lors de l'amplification, des bases biotinylées sont incorporées aux ARN. Expérimentalement, 20 µl d'IVT labeling Buffer, 4 µl d'IVT biotin label et 6 µl d'IVT enzyme mix sont ajoutés au mélange précédent. Le mélange est incubé 16 h à 40°C dans un thermocycler.

- Purification des ARNs biotinylés :

Les ARN amplifiés sont purifiés par le kit Affymetrix *GeneChip® 3' IVT Express* utilisant des billes magnétiques. Lors de cette étape les ARN sont retenues sur les billes alors que des rinçages successifs permettent d'éliminer les dNTP non incorporés pendant les précédentes réactions, ainsi que les sels, les enzymes et les phosphates inorganiques contenu dans les précédents mix qui ont été ajoutés. Expérimentalement, à chaque échantillon est ajouté 10 µl de RNA Binding Beads, 50 µl de aRNA Binding buffer concentré et 120 µl d'éthanol absolu. Le tout est délicatement mélangé par balancement manuel pendant au moins 2 min. Pendant cette étape les ARN marqués vont se lier aux billes aimantées. Les tubes contenant le mélange sont placés sur un portoir aimanté. Les billes se concentrent en culot contre l'aimant et le surnageant est éliminé. Les billes sont rincées par 2 lavages successifs avec 100 µl d'aRNA wash solution. Les ARN ainsi purifiés sont élués par 100 µl de tampon aqueux préchauffé (aRNA solution elution).

Après agitation, les billes sont à nouveau capturées grâce au portoir aimanté et le surnageant contenant les ARN est récupéré.

Afin de vérifier que les ARN ont convenablement été amplifiés, 1 µl de chaque échantillon est analysé sur puce RNA Nano Lab Chip® selon le protocole décrit § V-B-II (Figure 47).

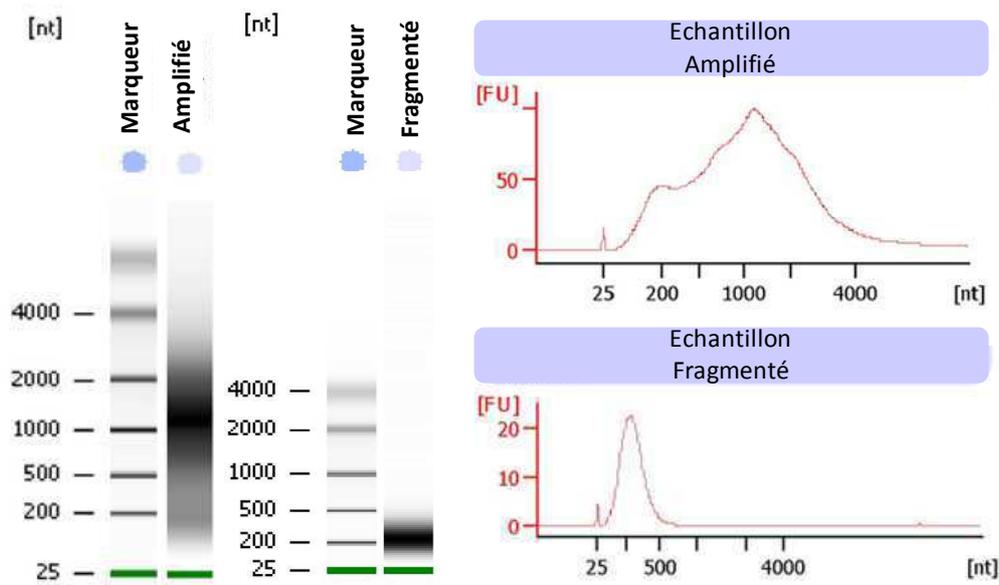


Figure 47 : Profils de migration des ARN correctement amplifiés (échantillon 5) et fragmentés (échantillon1).

- Fragmentation des ARNs biotinylés :

Cette étape vise à fragmenter les ARN cibles marqués pour leur hybridation sur les puces d'expression. Expérimentalement, les ARN précédemment élués sont dosés. Le volume contenant 15 µg d'ARN est additionné de 8 µl de fragmentation buffer 5X et complété à 40 µl d'eau, puis incubé 35 min à 94°C dans un thermocycleur. La fragmentation est vérifiée sur puce RNA Nano Lab Chip® selon le protocole décrit § V-B-II (Figure 47).

C - II - Hybridation sur puce

L'étape d'hybridation permet de mettre en contact et d'hybrider par complémentarité de bases, les oligonucléotides sondes présents sur la puce et les ARN cibles fragmentés et marqués à la biotine.

Expérimentalement, les ARN fragmentés sont ajoutés à 4,2 µl de control oligonucleotide B2, 12,5 µl d'hybridization control 20X, 125 µl d'hybridization mix 2X, 25 µl de DMSO et 50 µl d'eau pour former le cocktail d'hybridation. Celui-ci est chauffé pendant 5 min à 99°C puis centrifugé à 12 000g. Les puces GeneChip® Rat Genome 230 2.0 sont remplies avec 200 µl du cocktail d'hybridation, puis incubées 16 h à 45°C dans un four de type Affymetrix® GeneChip Hybridization Oven 640, permettant la rotation des puces à 60rpm. La suite de l'expérience est réalisée avec les réactifs du kit GeneChip Hybridization, Wash, and Stain Kit d'Affymetrix.

À la fin des 16 h d'incubation, le lavage et la coloration des puces par la streptavidine-phycoérythrine est réalisée automatiquement dans la station fluïdique (GeneChip® Fluidics Station 450 Affymetrix) avec les solutions du kit GeneChip Hybridization, Wash, and Stain Kit d'Affymetrix. Lors de ces étapes, la biotine des ARN hybridés va être mis en contact et fixer de la streptavidine couplée à de la phycoérythrine. La puce est ensuite scannée avec une longueur d'excitation de 488 nm, en utilisant un appareil de type Affymetrix GeneChip® Scanner 3000. La lumière émise à 570 nm est proportionnelle à la quantité d'ARN fixé au niveau de chaque groupe d'oligonucléotides (spot) sur la puce, le scanner enregistre donc pour chaque spot un signal proportionnel à la quantité d'ARN présent dans l'échantillon.

D - Traitement des données de transcriptomique

D - I - Traitement du signal

Au cours de cette thèse nous avons réalisé 2 types de normalisation des données en utilisant 2 des algorithmes parmi les plus utilisés : *Robust Multichip Analysis* (RMA) et *MAS5 Statistical algorithm*, implémentés dans le logiciel Affymetrix® expression console™.

RMA :

L'algorithme RMA consiste en 3 étapes successives : l'ajustement du bruit de fond, la normalisation des données et le calcul de l'expression des gènes. La première transformation des données corrige le bruit de fond causé par les hybridations non spécifiques et par l'autofluorescence de la surface de la puce [Irizarry Rafael A. *et al.* 2003]. Pour chaque puce, le bruit de fond estimé est soustrait des valeurs obtenues sur les sondes *Perfect Match*. La normalisation qui est ensuite réalisée sur l'ensemble des puces est effectuée par la méthode des

quantiles [Bolstad BM *et al.* 2003; Irizarry Rafael A. *et al.* 2003]. Elle vise à réduire les variabilités techniques accumulées au cours des différentes étapes de l'expérience pour rendre les données des puces comparables entre elles. Une valeur représentative de l'expression de chaque *probe set* est ensuite attribuée par calcul à partir des 11 valeurs des sondes PM et est exprimée en unité arbitraire.

MAS 5.0 :

L'algorithme MAS 5.0 [Liu WM *et al.* 2002] réalise également une normalisation des valeurs mais identifie en plus les *probe sets* en dehors ou à la limite de détection du système et les marque comme absents (A) ou marginaux (M). Les autres *probe sets* sont marqués comme présents (P). Cette estimation qualitative de la « présence » (P) ou « absence » (A) de chaque gène se base sur le nombre d'entités dans lesquels le signal PM est significativement plus haut que le signal MM sur l'ensemble d'un *probe set*. Les *probe sets* annotés comme « présent » ont un signal spécifique plus élevé que le signal non spécifique ou bruit de fond. Les *probe sets* « absents » peuvent parfois présenter des intensités élevées mais correspondent à des *probe sets* dont la différence d'intensité entre les sondes PM et MM n'est pas suffisante pour assurer que le signal soit spécifique de l'ARN présent dans l'échantillon.

Pour l'exploitation de nos données, l'ajustement du bruit de fond et la normalisation de l'intensité du signal des *probe sets* est réalisée par l'algorithme RMA. Les tests statistiques sont réalisés à partir de ces valeurs. Les informations de « présence » ou « absence » issu de MAS 5.0 sont ensuite utilisées pour sélectionner ou exclure les résultats du test statistique.

D - II - Traitements statistiques et sélections des données

Dans ce projet nous avons utilisés 2 tests statistiques à partir des valeurs normalisées par l'algorithme RMA : test Mann & Withney (M&W) et test *Significance Analysis for Microarrays* (SAM). Ces deux tests sont réalisées avec le logiciel TIGR *MultiExperiment Viewer* version 4.5.1 (TMeV, <http://www.tm4.org/mev/>).

Comparaison entre les tissus non irradiés et les tissus irradiés par MRT, 6h après l'irradiation

Les différences significatives entre les deux groupes de tumeurs (traitées ou non par MRT) et entre les deux groupes de tissus controlatéraux (traités ou non par MRT), 6h après MRT, sont obtenues grâce au test statistique SAM [Gross Tusher Virginia *et al.* 2001]. Un taux de faux positifs (FDR pour *False Discovery Rate*) inférieur à 5% est fixé pour générer la liste de gènes significativement modulés. Le choix de ce test et sa mise en œuvre est le fruit d'un travail de collaboration avec l'équipe « Techniques Avancées en Génomique et Clinique » (TAGC) de l'université de Luminy.

La significativité obtenue pour chaque *probe set* n'est retenue que dans les cas où au moins n-1 échantillons d'un des deux groupes comparés présente une valeur annotée « présente » par l'algorithme MAS5. Les *probes sets* présentant des valeurs annotées « absentes » ou « marginales » par l'algorithme MAS5 sur plus de n-1 échantillons dans les deux groupes comparés en statistique sont ainsi exclus de la suite de l'analyse.

Sélection des gènes d'intérêt

L'analyse permettant la sélection de gènes d'intérêt présentée § III-A - p141 de cette thèse est réalisé à partir d'un test SAM avec un FDR de 5% et de 10% et à partir de test M&W avec une *p-value* fixée à 0,05. Parmi les gènes répondant significativement dans le tissu tumoral avec chacun des 2 tests, nous avons successivement sélectionné les *probe sets* dont :

- au moins n-1 échantillons des tumeurs non traitées ou des tumeurs traitées par MRT présente une valeur annotée « présente » (MAS 5.0),
- le facteur de variation d'expression entre les tumeurs irradiées par MRT ou non traitées est supérieur à 2,
- la totalité des échantillons controlatéraux sont annotés « absents » (MAS 5).

Notons que les résultats obtenus à l'issu des tests statistiques ou de la filtration sur les critères « présent » / « absent » dépendent du choix du seuil de significativité et du nombre d'échantillons A acceptés dans chaque groupe. Du point de vue biologique, ces seuils restent arbitraires.

Comparaison entre les tissus irradiés par MRT et les tissus irradiés par BB

Les différences significatives entre les groupes traités par MRT ou par BB, au sein de chaque tissu et pour chaque temps ($J_{10}T_{6h}$, $J_{12}T_{48h}$, $J_{18}T_8$ et $J_{25}T_{15}$), sont obtenues grâce au test SAM [Gross Tusher Virginia *et al.* 2001]. Un taux de faux positif (FDR pour *False Discovery Rate*) inférieur à 5% est fixé pour générer la liste de gènes significativement modulés à $J_{10}T_{6h}$, $J_{12}T_{48h}$, $J_{18}T_8$ et $J_{25}T_{15}$. Les données obtenues à $J_{10}T_{6h}$ ont également été testées avec différents FDR ($0\% < \text{FDR} < 30\%$).

Comme précédemment, la significativité obtenue pour chaque *probe set* n'est retenue que dans les cas où au moins n-1 échantillons d'un des deux groupes comparés présente une valeur annotée « présente » par l'algorithme MAS5. Les *probe sets* présentant des valeurs annotées « absentes » ou « marginales » par l'algorithme MAS5 sur plus de n-1 échantillons dans les deux groupes comparés en statistique sont exclus.

Cinétique

L'expression (moyenne \pm SEM) de chaque *probe set* est exprimée pour chaque temps en rapport de l'expression obtenue dans les tumeurs non irradiées à J_{10} . Les différences entre les 3 groupes de traitements (non traités, BB ou MRT) au sein de chaque tissu sont testés sous GraphPad par un test ANOVA (*ANalysis Of VAriance*).

D - III - Analyses fonctionnelles

L'identification des interactions entre les gènes présentant une modification significative de leur niveau d'expression après MRT a été réalisée sous le logiciel *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA) (www.ingenuity.com).

Ce logiciel permet de réaliser le regroupement des gènes qui lui est proposé en « fonctions moléculaires et cellulaires », « voies de signalisation » et « réseau d'interaction ». De manière très récente (juillet 2012), les régulateurs communs à un groupe de gène peuvent également être identifiés. Ces analyses se font en fonction d'une sélection de critères choisis par l'utilisateur permettant de sélectionner certaines bases de données. Les analyses de ce travail ont été effectuées avec les sélections suivantes :

- Cadre général : base de données Ingenuity (gènes seulement)

- Production de réseau : 35 molécules maximum par réseau
- Source de données : toutes
- Niveau de confiance : données observées expérimentalement uniquement
- Espèce : mammifère (Humain, souris et rat)
- Tissus et lignée cellulaire : tous tissus et cellules primaires, toutes lignées cellulaires.

Pour les voies de signalisation regroupant les gènes répondant à la MRT, différentes catégories ont été exclues car inappropriées pour notre analyse : voies de signalisation influencée par un pathogène, voies de signalisation spécifique de maladie (hors gliome et glioblastomes) et les voies de signalisation spécifiques de tissu (cardiovasculaire, cellules de Sertoli, mélanocytes, cellules des voies respiratoires, cellules gastriques et jonctions neuromusculaires).

E - Validation par PCR

Les variations d'expression observées sur puce après MRT, sont vérifiées par PCR sur 9 gènes (Cdc20, Ccnb1, Fam64a, Inhbe, Mars, Plk1, Pttg1, Traf4af1, Trib3). Ces 9 gènes sont choisis parmi les gènes répondant à la MRT dans le tissu tumoral et au sein de la liste de gènes d'intérêt identifiée § III-A - p141. Les séquences sens et anti-sens des amorces utilisées pour tester ces gènes sont sélectionnées grâce au site www.roche-applied-science.com et rapportées Tableau 10.

Symbole	Nom du gène	Séquence (5'-3')	Séquence (5'-3')
Arpc1a	actin related protein 2/3 complex, subunit 1A	gtttgctgtggggagtgg	ggatcggcttctaagtgtgc
Atp5b	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide	gggtacaatgcagga	tcagctggcacatag
Cdc20	Cell division cycle 20 homolog	gagtgctgtggatgtgcatt	gctcctatagtgaggagacc
Ccnb1	cyclin B1	tgtgaaagatatctatgcttacctcag	cccagtaggtatttggcttaactg
Fam64a	family with sequence similarity 64, member A	gaagctgtctcaaaagctgga	aaggagacggatcatgtcac
Inhbe	inhibin beta E	caggcagcactgaccaga	gcgtaggtgaagtggatt
Mars	mehionine-tRNA synthetase	atacgttcggtcgcaaac	gcaacctctggaagatgtcc
Plk1	polo-like kinase 1	ttgaggacagcgactttgtg	gcccctcctcctttgt
Pttg1	pituitary tumor-transforming 1	ttctccccttcgatcctct	aggggagaagtgagatctggt
Traf4af1	TRAF4 associated factor 1	cggaggaacatcagaagcag	gctcgttttatccttcagatcc
Trib3	tribbles homolog 3b	tcaagttgcgtcgattgtc	ccagtcacacaggcatc

Tableau 10 : Séquences sens et anti-sens des amorces utilisés lors des RT-PCR quantitatives.

Rétro-transcription des ARN

Un à 2 µg d'ARN totaux sont rétro-transcrits en ADN complémentaires en utilisant des primers dN6 (6-mers aléatoires). Expérimentalement, un mélange réactionnel est réalisé avec 12 µl de Mix RT dN6, 0,5 µl d'enzyme reverse transcriptase, x µl d'échantillon contenant 1 à 2 µg d'ARN total et complété avec de l'eau pour atteindre un volume final de 20 µl. Le mélange est incubé dans un thermocycleur pendant 2h à 45°C pour la rétrotranscription en ADNc, puis l'inactivation de l'enzyme et l'hydrolyse de l'ARN sont obtenus par 15 min à 85°C. Les ADNc sont complétés à 100 µl d'eau puis stockés.

qPCR

La PCR quantitative ou qPCR permet de quantifier l'ADN double brin présent dans les échantillons testés. Son principe repose sur l'utilisation d'un fluorochrome, le SYBR green, de fluorescence faible en solution et élevée quand il est associé à l'ADN double brin pour lequel il a une grande affinité. Le suivi de l'augmentation de fluorescence due à l'amplification de la cible à chaque cycle de PCR permet d'estimer *a posteriori* la quantité d'ARN matrice dans l'échantillon initial.

Expérimentalement, les réactions de la qPCR sont réalisées avec le kit QuantiTect SYBR Green PCR kit (200) (Qiagen). Dans une plaque de 96 puits, est déposé pour chaque échantillon, 2 µl d'ADNc, 0.25 µM d'amorce sens et anti-sens, 11 µl de Mix Taq-SYBR (Qiagen) 2x et 9,5 µl d'eau (volume réactionnel total de 22 µl). L'ensemble est incubé dans un appareil de type MxPro 3005 (Stratagene®) couplé au logiciel MxPro-Mx3005P, utilisant le programme comportant : 10 min à 95°C (dénaturation des matrices et l'activation de l'enzyme), puis 50 cycles de 15 sec à 95°C, 30 sec à 56°C et 30 sec à 72°C.

Chaque échantillon est analysé en duplicat. Pour vérifier que l'ADN génomique contaminant éventuellement les cDNA n'est pas amplifié, une qPCR est réalisée avec une RT négative (c. à d. sans reverse transcriptase) pour chaque échantillon. Pour chaque séquence (gène d'intérêt) et pour chaque condition d'irradiation, nous avons testé entre 6 et 10 tumeurs (en fonction de la disponibilité des échantillons, comme indiqué Tableau 11).

L'efficacité de chaque couple d'amorce est déterminée par la méthode classique des droites standards à partir d'un échantillon dilué en cascade (en triplicat). Un nombre de copie arbitraire est attribuée au premier point de la gamme non dilué (exemple 100) puis déclinée en fonction de la dilution (ex. 33,33 ; 11,11 etc).

Gène testé	Nombre d'échantillon	
	Tumeur non irradiée	Tumeur irradié par MRT
Arpc1a	10	9
Atp5b	10	9
Cdc20	10	9
Ccnb1	10	9
Fam64a	7	8
Inhbe	9	9
Mars	9	9
Plk1	9	8
Pttg1	9	8
Traf4af1	10	9
Trib3	10	9

Tableau 11 : Nombre d'échantillons prélevé à ($J_{10}T_{6h}$) testés pour chaque gène d'intérêt.

Pour chaque primer, le nombre de copies présentes dans chaque puits est calculée en fonction de la droite d'étalonnage par le logiciel MxPro-Mx3005P et rendues en unités arbitraires.

Les écarts de la quantité d'ARN introduite lors de la rétro-transcription d'un échantillon à l'autre sont pris en compte en divisant le nombre de copies mesurées pour le gène d'intérêt par le nombre de copie des gènes normalisateurs Arpc1a et Atp5b dont l'expression est considérée constante dans les échantillons tumoraux, cérébraux sains, irradiés ou non. On obtient ainsi pour chaque gène et pour chaque échantillon, le niveau d'expression du gène en unités arbitraires.

La significativité des différences de niveaux d'expression de chaque gène entre les 2 groupes d'échantillons, tissu non irradié et irradié (exprimée en nombre de copie) est testé par un t-test (avec permutation) avec une *p-value* < 0,05 sous TMeV.

VI - Analyses histologiques et immunohistologiques

A - Coloration hématoxyline/éosine

La coloration appelée HE (pour hématoxyline/éosine ou érythrosine), permet de colorer les noyaux cellulaires en violet foncé par l'hématoxyline de Harris et le cytoplasme en rose par l'éosine ou érythrosine. Ce marquage est réalisé en fixant les coupes de 18 μ m dans un mélange acétone/méthanol (v/v) pendant 2 min puis rincées à l'eau courante pendant 5 min. Les coupes sont ensuite successivement plongées dans une solution d'hématoxyline de Harris pendant

4 min, un bain d'HCl à 0,5% pendant 15 sec, un bain d'eau ammoniaquée (2,5 ml.l⁻¹) pendant 30 sec. Entre chaque bain un rinçage à l'eau courante d'au moins 1 min est effectué. La phase de coloration terminée, les tissus sont déshydratés par immersion dans 3 bains successifs d'alcool (50%, 75% et 100%, 1 min par bain), puis dans 3 bains successif de toluène (5 min pour les deux 1^{ers} bains, et minimum 2h pour le 3^{ème} bain). Les coupes déshydratées sont montées entre lames et lamelles dans du Pertex (HistoLab, 00811) qui permet une conservation durable du tissu et de la coloration.

A - I - Mesure des surfaces tumorales

Les colorations HE des coupes réalisées à J₁₀T_{6h}, J₁₂T_{48h}, J₁₄T_{96h}, J₁₈T₈, J₂₅T₁₅ et J₃₂T₂₂ sont scannées sur un scanner de type Epson Perfection V750 PRO (Dual Lens System-High Pass Optics). La mesure de la surface tumorale est réalisée sous le logiciel image J par délimitation de la tumeur sur la coupe présentant la section tumorale maximale. Six à 9 rats sont examinés par temps et par traitement comme détaillé au début de chaque étude utilisant cette technique.

A - II - Caractéristiques histologiques

Les photos de tissus colorés par HE, présentées dans le manuscrit, ont été réalisées sous un microscope de type Olympus BX 51, couplé à une caméra de type View Illu de Soft Imaging System. Les observations et comptages ont été réalisées en double aveugle sous un microscope de type Zeiss Standard 14.

L'évaluation du pourcentage de contours infiltrants par rapport aux contours tumoraux totaux est effectuée par l'observation de l'ensemble de la section tumorale à un grossissement x10. Un indice compris entre 0 et 3 est attribué pour les tumeurs présentant des infiltrations ou des îlots tumoraux à distance de la masse sur respectivement 0%, 1/3, 2/3 et 100% des contours comme illustré Figure 48.

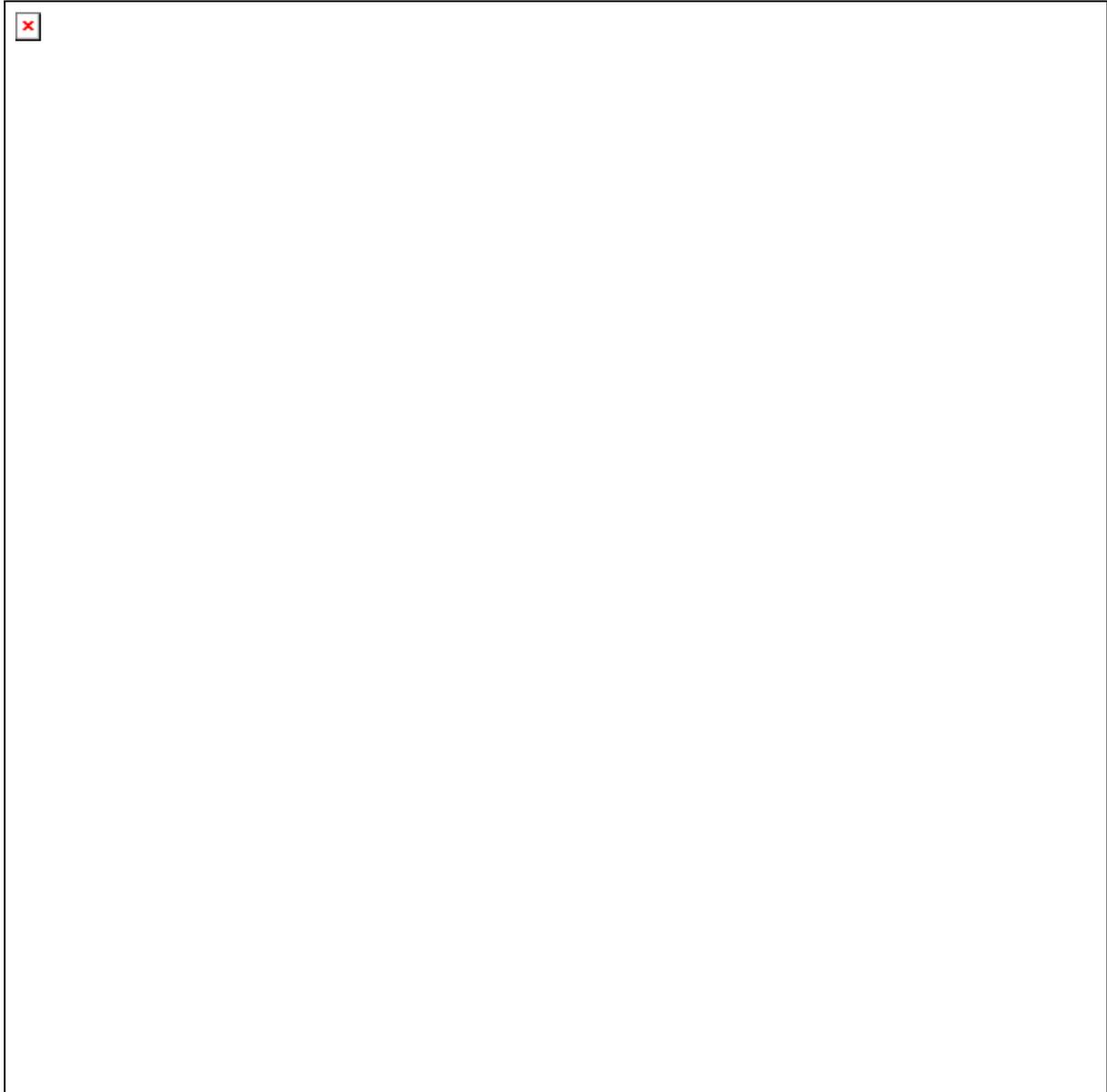


Figure 48 : *Illustration des critères tumoraux associés aux indices attribués pour les contours infiltrants (x10), cellularité tumorale, anisonucléose et infiltration leucocytaire (x20). Barre d'échelle: 200 μ m.*

L'évaluation de la cellularité tumorale, de l'anisonucléose et de l'infiltration leucocytaire est effectuée par l'observation de l'ensemble de la section tumorale avec un grossissement x20.

Pour la cellularité tumorale, un indice compris entre -1 et 3 est attribué en fonction de la densité de cellule tumorale ; l'indice 0 correspondant à une densité de cellule équivalente à celle des tissus sains controlatéraux, l'indice -1 à une densité inférieure, l'indice 3 à la densité maximum observée et les indices 1 et 2 aux densités intermédiaires comme illustré Figure 48.

L'indice d'anisonucléose tumorale 1 est attribué lorsque l'ensemble des cellules tumorales présente un aspect et une taille semblable, l'indice 3 pour le maximum de diversité cellulaire, les indices 1 et 2 pour les stades intermédiaires (Figure 48).

Pour l'infiltration leucocytaire, l'indice 0 correspond à l'absence de leucocyte, les indices 1 à 3 à une présence de leucocytes croissante avec un maximum observé pour l'indice 3 (Figure 48).

Parmi les entités histologiques observées sur les coupes de tissus colorés au HE, certaines sont comptées de manière individuelle telles que les cellules polyplœides, les cellules mitotiques, les cellules mitotiques polyplœides et les cellules pycno-mitotiques (Figure 49).

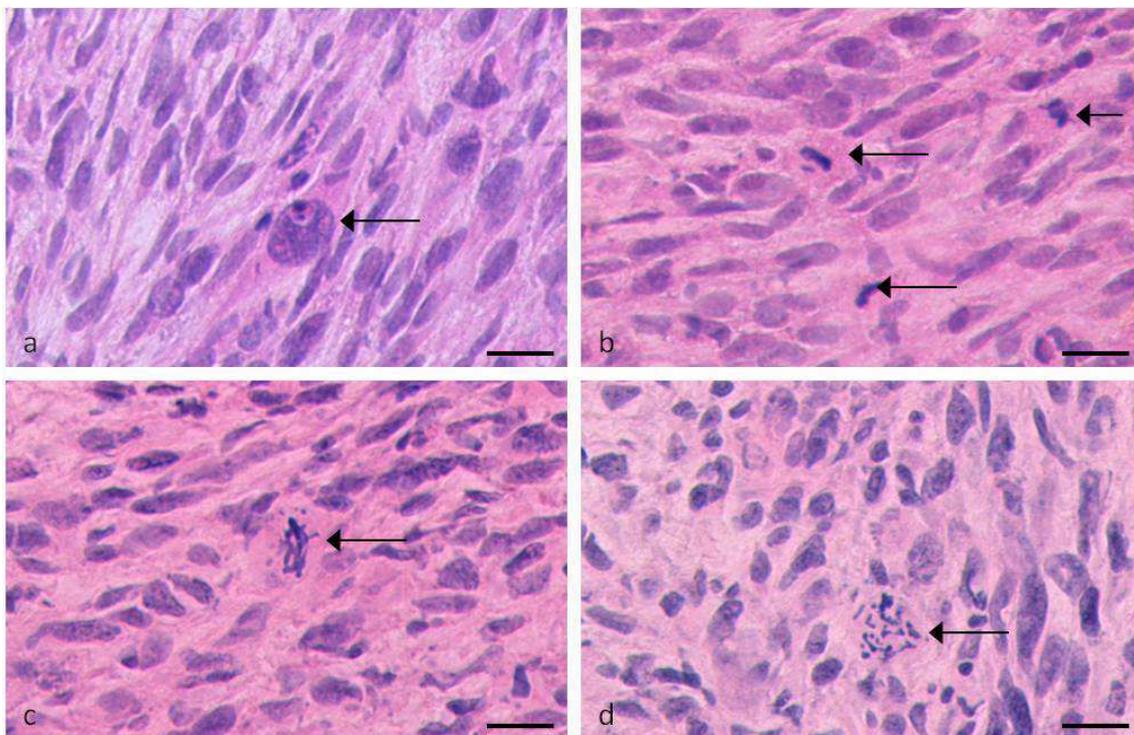


Figure 49 : Illustration des entités histologiques (flèche noire) dénombrées individuellement pour chaque tumeur. a- Cellule polyplœide. b- Cellules mitotiques. c- Cellule mitotique polyplœide. d- Cellule pycno-mitotique. Barre d'échelle: 100 µm.

Leur dénombrement est réalisé par champ d'observation au grossissement x40 et s'effectue en double aveugle sur 3 champs par tumeur, soit 6 champs d'observation et de comptage par tumeur.

B - Immunomarquages

B - I - Marquage des cellules apoptotiques par la méthode TUNEL

Cette méthode est basée sur le marquage des extrémités 3'OH libres générées par le clivage de l'ADN lors de l'apoptose cellulaire. Une transférase ajoute aux extrémités libres un dUTP biotinylé permettant de les visualiser.

Cette détection a été réalisée par le kit DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System (Promega). Le principe est d'évaluer la mort cellulaire par apoptose en mesurant la fragmentation d'ADN nucléaire qui est un indicateur biochimique important de l'apoptose pour de nombreux types cellulaires.

Les coupes sont délimitées à l'aide d'un stylo gras (Pap-pen) et incubées pendant 5 minutes dans du NaCl 0,85% à température ambiante. Elles sont rincées plusieurs fois au PBS puis elles sont fixées pendant 15 minutes avec du paraformaldéhyde 4% (m/v). Les coupes sont à nouveau rincées au PBS puis incubées pendant 1 heure à 37°C avec la solution rTdT reaction mix du kit de détection TUNEL (equilibration buffer 98%, biotinylated nucleotide mix 1% et rTdT enzyme (=transférase) 1%). Le liquide est retiré des coupes et les lames sont immergées pendant 15 minutes dans un bain de SSC (10% SSC dans H₂O ddl) puis rincées au PBS. Une solution d'H₂O₂ à 3% est déposée sur les coupes pendant 10 minutes afin d'inhiber les peroxydases endogènes. Après rinçages au PBS, les coupes sont incubées pendant 30 minutes à température ambiante avec une solution de streptavidine HRP à 0,2% (0,2% streptavidine dans PBS, VECTOR). Après lavage des coupes au PBS, la révélation est ensuite permise suite à un bain de Tris 0,005M à pH 7,4 pendant 5 minutes puis à l'immersion pendant 5 minutes des lames dans une solution de 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) diluée et activée par l'H₂O₂ (DAB Sigma 10mg dans 20ml de Tris 0.005M pH 7.4) + 1µl H₂O₂ (30%). Après une brève contre coloration à l'hématoxyline, les coupes sont ensuite montées entre lame et lamelle avec du pertex (HistoLab, ref00811).

B - II - Immunomarquages fluorescents

La protéine GFAP exprimée dans les cellules gliales et Ed1 (antigène CD68) exprimé par les monocytes et macrophages sont marqués afin d'évaluer la réponse immunitaire associée à la

présence de la tumeur et l'influence de la MRT sur celle-ci. Le collagène IV, protéine située dans la lame basale des vaisseaux, et le RECA (*Rat Endothelial Cell Antigen*) des cellules endothéliales ont été marqués afin d'évaluer la morphologie et la densité des vaisseaux. L'activité proliférative des cellules tumorales a été appréciée grâce au marquage du Ki67. Les histones pH2AX, présentent au niveau des DSB de l'ADN lors de leur réparation, sont marqués pour repérer les zones irradiées par MRT ou BB.

Expérimentalement, les coupes sont délimitées avec un feutre gras (pap-pen) pour créer une zone hydrophobe. Après fixation au paraformaldéhyde 4% pendant 10 min, les coupes sont rincées plusieurs fois au PBS et incubées dans du NDS (*Normal Donkey Serum*, Interchim-Uptima, UP77719A) dilué à 5% dans du PBS (PBS/NDS 5%) pendant 1 heure à température ambiante pour saturer les sites de liaison non spécifiques. Les coupes sont ensuite incubées sur la nuit à 4°C avec les anticorps primaires suivants dilués dans du PBS/ NDS 1% : *Rabbit polyclonal anti Glial Fibrillary Acidic Protein* (DAKO, Z0334, 1/2000^{ème}), *Mouse monoclonal anti CD68* (ABCYS, Abc117-6714, 1/2000^{ème}), *Rabbit monoclonal anti Ki67* (NeoMarkers RM-9106-S1, 1/500e), *Mouse monoclonal anti RECA* (AbD Serotec, MCA970R, 1/300^{ème}), *Goat Anti-Type IV Collagen* (SouthernBiotech, 1340-01, 1/1000^{ème}) et *Mouse monoclonal anti pH2AX* (MILLIPORE, 05636, 1/500^{ème}). Après 3 rinçages de 5 minutes au PBS (1X), les anticorps secondaires dilués au 1/500e dans du PBS/NDS 1% sont appliqués pendant 2h à température ambiante. En fonction de l'animal chez lequel a été développé l'anticorps primaire, les anticorps secondaires suivants sont utilisés : *Donkey anti Rabbit alexa fluor 488* (Invitrogen, A21206, au 1/500^{ème}), *Goat anti Mouse alexa fluor 546* (Invitrogen, A11030, 1/1000^{ème}) et *FITC-conjugated donkey anti-mouse IgG* (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc, au 1/500^{ème}). Après plusieurs rinçages au PBS (1X), les coupes sont montées entre lames et lamelles avec du gel mount (Biomedica Corp, Foster City, CA) contenant 5µg/mL de DAPI ou 4',6-Diamidino-2-Phénylindole, Dilactate (INVITROGEN, D3571) permettant de visualiser les noyaux. Les observations et images sont réalisées à l'aide d'un microscope équipé pour l'épifluorescence (Olympus BX51, Camera Color View Illu par Soft Imaging System).

RÉSULTATS

I - Caractérisation du modèle tumoral 9L

Parmi les modèles de gliomes de rongeur, le modèle 9L est historiquement l'un des plus largement utilisé (plus de 800 études depuis 1975). La lignée cellulaire 9L a été établie au début des années 1970 par Benda *et al.* suite à une administration intraveineuse répétée de N-méthylnitrosurée (5 mg/kg hebdomadaire pendant 8 mois) à des rats Fischer [Benda P. *et al.* 1971]. Les cellules 9L ont une apparence sarcomateuse (*c.-à-d.* de tissu conjonctif) qui les différencie des autres modèles de gliomes utilisés chez le rat [Barth RF 1998]. La classification de l'OMS de 2007 place les gliosarcomes comme des gliomes de grade IV et des variants des glioblastomes multiformes [Louis David N. *et al.* 2007].

Dans la littérature, les modèles tumoraux décrits varient en fonction de la virulence des cellules, du nombre de cellules utilisées, des volumes injectés, du site d'implantation tumorale, et bien sûr de l'espèce hôte. Il est de fait difficile de parler d'un seul et unique modèle tumoral 9L. Dans notre cas, le modèle 9L utilisé est celui de l'ESRF (MM § II -) basé sur une injection de 10^4 cellules 9L en suspension dans 1 μ l de milieu de culture, inoculées au niveau du noyau caudé de rats Fischer 344 âgés d'environ 10 semaines [Regnard P. *et al.* 2008].

Cette première étude est une caractérisation de notre modèle mise en place en regroupant des résultats acquis lors de ce travail de thèse. Elle comporte des paramètres de survie, des critères morphologiques et histologiques. Afin d'être le plus complet possible, des résultats concernant le réseau vasculaire de ces tumeurs, acquis par immuno-histologie et par IRM lors de mon travail de Master⁵ complètent cette description.

Protocole expérimental

Comme détaillé dans le Tableau 12, les données acquises sur le modèle sont issues de 6 séries d'expériences (S₁-S₆) regroupant 42 animaux suivis en survie et 44 animaux sacrifiés à des fins immuno-histologiques à différents temps après implantation (J₁₀, J₁₂, J₁₄ et J₁₈)

⁵ M2 réalisé en 2009 au sein de l'ESRF sous la direction de Géraldine Le Duc et Raphaël Serduc et en collaboration avec l'équipe 5 du GIN. Ces résultats font partie d'une étude publiée Bouchet A, Lemasson B, Leduc G, Maisin C, Bräuer-Krisch E, Siegbahn EA, Renaud L, Remy C, Bravin A, Laissue JA, Barbier E and Serduc R, *Preferential effect of synchrotron microbeam radiation therapy on intracerebral 9L gliosarcoma vascular networks*, Int. J. Rad. Onc. Biol. Phys., 2010. vol 78 (5) p1503-1512..

Session Expérimentale S_x Jours post Implantation (J_x)		Nombre d'animaux						
		S_1	S_2	S_3	S_4	S_5	S_6	Total
Survie		4	5	12	9	5	7	42
Surface tumorale	J_{10}	3	3	3				9
	J_{12}	3	3					6
	J_{14}			3	3			6
	J_{18}			3	3			6
Évaluation histologique et immuno-marquages	J_{10}	1	2	2				5
	J_{12}	2	2					4
	J_{14}			2	2			4
	J_{18}			2	2			4

Tableau 12 : Récapitulatif de la répartition des 42 animaux permettant l'établissement des courbes de survie et des 44 animaux sacrifiés pour prélèvement lors des 6 sessions expérimentales (S_1 - S_6).

A - Prise tumorale, croissance et survie associée

A - I - Efficacité de la prise tumorale

La prise tumorale est vérifiée par IRM 9 jours après l'inoculation des cellules 9L au niveau du noyau caudé (en prévision de l'irradiation à 10 jours pour les études suivantes). L'utilisation d'images pondérées en T_2 permet de vérifier la présence, la position, et d'évaluer la taille des tumeurs rendues visibles par l'hypersignal de l'œdème péritumoral. La prise tumorale est quasi-systématique. En effet, les 86 animaux impliqués dans cette 1^{ère} étude présentent une tumeur 9 jours après l'implantation et sur l'ensemble des animaux imagés par notre équipe au cours des 3 dernières années ($n \approx 600$), seul 2 rats ont été exclus des expériences en raison de l'absence de tumeur (Figure 50a). L'absence accidentelle d'injection des cellules est suspectée pour ces deux cas. Les tumeurs observées présentent principalement 2 types de formes : (i) sphérique ou ellipsoïde pouvant être positionnée au niveau du noyau caudé (Figure 50b) ou du cortex (Figure 50c), (ii) bilobé avec la présence d'une masse sphérique ou ellipsoïde dans le noyau caudé et dans le cortex (Figure 50d).

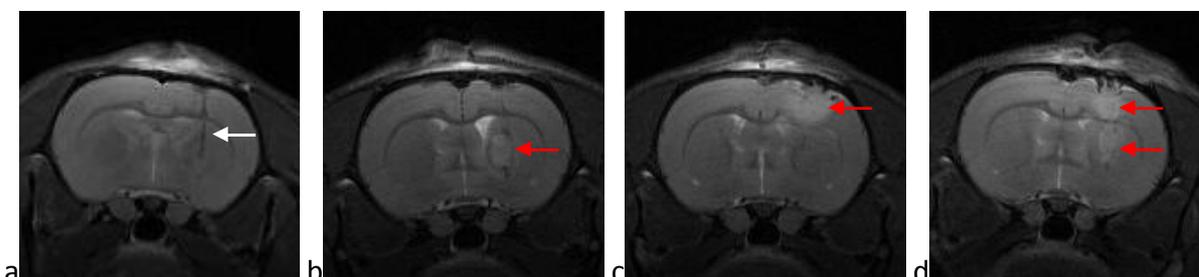


Figure 50 : IRM pondérée en T_2 de cerveau de rats 9 jours après inoculation des cellules 9L. a- Exemple d'un des 2 animaux exclus pour l'absence de tumeur visible en IRM. La flèche blanche indique le trajet de l'aiguille d'implantation. b à d- Tumeurs positionnées au niveau du noyau caudé (b) ou du cortex (c) ou des deux (d). Les flèches rouges indiquent la présence de la tumeur.

A - II - Une croissance tumorale exponentielle et reproductible

Le suivi de la croissance des tumeurs a été réalisé selon deux méthodes : (i) par calcul du volume tumoral selon les acquisitions IRM (images pondérées en T_2) réalisées lors de mon travail de master M2 [Bouchet A *et al.* 2010], (ii) à l'aide de mesures de la surface tumorale sur coupes histologiques issues de 6 séries d'implantation réalisées lors de ma thèse. Dans les deux cas la croissance tumorale présente une allure exponentielle (Figure 51).

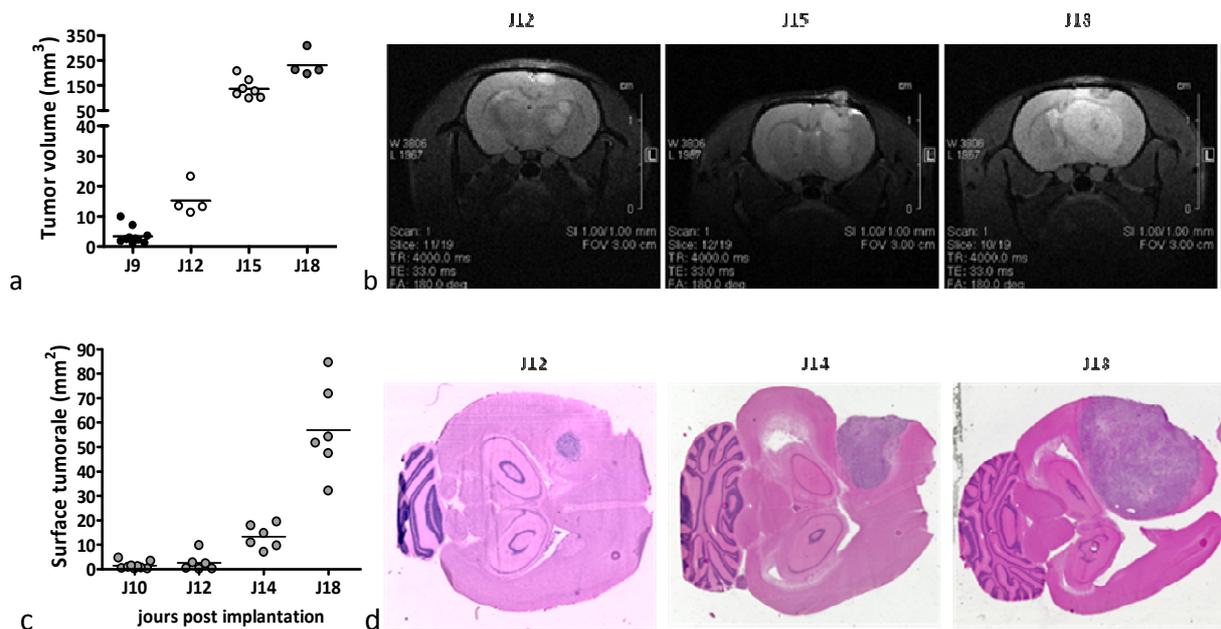


Figure 51 : Suivi de la croissance de tumeurs 9L. a- Volume tumoral individuel (rond) des tumeurs suivies 9, 12, 15 et 18 jours post-implantation par IRM (images pondérées en T_2) et moyennes associées (lignes). Échantillonnage : $n=9$ à J_9 , $n=4$ à J_{12} et J_{18} , $n=7$ à J_{18} . b- Images coronales IRM pondérée en T_2 illustrant l'évolution de taille d'une tumeur à J_{12} , J_{15} et J_{18} . (a et b extraits de [Bouchet A et al. 2010]). c- Surface tumorale individuelle (rond) des tumeurs suivies 10, 12, 14 et 18 jours post-implantation par histologie et moyennes associées (lignes). Nombre d'animaux: $n=9$ à J_{10} , $n=6$ à J_{12} , J_{14} et J_{18} . d- Colorations hématoxyline/éosine de coupes histologiques axiales illustrant l'évolution de taille des tumeurs 9L à J_{12} , J_{14} et J_{18} .

Le volume tumoral évalué par IRM à J_9 est compris entre 1,1 et 9,8 mm^3 et atteint 230 mm^3 en moyenne à J_{18} [Bouchet A et al. 2010]. Sur coupes histologiques, la surface tumorale à J_{10} varie entre 0,3 et 4,7 mm^2 (mesure sur la forme réelle de la tumeur axiale). Des facteurs multiplicatifs de 10 et 40 sont respectivement observés entre le 10^{ème} et le 14^{ème} jour et entre le 10^{ème} et le 18^{ème} jour post-implantation. Les résultats obtenus en master 2 et en thèse (c. à d. à 2 à 3 ans d'intervalle) sont comparables, soulignant ainsi la stabilité du modèle dans le temps.

A - III - Une survie très reproductible

Les courbes de survie de rats Fischer porteurs de tumeur 9L illustrent la grande reproductibilité de ce modèle tumoral (Figure 52).

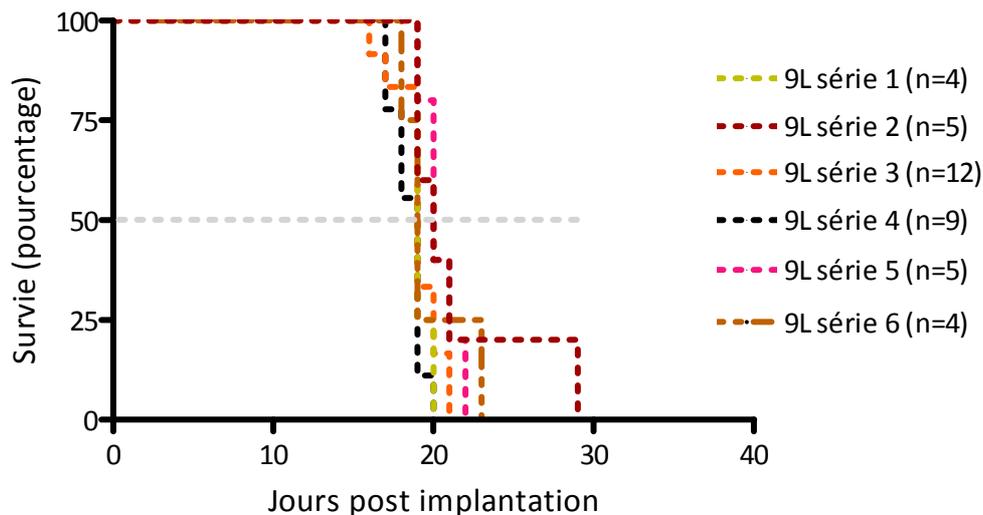


Figure 52 : Courbes de survie relatives à 6 expériences d'implantation orthotopique de cellules 9L chez le rat Fischer ($1\mu\text{l}$ contenant 10^4 cellules au niveau du noyau caudé).

La médiane de survie (MST pour *Median Survival Time*) pour les 6 séries de rats est comprise entre 19 et 20 jours, la survie moyenne (\pm SEM) entre 18,4 ($\pm 0,3$) et 21,6 ($\pm 1,9$) jours (Tableau 13).

	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6
Période de l'expérience	03/2010	06/2010	11/2010	02/2011	04/2011	07/2011
Nombre d'individus	4	5	12	9	5	4
Survie médiane (jour) (MST pour <i>Mean Survival Time</i>)	19	20	19	19	20	19
Survie moyenne \pm SEM (jour)	19,3 ($\pm 0,3$)	21,6 ($\pm 1,9$)	19,1 ($\pm 0,4$)	18,4 ($\pm 0,3$)	20,4 ($\pm 0,5$)	19,8 ($\pm 1,1$)
Survie minimale (jour)	19	19	16	17	19	18
Survie maximale (jour)	20	29	21	20	22	23

Tableau 13: Tableau récapitulatif des données de survie relatives à 6 expériences d'implantation orthotopique de cellules 9L chez le rat Fischer ($1\mu\text{l}$ contenant 10^4 cellules au niveau du noyau caudé). Sont répertoriés la période de réalisation de l'expérience (mois/année), nombre d'animaux (n), la survie médiane, la survie moyenne (\pm SEM), minimale et maximale en jours.

