



**HAL**  
open science

# Etude des mécanismes d'action de nouvelles molécules utilisées seules ou en association avec les radiations ionisantes dans les cancers pédiatriques

Pierre Leblond

► **To cite this version:**

Pierre Leblond. Etude des mécanismes d'action de nouvelles molécules utilisées seules ou en association avec les radiations ionisantes dans les cancers pédiatriques. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2013. Français. NNT : 2013LIL2S030 . tel-01012005

**HAL Id: tel-01012005**

**<https://theses.hal.science/tel-01012005>**

Submitted on 25 Jun 2014

**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.

**Université du Droit et de la Santé – Lille II**  
**Ecole Doctorale Biologie-Santé**

**THESE**

Présentée pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE II**

**- Aspects Cellulaires et Moléculaires de la Biologie -**

Par

**Dr Pierre LEBLOND**

---

**ETUDE DES MECANISMES D'ACTION DE NOUVELLES MOLECULES  
UTILISEES SEULES OU EN ASSOCIATION AVEC LES RADIATIONS  
IONISANTES DANS LES CANCERS PEDIATRIQUES**

---

**Soutenue le 19 Décembre 2013 devant la commission d'examen suivante :**

<b>Rapporteurs :</b>	<b>Pr. Pascal CHASTAGNER</b>
	<b>Pr. Jacques ROBERT</b>
<b>Examineurs :</b>	<b>Dr. Christian BAILLY</b>
	<b>Pr. Pierre FORMSTECHE</b>
	<b>Pr. Matthieu VINCHON</b>
<b>Directeur de Thèse :</b>	<b>Dr. Amélie LANSIAUX</b>
<b>Co-encadrant :</b>	<b>Dr. Samuel MEIGNAN</b>

## Remerciements

### **À Madame le Docteur Amélie LANSIAUX Directeur de thèse**

*Amélie, je te remercie de m'avoir chaleureusement accueilli au sein du laboratoire de Pharmacologie anti-tumorale, une première fois pour mon master recherche et cette fois-ci pour mes travaux de thèse. Ton enthousiasme et ta force de persuasion ont eu raison de mes périodes de doute. Tu as toujours su être présente dans les moments où il le fallait. Sois assurée de ma reconnaissance et de toute mon amitié.*

### **À Monsieur le Professeur Pascal CHASTAGNER**

*Pascal, je te remercie d'avoir accepté de faire partie de mon jury, et de surcroît d'endosser le rôle de rapporteur. Travailler avec toi au sein des différentes instances de la SFCE a toujours été un plaisir. Mon souhait est de renforcer encore notre collaboration. Tu trouveras ici l'expression de ma reconnaissance.*

### **À Monsieur le Professeur Jacques ROBERT**

*Mr Robert, je vous remercie d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse en tant que rapporteur et de consacrer du temps pour examiner ce travail. Vous avoir parmi les membres de ce jury est un honneur pour moi. Veuillez trouver ici l'expression de toute ma reconnaissance.*

### **À Monsieur le Docteur Christian BAILLY**

*Mr Bailly, je vous remercie d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse et de consacrer du temps pour examiner ce travail. Vous avez toujours prêté une oreille bienveillante pour la réalisation de nos projets en pédiatrie. Veuillez trouver ici l'expression de ma grande gratitude.*

### **À Monsieur le Professeur Pierre FORMSTECHE**

*Mr Formstecher, je vous remercie de m'avoir accueilli au sein de votre équipe « Ciblage moléculaire et cellulaire pour le traitement des Cancers » et d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Veuillez trouver ici l'expression de toute ma reconnaissance.*

**À Monsieur le Professeur Matthieu VINCHON**

*Matthieu, je te remercie d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Travailler avec toi au quotidien est un réel plaisir. Ton érudition et ta rigueur sont des exemples pour moi. Mon souhait est de poursuivre une collaboration déjà fructueuse et de développer des projets scientifiques communs. Tu trouveras ici l'expression de ma reconnaissance.*

**À mes collègues du service, les Dr Defachelles, Lervat et Sudour,**

*Pour votre aide précieuse au quotidien dans la prise en charge des malades. C'est en grande partie grâce à vous que cette thèse a été possible, et je vous en remercie.*

**À Florence, Elodie,** qui ont effectué leur master recherche au laboratoire,

*Pour leur bonne humeur et leur aide.*

**À Amélie Dewitte, dite « la petite Amélie »,**

*Pour sa gentillesse et son aide technique.*

**À Abigaëlle,**

*Pour son humour décalé et sa disponibilité... Tu nous auras bien fait rire !*

**À Christine,** la gardienne des cellules, la reine de la culture cellulaire et du MTS !

*Pour ton soutien, ta disponibilité et ton aide précieuse en culture... et en MTS...*