La survie minimale est comprise entre 16 et 19 jours lors de chaque série d'implantation. La survie maximale présente également reproductibilité importante, puisqu'elle survient entre 20 et 23 jours pour 5 des 6 séries. Seule une série présente une survie maximale supérieure avec un individu ayant survécu jusqu'à 29 jours.

Aucune spécificité de survie n'a pu être corrélée avec la taille ou la forme des tumeurs observées par IRM 9 jours après l'inoculation cellulaire.

B - Un modèle tumoral hypervascularisé

L'étude des paramètres vasculaires des tumeurs 9L a été réalisée lors de mon travail de Master M2 en collaboration avec l'équipe 5 du GIN [Bouchet A *et al.* 2010]. Dans ce travail, les mesures ont été réalisées sur une région d'intérêt englobant l'ensemble de la tumeur. Le volume sanguin obtenu par IRM est plus élevé dans le tissu tumoral que dans le tissu sain ce qui reflète la nature très vascularisée de ce modèle tumoral : 10 jours après l'implantation il est d'environ 6% contre 3% dans le tissu sain (Figure 53a) et corrèle avec un index de taille des vaisseaux (ITV) tumoraux plus élevé que celui des vaisseaux du tissu sain (Figure 53b) : 11 contre 5 μm .

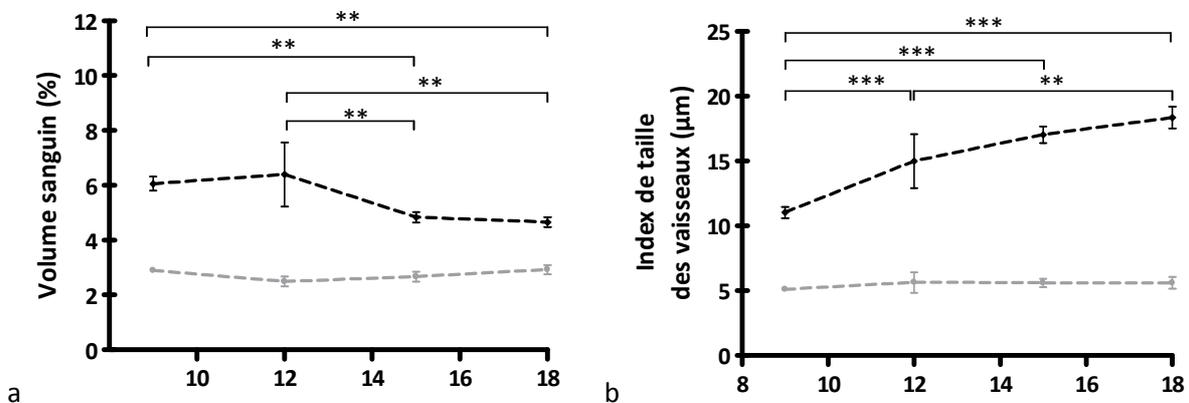


Figure 53 : Mesures des paramètres vasculaires par IRM. Suivi du volume sanguin (a) et de l'index de taille des vaisseaux (b) dans les tissus tumoraux (ligne pointillée noire) et cérébraux controlatéraux (ligne pointillée grise) à J₉, J₁₂, J₁₅ et J₁₈ (moyenne \pm SEM). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Adapté de Bouchet *et al.* 2010.

Une diminution du pourcentage du volume sanguin tumoral est observée entre J₁₂ et J₁₈ (respectivement 6,4 % et 4,7 %) alors qu'entre J₉ et J₁₈ l'ITV augmente de manière progressive, passant de 11 à 18,4 μm . De plus, l'immunomarquage de la lame basale et des cellules endothéliales indique également une densité vasculaire beaucoup plus faible et une distance intervaisseaux plus élevée au niveau tumoral qu'au niveau du tissu sain à ces mêmes stades tardifs (Figure 54). Cependant, le diamètre des vaisseaux sanguins tumoraux apparaît supérieur aux vaisseaux du tissu sain. Aucune évolution de ce diamètre dans le temps n'a été observée par cette méthode.

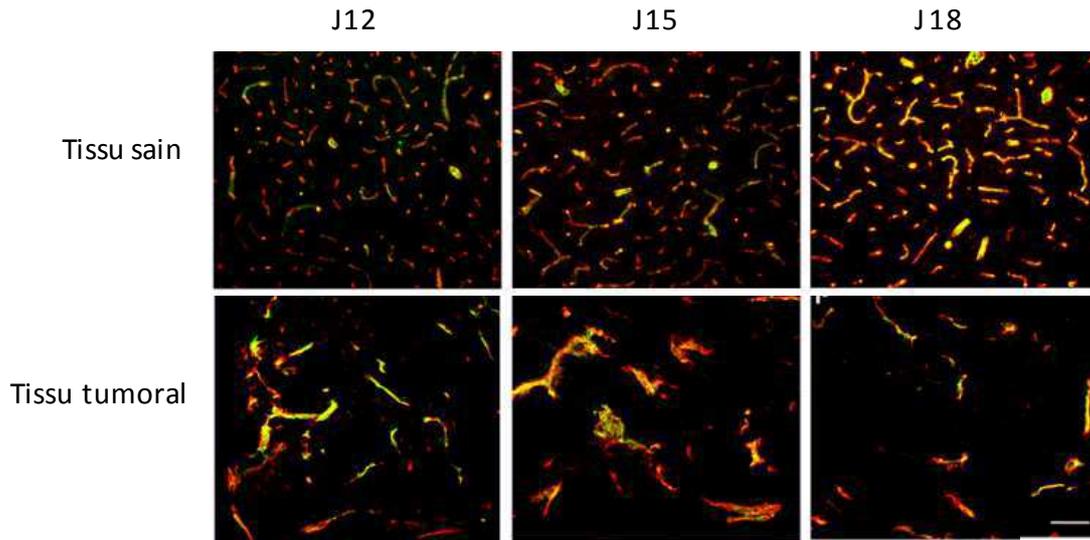


Figure 54 : Suivi de la morphologie des vaisseaux cérébraux sains et de tumeurs 9L à différents temps post-implantation (12, 15 et 18 jours) après l'immuno-marquage du collagène-IV présent dans la lame basale (rouge) et de la protéine RECA-1 des cellules endothéliales (vert). Barre d'échelle : 200 μ m. Adapté de Bouchet et al. 2010.

C - Evolution dans le temps des caractéristiques histologiques du modèle 9L

C - I - Description macroscopique

Pour les stades les plus évolués de la tumeur (J₁₈), une organisation zonale est observée avec des plages de forte cellularité et des plages nécrotiques plus ou moins centrales se développant au sein de 5 des 6 tumeurs (Figure 56). La surface nécrotique représente en moyenne 10,3% de la tumeur totale mais est très variable : entre 2 et 31% (Figure 56 b et c).

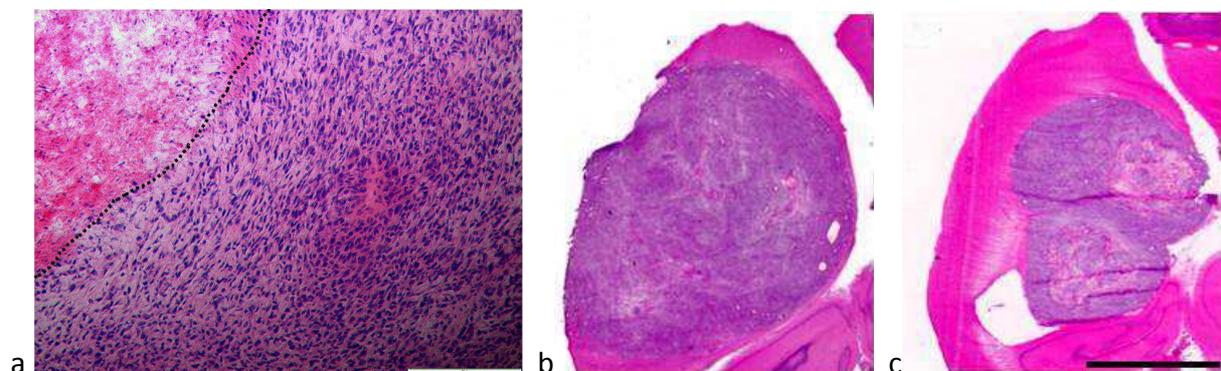


Figure 55: Hétérogénéité de répartition de la densité cellulaire au sein d'une même tumeur. a- La zone nécrotique présente au sein de la lésion tumorale est délimitée (par la ligne pointillée) d'une zone de haute densité cellulaire observée dans la partie plus périphérique de la tumeur (à droite de la ligne). Barre d'échelle : 200 μ m. b et c- Exemples de nécrose représentant 2% (b) et 30% (c) de la surface tumorale totale à J₁₈. Barre d'échelle : 500 μ m.

C - II - Un modèle infiltrant.

Les tumeurs 9L se présentent comme une masse aux limites franches qui infiltre le tissu péri-lésionnel par des extensions ou des îlots (Figure 56a).

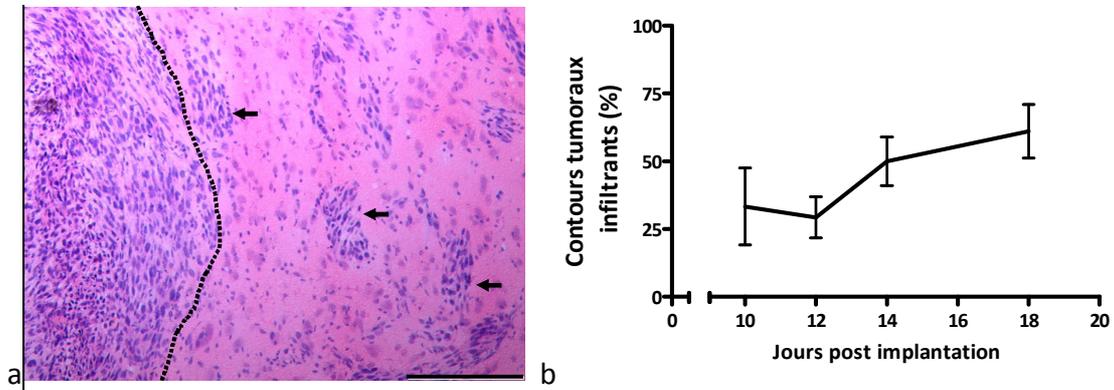


Figure 56 : a- Exemple d'extensions/infiltrations tumorales (flèches noires) dans le tissu sain (à droite de la ligne pointillée noire), à distance de la masse tumorale (présente à gauche de la ligne pointillée noire) visualisées grâce à une coloration HE d'une coupe de tissus prélevés 10 jours après inoculation tumorale. Barre d'échelle : 200 μ m. b- Suivi des contours tumoraux présentant des irrégularités par rapport aux contours tumoraux totaux (pourcentage moyen \pm SEM).

Une évaluation de la proportion des contours tumoraux présentant une irrégularité (infiltration tumorale ou îlots tumoraux distants de la masse principale) par rapport aux contours tumoraux totaux est représentée Figure 56b. Le marquage de l'antigène Ki67 permet d'observer des cellules proliférantes à distance de la masse tumorale, et ce, même au niveau de contours tumoraux identifiés comme francs sur les coupes HE (Figure 57).

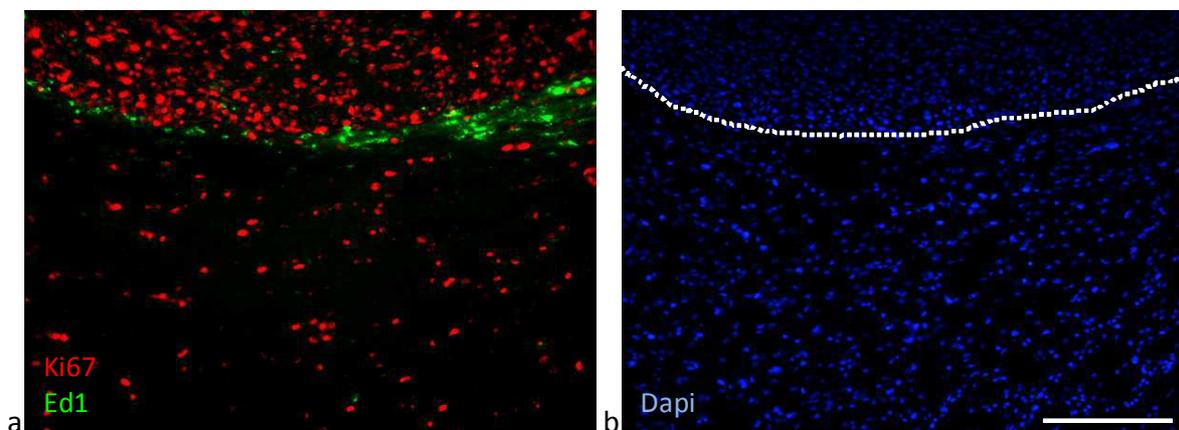


Figure 57 : Immuno-marquage de macrophages/monocytes activés (Ed1, en vert) et de cellules proliférantes (Ki67, en rouge) (a). Les noyaux sont marqués au dapi (bleu) permettant de discriminer la masse tumorale (au dessus de la ligne pointillée) du tissu cérébral péri-lésionnel (au dessous de la ligne pointillée). Barre d'échelle: 200 μ m.

Les cellules proliférantes ne colocalisent pas avec des macrophages/monocytes. La présence d'extensions de la tumeur, d'îlots de cellules tumorales et de cellules proliférantes isolées au niveau du tissu cérébral sein illustrent le caractère infiltrant de notre modèle sur les tissus périphériques. À un niveau plus macroscopique, nous n'avons pas observé de migration de cellules tumorales péri-fasciculaire dans le corps calleux, ni d'îlots tumoraux dans l'hémisphère controlatéral.

C - III - Une densité cellulaire tumorale élevée et une prolifération intense

L'aspect des cellules tumorales est hétérogène. Leurs noyaux sont ronds à allongés et présentent une anisonucléose (diversité de taille des noyaux) faible et quasi constante (Figure 58 a, c et d).

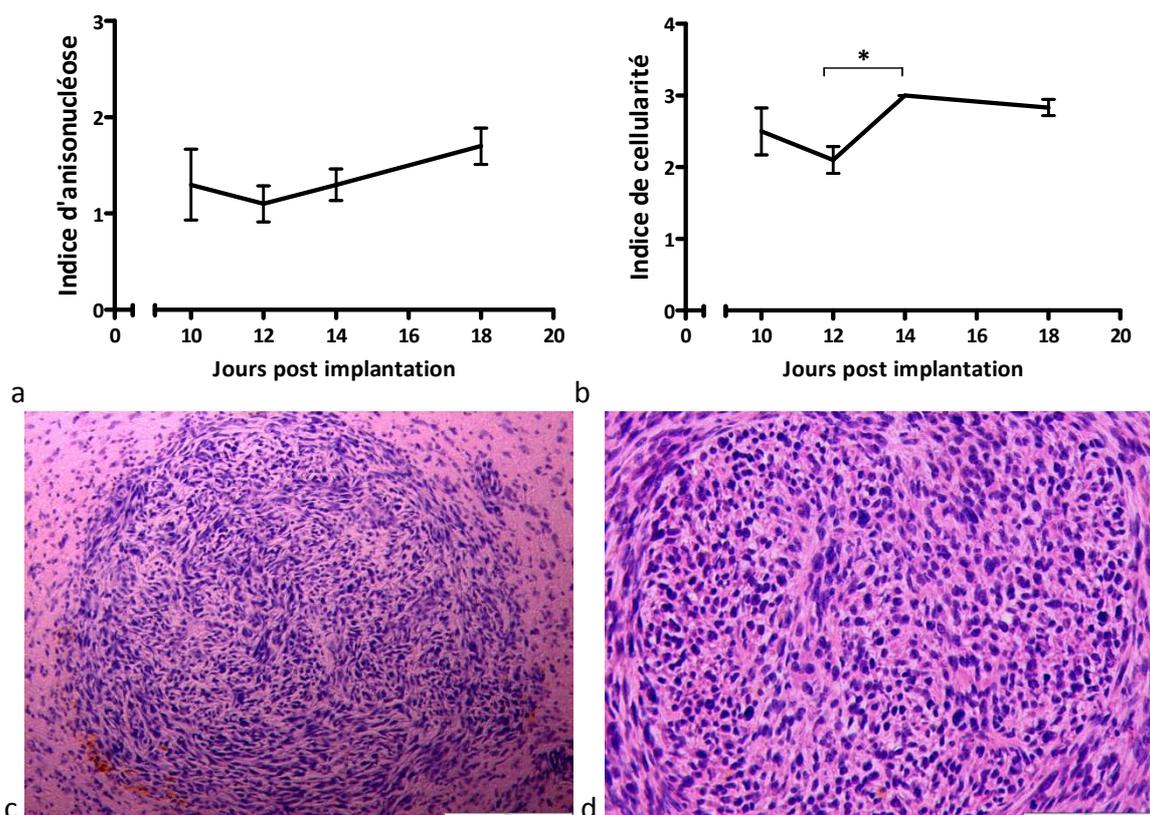


Figure 58 : Suivi de l'anisonucléose (a) et de la cellularité (b) tumorale (moyenne \pm SEM ; $n=8$ pour J_{10} , J_{12} et J_{14} ; $n=12$ pour J_{18}). Exemple de tumeur présentant une anisonucléose faible et une cellularité élevée visualisée grâce à une coloration à l'hématoxyline/éosine d'une coupe de tissus prélevés à J_{10} (c- barre d'échelle : 200 μ m. d- barre d'échelle : 100 μ m).

La densité cellulaire (évaluée sans prendre en compte les zones de nécrose) est élevée dès le premier temps observé (10 jours post-implantation) avec un indice de cellularité moyen de 2,5/3 (Figure 58 b, c et d). Elle reste relativement stable au cours du temps, hormis une augmentation significative entre J₁₂ et J₁₄ (2,1±0,53 à 3,0±0,0 ; p<0,05).

Le marquage des cellules tumorales au Ki67 indique un index prolifératif élevé (Figure 59).

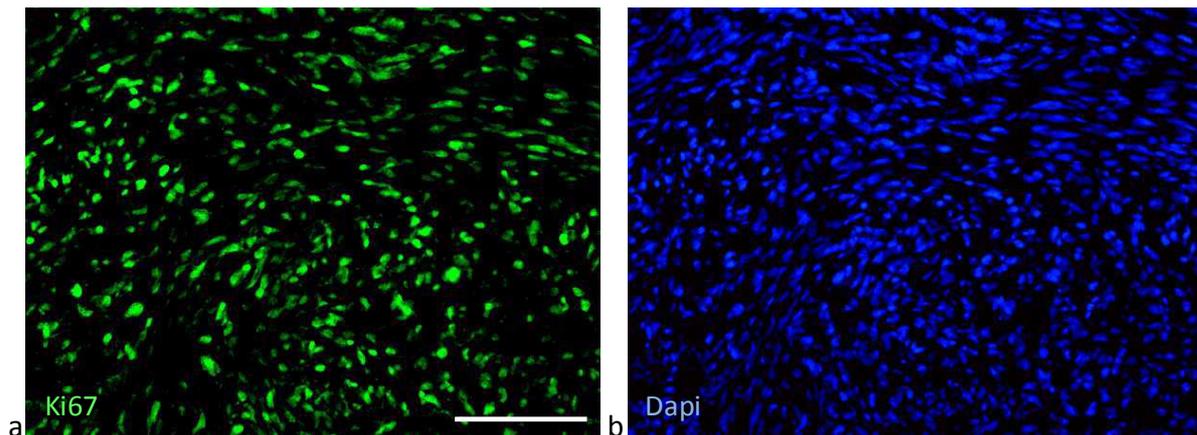


Figure 59 : Exemple de marquage Ki67 (vert) des cellules tumorales proliférantes à J₁₀ (a). Les noyaux de l'ensemble des cellules sont marqués au dapi (bleu) (b). Barre d'échelle : 100 μ m.

Un minimum de 20% des cellules tumorales positives au Ki67 est requis pour qu'un gliome soit classé en astrocytome de grade IV. Dans le cas de notre modèle murin, une évaluation visuelle permet de déterminer un pourcentage nettement supérieur à 20, et ce, pour tous les temps observés. Ce marquage témoigne qu'une fraction élevée de cellules tumorales est entrée en cycle cellulaire laissant présager l'observation de mitoses.

Plusieurs figures mitotiques peuvent en effet être visualisées par champ d'observation au grossissement x20 (Figure 60a) d'où un index mitotique élevé (Figure 60b).

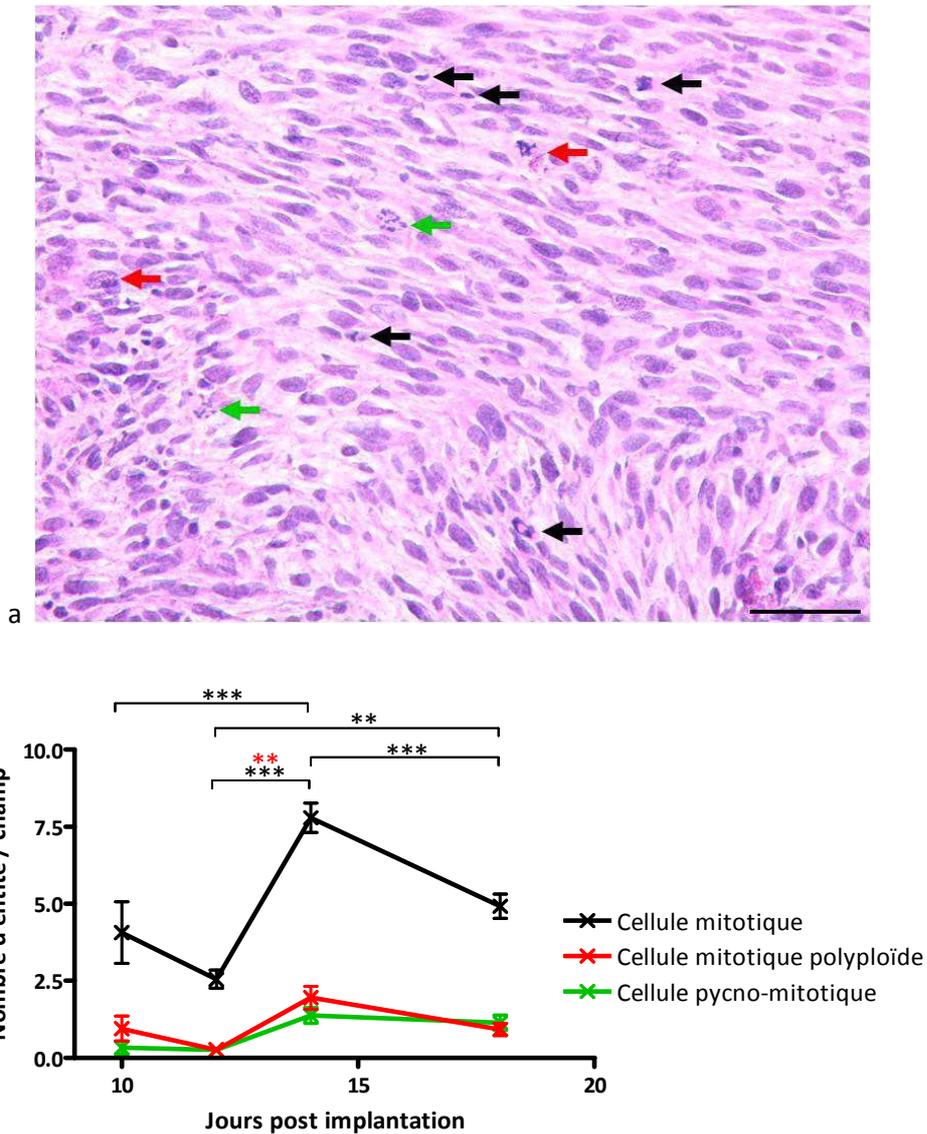


Figure 60 : a - Exemple de coupes histologiques présentant des cellules mitotiques (flèches noires), mitotiques polyploïdes (flèches rouges), pycno-mitotiques (flèche vertes) 14 jours après implantation. Barre d'échelle : 100 μ m. b - Suivi du nombre moyen (\pm SEM) par champ d'observation de cellules mitotiques (ligne noire), de cellules mitotiques polyploïdes (ligne rouge) et de cellules pycno-mitotiques (ligne verte) 10, 12, 14 et 18 jours après l'inoculation des cellules 9L (** : $p < 0,01$ et *** : $p < 0,001$).

Un quasi-doublement du nombre de cellules mitotiques est observable entre le 10^{ème} et le 14^{ème} jour post-implantation passant de 4,1 (\pm 1,0) à 7,8 (\pm 0,48) mitoses par champ ($p < 0,001$) (Figure 60b). Les cellules mitotiques polyploïdes et les cellules pycno-mitotiques sont des sous-population faiblement représentées des cellules mitotiques totales : moins de 25% quel que soit le temps d'observation (soit moins de 1,4 (\pm 0,26) cellules pycno-mitotiques et 2 (\pm 0,37) cellules mitotiques polyploïdes en moyenne par champ d'observation). Ceci illustre le fort potentiel mitotique des tumeurs 9L (c. à d. un index mitotique élevé) et un *turn-over* faible.

C - IV - Réaction immunitaire

La réaction de l'hôte vis-à-vis de notre modèle tumoral est caractérisé par évaluation de l'infiltration leucocytaire sur coupes colorées à l'hématoxyline/éosine et grâce au marquage immunohistochimique des macrophages/monocytes activés (antigène Ed1) et de la gliose réactionnelle (antigène GFAP pour *Glial Fibrillary Acidic Protein*).

L'infiltration leucocytaire est définie par un indice allant de 0 à 3 selon les critères décrits MM § VI - A - II -. Des leucocytes sont présents dans la tumeur néoformée mais en faible quantité 10 et 12 jours après inoculation des cellules 9L (Figure 61).

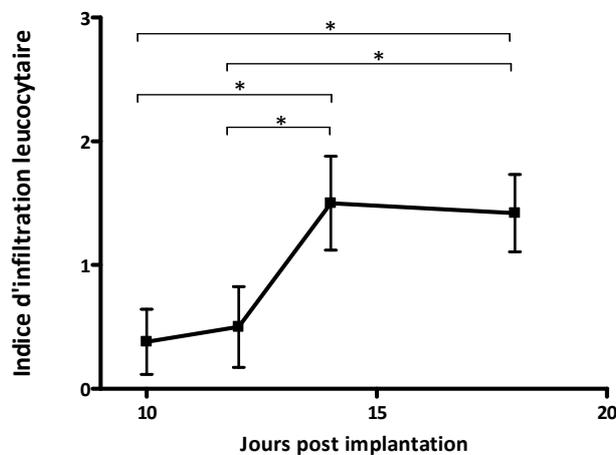


Figure 61 : Suivi de l'indice d'infiltration leucocytaire (\pm SEM) 10, 12, 14 et 18 jours après l'inoculation des cellules 9L (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$ et *** : $p < 0,001$).

Une augmentation significative de leur nombre est observable à partir du 14^{ème} jour, l'indice d'infiltration leucocytaire moyen passant de 0,5 à 1,5 ($p < 0,05$) entre J₁₂ et J₁₄ et se maintenant à 1,4 le 18^{ème} jour (Figure 61). Des macrophages/monocytes activés (antigène Ed1) au niveau tumoral sont également détectés dès le 1^{er} temps observé révélant une réaction de l'hôte contre les cellules tumorales. Leur présence, principalement périphérique, reste stable entre J₁₀ et J₁₈ (Figure 62).

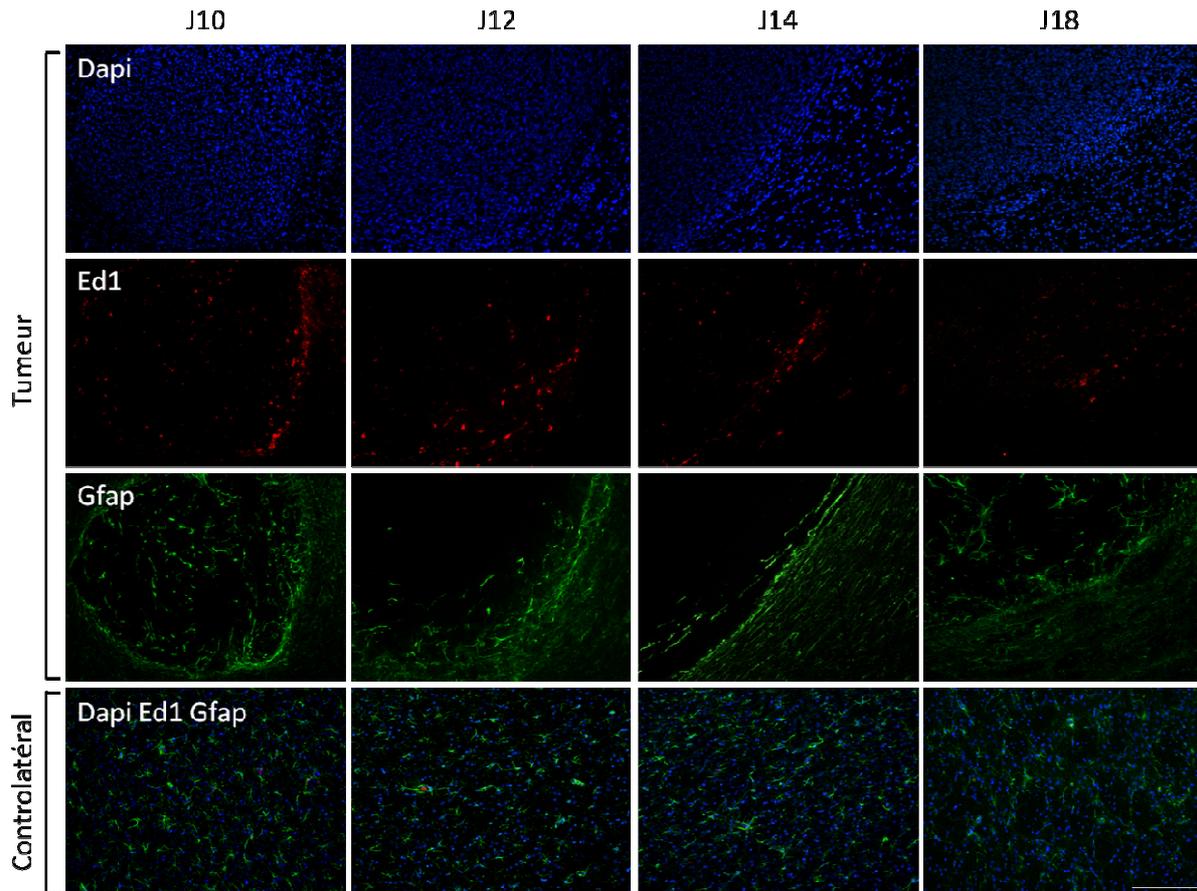


Figure 62 : Immunomarquages des macrophages/monocytes activés (Ed1, rouge) et des cellules GFAP positives (vert), dans les tumeurs 9L et dans les tissus controlatéraux à J₁₀, J₁₂, J₁₄ et J₁₈. Les noyaux sont marqués au dapi (bleu). Barre d'échelle : 200 μ m.

L'immunomarquage de la protéine GFAP est négatif au niveau de cellules tumorales pour tous les temps observés (Figure 62). Néanmoins les tumeurs présentent un marquage positif soutenu au niveau péri-lésionnel et s'infiltrant dans les premiers millimètres de la périphérie tumorale, indiquant la présence d'une gliose réactionnelle intense.

D - Discussion

Cette étude a permis de caractériser le modèle tumoral utilisé lors de cette thèse. Nos données confrontées à celle de la littérature (pour revue [Barth RF *et al.* 2009; Jacobs Valérie J. *et al.* 2011]) permettent de le repositionner et de compléter les connaissances le concernant. La procédure d'implantation utilisée conduit à une prise tumorale proche de 100%. Plusieurs morphologies tumorales ont pu être observées 9 jours après l'implantation. La lésion pouvant se présenter sous forme uni- ou poly-lobée, localisée dans la zone d'inoculation théorique des

cellules 9L (le noyau caudé), le cortex traversé lors de l'implantation ou dans les deux. Ces différences de configuration tumorale ne semblent pas se répercuter sur le devenir des animaux, puisqu'aucune différence de survie n'a pu être mise en évidence. Le suivi *in vivo* des animaux issus de 6 séries expérimentales étalées sur 20 mois ont démontré une très bonne reproductibilité de la survie, avec des médianes de 19 ou 20 jours. Les tumeurs présentent une croissance quasi-exponentielle : d'un volume moyen équivalent à $3,5\text{mm}^3$ neuf jours après l'implantation, les tumeurs occupent la quasi-intégralité de l'hémisphère ipsilatéral une 10^{aine} de jours plus tard.

D'un point de vue morphologique, les tumeurs 9L ont initialement été décrites comme ne présentant pas [Benda P. *et al.* 1971] ou peu [Barth RF *et al.* 2009] le caractère invasif diffus particulier des glioblastomes humains. Les observations menées dans notre étude mettent pourtant en évidence des infiltrations tumorales et des îlots de cellules distants de la masse principale. De nombreuses cellules proliférantes isolées de la masse principale sont également visibles dans le tissu sain bordant la tumeur.

Une nécrose typique des astrocytomes de grade IV est observée au dernier stade de croissance des tumeurs 9L. Contrairement à ce qui est communément décrit pour les glioblastomes [Rong Y *et al.* 2006] la zone nécrotique des tumeurs 9L n'est pas entourée d'une pseudo-palissade de cellules tumorales, mais par une fine bande de tissus péri-nécrotiques présentant plutôt une allure œdémateuse et une densité cellulaire plus faible.

En dehors des zones nécrotiques observées aux temps tardifs, les tumeurs sont hypervascularisées comme l'illustre le marquage du réseau vasculaire sur coupes histologiques. Les vaisseaux tumoraux sont tortueux et de taille beaucoup plus irrégulière que ceux du tissu sain. Leur diamètre et leur espacement sont supérieurs à ceux des vaisseaux du tissu sain. Ces observations corrélerent avec la quantification histologique réalisée sur des tumeurs 9L^{**} cultivées et implantées orthotopiquement chez la souris Nude [Serduc R 2006]. Le suivi *in vivo* par IRM montre également un volume sanguin tumoral et un indice de taille des vaisseaux élevés, illustrant la nature très angiogénique du modèle 9L. À J₁₀, le rapport entre le volume sanguin tumoral et celui de l'hémisphère controlatéral est de 2. Cet ordre de grandeur est en accord avec

^{**} Les cellules 9L utilisées lors des travaux de thèse de Raphaël Serduc, de Pierrick Regnard et de ce manuscrit sont issues du pool commun de cellules ramené du National Brookaven Laboratory par Géraldine Le Duc en 1997.

la littérature pour des études similaires menées sur le même modèle (rapport de 1.6 en IRM et de 2.35 en histologie) [Pathak AP *et al.* 2001]. Un pourcentage de volume sanguin plus bas est observé dès J₁₄ et peut être expliqué par une diminution de la perfusion du centre de la tumeur (moyennage des pixels). De telles conclusions avaient déjà été évoquées sur le même modèle [Regnard P. 2007]. Dans d'autres laboratoires, une caractérisation par tomographie a également révélé une tortuosité vasculaire plus élevée au niveau des tumeurs 9L que dans l'hémisphère cérébral sain [Darpolor MM *et al.* 2011].

L'hyper-vascularisation des tissus tumoraux non nécrotiques est accompagnée d'une cellularité très élevée. Les cellules présentent des noyaux ronds à ovales, de tailles conventionnelles pour la plupart. Elles ont un aspect relativement homogène reflétant une anisonucléose faible et constante dans le temps. Un comptage des cellules mitotiques et un immuno-marquage de la protéine Ki67 ont permis d'estimer l'index mitotique et prolifératif de notre modèle. Ces deux index complémentaires permettent d'évaluer respectivement la fraction de cellules tumorales entrées en cycle cellulaire et le nombre de cellules effectivement capables de se diviser. Un index prolifératif supérieur à 20% et la présence de plusieurs mitoses par champs d'observation sont requis pour la classification en astrocytome de grade IV (glioblastome ou gliosarcome). Les tumeurs 9L présentent largement ces critères et ce quel que soit le stade de leur développement. Parmi les cellules mitotiques, un nombre limité de cellules mitotiques polyploïdes et pycno-mitotiques (moins de 25% des cellules mitotiques pour tous les temps) démontrent une capacité de mitose efficace élevée et *turn-over* faible. Ceci corrèle avec les résultats précédemment obtenus par cytométrie de flux sur le même modèle où les cellules endorépliquatives ou apoptotiques/nécrotiques atteignaient respectivement 3,3% et 2,6% des cellules tumorales totales, pour 62% de cellules en phase G0/G1 et 22% en G2/M [Bouchet A *et al.* 2012]. La capacité de prolifération élevée et le faible *turn-over* des tumeurs 9L explique leur croissance tumorale rapide et la faible médiane de survie des animaux associée (19 jours), en accord avec la littérature [Masi BC *et al.* 2012; Portnow J *et al.* 2002].

L'éventuelle nature astrocytaire de la lésion a été testée par le marquage de la protéine GFAP qui constitue les filaments intermédiaires spécifiques des astrocytes. La masse tumorale n'a présenté aucune immunoréactivité pour cette protéine ce qui témoigne de cellules très peu différenciées et ne présentant pas les critères astrocytaires. Ceci corrèle avec la description faite sur les tumeurs originelles [Benda P. *et al.* 1971; Stojiljkovic M *et al.* 2003]. La protéine GFAP

permet également de visualiser la gliose réactionnelle qui peut être mise en place en réponse à l'invasion du parenchyme cérébral sain.

Dans notre modèle une telle réaction péri-lésionnelle est systématiquement visible dès J₁₀ et perdure jusqu'à J₁₈. Chez le rat Wistar, une gliose réactionnelle apparaît à partir du 14^{ème} jour post-implantation seulement, alors qu'une réaction plus forte aurait été envisagée sur ces rats allogéniques pour les cellules 9L [Stojiljkovic M *et al.* 2003]. La comparaison stricte de ces deux jeux de données reste délicate du fait de différences de protocole au moment de l'implantation. De plus la croissance tumorale chez ces rats a une allure linéaire alors qu'elle est classiquement exponentielle chez le rat Fischer syngénique des 9L [Bouchet A *et al.* 2010; Darpolor MM *et al.* 2011; Regnard P. 2007].

Enfin, la présence de leucocytes et macrophages/monocytes activés (antigène ED1) observée dans notre modèle, indique une réaction immunitaire du rat Fisher contre les tumeurs 9L, comme décrit dans la littérature [Denlinger RH *et al.* 1975; Goldbrunner RH *et al.* 2000]. Notons cependant que dans notre cas, la réaction immunitaire mise en place chez le rat Fischer immunocompétent est dépassée par la progression tumorale : notre taux de prise tumorale est de 100% et aucune régression tumorale spontanée n'a été observée, contrairement à ce que relatent certains auteurs [Barth RF 1998; Barth RF *et al.* 2009].

Enfin sur le plan moléculaire les cellules 9L décrites dans la littérature présentent des similitudes avec les gliomes humains de haut grade. A l'instar des glioblastomes humains, les cellules 9L présentent une mutation du gène p53 [Asai A *et al.* 1994; Schlegel J *et al.* 1999], associée à une diminution des capacités apoptotiques et à une résistance aux radiothérapies. De plus, les cellules 9L^{††} présentent une capacité de réparation des lésions double-brins de l'ADN supérieure aux autres lignées cellulaires largement utilisées (C6 et F98) : 15h étant nécessaire à la réparation de l'intégralité des DSB provoquées par une exposition à 2 Gy chez les cellules 9L contre plus de 25h pour les cellules C6 et F98 [Bencokova Z. *et al.* 2008]. Le système de réparation NHEJ des cellules 9L est plus performant ce qui explique la radiorésistance importante de ces cellules 9L. La recombinaison homologue est active pendant les phases S-G2/M du cycle cellulaire et nécessite l'intervention de la protéine BRCA1. Parmi les modèles de rongeur testés, seules les cellules 9L ont présenté une réponse caractéristique de BRCA1 après exposition aux rayons X (c. à d. présence de

^{††} Lignée 9L présente à l'ESRF.

BRAC1 en foci nucléaires) [Bencokova Z. *et al.* 2008]. En dehors des informations concernant les mécanismes de réparation des lésions de l'ADN, l'étude de Sibenaller *et al.* menée sur 1 176 gènes par microarray est à notre connaissance la plus complète sur le plan de l'expression des gènes des cellules 9L [Sibenaller ZA *et al.* 2005]. Elle a permis de déterminer une surexpression du récepteur à l'EGF et de certains de ses ligands comme le TGF α (*Transforming Growth Factor alpha*) rappelant celle des glioblastomes humains. Une divergence par rapport à ces derniers est cependant détectable puisque les tumeurs 9L ne présentent pas de sur-expression ou de mutation du gène suppresseur de tumeur PTEN, de p16, de FGFR-1 (*Fibroblast Growth Factor Receptor-1*) et PDGFR β (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor beta*) [Sibenaller ZA *et al.* 2005]. Les techniques de hauts débits actuellement disponibles permettent de compléter cette investigation et devront être envisagées pour caractériser pleinement ce modèle tumoral.

Au-delà des comparaisons avec d'autres modèles précliniques où d'autres protocoles d'implantation des tumeurs 9L, le modèle 9L de l'ESRF présente bien les caractéristiques d'un gliome de grade IV selon la classification de l'OMS (§I-B - I - p4).

Pour conclure, nous avons vérifié que le modèle tumoral utilisé est reproductible et stable dans le temps. Ces paramètres sont essentiels dans ce projet de thèse pour lequel l'utilisation du faisceau synchrotron est assujettie à l'attribution de temps de faisceaux à dates fixes, obligeant des comparaisons intra- mais aussi inter-expériences sur une durée de 3 ans. Au-delà de cette vérification, nous avons approfondi la caractérisation du modèle au sein du laboratoire en illustrant et quantifiant certaines caractéristiques jusqu'alors non étudiées. Cette caractérisation histologique permet aussi de mieux positionner le travail effectué à l'ESRF sur ce modèle, face à d'autres modèles fréquemment utilisés chez le rongeur (C6, F98, RG2) pour revue [Barth RF *et al.* 2009; Jacobs Valérie J. *et al.* 2011]).

II - Réponse transcriptomique précoce des tumeurs 9L et des tissus cérébraux sains à la MRT

Comme décrit précédemment (§ III - D - III - p65) plusieurs études se sont intéressées aux mécanismes par lesquels la MRT produisait un effet différentiel sur les tissus sains et tumoraux ; préservant les premiers et détruisant tout ou partie des 2^{nds}. L'hypothèse d'un effet préférentiel de la MRT sur les vaisseaux tumoraux a largement été expérimentée [Bouchet A *et al.* 2010; Dilmajian F.A. *et al.* 2003; Sabatasso S *et al.* 2011; Serduc R. *et al.* 2008a; Van der Sanden B. *et al.* 2010]. L'effet vasculaire ne peut cependant pas expliquer à lui seul l'efficacité de la MRT puisqu'une inhibition de la croissance tumorale a été observée en amont de l'effet vasculaire [Bouchet A *et al.* 2010]. D'autres hypothèses ont été proposées dont un effet cytotoxique sur les cellules tumorales, une communication intercellulaire accrue par le mouvement des cellules tumorales après MRT ou encore une réponse inflammatoire singulière [Bouchet A *et al.* 2010; Crosbie J. C. *et al.* 2010; Sprung CN *et al.* 2012]. Ces travaux, quoique significatifs restent néanmoins difficiles à relier entre eux, empêchant une compréhension globale des processus mis en place après MRT. Nous proposons dans cette étude d'améliorer les connaissances entourant la biologie de la MRT en utilisant une approche transcriptomique. Nous chercherons donc dans cette étude à :

- établir une description de la réponse transcriptomique précoce (*c. à d.* 6h post irradiation) des tissus sains et tumoraux à la MRT pouvant servir de base de connaissance pour diverses approches.
- exploiter les différences de réponse entre les deux types de tissu afin de mieux comprendre l'effet différentiel de la MRT.

Comme précisé dans le Tableau 14, 48 rats ont été implantés selon les conditions détaillées § II-C - (n=20 et n=28 pour la 1^{ère} et 2^{ème} session expérimentale désignées par S₁ et S₂). Neuf jours après implantation les tumeurs sont visualisées par IRM (§ II-D - p76) afin d'intégrer de façon randomisée, un groupe témoin (non traité) et un groupe traité par MRT au 10^{ème} jour post-implantation (§ III - A - II - p78). Au sein des deux groupes, entre 9 et 10 rats sont sacrifiés 6h après l'irradiation, selon la procédure décrite § IV - A - p83, afin que leur tissu cérébral soit analysés par microarray, PCR ou par histologie. Les animaux restant entrent dans un protocole de survie. En effet, les choix expérimentaux nous ont amené à utiliser des paramètres d'irradiation sub-

optimaux (400 Gy, unidirectionnel) dont l'efficacité sur la survie n'a jamais été testée *in vivo*, la plupart des expériences utilisant des balistiques de croisement de faisceaux.

		Survie	Sacrifice			
			Totaux	Microarray 6h	PCR 6h	Immunohistologie
MRT (n)	S1	5	6	3	6	2 (6h), 2 (48h)
	S2	13	3	3	3	2 (6h), 2 (48h)
Témoin (n)	S1	4	5	3	5	2 (6h), 2 (48h)
	S2	7	5	2	5	2 (6h), 2 (48h)

Tableau 14: Répartition du nombre d'animaux irradiés (MRT) ou non (témoins) dans les groupes de survie ou de sacrifice pour analyses par microarray, PCR ou immuno-histologiques, lors deux sessions expérimentales S_1 et S_2 .

Les valeurs d'intensité obtenues par microarray selon la procédure décrite § V-D - (MM) sont confrontées comme indiqué Figure 63 pour chaque tissu et chaque session expérimentale.

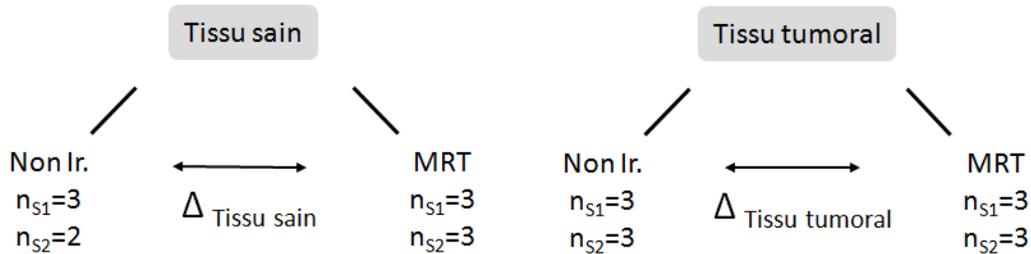


Figure 63 : Schéma de comparaison des données issues de 2 sessions expérimentales (S_1 et S_2) et nombre d'échantillons associés au sein des tissus sains et tumoraux. Les différences significatives entre les tissus non irradiés (non ir.) et irradié par MRT (MRT) constituent la réponse des tissus sains controlatéraux ou tumoraux à la MRT ($\Delta_{\text{Tissu sain}}$ OU $\Delta_{\text{Tissu tumoral}}$).

A - Survie des animaux

Les 2 groupes d'animaux traités par MRT présentent une augmentation significative de leur médiane de survie par rapport aux groupes de rats non traités, lors des deux sessions expérimentales : 30 *versus* 19 jours, $p=0,0164$ pour la 1^{ère} session et 33 *versus* 20 jours, $p=0,0002$ pour la 2^{ème} session. Il n'y a aucune différence significative de survie entre les deux groupes d'animaux traités ($p=0,6234$). Outre des médianes de survie très similaires, le pourcentage de survivants à long terme est également proche, respectivement 14,3 et 15,4% cent jours après l'inoculation tumorale. Du fait de cette forte reproductibilité entre les deux expériences, nous avons couplé les données des deux sessions expérimentales (Figure 64).

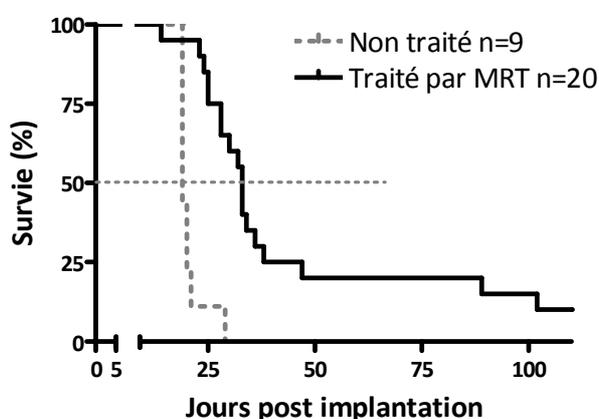


Figure 64: Représentation de Kaplan-Meier de la courbe de survie de rats porteurs de gliosarcomes intracérébrales 9L non traités (ligne grise pointillée) ou irradiés par MRT (ligne noire). La MRT augmente significativement la MST des animaux traités en comparaison avec les rats non irradiés (33 jours *versus* 19 jours, $p<0,0001$).

La médiane de survie est alors de 33 jours post-implantation contre 19 jours pour l'ensemble des rats non traités ($p<0,0001$). Lors du décès du dernier rat non traité (29 jours post-implantation) 65% des animaux traités sont encore en vie, illustrant clairement l'influence de MRT sur la survie des animaux même lors d'un tir unidirectionnel.