*Sois assurée de toute mon amitié*

**À Nicole et Brigitte,**

*Pour votre soutien de tous les jours et votre disponibilité*

**Au Dr Bernard Leclercq, directeur du centre Oscar Lambret,**

*Pour avoir rendu cette aventure possible, votre bienveillance et votre soutien.*

**Au Pr Lartigau, au Dr Thierry Sarrazin, et à l'équipe du département de radiothérapie du Centre Oscar Lambret,**

*Pour m'avoir permis d'accéder au plateau technique de radiothérapie et au fameux DARPAC !*

**Au Dr Samuel Meignan,**

*Pour ton soutien sans faille du premier au dernier jour de ce travail.*

*Merci pour ton regard à la fois bienveillant mais aussi critique, tes conseils techniques avisés, tes multiples relectures, ton aide informatique, etc...*

*La liste des épines que tu m'as retirées du pied serait trop longue pour toutes les énumérer ici !*

*Sois assuré de toute ma gratitude et de toute mon amitié.*

**À mes parents,**

**Et enfin à ma femme Virginie, et mes enfants Jeanne, Charles, Juliette, et Malo**

*Pour votre soutien, et votre infinie patience. Vous avoir à mes côtés chaque jour est le plus grand bonheur de ma vie.*

## Résumé

Les progrès considérables effectués durant les trente dernières années permettent de guérir actuellement plus de 75% des enfants atteints d'un cancer. Néanmoins, certains types de tumeur, comme les gliomes de haut grade et les neuroblastomes métastatiques des enfants de plus de un an, gardent un pronostic particulièrement sombre. De nouvelles stratégies thérapeutiques doivent donc être développées dans ces indications. Dans cette optique, nous avons étudié les effets de deux nouvelles molécules ciblées, le cilengitide, inhibiteur des intégrines  $\alpha\beta3$  et  $\alpha\beta5$ , et le F14512, inhibiteur de la topoisomérase II dont la délivrance est vectorisée via le système de transport des polyamines, sur des modèles précliniques de gliomes pédiatriques et de neuroblastomes.

Nous avons montré pour la première fois l'existence d'une expression variable d' $\alpha\beta3$  et  $\alpha\beta5$  dans nos modèles de lignées cellulaires pédiatriques, peu modifiée par les radiations ionisantes. Le traitement par cilengitide a entraîné une inhibition dose-dépendante de la croissance des cellules exprimant  $\alpha\beta3$ , liée à un rapide détachement cellulaire et à une sensibilité à l'anoïkis. Cette inhibition de croissance et le détachement cellulaire n'étaient pas corrélés au niveau d'expression des intégrines  $\alpha\beta3$  et  $\alpha\beta5$ . Néanmoins, nos travaux semblent montrer que la cible principale du cilengitide est l'intégrine  $\alpha\beta3$ . Le traitement par radiations ionisantes n'a pas modifié le détachement induit par le cilengitide dans nos modèles.

Nous avons également mis en évidence une activité du système de transport des polyamines dans nos modèles, permettant ainsi une incorporation active du F14512 dans nos cellules de neuroblastomes. Nous avons montré une supériorité de la cytotoxicité du F14512 par rapport à l'étoposide *in vitro*, et son effet antitumoral a été démontré sur un modèle *in vivo*. Ces résultats, ainsi que l'effet globalement synergique de l'association du F14512 avec les sels de platine, sont de solides arguments pour poursuivre le développement de cette molécule, en phase clinique chez les patients atteints d'un neuroblastome. Par ailleurs, d'autres investigations pourraient être envisagées dans d'autres types tumoraux dans lesquels l'étoposide occupe une place importante. L'effet radiosensibilisant du F14512 pourrait dans ce cadre ouvrir des perspectives dans la prise en charge des médulloblastomes.

Mes travaux de thèse ont permis de montrer *in vitro* l'intérêt d'une inhibition de l'intégrine  $\alpha\beta3$  dans les HHG pédiatriques et les neuroblastomes et la pertinence de la vectorisation d'une molécule cytotoxique « classique » par le STP dans les neuroblastome tant *in vitro* qu'*in vivo*. Ces deux stratégies présentent de plus l'atout de pouvoir s'appuyer sur une possible sélection des patients potentiellement répondeurs par des moyens d'imagerie.