Cette courbe de survie met en évidence la pertinence des paramètres choisis et leur efficacité, vérification qui nous a semblé indispensable avant de débiter les études transcriptomiques.

B - Réponse transcriptomique des tissus sains et tumoraux 6 h après MRT

La comparaison des tissus traités ou non par MRT permet d'accéder à la réponse de ces tissus à l'irradiation. Le niveau d'expression des ARN des tissus tumoraux et controlatéraux (n=5 pour les animaux non irradiés et n=6 pour les animaux irradiés par MRT) a été mesuré à l'aide de puces d'expression GeneChip® Rat Genome 230 Arrays d'Affymetrix. Afin de vérifier la reproductibilité et la robustesse de nos données transcriptomiques, nous avons confronté l'expression moyenne obtenue pour chaque *probe set*, lors des deux sessions expérimentales au sein d'un même tissu (Figure 65).

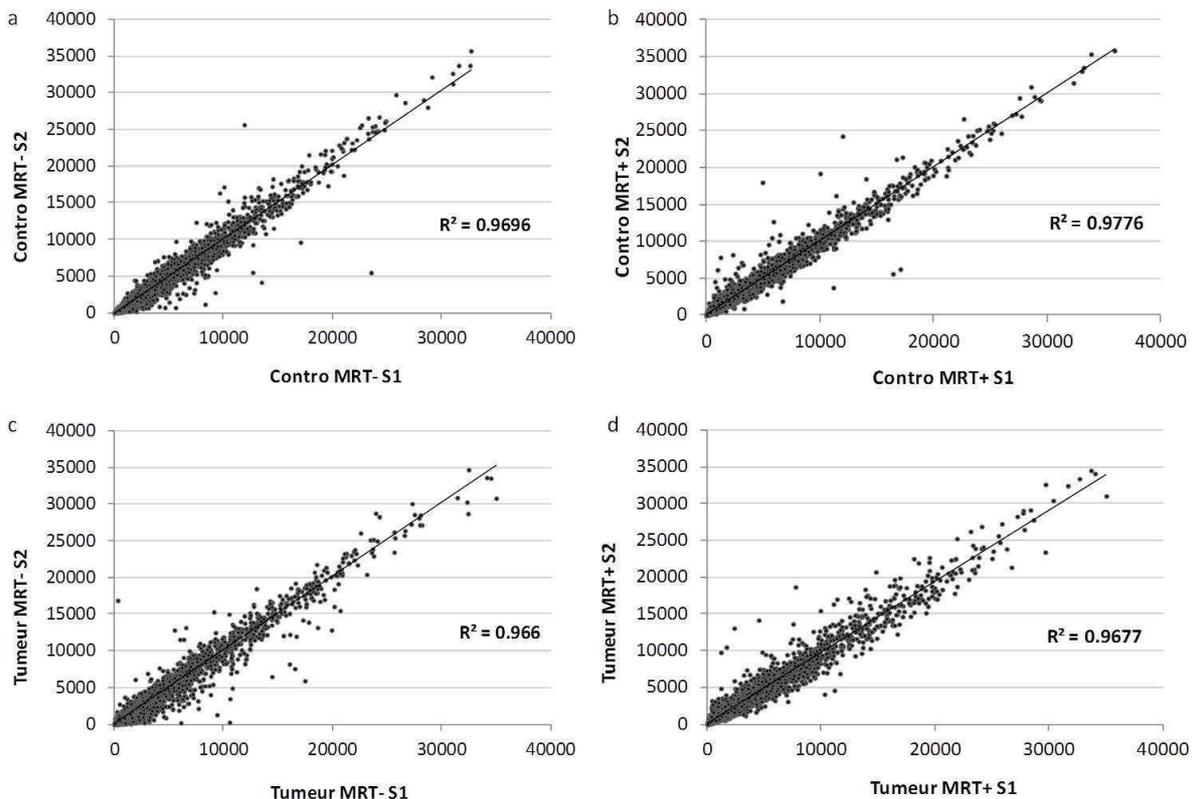


Figure 65 : Confrontation des valeurs d'intensité obtenues pour chaque *probe set* lors des deux sessions expérimentales (S₁ et S₂) dans le tissu controlatéral non irradié (Conto MRT-) (a), irradié par MRT (Conto MRT+) (b), le tissu tumoral non irradié (Tumeur MRT-) (c) et irradié par MRT (Tumeur MRT-) (d).

Les coefficients de corrélation linéaire sont supérieurs à 0,96 quel que soit le tissu et la condition d'irradiation considérés (R²=0,9776 et 0,9696 pour les tissus controlatéraux irradiés ou non par MRT ; R²=0,9677 et 0,966 pour les tumeurs irradiées ou non par MRT). Ceci révèle une très bonne reproductibilité de nos résultats sur l'ensemble des 31 000 *probe sets* testés, l'absence de variation globale entre les séries d'expérience et donc la possibilité de coupler les sessions expérimentales.

Les valeurs d'expression génique des tissus irradiés ou non par MRT, comparées par un test SAM et filtrés selon les critères détaillés § V-D - (MM), constituent la réponse transcriptomique précoce de chaque tissu 6h après MRT. Nous observons (i) une modification des profils transcriptomiques des tissus irradiés, (ii) une différence entre la réponse des tissus tumoraux et controlatéraux à la MRT (Figure 66a et b). En effet, 1 509 gènes répondent significativement dans le tissu controlatéral (1 011 étant induits et 498 réprimés) et 554 gènes dans la tumeur (344 étant induits et 210 réprimés). Parmi eux, 319 (dont 227 induits et 92 réprimés) sont communs aux deux tissus comme représenté sur le diagramme de Venn (Figure 66c).

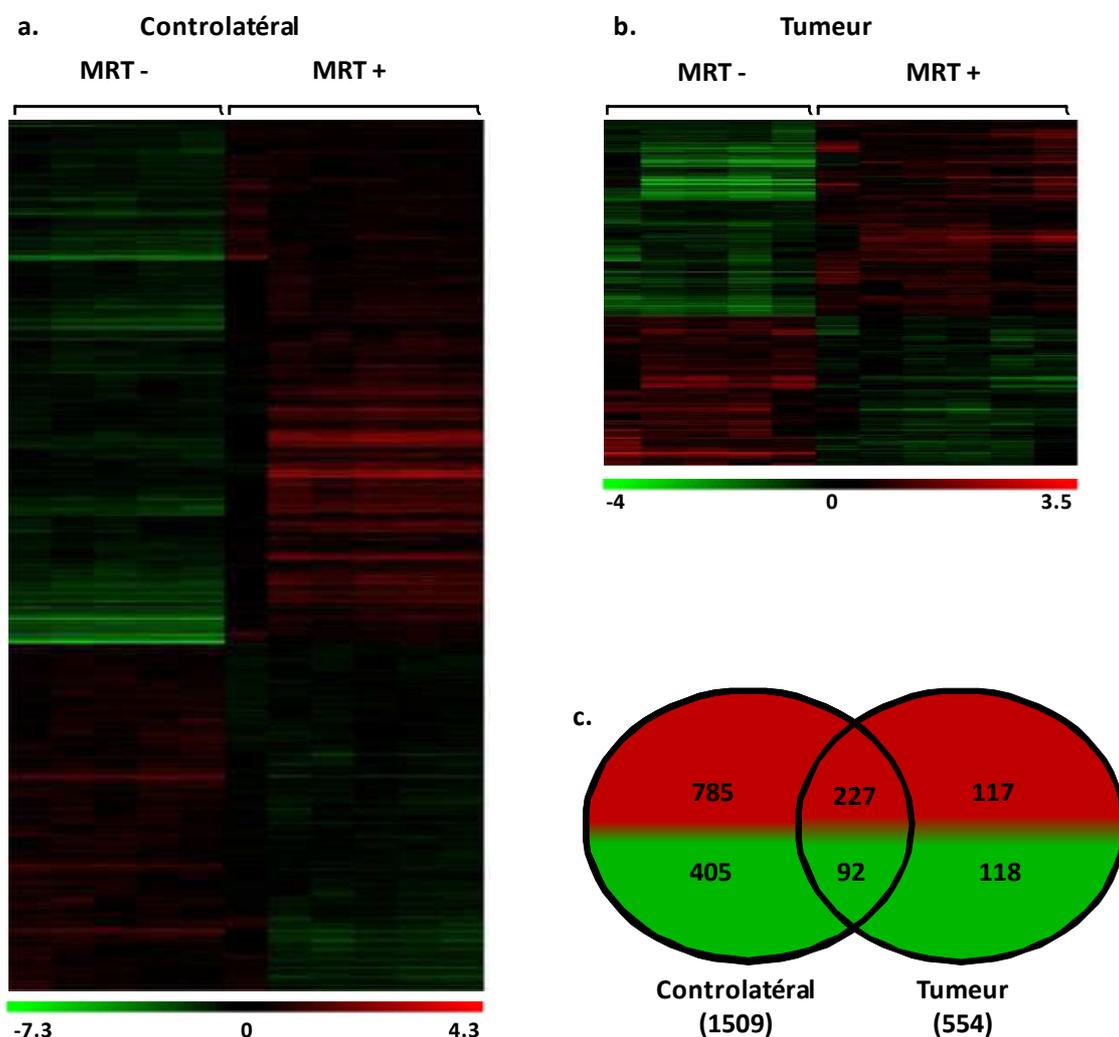


Figure 66 : Influence de la MRT sur l'expression des gènes dans la tumeur et dans le tissu cérébral controlatéral. a et b- Cartes d'expression présentant les pertes et gains d'expression génique après MRT dans la tumeur (a) et dans le tissu cérébral controlatéral (b). Les couleurs indiquent le niveau d'expression supérieur (rouge) ou inférieur (vert) à la médiane d'expression de chaque gène pour chaque échantillon. c- Diagramme de Venn présentant le nombre de gènes significativement sur- ou sous exprimés (respectivement représentés en rouge et en vert) après MRT dans la tumeur et dans les tissus cérébraux controlatéraux par rapport au tissus non irradiés.

Les 319 *probe sets* communs sont affectés par le même type de modification (c.à d. régulation positive ou négative) dans le tissu tumoral et controlatéral. Le niveau de modulation de son expression peut cependant différer entre les deux tissus.

La MRT modifie respectivement 1,8 et 5% de la totalité des *probe sets* testés dans la tumeur et le tissu controlatéral, ce qui est relativement peu par rapport au nombre de gènes testés. De fait, il semble important d'évaluer les valeurs des coefficients de corrélation linéaire seulement pour les *probe sets* ayant répondu significativement à la MRT. La comparaison de leur intensité moyenne pour chacune de deux sessions expérimentales et pour chaque tissu est illustrée Figure 67.

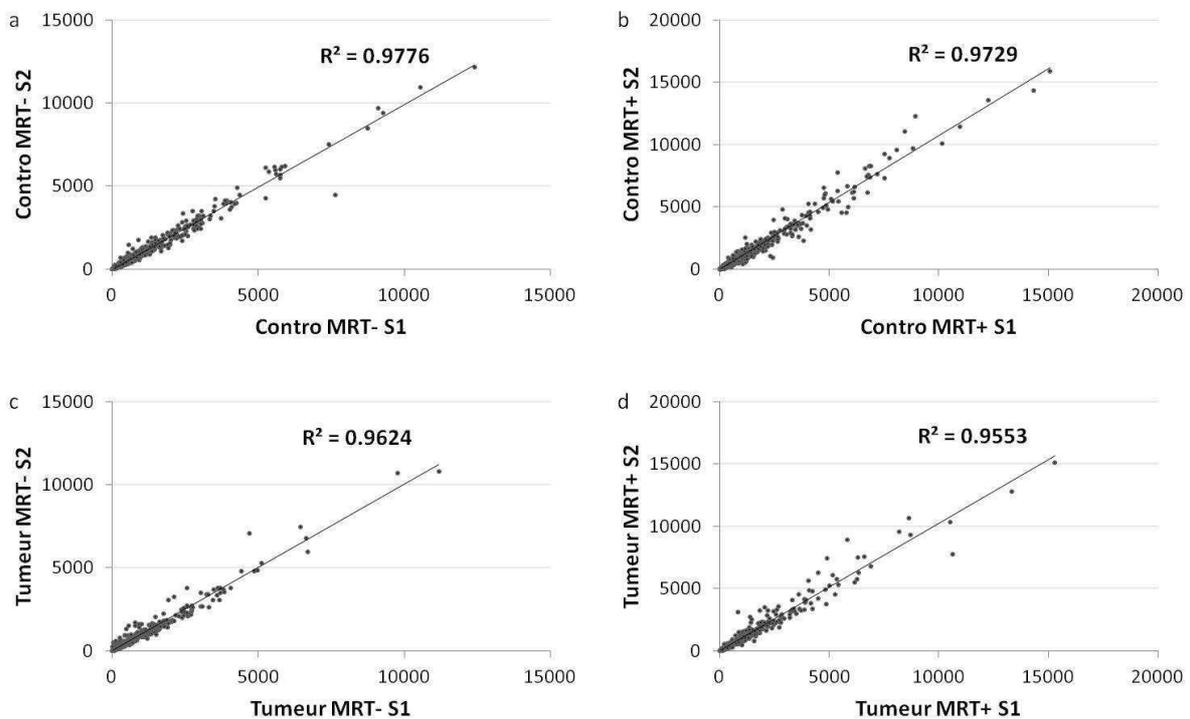


Figure 67 : Comparaison des valeurs d'intensité obtenues lors des deux sessions expérimentales (S_1 et S_2) dans le tissu controlatéral non irradié (a), irradié par MRT (b), le tissu tumoral non irradié (c) et irradié par MRT (d) pour les *probe sets* dont l'expression est significativement modulée par la MRT.

Comme pour la comparaison globale des données, l'intensité du signal des *probe sets* répondant significativement à la MRT est similaire lors des deux sessions expérimentales ($0,9553 < R^2 < 0,9776$ quel que soit le groupe considéré, Figure 67). Ceci confirme la possibilité de coupler les données issues des deux séries expérimentales. Les facteurs de variation d'expression (*fold-change*) induits par la MRT présentent également une reproductibilité satisfaisante, les coefficients de

corrélation étant respectivement de 0,9446 et 0,7614 pour les tissus sains et tumoraux (Figure 68).

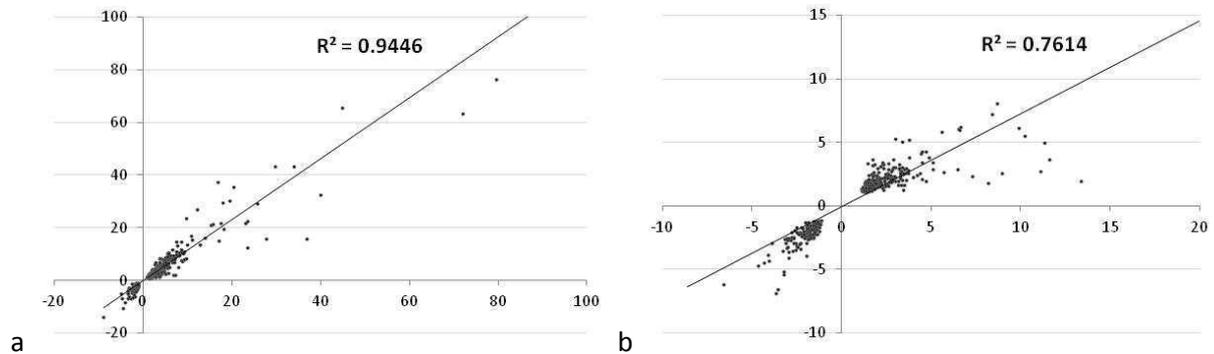


Figure 68 : Comparaison des facteurs de variation (*fold-change*) d'expression induits par la MRT lors des deux sessions expérimentales (S_1 en abscisse et S_2 en ordonnée) pour le tissu sain controlatéral (a) et le tissu tumoral (b).

L'expression d'un groupe de 9 gènes, choisi parmi les *probe sets* présentant des *fold-changes* supérieurs à 2, a ensuite été examinée en qRT-PCR dans le but de :

- valider les modulations d'expression obtenues par puce,
- vérifier la représentativité des échantillons utilisés pour l'analyse par puce.

Cette vérification a d'abord été menée sur les échantillons analysés sur puce (n=5 et 6 pour le groupe non irradié et MRT, respectivement). Les résultats sont qualitativement identiques à ceux des puces d'expression : le sens de modulation de l'expression des gènes est identique avec les deux techniques d'analyse. Des résultats similaires ont été obtenus en qRT-PCR sur des échantillons additionnels, non analysés sur puce mais issus de la même campagne d'expériences (n total=6 à 10 pour les tumeurs non traitées et 6 à 9 pour les tumeurs traitées par MRT selon les gènes testés et la disponibilité des échantillons (Figure 69)).

L'expression de tous les gènes testés en qRT-PCR montre des différences significatives entre les tumeurs traitées et non traitées ($p < 0,05$). Les facteurs de variation (*fold-change*) obtenus par RT-PCR sont supérieurs à ceux issus des puces pour 3 des ARNm testés (Fam64a, Inhbe et Trib3). Cependant ceci est fréquemment observé dans ce type de comparaison et est inhérent aux différences de sensibilité et de séquences d'oligonucléotides utilisées dans les deux techniques.

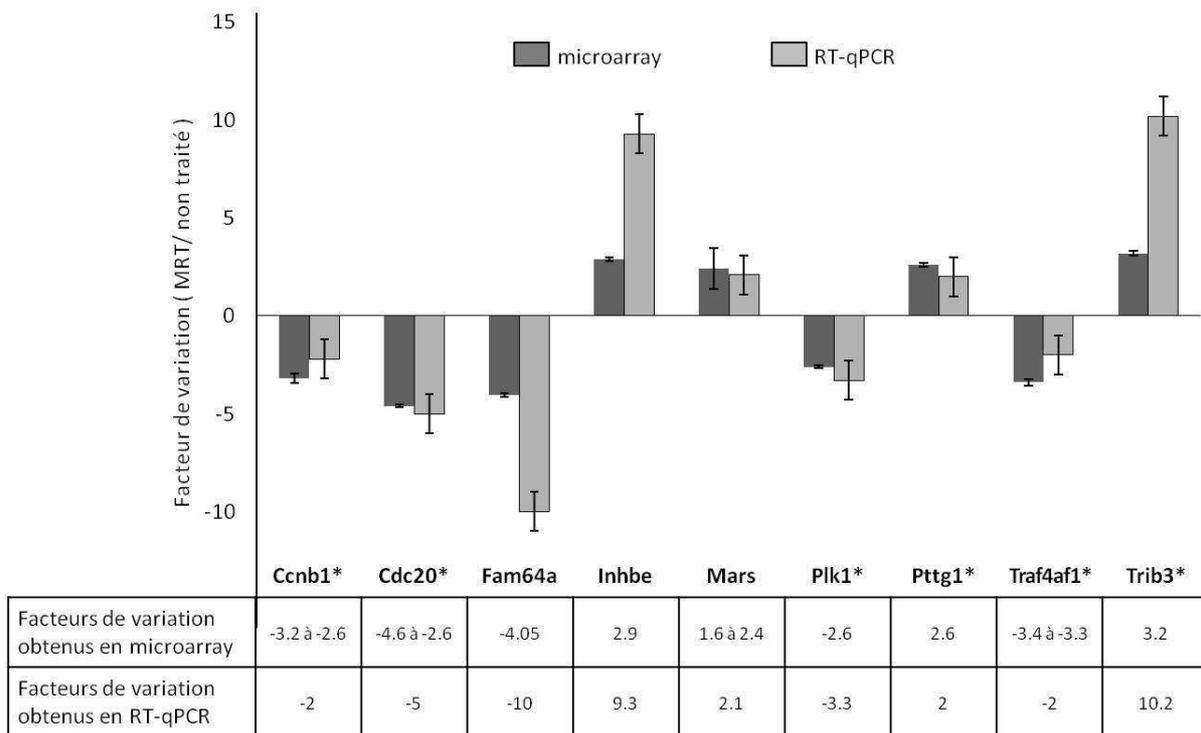
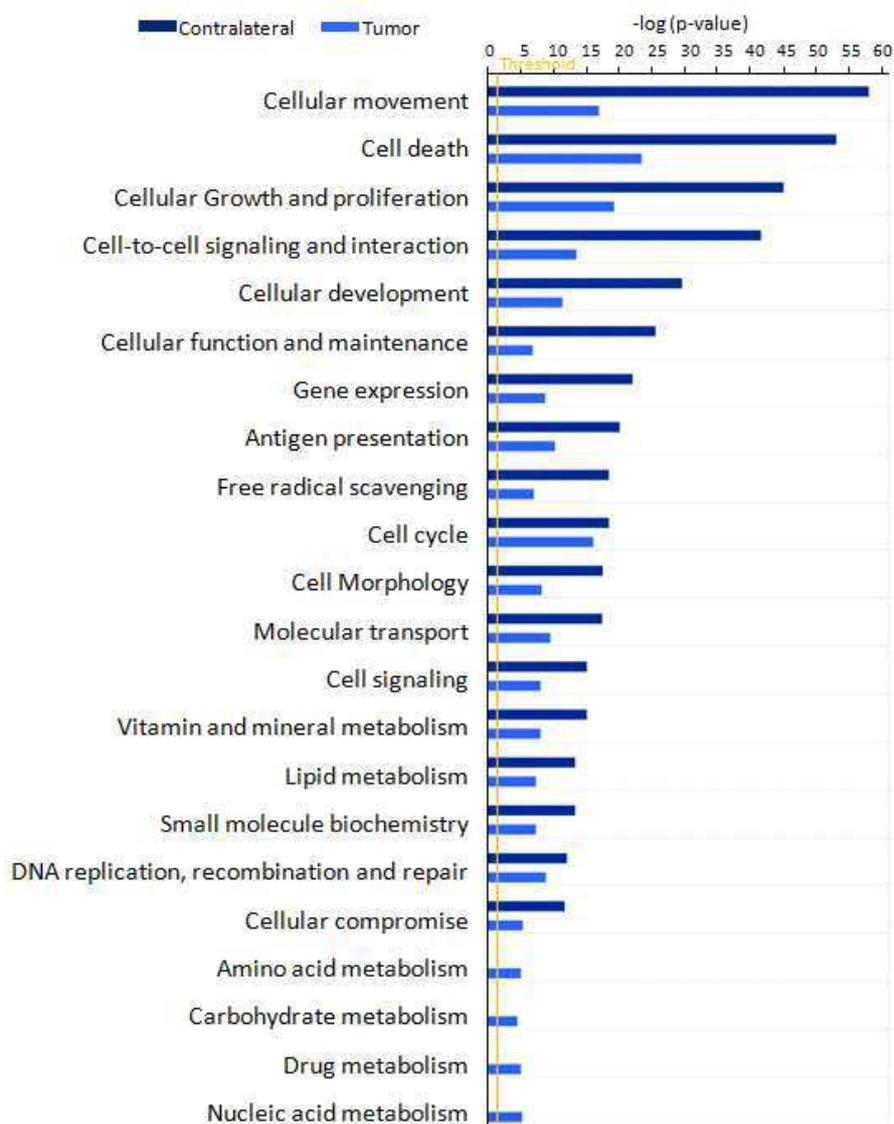


Figure 69 : Validation par qRT-PCR des résultats obtenus sur puces sur échantillons tumoraux. Les données sont normalisées grâce aux gènes de ménages *Arcp1* et *Atp5b*. Les facteurs multiplicatifs de variations (fold-change (FC) \pm SEM) obtenus 6h après irradiation sont le résultat de la comparaison de 5 tumeurs non traitées et 6 tumeurs traitées par MRT pour les puces et de 6 à 10 tumeurs non traitées et de 6 à 9 tumeurs traitées par MRT pour la RT-q-PCR. Tous les gènes testés présentent une différence significative d'expression entre les tumeurs traitées ou non par MRT (p -value inférieure à 0,05 ; t -test). Les astérisques indiquent les gènes également identifiés comme gènes d'intérêt dans l'étude 3 de ce manuscrit.

C - Identification des fonctions biologiques impliquées dans la réponse à la MRT des tumeurs 9L et des tissus cérébraux controlatéraux

Les gènes précédemment identifiés dans la réponse à la MRT ont été classés en différentes catégories de bio-fonctions selon la base de données d'*Ingenuity Pathway Analysis* (Figure 70). La réponse précoce à la MRT (*i.e.* 6h post irradiation) implique respectivement 22 et 18 fonctions moléculaires et cellulaires dans la tumeur et le tissu controlatéral. Toutes les fonctions identifiées dans le tissu controlatéral sont également présentes dans le tissu tumoral mais avec une p -value supérieure, ce qui traduit l'implication de moins de gènes ou de gènes moins pertinents.



*les *p-values* sont calculées en utilisant un "right-tailed Fisher's exact test" dans le programme Ingenuity Pathways Analysis.

Figure 70 : Fonctions moléculaires et cellulaires associées aux transcrits significativement régulés dans la tumeur et dans le tissu cérébral sain (controlatéral) 6h après MRT. Les réponses des tissus controlatéraux et tumoraux sont respectivement représentées en bleu foncé et clair.

Les bio-fonctions identifiées sous les noms de « mort cellulaire », « croissance cellulaire », « prolifération cellulaire », « cycle cellulaire » et « fonction cellulaire et maintenance » sont reliées à la réponse des cellules aux dommages induits par les radiations (annotation fonctionnelle selon IPA). Les réactions inflammatoire et immunitaire sont également des annotations fonctionnelles communes des catégories « mouvement cellulaire », « présentation de l'antigène » et « interaction et signalisation intercellulaire ». Malgré un nombre de gènes modulés plus faible, la réponse des tumeurs 9L à la MRT implique 4 bio-fonctions de plus que le tissu cérébral controlatéral : « métabolisme de acides aminés » ($p=7,02^{-06}$), « métabolisme des

glucides » ($p=2,44^{-05}$), « métabolisme des drogues » ($p=7,02^{-06}$) et « métabolisme des acides nucléiques » ($p=4,55^{-06}$). Ces quatre bio-fonctions regroupent cependant un petit nombre de gènes et des *p-values* relativement hautes par rapport aux autres bio-fonctions de cette étude (Tableau 15).

Fonctions moléculaires et cellulaires	Nombre de gènes impliqués		<i>p-value</i> *	
	Controlatéral	Tumeur	Controlatéral	Tumeur
Mouvement cellulaire	275	96	6.58E-59 à 2.83E-10	9.13E-18 à 2.85E-05
Mort cellulaire	375	148	5.93E-54 à 3.01E-10	2.65E-24 à 3.31E-05
Prolifération et croissance cellulaire	379	145	6.42E-46 à 5.30E-11	4.21E-20 à 2.47E-05
Interaction et signalisation intercellulaire	240	73	1.76E-42 à 2.59E-10	2.31E-14 à 2.77E-05
Développement cellulaire	275	117	1.89E-30 à 2.66E-10	3.22E-12 à 3.10E-05
Fonctions cellulaire et maintenance	195	66	2.14E-26 à 2.17E-10	1.17E-07 à 2.44E-05
Expression de gène	234	89	6.62E-23 à 2.42E-10	1.38E-09 à 1.39E-05
Présentation antigénique	144	52	6.08E-21 à 2.83E-10	4.22E-11 à 2.77E-05
Capture de radicaux libres	64	24	2.80E-19 à 2.80E-10	7.53E-08 à 2.98E07
Cycle cellulaire	148	76	2.81E-19 à 2.47E-10	6.55E-17 à 3.04E-05
Morphologie cellulaire	99	49	2.36E-18 à 3.06E-12	4.66E-09 à 2.44E-05
Transport moléculaire	113	63	2.88E-18 à 2.17E-10	2.19E-10 à 1.00E-05
Signalisation cellulaire	156	42	6.27E-16 à 1.28E-10	7.02E-09 à 7.24E-06
Métabolisme des minéraux et vitamines	105	27	6.27E-16 à 6.69E-11	7.02E-09
Métabolisme lipidique	86	58	3.81E-14 à 2.65E-10	3.52E-08 à 1.00E-05
Biochimie des petites molécules	127	69	3.81E-14 à 2.65E-10	3.52E-08 à 1.00E-05
Réparation, recombinaison et réplication de l'ADN	77	30	6.76E-13 à 1.10E-10	1.14E-09 à 7.41E-06
Compromis cellulaire	46	12	1.49E-12 à 2.16E-10	3.67E-06 à 9.78E-06
Métabolisme des acides aminés	/	3	/	7.02E-06
Métabolisme des glucides	/	10	/	2.44E-05
Métabolisme des drogues	/	3	/	7.02E-06
Métabolisme des acides nucléiques	/	21	/	4.55E-06 à 7.41E-06

*les *p-values* sont calculées par le programme Ingenuity Pathways Analysis par un "right-tailed Fisher's exact test"

Tableau 15: Nombre de gènes et *p-value* associées aux **22 fonctions moléculaires et cellulaires** identifiées dans de la réponse des tissus tumoraux et sains controlatéraux à la MRT, 6h après l'irradiation.

D - Identification des voies de signalisation impliquées dans la réponse des tumeurs 9L et des tissus cérébraux controlatéraux à la MRT

Les fonctions moléculaires et cellulaires apportent une information d'ordre phénotypique. Les gènes qu'elles regroupent peuvent appartenir à plusieurs cascades (de signalisation ou métaboliques) y contribuant. Les voies de signalisation sont justement ces cascades. Leur mise

en œuvre peut également se faire dans le cadre de plusieurs fonctions moléculaires et cellulaires.

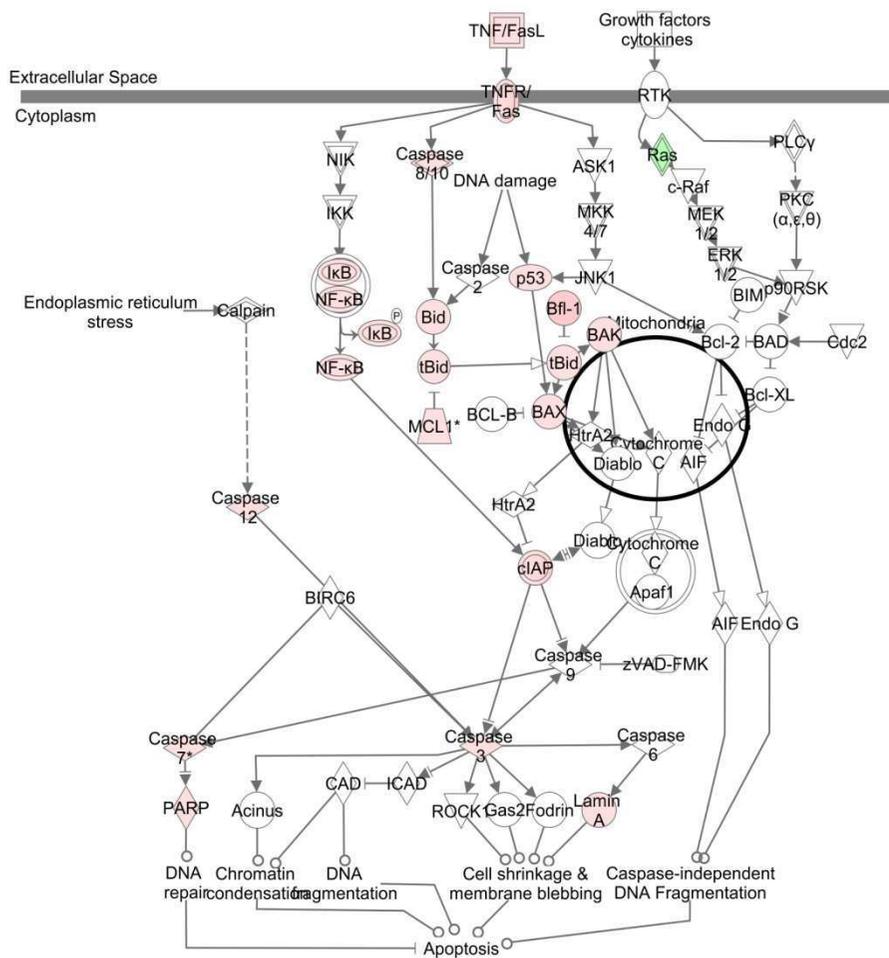
Six heures après irradiation, 205 et 221 voies de signalisation contiennent des gènes dont l'expression est respectivement modulée dans la tumeur et le tissu controlatéral. Parmi ces voies, 180 sont communes. Parmi les 10 principales voies communes (*p-value* les plus faibles), 9 sont en rapport avec la réaction immunitaire/inflammatoire et une avec l'apoptose (Tableau 16).

Voies de signalisation	Nombre de gènes impliqués		<i>p-value</i>	
	Controlatéral	Tumeur	Controlatéral	Tumeur
Voie de signalisation d'IL-6	30	11	1.58E-16	1.86E-06
Voie de signalisation de impliquées dans la phase aigue de réponse	38	16	5.01E-15	1.45E-07
Voie de signalisation de l'Interféron	17	4	1.00E-13	3.89E-03
Voie de signalisation de NFκB	35	13	7.94E-13	2.24E-05
Voie de signalisation de TREM1	19	9	7.94E-12	7.94E-07
Voie de signalisation de IL-10	21	9	1.26E-11	5.75E-06
Communication entre cellules dendritiques et cellules natural killer	24	7	1.26E-11	1.74E-03
Communication entre les cellules du système immunitaire inné et adaptatif	24	8	1.81E-11	3.62E-04
Voies de signalisation de l'apoptose	23	7	7.94E-11	1.62E-03
Voie de signalisation de CD40	15	9	4.08E-07	3.02E-06

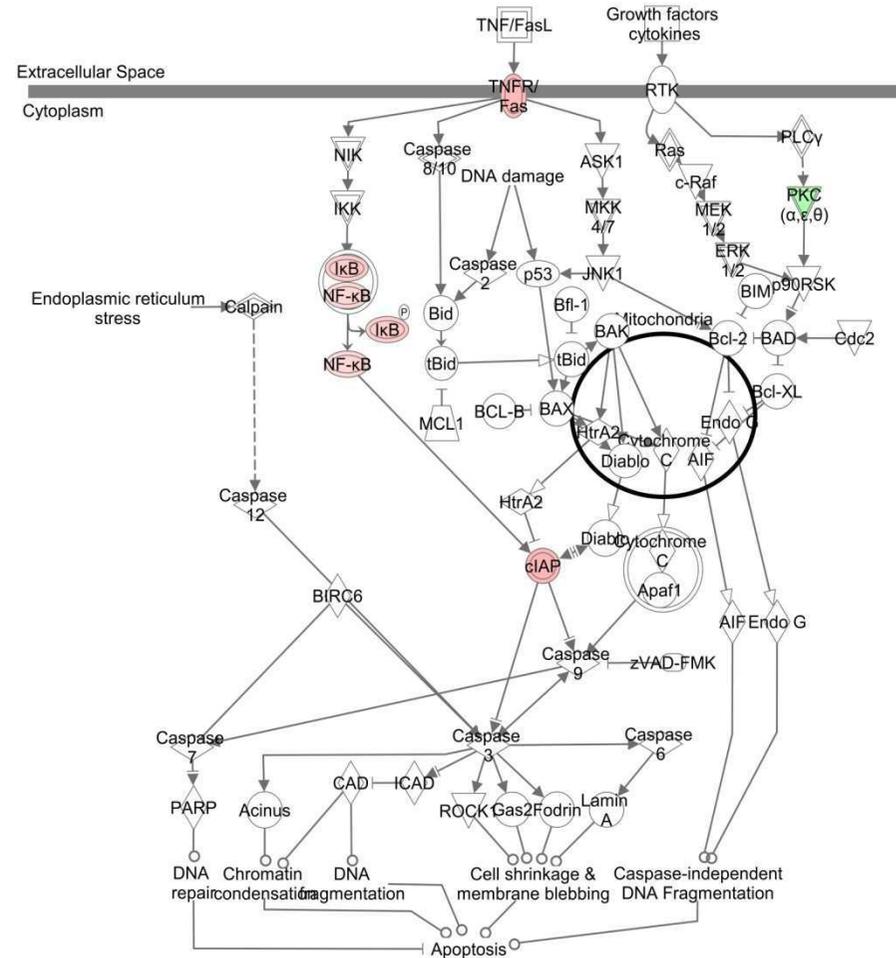
Tableau 16 : Nombre de gènes et *p-values* associées aux 10 principales **voies de signalisation** comportant des gènes dont l'expression est modulée 6h après MRT dans les tumeurs 9L et les tissus cérébraux controlatéraux. Les *p-values* sont calculées grâce au Fisher's exact test.

D - I - Exemple de l'apoptose : une même voie, des gènes différents

Comme pour les fonctions moléculaires et cellulaires, les gènes modulés au sein d'une voie de signalisation identique peuvent être en partie différents dans des tissus sains et tumoraux (Tableau 16). Ceci révèle une réponse différentielle à la MRT, entre les deux tissus, non pas en terme de voies de signalisation impliquées, mais en terme de nombre et de nature des gènes modulés au sein de ces voies. Dans le cas de l'apoptose par exemple, 23 gènes sont modulés après MRT dans le tissu controlatéral et 7 dans la tumeur. Leur positionnement au sein des voies apoptotiques permet de visualiser notre observation (Figure 71).



a 10-2012 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.



b 10-2012 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Figure 71: Gènes significativement modulés 6h après MRT dans les tissus sains contrôlatéraux (a) et tumoraux (b), replacés au sein des voies de signalisation impliquées dans l'apoptose. Les gènes dont l'expression est activée après MRT sont représentés en rouge, ceux réprimés en vert.

Les 2 tissus présentent un groupe commun de gènes surexprimés en réponse à la MRT : FAS, RELA (=NFκB), NFKBIA (=IκB), NFKB2 (=NFκB), NFKBIE (=IκB), BIRC3 (=cIAP). La résultante de l'activation de la transcription de ces gènes est difficile à évaluer. En effet, divers stimuli inflammatoires peuvent activer les facteurs de transcription de la famille NFκB et aboutir à une activité anti-apoptotique. La sur-expression de FAS et des inhibiteurs de NFκB (famille IκB) conduit cependant généralement au processus apoptotique. Il est donc difficile de conclure quant à l'activation ou l'inhibition de l'apoptose par l'intermédiaire de ce groupe de gènes.

Les gènes modulés uniquement dans les tissus sains contrôlés semblent eux être en faveur d'une augmentation de l'activité apoptotique (codant pour TP53 (=p53), TNFRSF1A (=TNFR), TNF, LMNA (=lamin A), BAX, NFKB1 (=NFκB), BAK1 (=BAK), PARP1 (=PARP), RRAS2 (=Ras), BID (=Bid), BCL2A1 (=Bcl2), BIRC2 (=cIAP), MCL1, les caspases 3, 7, 8 et 12). La surexpression des ARN codant pour p53, Bax, Bak, caspase 12 conduit à l'apoptose *via* la voie mitochondriale et celle codant pour le récepteur TNF et son ligand, caspases initiateur 8 et effectrices 3 et 7 participe à la voie des récepteurs de mort. Une interaction est mise en place entre elles par l'intermédiaire de Bid qui active la voie mitochondriale à partir de la voie des récepteurs de mort et par IAP qui active celle des récepteurs de mort à partir de la voie mitochondriale.

A contrario, la tumeur ne présente pas de modification de l'expression des gènes impliqués dans ces deux voies. Un seul ARN est modulé uniquement dans la tumeur : PRKCC (=PKC) mais présente un caractère pléiotrope.

Les données transcriptomiques démontrent une activation de l'apoptose post-MRT dans les tissus sains, impliquant la voie des récepteurs de mort et la voie mitochondriale. Par contre, même si l'apoptose semble identifiée comme une réponse à l'irradiation dans le cas du tissu tumoral, une analyse plus détaillée montre que les gènes regroupés sous cette voie n'en sont pas spécifiques.

La régulation de la voie apoptotique ne passe pas uniquement par des phénomènes transcriptomiques. En effet les cascades d'activation (des caspases notamment) résultent de nombreuses phosphorylations et clivages post-traductionnels. Nous avons donc cherché à vérifier si les différences transcriptomiques se reflétaient au niveau tissulaire en réalisant un marquage des cellules apoptotiques par la méthode TUNEL comme détaillé MM VI - B - I - (Figure 72).

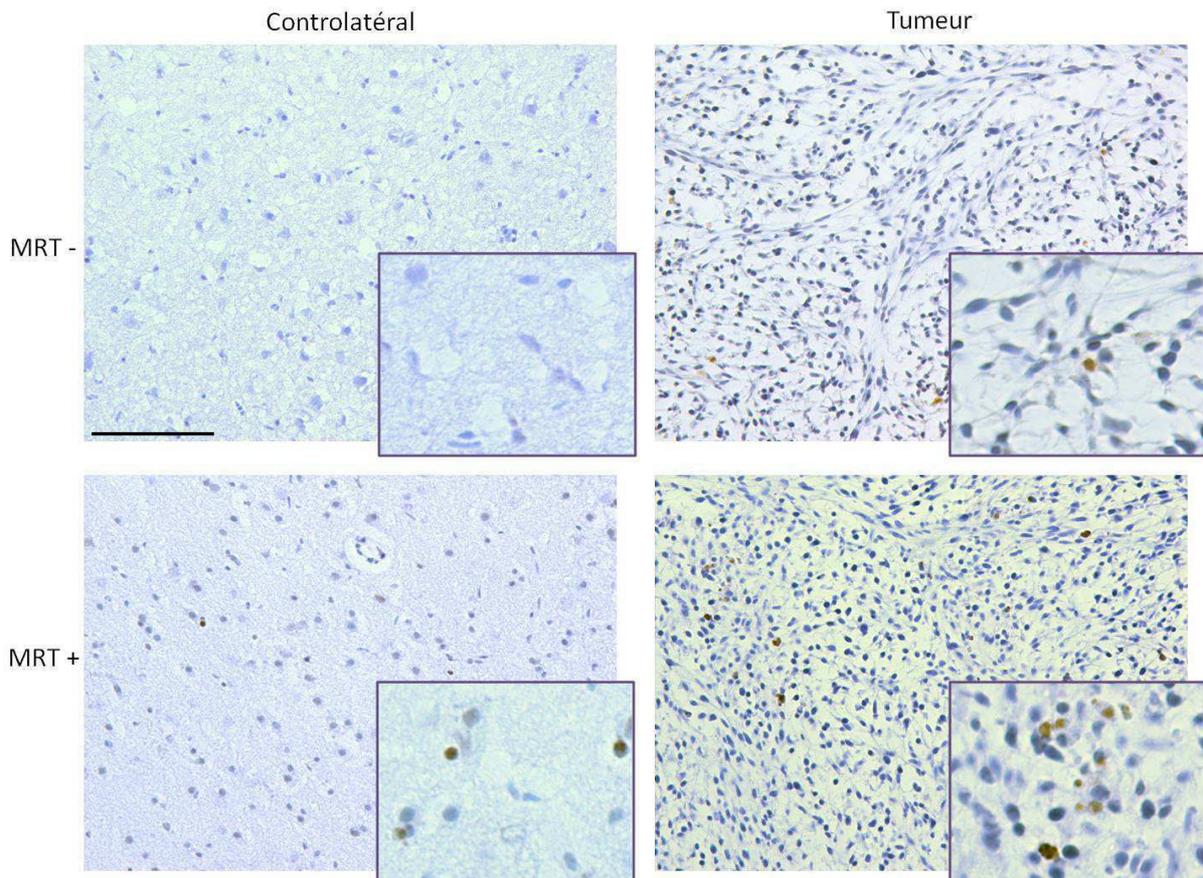


Figure 72 : Visualisation des cellules apoptotiques par marquage TUNEL (brun) au sein des tissus sains et tumoraux, 6h après irradiés ou non par MRT. Les noyaux sont colorés à l'hématoxyline. Barre d'échelle : 100 μ m.

Aucune cellule apoptotique n'est détectée dans le tissu sain à l'état basal mais elles sont clairement visibles après l'irradiation (cellules brunes, Figure 72). Au niveau tumoral, des cellules apoptotiques sont présentes même avant irradiation mais elles sont en nombre plus élevé après MRT. Ceci révèle la mise en place d'une réponse apoptotique même au niveau du tissu tumoral alors qu'elle est ambiguë au niveau transcriptomique. L'apoptose dans le tissu tumoral avant l'irradiation peut en partie expliquer que certains transcrits ne soient pas identifiés dans la réponse de ce tissu à la MRT.

À $J_{12}T_{48h}$, des cellules apoptotiques sont toujours détectables dans le tissu tumoral et de manière plus prononcée pour le groupe traité, alors qu'elles sont absentes du tissu sain (résultats non illustrés). Ceci établit également une différence de cinétique du processus dans les deux tissus.

L'apoptose constitue donc un bon exemple pour illustrer qu'une voie de signalisation, identifiée à la fois dans la réponse des tissus sains et des tissus tumoraux peut :

- regrouper des gènes de nature et nombre différents au sein des 2 tissus,

- comporter des gènes peu spécifiques de la voie,
- ne pas refléter le phénotype tissulaire.

D - II - Voies de signalisation modulées dans un seul des deux tissus

Certaines voies de signalisation ne sont associées qu'à la réponse à la MRT de l'un ou l'autre des tissus. Ainsi 41 voies se distinguent dans le tissu sain et 25 dans la tumeur. Parmi eux, seuls 11 et 3 voies présentent une $p\text{-value} < 0,05$ (Tableau 17).

Voies de signalisation	$p\text{-value}$	Nombre de gènes impliqués	Molécules impliquées
Tissus controlatéraux			
Système du complément	$2,95^{-05}$	9	C1R, SERPING1, C3, C5AR1, C1S, CFB, CFH, C3AR1, C2
Apoptose des lymphocytes T médié par le calcium	$6,17^{-05}$	12	CD247, LCK, TRB@, PRKCD, HLA-DRA, HLA-DQA1, FCER1G, HLA-DRB1, HLA-DMB, PRKCH, HLA-DQB1, ORAI1
Signalisation de Cdc42	$7,08^{-04}$	19	CD247, B2M, H2-T24, TRB@, ARPC1B, HLA-DQA1, HLA-DRB1, HLA-DMB, LIMK2, HLA-DQB1, FOS, JUN, HLA-E, HLA-DRA, BAIAP2, FCER1G, VAV1, CDC42SE1, HLA-C
Signalisation de Nur77 dans les lymphocytes T	$1,78^{-03}$	9	CD247, TRB@, CASP3, HLA-DRA, HLA-DQA1, FCER1G, HLA-DRB1, HLA-DMB, HLA-DQB1
Signalisation des intégrines	$6,92^{-03}$	9	RAP1B, RAP2B, RAC2, ARPC1B, RHOC, ASAP1, RALB, RGD1309537, RHOJ, Arf2, ITGAL, ITGB7, ITGB2, ARF6, RRAS2, RHOQ, CAV1, ITGA1, VASP
Signalisation des granzymes B	$7,59^{-03}$	4	CASP3, BID, CASP8, PARP1
Présentation des antigènes lipidiques par CD1	$1,74^{-02}$	4	B2M, TRB@, ARF6, FCER1G
Rôle des cytokines dans la communication entre les cellules immunitaires	$2,19^{-02}$	7	IL33, IL1A, IL18, IL12B, IL1B, IL6, TNF
Nucléation de l'actine par le complexe ARP-WASP	$2,34^{-02}$	7	RRAS2, RHOQ, ARPC1B, RHOC, BAIAP2, RHOJ, VASP
Signalisation de RhoA	$2,69^{-02}$	11	LPAR4, RHPN2, ARHGAP9, ARPC1B, EZR, BAIAP2, LIMK2, PIP5K1B, PLD1, CDC42EP4, MSN
Métabolisme du glutamate	$4,37^{-02}$	5	Aldh4a1, CCDC92, GCLC, GCLM, GFPT2
Tissus tumoraux			
Biosynthèse des aminoacyl-tRNA	$2,51^{-02}$	3	CARS, YARS, SARS
Rôles mitotiques de la Polo-Like Kinase	$3,09^{-02}$	4	CDC20, PLK1, FZR1, CCNB1
Dégradation de la Valine, Leucine et Isoleucine	$3,08^{-2}$	4	ACADL, PCCA, MCEE, ACAT1

Tableau 17 : Gènes et $p\text{-values}$ associées aux voies de signalisation impliquées dans la réponse à la MRT des tissus cérébraux sains ou tumoraux uniquement.

Les voies relatives au « système du complément » ($p=2,95^{-5}$), « apoptose des lymphocytes T induit par le calcium » ($p=6,17^{-5}$), « signalisation de Cdc42 » ($p=7,08^{-4}$), « signalisation de Nur77 dans les lymphocytes T » ($p=1,78^{-3}$), « signalisation des intégrines » ($p=6,92^{-3}$), « signalisation du granzyme B » ($p=7,59^{-3}$), « Présentation de l'antigène lipidique par CD1 » ($p=1,74^{-2}$), « rôle des cytokines la communication entre les cellules immunitaires » ($2,19^{-2}$), « Nucléation de l'actine par le complexe ARP-WASP » ($p=2,34^{-2}$), « signalisation de RhoA » ($p=2,69^{-2}$), « métabolisme du glutamate » ($p=4,37^{-2}$) sont impliquées dans la réponse à la MRT dans le tissu sain uniquement. Les voies de signalisation « biosynthèse des aminoacyl-ARNt » ($p=2,51^{-2}$), « rôles mitotiques de la Polo-like kinase » ($p=3,09^{-2}$) et « dégradation de la valine, leucine et isoleucine » ($p=3,08^{-2}$) sont impliquées dans la réponse précoce à la MRT dans la tumeur uniquement (Tableau 17).

III - Modifications transcriptomiques spécifiques de la tumeur après MRT

Nous avons identifié un groupe restreint de gènes présentant une implication dans la réponse à la MRT uniquement dans les tissus tumoraux. Il nous a semblé important de réduire notre champ d'investigation afin de nous focaliser sur les modifications de ces gènes et des les étudier sur une fenêtre de temps plus importante (jusqu'à 15 jours post-implantation).