---

## SOMMAIRE

---

INTRODUCTION .....	7
I. les cancers de l'enfant .....	8
II. Les gliomes de haut grade de l'enfant .....	13
II.A. Epidémiologie et diagnostic .....	13
II.B. Localisation.....	16
II.C. Clinique/imagerie .....	19
II.D. Profil biologique des HGG .....	20
II.D.1. Profil biologique des HGG sustentoriels .....	20
II.D.2. Profil biologique des HGG du tronc cérébral (DIPG).....	22
II.E. Stratégies thérapeutiques dans les HGG de l'enfant .....	23
II.E.1. La chirurgie .....	24
II.E.2. La radiothérapie et la radio-chimiothérapie concomitante .....	24
II.E.3. Le témozolomide seul ou en association .....	27
II.E.4. La polychimiothérapie cytotoxique dans les gliomes de haut grade de l'enfant .....	29
II.E.5. Les nouvelles molécules ciblées en essai clinique.....	31
II.E.6. Les stratégies basées sur les anti-angiogéniques.....	33
III. Les neuroblastomes.....	36
III.A. Epidémiologie.....	36
III.B. Localisations et diagnostic.....	36
III.C. Facteurs pronostiques principaux et classifications .....	38
III.D. Les traitements des neuroblastomes .....	43
III.D.1. L'attitude « Wait and see » .....	43
III.D.2. La chirurgie.....	43
III.D.3. La chimiothérapie cytotoxique.....	44
III.D.4. La radiothérapie externe et la radiothérapie métabolique .....	45
III.D.5. Le traitement d'entretien.....	45
III.D.6. Les nouvelles molécules .....	46
III.D.7. Les antiangiogéniques pour le traitement des neuroblastomes .....	47
IV. Les intégrines et le Cilengitide.....	48
IV.A. La matrice extracellulaire .....	49
IV.B. Les intégrines .....	50
IV.B.1. Structure .....	50

IV.B.2. Rôle physiologique .....	51
IV.B.3. Voies majeures de signalisation .....	52
IV.B.4. Rôle dans la cancérogenèse .....	53
IV.C. Le Cilengitide.....	56
IV.C.1. Mécanisme d'action .....	56
IV.C.2. Études <i>in vitro</i> .....	57
IV.C.3. Études <i>in vivo</i> .....	58
IV.C.4. Développement clinique du cilengitide .....	60
IV.C.4.a. Essais cliniques de phase I .....	60
IV.C.4.b. Essais cliniques de phase II .....	61
• Essais cliniques dans des cancers autres que les gliomes de haut grade .....	61
• Essais cliniques dans les gliomes de haut grade.....	62
IV.C.4.c. Le cilengitide utilisé en association.....	64
IV.C.4.d. Essai cliniques précoces avec le cilengitide en pédiatrie .....	65
V. Le Système de Transport des Polyamines et F14512 .....	67
V.A. Les polyamines.....	67
V.A.1. Rôle physiologique des polyamines .....	67
V.A.2. Métabolisme des polyamines .....	68
V.A.3. Le Système de Transport des Polyamines .....	70
V.A.4. Implications des polyamines dans le cancer .....	71
V.B. Le F14512, nouvel inhibiteur de topoisomérase II à action ciblée .....	72
V.B.1. La topoisomérase II .....	72
V.B.2. Le F14512, nouvel inhibiteur sélectif de topoisomérase II .....	74
V.B.3. Développement clinique du F14512.....	77
OBJECTIFS DE LA THESE .....	78
MATERIEL ET METHODE.....	81
RESULTATS .....	87
Article 1 : <i>Cilengitide in pediatric tumor cell lines</i> .....	88
Article 2 : <i>F14512 in pediatric tumor cell lines</i> .....	96
DISCUSSION.....	104
CONCLUSION.....	116
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	118
ANNEXES .....	132

---

## SOMMAIRE DES FIGURES

---

Figure 1 : Répartition des cancers de l'enfant en France .....	9
Figure 2 : Répartition par sous-types histologiques des tumeurs cérébrales chez les enfants de moins de 15 ans .....	14
Figure 3 : Répartition par sous-types histologiques des tumeurs cérébrales tous âges confondus .....	15
Figure 4 : Aspect anatomopathologique d'un glioblastome.....	16
Figure 5 : Histogrammes représentant l'incidence relative des gliomes en fonction de l'âge.....	18
Figure 6 : Topographie des tumeurs gliales et glio-neurales.....	18
Figure 7 : Imageries cérébrales de gliomes de haut grade. ....	20
Figure 8 : Imagerie tomodensitométrique d'un neuroblastome. ....	37
Figure 9 : Aspects anatomopathologiques d'un neuroblastome .....	38
Figure 10 : Les différents profils génomiques tumoraux de neuroblastome .....	42
Figure 11 : Les différentes familles d'intégrines. ....	50
Figure 12 : Représentation schématique des différentes voies de signalisation des intégrines. ....	53
Figure 13 : Formule moléculaire du cilengitide .....	57
Figure 14 : Réponse IRM au cilengitide. ....	63
Figure 15 : Métabolisme des polyamines .....	69
Figure 16 : Représentation schématique des hypothèses de transport des polyamines et de la chaîne des polyamines.....	71
Figure 17 : Mécanisme d'action de la topoisomérase II. ....	73
Figure 18 : Structure de l'Étoposide (A) et du F14512 (B). ....	74
Figure 19 : Structure de la sonde fluorescente F17073. ....	76
Figure 20 : Immunophénotypage des cellules gliales .....	84
Figure supplémentaire 1 : Histogramme de cytométrie en flux représentant la taille des cellules Res259 avant et après irradiation. ....	92
Figure supplémentaire 2 : Test de détachement cellulaire après irradiation. ....	93
Figure supplémentaire 3 : Courbes de survie cellulaire en fonction de la dose d'irradiation avec ou sans traitement par cilengitide pour les lignées pédiatriques Res259 et SF188. ....	94
Figure supplémentaire 4: Activité du STP et courbes de cytotoxicité du F14512 et de l'étoposide dans la lignée de tumeur primitive neuro-ectodermique PFSK-1. ....	100
Figure supplémentaire 5 : Isobogrammes de l'association du F14512 avec métabolite actif de l'irinotécan (SN38).....	101
Figure supplémentaire 6 : Effet radiosensibilisant du F14512 et de l'étoposide dans les lignées cellulaires de neuroblastome. ....	102

---

## SOMMAIRE DES TABLEAUX

---

Tableau 1: « Grading » de la classification 2007 de l'OMS des principales tumeurs gliales et neuro-gliales (Adapté de Louis <i>et al.</i> [Louis]) .....	13
Tableau 2 : Principales caractéristiques génétiques des gliomes malins selon l'âge et la localisation .	23
Tableau 3 : Principaux essais cliniques de radiothérapie et de radio-chimiothérapie concomitante concernant les tumeurs infiltrantes du tronc cérébral chez l'enfant. ....	26
Tableau 4 : Schéma de consensus de la classification de l'International Neuroblastoma Risk Group (INRG).....	41
Tableau 5 : Classification de l'International Neuroblastoma Staging System (INSS).....	43
Tableau 6 : Caractéristiques principales et immunophénotypage des cellules de gliome pédiatrique	83
Tableau supplémentaire 1 : Valeurs des IC50 du F14512 et de l'étoposide dans les lignées de neuroblastome, et niveau d'activation du STP .....	99