Protocole expérimental

Les échantillons issus des 2 premières sessions expérimentales (S_1 et S_2) et ont été complétés lors de 4 autres expériences (S_3 , S_4 , S_5 et S_6) afin d'obtenir des tissus 6h ($J_{10}T_{6h}$), 48h ($J_{12}T_{48h}$), 96h ($J_{14}T_{96h}$) 8 jours ($J_{18}T_8$), 15 jours ($J_{25}T_{15}$) et 22 jours ($J_{32}T_{22}$) post-irradiation (Tableau 18).

Session Expérimentale S_x $J_{10+x}T_{0+x}$ Temps post implantation ou MRT			Nombre d'échantillon MRT +						Nombre d'échantillon MRT -					
			S_1	S_2	S_3	S_4	S_5	S_6	S_1	S_2	S_3	S_4	S_5	S_6
Transcripto- mique	$J_{10}T_{6h}$	C	3	3			3		3	2				
		T	3	3			3		3	2				
	$J_{12}T_{48h}$	C	2	2				3	2	2				
		T	2	3				2	2	2				
	$J_{18}T_8$	C			3			3			3	2		
		T			4			3			3	2		
	$J_{25}T_{15}$	C					4							
		T					4							
Histologie (Comptage entités - Surface tumorale)	$J_{10}T_{6h}$		0-3	2-3	1-0				1-3	2-3	2-3			
	$J_{12}T_{48h}$		1-3	1-3				3-0	2-3	2-3				
	$J_{14}T_{96h}$				1-3	2-3		2-0			2-3	2-3		
	$J_{18}T_8$				2-3	2-3		2-3			2-3	2-3		
	$J_{25}T_{15}$				2-3	2-3	2-4							
	$J_{32}T_{22}$				4-4									

Tableau 18: Nombre d'échantillons tumoraux (T) ou cérébraux controlatéraux (C) irradiés (MRT+) ou non (MRT-) obtenus lors de 6 sessions expérimentales (S_1 - S_6) à différents temps post-implantation (J) ou irradiation (T) et utilisés pour les expériences de transcriptomique ou d'histologie.

Les courbes de survie obtenues lors des 6 sessions expérimentales n'ont montré aucune différence significative (données non illustrées). Comme pour les animaux non traités présentés

dans l'étude de caractérisation du modèle (Résultats § I- A - III -), la médiane de survie des animaux traités par MRT est très proche : 30, 33, 36,5, 32, 30,5 et 32 jours respectivement pour les sessions 1 à 6.

A - Sélection des gènes répondant uniquement dans le tissu sain et absent du tissu tumoral

Le choix de gènes répondant significativement dans les tumeurs 9L six heures après MRT et dont l'expression est non détectée dans le tissu cérébral controlatéral (irradié ou non) a été effectué par sélection successive comme illustré sur la Figure 73.

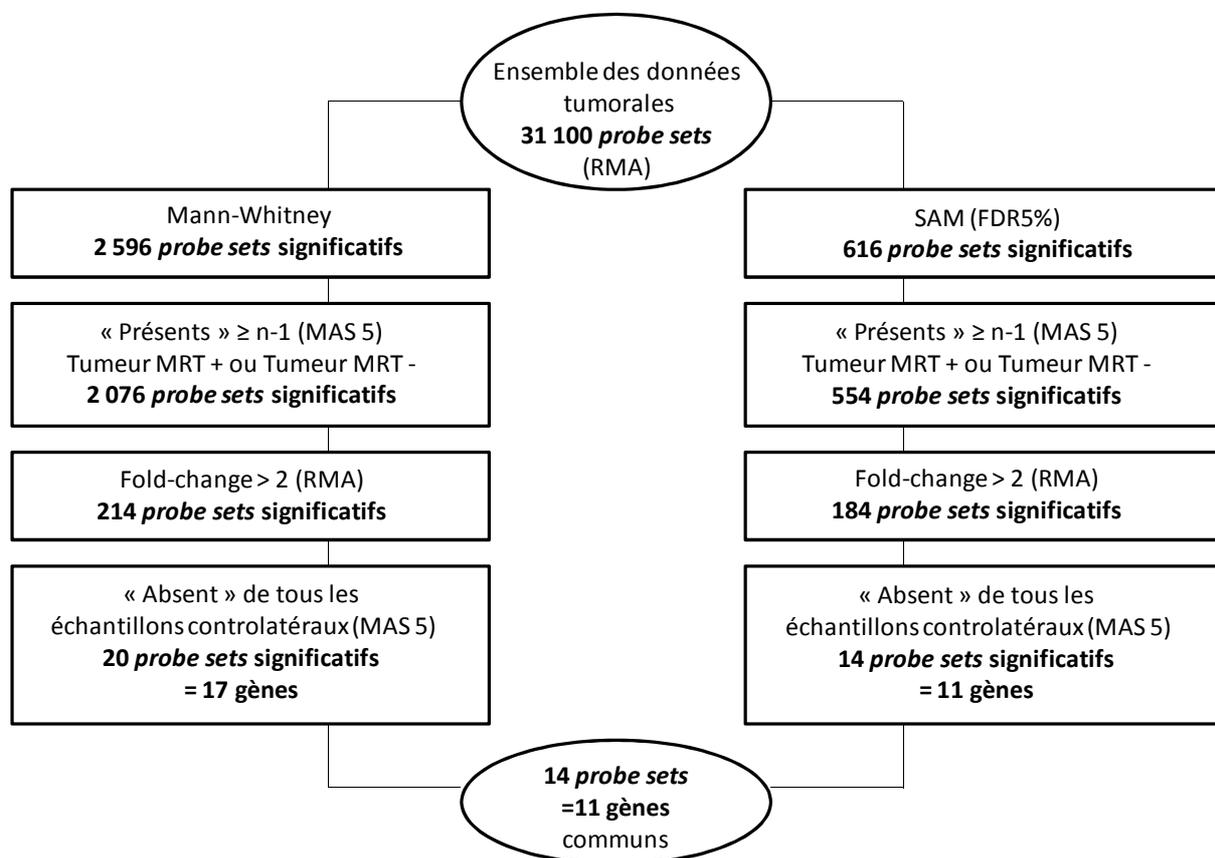


Figure 73 : Critères successifs conduisant à la sélection d'un groupe de gènes répondant significativement 6h après MRT dans les tissus tumoraux mais non détectés dans les tissus cérébraux controlatéraux irradiés par MRT ou non.

L'analyse de la réponse précoce des tissus 6h après l'irradiation a été réalisée par 2 approches statistiques : test Mann & Withney (M&W) et test SAM identifiant dans les tissus tumoraux respectivement 2 596 et 616 probsets répondant significativement. Parmi eux, seuls 20 probsets

issus du test M&W et 14 issus du test SAM, possèdent un signal « présent » pour au moins n-1 échantillons du groupe tumoral traité ou non traité (normalisation MAS5), un taux de modulation supérieur à 2 et un signal « absent » dans l'intégralité des échantillons tumoraux. Plusieurs *probe sets* correspondant à un même gène, 17 et 11 gènes respectivement issus des tests M&W et SAM sont finalement sélectionnés.

Onze d'entre eux sont communs : Areg, Trib3, Nppb, Dlgap5, Clefcsf6, Cdc20, Plk1, Cenpf, Kif20a, Ccnb1 et Traf4af1. L'expression de Depdc1b, Mxd3 et Pttg1 est également significativement modifiée après MRT selon le test M&W et SAM avec un FDR de 10%. Les transcrits Cenpe, LOC689399 et Bub1b ne sont identifiés que par le test M&W (Tableau 19). Parmi ces 17 gènes, seuls 3 (Areg, Trib3 et Nppb) sont sur-exprimés après MRT, l'expression des 14 autres est réprimée.

Symbole des gènes	Noms des gènes	Probe Set ID	RefSeq Transcript ID	Ratio	SAM*	SAM*	M&W*
				MRT/ Non irradié	FDR 5%	FDR 10%	(p-value)
Areg	Amphiréguline	1369871_at	NM_017123	3,24	+	+	6,17-03
Trib3	tribbles homolog 3	1370695_s_at	NM_144755	3,18	+	+	6,17-03
Nppb	natriuretic peptide precursor B	1367616_at	NM_031545	3,01	+	+	6,17-03
Cenpe	centromere protein E	1389542_at	XM_342345	0,49	/	/	2,85-02
Dlgap5	discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 5	1376684_at	XM_223937	0,47	+	+	1,76-02
LOC689399 (ou CenpW)	hypothetical protein LOC689399 centromere protein W homolog (H, Sapiens)	1393816_at	XM_001058771	0,46	/	/	1,76-02
Clecsf6	C-type (Calcium dependent, carbohydrate recognition domain) lectin, superfamily member 6	1382153_at	NM_001005899	0,45	+	+	6,17-03
Depdc1b	DEP domain containing 1B	1390892_at	NM_001107651	0,42	/	+	4,46-02
Mxd3	Max dimerization protein 3	1370416_at	NM_145773	0,41	/	+	1,06-02
Pttg1	pituitary tumor-transforming 1	1367780_at	NM_022391	0,39	/	+	1,06-02
Bub1b	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog, beta (S, cerevisiae)	1383926_at	XM_342494	0,39	/	/	4,46-02
Cdc20	Cell division cycle 20 homolog (S, cerevisiae)	1374360_at	NM_171993	0,38	+	+	6,17-03
		1389506_x_at	NM_171993	0,34	+	+	1,06-02
		1387895_s_at	NM_171993	0,22	+	+	6,17-03
Plk1	polo-like kinase 1 (Drosophila)	1370297_at	NM_017100	0,38	+	+	6,17-03
Cenpf	centromere protein F	1382493_at	---	0,32	+	+	6,17-03
Kif20a	kinesin family member 20A	1373722_at	NM_001108426	0,32	+	+	6,17-03
Ccnb1	cyclin B1	1370345_at	NM_171991	0,32	+	+	6,17-03
Traf4af1	TRAF4 associated factor 1	1390137_at	NM_001004264	0,30	+	+	6,17-03
		1397609_at	NM_001004264	0,30	+	+	1,06-02

*dans le tissu tumoral

Tableau 19 : Gènes répondant significativement 6h après une irradiation MRT et indétectables par microarray (identifié comme absent) dans les échantillons de tissu controlatéral sain. Parmi les 17 gènes identifiés, 11 sont retrouvés avec trois approches statistiques utilisées (Mann-Whitney, SAM avec un FDR de 10 et 5%).

B - Identification des fonctions et voies de signalisation associées

Fonctions moléculaires et cellulaires

Vingt trois fonctions moléculaires et cellulaires sont identifiées pour les 17 transcrits sélectionnés (Figure 74).

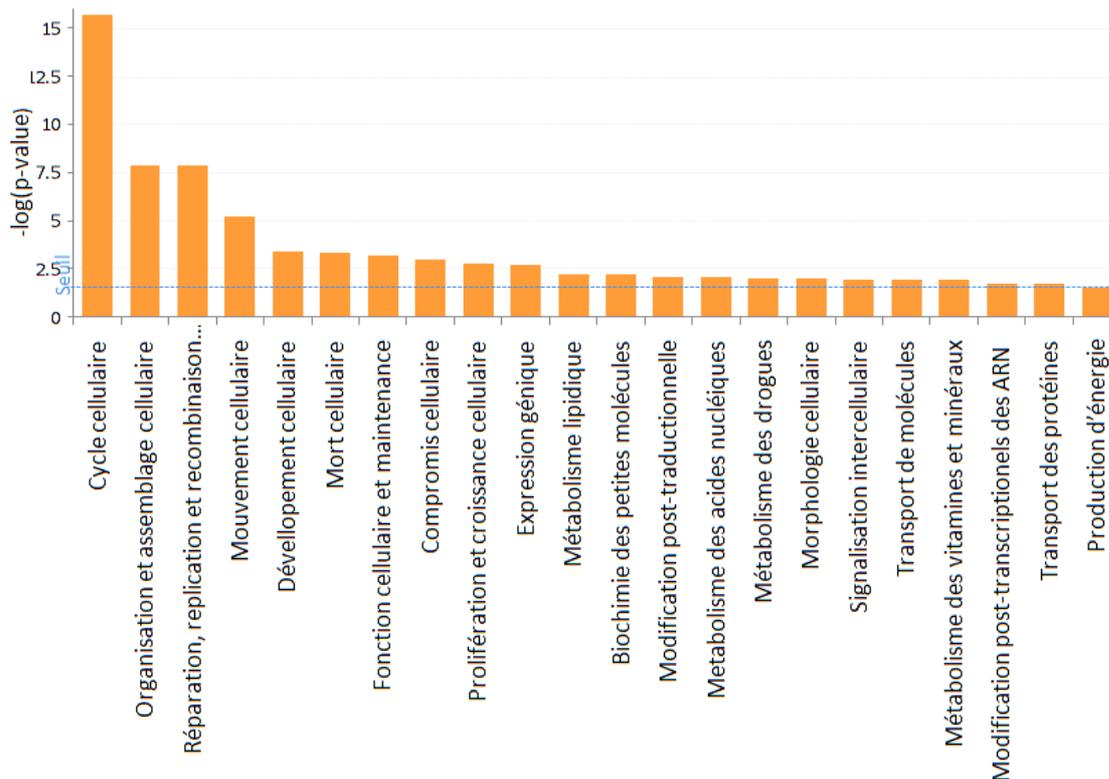


Figure 74 : Fonctions cellulaires et moléculaires associées aux 17 gènes répondant significativement dans le tissu tumoral et dont l'expression n'a pas été détectée par microarray dans les tissus cérébraux controlatéraux irradiés ou non.

La plupart de ces transcrits est associée aux fonctions : « cycle cellulaire » (n=12), « organisation et assemblage cellulaire » (n=11), « réparation, recombinaison et réplication de l'ADN » (n=9) et « mort cellulaire » (n=10), « Prolifération et croissance cellulaire » (n=10) (Tableau 20).

Trois transcrits (Traf4af1, Clecsf6 et Depdc1b) ne sont pas identifiés dans ces fonctions moléculaires et cellulaires sous IPA. Traf4af1 peut être manuellement rattaché à plusieurs des fonctions identifiées ci-dessus puisque, d'après la littérature, il est impliqué dans le cycle cellulaire, la ségrégation des chromosomes et la régulation de l'attachement des microtubules au kinétochore.

Fonctions cellulaire et moléculaire	<i>p-value</i>	Molécules
Cycle cellulaire	2,16 ⁻¹⁶ à 3,73 ⁻⁰²	KIF20A, CENPF, DLGAP5, MXD3, CDC20, CENPE, PTTG1, PLK1, BUB1B, AREG, CCNB1, CENPW
Organisation et assemblage cellulaire	1,4 ⁻⁰⁸ à 3,93 ⁻⁰²	KIF20A, CENPF, DLGAP5, CDC20, CENPE, PTTG1, PLK1, BUB1B, AREG, CCNB1, CENPW
Réparation, réplication et recombinaison de l'ADN	1,4 ⁻⁰⁸ à 4,44 ⁻⁰²	CENPF, DLGAP5, CDC20, CENPE, PTTG1, PLK1, BUB1B, CCNB1, CENPW
Mouvement cellulaire	5,47 ⁻⁰⁶ à 3,73 ⁻⁰²	KIF20A, CDC20, PTTG1, PLK1, CCNB1, AREG
Développement cellulaire	4,15 ⁻⁰⁴ à 4,33 ⁻⁰²	CENPF, MXD3, PTTG1, PLK1, CCNB1, AREG
Mort cellulaire	5,02 ⁻⁰⁴ à 3,62 ⁻⁰²	CENPF, MXD3, CDC20, PTTG1, PLK1, TRIB3, BUB1B, Nppb, AREG, CCNB1
Fonction cellulaire et maintenance	6,42 ⁻⁰⁴ à 3,93 ⁻⁰²	CENPF, DLGAP5, CDC20, PTTG1, PLK1, AREG
Compromis cellulaire	1,05 ⁻⁰³ à 4,44 ⁻⁰²	CENPE, PTTG1, PLK1
Prolifération et croissance cellulaire	1,63 ⁻⁰³ à 4,33 ⁻⁰²	CENPF, KIF20A, DLGAP5, MXD3, CDC20, PTTG1, PLK1, BUB1B, Nppb, AREG
Expression génique	2,11 ⁻⁰³ à 2,72 ⁻⁰²	PTTG1, TRIB3, PLK1, CCNB1
Métabolisme lipidique	5,26 ⁻⁰³ à 3,52 ⁻⁰²	BUB1B, Nppb
Biochimie des petites molécules	5,26 ⁻⁰³ à 4,64 ⁻⁰²	BUB1B, Nppb, CCNB1
Modification post-traductionnelle	6,76 ⁻⁰³ à 6,76 ⁻⁰³	PLK1, BUB1B, CCNB1, AREG
Metabolisme des acides nucléiques	6,79 ⁻⁰³ à 4,64 ⁻⁰²	Nppb, CCNB1
Métabolisme des drogues	8,4 ⁻⁰³ à 3,52 ⁻⁰²	Nppb
Morphologie cellulaire	9,44 ⁻⁰³ à 3,52 ⁻⁰²	CENPF, PTTG1, AREG
Signalisation intercellulaire	1,15 ⁻⁰² à 4,44 ⁻⁰²	AREG
Transport de molécules	1,15 ⁻⁰² à 2,5 ⁻⁰²	Nppb
Métabolisme des vitamines et minéraux	1,15 ⁻⁰² à 3,52 ⁻⁰²	Nppb
Modification post-transcriptionnels des ARN	2,19 ⁻⁰² à 2,19 ⁻⁰²	CCNB1
Transport des protéines	2,4 ⁻⁰² à 2,4 ⁻⁰²	CENPE
Production d'énergie	4,33 ⁻⁰² à 4,33 ⁻⁰²	CCNB1

Les *p-values* ont été calculées grâce à un Fisher's exact test sous IPA.

Tableau 20 : *P-values* et transcrits associés à aux fonctions cellulaires et moléculaires regroupant les gènes cibles.

Depdc1b est très peu référencé (2 articles sous *pubmed*) et semble être un activateur cytosolique de l'activité GTPase dont l'expression n'est retrouvée que dans le plasma sanguin et la lignée cellulaire de cancer rénal HEK-293. Le transcrit Clecsf6 code pour une protéine membranaire présente sur les cellules dendritiques, monocytes, macrophages et lymphocytes-B.

Voies de signalisation

Certains des 17 gènes d'intérêt sont impliqués dans deux groupes de voies de signalisation : « rôle mitotique de la Polo-like kinase 1 » et « régulation des points de contrôle des dommages de l'ADN lors du passage G2/M du cycle cellulaire » qui comprennent respectivement (Cdc20, Ccnb1, Pttg1, Plk1 ; $p=5,68^{-7}$) et (Plk1, Ccnb1 ; $p=9,59^{-4}$). Leur place au sein de ces voies de signalisation est illustrée dans la Figure 75.

L'expression de l'ensemble des gènes d'intérêt regroupés dans ces voies de signalisation est significativement réprimée 6h après MRT et pourrait aboutir à une inhibition de la progression du cycle cellulaire à différents stades comme la transition métaphase/anaphase, la ségrégation du matériel génétique (Figure 75a), le passage G2/M (Figure 75b).

C - Cinétique d'expression des gènes sélectionnés

La cinétique d'expression des gènes candidats permet d'identifier 3 groupes.

C - I - Des variations d'expression communes pour 13 gènes

La cinétique d'expression des 4 gènes Cdc20, CyclinB1, Pttg1 and Plk1 regroupés dans les 2 voies de signalisation précédentes est représentée Figure 76.

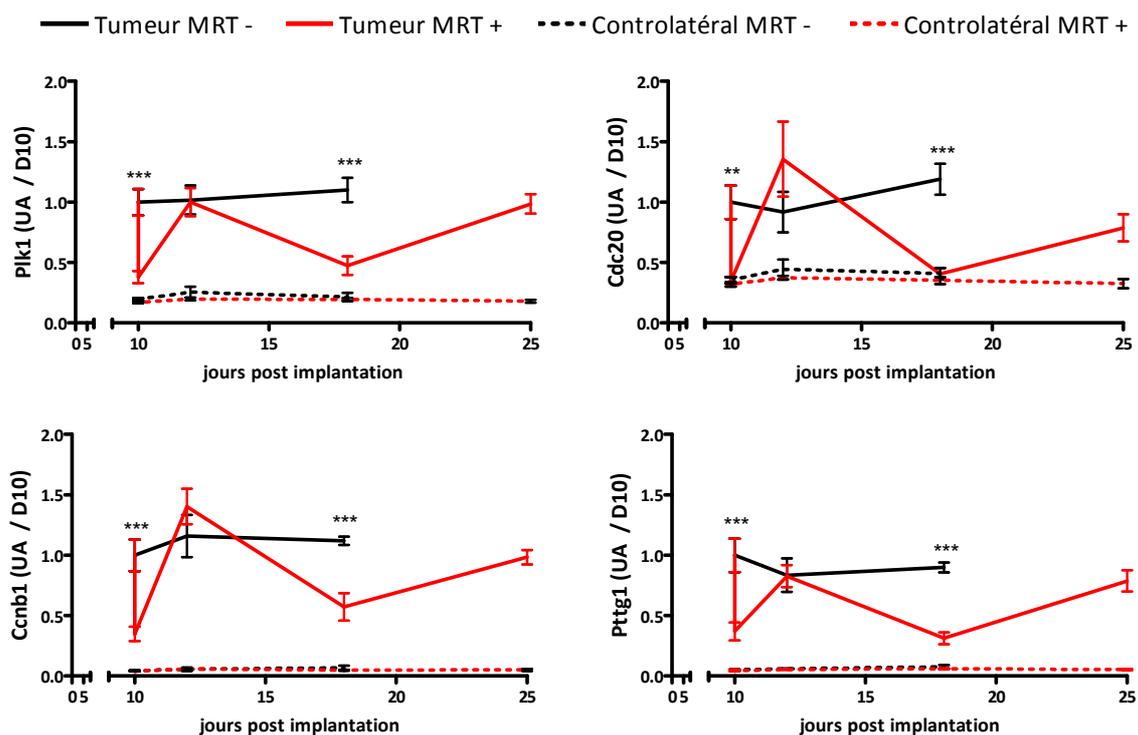
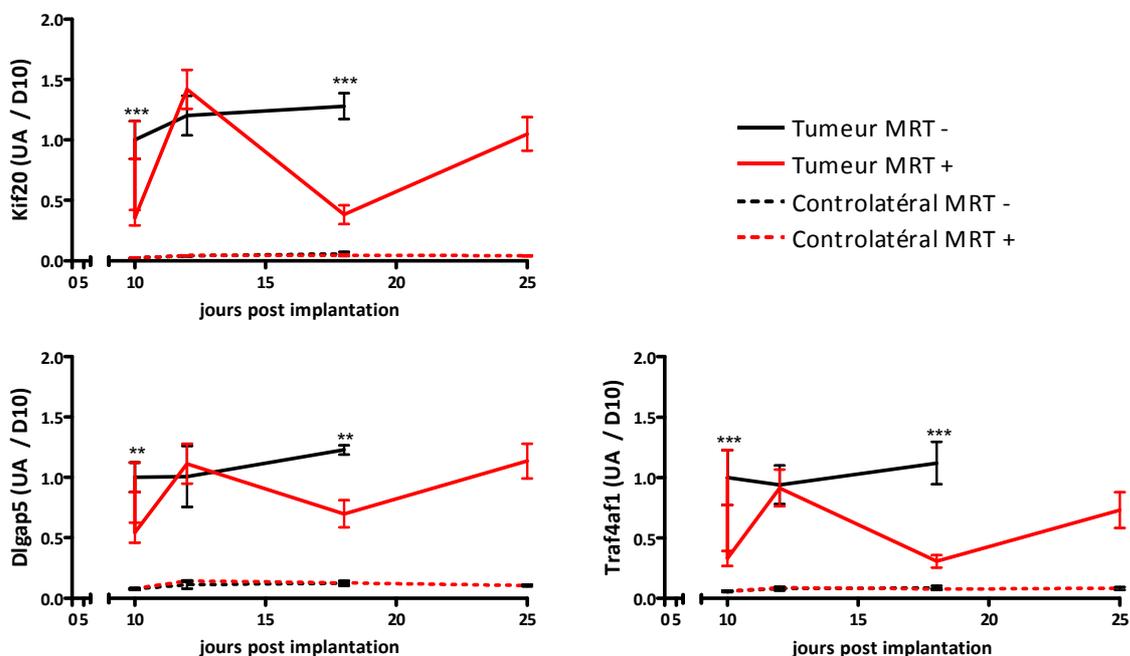


Figure 76 : Suivi de l'expression des 4 gènes : Cdc20, CyclinB1, Pttg1 and Plk1 (moyenne \pm SEM) impliqués dans les voies de signalisation « Rôle mitotique de la Polo-like kinase 1 » et « régulation des points de contrôle des dommages de l'ADN lors du passage G2/M du cycle cellulaire » 10, 12, 18 et 25 jours après l'inoculation des cellules 9L soit 6 h, 48 h, 8 et 15 jours après MRT. Les valeurs sont exprimées en rapport de l'expression des tumeurs avant traitement (J_{10}). Les lignes noires pleines ou pointillées représentent respectivement l'expression dans les tissus tumoraux et controlatéraux non traité (MRT-); les lignes rouges pleines ou pointillées, les tissus tumoraux et controlatéraux traités par MRT (MRT+), *** : $p < 0,001$; ** : $p < 0,01$.

Dans les tissus sains l'expression transcriptomique de Plk1, Cdc20, Ccnb1 et Pttg1 est indétectable par microarray pour tous les temps observés, elle ne varie pas en réponse à la MRT. Leur expression est en revanche bien plus élevée dans le tissu tumoral non irradié et reste stable lors de l'intégralité du suivi.

Dans les tumeurs irradiées, l'expression de ces 4 transcrits oscille autour des valeurs d'expression des tissus tumoraux non irradiés et des valeurs beaucoup plus faibles mais qui restent détectables sur puce. Après la forte inhibition observée 6h après MRT, l'expression de ces 4 transcrits atteint le niveau d'expression des tumeurs non irradiées à 48h (aucune différence significative entre les deux groupes pour ce temps). Huit jours après l'irradiation, le niveau d'expression de ces transcrits connaît une seconde diminution significative par rapport aux tumeurs non traitées ($p < 0,001$), puis augmente 15 jours après l'irradiation.

Des profils de variation très proches sont obtenus pour 9 autres transcrits : Kif20, Dlgap5, Traf4af1, Cenpf, Cenpe, Bub1, Mxb3, Depdc1b et LOC689399 (Figure 77).



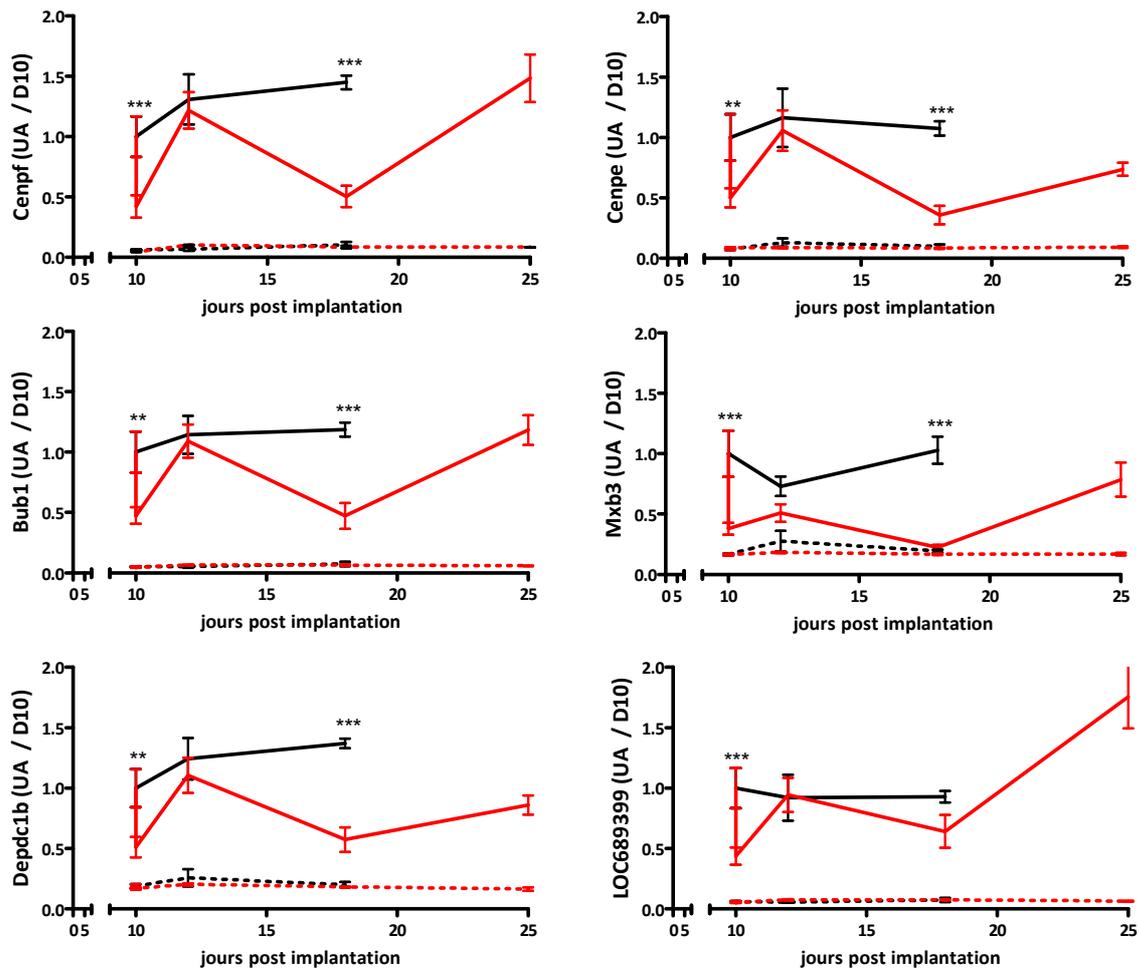


Figure 77 : Suivi de l'expression (moyenne \pm SEM) de 9 des gènes sélectionnés 10, 12, 18 et 25 jours après l'inoculation des cellules 9L soit 6 h, 48 h, 8 et 15 jours après irradiation. Les valeurs sont exprimées en rapport de l'expression des tumeurs avant traitement (D_{10}). Les lignes noires pleine ou pointillée représentent respectivement l'expression dans les tissus tumoraux et controlatéraux non traité (MRT-); les lignes rouges pleine ou pointillée, les tissus tumoraux et controlatéraux traités par MRT (MRT+), *** : $p < 0,001$; ** : $p < 0,01$.

L'ensemble de ces 13 gènes (=cluster Plk1) présentant des profils de variations d'expression similaires (Figure 76 et Figure 77), nous avons donc cherché des éléments régulateurs de la transcription communs : 10 facteurs de transcription ont ainsi été identifiés sous IPA (Figure 78).

Aucun facteur de transcription ne régule l'ensemble des gènes candidats. Au moins 4 de ces facteurs sont nécessaires pour réguler l'ensemble des gènes candidats.

Régulateur (facteur de transcription)	Fold-change à 6h	p-value	Molécules cibles
FOXM1	0,79	4,66 ⁻¹⁰	CCNB1, CDC20, CENPF, KIF20A, PLK1
SMARCE1	0,97 à 1	4,81 ⁻⁰⁷	CCNB1, CENPE, CENPF
YY1	0,99 à 1,30	6,33 ⁻⁰⁷	BUB1B, CENPE, KIF20A, MXD3, PLK1
NFYB	1,26 à 1,35	8,30 ⁻⁰⁷	CCNB1, PLK1, PTTG1
KDM5B	0,94 à 1,08	9,33 ⁻⁰⁵	BUB1B, CCNB1, DLGAP5
FOXO1	0,92 à 1,18	1,90 ⁻⁰⁴	CCNB1, CENPF, DLGAP5
E2F4	/	3,49 ⁻⁰⁴	CENPE, PLK1, PTTG1
TP53	1,18 à 1,38	3,85 ⁻⁰⁴	BUB1B, CCNB1, CDC20, CENPF, PLK1
BRCA1	1,45	2,17 ⁻⁰³	CCNB1, PLK1
MYC	1,7	4,01 ⁻⁰³	BUB1B, CCNB1, CDC20

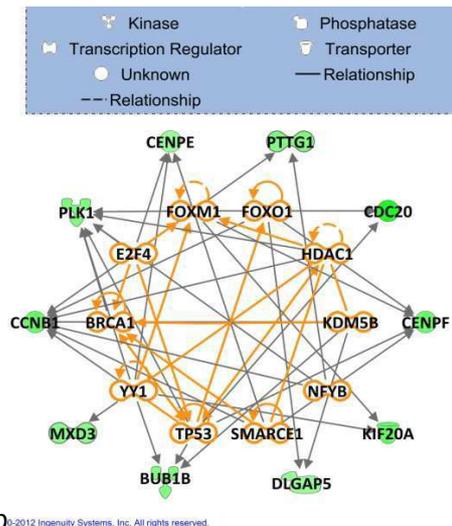


Figure 78 : Facteurs de transcription influençant l'expression de certains gènes cibles. a - Tableau regroupant les molécules cibles potentiellement régulées par chaque facteur de transcription, la p-value associée et le taux de modulation des facteurs de transcription dans les tumeurs 6h après MRT. b - Réseau d'interaction entre les facteurs de transcription et les gènes cibles régulés.

C - II - Cas particulier de la cinétique d'expression de 4 transcrits

Six heures après MRT, les résultats sur obtenus sur Areg et Nppb révèlent une nette surexpression qui perdure jusqu'au 15^{ème} jour post MRT (Figure 79).

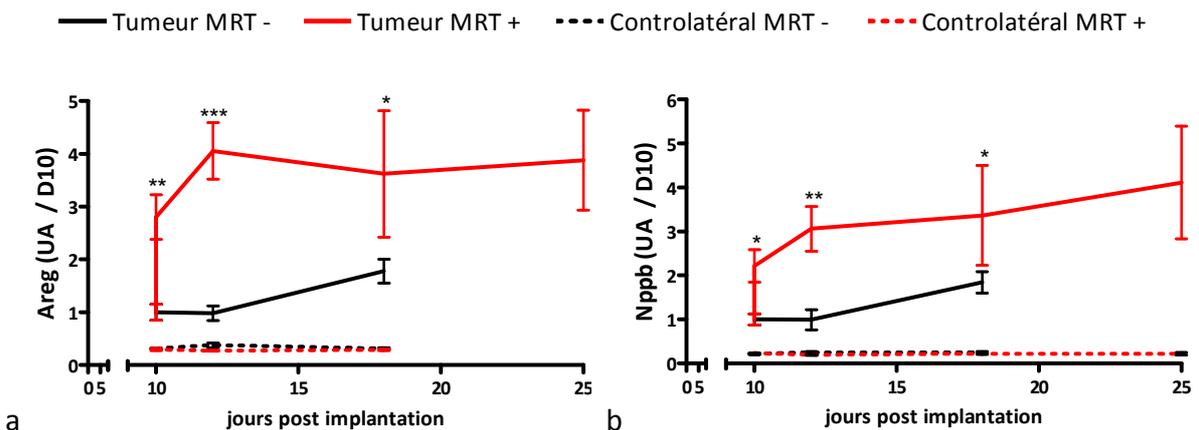


Figure 79 : Suivi de l'expression (moyenne \pm SEM) des ARNm d'Areg (a) et Nppb (b) 9 10, 12, 18 et 25 jours après l'inoculation des cellules 9L. Les valeurs sont exprimées en rapport de l'expression des tumeurs avant traitement (D10). Les lignes noires pleine ou pointillée représentent respectivement l'expression dans les tissus tumoraux et controlatéraux non traité (MRT-); les lignes rouges pleine ou pointillée, les tissus tumoraux et controlatéraux traités par MRT (MRT+), *** : $p < 0,001$; ** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$.

Ainsi 48h et 8 jours après MRT, ces gènes présentent une différence d'expression significative avec celle des tissus tumoraux non irradiés (respectivement $p < 0,001$ et $p < 0,05$ pour Areg et $p < 0,01$ et $p < 0,05$ pour Nppb). Le niveau des transcrits dans le tissu controlatéral irradié ou non reste indétectable par microarray à tous les temps d'observation. Dans les tumeurs non irradiées, Areg comme Nppb présentent un niveau d'expression stable.

Malgré des cinétiques d'expression très proches, ces deux transcrits ne possèdent aucun facteur de transcription commun décrit sous IPA.

Des cinétiques d'expression très différentes des autres transcrits sont observées pour Trib3 et Clefcsf6 (Figure 80).

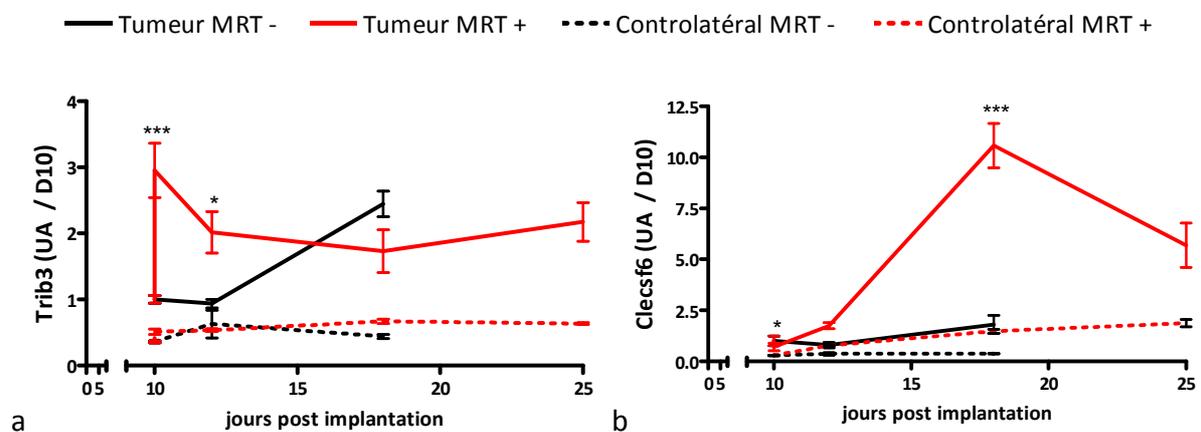


Figure 80 : Suivi de l'expression (moyenne \pm SEM) des ARNm de Trib3 (a) et Clefcsf6 (b) 10, 12, 18 et 25 jours après l'inoculation des cellules 9L. Les valeurs sont exprimées en rapport de l'expression des tumeurs avant traitement ($J_{10}T_{6h}$). Les lignes noires pleine ou pointillée représentent respectivement l'expression dans les tissus tumoraux et controlatéraux non traité (MRT-); les lignes rouges pleine ou pointillée, les tissus tumoraux et controlatéraux traités par MRT (MRT+), *** : $p < 0,001$; * : $p < 0,05$.

Ainsi Trib3 reste indétectable par puce dans les tissus controlatéraux durant toute la période observée (Figure 80a). Contrairement à l'ensemble des autres transcrits, Trib3 présente des variations d'expression dans le tissu tumoral non irradié. Une augmentation significative d'un facteur d'environ 2,5 est observée entre $J_{10}T_{6h}$ et $J_{18}T_{8j}$ ($p < 0,01$) et entre $J_{12}T_{48h}$ et $J_{18}T_{8j}$ ($p < 0,01$). Dans le tissu tumoral traité par MRT, le transcrit Trib3 est surexprimé 6h après irradiation. Son expression diminue à $J_{12}T_{48h}$ mais reste significativement plus élevée que dans les tumeurs non irradiées au même temps d'observation ($p < 0,05$). Pour les temps suivants l'expression de Trib3 reste identique dans les tumeurs irradiées. Cependant, plus aucune différence significative n'est

observée entre les deux groupes de tumeurs du fait de l'augmentation de l'expression de Trib3 dans les tumeurs non traitées.

L'expression des ARNm de Clecsf6 est réprimée d'un facteur 2,2 six heures après irradiation, et présente dès 48h une surexpression qui devient supérieure à celle obtenue dans les tumeurs non traitées. Cette surexpression s'accroît jusqu'à J₁₈T_{8j} où les tumeurs irradiées présentent une expression de ce transcrite environ 10 fois supérieure aux tumeurs non irradiées (p<0,001), puis s'atténue à J₂₅T_{15j} pour atteindre 5 fois le niveau d'expression initiale (Figure 80b), L'expression du transcrite Clecsf6 reste faible et stable pour tous les temps d'observation dans le tissu tumoral non irradié ainsi que dans les tissus controlatéraux irradiés ou non par MRT.

D - Des variations transcriptomiques aux modifications cellulaires et tissulaires

D - I - Croissance tumorale et cellules en division

La majorité de nos gènes cibles étant en relation avec des processus de croissance, de division ou de mort cellulaire, nous avons caractérisé les effets de la MRT sur la croissance tumorale (Figure 81).

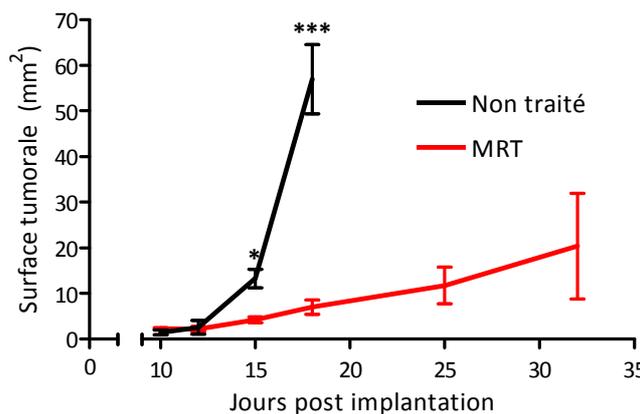


Figure 81 : Suivi de la surface (moyenne \pm SEM) de tumeur 9L non traitées (ligne noire) ou traitées par MRT (ligne rouge) mesurée sur coupe histologique (exprimée en mm²) 12, 14 et 18 jours après implantation (***: p<0,001 ; * : p<0,05). Le nombre d'individus par temps et par groupe est compris entre 4 et 10 (répartition détaillée Tableau 18).

Un ralentissement de la croissance tumorale est induit par la MRT. Dès le 4^{ème} jour après MRT (J₁₄T_{96h}), les tumeurs présentent une taille significativement inférieure à celle des tumeurs non traitées (p<0,05). Cette différence s'accroît à J₁₈T_{8j} où les tumeurs irradiées sont en moyenne 8

fois plus petites que les tumeurs du groupe témoin ($p < 0,001$). Les surfaces tumorales mesurées 15 et 22 jours après l'irradiation ne peuvent pas être directement comparées aux tumeurs non irradiées puisque les animaux témoins ne survivent pas jusqu'à ces temps. Néanmoins en comparaison avec le dernier temps d'observation de groupe non traité ($J_{18}T_{8j}$), le groupe traité par MRT présente des tumeurs plus petites (respectivement 4,9 et 2,8 fois à $J_{25}T_{15j}$ et $J_{32}T_{22j}$).

Parrallèlement au ralentissement de la croissance tumorale, des différences notables ont pu être observées au niveau cellulaire :

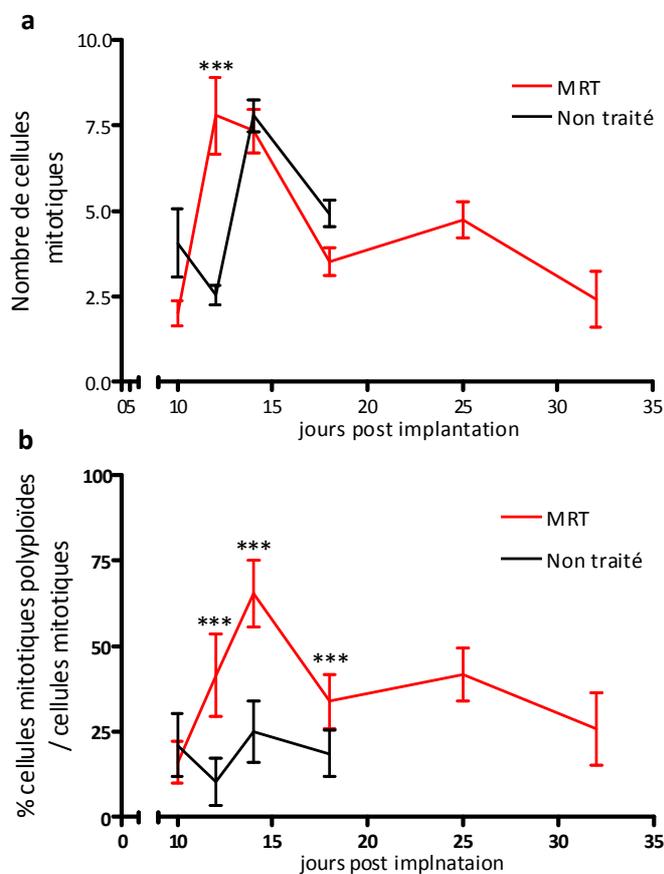


Figure 82 : Suivi du nombre moyen (\pm SEM) de cellules mitotiques par champ d'observation (a) et du pourcentage (\pm SD) de cellules mitotiques-polypléides parmi les cellules mitotiques (b) au niveau des tissus tumoraux non irradiés (ligne noire) ou irradiés par MRT (ligne rouge), 10, 12, 14 et 18 jours après l'inoculation des cellules 9L (***) : $p < 0,001$).

Un nombre plus important de cellules mitotiques (Figure 82a) est observé au sein du tissu tumoral 2 jours après l'irradiation ($7,8 \pm 1,1$ vs $2,6 \pm 0,3$; $p < 0,001$). Parmi celles-ci on dénombre 10% de cellules mitotiques polypléides (Figure 82b) dans le groupe non traité et 41% dans le groupe MRT. À $J_{14}T_{96h}$, le nombre de cellules mitotiques augmente dans le tissu tumoral non irradié et devient équivalent à celui retrouvé dans les tumeurs traitées par MRT. Cependant la proportion de cellules mitotiques polypléides au sein des 2 groupes reste très différente. En effet, alors qu'elles représentent environ 25% dans les tumeurs témoins, elles atteignent 65% de la population mitotique dans les tumeurs irradiées. Ce pourcentage diminue pour les temps suivants (respectivement 34, 42 et 26% pour $J_{18}T_{8j}$, $J_{25}T_{15j}$ et $J_{32}T_{22j}$) mais

reste dans tous les cas supérieur à ceux retrouvés dans les tumeurs non irradiées. L'augmentation de ces aberrations mitotiques dans les tumeurs irradiées corrèle avec

l'inhibition tardive de l'expression du cluster de gènes Plk1. De plus un nombre de cellules géantes/polyploïdes (mitotiques ou non) élevé renforce les preuves d'accumulation de problème de division cellulaire dans les tumeurs après MRT (Figure 83).

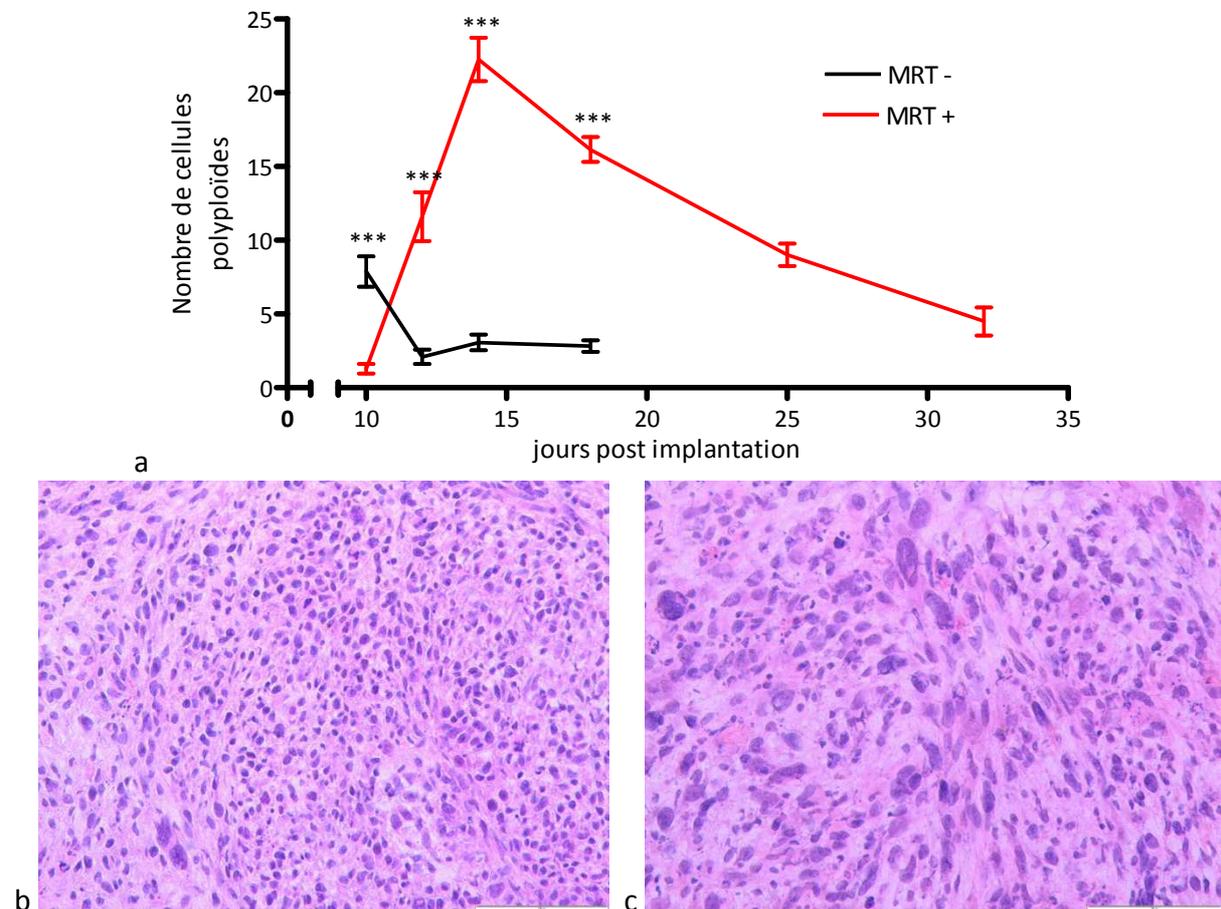


Figure 83 : a - Suivi du nombre moyen (\pm SEM) de cellules polyploïdes par champ d'observation au sein de tumeur 9L non traitées (ligne noire) ou traitées par MRT (ligne rouge) (***) ($p < 0,001$). b et c - Exemples de tissus tumoraux non irradiés (b) ou irradiés par MRT(c) à $J_{14}T_{96h}$ et présentant des proportions de cellules polyploïdes différentes. Barres d'échelle: 200 μ m.

Le nombre de cellules géantes polyploïdes évolue de façon tout à fait semblable à celui des cellules mitotiques polyploïdes et peut donc être également relié aux variations d'expression des gènes du cluster Plk1.

D - II - Réaction inflammatoire/immunitaire

La cinétique d'expression transcriptomique de *Clecsf6* est particulièrement atypique par rapport à nos autres gènes cibles. La protéine *Clecsf6*, également appelée DCIR pour *Dendritic cell immunoreceptor*, est à la surface des cellules dendritiques, monocytes et macrophages. Elle est plus fortement exprimée dans les monocytes et son expression est sous-réglée par les signaux induisant la maturation des cellules dendritiques.

De plus, les transcrits en rapport avec les réactions inflammatoires/immunitaires sont largement activés dans la réponse globale des tissus controlatéraux et tumoraux à la MRT et se retrouvent regroupés dans les principales voies de signalisation et bio-fonctions identifiées dans notre étude. En raison de nombreuses régulations traductionnelles et modifications post-traductionnelles, les manifestations phénotiques peuvent diverger des phénomènes transcriptomiques. Nous avons donc cherché à vérifier si la MRT conduit à la mise en place d'une réaction immunitaire/inflammatoire massive dans les tissus. Dans la mesure où les effets de modifications transcriptomiques ne sont pas immédiatement détectables au niveau cellulaire, nous présentons ici le marquage sur coupes histologiques de cellules impliquées dans la réaction immunitaire (macrophages/monocytes/microglies activée) 6h après l'irradiation et à des temps plus tardifs. Le recrutement de macrophages dérivés du sang et l'activation des cellules microgliales résidentes du SNC se réalisent en 24h, puis atteignent leur maximum en 4 à 8 jours après un changement pathologique ou une lésion du SNC. Nous proposons donc d'étendre les temps d'observations jusqu'au 8^{ème} jour après MRT ($J_{18}T_8$) (Figure 84).

Les tissus sains non irradiés par MRT ne présentent pas de cellules immuno-réactives pour l'antigène Ed1. Après irradiation, des cellules marquées apparaissent à partir de 48h ($J_{12}T_{48h}$) et leur nombre augmente à $J_{14}T_{96h}$. Le marquage de la protéine GFAP semble identique dans les tissus sains irradiés ou non, révélant l'absence de gliose réactionnelle dans les tissus sains pour ce temps précoce post-irradiation.

Dans les tissus tumoraux, les macrophages/monocytes activés sont présents avant l'irradiation comme précédemment décrit § I - C - IV - p118. On observe cependant une présence plus importante de ces cellules dès le 2^{ème} jour après MRT et qui perdure pour tous les temps (Figure 84n-p).

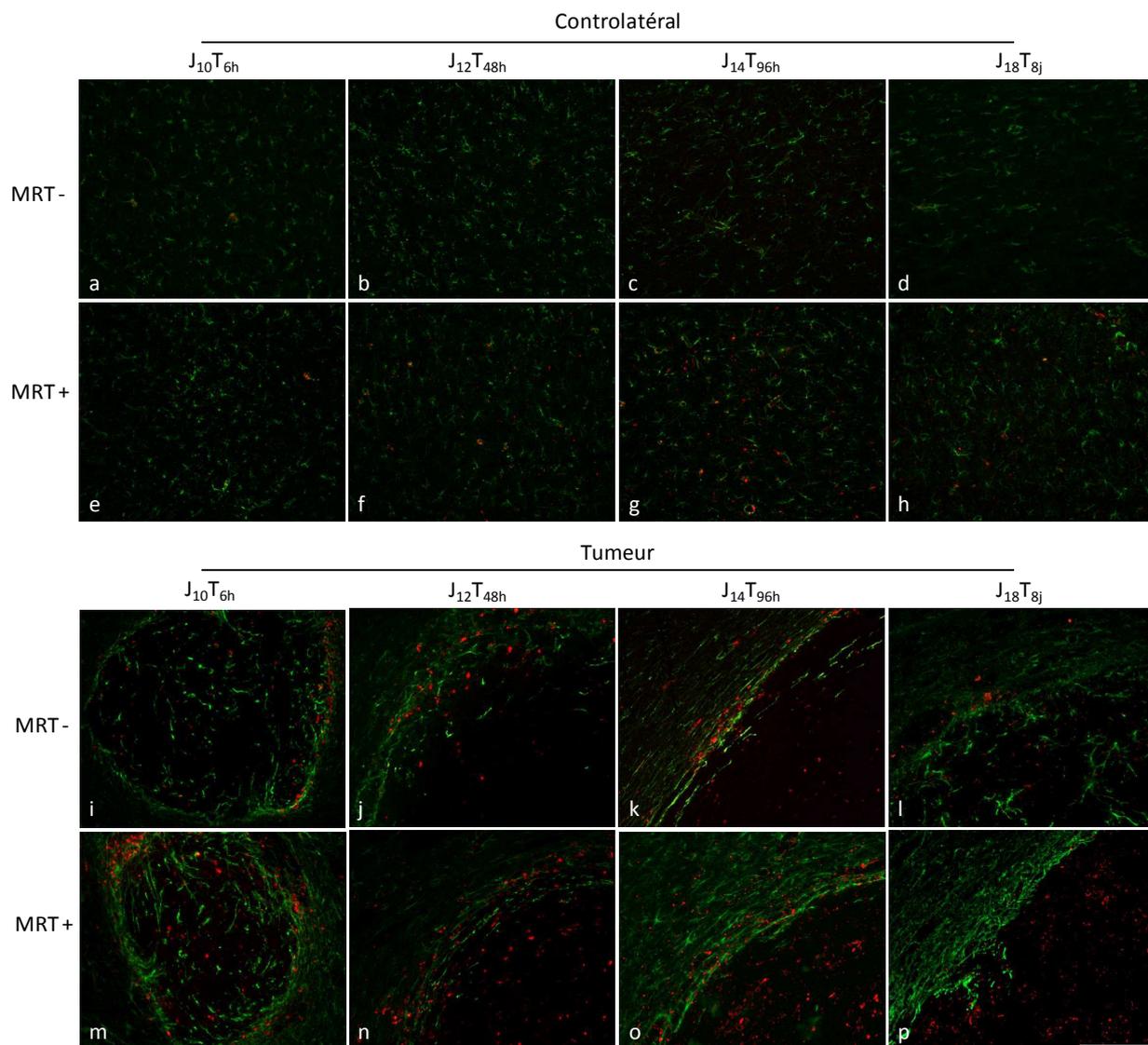


Figure 84 : Marquage des macrophages/monocytes activés (antigène Ed1, rouge) et de la protéine GFAP (vert) au niveau des tissus sains (a-h) et tumoraux (i-p) irradiés ou non par MRT. Barre d'échelle : 200 μ m.

La présence de macrophages/monocytes est marquée dans le centre des tumeurs irradiées, alors qu'elle reste faible dans les tumeurs non traitées (données non illustrées). Le marquage de la GFAP illustre un maintien de la gliose réactionnelle péri-lésionnelle et reste similaire entre les groupes témoins et irradiés.

Le suivi de l'infiltration leucocytaire permet également de mettre en évidence une réponse immunitaire massive au niveau tumoral quelques jours après MRT (Figure 85).

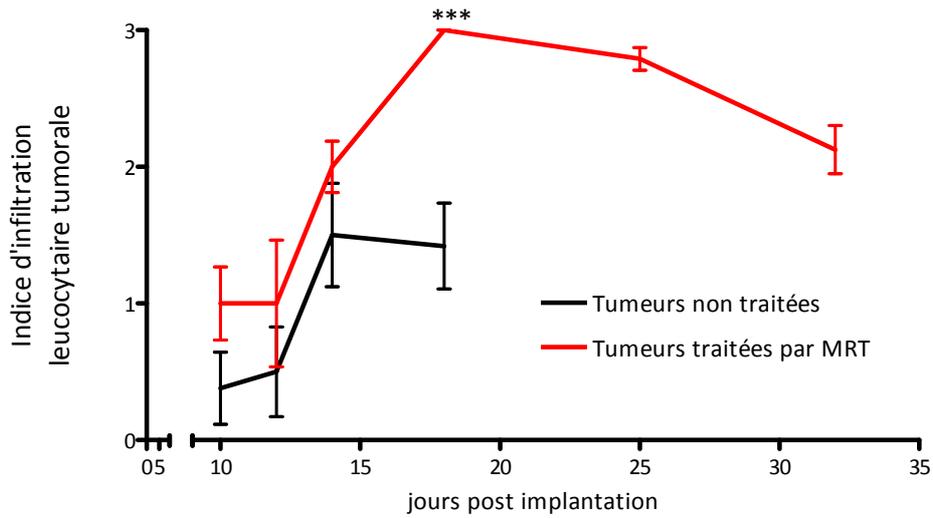


Figure 85 : Suivi de l'infiltration leucocytaire (indice moyen \pm SEM) au niveau de tumeurs irradiées par MRT (ligne rouge) ou non (ligne noire) 10, 12, 14, 18, 25 et 32 jours après l'inoculation des cellules 9L (***) : $p < 0,001$).

En effet, une présence plus marquée de leucocytes est observable dans les tumeurs irradiées 8 jours après l'irradiation ($J_{18}T_{8j}$) et cette présence perdure à $J_{25}T_{15}$ et $J_{32}T_{22j}$.

E - Discussion partie II et III

Nous avons réalisé une analyse transcriptomique de la réponse à la MRT des tumeurs et des tissus cérébraux sains controlatéraux dans le but (i) de décrire les mécanismes biologiques supportant la réponse des tissus à la MRT, (ii) d'identifier des gènes d'intérêt candidats pour augmenter l'efficacité de la MRT sur la tumeur tout en assurant la préservation du tissu sain.

Dans un premier temps, nous avons évalué les paramètres suivants, afin de pouvoir effectuer une comparaison optimale entre les tissus tumoraux et cérébraux sains après MRT :

- les deux tissus doivent provenir de la même espèce afin de pouvoir utiliser le même type de puce pour les analyses transcriptomiques
- le modèle animal doit être immunocompétent afin de ne pas mésestimer l'influence de la réponse immunitaire.

Le gliosarcome 9L implanté orthotopiquement au niveau du cerveau de rat syngénique Fischer répond à ces besoins et est actuellement le modèle de rat le plus utilisé pour les expériences *in vivo* impliquant la MRT ([Bouchet A *et al.* 2012; Bouchet A *et al.* 2010; Dilmanian F. A. *et al.* 2002; Laissue J. A. *et al.* 1998; Le Duc G *et al.* 2011; Regnard P *et al.* 2008; Regnard P. *et al.* 2008; Serduc R *et al.* 2009b; Serduc R. *et al.* 2009; Serduc R. *et al.* 2008a]. Même si l'irradiation croisée est plus efficace sur les tumeurs 9L que l'irradiation unidirectionnelle [Laissue J. A. *et al.* 1998], nous avons choisi une configuration simple afin d'obtenir une configuration d'irradiation similaire dans la tumeur et dans les tissus cérébraux sains controlatéraux. Une irradiation MRT unidirectionnelle a été délivrée de manière latérale au cerveau de rats 10 jours après l'inoculation tumorale, par 40 microfaisceaux de 50 μm , une dose pic de 400 Gy et un espacement crête à crête de 200 μm . L'efficacité de cette configuration d'irradiation, même si elle reste sub-optimale, a été vérifiée puisque la médiane de survie des animaux (x1,7) est significativement augmentée après MRT en comparaison avec celles des rats non traités (respectivement 33 *versus* 19 jours, $p < 0,0001$).

Description de la réponse transcriptomique globale des tissus sains et tumoraux 6h après MRT

Une analyse transcriptomique réalisée sur les échantillons prélevés 6 heures après irradiation a permis d'identifier les gènes répondant à la MRT dans les tissus tumoraux et cérébraux

controlatéraux. Les puces Affymetrix GeneChip® Rat Genome 230 2.0 permettant d'explorer l'expression de 28 000 gènes (31 100 *probe sets*), un profil global de l'expression génique des tissus tumoraux et cérébraux controlatéraux 6 heures après MRT a été obtenu. La comparaison des données issues de 2 sessions expérimentales réalisées à plusieurs mois d'intervalle a permis de confirmer la robustesse et la reproductibilité de nos résultats.

Une réponse transcriptomique différentielle a été identifiée entre les deux tissus. La réponse du tissu cérébral sain implique 2,7 fois plus de gènes que le tissu tumoral (1 509 *versus* 554). Le nombre beaucoup plus élevé de gènes modulés dans le tissu controlatéral peut provenir de la plus grande diversité cellulaire.

Les hautes doses d'irradiations ionisantes utilisées dans ce travail modifient l'expression de 1,8% des gènes testés dans le tissu tumoral (554/31 100 *probe sets*). À notre connaissance, aucune analyse par puce d'expression à haut débit n'a été réalisée sur tumeurs 9L après irradiation. À titre de comparaison, il a été montré que l'expression d'un fort pourcentage de gènes était modifié (22,8%) chez les glioblastomes humains U343, implantées chez la souris 6h après une exposition à seulement 1Gy [Bassi C *et al.* 2008]. Cependant, cette étude, comme la plupart des études transcriptomiques réalisées sur les gliomes après irradiation, a été menée sur des tissus humains (modèle xénogénique) et sur un nombre de gènes restreint (n=859 à 7680) [Bassi C *et al.* 2008; Camphausen K *et al.* 2005; Kumaraswamy S *et al.* 2008; Shankavaram UT *et al.* 2012]. Les gènes testés sont généralement choisis parmi des fonctions déterminées ce qui influence l'enrichissement relatif des gènes qui répondent. En revanche, les études testant un nombre de séquences ARN plus proche du nôtre ont été réalisées sur d'autres types de cancers. Sur différents cancers hématologiques par exemple, l'expression de 0,5 à 0,7% des gènes est modifié après une exposition à 4 ou 5 Gy [Chiba M *et al.* 2012; Lindgren Theres *et al.* 2012]. Ces résultats suggèrent que la MRT modifie l'expression d'un nombre plus élevé de gènes qu'une irradiation conventionnelle dans les tissus cancéreux. Cependant, les différences entre cancers solides et hématologiques ainsi que celles concernant la nature de l'irradiation, les doses et les méthodes utilisées peuvent justifier ces différences de réponse.

L'expression d'environ 5% des *probe sets* testés est modifiée dans le tissu controlatéral et dans nos conditions expérimentales (1 509 des 31 100 *probe sets*). Cette proportion est plus haute que celles décrites pour des radiations ionisantes dans la littérature, Zhao *et al.*, ont rapporté seulement 0,6% de gènes modifiés dans les tissus cérébraux de souris 8h après une exposition unique à 10 Gy [Zhao W *et al.* 2006]. Environ 1,1% et 2,2% des gènes testés sont modifiés 5 h après une exposition du cerveau complet de souris à respectivement 10 et 20 Gy [Mahmoud-

Ahmed AS *et al.* 2006]. Une comparaison directe de ces résultats avec les nôtres reste difficile en raison des différences de techniques et de méthodes d'analyse utilisées. Il n'existe cependant pas de référence plus appropriée, à notre connaissance. La réponse des tissus cérébraux à la MRT semble impliquer plus de gènes que lors d'une irradiation conventionnelle, y compris pour des doses d'irradiation de 20 Gy. Plusieurs études ont rapporté une augmentation à la fois du niveau d'expression et du nombre de gènes modulés de manière dépendante de la dose [Mahmoud-Ahmed AS *et al.* 2006; Shin SC *et al.* 2011; Yin E *et al.* 2003]. Nous pouvons donc envisager que le nombre inhabituel de gènes modulés après MRT soit dû à l'importance de dose globale déposée dans les tissus entre les microfaisceaux (~18Gy) et sur le passage des microfaisceaux (400 Gy). Il est cependant difficile de savoir quelle est la part de responsabilité attribuable (i) à la haute dose globalement délivrée (i) à la géométrie d'irradiation (alternance des pics et vallées) (iii) et au flux. Ces différents paramètres peuvent aussi influencer la réponse transcriptomique. En résumé, aucune source de la littérature ne permet de vraiment comparer et positionner nos données. Afin de répondre de façon plus directe à ses questions, des expériences complémentaires impliquant une irradiation en champ plein mais avec une source synchrotron ont été réalisées afin de déterminer si les hauts dépôts de dose locaux sur le passage des microfaisceaux (400 Gy) impliquent des gènes ou des voies de signalisation spécifiques. Elles sont présentées dans la suite de ce manuscrit (p171).

Analyse fonctionnelle de la réponse transcriptomique globale des tissus sains et tumoraux 6h après MRT

Au delà du nombre de gènes modulés par la MRT, nous nous sommes intéressés à la nature de ces gènes. Après leur annotation fonctionnelle sous le logiciel IPA, nous avons identifié une large gamme de fonctions moléculaires et cellulaires ainsi que de voies de signalisation impliquée dans la réponse à la MRT dans chaque tissu. Ceci révèle qu'un réseau complexe de régulation des processus biologiques intervient dans les 2 tissus après MRT.

Les 1 509 *probe sets* dont l'expression est modulée dans le tissu sain ont été associés à 18 fonctions moléculaires et cellulaires. Ces fonctions sont également identifiées dans la réponse des tissus tumoraux et sont majoritairement en lien avec la réponse des cellules aux dommages induits par les radiations (annotation fonctionnelle selon IPA). Elles aboutissent à l'activation de

la mort cellulaire, une inhibition de la prolifération et de la croissance cellulaire. Les réactions inflammatoire et immunitaire sont représentées au sein des bio-fonctions « mouvement cellulaire », « présentation de l'antigène » et « interaction et signalisation intercellulaire ». De telles réponses sont couramment observées dans les tissus après une radiothérapie [Multhoff G *et al.* 2012; Rabin BM *et al.* 1996; Shan YX *et al.* 2007]. La MRT semble donc provoquer le même type de réponse tissulaire globale que les radiothérapies conventionnelles.

Malgré un nombre de transcrits plus faible (554 *probe sets*), la réponse des tissus tumoraux implique plus de fonctions moléculaires et cellulaires le tissu sain. En effet, 4 fonctions apparaissent uniquement dans la réponse du tissu tumoral et sont en relation avec les processus métaboliques. Elles sont cependant associées aux *p-values* les plus élevées obtenues lors de notre étude dans le tissu tumoral ($2,44^{-05}$ to $7,41^{-06}$). Pour chaque fonction moléculaire et cellulaire identifiée, des annotations fonctionnelles renseignent sur le cadre de leur mis en place. Ainsi le « métabolisme des acides aminés » ($p=7,02^{-06}$) et « métabolisme des drogues » ($p=7,02^{-06}$) sont associés dans cette analyse à la « captation de la lévothyroxine ». À notre connaissance aucun lien n'a été établi entre la captation de la lévothyroxine et les gliomes. Le faible nombre de gènes reliés à ces fonctions ($n=3$) conduit à une identification ambiguë et à une exclusion de ces deux fonctions. Les 2 autres fonctions identifiées lors de la réponse à la MRT uniquement dans le tissu tumoral, concernent le « métabolisme des glucides » ($p=2,44^{-05}$) (annotation fonctionnelle associée : accumulation des glucides) et le « métabolisme des acides nucléiques » ($p=4,55^{-06}$) (annotations fonctionnelles associées : variation de la quantité des nucléotides cycliques ($n=13$ molécules), de l'AMP cyclique ($n=12$ molécules) et incorporation de thymidine ($n=9$ molécules). Une modification du métabolisme glucidique des tumeurs, après irradiation à dose « élevée » (>9 Gy) a été décrite lors d'études histologiques [Thiel HJ *et al.* 1988] et par imagerie [Broggini-Tenzer A *et al.* 2011]. La réponse précoce des cellules tumorales à la MRT semble donc passer par une adaptation de leur métabolisme similaire à celle observée en d'irradiation conventionnelle. L'incorporation de thymidine, de nucléotides cycliques et la consommation d'AMPc sont révélateurs de la synthèse d'ADN pouvant être associé à la réparation des lésions radio-induite à l'ADN.

Nous avons également identifié un nombre élevé de voies de signalisation impliquées dans la réponse des tissus à la MRT. En effet, 205 et 221 voies sont respectivement associées aux gènes modulés dans les tissus tumoraux et controlatéraux. Parmi elles, 180 sont communes aux 2 tissus. La réaction immunitaire est largement représentée et constitue 9 des 10 principales voies,

et coïncide avec l'inflammation décrite dans la littérature après exposition à des rayonnements ionisants [Desmarais G *et al.* 2012; Kureshi SA *et al.* 1994; Multhoff G *et al.* 2012]. Parallèlement à cette signature transcriptomique, la présence de leucocytes et de macrophages/monocytes activés a été observée sur des coupes de tissus, avec une présence plus marquée de macrophages dès le 2^{ème} jour post MRT (Figure 84). Des macrophages/monocytes activés sont également détectés dans le centre de la tumeur après MRT alors qu'ils sont quasiment absents sans irradiation et dévoile aussi une colonisation plus facile sur des tissus tumoraux installés.

L'apoptose apparaît également impliquée lors de la réponse à la MRT des tissus tumoraux et sains. Cependant, l'analyse détaillée des transcrits modulés dans les deux tissus révèle des différences. En effet, 23 gènes sont regroupés dans les voies apoptotiques pour le tissu sain ($p=7,94^{-11}$) contre seulement 7 pour le tissu tumoral ($p=1,62^{-3}$). De plus, si des gènes très spécifiques de l'apoptose (caspases 3, 7, 8 et 12, Bax, Bak, Bcl2, Bid, p53) sont surexprimés dans le tissu sain, le tissu tumoral surexprime principalement des gènes plus pléiotropes (PKC, NFκB, IκB). Cet exemple illustre une régulation transcriptomique différentielle des gènes dans les deux tissus pour une même voie de signalisation. La nature des tissus irradiés et leurs caractéristiques peuvent influencer et/ou expliquer en partie de telles différences. Ainsi le gène suppresseur de tumeur (GST) p53, activant notamment la transcription de Bax (voie mitochondriale), est muté dans les cellules 9L [Asai A *et al.* 1994; Schlegel J *et al.* 1999]. Ce GST peut également moduler la mort cellulaire médiée par les récepteurs de mort. Cette différence constitutionnelle du tissu tumoral, ainsi que les données transcriptomiques acquises après MRT laissent envisager une faible occurrence de l'apoptose au niveau tumoral. Le marquage des cellules apoptotiques par la méthode TUNEL sur coupes histologiques a révélé l'apparition de cellules positives dans le tissu sain controlatéral aussi bien que dans la tumeur. Plusieurs hypothèses peuvent être évoquées pour expliquer cette différence entre transcriptome et phénotype tissulaire. L'activation et la mise en place de l'apoptose passe par de nombreuses régulations non transcriptomiques : activations, phosphorylations et clivages protéiques. Malgré une expression transcriptomique différente, la participation de la voie peut donc être similaire entre les tissus. Le transcriptome ne constitue donc qu'une première étape d'investigation. Il est également envisageable que le marquage TUNEL soit trop général pour discriminer des différences fines dans la contribution des différentes voies conduisant à l'apoptose (voie mitochondriale, des récepteurs de mort ou du réticulum endoplasmique), voire pour différencier d'autres types de mort cellulaire (oncosé,

nécrose cellulaire). L'exemple de l'apoptose illustre ainsi une implication différentielle des transcrits dans les deux tissus même si la conséquence tissulaire est moins claire. Malgré une proportion élevée de fonctions et de voies de signalisation communes entre les 2 tissus, il est nécessaire de regarder en détail le nombre, la nature et le sens de régulation des gènes qui composent ces entités communes. Il est en ce sens fastidieux de réaliser ce travail sur l'ensemble des 180 voies communes. Elles constituent cependant une base de données solide pour répondre à des problématiques plus ciblées.

En dehors des 180 voies de signalisation communes, quelques unes ne sont identifiées que dans la réponse de l'un ou l'autre des tissus. La réponse du tissu sain implique ainsi 11 voies de signalisation particulières. Celles-ci peuvent principalement être regroupées en 2 grandes catégories : la réaction immunitaire et inflammatoire pour les voies : « signalisation de Nur77 dans les lymphocytes T » ($p=1,78^{-3}$), « présentation de l'antigène lipidique par CD1 » ($p=1,74^{-2}$), « rôle des cytokines la communication entre les cellules immunitaire » ($2,19^{-2}$), « système du complément » ($p=2,95^{-5}$), « apoptose des lymphocytes T induit par le calcium » ($p=6,17^{-5}$) et « signalisation du granzyme B » ($p=7,59^{-3}$) ; la réorganisation du cytosquelette pour les voies « nucléation de l'actine par le complexe ARP-WASP » ($p=2,34^{-2}$), « signalisation de RhoA » ($p=2,69^{-2}$) et « signalisation de Cdc42 » ($p=7,08^{-4}$). La « signalisation des intégrines » ($p=6,92^{-3}$) indique une modification des interactions entre les cellules et la matrice extracellulaire (MEC) qui peut aboutir à divers effets dont la migration et la fixation cellulaire, la croissance et la différenciation cellulaire. Enfin la voie du « métabolisme du glutamate » ($p=4,37^{-2}$) engage la *Glutamate-ammonia ligase*, *Glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 2*, *Glutamate-cysteine ligase regulatory subunit* et *Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit* respectivement codées par les gènes CCDC92, GFPT2, GCLM et GCLC. Ces enzymes sont impliquées dans la synthèse de glutamine qui est une source d'énergie impliquée dans la prolifération cellulaire ou encore dans la protection des cellules neuronales contre la toxicité de certaines espèces réactives de l'oxygène [Zitzler J *et al.* 2004].

Trois voies de signalisation sont impliquées dans la réponse à la MRT uniquement dans la tumeur : « biosynthèse des aminoacyl-ARNt » ($p=2,51^{-2}$), « dégradation de la valine, leucine et isoleucine » ($p=3,08^{-2}$) et « rôle mitotique de la Polo-like kinase » ($p=3,09^{-2}$). Les 2 premières indiquent une activité métabolique généralement corrélée avec une activité cellulaire intense. Le rôle mitotique de la Polo-like kinase est intéressant puisqu'il révèle un blocage de la division

cellulaire post-MRT dans la tumeur. Cette voie de signalisation a également été retrouvée lors d'une seconde approche (détaillée ci-dessous), où une sélection plus précise de transcrits avait été effectuée en amont.

Identification de gènes spécifiques de la réponse tumorale à la MRT et intérêts thérapeutiques potentiels

En nous basant sur la réponse différentielle des deux types de tissu, nous avons en effet sélectionné les gènes répondant significativement à la MRT dans le tissu tumoral et indétectables par microarray dans les tissus sains. Dix sept gènes ont ainsi été identifiés : Areg, Trib3, Nppb, Dlgap5, Clefcsf6, Cdc20, Plk1, 13824993_at, Kif20a, Ccnb1 et Traf4af1, Depdc1b, Mxd3 et Pttg1 Cenpe, LOC689399 et Bub1b. Les 11 premiers étant retrouvés quel que soient les méthodes statistiques utilisées dans notre étude (test Mann&Whitney ou SAM avec un FDR de 5% ou de 10%), confortent notre analyse.

Vingt trois fonctions moléculaires et cellulaires sont associées à ces 17 gènes d'intérêt et 4 d'entre elles en regroupent la majorité : « cycle cellulaire » (n=12), « organisation et assemblage cellulaire » (n=11), « réparation, recombinaison et réplication de l'ADN » (n=9) et « mort cellulaire » (n=10), « Prolifération et croissance cellulaire » (n=10). Quatre gènes cibles ont également été regroupés au sein de 2 voies de signalisation : « rôle mitotique de la Polo-like kinase 1 » et « régulation des points de contrôle des dommages de l'ADN lors du passage G2/M du cycle cellulaire » qui comprennent respectivement (Cdc20, Ccnb1, Pttg1, Plk1 ; $p=5,68^{-7}$) et (Plk1, Ccnb1 ; $p=9,59^{-4}$). Parmi ces gènes cibles, fonctions et voies associées, 3 entités se sont révélées pertinentes et sont détaillées ci-après.

Cluster Plk1 :

Plk1 est au centre de ces fonctions et de ces voies de signalisation et apparaît comme une piste pour comprendre les mécanismes de la MRT sur le tissu tumoral puisque le fonctionnement de ce gène est de plus en plus référencé depuis une 10^{aine} d'années.

Une surexpression de Plk1 a été rapportée pour de nombreux cancers humains dont les carcinomes hépatocellulaires, œsophagiens, de la langue, les cancers de la vessie, pancréatiques, colorectaux [Feng YB *et al.* 2009; Gray Jr PJ *et al.* 2004; Ito Y *et al.* 2004; Pellegrino R *et al.* 2010; Takahashi T *et al.* 2003; Yamamoto Y *et al.* 2006]. Une surexpression de la Polo-like kinase 1 dans le cancer de la prostate est associée aux plus hauts grades tumoraux [Weichert W *et al.* 2004].

Elle est également reliée à une accumulation d'oncogènes dans les cancers gastriques et est inversement corrélée avec l'expression de gènes suppresseurs de tumeur [Jang YJ *et al.* 2006]. Pour les tumeurs cérébrales, un niveau transcriptomique élevé de Plk1 a été démontré dans une cohorte de 68 gliomes humains et tend à augmenter en fonction du grade tumoral (selon la classification de l'OMS). L'expression transcriptomique élevée de Plk1 semble de ce fait corrélée avec un pronostic sombre pour les patients porteurs de gliomes [Chenga Mao-Wei *et al.* 2011].

Plk1 joue un rôle prépondérant dans la maturation des centrosomes, la formation du fuseau mitotique et sa séparation bipolaire [Casenghi M *et al.* 2005; Feng Y *et al.* 2006; Lane HA *et al.* 1996; Rapley J *et al.* 2005; Sumara I *et al.* 2004; van Vugt MA *et al.* 2004; Yarm FR 2002], l'entrée en mitose [Roshak AK *et al.* 2000], la transition entre métaphase et anaphase [Golan A *et al.* 2002; Hansen DV *et al.* 2004; Moshe Y *et al.* 2004] et la cytokinèse lors de la phase M du cycle cellulaire [Neef R *et al.* 2003; Niiya F *et al.* 2006; Seong YS *et al.* 2002; Zhou T *et al.* 2003].

La répression de l'expression de Plk1 sur des cellules de gliome U251 peut inhiber la croissance tumorale, induire l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M et augmenter l'apoptose [Chenga Mao-Wei *et al.* 2011; Gerster K *et al.* 2010; Harris PS *et al.* 2012; Ree AH *et al.* 2004]. Une réduction de 80 à 90% de la croissance tumorale d'un panel de cancers pédiatriques dont les GBM a même récemment pu être obtenu [Hu K *et al.* 2009]. L'inhibition de ce gène par la MRT dès les premières heures après l'irradiation peut donc en partie expliquer l'inhibition précoce de la croissance tumorale.

Les rayonnements ionisants sont décrits pour inhiber l'expression de Plk1 notamment chez des lignées cellulaires d'ostéosarcomes humains (U2OS) [van Vugt MA *et al.* 2001], de carcinome mammaire (HCC1937) [Ree AH *et al.* 2004], de lymphomes humains (U698 et cellules Reh) [Landsverk KS *et al.* 2011; Lyng H *et al.* 2005], de cancer du col de l'utérus (Hela) [Zhang W *et al.* 2005]. L'inhibition de Plk1 semble directement lié aux dommages induits à l'ADN [Smits VAJ *et al.* 2000], être sous le contrôle de BRCA1 [Ree AH *et al.* 2004] et indépendante de p53 [Ree AH *et al.* 2004; Sanhaji M *et al.* 2012]. Ceci corrèle avec le statut de notre modèle tumoral où p53 est mutée [Asai A *et al.* 1994; Schlegel J *et al.* 1999] alors que BRCA1 est fonctionnelle [Bencokova Z. *et al.* 2008].

Au cours des études concernant le statut et le fonctionnement de Plk1, une association a été établie avec plusieurs gènes correspondant à nos gènes cibles notamment ceux regroupés dans

la voie « rôle mitotique de la Polo-like kinase 1 » : Ccnb1 [Golan A *et al.* 2002; Hansen DV *et al.* 2004; Moshe Y *et al.* 2004; Wikman H *et al.* 2002], Cdc20 [Golan A *et al.* 2002; van Vugt MA *et al.* 2004]. Outre Ccnb1 et Cdc20, les gènes Bub1 et CenpE sont également mis en lien avec Plk1 dans le cadre du contrôle de la formation du fuseau mitotique [Bharadwaj R *et al.* 2004], CenpF lors de l'arrêt des cellules mitotiques en phase G2 après irradiation [Lyng H *et al.* 2005] et Cenpe lors de l'attachement des chromosomes aux fuseaux mitotiques [Sumara I *et al.* 2004]. Enfin l'étude de Landsverk *et al.* a montré que l'exposition de cellules humaines de lymphome (U698) à 4Gy provoquait, 6h après l'irradiation, une inhibition commune de l'expression transcriptomique de Plk1, Cdc20, Ccnb1, Kif20a et Dlgap5 [Landsverk KS *et al.* 2011]. Le taux de ces transcrits augmente à nouveau 10h après l'irradiation et l'inhibition est intégralement levée 24h après l'irradiation.

Dans le cas de la MRT, si on observe également une levée de l'inhibition de ce groupe de gènes 48h après l'irradiation, leur expression est à nouveau retrouvée très faible 8 et même 15 jours après MRT dans le cas de certains transcrits (Figure 76 et Figure 77). Une évolution des profils d'expression similaire est retrouvée pour les transcrits de Cenpe, Cenpf, Pttg1, Bub1b, LOC689399, Depdc1b et Mxd3. Ces 13 gènes, que nous nommerons « cluster Plk1 », constituent un groupe dominant au sein de nos 17 gènes d'intérêt et peuvent être co-régulés par une 10^{aine} de facteurs de transcription communs (FOXM1, SMARCE1, YY1, NFYB, KDM5B, FOXO1, E2F4, TP53, BRCA1, MYC (Figure 78)). L'inhibition prolongée des gènes du cluster Plk1 est d'autant plus intéressante lorsqu'on la met en parallèle avec la croissance tumorale (Figure 81). En effet, alors que les tumeurs non traitées présentent une croissance exponentielle et un taux élevé et stable des transcrits du cluster de Plk1, la croissance des tumeurs irradiées par MRT est inhibée jusqu'à J₁₈T₈ tout comme l'expression des transcrits du cluster Plk1. Parallèlement, on observe une proportion significativement plus élevée de mitoses anormales (cellules mitotiques polyploïdes) au sein des tumeurs irradiées jusqu'à J₁₈T_{8j} (p<0,001). Les mêmes différences sont obtenues pour le nombre de cellules polyploïdes (mitotiques ou non). La levée de l'inhibition de l'expression d'une partie des gènes du cluster de Plk1 (dont Plk1 lui-même) dans les tumeurs à J₂₅T₁₅ corrèle avec une diminution importante de la proportion de cellules mitotiques polyploïdes et du nombre de cellules polyploïdes. On peut ainsi émettre l'hypothèse que l'inhibition des gènes du cluster Plk1 après MRT, entraîne une perturbation du cycle et de la division cellulaire, avec une accumulation de cellules mitotiques anormales et de cellules polyploïdes et participe au contrôle transitoire de la croissance tumorale. Pour éprouver cette hypothèse et déterminer l'influence du cluster Plk1 dans l'efficacité de la MRT, il serait nécessaire de mimer l'inhibition de ces gènes

au sein de tumeurs non irradiées. L'emploi de siRNA anti-Plk1 ou de molécules inhibitrices spécifiques permettrait de réaliser cette inhibition en se concentrant uniquement sur Plk1. Le BI2536 est une molécule pertinente puisque cet inhibiteur présente une spécificité 1 000 fois supérieure pour Plk1 que pour 63 kinases testées [Steehmaier M *et al.* 2007] et a une excellente activité anti-tumorale *in vivo* corrélée à la perturbation de la formation des fuseaux mitotiques et de l'activation des points de contrôle de ces fuseaux qui résultent *in fine* en des catastrophes mitotiques [Lénárt P *et al.* 2007; Steegmaier M *et al.* 2007]. Cette molécule a récemment permis d'inhiber la croissance d'un modèle de glioblastome implanté orthotopiquement (U251) prouvant son efficacité même dans un site protégé par une barrière hémato tumorale [Lee C *et al.* 2012]. La modulation de plusieurs gènes du cluster pourrait également être réalisée par l'intermédiaire d'un ou plusieurs des 10 facteurs de transcription communs (Figure 78), ce qui serait plus proche du phénomène transcriptomique observé pour l'ensemble du cluster Plk1.

Au delà de cette approche mécanistique, il est envisageable d'utiliser l'inhibition de Plk1 en couplage avec la MRT dans un but thérapeutique. En effet, l'expression de Plk1 dans les tissus cérébraux sains semble être nulle, comme dans la plupart des tissus sains de l'organisme (poumon, cœur, foie, rein, muscle, pancréas; seul le colon et le placenta présente une expression du transcrit Plk1) [Holtrich U *et al.* 1994; Knecht R *et al.* 1999; Tokumitsu Y *et al.* 1999; Wikman H *et al.* 2002; Wolf G *et al.* 2000].

La déplétion de Plk1 de lignées de cellules saines (hTERT-RPE1 and MCF10A) n'affecte pas leur cycle cellulaire et leur prolifération [Lei M *et al.* 2008; Liu X *et al.* 2006]. Des études de phase I/II impliquant des inhibiteurs de Plk1 (BI2565 [Mross K *et al.* 2008; Olmos D *et al.* 2011] et BI6727 sous le nom de Volasertib [Schöffski P *et al.* 2012]) ont ainsi montré une bonne tolérance du traitement. De plus, notre étude établit qu'aucune expression de Plk1 (ou des 13 gènes du cluster Plk1) n'est détectable dans tissus cérébraux sains après MRT (6h à 15 jours après irradiation). Il est donc probable que l'utilisation d'inhibiteurs de Plk1 n'affecte pas la préservation du tissu cérébral sain après MRT. Enfin, une combinaison de rayonnement ionisant et d'inhibition de la Plk1 a récemment aboutit à un effet synergique sur la contrôle de croissance des cellules de tumeurs cérébrales (médulloblastomes Daoy et ONS-76) [Harris PS *et al.* 2012]. La chronologie d'administration des deux thérapies est cependant critique et les informations divergentes. En effet alors que certaines études rapportent qu'une inhibition de Plk1 24h avant l'exposition à 4Gy induit une cytotoxicité *in vitro* et diminution de la croissance tumorale *in vivo* [Gerster K *et al.* 2010], d'autres montrent que l'inhibition de Plk1 avant radiothérapie augmente la proportion de cellules en phase G2 (phase pendant laquelle les cellules sont le moins

radiosensible) et provoque une radioprotection des cellules tumorales [Mir Shahryar E. *et al.* 2010]. L'inhibition de Plk1 seulement après MRT, dans un délai à définir, semble donc une approche plus sûre.

À notre connaissance aucune information n'existe dans la littérature sur l'expression de Plk1 (ou des gènes associés) après rayonnement ionisant à des temps équivalents à notre études (J₁₈T₈), rendant difficile d'attribuer spécifiquement à la MRT l'inhibition tardive de Plk1. L'étude présentée p171 permet en partie de lever cette incertitude.

Clecsf6 :

Clecsf6 est un antigène exprimé au niveau de différentes cellules immunitaires comme les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques. Il n'est pas détecté dans les lymphocytes T et cellules NK (*natural killers*). L'augmentation progressive du taux de transcrits de Clecsf6 jusqu'au 8^{ème} jour post-implantation, puis sa diminution à J₂₅T_{15j}, coïncide avec la présence de leucocytes au niveau tumoral. En effet, l'indice d'infiltration leucocytaire atteint un maximum à J₁₈T_{8j}, puis diminue légèrement pour les temps plus tardifs (J₂₅T_{15j} et J₃₂T_{22j}) (Figure 85). Le nombre de macrophages/monocytes activés progresse également jusqu'à J₁₈T_{8j}. La quantité d'ARNm de Clecsf6 semble donc être un indicateur du nombre de cellules inflammatoires tissulaires.

La protéine membranaire (également appelée récepteur DCIR pour *dendritic cell immunoreceptor* [Bates EE *et al.* 1999]) codée par ce transcrit est cependant décrite pour présider une signalisation anti-inflammatoire notamment par l'inhibition de l'activation leucocytaire [Richard M *et al.* 2003]. La présence massive de Clecsf6 dans les tissus tumoraux après MRT devrait ainsi engendrer une inhibition de l'inflammation, ce qui ne corrèle pas avec nos observations tissulaires. Deux 2 formes d'ARNm de Clecsf6 sont rapportés dans la littérature [Richard M *et al.* 2002]. Si la version longue code bien pour une protéine transmembranaire à activité anti-inflammatoire, la version courte est déléetée d'une région responsable de la formation du récepteur fonctionnel. Les puces d'expression utilisées dans ce travail de thèse ne permettent pas de différencier les deux isoformes de Clecsf6 et l'augmentation observée du transcrit peut refléter une augmentation de la forme courte du transcrit codant pour un récepteur non fonctionnel. Sous certaines conditions pro-inflammatoires (présence de TNF- α , IL-1 α , LPS, GM-CSF, IL-3, IL-4, and IL-13) la version courte de l'ARNm de Clecsf6 est préférentiellement produite et l'expression membranaire de la protéine est sous-régulée ce qui aboutit finalement à une levée de l'inhibition anti-inflammatoire [Richard M *et al.* 2002]. Un taux

élevé de la version courte de Clecsf6 pourrait ainsi corrélérer avec une réaction immunitaire/inflammatoire massive comme celle observée après MRT au niveau tumoral. La différenciation de ces 2 types d'ARNm dans les tumeurs après MRT permettrait de valider cette hypothèse.

En vaccinothérapie anticancéreuse, les cellules dendritiques (ou monocytes précurseurs de cellules dendritiques) sont prélevées chez le patient, manipulées en laboratoire pour renforcer leur capacité à activer le propre système immunitaire du patient afin d'attaquer les cellules cancéreuses de manière spécifique. Généralement ces cellules présentatrices de l'antigène sont chargées d'antigènes tumoraux avant d'être réinjectées et provoquent alors une augmentation de la cytotoxicité T spécifique contre les cellules tumorales [Butterfield LH *et al.* 1998]. Le recrutement d'un nombre massif de cellules immunitaires qui expriment un ARNm particulier et de manière spécifique à la tumeur après MRT, peut être exploité dans un but thérapeutique. En effet les monocytes et/ou cellules dendritiques pourraient être utilisées non plus pour leur capacité de présentation de l'antigène, mais comme véhicule pour induire l'expression de gène spécifiquement au niveau tumoral. Les cellules modifiées exprimeraient alors spécifiquement un gène au niveau tumoral (à définir en fonction de la stratégie choisie) dont l'expression serait sous le contrôle du promoteur de Clecsf6.

AREG

L'expression d'AREG est absente dans les tissus cérébraux sains (indétectable même après irradiation), est détectée dans les tissus tumoraux non irradié et est augmenté après MRT pour tous nos temps d'observation (6h à 15jours post-implantation). AREG code pour la protéine amphiréguline qui est un facteur de croissance sécrété de la famille de l'*epidermal growth factor* (EGF) [Plowman GD *et al.* 1990; Shoyab M *et al.* 1989]. À notre connaissance, l'effet des rayonnements ionisants sur l'expression de l'amphiréguline est peu exploré mais la radiothérapie est décrite pour activer la signalisation de son récepteur l'*epidermal growth factor receptor* (EGFR) dès 15min après l'irradiation (de 0.5 à 15Gy) [Martinou M *et al.* 2011]. La traduction des transcrits AREG aboutit à la formation d'une protéine membranaire qui est clivée pour donner une protéine soluble, extracellulaire capable de se lier et d'activer l'EGFR [Plowman GD *et al.* 1990]. Pour les glioblastomes l'EGFR est surexprimé dans ~40% à 60% des glioblastomes [Ekstrand AJ *et al.* 1991]. De plus l'activation de l'EGFR peut aboutir à la production d'amphiréguline, créant une boucle d'autoamplification et une indépendance des

cellules tumorales vis-à-vis des facteurs de croissances du microenvironnement. L'amphiréguline revêt plusieurs fonctions dont (i) l'augmentation de l'activité mitotique des cellules tumorales par stimulation autocrine [Li S *et al.* 1992] ou paracrine [Sternlicht MD *et al.* 2005] (ii) la stimulation de l'angiogenèse par son activité mitogène directe sur les cellules endothéliales vasculaires [Kato M *et al.* 2003] et par l'induction de la production de VEGF [Soh J *et al.* 2007]. La surexpression d'AREG lors de la réponse des tissus tumoraux à la MRT pourrait donc limiter l'efficacité de l'irradiation. Une stratégie thérapeutique envisageable serait d'inhiber les effets d'AREG pour potentialiser notre irradiation.

De nombreuses thérapies ciblées sont disponibles pour inhiber l'EGFR. Les petites molécules inhibitrices de l'EGFR comme le gefitinib, l'erlotinib, le lapatanib ou les anticorps inhibiteurs du récepteur comme cetuximab sont bien tolérés chez les patients porteurs de gliomes, mais leur efficacité est décevante en termes de progression de survie [Neyns B *et al.* 2009; Thiessen B *et al.* 2010]. De plus leur utilisation présente plusieurs inconvénients dans le cadre du couplage à la MRT. Tout d'abord les inhibiteurs de l'EGFR sont généralement des inhibiteurs multikinases pouvant interférer avec les mécanismes de réparation et de maintien des tissus sains après MRT. D'autre part Areg est décrit pour induire une résistance à ces traitements notamment au gefitinib (inhibiteur de l'EGFR) dans adénocarcinomes de poumon (H322) [Busser B *et al.* 2010a; Busser B *et al.* 2010b]. L'inhibition directe d'Areg semble clairement plus indiquée pour assurer la préservation du tissu sain et contourner la résistance à certains agents antiprolifératifs. Cependant seuls des oligonucléotides anti-sens (siRNA anti-Areg) et des anticorps monoclonaux anti-Areg sont actuellement disponibles pour inhiber l'amphiréguline. La présence de la BHE limite de plus l'utilisation des anticorps *in vivo*. Le développement de thérapies anti-AREG pourrait être d'un grand intérêt pour améliorer l'index thérapeutique de la MRT.

Les 2 derniers transcrits identifiés dans notre étude (Trib3 et Nppb) ne sont pas traités dans cette discussion en raison de leur référencement très restreint dans la littérature en rapport avec la radiothérapie et donc des difficultés de compréhension de leur fonction.

IV - Influence de la présence des microfaisceaux lors de la MRT

Quelle que soit la configuration d'irradiation utilisée en MRT, une efficacité a toujours été observée sur la survie des animaux porteurs de tumeur (pour rappel § III - p48). Cependant peu d'informations permettent de comprendre la part des microfaisceaux dans cette efficacité. Les paramètres d'irradiation utilisés dans le cadre de cette thèse (microfaisceaux de 50 μm de largeur, espacés crête-à-crête de 200 μm et déposant sur leur passage 400 Gy au niveau de la tumeur) engendrent un dépôt de dose de 17,3 Gy entre les microfaisceaux (dose vallée). L'exposition de tumeurs 9L à une telle dose en radiothérapie conventionnelle engendre déjà une augmentation significative de la survie des animaux. Différents travaux ont en effet rapporté une progression de la médiane de survie de 74% avec 16 Gy [Kimler BF *et al.* 1993a], 83% à 18 Gy (en 3 fractions de 6 Gy délivrés tous les 3 jours) [Vinchon-Petit S *et al.* 2010], 120% et 11% avec respectivement 24 et 32 Gy [Kimler BF *et al.* 1993b]. Cependant, de nombreux paramètres comme la localisation tumorale, son stade de développement au moment de l'irradiation ou les procédures anesthésiques peuvent influencer l'effet des rayonnements [Kimler BF *et al.* 1993b] et réduisent d'autant la comparabilité des résultats, au moins sur le plan quantitatif. De plus, l'influence des débits de dose (quand ceux-ci sont faibles : 0,5 à 150 cGy) et donc la durée d'irradiation est connue [Baldetorp L *et al.* 1977; Steel GG *et al.* 1987; Steel GG *et al.* 1986]. Aucune étude n'a comparé l'effet du débit de dose utilisé en radiothérapie conventionnelle^{##} avec celui produit par un synchrotron^{§§} ; or il n'est pas exclu que ce paramètre puisse influencer les résultats. L'étude de l'influence des microfaisceaux lors du traitement par MRT nécessite d'exclure toutes ces variations (dose, débit de dose, spectre). À ce jour aucune étude rigoureuse n'a abordé l'apport du fractionnement spatial.

Nous proposons ici de comparer les effets d'une irradiation MRT avec celle d'une irradiation synchrotron en champ plein (ou BB pour *Broad Beam*) dans des conditions similaires (modèle tumoral, protocole anesthésique, lieux, période, expérimentateurs, source d'irradiation, taille du champ) et surtout pour la première fois avec des doses comparables c. à d., une dose déposée en champ plein identique à celle déposée dans les vallées lors de l'irradiation MRT.

^{##} 2 à 4 Gy.min⁻¹ pour une source de radiothérapie conventionnelle.

^{§§} 17 000 Gy.s⁻¹ pour une source synchrotron utilisée en MRT.

Protocole expérimental

Parallèlement aux irradiations MRT présentées précédemment, nous avons irradié des animaux en champ plein lors des sessions expérimentales 4, 5 et 6 avec des doses de 18,6 Gy (S_4) et de 17,4 Gy (S_5 et S_6), selon le protocole détaillé § III page 81. L'ensemble de ces animaux a été implanté et randomisé après IRM de manière identique et concomitante aux animaux des groupes non irradiés ou traités par MRT. Vingt quatre rats irradiés en BB ($n=12$ pour S_4 et $n=12$ pour S_5) ont permis d'établir des courbes de survie (répartition indiquée Tableau 21).

Session Expérimentale Sx		Nombre d'échantillons non traités						Nombre d'échantillons MRT						Nombre d'échantillons BB		
		S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₄	S ₅	S ₆
Survie					9	5					9	6		12	12	
Transcriptomique (cinétique sur les gènes cibles)	J ₁₀ T _{6h}	C	3	2				3	3			3			4	
		T	3	2				3	3			3			4	
	J ₁₂ T _{48h}	C	2	2				2	2				3			3
		T	2	2				2	3				2			4
	J ₁₈ T ₈	C			3	2				3			3			4
		T			3	2				4			3			4
	J ₂₅ T ₁₅	C	na	na	na	na	na	na					4			4
		T	na	na	na	na	na	na					4			4
Transcriptomique (SAM sur l'ensemble des probe sets)	J ₁₀ T _{6h}	C										3			4	
		T										3			4	
	J ₁₂ T _{48h}	C											3			3
		T											2			4
	J ₁₈ T ₈	C											3			4
		T											3			4
	J ₂₅ T ₁₅	C											4			4
		T											4			4
Histologie (Comptage entités - Surface tumorale)	J ₁₀ T _{6h}	1-3	2-3	2-3				0-3	2-3	1-0				2-3	2-3	
	J ₁₂ T _{48h}	2-3	2-3					1-3	1-3				3-0			4-6
	J ₁₄ T _{96h}			2-3	2-3					1-3	2-3		2-0			4-6
	J ₁₈ T ₈			2-3	2-3					2-3	2-3		2-3			5-6
	J ₂₅ T ₁₅	na	na	na	na	na	na			2-3	2-3	2-4		3-3	4-6	
	J ₃₂ T ₂₂	na	na	na	na	na	na			4-4				na	na	na

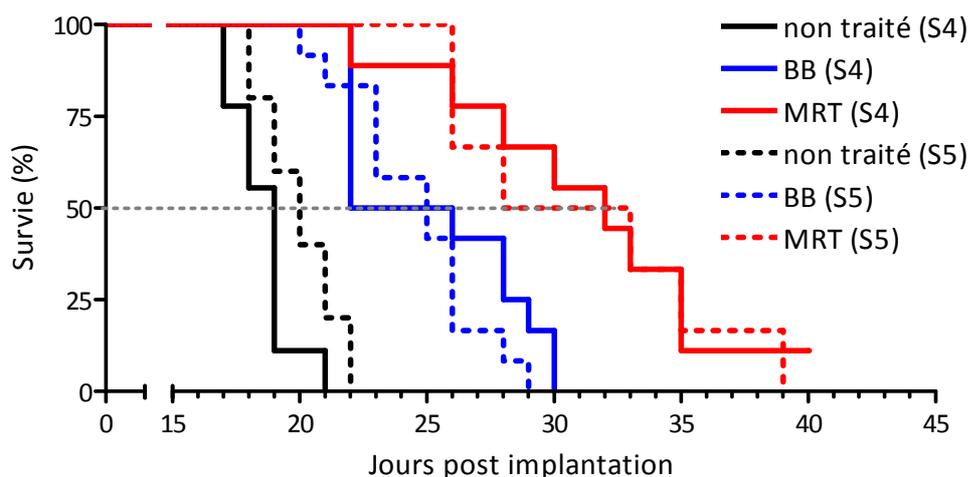
Tableau 21 : Nombre d'échantillons tumoraux (T) ou cérébraux controlatéraux (C) irradiés par MRT, par champ plein (BB) ou non traités, obtenus lors de 6 sessions expérimentales (S_1 - S_6) à différents temps post-implantation (J) ou irradiation (T) et utilisés pour les analyses transcriptomiques ou d'histologiques.

Les autres animaux irradiés en BB ont fourni les échantillons à différents temps après irradiation lors des sessions expérimentales S₄, S₅ et S₆ qui ont été comparés aux échantillons non traités ou irradiés par MRT prélevés aux mêmes temps (Tableau 21). Le suivi de l'expression des gènes d'intérêt identifiés précédemment a été réalisé sur l'ensemble des échantillons testés en transcriptomique. La comparaison statistique de l'expression des gènes après MRT et BB a été réalisée uniquement à partir des échantillons issus de sessions expérimentales identiques.

A - Effet des microfaisceaux sur animaux porteurs de tumeur 9L

Survie

Les survies obtenues pour chaque traitement sont reproductibles pour les 2 sessions expérimentales ($p > 0,1$ entre les 2 sessions pour chaque groupe) (Figure 86a).



a

b

	Session 4			Session 5		
	Non traité	BB	MRT	Non traité	BB	MRT
Nombre de rats	9	12	9	5	12	6
Survie minimum (jour)	17	22	22	18	20	26
Survie maximum (jour)	21	30	>300 (1/9)	22	29	39
MST	19	24	31	20	25	30.5
ILS %	na	26	63	na	25	52.5

Figure 86 : a- Représentation de Kaplan Meier associée aux survies des rats porteurs de tumeurs 9L non traités (lignes noires), traités par champs plein (lignes bleues) ou par MRT (lignes rouges). Les lignes pleines correspondent à la 1^{ère} expérience, les lignes pointillées à la 2^{ème}. b – Tableau indiquant le nombre d'animaux, la médiane de survie et le pourcentage d'augmentation de l'espérance de vie pour chaque groupe d'animaux et pour chaque expérience.

En raison de la bonne reproductibilité des deux expériences (Figure 86b) nous avons couplé les données *in vivo* pour la suite de ce travail. L'irradiation en champs plein ou par MRT augmente significativement la médiane de survie des animaux porteurs d'une tumeur 9L en comparaison au groupe de rats non traités (respectivement 25 et 32 jours *versus* 19, $p < 0,0001$). Les animaux irradiés par MRT présentent une meilleure survie que le groupe d'animaux traités par BB (32 contre 25 jours après l'implantation, $p < 0,0001$). Une irradiation synchrotron de $18 \pm 0,6$ Gy induit donc une augmentation de 131,6% de l'ILS des animaux (ILS post-traitement de 166,7%). L'ajout de microfaisceaux permet d'augmenter l'ILS de 168,4% (ILS post-traitement de 244,4%). La présence des microfaisceaux a donc une influence positive sur la survie des animaux porteurs d'une tumeur cérébrale.

Croissance tumorale

La MRT a également une meilleure efficacité sur le contrôle de la croissance tumorale par rapport au BB (Figure 87).

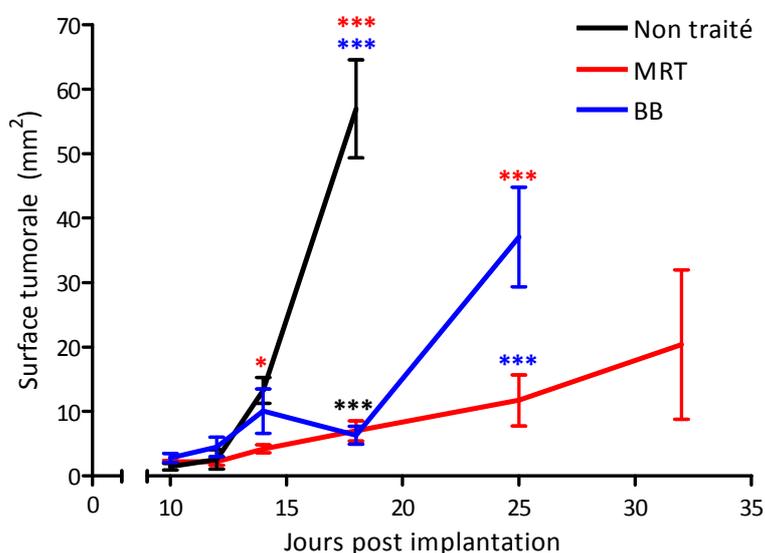


Figure 87 : Évolution de la taille tumorale moyenne (\pm SEM) mesurée sur coupes histologiques à différents temps après l'inoculation tumorale (10, 12, 14, 18, 25 et 32 jours) pour le groupe non traité (ligne noire), traité par BB (ligne bleue) ou par MRT (ligne rouge). La couleur des étoiles indique le groupe par rapport auquel la valeur est significativement différente (* : $p < 0,05$ et *** : $p < 0,001$).

L'évaluation histologique de la taille des tumeurs 9L non irradiées révèle une croissance exponentielle entre le 10^{ème} et le 18^{ème} jour. Les deux traitements ralentissent la croissance des

tumeurs irradiées. À $J_{18}T_{8j}$, les tailles moyennes des tumeurs irradiées en BB ou MRT sont respectivement 9 et 8,2 fois plus faibles que pour le groupe non traité (6,3 et 7 mm² contre 56,9 mm², $p < 0,001$). Malgré un contrôle tumoral similaire entre les deux irradiations pour les premiers temps observés, la récurrence tumorale est plus rapide après une irradiation BB qu'après MRT : la taille tumorale présentant une augmentation de 68 et 489 % entre $J_{18}T_{8j}$ et $J_{25}T_{15j}$ pour les groupes traités par MRT ou par BB, respectivement. Cette différence de reprise tumorale aboutit à des tumeurs de taille significativement supérieure chez les animaux traités par BB (37,1 et 11,7 mm² pour les groupes traités par BB et MRT, $p < 0,001$).

Au sein des animaux traités par MRT, nous avons observé une variabilité de réponse : 50% des tumeurs présentent une taille similaire entre $J_{10}T_{6h}$ et $J_{32}T_{22j}$, alors que l'autre moitié présente une taille 20 fois supérieure. A l'opposé, l'intégralité des tumeurs du groupe BB présente une taille supérieure au dernier temps mesuré ($J_{25}T_{15j}$).

La dose d'environ $18 \pm 0,6$ Gy déposée en champ plein et correspondant à la dose vallée de la MRT permet déjà une augmentation significative de la survie. Celle-ci est associée à un quasi-contrôle de la croissance tumorale lors des 8 premiers jours après l'irradiation. Cependant les effets de la MRT ne proviennent pas uniquement de la dose déposée dans la vallée. En effet une irradiation MRT de 400 Gy, déposant $18 \pm 0,6$ Gy dans les zones vallées, entraîne une augmentation de la survie des animaux supérieure à celle obtenue avec $18 \pm 0,6$ Gy en champ plein. La croissance tumorale est également moins rapide après MRT qu'après BB. L'efficacité *in vivo* de la MRT semble donc être due à la fois à la dose déposée dans les vallées et à la présence de microfaisceaux.

B - Influence de la configuration d'irradiation sur les paramètres histologiques

Parmi les différents critères histologiques observés (contours, infiltration leucocytaire, cellularité, anisonucléose, nombre de cellules mitotiques, polyplôïdes, mitotiques polyplôïdes, pycno-mitotiques), seuls le nombre de cellules mitotiques, de cellules polyplôïdes (mitotiques ou non) et de cellules pycno-mitotiques ont présenté des différences entre les tumeurs BB et les tumeurs MRT (Figure 88).

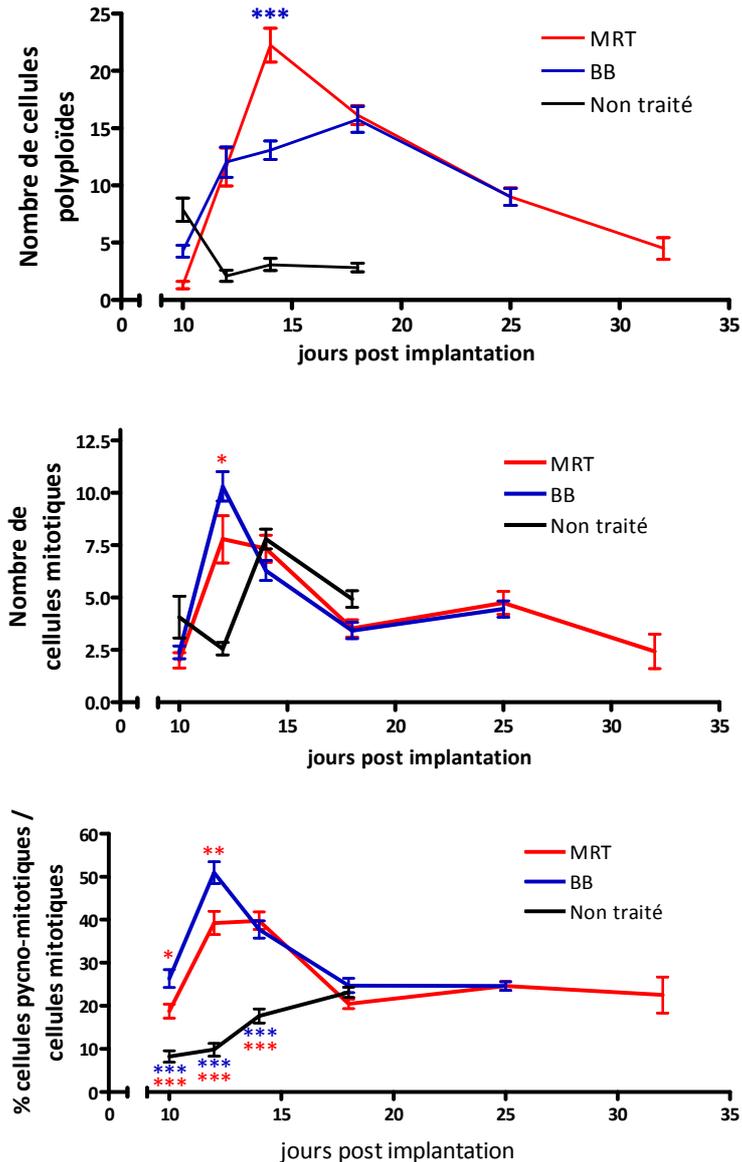


Figure 88 : Suivi du nombre moyen (\pm SEM) de cellules polyplloïdes, de cellules mitotiques et le pourcentage de cellules pycno-mitotiques/cellules mitotiques par champ d'observation au niveau des tissus tumoraux non irradiés (ligne noire), irradiés par MRT (ligne rouge) ou irradiés par BB (ligne bleue) à $J_{10}T_{6h}$, $J_{12}T_{48h}$, $J_{14}T_{96h}$, $J_{18}T_{8j}$, $J_{25}T_{15j}$ et $J_{32}T_{22j}$. La couleur des étoiles indique le groupe par rapport auquel la valeur est significativement différente (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$).

Seuls quelques critères histologiques ont permis de différencier les effets des deux types de rayonnement. Les tumeurs MRT présentent un nombre de cellules polyplloïdes significativement plus élevé que les tumeurs BB à $J_{14}T_{96h}$ ($p < 0,001$). Les tumeurs BB présentent un nombre de cellules mitotiques plus élevé que les tumeurs MRT à $J_{12}T_{48h}$ ($p < 0,05$) et parmi elles, un pourcentage plus élevé de cellules pycno-mitotique à $J_{10}T_{6h}$ et $J_{12}T_{48h}$ ($p < 0,05$ et $p < 0,01$ respectivement).

C - Effets des microfaisceaux sur les gènes sélectionnés

Les tumeurs irradiées par MRT ou par BB présentent des différences d'expression pour 8 des 17 gènes sélectionnés précédemment (§ III p141) (Figure 89 et Figure 90).

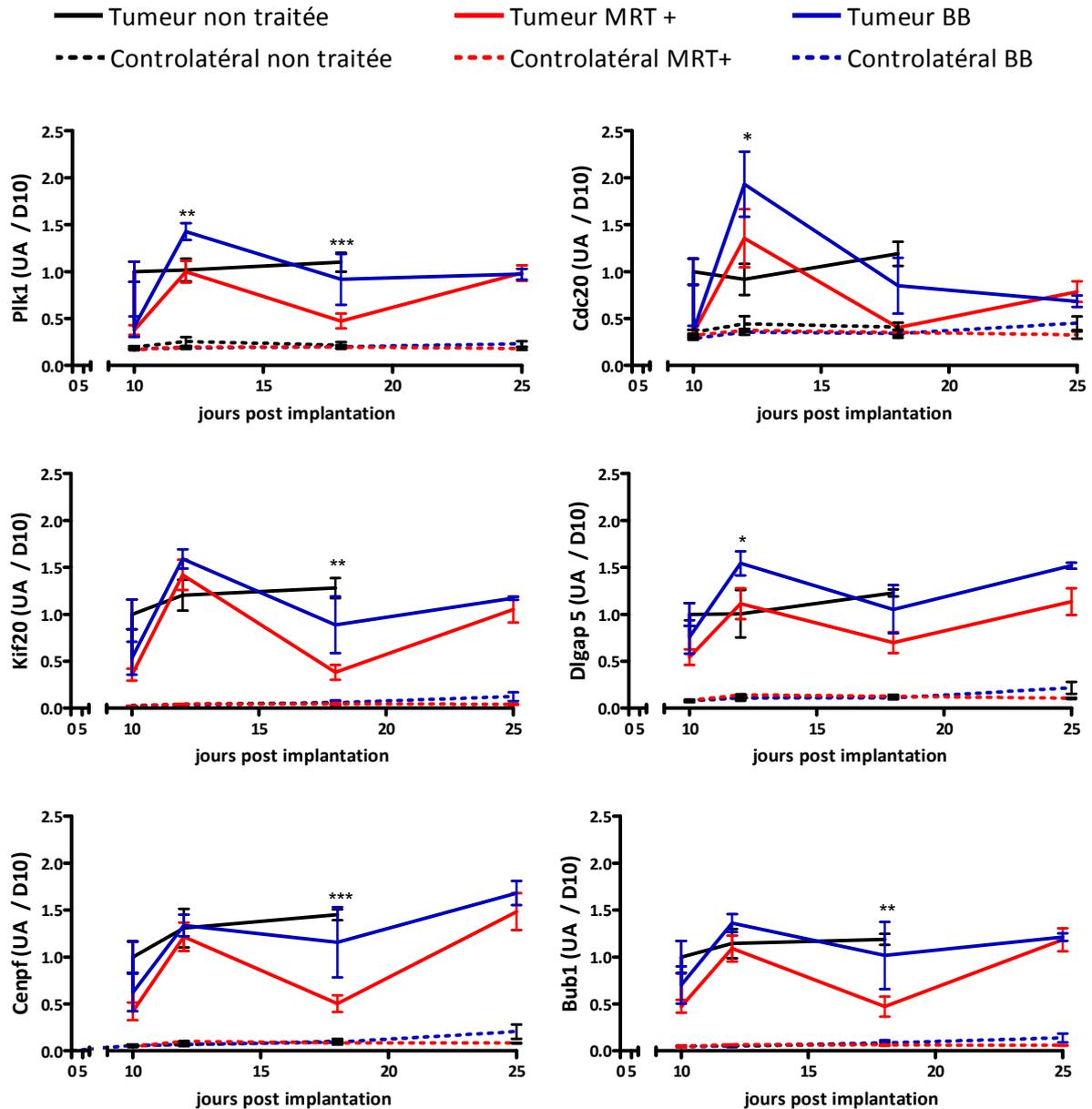


Figure 89 : Suivi de l'expression (moyenne \pm SEM) des gènes *Plk1*, *Cdc20*, *Kif20a*, *Dlgap5*, *Cenpf* et *Bub1* à $J_{10}T_{6h}$, $J_{12}T_{48h}$, $J_{18}T_{8j}$ et $J_{25}T_{15j}$. Les valeurs sont exprimées en rapport de l'expression des tumeurs avant traitement (J_{10}). Les lignes noires pleines ou pointillées représentent respectivement l'expression dans les tissus tumoraux et controlatéraux non traités ; les lignes rouges pleines ou pointillées, les tissus tumoraux et controlatéraux traités par MRT ; les lignes bleues pleines ou pointillées, les tissus tumoraux et controlatéraux traités par BB. Les étoiles indiquent la significativité entre les groupes BB et MRT (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$).

L'expression des transcrits Plk1, Cdc20, Kif20a, Dlgap5, Cenpf et Bub1, appartenant au cluster Plk1, présente une tendance plus élevée dans les tumeurs irradiées par BB (tumeurs BB) que dans les tumeurs irradiées par MRT (tumeurs MRT). Aucun de ces transcrits ne présente de différence significative à J₁₀T_{6h} et J₂₅T_{15j} entre les tumeurs irradiées. Par rapport aux tumeurs MRT, les tumeurs BB présentent une expression significativement plus élevée de Plk1, Cdc20, Dlgap5 à J₁₂T_{48h} et de Plk1, Kif20a, Cenpf et Bub1 à J₁₈T_{8j}. Les tissus controlatéraux non irradiés ou irradiés par BB ou MRT présentent des expressions indétectables par microarray (et donc similaires) pour ces 6 gènes du cluster Plk1 à tous les temps observés.

Des différences entre tumeurs BB et MRT sont également observées au niveau de l'expression des transcrits d'Areg et de Clecsf6 (Figure 90).

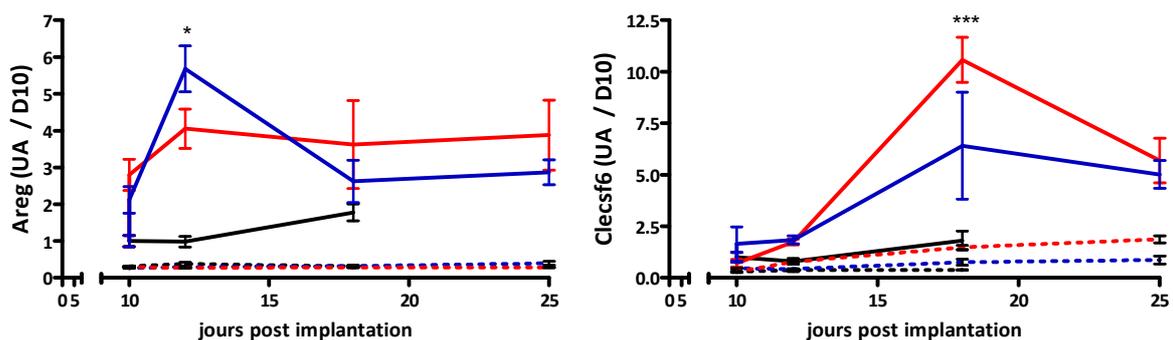


Figure 90 : Suivi de l'expression (moyenne \pm SEM) des gènes Areg et Clecsf6 à J₁₀T_{6h}, J₁₂T_{48h}, J₁₈T_{8j} et J₂₅T_{15j}. Les valeurs sont exprimées en rapport de l'expression des tumeurs avant traitement (J₁₀). Les lignes noires pleine ou pointillée représentent respectivement l'expression dans les tissus controlatéraux traités par MRT (Controlatéral MRT +) ou non traités (Controlatéral MRT -); les lignes rouges pleine ou pointillée, les tumeurs traitées (Tumeur MRT +) ou non traitées (Tumeur MRT -); les lignes bleues pleine ou pointillée, les tumeurs traitées (Tumeur BB +) ou non traitées (Tumeur BB -). Les étoiles indiquent la significativité entre les groupes BB et MRT (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$).

En effet, l'expression transcriptomique d'Areg est significativement plus élevée dans les tumeurs BB à J₁₂T_{48h}. Pour les autres temps, l'expression d'Areg est sensiblement plus faible dans les tumeurs BB que dans tumeurs MRT (non significatif). Le taux de transcrite de Clecsf6 dans les tumeurs est significativement plus élevé pour le groupe MRT que pour le groupe BB à J₁₈T_{8j}. Pour ces deux transcrits, aucune expression n'est observée dans les tissus controlatéraux irradiés par MRT ou BB.

D - Identification des gènes modulés spécifiquement par la présence des microfaisceaux

Au-delà de ces 17 gènes d'intérêt, nous avons recherché les gènes présentant une expression différentielle entre les tissus irradiés par MRT ou par BB. Sur les échantillons prélevés 6h après l'irradiation, aucun gène n'a été identifié en utilisant la méthode SAM avec un FDR compris entre 0 et 30%. Ce résultat révèle que les tissus cérébraux sains comme tumoraux présentent une réponse transcriptomique similaire 6h après MRT et après BB. L'étude a été étendue à des temps plus tardifs. Pour chaque tissu, un diagramme de Venn résume le nombre de gènes présentant une expression significativement différente entre les tissus irradiés par MRT ou par BB et leur superposition à différents délais (Figure 91).

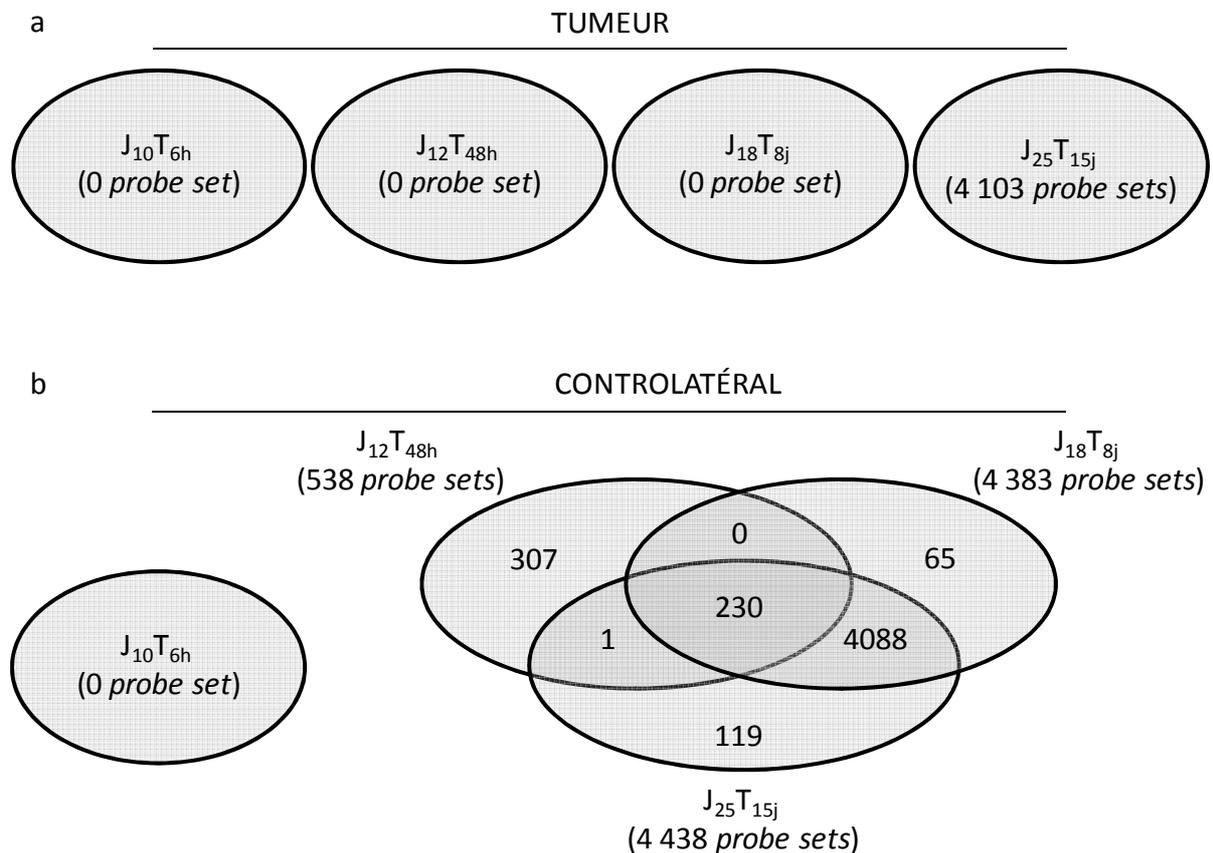


Figure 91 : Diagramme de Venn représentant le nombre de gènes différentiellement exprimés (test SAM, FDR 5%) entre les groupes MRT et BB, au sein des tissus tumoraux (a) ou controlatéraux (b), à $J_{10}T_{6h}$, $J_{12}T_{48h}$, $J_{18}T_{8j}$, $J_{25}T_{15j}$.

Au niveau tumoral, des différences transcriptomiques ne sont observables qu'à $J_{25}T_{15j}$; les temps $J_{12}T_{48h}$ et $J_{18}T_{8j}$ ne présentant de différence transcriptomique significative sur aucun *probe set*.

Une différence de réponse transcriptomique après MRT ou BB apparaît plus précocement dans les tissus controlatéraux. En effet, 538 *probe sets* sont différentiellement exprimés à J₁₂T_{48h}. Ce nombre passe à 4 383 et 4 438 *probe sets* à J₁₈T_{8j} et J₂₅T_{15j}, respectivement. La différence d'expression de 4 318 transcrits identifiés entre les tumeurs BB et MRT à J₁₈T_{8j} est maintenue à J₂₅T_{15j}.

Un nombre assez proche de *probe sets* est différentiellement exprimé à J₂₅T₁₅ dans les 2 types de tissus (tumeur=4 103 et controlatéral=4 438), dont 1 113 sont communs (résultat non illustré).

E - Discussion

Un faible nombre d'études a confronté la MRT à d'autres types de traitements. Une radiothérapie conventionnelle en champ plein déposant 35 Gy et différentes configurations MRT (442/35/200^{***}, 625/35/200, 884/35/200 and 442/70/200) ont été testées sur des cellules SCCVII (*squamous cell carcinoma*) implantées de façon sous-cutanée chez la souris [Miura M *et al.* 2006]. Si des différences sur la médiane de survie ont été observées (20 jours pour 35 Gy en champ plein et respectivement 25, 29, 37 et 35 jours pour les groupes MRT), l'extrapolation est limitée par l'absence d'indication sur les doses vallées déposées en MRT et par les différentes sources d'irradiation utilisées. Une comparaison de l'effet d'irradiation MRT (2x560/25/200) déposant une dose vallée de 17 Gy et d'irradiations de 11 ou 22 Gy en BB par un irradiateur hospitalier (LINAC) sur des tumeurs mammaires EMT-6.5 a permis d'obtenir respectivement une ILS d'environ 81, 42 et 73% par rapport aux animaux non traités [Crosbie J. C. *et al.* 2010]. Dans cette étude, même si la dose vallée de la MRT (17 Gy) est encadrée par les 2 doses déposées en BB (11 et 22 Gy), une comparaison stricte des résultats ne peut se faire en raison de la différence de configuration d'irradiation (croisée en MRT, unidirectionnelle en BB) et à nouveau par la différence de source d'irradiation. Dans des conditions expérimentales plus proches des nôtres, le traitement de tumeurs cérébrales 9L par une irradiation synchrotron BB (20 Gy) ou par MRT (625/25/200) déposant 8,8 Gy dans la vallée a abouti à des résultats *in vivo* très proches avec des MST respectives de 37,5 et 40 jours et des ILS de 87,5 et 100% [Regnard P. *et al.* 2008].

^{***} Les conditions d'irradiation sont par convention notées : Dose pic (Gy) / largeur des microfaisceaux (μm) / distance entre les microfaisceaux (μm).

Cependant, même si une source synchrotron est utilisée pour ces 2 types de radiothérapie, le manque de point de comparaison pour les doses appliquées ne permet pas de conclure quant à l'influence de l'utilisation des microfaisceaux.

L'absence d'étude comparable entre BB et MRT peut s'expliquer par les difficultés inhérentes à la dosimétrie en MRT. En effet, l'alternance de dose vallée (de quelques Grays) et de doses pics (de plusieurs centaines de Grays) sur un volume micrométrique rend l'utilisation des stratégies de mesures et de calculs habituelles complexes. Les efforts pour conjuguer la dosimétrie théorique et expérimentale au sein de l'ESRF ont permis d'accéder à la dose vallée de manière de plus en plus précise. Pour la configuration d'irradiation MRT utilisée lors de ce travail de thèse (400/50/200), un PVDR de 23,1 et donc une dose vallée de 17,3 Gy a été évalué avec une précision de 2 % par calculs Monte Carlo ($17,3 \pm 0,35$ Gy) et d'environ 8 % expérimentalement ($17,3 \pm 1,38$ Gy). Nous avons ainsi pu effectuer, pour la première fois sur des animaux porteurs de tumeur cérébrale, une comparaison rigoureuse des effets d'une irradiation MRT et d'une irradiation synchrotron en champ plein avec une dose équivalente à la dose vallée déposée en MRT.

En utilisant nos paramètres d'irradiation, un traitement par MRT comme par BB augmente la survie de rats Fischer porteurs de tumeur 9L orthotopique et augmentent la médiane de survie de 19 jours pour les animaux non traités à respectivement 35 et 25 jours ($p < 0,0001$). La MRT permet d'obtenir de meilleurs résultats que l'irradiation BB sur la survie des animaux ($p < 0,0001$) (Figure 86). La valeur de ces résultats est de plus confortée par leur reproductibilité à plusieurs mois d'intervalle. L'augmentation de la médiane de survie post-traitement est de 244,4% pour l'irradiation MRT contre 166,7% avec une irradiation de $18 \pm 0,6$ Gy en champ plein. Cette différence de survie corrèle avec une différence d'efficacité sur le contrôle tumoral : la croissance des tumeurs irradiées est plus lente que celles des tumeurs traitées et la MRT limite plus longtemps et plus efficacement la croissance tumorale que les irradiations BB (Figure 87). Même si la majorité du volume irradié en MRT reçoit une dose de $17,3 \pm 1,38$ Gy, la présence de microfaisceaux octroie donc à la MRT une efficacité supérieure à une irradiation synchrotron en champ plein. Ceci constitue la première preuve d'un effet additif des microfaisceaux pour le contrôle des tumeurs cérébrales par rapport à une irradiation synchrotron homogène comparable.

Pour comprendre par quels mécanismes les microfaisceaux augmentent l'index thérapeutique, nous avons cherché à déterminer par une approche histologique et transcriptomique s'il existait une réponse particulière à la MRT par rapport au BB.

Seuls quelques critères histologiques diffèrent entre les tumeurs irradiées en MRT et en BB. Les tumeurs irradiées en BB présentent un nombre de cellules mitotiques et parmi elles de cellules pycno-mitotiques plus élevé qu'après une irradiation MRT pour les temps précoces ($J_{10}T_{6h}$ et $J_{12}T_{48h}$). Ces 2 paramètres étant antagonistes, il est difficile de conclure quant à leur influence sur la croissance tumorale. En revanche, ils révèlent un *turn-over* plus élevé après une irradiation BB. Le nombre de cellules polyploïdes plus élevé après MRT (Figure 88) peut indiquer des mitoses aberrantes ou un blocage mitotique plus important et être au moins partiellement responsable d'une différence de croissance tumorale. Ceci est de plus en accord avec la différence d'expression des gènes *Plk1*, *Cdc20*, *Kif20a*, *Dlgap5*, *Cenpf* et *Bub1* (Figure 89). En effet, l'expression de ces gènes, impliquée dans le contrôle de la division cellulaire, présente une tendance plus faible dans les tumeurs irradiées par MRT que dans les tumeurs irradiées par BB (différences significatives pour 1 ou 2 temps selon le *probe set*). Les niveaux d'expression d'*Areg* et de *Clecsf6* présentent également des différences entre les tumeurs du groupe BB et MRT (Figure 90), mais pour un seul temps de la cinétique. Il est par conséquent délicat de donner du poids à cette observation en dehors d'un faisceau cohérent de résultats. Ces gènes d'intérêt ont précédemment été sélectionnés sur leur spécificité à répondre après MRT uniquement dans la tumeur, mais ils semblent ne répondre que peu différemment après une irradiation BB synchrotron. Nous avons donc cherché s'il existait des différences de réponse transcriptomique sur l'intégralité du génome testé par microarray.

Six heures après les irradiations, aucun des 31 100 *probe sets* ne présente de différence significative entre le groupe MRT et BB, et ce, pour le tissu sain comme tumoral. Au niveau du tissu controlatéral, un nombre croissant de gènes différentiellement exprimés pour les irradiations MRT et BB sont identifiés dès $J_{12}T_{48h}$ (respectivement 538, 4 383 et 4 438 *probe sets* à $J_{12}T_{48h}$, $J_{18}T_{8j}$ et $J_{25}T_{15j}$). Parmi eux, 230 sont communs aux 3 temps et surtout 4 318 sont communs à $J_{18}T_{8j}$ et $J_{25}T_{15j}$, révélant des profils transcriptomiques spécifiques du type d'irradiation s'établissant de manière durable dans les tissus controlatéraux. Ces résultats constituent une base de données qui par une analyse plus détaillée pourrait faciliter la compréhension des mécanismes qui permettent préservation des tissus sains après MRT.

Au niveau tumoral, la détection des 1^{ers} gènes différentiellement modulés par les 2 irradiations n'intervient qu'à $J_{25}T_{15j}$: 4 103 *probe sets* présentent des expressions significativement différentes. À ce temps les tumeurs sont de tailles très différentes dans les 2 groupes (plus de 3 fois plus élevée pour le groupe BB). Les différences de profils transcriptomiques à ce temps long peuvent donc davantage refléter les différences phénotypiques des tumeurs que des mécanismes de réponses différentielles entre les 2 irradiations. Ces résultats diffèrent de ceux récemment rapportés sur des tumeurs mammaires (ENT-6.5) implantées en position sous-cutané [Sprung CN *et al.* 2012] (résultats encore non publiés, communication personnelle avec le Dr. Jeff Crossbie). Cette étude compare les profils transcriptomiques tumoraux après une irradiation MRT (560/25/200) déposant 11 Gy dans la vallée et après irradiation synchrotron en champ plein à des doses de 11 ou 22 Gy. L'expression d'un groupe de transcrits est significativement différente dès la 4^{ème} heure post-irradiation, plus faible dans le groupe MRT que dans le groupe BB. À 24 et 48h, des profils transcriptomiques différents sont obtenus, avec une augmentation de la proportion de gènes présentant une expression dans le groupe MRT supérieure à celle du groupe BB. L'annotation fonctionnelle de ces gènes permis d'identifier de façon prépondérante des voies de signalisation en lien avec la réponse immunitaire. L'extrapolation de ces résultats aux nôtres est cependant délicate puisque les outils d'analyses et surtout les techniques de traitement des données sont différents. Dans leur étude, les données obtenues sur puces de type Illumina (n=4 pour le groupe MRT, n=2 pour le groupe BB 11 Gy et n=2 pour le groupe BB 22 Gy) et sont analysées à l'aide test ANOVA (sélection : *fold-change*>1,5 et *p-value*<0,05). L'utilisation de tests statistiques différents influence la sélection de gènes. A titre d'exemple, le traitement de nos données par un test M&W avec *p-value*<0,05 (au lieu de la méthode SAM utilisée dans notre étude), permet d'identifier une 100^{aine} de gènes dont l'expression est significativement différente entre le groupe BB et MRT dès $J_{10}T_{6h}$.

L'absence de réponse différentielle après MRT ou BB au niveau tumoral peut s'expliquer par différentes hypothèses. (i) La capacité de réponse transcriptomique des cellules peut être saturée au-delà d'une certaine dose. L'utilisation d'une dose vallée et BB plus faible peut être envisagée afin d'observer l'influence des microfaisceaux au niveau transcriptomique. (ii) Le nombre d'échantillons tumoraux utilisés pour l'analyse statistique ($3 < n < 4$) pourrait être trop faible pour révéler des différences fines entre les 2 irradiations. Nous avons cependant obtenu une différence de réponse transcriptomique pour des temps beaucoup plus précoces au niveau des tissus controlatéraux. À la différence des tissus sains, les tumeurs présentent une hétérogénéité intra-expérience limitant l'identification de variations faibles par le biais de tests

statistiques. Une augmentation de l'échantillonnage tumoral permettrait de lever cette incertitude. (iii) Il peut être envisagé que les cellules irradiées par 400 Gy sur le passage des microfaisceaux soient trop lésées (40 DSB pour 1 Gy) pour mettre en place une transcription. La réponse transcriptomique observée serait alors issue des cellules encore fonctionnelles, c'est-à-dire les cellules de la zone vallée ayant reçues une dose équivalente à celle reçues par les cellules irradiées en BB. (iv) Enfin l'analyse transcriptomique que nous avons réalisée permet de définir de façon globale et donc moyennée la réponse d'un tissu. Il peut être envisagé que les spécificités de réponse aux deux stimuli d'un groupe mineur de cellules ne soit pas apparente. Pour étudier cette hypothèse, il faudrait faire une analyse des tissus irradiés en pratiquant par exemple des microdissections en rapport avec le fractionnement spatial.

Les observations transcriptomiques et histologiques des tumeurs n'ont pas permis de déterminer quels sont les effets inhérents aux passages des microfaisceaux en MRT. Cependant, si les résultats transcriptomiques obtenus sur les tumeurs méritent d'être complétés; ceux acquis sur les tissus controlatéraux demeurent une source de données pour une future caractérisation des effets de rayonnements spatialement fractionnés sur le tissu cérébral sain. Ceci est d'autant plus intéressant que l'utilisation des microfaisceaux est proposée depuis quelques années pour le traitement d'autres pathologies cérébrales comme l'épilepsie ou Parkinson [Anschel DJ *et al.* 2010; Romanelli P *et al.* 2011; Serduc R. *et al.* 2010a; Serduc R. *et al.* 2010b].

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'hypothèse d'un effet différentiel de la radiothérapie par microfaisceaux sur les tumeurs cérébrales a été énoncée il y a plus d'une vingtaine d'années. Cependant, les études publiées n'ont permis qu'une description partielle des phénomènes biologiques mis en jeu après MRT. Dans ce travail, nous avons choisi d'utiliser une approche pangénomique afin d'explorer et de décrire les phénomènes transcriptionnels impliqués dans la réponse tissulaire saine et tumorale face à ce mode d'irradiation.

Dans un premier temps, nous nous sommes assurés de la reproductibilité du modèle tumoral utilisé au cours de cette thèse afin de nous affranchir des variations entre les expériences pouvant interférer dans l'analyse des résultats. En effet, de par sa quasi-exhaustivité, l'approche transcriptomique est une méthode sensible aux modifications physiologiques et micro-environnementales. Nous avons pu vérifier que le modèle de gliosarcome 9L implanté orthotopiquement chez le rat Fischer présente des caractéristiques des gliomes de haut grade *c. à d.* hyper-vascularisation, densité cellulaire élevée, prolifération intense et présence de plages nécrotiques. Malgré une hétérogénéité de morphologie tumorale intra-expérience, ce travail a été réalisé à partir d'un modèle prévisible (prise, croissance tumorale et survie animale) qui a permis une étude transcriptomique robuste et reproductible.

Cette étude transcriptomique est basée sur l'utilisation de puces d'expression de type Affymetrix permettant d'accéder à l'expression de 31 100 *probe sets*. Ce travail décrit les profils transcriptomiques obtenus dans les tissus cérébraux sains et tumoraux 6h après une irradiation par microfaisceaux synchrotron. Nous avons pu montrer que la MRT modifie l'expression d'un large spectre de gènes dans les deux types de tissus. Aucune étude transcriptomique comparant effets de la MRT sur les tissus sains et tumoraux n'avait été réalisée jusqu'à aujourd'hui. Nous avons pu mettre en évidence une réponse précoce différentielle entre les deux types de tissus. Elle implique un large nombre de gènes spécifiques de chaque tissu et met en jeu 1 509 et 554 *probe sets* dans les tissus sains et tumoraux respectivement (seuls 219 sont communs aux deux tissus). L'annotation fonctionnelle de ces transcrits a permis de les regrouper à l'aide du logiciel IPA dans des voies de signalisation et des fonctions moléculaires et cellulaires. Alors que les transcrits tissu-spécifiques se distinguent par leur nombre, les voies de signalisation et les fonctions

moléculaires et cellulaires qui les regroupent sont similaires. Les deux tissus engagent ainsi 18 fonctions identiques en lien avec la réaction immunitaire et la réponse cellulaire aux dommages radio-induits comme la mort cellulaire, la modification du cycle cellulaire et de la prolifération. Ces résultats sont en accord avec les données rapportées dans la littérature pour différents types de radiothérapies.

Parmi les 205 et 221 voies de signalisation respectivement empruntées par les tissus tumoraux et controlatéraux, nous avons pu identifier certaines d'entre elles comme spécifiques de la réponse du tissu sain à la MRT. Elles sont pour la plupart impliquées dans la réponse immunitaire et dans la réorganisation du cytosquelette. La réponse des tumeurs cérébrales à la MRT utilise une voie de signalisation intervenant dans le blocage de la division cellulaire (rôle mitotique de la Polo-like kinase) et deux voies induisant une modification de l'activité métabolique.

Seules quelques voies ont été identifiées comme tissu-dépendantes et 180 autres sont communes à la réponse des deux tissus à la MRT, rendant difficile l'exploitation et l'interprétation des résultats. L'analyse détaillée du phénomène apoptotique révèle par exemple que les voies identifiées communément dans les deux tissus mettent en jeu des transcrits tissu-dépendants. Il s'agit d'une limite de la méthode IPA qui nécessite une investigation en profondeur de la nature des différents gènes regroupés sous les mêmes voies ou fonctions. L'analyse des conséquences fonctionnelles de la modulation de ces voies et fonctions est nécessairement manuelle et une approche naïve n'est pas adaptée ; ces résultats constituent une base de données interrogeable à partir d'hypothèses et questions précises. Enfin, à un niveau d'intégration supérieure, l'étude des interactions entre ces différentes voies ne peut être fiable qu'en utilisant des outils informatiques de grande capacité (simulations *in silico* qui pourraient être réalisées au sein de la société Helios, Paris).

Dans le cadre d'une utilisation plus ciblée des données obtenues, nous avons recherché des gènes qui pourraient être modulés dans la tumeur sans influencer la réponse du tissu sain après exposition aux microfaisceaux. Un groupe de 17 gènes répondant significativement à la MRT dans les tumeurs et indétectables dans le tissu sain a pu être identifié : Areg, Trib3, Nppb, Dlgap5, Clefcsf6, Cdc20, Plk1, Cenpf, Kif20a, Ccnb1, Traf4af1, Depdc1b, Mxd3 et Pttg1.

Parmi eux, 3 entités apparaissent comme des cibles pertinentes pour le traitement des tumeurs cérébrales après irradiation synchrotron :

- *le Cluster Plk1 participant à la progression du cycle cellulaire :*

Ce cluster regroupe 13 gènes par la similitude de leur fonction et de leur cinétique de transcription. L'inhibition de l'expression de ces gènes après MRT interfère avec le déroulement de différentes phases de la division cellulaire (maturation des centrosomes, formation du fuseau mitotique, séparation bipolaire, entrée en mitose, transition entre métaphase/anaphase et cytokinèse). Ces modifications transcriptomiques post-irradiation pourraient être à l'origine de la présence de cellules polyploïdes (mitotiques ou non) observées après MRT. Il s'agit de la première mise en évidence d'un mécanisme moléculaire spécifique du tissu tumoral participant au contrôle précoce de la croissance de la lésion après MRT. Ce processus pourrait être amplifié en inhibant Plk1 par un inhibiteur spécifique (par exemple le BI2536, utilisé en essai clinique de phase II) ou en modulant plusieurs gènes du cluster par l'intermédiaire de facteurs de transcription (FOXO1, YY1, NFYB, E2F4).

- *Clecsf6:*

Le taux de ce transcrit corrèle avec la densité de cellules immunitaires présentes dans le tissu tumoral. Ce gène est fortement surexprimé à partir d'une semaine après MRT et son promoteur pourrait être utilisé afin de produire des molécules participant au contrôle tumoral. En effet, des monocytes prélevés, transfectés (insert en aval du promoteur de Clecsf6), multipliés et réinjectés pourront être recrutés au niveau du tissu tumoral et excréter des protéines d'intérêt thérapeutique.

- *Areg codant pour le facteur de croissance Amphiréguline :*

L'expression d'Areg est un marqueur de mauvais pronostic en clinique et est associé à l'échappement tumoral dans plusieurs traitements. Sa surexpression après MRT pourrait constituer un mécanisme de résistance aux radiothérapies. L'association de la MRT et d'une inhibition de ce transcrit ou de la protéine résultante semble être intéressante pour augmenter l'index thérapeutique de la MRT en limitant la prolifération cellulaire *via* l'EGFR. Cependant, les outils actuels modifiant les effets de l'Amphiréguline repose sur l'utilisation d'anticorps neutralisants, peu efficaces en présence de la barrière hémato-tumorale, et une stratégie visant une inhibition d'Areg *via* des siRNA apparaît pertinente.

La sélection de ces cibles est effectuée à partir des données obtenues six heures après l'irradiation. La variation de leur expression dans le temps illustre cependant qu'une sélection réalisée à un autre temps aurait permis l'identification de cibles différentes. Les résultats pangénomiques acquis lors de notre étude cinétique complète donc la base de données disponible pour étudier la MRT.

Enfin, dans une dernière partie de notre travail, nous avons vérifié si ces modulations transcriptionnelles étaient propres à la MRT. Nous avons donc comparé les profils de transcrits tumoraux induits par la MRT ou par une dose équivalente délivrée en champ plein. L'étude pangénomique n'a révélé aucune différence entre les deux groupes de tumeurs irradiées par MRT ou BB. Il est indispensable d'augmenter le nombre d'échantillons analysés afin de confirmer cette similitude. En utilisant un échantillonnage supérieur, des différences significatives ont pu être détectées sur la cinétique d'expression des gènes choisis comme cibles. Nos résultats révèlent en effet que les phénomènes de régulation associés aux gènes cibles précédemment décrits sont accentués après MRT par rapport au BB. Cependant, d'autres processus biologiques intervenant à d'autres échelles que celle du transcriptome pourrait expliquer les meilleurs survies et contrôle tumoral obtenus après MRT. D'aucuns considéreront pertinent l'étude du microenvironnement tumoral, d'autres le rôle de l'inflammation radio-induite dans la récurrence tumorale et enfin, certains éprouveront l'hypothèse d'un effet préférentiel vasculaire énoncée il y a 14 ans déjà par le professeur Jean Laissue et ses collaborateurs.

RÉFÉRENCES

- Alwine J C, Kemp D J and Stark G R, *Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzylloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes.*, Proc Natl Acad Sci U S A, **1977**. vol 74 (12) p5350-5354.
- Anschel DJ, Bravin A and Romanelli P, *Microbeam radiosurgery using synchrotron-generated submillimetric beams: a new tool for the treatment of brain disorders*, Neurosurg Rev, **2010**. vol 34 (2) p133-42.
- Archer, D. (1998). Collimator for producing an array of microbeams. United States Patent.
- Asai A, Miyagi Y, Sugiyama A, Gamanuma M, Hong SH, Takamoto S, Nomura K, Matsutani M, Takakura K and Kuchino Y, *Negative effects of wild-type p53 and s-Myc on cellular growth and tumorigenicity of glioma cells. Implication of the tumor suppressor genes for gene therapy*, J Neurooncol, **1994**. vol 19 (3) p259-68.
- Attenello FJ, Mukherjee D, Dato G, McGirt MJ, Bohan E, Weingart JD, Olivi A, Quinones-Hinojosa A and Brem H, *Use of Gliadel (BCNU) wafer in the surgical treatment of malignant glioma: a 10-year institutional experience*, Ann Surg Oncol, **2008**. vol 15 (10) p2887-93.
- Bailey P and Cushing H, *A classification of tumors of the glioma group on a histogenetic basis with a correlation study of prognosis.*, Philadelphia: Lippincott, **1926**. vol
- Baldetorp L and Håkansson CH, *Response of ciliated cells during irradiation at different dose rates*, Acta Radiol Ther Phys Biol, **1977**. vol 16 (4) p378-84.
- Barth RF, *Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the 9L, C6, T9, F98, RG2 (D74), RT-2 and CNS-1 gliomas*, J Neurooncol, **1998**. vol 36 (1) p91-102.
- Barth RF and Kaur B, *Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas*, J Neurooncol, **2009**. vol 94 (3) p299-312.
- Bassi C, Mello SS, Cardoso RS, Godoy PD, Fachin AL, Junta CM, Sandrin-Garcia P, Carlotti CG, Falcão RP, Donadi EA, Passos GA and Sakamoto-Hojo ET, *Transcriptional changes in U343 MG-a glioblastoma cell line exposed to ionizing radiation*, Hum Exp Toxicol, **2008**. vol 27 (12) p919-29.
- Bates EE, Fournier N, Garcia E, Valladeau J, Durand I, Pin JJ, Zurawski SM, Patel S, Abrams JS, Lebecque S, Garrone P and Saeland S, *APCs express DCIR, a novel C-type lectin surface receptor containing an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*, J Immunol, **1999**. vol 163 (4) p1973-83.
- Bauchet, L., V. Rigau, H. Mathieu-Daudé, D. Figarella-Branger, D. Hugues, L. Palusseau, F. Bauchet, M. Fabbro, C. Campello, L. Capelle, A. Durand, B. Trétarre, D. Frappaz, D. Henin, P. Menei, J. Honnorat and F. Segnarbieux, *French brain tumor data bank: Methodology and first results on 10,000 cases*, J Neurooncol, **2007**. vol 84 (2) p189-199.
- Bencokova, Z., L. Pauron, C. Devic, A. Joubert, J. Gastaldo, C. Massart, J. Balosso and N. Foray, *Molecular and cellular response of the most extensively used rodent glioma models to radiation and/or cisplatin*, J Neurooncol, **2008**. vol 86 (1) p13-21.

- Benda, P., K. Someda, J. Messer and W. H. Sweet, *Morphological and immunochemical studies of rat glial tumors and clonal strains propagated in culture*, J Neurosurg, **1971**. vol 34 (3) p310-23.
- Bharadwaj R and Yu H, *The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer*, Oncogene, **2004**. vol 23 (11) p2016-27.
- Biston MC, A. Joubert, J. F. Adam, H. Elleaume, S. Bohic, A. M. Charvet, F. Esteve, N. Foray and J. Balosso, *Cure of Fisher rats bearing radioresistant F98 glioma treated with cis-platinum and irradiated with monochromatic synchrotron X-rays*, Cancer Res, **2004**. vol 64 (7) p2317-23.
- Blattmann, H., J.-O. Gebbers, E. Brauer-Krisch, A. Bravin, G. Le Duc, W. Burkard, D. Michiel, V. Djonov, D. N. Slatkin, J. Stepanek and J. Laissue, *Applications of synchrotron X-rays to radiotherapy*, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment, **2005**. vol 548 p17-22.
- Boiardi A, Silvani A, Pozzi A, Farinotti M, Fariselli L, Broggi G and Salmaggi A, *Advantage of treating anaplastic gliomas with aggressive protocol combining chemotherapy and radiotherapy*, J Neurooncol, **1997**. vol 34 (2) p179-85.
- Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M and Speed TP, *A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias*, Bioinformatics, **2003**. vol 19 (2) p185-93.
- Bouchet A, Boumendjel A, Khalil E, Serduc R, Brauer E, Siegbahn EA, Laissue JA. and Boutonnat J, *Chalcone JAI-51 improves efficacy of synchrotron microbeam radiation therapy of brain tumors*, J. Synchrotron Rad, **2012**. vol 19 p478-482.
- Bouchet A, Lemasson B, Leduc G, Maisin C, Bräuer-Krisch E, Siegbahn EA, Renaud L, Remy C, Bravin A, Laissue JA, Barbier E and Serduc R, *Preferential effect of synchrotron microbeam radiation therapy on intracerebral 9L gliosarcoma vascular networks*, Int. J. Rad. Onc. Biol. Phys., **2010**. vol 78 (5) p1503-1512.
- Brat DJ, Parisi JE, Kleinschmidt-DeMasters BK, Yachnis AT, Montine TJ, Boyer PJ, Powell SZ, Prayson RA and McLendon RE, *Surgical neuropathology update: a review of changes introduced by the WHO classification of tumours of the central nervous system, 4th edition.*, Arch Pathol Lab Med., **2008**. vol 132 (6) p993-1007.
- Bräuer-Krisch, E. (2005). Theoretical and experimental microdosimetry for MRT (Microbeam Radiation Therapy). Micro and Mini Dosimetry, Melbourne, Australia.
- Bräuer-Krisch E, Requardt H, Brochard T, Berruyer G, Renier M, Laissue JA and Bravin A, *New technology enables high precision multislit collimators for microbeam radiation therapy.*, Rev Sci Instrum., **2009a**. vol 80 (7)
- Bräuer-Krisch E, Serduc R, Siegbahn EA, Le Duc G, Prezado Y, Bravin A, Blattmann H and L. JA., *Effects of pulsed, spatially fractionated, microscopic synchrotron X-ray beams on normal and tumoral brain tissue*, Mutat Res, **2010**. vol 704 (1-3) p160-6.
- Bräuer-Krisch, E., A. Bravin, E. Siegbahn, A., L. Zhang, J. Stepanek, H. Blattmann, D. N. Slatkin, J. O. Gebbers, M. Jasmin and J. Laissue, *Characterization of a tungsten/gas multislit collimator for*

- microbeam radiation therapy at the European Synchrotron Radiation Facility.*, Review of scientific instruments, **2005a**. vol 76 p1-7.
- Bräuer-Krisch, E., H. Requardt, P. Regnard, S. Corde, E. Siegbahn, A., G. Leduc, H. Blattmann, J. Laissue and A. Bravin, *Exploiting geometrical irradiation possibilities in MRT application*, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment, **2005b**. vol 548 p69-71.
- Bräuer-Krisch, E., H. Requardt, P. Regnard, S. Corde, E. Siegbahn, G. Leduc, T. Brochard, H. Blattmann, J. Laissue and A. Bravin, *New irradiation geometry for microbeam radiation therapy*, Phys Med Biol, **2005c**. vol 50 (13) p3103-11.
- Bräuer-Krisch, E., A. Rosenfeld, M. Lerch, M. Petasecca, G. M. Akselrod, G. J. Sykora, J. Bartz, M. Ptaszkiwicz, P. Olko, A. Berg, M. Wieland, S. Doran, T. Brochard, A. Kamlowski, G. Cellere, A. Paccagnella, E. A. Siegbahn, Y. Prezado, I. Martinez-Rovira, A. Bravin, L. Dusseau and P. Berkvens, *Potential High Resolution Dosimeters For MRT*, MASR proceedings 2010, Melbourne, Australia, **2010**. vol submitted for publication
- Bräuer-Krisch, E., E. A. Siegbahn and A. Bravin, *GafChromic® Film Measurements for Microbeam Radiation Therapy (MRT)*, IFMBE Proceedings, **2009b**. vol 25
- Bräuer-Krisch, E., E. A. Siegbahn and A. Bravin, *GafChromic® Film Measurements for Microbeam Radiation Therapy (MRT)*, IFMBE Proceedings **2009c**. vol 25
- Broggini-Tenzer A, Vuong V and Pruschy M, *Metabolism of tumors under treatment: mapping of metabolites with quantitative bioluminescence.*, Radiother Oncol, **2011**. vol 99 (3) p398-403.
- Bromberg JE and van den Bent MJ., *Oligodendrogliomas: molecular biology and treatment.*, Oncologist, **2009**. vol 14 p155-163.
- Bruner JM, Inouye L, Fuller GN and Langford LA, *Diagnostic discrepancies and their clinical impact in a neuropathology referral practice*, Cancer, **1997**. vol 79 (4) p796-803.
- Busser B, Sancey L, Josserand V, Niang C, Favrot MC, Coll JL and Hurbin A, *Amphiregulin promotes BAX inhibition and resistance to gefitinib in non-small-cell lung cancers*, Mol Ther, **2010a**. vol 18 (3) p528-35.
- Busser B, Sancey L, Josserand V, Niang C, Khochbin S, Favrot MC, Coll JL and Hurbin A, *Amphiregulin promotes resistance to gefitinib in nonsmall cell lung cancer cells by regulating Ku70 acetylation*, Mol Ther, **2010b**. vol 18 (3) p536-43.
- Butterfield LH, Jilani SM, Chakraborty NG, Bui LA, Ribas A, Dissette VB, Lau R, Gamradt SC, Glaspy JA, McBride WH, Mukherji B and Economou JS, *Generation of melanoma-specific cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells transduced with a MART-1 adenovirus*, J Immunol, **1998**. vol 161 (10) p5607-13.
- Cairncross G, Berkey B, Shaw E, Jenkins R, Scheithauer B, Brachman D, Buckner J, Fink K, Souhami L, Laperriere N, Mehta M and Curran W, *Phase III trial of chemotherapy plus radiotherapy compared with radiotherapy alone for pure and mixed anaplastic oligodendroglioma: Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402.*, Journal of Clinical Oncology, **2006**. vol 24 (18) p2707-14.

- Camphausen K, Purow B, Sproull M, Scott T, Ozawa T, Deen DF and Tofilon PJ, *Orthotopic growth of human glioma cells quantitatively and qualitatively influences radiation-induced changes in gene expression*, *Cancer Res*, **2005**. vol 65 (22) p10389-93.
- Casenghi M, Barr FA and Nigg EA, *Phosphorylation of Nlp by Plk1 negatively regulates its dynein-dynactin-dependent targeting to the centrosome*, *J Cell Sci*, **2005**. vol 118 (Pt 21) p5101-8.
- Catherine Daumas-Duport, Marie-Louise Tucker, Harry Kolles, Pascale Cervera, Frédéric Beuvon, Pascale Varlet, Naoko Udo, M. Koziak and J.-P. Chodkiewicz, *Oligodendrogliomas. Part II: A new grading system based on morphological and imaging criteria*, *Journal of Neuro-Oncology* **1997a**. vol 34 p 61–78.
- Catherine Daumas-Duport, Pascale Varlet, Marie-Louise Tucker, Frederic Beuvon, P. Cervera and J.-P. Chodkiewicz, *Oligodendrogliomas. Part I: Patterns of growth, histological diagnosis, clinical and imaging correlations: A study of 153 cases*, *Journal of Neuro-Oncology* **1997b**. vol 34 p37-59.
- CBTRUS, *Central Brain Tumor Registry of the United States (2005–2006) Primary brain tumors in the United States: statistical report, 1998–2002.* , vol
- CBTRUS, *CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2004-2008. Source: Central Brain Tumor Registry of the United States, Hinsdale, IL. website: www.cbtrus.org*, **2012**. vol
- Chaichana KL, Zaidi H, Pendleton C, McGirt MJ, Grossman R, Weingart JD, Olivi A, Quiñones-Hinojosa A and Brem H, *The efficacy of carmustine wafers for older patients with glioblastoma multiforme: prolonging survival*, *Neurol Res*, **2011**. vol 33 (7) p759-64.
- Chan JA, Krichevsky AM and K. KS., *MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells.*, *Cancer Res.*, **2005**. vol 65 (14) p6029-33.
- Chatel, M., M. Frenay, C. Lebrun, V. Bourg and F. Fauchon, *High grade gliomas: anaplastic astrocytomas and glioblastomas*, *EMC-Neurologie*, **2005**. vol p1-15.
- Chenga Mao-Wei, Wangb Bing-Chan, Wengc Zhi-Qiang and Zhuc Xiao-Wei, *Clinicopathological significance of Polo-like kinase 1 (PLK1) expression in human malignant glioma*, *Acta Histochemica*, **2011**. vol
- Chiba M, Miura T, Kasai K, Monzen S, Kashiwakura I, Yasue H and Nakamura T, *Identification of up-regulated and down-regulated cis-natural antisense transcripts in the human B lymphoblastic cell line IM-9 after X-ray irradiation*, *Mol Med Report*, **2012**. vol 5 (5) p1151-7.
- Ciafrè SA, Galardi S, Mangiola A, Ferracin M, Liu CG, Sabatino G, Negrini M, Maira G, Croce CM and Farace MG, *Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma.*, *Biochem Biophys Res Commun*, **2009**. vol 334 (4) p1351-8.
- Combs SE, Widmer V, Thilmann C, Hof H, Debus J and Schulz-Ertner D, *Stereotactic radiosurgery (SRS): treatment option for recurrent glioblastoma multiforme (GBM)*, *Cancer*, **2005**. vol 104 (10) p2168-73.

- Conti A, Aguenouz M, La Torre D, Tomasello C, Cardali S, Angileri FF, Maio F, Cama A, Germanò A, Vita G and T. F., *miR-21 and 221 upregulation and miR-181b downregulation in human grade II-IV astrocytic tumors.*, *J Neurooncol.*, **2009**. vol 93 (3) p325-32.
- Coons SW, Johnson PC, Scheithauer BW, Yates AJ and Pearl DK, *Improving diagnostic accuracy and interobserver concordance in the classification and grading of primary gliomas*, *Cancer*, **1997**. vol 79 (7) p1381-93.
- Cooper LA, Gutman DA, Long Q, Johnson BA, Cholleti SR, Kurc T, Saltz JH, Brat DJ and M. CS, *The proneural molecular signature is enriched in oligodendrogliomas and predicts improved survival among diffuse gliomas*, *PLoS One*, **2010**. vol 5 (9) pe12548.
- Couzin Jennifer, *Small RNAs Make Big Splash*, *Science*, **2002**. vol 298 (5602) p2296-2297.
- Crosbie, J. C., R. L. Anderson, K. Rothkamm, C. M. Restall, L. Cann, S. Ruwanpura, S. Meachem, N. Yagi, I. Svalbe, R. A. Lewis, B. R. Williams and P. A. Rogers, *Tumor cell response to synchrotron microbeam radiation therapy differs markedly from cells in normal tissues*, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **2010**. vol 77 (3) p886-94.
- Crosbie, J. C., I. Svalbe, S. M. Midgley, N. Yagi, P. A. Rogers and R. A. Lewis, *A method of dosimetry for synchrotron microbeam radiation therapy using radiochromic films of different sensitivity*, *Phys Med Biol*, **2008**. vol 53 (23) p6861-77.
- Darpolor MM, Molthen RC and Schmainda KM, *Multimodality imaging of abnormal vascular perfusion and morphology in preclinical 9L gliosarcoma model*, *PLoS One*, **2011**. vol 6 (1) pe16621.
- Daumas-Duport C, V. P. Beuvon F and F.-B. C., *Gliomas : WHO and Sainte-Anne Hospital classifications*, *Ann Pathol*, **2000**. vol 20 p413-28.
- Daumas-Duport, C., F. Beuvon, P. Varlet and C. Fallet-Bianco, *Gliomas: WHO and Sainte-Anne Hospital classifications*, *Ann Pathol*, **2000**. vol 20 (5) p413-28.
- De Felici, M., R. Felici, M. Sanchez del Rio, C. Ferrero, T. Bacarian and F. A. Dilmanian, *Dose distribution from x-ray microbeam arrays applied to radiation therapy: an EGS4 Monte Carlo study*, *Med Phys*, **2005**. vol 32 (8) p2455-63.
- Debinski W, Gibo DM, Hulet SW, Connor JR and Gillespie GY, *Receptor for interleukin 13 is a marker and therapeutic target for human high-grade gliomas*, *Clin Cancer Res*, **1999**. vol 5 (5) p985-90.
- Denlinger RH, Axler DA, Koestner A and Liss L, *Tumor-specific transplantation immunity to intracerebral challenge with cells from a methylnitrosourea- induced brain tumor*, *J Med*, **1975**. vol 6 (3-4) p249-59.
- Denny BJ, Wheelhouse RT, Stevens MF, Tsang LL and Slack JA, *NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA*, *Biochemistry*, **1994**. vol 33 (31) p9045-51.
- Desmarais G, Fortin D, Bujold R, Wagner R, Mathieu D and Paquette B, *Infiltration of glioma cells in brain parenchyma stimulated by radiation in the F98/Fischer rat model*, *Int J Radiat Biol*, **2012**. vol 88 (8) p565-74.

- Dilmanian, F. A., T. M. Button, G. Le Duc, N. Zhong, L. A. Pena, J. A. Smith, S. R. Martinez, T. Bacarian, J. Tammam, B. Ren, P. M. Farmer, J. Kalef-Ezra, P. L. Micca, M. M. Nawrocky, J. A. Niederer, F. P. Recksiek, A. Fuchs and E. M. Rosen, *Response of rat intracranial 9L gliosarcoma to microbeam radiation therapy*, *Neuro-oncol*, **2002**. vol 4 (1) p26-38.
- Dilmanian, F. A., J. F. Hainfeld, C. A. Kruse, C. D. Cool, C. I. Sze, J. S. Laterra, A. Feldman, S. J. Gatley, M. M. Nawrocky and R. Yakupov. (2003). "Biological mechanisms underlying the X-ray microbeam effects of preferentially destroying tumors." National Synchrotron Light Source Activity Report 2002, M.A. Corwin and S.N. Ehrlich, Eds. Retrieved Abstract No. Dilm0599. <http://nslsweb.nsls.bnl.gov/nsls/pubs/actrpt/2002/Abstracts/dilm0599.pdf>.
- Dilmanian, F. A., G. M. Morris, G. Le Duc, X. Huang, B. Ren, T. Bacarian, J. C. Allen, J. Kalef-Ezra, I. Orion, E. M. Rosen, T. Sandhu, P. Sathe, X. Y. Wu, Z. Zhong and H. L. Shivaprasad, *Response of avian embryonic brain to spatially segmented x-ray microbeams*, *Cell Mol Biol*, **2001**. vol 47 (3) p485-93.
- Dilmanian, F. A., G. M. Morris, N. Zhong, T. Bacarian, J. F. Hainfeld, J. Kalef-Ezra, L. J. Brewington, J. Tammam and E. M. Rosen, *Murine EMT-6 carcinoma: high therapeutic efficacy of microbeam radiation therapy*, *Radiat Res*, **2003**. vol 159 (5) p632-41.
- Dilmanian, F. A., Y. Qu, L. E. Feinendegen, L. A. Pena, T. Bacarian, F. A. Henn, J. Kalef-Ezra, S. Liu, Z. Zhong and J. W. McDonald, *Tissue-sparing effect of x-ray microplanar beams particularly in the CNS: is a bystander effect involved?*, *Exp Hematol*, **2007**. vol 35 (4 Suppl 1) p69-77.
- Dilmanian, F. A., Z. Zhong, T. Bacarian, H. Benveniste, P. Romanelli, R. Wang, J. Welwart, T. Yuasa, E. M. Rosen and D. J. Ansel, *Interlaced x-ray microplanar beams: a radiosurgery approach with clinical potential*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2006**. vol 103 (25) p9709-14.
- Ducray François, El Hallani Soufiane and Idbaih Ahmed, *Diagnostic and prognostic markers in gliomas*, *Current Opinion in Oncology*, **2009**. vol 21 (6) p537-42.
- Ekstrand AJ, James CD, Cavenee WK, Seliger B, Pettersson RF and Collins VP, *Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, and epidermal growth factor and their expression in human gliomas in vivo*, *Cancer Res*, **1991**. vol 51 (8) p2164-72.
- Enchev YP, Popov RV, Romansky KV, Marinov MB and B. VA., *Cranial neuronavigation--a step forward or a step aside in modern neurosurgery.*, *Folia Med*, **2008** vol 50 (2) p5-10.
- EORTC Brain Tumor Group, *Cisplatin does not enhance the effect of radiation therapy in malignant gliomas*. *EORTC Brain Tumor Group*, *Eur J Cancer*, **1991**. vol 27 (5) p568-71.
- Faury Damien, Nantel André, Dunn Sandra E., G. Marie-Christine, Haque Takrima, Hauser Péter, Garami Miklós, Bognár László, Hanzély Zoltán, Liberski Pawel P., Lopez-Aguilar Enrique, Valera Elvis T., Tone Luis G., Carret Anne-Sophie, Del Maestro Rolando F., Gleave Martin, Montes Jose-Luis, Pietsch Torsten, A. Stephen and J. Nada, *Molecular profiling identifies prognostic subgroups of pediatric glioblastoma and shows increased YB-1 expression in tumors.*, *J Clin Oncology*, **2007**. vol 25 (10) p1196-208.
- Favaudon V, *Régulation du cycle cellulaire et de la mort cellulaire radio-induite*, *Cancer/Radiother* **2000**. vol 4 p355-68.

- Feng Y, Yuan JH, Maloid SC, Fisher R, Copeland TD, Longo DL, Conrads TP, Veenstra TD, Ferris A, Hughes S, Dimitrov DS and Ferris DK, *Polo-like kinase 1-mediated phosphorylation of the GTP-binding protein Ran is important for bipolar spindle formation*, *Biochem Biophys Res Commun*, **2006**. vol 349 (1) p144-52.
- Feng YB, Lin DC, Shi ZZ, Wang XC, Shen XM and Zhang Y, *Overexpression of PLK1 is associated with poor survival by inhibiting apoptosis via enhancement of survivin level in esophageal squamous cell carcinoma.*, *Int J Cancer* **2009**. vol 124 p578-88.
- Figarella-Branger D. and Bouvier C., *Histological classification of human gliomas: state of art and controversies*, *Bull Cancer*, **2005**. vol 92 (4) p301-9.
- Frappaz, D., O. Chinotn, A. Bataillard, M. B. Hassel, L. Capelle, S. Chanalet, M. Chatel, D. Figarella-Branger, Y. Guegan, J. Guyotat, K. Hoang-Xuan, E. Jouanneau, F. Keime-Guibert, C. Laforêt, C. Linassier, H. Loiseau, J. Maire, P. Menei, S. Rousmans, M. Sanson and M. Sunyach, *Summary version of the Standards, Options and Recommendations for the management of adult patients with intracranial glioma (2002)*, *British Journal of Cancer* **2003**. vol 89 (Suppl 1) pS73 – S83.
- Freeman CR, Kepner J, Kun LE, Sanford RA, Kadota R, Mandell L and Friedman H, *A detrimental effect of a combined chemotherapy-radiotherapy approach in children with diffuse intrinsic brain stem gliomas?*, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **2000**. vol 47 (3) p561-4.
- Freije William A., Castro-Vargas F. Edmundo, Fang Zixing, Horvath Steve, Cloughesy Timothy, Liau Linda M., Mischel Paul S. and Nelson Stanley F., *Gene expression profiling of gliomas strongly predicts survival*, *Cancer Research*, **2004**. vol 64 (18) p6503-10.
- French PJ, Swagemakers SM, Nagel JH, Kouwenhoven MC, Brouwer E, van der Spek P, Luider TM, Kros JM, van den Bent MJ and S. S. PA., *Gene expression profiles associated with treatment response in oligodendrogliomas.*, *Cancer Research*, **2005**. vol 65 (24) p11335-44.
- Friedman HS, Kerby T and Calvert H, *Temozolomide and treatment of malignant glioma*, *Clin Cancer Res*, **2000**. vol 6 (7) p2585-97.
- Friedrich W, Knipping P and von Laue M, *Interferenz-Erscheinungen bei Röntgenstrahlen*, *Sitzungsberichte der Mathematisch-Physikalischen Klasse der Königlich-Bayerischen Akademie der Wissenschaften zu München*, , **1912**. vol p303-322.
- Fu Y, Zheng S, Zheng Y, Huang R, An N, Liang A and H. C., *Glioma derived isocitrate dehydrogenase-2 mutations induced up-regulation of HIF-1 α and β -catenin signaling: Possible impact on glioma cell metastasis and chemo-resistance.*, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **2012**. vol 44 (5) p770-775.
- Gerson, S. L., *MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics*, *Nature Reviews Cancer*, **2004**. vol 4 p296-307.
- Gerster K, Shi W, Ng B, Yue S, Ito E, Waldron J, Gilbert R and Liu FF, *Targeting polo-like kinase 1 enhances radiation efficacy for head-and-neck squamous cell carcinoma*, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **2010**. vol 77 (1) p253-60.
- Giese A, Bjerkvig R, Berens ME and Westphal M, *Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment*, *J Clin Oncology*, **2008**. vol 21 (8) p1624-36.

- Gil S, Fernández M, Prezado Y, Biete A, Bravin A and Sabés M, *Synchrotron radiation in cancer treatments and diagnostics: an overview*, Clin Transl Oncol, **2011a**. vol 13 (10) p715-20.
- Gil S, Sarun S, Biete A, Prezado Y and Sabés M, *Survival analysis of F98 glioma rat cells following minibeam or broad-beam synchrotron radiation therapy*, Radiat Oncol, **2011b**. vol 6 (37)
- Gillies JK and Lorimer IA, *Regulation of p27Kip1 by miRNA 221/222 in glioblastoma.*, Cell Cycle, **2007**. vol 6 (16) p2005-9.
- Godard Sophie, Getz Gad, Delorenzi M, Farmer P, Kobayashi H, Desbaillets I, Nozaki M, Diserens AC, Hamou MF, Dietrich PY, Regli L, Janzer RC, Bucher P, Stupp R, de Tribolet N, Domany E and H. ME., *Classification of human astrocytic gliomas on the basis of gene expression: a correlated group of genes with angiogenic activity emerges as a strong predictor of subtypes.*, Cancer Research, **2003**. vol 63 (20) p6613-25.
- Gokeri G, Kocar C and Tombakoglu M, *Monte Carlo simulation of microbeam radiation therapy with an interlaced irradiation geometry and an Au contrast agent in a realistic head phantom*, Phys Med Biol, **2010**. vol 55 (24) p7469-87.
- Golan A, Yudkovsky Y and Hershko A, *The cyclin-ubiquitin ligase activity of cyclosome/APC is jointly activated by protein kinases Cdk1-cyclin B and Plk*, J Biol Chem, **2002**. vol 277 (18) p15552-7.
- Goldbrunner RH, Wagner S, Roosen K and Tonn JC, *Models for assessment of angiogenesis in gliomas*, J Neurooncol, **2000**. vol 50 (1-2) p53-62.
- Gray Jr PJ, Bearss DJ, Han H, Nagle R, Tsao MS and Dean N, *Identification of human Polo-like kinase 1 as a potential therapeutic target in pancreatic cancer*, Mol Cancer Ther **2004**. vol 3 p641-6.
- Gross Tusher Virginia, Tibshirani Robert and Chu Gilbert, *Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response*, Proc Natl Acad Sci U S A. , **2001**. vol 98 (9) p5116-5121.
- Haberer S, Assouline A and Mazon JJ, *Normal tissue tolerance to external beam radiation therapy: brain and hypophysis*, Cancer Radiother, **2010**. vol 14 (4) p263-8.
- Hansen DV, Loktev AV, Ban KH and Jackson PK, *Plk1 regulates activation of the anaphase promoting complex by phosphorylating and triggering SCFbetaTrCP-dependent destruction of the APC Inhibitor Emi1*, Mol Biol Cell, **2004**. vol 15 (12) p5623-34.
- Harris PS, Venkataraman S, Alimova I, Birks DK, Donson AM, Knipstein J, Dubuc A, Taylor MD, Handler MH, Foreman NK and Vibhakar R, *Polo-like kinase 1 (PLK1) inhibition suppresses cell growth and enhances radiation sensitivity in medulloblastoma cells*, BMC Cancer, **2012**. vol 5 (12) p80.
- Hermanto U, Frija EK, Lii MJ, Chang EL, Mahajan A and Woo SY, *Intensity-modulated radiotherapy (IMRT) and conventional three-dimensional conformal radiotherapy for high-grade gliomas: does IMRT increase the integral dose to normal brain?* , Int J Radiat Oncol Biol Phys, **2005**. vol 67 (4) p1135-44.
- Hill Catherine and Doyon Françoise, *The frequency of cancer in France in year 2000, and trends since 1950*, Bull Cancer, **2005**. vol 92 (1) p7-11.

- Hill Catherine and Doyon Françoise, *The frequency of cancer in France: all ages and under age 15, mortality in 2003 and trends since 1968*, Bull Cancer **2007**. vol 94 (1) p7-13.
- Hochberg FH and Pruitt A, *Assumptions in the radiotherapy of glioblastoma*, Neurology, **1980**. vol 30 (9) p907-11.
- Hofera S and Merlo A, *Options thérapeutiques pour les gliomes malins de degré III et IV OMS* Forum Med Suisse, **2002**. vol 32/33 p748-55.
- Holtrich U, Wolf G, Bräuninger A, Karn T, Böhme B, Rübsamen-Waigmann H and Strebhardt K, *Induction and down-regulation of PLK, a human serine/threonine kinase expressed in proliferating cells and tumors*, Proc Natl Acad Sci U S A, **1994**. vol 91 (5) p1736-40.
- Hu K, Lee C, Qiu D, Fotovati A, Davies A, Abu-Ali S, Wai D, Lawlor ER, Triche TJ, Pallen CJ and Dunn SE, *Small interfering RNA library screen of human kinases and phosphatases identifies polo-like kinase 1 as a promising new target for the treatment of pediatric rhabdomyosarcomas*, Mol Cancer Ther, **2009**. vol 8 (11) p3024-35.
- Huse JT, Brennan C, Hambardzumyan D, Wee B, Pena J, Rouhanifard SH, Sohn-Lee C, le Sage C, Agami R, Tuschl T and H. EC., *The PTEN-regulating microRNA miR-26a is amplified in high-grade glioma and facilitates gliomagenesis in vivo.*, Genes Dev. , **2009**. vol 23 (11) p1327-37.
- Idbaih A, Crinière E, Ligon KL, Delattre O and Delattre JY, *Array-based genomics in glioma research*, Brain Pathol **2010**. vol 20 (1) p28-38.
- Idbaih A, Marie Y, Lucchesi C, Pierron G, Manié E, Raynal V, Mosseri V, Hoang-Xuan K, Kujas M, Brito I, Mokhtari K, Sanson M, Barillot E, Aurias A, Delattre JY and Delattre O, *BAC array CGH distinguishes mutually exclusive alterations that define clinicogenetic subtypes of gliomas*, Int J Cancer, **2008**. vol 122 (8) p1778-86.
- Irizarry Rafael A., Hobbs Bridget, Collin Francois, Beazer-Barclay Yasmin D., Antonellis Kristen J., Scherf Uwe and Speed Terence P., *Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data*, Biostat **2003**. vol 4 (2) p 249-264.
- Ito Y, Miyoshi E, Sasaki N, Kakudo K, Yoshida H and Tomoda C, *Polo-like kinase 1 overexpression is an early event in the progression of papillary carcinoma*, Br J Cancer, **2004**. vol 90 p414-8.
- Jacobs, V. J., P. A. Valdes, W. F. Hickey and J. A. De Leo, *Current review of in vivo GBM rodent models: emphasis on the CNS-1 tumour model*, ASN Neuro, **2011**. vol 3 (3) p171-181.
- Jang YJ, Kim YS and Kim WH, *Oncogenic effect of Polo-like kinase 1 expression in human gastric carcinomas.* , Int J Oncol, **2006**. vol 29 p589-94.
- Janzer RC, *Neuropathology and molecular pathology of gliomas*, Rev Med Suisse. , **2009**. vol 5 (211) p1501-4.
- Jones DT, Kocalkowski S, Liu L, Pearson DM, Bäccklund LM, Ichimura K and C. VP., *Tandem duplication producing a novel oncogenic BRAF fusion gene defines the majority of pilocytic astrocytomas.*, Cancer Research, **2008**. vol 68 p8673–8677.

- Jones DT, Kocialkowski S, Liu L, Pearson DM, Ichimura K and C. VP., *Oncogenic RAF1 rearrangement and a novel BRAF mutation as alternatives to KIAA1549:BRAF fusion in activating the MAPK pathway in pilocytic astrocytoma.*, *Oncogene*, **2009**. vol 28 (20) p2119-23.
- Kantor G, Laprie A, Huchet A, Loiseau H, Dejean C and Mazon JJ, *Radiation therapy for glial tumors: technical aspects and clinical indications*, *Cancer Radiother*, **2008**. vol 12 (6-7) p687-94.
- Kaplan EL and Meier P, *Non-parametric estimation from incomplete observations*, *J Am Stat Assoc*, **1958**. vol 53 p457-481.
- Kato M, Inazu T, Kawai Y, Masamura K, Yoshida M, Tanaka N, Miyamoto K and Miyamori I, *Amphiregulin is a potent mitogen for the vascular smooth muscle cell line, A7r5*, *Biochem Biophys Res Commun*, **2003**. vol 301 (4) p1109-15.
- Kawakami M, Kawakami K and Puri RK, *Intratumor administration of interleukin 13 receptor-targeted cytotoxin induces apoptotic cell death in human malignant glioma tumor xenografts*, *Mol Cancer Ther*, **2002**. vol 1 (12) p999-1007.
- Kelly PJ, Dumas-Duport C, Scheithauer BW, Kall BA and K. DB., *Stereotactic histologic correlations of computed tomography- and magnetic resonance imaging-defined abnormalities in patients with glial neoplasms.*, *Mayo Clin Proc.* , **1987**. vol 62 (6) p450-9.
- Kernohan JW, Mabon RF, Svien HJ and A. AW., *A simplified classification of gliomas*, *Proc Staff Meet Mayo Clin*, **1949**. vol 24 p71-5.
- Kim H, Huang W, Jiang X, Pennicooke B, Park PJ and Johnson MD, *Integrative genome analysis reveals an oncomir/oncogene cluster regulating glioblastoma survivorship.*, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **2010**. vol 107 (5) p2183-8.
- Kim, J. H., M. S. Khil, A. Kolozsvary, J. A. Gutierrez and S. L. Brown, *Fractionated radiosurgery for 9L gliosarcoma in the rat brain*, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **1999**. vol 45 (4) p1035-40.
- Kimler BF, Liu C, Evans RG and Morantz RA, *Combination of aziridinylbenzoquinone and cis-platinum with radiation therapy in the 9L rat brain tumor model*, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **1993a**. vol 26 (3) p445-50.
- Kimler BF, Liu C, Evans RG and Morantz RA, *Effect of pentobarbital on normal brain protection and on the response of 9L rat brain tumor to radiation therapy*, *J Neurosurg*, **1993b**. vol 79 (4) p577-83.
- Kleihues P, Burger PC and S. BW., *The new WHO classification of brain tumours.*, *Brain Pathology*, **1993**. vol 3 (3) p255-68.
- Kleihues P and Cavenee WK, *World Health Organization classification of tumours. pathology and genetics of tumours of the nervous system.* , Lyon: IARC Press, **2000**. vol
- Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC and Cavenee WK., *The WHO classification of tumors of the nervous system.*, *J Neuropathol Exp Neurol.*, **2002**. vol 61 (3) p215-25.

- Knecht R, Elez R, Oechler M, Solbach C, von Ilberg C and Strebhardt K, *Prognostic significance of polo-like kinase (PLK) expression in squamous cell carcinomas of the head and neck*, *Cancer Res*, **1999**. vol 59 (12) p2794-7.
- Korshunov A, Sycheva R and Golanov A, *Genetically distinct and clinically relevant subtypes of glioblastoma defined by array-based comparative genomic hybridization (array-CGH)*, *Acta Neuropathol*, **2006**. vol 111 (5) p465-74.
- Kros Johan M., *WHO Guidelines for Diagnosis of Glial Tumours: What Is Old and What Is New?* , *European Association of NeuroOncology Magazine*, **2011**. vol 1 (1) p9-12.
- Kumaraswamy S, Chinnaiyan P, Shankavaram UT, Lü X, Camphausen K and Tofilon PJ, *Radiation-induced gene translation profiles reveal tumor type and cancer-specific components*, *Cancer Res.* , **2008**. vol 68 (10) p3819-26.
- Kunwar S, Chang S, Westphal M, Vogelbaum M, Sampson J, Barnett G, Shaffrey M, Ram Z, Piepmeier J, Prados M, Croteau D, Pedain C, Leland P, Husain SR, Joshi BH and Puri RK, *Phase III randomized trial of CED of IL13-PE38QQR vs Gliadel wafers for recurrent glioblastoma*, *Neuro Oncol*, **2010**. vol 12 (8) p871-81.
- Kureshi SA, Hofman FM, Schneider JH, Chin LS, Apuzzo ML and Hinton DR, *Cytokine expression in radiation-induced delayed cerebral injury*, *Neurosurgery*, **1994**. vol 35 (5) p822-30.
- Lages E, Guttin A, El Atifi M, Ramus C, Ipas H, Dupré I, Rolland D, Salon C, Godfraind C, deFraipont F, Dhobb M, Pelletier L, Wion D, Gay E, Berger F and I. JP, *MicroRNA and target protein patterns reveal physiopathological features of glioma subtypes.*, *PLoS One*, **2011**. vol 6 (5)
- Lages E, Ipas H, Guttin A, Nesr H, Berger F and Issartel JP, *MicroRNAs: molecular features and role in cancer*, *Front Biosci*, **2012**. vol 17 p2508-40.
- Laissue, J., P. Spanne, F. A. Dilmanian, J. O. Gebbers and D. N. Slatkin, *Zell- und Gewebeläsionen nach räumlich fraktionierter Mikro-Bestrahlung des ZNS mit Synchrotron Photonen.*, *Schweiz. Med. Wochenschr.*, **1992**. vol 122 p16-27.
- Laissue JA, Blattmann H, Michiel D, Slatkin DN, Lyubimova N, Guzman R, Zimmermann A, Birrer S, Bey T, Kircher P, Stettler R, Fatzer R, Jaggy A, Smilowitz HM, Bräuer-Krisch E, Bravin A, Le Duc G, Nemoz C, Renier M, Thomlinson W, Stepanek J and Wagner HP (2001). The weanling piglet cerebellum: a surrogate for tolerance to MRT (microbeam radiation therapy) in pediatric neuro-oncology. Proc. of SPIE, Washington.
- Laissue, J. A., G. Geiser, P. O. Spanne, F. A. Dilmanian, J. O. Gebbers, M. Geiser, X. Y. Wu, M. S. Makar, P. L. Micca, M. M. Nawrocky, D. D. Joel and D. N. Slatkin, *Neuropathology of ablation of rat gliosarcomas and contiguous brain tissues using a microplanar beam of synchrotron-wiggler-generated X rays*, *Int J Cancer*, **1998**. vol 78 (5) p654-60.
- Laissue, J. A., N. Lyubimova, H. P. Wagner, D. W. Archer, D. N. Slatkin, M. Di Michiel, C. Nemoz, M. Renier, E. Bräuer-Krisch, P. O. Spanne, J.-O. Gebbers, K. Dixon and H. Blattmann (1999). Microbeam radiation therapy. Proc. Of SPIE, Denver, USA.
- Landsverk KS, Patzke S, Rein ID, Stokke C, Lyng H, De Angelis PM and Stokke T, *Three independent mechanisms for arrest in G2 after ionizing radiation*, *Cell Cycle*, **2011**. vol 10 (5) p819-29.

- Lane HA and Nigg EA, *Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes*, J Cell Biol, **1996**. vol 135 (6 Pt 2) p1701-13.
- Larsson B, *Potentialities of synchrotron radiation in experimental and clinical radiation surgery*, Acta Radiol Suppl, **1983**. vol 365 p58-64.
- Le Duc G, Miladi I, Alric C, Mowat P, Bräuer-Krisch E, Bouchet A, Khalil E, Billotey C, Janier M, Lux F, Epicier T, Perriat P, Roux S and Tillement O, *Toward an image-guided microbeam radiation therapy using gadolinium-based nanoparticles*, ACS Nano, **2011**. vol 5 (12) p9566-74.
- Lee C, Fotovati A, Triscott J, Chen J, Venugopal C, Singhal A, Dunham C, Kerr JM, Verreault M, Yip S, Wakimoto H, Jones C, Jayanthan A, Narendran A, Singh SK and Dunn SE, *Polo-like kinase 1 inhibition kills glioblastoma multiforme brain tumor cells in part through loss of SOX2 and delays tumor progression in mice*, Stem Cells, **2012**. vol 30 (6) p1064-75.
- Lefranc F, Sadeghi N, Camby I, Metens T, Dewitte O and K. R., *Present and potential future issues in glioblastoma treatment.*, Expert Rev Anticancer Ther., **2006**. vol 6 (5) p719-32.
- Lei M and Erikson RL, *Plk1 depletion in nontransformed diploid cells activates the DNA-damage checkpoint*, Oncogene, **2008**. vol 27 (28) p3935-43.
- Lénárt P, Petronczki M, Steegmaier M, Di Fiore B, Lipp JJ, Hoffmann M, Rettig WJ, Kraut N and Peters JM, *The small-molecule inhibitor BI 2536 reveals novel insights into mitotic roles of polo-like kinase 1*, Curr Bio, **2007**. vol 17 (4) p304-15.
- Li A, Walling J, Ahn S, Kotliarov Y, Su Q, Quezado M, Oberholtzer JC, Park J, Zenklusen JC and Fine HA., *Unsupervised analysis of transcriptomic profiles reveals six glioma subtypes.*, Cancer Research, **2009**. vol 69 (5)
- Li S, Plowman GD, Buckley SD and Shipley GD, *Heparin inhibition of autonomous growth implicates amphiregulin as an autocrine growth factor for normal human mammary epithelial cells*, J Cell Physiol, **1992**. vol 153 (1) p103-11.
- Lindgren Theres, Stigbrand Torgny, Riklund Katrine, Johansson Lennart and Eriksson David, *Gene expression profiling in MOLT-4 cells during gamma-radiation-induced apoptosis*, Tumor Biol., **2012**. vol
- Lipshutz RJ, Fodor SP, Gingeras TR and Lockhart DJ, *High density synthetic oligonucleotide arrays.*, Nat Genetics **1999**. vol 21 (1 suppl) p20-4.
- Liu WM, Mei R, Di X, Ryder TB, Hubbell E, Dee S, Webster TA, Harrington CA, B. J. Ho M and Smeekens SP, *Analysis of high density expression microarrays with signed-rank call algorithms*, Bioinformatics, **2002**. vol 18 (12) p1593-1599.
- Liu X, Lei M and Erikson RL, *Normal cells, but not cancer cells, survive severe Plk1 depletion*, Mol Cell Biol, **2006**. vol 26 (6) p2093-108.
- Lockhart David J., Dong Helin, Byrne Michael C., Follettie Maximillian T., Gallo MV, Chee MS, Mittmann M, Wang C, Kobayashi M, Horton H and Brown EL, *Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays.*, Nat Biotechnology, **1996**. vol 14 (13) p1675-80.

- Louis David N., Ohgaki Hiroko., Wiestler Otmar D., Cavenee Webster K., Burger Peter C., Jouvét Anne, Scheithauer Bernd W. and Paul Kleihues, *The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*, Acta Neuropathol **2007**. vol 114 p97-109.
- Lyng H, Landsverk KS, Kristiansen E, DeAngelis PM, Ree AH, Myklebost O, Hovig E and Stokke T, *Response of malignant B lymphocytes to ionizing radiation: gene expression and genotype.*, Int J Cancer, **2005**. vol 115 (6) p935-42.
- Maher EA, Brennan C, Wen PY, Durso L, Ligon KL, Richardson A, Khattry D, Feng B, Sinha R, Louis DN, Quackenbush J, Black PM, Chin L and DePinho RA, *Marked genomic differences characterize primary and secondary glioblastoma subtypes and identify two distinct molecular and clinical secondary glioblastoma entities.*, Cancer Res, **2006**. vol 66 (23) p11502-13.
- Mahmoud-Ahmed AS, Atkinson S and Wong CS, *Early gene expression profile in mouse brain after exposure to ionizing radiation*, Radiat Res., **2006**. vol 165 (2) p142-54.
- Mao H, Lebrun DG, Yang J, Zhu VF and Li M, *Deregulated signaling pathways in glioblastoma multiforme: molecular mechanisms and therapeutic targets*, Cancer Invest, **2012**. vol 30 (1) p48-56.
- Martínez-Rovira I, Sempau J, Fernández-Varea JM, Bravin A and Prezado Y, *Monte Carlo dosimetry for forthcoming clinical trials in x-ray microbeam radiation therapy*, Phys Med Biol, **2010**. vol 55 (15) p4375-88.
- Martínez-Rovira I, Sempau J and Prezado Y, *Development and commissioning of a Monte Carlo photon beam model for the forthcoming clinical trials in microbeam radiation therapy.*, Med Phys, **2012**. vol 39 (1) p119-31.
- Martínez-Rovira I., Sempau J and P. Y, *Development and commissioning of a 1 Monte Carlo photon beam model for the forthcoming clinical trials in Microbeam Radiation Therapy*, Med Phys, **2012**. vol 39 (1) p119-31.
- Martinou M, Giannopoulou E, Malatara G, Argyriou AA, Kalofonos HP and Kardamakis D, *Ionizing radiation affects epidermal growth factor receptor signalling and metalloproteinase secretion in glioma cells*, Cancer Genomics Proteomics, **2011**. vol 8 (1) p33-8.
- Masi BC, Tyler BM, Bow H, Wicks RT, Xue Y, Brem H, Langer R and Cima MJ, *Intracranial MEMS based temozolomide delivery in a 9L rat gliosarcoma model*, Biomaterials, **2012**. vol 33 (23) p5768-75.
- Maurice Tubiana, Jean Dutreix and André Wambersie (1986). Radiobiologie, Hermann.
- McCubrey JA, Steelman LS, Abrams SL, Lee JT, Chang F, Bertrand FE, Navolanic PM, Terrian DM, Franklin RA, D'Assoro AB, Salisbury JL, Mazzarino MC, Stivala F and Libra M, *Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance.*, Adv Enzyme Regul. , **2006**. vol 46 p249-79.
- McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A, Stivala F, Libra M, Basecke J, Evangelisti C, Martelli AM and Franklin RA, *Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance.*, Biochim Biophys Acta. , **2007**. vol 1773 (8) p1263-84.

- McGirt MJ, Than KD, Weingart JD, Chaichana KL, Attenello FJ, Olivi A, Lattera J, Kleinberg LR, Grossman SA, Brem H and Quiñones-Hinojosa A, *Glial (BCNU) wafer plus concomitant temozolomide therapy after primary resection of glioblastoma multiforme*, J Neurosurg, **2009**. vol 110 (3) p583-8.
- Miller MB and Tang YW, *Basic concepts of microarrays and potential applications in clinical microbiology.*, Clin Microbiol Rev. , **2009**. vol 22 (4) p611-33.
- Mir Shahryar E., De Witt Hamer Philip C., Krawczyk Przemek M., Balaj Leonora, Claes An, Niers Johanna M., Van Tilborg Angela A.G., Zwinderman Aeilko H., Geerts Dirk, Kaspers Gertjan J.L., Vandertop W. Peter, Cloos Jacqueline, TannousBakhos A., Wesseling Pieter, Aten Jacob A., Noske David P., Van Noorden Cornelis J.F. and Würdinger Thomas, *In Silico Analysis of Kinase Expression Identifies WEE1 as a Gatekeeper against Mitotic Catastrophe in Glioblastoma*, Cancer Cell, **2010**. vol 18 (3) p244-257.
- Misra A, Pellarin M, Nigro J, Smirnov I, Moore D, Lamborn KR, Pinkel D, Albertson DG and Feuerstein BG, *Array comparative genomic hybridization identifies genetic subgroups in grade 4 human astrocytoma*, Clin Cancer Res, **2005**. vol 11 (8) p2907-18.
- Mittler MA, Walters BC and Stopa EG, *Observer reliability in histological grading of astrocytoma stereotactic biopsies.*, J Neurosurg, **1996**. vol 85 (6) p1091-4.
- Miura M, Blattmann H, Bräuer-Krisch E, Bravin A, Hanson AL, Nawrocky MM, S. D. Micca PL and Laissue JA, *Radiosurgical palliation of aggressive murine SCCVII squamous cell carcinomas using synchrotron-generated X-ray microbeams*, Br J Radiol, **2006**. vol 79 (937) p71-5.
- Miura, M., H. Blattmann, E. Bräuer-Krisch, A. Bravin, A. L. Hanson, M. M. Nawrocky, P. L. Micca, D. N. Slatkin and J. A. Laissue, *Radiosurgical palliation of aggressive murine SCCVII squamous cell carcinomas using synchrotron-generated X-ray microbeams*, Br J Radiol, **2006**. vol 79 (937) p71-5.
- Moiyadi Aliasgar V. and Shetty Prakash M., *Perioperative outcomes following surgery for brain tumors: Objective assessment and risk factor evaluation*, Journal of Neurosciences in Rural Practice, **2012**. vol 3 (1) p28-35.
- Moroch, J., *Les tumeurs glioneurales malignes selon la classification de l'hôpital Sainte-Anne*, **2009**. vol
- Moshe Y, Boulaire J, Pagano M and Hershko A, *Role of Polo-like kinase in the degradation of early mitotic inhibitor 1, a regulator of the anaphase promoting complex/cyclosome*, Proc Natl Acad Sci U S A, **2004**. vol 101 (21) p7937-42.
- Mross K, Frost A, Steinbild S, Hedbom S, Rentschler J, Kaiser R, Rouyre N, Trommeshauser D, Hoelzl CE and Munzert G, *Phase I dose escalation and pharmacokinetic study of BI 2536, a novel Polo-like kinase 1 inhibitor, in patients with advanced solid tumors*, Clin Oncol, **2008**. vol 26 (34) p5511-7.
- Multhoff G and Radons J, *Radiation, inflammation, and immune responses in cancer*, Front Oncol, **2012**. vol 2 (58)

- Neef R, Preisinger C, Sutcliffe J, Kopajtich R, Nigg EA, Mayer TU and Barr FA, *Phosphorylation of mitotic kinesin-like protein 2 by polo-like kinase 1 is required for cytokinesis*, J Cell Biol, **2003**. vol 162 (5) p863-75.
- Neyns B, Sadones J, Joosens E, Bouttens F, Verbeke L, Baurain JF, D'Hondt L, Strauven T, Chaskis C, In't Veld P, Michotte A and De Greve J, *Stratified phase II trial of cetuximab in patients with recurrent high-grade glioma*, Ann Oncol, **2009**. vol 20 (9) p1596-603.
- Nigro JM, Misra A, Zhang L, Smirnov I, Colman H, Griffin C, Ozburn N, Chen M, Pan E, Koul D, Yung WK, Feuerstein BG and Aldape KD., *Integrated array-comparative genomic hybridization and expression array profiles identify clinically relevant molecular subtypes of glioblastoma*, Cancer Res, **2005**. vol 65 (5) p1678-86.
- Niiya F, Tatsumoto T, Lee KS and Miki T, *Phosphorylation of the cytokinesis regulator ECT2 at G2/M phase stimulates association of the mitotic kinase Plk1 and accumulation of GTP-bound RhoA*, Oncogene, **2006**. vol 25 (6) p827-37.
- Nobusawa S, Watanabe T, Kleihues P and Ohgaki H, *IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas.*, Clinical Cancer Research **2009**. vol 15 (19) p6002-7.
- Nutt Catherine L., Mani D. R., Betensky Rebecca A., Tamayo Pablo, Cairncross J. Gregory, Ladd Christine , Pohl Ute, Hartmann Christian, McLaughlin Margaret E., Batchelor Tracy T., Black Peter M., von Deimling Andreas , Pomeroy Scott L., Golub Todd R. and L. D. N., *Gene expression-based classification of malignant gliomas correlates better with survival than histological classification*, Cancer Research, **2003**. vol 63 (7) p1602-7.
- Olmos D, Barker D, Sharma R, Brunetto AT, Yap TA, Taegtmeyer AB, Barriuso J, Medani H, Degenhardt YY, Allred AJ, Smith DA, Murray SC, Lampkin TA, Dar MM, Wilson R, de Bono JS and Blagden SP, *Phase I study of GSK461364, a specific and competitive Polo-like kinase 1 inhibitor, in patients with advanced solid malignancies*, Clin Cancer Res, **2011**. vol 17 (10) p3420-30.
- Orion, I., A. B. Rosenfeld, F. A. Dilmanian, F. Telang, B. Ren and Y. Namito, *Monte Carlo simulation of dose distributions from a synchrotron-produced microplanar beam array using the EGS4 code system*, Phys Med Biol, **2000**. vol 45 (9) p2497-508.
- Pathak AP, Schmainda KM, Ward BD, Linderman JR, Rebro KJ and Greene AS, *MR-derived cerebral blood volume maps: issues regarding histological validation and assessment of tumor angiogenesis*, Magn Reson Med, **2001**. vol 46 (4) p735-47.
- Paxinos G and Watson C (1998). The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. New York, p11.
- Pellegrino R, Calvisi DF, Ladu S, Ehemann V, Staniscia T and Evert M, *Hepatology*, Oncogenic and tumor suppressive roles of Pololike kinases in human hepatocellular carcinoma., **2010**. vol 51 p857-68.
- Petit S, Garcion E, Benoît JP and Menei P, *Chimiothérapie locale dans les gliomes malins: de l'injection à la seringue aux nanotechnologies*, Rev Neurol, **2008**. vol 164 p547 - 553.
- Phillips Heidi S., Kharbanda Samir, Chen Ruihuan, Forrest William F., Soriano Robert H., Wu Thomas D., Misra Anjan, Nigro Janice M., Colman Howard, Soroceanu Liliana, Williams P. Mickey,

- Modrusan Zora, Feuerstein Burt G. and Aldape Ken, *Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis.*, *Cancer Cell.* , **2006**. vol 9 (3) p157-73.
- Plowman GD, Whitney GS, Neubauer MG, Green JM, McDonald VL, Todaro GJ and Shoyab M, *Molecular cloning and expression of an additional epidermal growth factor receptor-related gene*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1990**. vol 87 (13) p4905-9.
- Portnow J, Suleman S, Grossman SA, Eller S and Carson K, *A cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor compared with dexamethasone in a survival study of rats with intracerebral 9L gliosarcomas*, *Neuro-Oncology*, **2002**. vol 4 (1) p22-25.
- Pourquier Philippe *DNA repair, a potential target for anticancer drug development*, *Bull Cancer*, **2006**. vol hors série : 124-44
- Prezado Y, Fois G, Le Duc G and Bravin A, *Gadolinium dose enhancement studies in microbeam radiation therapy*, *Med Phys*, **2009a**. vol 36 (8) p3568-74.
- Prezado Y, Martiinez-Rovira I and Saanchez M, *Scatter factors assessment in microbeam radiation therapy*, *Med Phys*, **2012a**. vol 39 (3) p1234-8.
- Prezado Y, Martinez-Rovira I, Thengumpallil S and Deman P, *Dosimetry protocol for the preclinical trials in white-beam minibeam radiation therapy.*, *Med Phys.* , **2011**. vol 38 (9) p5012-20.
- Prezado Y, Renier M and Bravin A, *A new method of creating minibeam patterns for synchrotron radiation therapy: a feasibility study*, *J Synchrotron Radiat*, **2009b**. vol 16 (Pt 4) p582-6.
- Prezado Y, Sarun S, Gil S, Deman P, Bouchet A and Le Duc G, *Increase of lifespan for glioma-bearing rats by using minibeam radiation therapy*, *J Synchrotron Radiat*, **2012b**. vol 19 (Pt 1) p60-5.
- Priyadarshika RC, Crosbie JC, Kumar B and Rogers PA, *Biodosimetric quantification of short-term synchrotron microbeam versus broad-beam radiation damage to mouse skin using a dermatopathological scoring system*, *Br J Radiol*, **2011**. vol 84 (1005) p833-42.
- Ptaszkiewicz, M., E. Bräuer-Krisch, M. Klosowski, L. Czopyk and P. Olko, *TLD dosimetry for microbeam radiation therapy at the ESRF*, *Radiation Measurements*, **2008**. vol 43 p990-993.
- Putney SD, Herlihy WC and Schimmel P, *A new troponin T and cDNA clones for 13 different muscle proteins, found by shotgun sequencing.*, *Nature*, **1983**. vol 302 (5910) p718-21.
- Rabin BM, Meyer JR, Berlin JW, Marymount MH, Palka PS and Russell EJ, *Radiation-induced changes in the central nervous system and head and neck*, *Radiographics*, **1996**. vol 16 (5) p1055-72.
- Rainov NG, Gorbatyuk K and Heidecke V, *Clinical trials with intracerebral convection-enhanced delivery of targeted toxins in malignant glioma*, *Rev Recent Clin Trials*, **2008**. vol 3 (1) p2-9.
- Rao SA, Santosh V and Somasundaram K., *Genome-wide expression profiling identifies deregulated miRNAs in malignant astrocytoma.*, *Mod Pathol.*, **2010**. vol 23 (10) p1404-17.
- Rapley J, Baxter JE, Blot J, Wattam SL, Casenghi M, Meraldi P, Nigg EA and Fry AM, *Coordinate regulation of the mother centriole component nlp by nek2 and plk1 protein kinases*, *Mol Cell Biol*, **2005**. vol 25 (4) p1309-24.

- Ree AH, Bratland A, Solberg Landsverk K and Fodstad O, *Ionizing radiation inhibits the PLK cell cycle gene in a G2 checkpoint-dependent manner*, *Anticancer Res*, **2004**. vol 24 (2B) p555-62.
- Regnard, P. *Interet du rayonnement synchrotron dans la thérapie des tumeurs cérébrales : méthodologie et applications précliniques (2007)*: 299.
- Regnard P, Bräuer-Krisch E, Tropès I, Keyriläinen J, Bravin A and Le Duc G, *Enhancement of survival of 9L gliosarcoma bearing rats following intracerebral delivery of drugs in combination with microbeam radiation therapy*, *Eur J Radiol*, **2008**. vol 68 ((3 Suppl)) pS151-5.
- Regnard, P., G. L. Duc, E. Bräuer-Krisch, I. Tropres, E. A. Siegbahn, A. Kusak, C. Clair, H. Bernard, D. Dallery, J. A. Laissue and A. Bravin, *Irradiation of intracerebral 9L gliosarcoma by a single array of microplanar x-ray beams from a synchrotron: balance between curing and sparing*, *Phys Med Biol*, **2008**. vol 53 (4) p861-78.
- Reifenberger J, Reifenberger G, Liu L, James CD, Wechsler W and C. VP., *Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p.*, *Am J Pathol*, **1994**. vol 145 p1175-90.
- Reitman Zachary J. and Yan Hai, *Isocitrate Dehydrogenase 1 and 2 Mutations in Cancer: Alterations at a Crossroads of Cellular Metabolism*, *J Natl Cancer Inst.*, **2010**. vol 102 (13) p932-941.
- Renier, M., T. Brochard, C. Nemoz and W. Thomlinson, *A white-beam fast-shutter for microbeam radiation therapy at the ESRF.*, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, **2002**. vol 479 (2-3) p656-660.
- Richard M, Thibault N, Veilleux P, Breton R and Beaulieu AD, *The ITIM-bearing CLECSF6 (DCIR) is down-modulated in neutrophils by neutrophil activating agents.*, *Biochem Biophys Res Commun*, **2003**. vol 310 (3) p767-73.
- Richard M, Veilleux P, Rouleau M, Paquin R and Beaulieu AD, *The expression pattern of the ITIM-bearing lectin CLECSF6 in neutrophils suggests a key role in the control of inflammation.*, *J Leukoc Biol*, **2002**. vol 71 (5) p871-80.
- Rickman David S., Bobek Miroslav P., Misek David E., Kuick Rork, Blaivas Mila, Kurnit David M., Taylor Jeremy and H. S. M., *Distinctive molecular profiles of high-grade and low-grade gliomas based on oligonucleotide microarray analysis.*, *Cancer Research* **2001**. vol 61 (18) p6885-91.
- Riemenschneider Markus J., Jeuken Judith W. M., Wesseling Pieter, Reifenberger Guido and *Molecular diagnostics of gliomas: state of the art*, *Acta Neuropathology*, **2010**. vol 120 p567-584.
- Romanelli P and Bravin A, *Synchrotron-generated microbeam radiosurgery: a novel experimental approach to modulate brain function*, *Neurol Res*, **2011**. vol 33 (8) p825-31.
- Rong Y, Durden DL, Van Meir EG and Brat DJ, *Pseudopalisading' necrosis in glioblastoma: a familiar morphologic feature that links vascular pathology, hypoxia, and angiogenesis*, *J Neuropathol Exp Neurol*, **2006**. vol 65 (6) p529-39.

- Rosenfeld, A., E. A. Siegbahn, E. Brauer-Krisch, A. Holmes-Siedle, M. Lerch, A. Bravin, M. Cornelius, G. J. Takacs, H. Painuly, H. Nettelbeck and T. Kron, *Edge-on Face-to-Face MOSFET for Synchrotron Microbeam Dosimetry: MC Modeling*, IEEE Trans. Nucl. Sci., **2005**. vol 52 p2562-2569.
- Roshak AK, Capper EA, Imburgia C, Fornwald J, Scott G and Marshall LA, *The human polo-like kinase, PLK, regulates cdc2/cyclin B through phosphorylation and activation of the cdc25C phosphatase*, Cell Signal, **2000**. vol 12 (6) p405-11.
- Rothkamm K, Crosbie JC, Daley F, Bourne S, Barber PR, Vojnovic B, Cann L and Rogers PA, *In situ biological dose mapping estimates the radiation burden delivered to 'spared' tissue between synchrotron X-ray microbeam radiotherapy tracks*, PLoS One, **2012**. vol 7 (1) pe29853.
- Sabatasso S, Laissue JA, Hlushchuk R, Graber W, Bravin A, Bräuer-Krisch E, Corde S, Blattmann H, Gruber G and Djonov V, *Microbeam radiation-induced tissue damage depends on the stage of vascular maturation*, Int J Radiat Oncol Biol Phys, **2011**. vol 80 (5) p1522-32.
- Salvat F, Fernández-Varea JM and Sempau J (2008). PENELOPE-2008, a code system for Monte Carlo simulation of electron and photon transport. OECD - Nuclear Energy Agency Issy-les-Moulineaux, France.
- Salvati M, D'elia A, Frati A, Brogna C, Santoro A and Delfini R, *Safety and feasibility of the adjunct of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers to the standard multimodal approach to high grade gliomas at first diagnosis*, J Neurosurg Sci, **2011**. vol 55 (1) p1-6.
- Sanhaji M, Kreis NN, Zimmer B, Berg T, Louwen F and Yuan J, *p53 is not directly relevant to the response of Polo-like kinase 1 inhibitors*, Cell Cycle, **2012**. vol 11 (3)
- Sanson M, Marie Y, Paris S, Idbah A, Laffaire J, Ducray F, El Hallani S, Boisselier B, Mokhtari K, Hoang-Xuan K and Delattre JY, *Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas.*, J Clin Oncology, **2009**. vol 27 (25) p4150-4.
- Schena Mark, Shalon Dari, Davis Ronald W. and Brown Patrick O., *Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray.*, Science, **1995**. vol 270 (5235) p467-70.
- Schlegel J, Piontek G, Kersting M, Schuermann M, Kappler R, Scherthan H, Weghorst C, Buzard G and Mennel H, *The p16/Cdkn2a/Ink4a gene is frequently deleted in nitrosourea-induced rat glial tumors*, Pathobiology, **1999**. vol 67 (4) p202-6.
- Schöffski P, Awada A, Dumez H, Gil T, Bartholomeus S, Wolter P, Taton M, Fritsch H, Glomb P and Munzert G, *A phase I, dose-escalation study of the novel Polo-like kinase inhibitor volasertib (BI 6727) in patients with advanced solid tumours*, Eur J Cancer, **2012**. vol 48 (2) p179-86.
- Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M and Ragg T, *The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements*, BMC Mol Biol, **2006**. vol 7 (3)
- Seong YS, Kamijo K, Lee JS, Fernandez E, Kuriyama R, Miki T and Lee KS, *A spindle checkpoint arrest and a cytokinesis failure by the dominant-negative polo-box domain of Plk1 in U-2 OS cells*, J Biol Chem, **2002**. vol 277 (35) p32282-93.

- Serduc R *Effets de la radiothérapie par microfaisceaux sur la microvascularisation saine et tumorale chez la souris (2006)*: 243.
- Serduc R, Bouchet A, Bräuer-Krisch E, Laissue JA, Spiga J, Sarun S, Bravin A, Fonta C, Renaud L, Boutonnat J, Siegbahn EA, Estève F and Le Duc G, *Synchrotron microbeam radiation therapy for rat brain tumor palliation-influence of the microbeam width at constant valley dose*, *Phys Med Biol*, **2009a**. vol 54 (21) p6711-24.
- Serduc R, Brauer-Krisch E, Bouchet A, Renaud L, Brochard T, Bravin A, Laissue JA and L. D. G, *First trial of spatial and temporal fractionations of the delivered dose using synchrotron microbeam radiation therapy*, *J Synchrotron Radiat*, **2009b**. vol 16 (Pt 4) p587-90.
- Serduc, R., G. Berruyer, T. Brochard, M. Renier and C. Nemoz, *In vivo pink-beam imaging and fast alignment procedure for rat brain lesion microbeam radiation therapy*, *J Synchrotron Radiat*, **2010a**. vol 17 (3) p325-31.
- Serduc, R., A. Bouchet, E. Brauer-Krisch, J. A. Laissue, J. Spiga, S. Sarun, A. Bravin, C. Fonta, L. Renaud, J. Boutonnat, E. A. Siegbahn, F. Esteve and G. Le Duc, *Synchrotron microbeam radiation therapy for rat brain tumor palliation-influence of the microbeam width at constant valley dose*, *Phys Med Biol*, **2009**. vol 54 (21) p6711-24.
- Serduc, R., E. Brauer-Krisch, E. A. Siegbahn, A. Bouchet, B. Pouyatos, R. Carron, N. Pannetier, L. Renaud, G. Berruyer, C. Nemoz, T. Brochard, C. Remy, E. L. Barbier, A. Bravin, G. Le Duc, A. Depaulis, F. Esteve and J. A. Laissue, *High-precision radiosurgical dose delivery by interlaced microbeam arrays of high-flux low-energy synchrotron X-rays*, *PLoS One*, **2010b**. vol 5 (2) pe9028.
- Serduc, R., T. Christen, J. Laissue, R. Farion, A. Bouchet, B. van der Sanden, C. Segebarth, E. Bräuer-Krisch, G. Le Duc, A. Bravin, C. Rémy and E. L. Barbier, *Brain tumor vessel response to synchrotron microbeam radiation therapy: a short-term in vivo study*, *Phys Med Biol*, **2008a**. vol 53 (13) p3609-22.
- Serduc, R., Y. van de Looij, G. Francony, O. Verdonck, B. van der Sanden, J. Laissue, R. Farion, E. Bräuer-Krisch, E. A. Siegbahn, A. Bravin, Y. Prezado, C. Segebarth, C. Rémy and H. Lahrech, *Characterization and quantification of cerebral edema induced by synchrotron x-ray microbeam radiation therapy*, *Phys Med Biol*, **2008b**. vol 53 (5) p1153-66.
- Serduc, R., P. Verant, J. C. Vial, R. Farion, L. Rocas, C. Remy, T. Fadlallah, E. Bräuer-Krisch, A. Bravin, J. Laissue, H. Blattmann and B. van der Sanden, *In vivo two-photon microscopy study of short-term effects of microbeam irradiation on normal mouse brain microvasculature*, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **2006**. vol 64 (5) p1519-27.
- Shai Rutu, Shi Tao, Kremen Thomas J, Horvath Steve, Liao Linda M, Cloughesy Timothy F, Mischel Paul S and N. S. F., *Gene expression profiling identifies molecular subtypes of gliomas.*, *Oncogene*, **2003**. vol 22 (31) p4918-23.
- Shan YX, Jin SZ, Liu XD, Liu Y and Liu SZ, *Ionizing radiation stimulates secretion of pro-inflammatory cytokines: dose-response relationship, mechanisms and implications*, *Radiat Environ Biophys*, **2007**. vol 46 (1) p21-9.

- Shankavaram UT, Bredel M, Burgan WE, Carter D, Tofilon P and Camphausen K, *Molecular profiling indicates orthotopic xenograft of glioma cell lines simulate a subclass of human glioblastoma*, J Cell Mol Med **2012**. vol 16 (3) p545-54.
- Shi L, Cheng Z, Zhang J, Li R, Zhao P, Fu Z and Y. Y., *hsa-mir-181a and hsa-mir-181b function as tumor suppressors in human glioma cells.*, Brain Res. , **2008**. vol 1236 p185-93.
- Shin SC, Lee KM, Kang YM, Kim K, Lim SA, Yang KH, Kim JY, Nam SY and Kim HS, *Differential expression of immune-associated cancer regulatory genes in low- versus high-dose-rate irradiated AKR/J mice*, Genomics, **2011**. vol 97 (6) p358-63.
- Shirahata M, Iwao-Koizumi K, Saito S, Ueno N, Oda M, Hashimoto N, Takahashi JA and K. K., *Gene expression-based molecular diagnostic system for malignant gliomas is superior to histological diagnosis.*, Clin Cancer Res. , **2007**. vol 13 (24) p7341-56.
- Shoyab M, Plowman GD, McDonald VL, Bradley JG and Todaro GJ, *Structure and function of human amphiregulin: a member of the epidermal growth factor family*, Science, **1989**. vol 243 ((4894 Pt 1)) p1074-6.
- Sibenaller ZA, Etame AB, Ali MM, Barua M, Braun TA, Casavant TL and Ryken TC, *Genetic characterization of commonly used glioma cell lines in the rat animal model system*, Neurosurg Focus, **2005**. vol 19 (4) pE1.
- Siegbahn, E., A., J. Stepanek, E. Bräuer-Krisch, A. Bravin and *Determination of dosimetric quantities used in microbeam radiation therapy (MRT) with Monte Carlo simulations.*, Med. Phys., **2006**. vol 33 (9) p3248-59.
- Siegbahn, E., E. Brauer-Krisch, J. Stepanek, H. Blattmann, J. Laissue and A. Bravin, *Dosimetric studies of microbeam radiation therapy (MRT) with Monte Carlo simulations*, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment, **2005**. vol 548 (1-2) p54-58.
- Siegbahn, E. A., E. Brauer-Krisch, A. Bravin, H. Nettelbeck, M. L. Lerch and A. B. Rosenfeld, *MOSFET dosimetry with high spatial resolution in intense synchrotron-generated x-ray microbeams*, Med Phys, **2009**. vol 36 (4) p1128-37.
- Silber J, Lim DA, Petritsch C, Persson AI, Maunakea AK, Yu M, Vandenberg SR, Ginzinger DG, James CD, Costello JF, Bergers G, Weiss WA, Alvarez-Buylla A and H. JG., *miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells.*, BMC Med., **2008**. vol 6 (14)
- Simon JM, Cornu P, Boiserie G, Hasboun D, Tep B, Hardiman C, Valery CA, Delattre JY, Dormont D, Baillet F and Mazeran JJ, *Brachytherapy of glioblastoma recurring in previously irradiated territory: predictive value of tumor volume*, Int J Radiat Oncol Biol Phys, **2002**. vol 53 (1) p67-74.
- Slatkin, D. N., *Uniaxial and biaxial irradiation protocols for microbeam radiation therapy*, Phys Med Biol, **2004**. vol 49 (13) p203-4.
- Slatkin DN, Dilmanian FA and Spanne P (1994). Method for microbeam radiation therapy. United States. **1**.

- Slatkin, D. N., P. Spanne, F. A. Dilmanian, J. O. Gebbers and J. A. Laissue, *Subacute neuropathological effects of microplanar beams of x-rays from a synchrotron wiggler*, Proc Natl Acad Sci U S A, **1995**. vol 92 (19) p8783-7.
- Slatkin, D. N., P. Spanne, F. A. Dilmanian and M. Sandborg, *Microbeam radiation therapy*, Med Phys, **1992**. vol 19 (6) p1395-400.
- Smilowitz, H. M., H. Blattmann, E. Bräuer-Krisch, A. Bravin, M. D. Michiel, J. O. Gebbers, A. L. Hanson, N. Lyubimova, D. N. Slatkin, J. Stepanek and J. A. Laissue, *Synergy of gene-mediated immunoprophylaxis and microbeam radiation therapy for advanced intracerebral rat 9L gliosarcomas*, J Neurooncol, **2006**. vol 78 (2) p135-143.
- Smits VAJ, Klomp maker R, Arnaud L, Rijk sen G, Nigg EA and Medema RH, *Polo-like kinase-1 is a target of the DNA damage checkpoint*, Nat Cell Biol, **2000**. vol 2 p672-676.
- Soh J, Toyooka S, Ichihara S, Suehisa H, Kobayashi N, Ito S, Yamane M, Aoe M, Sano Y, Kiura K and Date H, *EGFR mutation status in pleural fluid predicts tumor responsiveness and resistance to gefitinib*, Lung Cancer, **2007**. vol 56 (3) p445-8.
- Southern EM, *Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.*, J Mol Biol. , **1975**. vol 98 (3) p503-17.
- Spasica E, Buchheita I, Berniera V and Noël A, *Dosimetry comparison of irradiation with conformal radiotherapy, intensity modulated radiotherapy, conformal radiotherapy in stereotactic conditions and robotic stereotactic radiotherapy for benign brain tumours*, Cancer/Radiothérapie, **2011**. vol 15 (4) p287-293.
- Spiga, J., E. A. Siegbahn, E. Bräuer-Krisch, P. Randaccio and A. Bravin, *The GEANT4 toolkit for microdosimetry calculations: application to microbeam radiation therapy (MRT)*, Med Phys, **2007**. vol 34 (11) p4322-30.
- Sprung CN, Yang Y, Forrester HB, Li J, Zaitseva M, Cann L, Restall T, Anderson R, Crosbie JC and Rogers PAW, *Genome-wide transcription responses to synchrotron microbeam radiotherapy*, Radiation research (accepted), **2012**. vol
- Steehmaier M, Hoffmann M, Baum A, Lénárt P, Petronczki M, Krssák M, Gürtler U, Garin-Chesa P, Lieb S, Quant J, Grauert M, Adolf GR, Kraut N, Peters JM and Rettig WJ, *BI 2536, a potent and selective inhibitor of polo-like kinase 1, inhibits tumor growth in vivo*, Curr Biol, **2007**. vol 17 (4) p316-22.
- Steel GG, Deacon JM, Duchesne GM, Horwich A, Kelland LR and Peacock JH, *The dose-rate effect in human tumour cells*, Radiother Oncol, **1987**. vol 9 (4) p299-310.
- Steel GG, Down JD, Peacock JH and Stephens TC, *Dose-rate effects and the repair of radiation damage.*, Radiother Oncol, **1986**. vol 5 (4) p321-31.
- Stepanek, J., H. Blattmann, J. A. Laissue, N. Lyubimova, M. Di Michiel and D. N. Slatkin, *Physics study of microbeam radiation therapy with PSI-version of Monte Carlo code GEANT as a new computational tool*, Med Phys, **2000**. vol 27 (7) p1664-75.

- Sternlicht MD, Sunnarborg SW, Kouros-Mehr H, Yu Y, Lee DC and Werb Z, *Mammary ductal morphogenesis requires paracrine activation of stromal EGFR via ADAM17-dependent shedding of epithelial amphiregulin*, *Development*, **2005**. vol 132 (17) p3923-33.
- Stewart LA, *Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials*, *Lancet*, **2002**. vol 359 (9311) p1011-8.
- Stojiljkovic M, Piperski V, Dacevic M, Rakic L, Ruzdijic S and Kanazir S, *Characterization of 9L glioma model of the Wistar rat*, *J Neurooncol*, **2003**. vol 63 (1) p1-7.
- Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, R. HJ; and ALA-Glioma Study Group, *Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial*, *Lancet Oncol*, **2006**. vol 7 (5) p392-401.
- Stummer W, van den Bent MJ and Westphal M, *Cytoreductive surgery of glioblastoma as the key to successful adjuvant therapies: new arguments in an old discussion.*, *Acta Neurochir*, **2011**. vol 153 (6) p1211-8.
- Stupp R, Hegi ME, van den Bent MJ, Mason WP, Weller M, Mirimanoff RO and Cairncross JG, *Changing Paradigms—An Update on the Multidisciplinary Management of Malignant Glioma*, *The Oncologist*, **2006**. vol 11 p165-180.
- Stupp R, Pica A, Mirimanoff RO and Michielin O, *A practical guide for the management of gliomas*, *Bull Cancer*, **2007**. vol 94 (9) p817-22.
- Stupp, R., M. E. Hegi, W. P. Mason, M. J. van den Bent, M. J. Taphoorn, R. C. Janzer, S. K. Ludwin, A. Allgeier, B. Fisher, K. Belanger, P. Hau, A. A. Brandes, J. Gijtenbeek, C. Marosi, C. J. Vecht, K. Mokhtari, P. Wesseling, S. Villa, E. Eisenhauer, T. Gorlia, M. Weller, D. Lacombe, J. G. Cairncross and R. O. Mirimanoff, *Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial*, *Lancet Oncol*, **2009**. vol 10 (5) p459-66.
- Stupp, R., W. P. Mason, M. J. van den Bent, M. Weller, B. Fisher, M. J. Taphoorn, K. Belanger, A. A. Brandes, C. Marosi, U. Bogdahn, J. Curschmann, R. C. Janzer, S. K. Ludwin, T. Gorlia, A. Allgeier, D. Lacombe, J. G. Cairncross, E. Eisenhauer and R. O. Mirimanoff, *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*, *N Engl J Med*, **2005**. vol 352 (10) p987-96.
- Sumara I, Giménez-Abián JF, Gerlich D, Hirota T, Kraft C, de la Torre C, Ellenberg J and Peters JM, *Roles of polo-like kinase 1 in the assembly of functional mitotic spindles*, *Curr Biol*, **2004**. vol 14 (19) p1712-22.
- Suortti P and Thomlinson W, *Medical applications of synchrotron radiation*, *Phys Med Biol*, **2003**. vol 48 (13) pR1-35.
- Takahashi T, Sano B, Nagata T, Kato H, Sugiyama Y and e. a. Kunieda K, *Polo-like kinase 1 (PLK1) is overexpressed in primary colorectal cancers*, *Cancer Sci* **2003**. vol 94 p148-52.
- Thiel HJ, Lierse W, Lehmann FM and Sauer R, *Histochemical and ultrastructural studies on anti-edematous and radiation-protective action of O-(beta-hydroxyethyl)-rutosides on the rat brain after single irradiation. 2. Histochemical study on carbohydrate metabolism and acid phosphatase activation*, *Strahlenther Onkol*, **1988**. vol 164 (11) p662-73.

- Thiessen B, Stewart C, Tsao M, Kamel-Reid S, Schaiquevich P, Mason W, Easaw J, Belanger K, Forsyth P, McIntosh L and Eisenhauer E, *A phase I/II trial of GW572016 (lapatinib) in recurrent glioblastoma multiforme: clinical outcomes, pharmacokinetics and molecular correlation*, *Cancer Chemother Pharmacol*, **2010**. vol 65 (2) p353-61.
- Tokumitsu Y, Mori M, Tanaka S, Akazawa K, Nakano S and Niho Y, *Prognostic significance of polo-like kinase expression in esophageal carcinoma*, *Int J Oncol*, **1999**. vol 15 (4) p687-92.
- Tropres I, Grimault S, Vaeth A, Grillon E, Julien C, Payen JF, Lamalle L and Decorps M, *Vessel size imaging*, *Magn Reson Med*, **2001**. vol 45 (3) p397-408.
- Tso CL, Freije WA, Day A, Chen Z, Merriman B, Perlina A, Lee Y, Dia EQ, Yoshimoto K, Mischel PS, Liao LM, Cloughesy TF and N. SF., *Distinct transcription profiles of primary and secondary glioblastoma subgroups.*, *Cancer Research*, **2006**. vol 66 (1) p159-67.
- Uyama A, Kondoh T, Nariyama N, Umetani K, Fukumoto M, Shinohara K and Kohmura E, *A narrow microbeam is more effective for tumor growth suppression than a wide microbeam: an in vivo study using implanted human glioma cells*, *J Synchrotron Radiat*, **2011**. vol 18 ((Pt 4)) p671-8.
- van den Bent MJ, Carpentier AF, Brandes AA, Sanson M, Taphoorn MJ, Bernsen HJ, Frenay M, Tjissen CC, Grisold W, Sipos L, Haaxma-Reiche H, Kros JM, van Kouwenhoven MC, Vecht CJ, Allgeier A, Lacombe D and Gorlia T, *Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine improves progression-free survival but not overall survival in newly diagnosed anaplastic oligodendrogliomas and oligoastrocytomas: a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer phase III trial*, *J Clin Oncol*, **2006a**. vol 24 (18) p2715-22.
- van den Bent MJ, Carpentier AF, Brandes AA, Sanson M, Taphoorn MJ, Bernsen HJ, Frenay M, Tjissen CC, Grisold W, Sipos L, Haaxma-Reiche H, Kros JM, van Kouwenhoven MC, Vecht CJ, Allgeier A, Lacombe D and Gorlia T, *Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine improves progression-free survival but not overall survival in newly diagnosed anaplastic oligodendrogliomas and oligoastrocytomas: a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer phase III trial.*, *Journal of Clinical Oncology*, **2006b**. vol 24 (18) p2715-22.
- van den Boom Jörg, Wolter Marietta, Kuick Rork, Misek David E., Youkilis Andrew S., Wechsler Daniel S., Sommer Clemens, Reifenberger Guido and H. S. M., *Characterization of gene expression profiles associated with glioma progression using oligonucleotide-based microarray analysis and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction.*, *American Journal of Pathology*, **2003**. vol 163 (3) p1033-43.
- Van der Sanden, B., E. Bräuer-Krisch, E. A. Siegbahn, C. Ricard, J. C. Vial and J. A. Laissue, *Tolerance of arteries to microplanar x-ray beams*, In print *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **2010**. vol
- van Vugt MA, Smits VA, Klompmaker R and Medema RH, *Inhibition of polo-like kinase-1 by DNA damage occurs in an ATM- or ATR-dependent fashion*, *J Biol Chem*, **2001**. vol 276 (4) p1656-41660.
- van Vugt MA, van de Weerd BC, Vader G, Janssen H, Calafat J, Klompmaker R, Wolthuis RM and Medema RH, *Polo-like kinase-1 is required for bipolar spindle formation but is dispensable for anaphase promoting complex/Cdc20 activation and initiation of cytokinesis*, *J Biol Chem*, **2004**. vol 279 (35) p36841-54.

- Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, Tamayo P, Weir BA, Gabriel S, Winckler W, Gupta S, Jakkula L, Feiler HS, Hodgson JG, James CD, Sarkaria JN, Brennan C, Kahn A, Spellman PT, Wilson RK, Speed TP, Gray JW, Meyerson M, Getz G, Perou CM and H. DN; , *Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1.*, *Cancer Cell.* , **2010**. vol 17 (1) p98-110.
- Vinchon-Petit S, Jarnet D, Jadaud E, Feuvret L, Garcion E and Menei P, *External irradiation models for intracranial 9L glioma studies*, *J Exp Clin Cancer Res*, **2010**. vol 29 (1) p142.
- Vitucci M, Hayes DN and M. CR., *Gene expression profiling of gliomas: merging genomic and histopathological classification for personalised therapy.*, *British Journal of Cancer*, **2011**. vol 104 (4) p545-53.
- Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, Jones CM, Marshall CJ, Springer CJ, Barford D and Marais R, *Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF.*, *Cell*, **2004**. vol 116 (6) p855-67.
- Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P and Ohgaki H, *IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas.*, *Am J Pathol.*, **2009**. vol 174 (4) p1149-53.
- Weichert W, Schmidt M, Gekeler V, Denkert C, Stephan C and Jung K, *Polo-like kinase 1 is overexpressed in prostate cancer and linked to higher tumor grades*, *Prostate*, **2004**. vol 60 p240-5.
- Weller Michael, *Novel diagnostic and therapeutic approaches to malignant glioma*, *Swiss Med Wkly*, **2011**. vol 141 (w13210)
- Wen PY and Kesari S, *Malignant gliomas in adults*, *N Engl J Med* **2008**. vol 359 (5) p492-507.
- Wick W, Hartmann C, Engel C, Stoffels M, Felsberg J, Stockhammer F, Sabel MC, Koeppen S, Ketter R, Meyermann R, Rapp M, Meisner C, Kortmann RD, Pietsch T, Wiestler OD, Ernemann U, Bamberg M, Reifenberger G, von Deimling A and Weller M, *NOA-04 randomized phase III trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with procarbazine, lomustine, and vincristine or temozolomide.*, *Journal of Clinical Oncology*, **2009**. vol 27 (35) p5874-80.
- Wikman H, Kettunen E, Seppänen JK, Karjalainen A, Hollmén J, Anttila S and Knuutila S, *Identification of differentially expressed genes in pulmonary adenocarcinoma by using cDNA array*, *Oncogene*, **2002**. vol 21 (37) p5804-13.
- Wilson CB, *Glioblastoma: the past, the present, and the future.*, *Clin Neurosurg*, **1992**. vol 38 p32-48.
- Wolf G, Hildenbrand R, Schwar C, Grobholz R, Kaufmann M, Stutte HJ, Strebhardt K and Bleyl U, *Polo-like kinase: a novel marker of proliferation: correlation with estrogen-receptor expression in human breast cancer*, *Pathol Res Pract*, **2000**. vol 196 (11) p753-9.
- Yamamoto Y, Matsuyama H, Kawauchi S, Matsumoto H, Nagao K and Ohmi C, *Overexpression of Polo-like kinase 1 (PLK1) and chromosomal instability in bladder cancer*, *Oncology*, **2006**. vol 70 p231-7.

- Yarm FR, *Plk phosphorylation regulates the microtubule-stabilizing protein TCTP*, Mol Cell Biol, **2002**. vol 22 (17) p6209-21.
- Yin E, Nelson DO, Coleman MA, Peterson LE and Wyrobek AJ, *Gene expression changes in mouse brain after exposure to low-dose ionizing radiation*, Int J Radiat Biol, **2003**. vol 79 (10) p759-75.
- Zeman W, Curtis H and Baker CP, *Histopathologic effect of high-energy-particle microbeams on the visual cortex of the mouse brain.*, Radiat Res, **1961**. vol 15 p496-514.
- Zhang W, Fletcher L and Muschel RJ, *The role of Polo-like kinase 1 in the inhibition of centrosome separation after ionizing radiation*, J Biol Chem, **2005**. vol 280 (52) p42994-9.
- Zhang Ying, Dutta Anindya and Abounader Roger, *The role of microRNAs in glioma initiation and progression*, Front Biosci., **2012**. vol 17 p700-712.
- Zhao S, Lin Y, Xu W, Jiang W, Zha Z, Wang P, Yu W, Li Z, Gong L, Peng Y, Ding J, Lei Q, Guan KL and X. Y., *Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1alpha.*, Science, **2009**. vol 324 (5924) p261-5.
- Zhao W, Chuang EY, Mishra M, Awwad R, Bisht K, Sun L, Nguyen P, Pennington JD, Wang TJ, Bradbury CM, Huang L, Chen Z, Bar-Sela G, Robbins ME and Gius D, *Distinct effects of ionizing radiation on in vivo murine kidney and brain normal tissue gene expression.*, Clin Cancer Res., **2006**. vol 12 (12) p3823-30.
- Zhou T, Aumais JP, Liu X, Yu-Lee LY and Erikson RL, *A role for Plk1 phosphorylation of NudC in cytokinesis*, Dev Cell, **2003**. vol 5 (1) p127-38.
- Zitzler J, Link D, Schäfer R, Liebetrau W, Kazinski M, Bonin-Debs A, Behl C, Buckel P and B. U., *High-throughput functional genomics identifies genes that ameliorate toxicity due to oxidative stress in neuronal HT-22 cells: GFPT2 protects cells against peroxide*, Mol Cell Proteomics, **2004**. vol 3 (8) p834-40.
- Zouaoui S., Rigau V., Mathieu-Daudé H., Darlix A., Bessaoud F., Fabbro-Peray P., Bauchet F., Kerr C., Fabbro M., Figarella-Branger D., Taillandier L., Duffau H., Trétarre B. and Bauchet L., *French brain tumor database: General results on 40,000 cases, main current applications and future prospects*, Neurochirurgie, **2012**. vol
- Zülch K.J., *Histological typing of tumours of the central nervous system. World Health Organization, Geneva, (ed) 1979*. vol

ANNEXE

PUBLICATIONS

Bouchet A, Boumendjel A, Khalil E, Serduc R, Bräuer-Krisch E, Siegbahn EA, Laissue JA and Boutonnat J. Chalcone JAI-51 improves efficacy of synchrotron microbeam radiation therapy of brain tumors. *J Synchrotron Radiat.* 2012 Jul;19(Pt 4):478-82.

Prezado Y, Sarun S, Gil S, Deman P, **Bouchet A**, Le Duc G. Increase of lifespan for glioma-bearing rats by using minibeam radiation therapy. *J Synchrotron Radiat.* 2012 Jan;19(Pt 1):60-5.

Le Duc G, Maldi I, Alric C, Mowat P, Bräuer-Krisch E, **Bouchet A**, Billotey C, Janier M, Lux F, Epicier T, Perriat P, Roux S, Tillement O, Toward an Image-Guided Microbeam Radiation Therapy using Gadolinium-based nanoparticles. *ACS Nano.* 2011 Dec 27 ; 5(12) : 9566-74.

Jensen TH, Bech M, Bunk O, Menzel A, **Bouchet A**, Le Duc G, Feidenhans'l R, Pfeiffer F, Molecular X-ray computed tomography of myelin in a rat brain. *Neuroimage.* 2011 July 1;57(1):124-9.

Jensen TH, Bech M, Bunk O, Thomsen M, Menzel A, **Bouchet A**, Le Duc G, Feidenhans'l R, Pfeiffer F, Brain tumor imaging using small-angle x-ray scattering tomography. *Phys Med Biol.* 2011 Mar 21;56(6):1717-26.

Bouchet A, Lemasson B, Le Duc G, Maisin C, Bräuer-Krisch E, Siegbahn EA, Renaud L, Khalil E, Rémy C, Poillot C, Bravin A, Laissue JA, Barbier EL, Serduc R. Preferential effect of synchrotron microbeam radiation therapy on intracerebral 9L gliosarcoma vascular networks. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2010 Dec 1;78(5):1503-12.

Lemasson B, Serduc R, Maisin C, **Bouchet A**, Coquery N, Robert P, Le Duc G, Troprès I, Rémy C, Barbier EL. Monitoring blood-brain barrier status in a rat model of glioma receiving therapy: dual injection of low-molecular-weight and macromolecular MR contrast media. *Radiology.* 2010 Nov;257(2):342-52.

Serduc R, Bräuer-Krisch E, Siegbahn EA, **Bouchet A**, Pouyatos B, Carron R, Pannetier N, Renaud L, Berruyer G, Nemoz C, Brochard T, Rémy C, Barbier EL, Bravin A, Le Duc G, Depaulis A, Estève F, Laissue JA. High-precision radiosurgical dose delivery by interlaced microbeam arrays of high-flux low-energy synchrotron X-rays. *PLoS One.* 2010 Feb 3;5(2):e9028.

Serduc R, **Bouchet A**, Bräuer-Krisch E, Laissue JA, Spiga J, Sarun S, Bravin A, Fonta C, Renaud L, Boutonnat J, Siegbahn EA, Estève F, Le Duc G. Synchrotron microbeam radiation therapy for rat brain tumor palliation-influence of the microbeam width at constant valley dose. *Phys Med Biol.* 2009 Nov 7;54(21):6711-24.

Serduc R, Bräuer-Krisch E, **Bouchet A**, Renaud L, Brochard T, Bravin A, Laissue JA, Le Duc G. First trial of spatial and temporal fractionations of the delivered dose using synchrotron microbeam radiation therapy. *J Synchrotron Radiat.* 2009 Jul;16(Pt 4):587-90.

Serduc R, Christen T, Laissue J, Farion R, **Bouchet A**, Sanden B, Segebarth C, Bräuer-Krisch E, Le Duc G, Bravin A, Rémy C, Barbier EL. Brain tumor vessel response to synchrotron microbeam radiation therapy: a short-term in vivo study. *Phys Med Biol*. 2008 Jul 7;53(13):3609-22.

COMMUNICATIONS ORALES ET AFFICHÉES (en premier auteur)

A. Bouchet, B. Lemasson, T Christen, C. Rome, M. Potez, E. Bräuer-Krisch, G. Leduc, C. Rémy, J. A. Laissue, E. Barbier, and R. Serduc. *Synchrotron Microbeam Radiation Therapy induces hypoxia in tumor but not in normal brain tissues*. 7th International Symposium on Medical Applications of Synchrotron Radiation (MASR), Shanghai, China, 2012. **Communication affichée**.

A. Bouchet, M. El Atifi, N. Sakakini, E. Bräuer-Krisch, Y. Prezado, R. Serduc, C. Leclec'h, P. Rihet, L. Pelletier, G. Le Duc. *Effect of unidirectional irradiation by Synchrotron Microbeam Radiation Therapy on 9L gliosarcoma bearing rats. Transcriptomic tissues responses*. 14th International Congress of Radiation Research, Warsaw, Poland, 2011. **Communication affichée**.

Bouchet A., El Atifi M., Bräuer-Krish E., Le Duc G., Pelletier L. *Microbeam radiation therapy (MRT) applied to brain tumor: biological mechanisms*. 6^{ème} édition des journées scientifiques du Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône Alpes (CLARA), Lyon, 2011. **Communication affichée**.

A. Bouchet. *Preferential effect of synchrotron microbeam radiation therapy (MRT) on intracerebral 9L gliosarcoma vascular networks. RMI and histological approach*. Congress Medical Applications of Synchrotron Radiation, Melbourne, Australia, 2010. **Communication orale**.

Résumé

La radiothérapie par microfaisceaux (MRT) synchrotron est une méthode de radiothérapie alternative pour les tumeurs cérébrales, qui présente l'avantage unique de pouvoir déposer de très hautes doses d'irradiation (plusieurs 100^{aines} de Gy) au niveau de la masse tumorale. En effet, le fractionnement spatial des rayons X en microfaisceaux parallèles de quelques dizaines de micromètres s'est montré efficace dans le traitement des tumeurs cérébrales du rongeur tout en préservant le tissu cérébral péri-tumoral. Pour autant, son mode d'action sur le plan biologique n'est qu'en partie connu. Si l'effet différentiel de cette irradiation sur les vaisseaux sains et tumoraux a pu être démontré ces dernières années, il ne peut expliquer à lui seul l'efficacité de la MRT. Dans ce travail, nous avons établi une description de la réponse transcriptomique précoce des tissus sains et tumoraux (gliosarcome 9L) à la MRT et les fonctions biologiques et voies de signalisation associées. Ces résultats constituent une base de données interrogeable à partir d'hypothèses précises. Cette base a ainsi permis d'identifier des transcrits impliqués dans la réponse de la tumeur à la MRT et dont l'inhibition n'interférerait pas avec la réparation des tissus sains : nous avons proposé 3 cibles potentielles qui permettraient d'augmenter l'index thérapeutique de la MRT. (i) L'inhibition radio-induite d'un groupe de 13 gènes (Plk1, Cdc20, Ccnb1, Pttg1, Bub1, Dlgap5, Kif20a, Traf4af1, Depdc1b, Mxd3, Cenpw, Cenpe et Cenpf), participerait au contrôle tumoral précoce après MRT par la perturbation de la division cellulaire et pourrait être amplifié pour prolonger l'inhibition de la croissance tumorale. (ii) La mise à profit de l'activation du promoteur de Clecfs6 au sein des tumeurs irradiées permettrait la surexpression locale, *via* les monocytes modifiés et infiltrés, de protéine d'intérêt thérapeutique. (iii) Areg (codant pour l'Amphiréguline) est surexprimé au sein du tissu tumoral après MRT et son implication connue dans la chimio/radio-résistance nous conduit à considérer que son inhibition pourrait être une stratégie de renforcement des effets de la MRT. Par ailleurs, nous avons montré que la MRT engendrait de meilleurs résultats sur le contrôle tumoral et la survie animale qu'une irradiation synchrotron en champ plein (avec une dose équivalente à la vallée MRT). Cependant, aucune différence transcriptomique ne pouvant soutenir cet effet n'a pu être mis en évidence.

Abstract

Synchrotron Microbeam Radiation Therapy (MRT) is a novel form of radiosurgery of brain tumors which allows high dose deposition (few hundreds of Gy) in pathologic tissues. The spatial fractionation of the incident beam into arrays of near-parallel microbeams has shown efficiency on brain tumors implanted in rodents while sparing normal tissues. The preferential effects observed on tumor vessels could not entirely explain the efficiency of MRT and other biological mechanisms might be involved in tumor control. In this work, we described the early whole transcriptomic responses of normal and tumoral (9L gliosarcoma) tissues to MRT and the associated biofunctions and pathways. This provides a questionable data base which can be used by the whole MRT community. This base allows to identify transcripts involved in tumor response to MRT and which inhibition would have no consequence in healthy tissue repair. We identified 3 relevant targets which might increase the therapeutic index of MRT. (i) The radio-induced inhibition of a cluster of 13 genes (Plk1, Cdc20, Ccnb1, Pttg1, Bub1, Dlgap5, Kif20a, Traf4af1, Depdc1b, Mxd3, Cenpw, Cenpe and Cenpf) may be involved in tumor control after MRT through the deregulation of cell division and could be amplified to continue the tumor growth inhibition. (ii) We might benefit from the activation of the Clecfs6 promoter in irradiated tumors by delivering, *via* modified and injected monocytes, some therapeutic proteins. (iii) Finally, Areg (encoding for Amphiregulin) is overexpressed in tumors after MRT and its involvement described in chimio/radioresistance enable to consider that its inhibition might help in tumor control after irradiation. We also showed that MRT induces a greater tumor control and survival rates compared with similar broad beam irradiations but no differences in transcriptomic responses have been highlighted.

Mots clefs

Radiothérapie par microfaisceaux / Synchrotron / Tumeur cérébrale / Réponse transcriptomique.