---

## ABBREVIATIONS

---

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique

**CGH** : Comparative Genomic hybridization

**CHO** : Chinese Hamster Ovary

**DAPI** : 4',6'-diamidino-2-phénylindole

**DIPG**: Gliome infiltrant du tronc cérébral (Diffuse Intrinsic Pontine Glioma)

**DMEM** : Dulbecco's Modified Eagle Medium

**EDTA** : acide éthylène diamine tétraacétique

**EGFR** : Epidermal Growth Factor receptor

**EPC**: Cellules endothéliales progénitrices

**FLAIR** : Fluid Attenuated Inversion Recovery

**HGFR**: Hepatocyte Growth Factor Receptor

**HGG** : Gliome de haut grade

**HVA**: Acide homovanilique

**IC<sub>50</sub>** : Inhibition Concentration 50

**INCa** : Institut National du Cancer

**INRG**: International Neuroblastoma Risk Group

**INSS**: International Neuroblastoma Staging System

**IRM** : Imagerie par Résonance Magnétique

**LDH**: Lactate Deshydrogénase

**MAT** : Méthione-Acétyltransférase

**MGMT** : methylguanine DNA methyltransférase

**MIBG**: Méta-Iodo-Benzyl-Guanidine

**NBD** : Nitrobenzoxadiazole

**NMDA** : N-Méthyl-D-Aspartate

**NO** : Oxyde Nitrique

**NOS2** : Oxyde Nitrique Synthétase

**ODC** : Ornithine Décarboxylase

**OMS** : Organisation Mondiale de la santé

**PAO** : Polyamine Oxydase

**PBS** : Phosphate Buffered Saline

**PDGFR** : Platelet-Derived Growth Factor Receptor

**PNET** : Primitive Neuro-Ectodermique Tumor

**RNHE** : Registre National des Hémopathies malignes de l'Enfant

**RNSTE** : Registre National des Tumeurs Solides de l'Enfant

**RPMI** : Roswell Park Memorial Institute medium

**SamDC** : S-adénosylméthionine Décarboxylase

**SAT1** : Spermidine/Spermine N-acétyltransférase

**SFCE** : Société Française des Cancers et leucémies de l'Enfant et de l'adolescent

**SIOP** : Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique

**Spd** : Spermidine

**Spm** : Spermine

**SSAT** : Spermidine/Spermine-Acétyltransférase

**STP** : Système de Transport des Polyamines

**VEGF** : Vascular Endothelial Growth Factor

**VMA** : Acide vanilmandélique

## INTRODUCTION

---

## INTRODUCTION

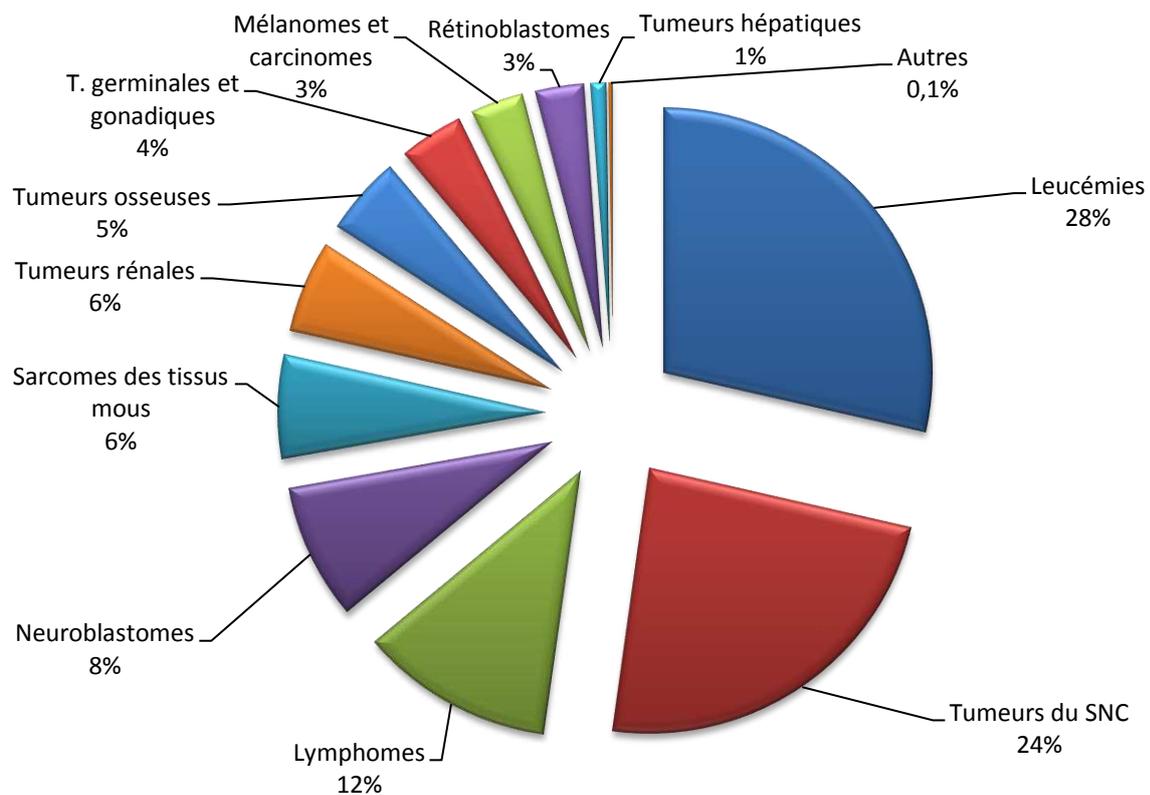
---

## **I. LES CANCERS DE L'ENFANT**

Les cancers de l'enfant représentent la seconde cause de mortalité entre 1 et 14 ans après les accidents, soit 20% des décès. Environ un enfant sur 440 est atteint d'un cancer avant l'âge de 15 ans, et un sur 300 avant l'âge de 20 ans en France comme dans les pays industrialisés, ce qui correspond à environ 1700 cas annuels chez les moins de 15 ans, auxquels se rajoutent 700 cas survenant chez des patients entre 15 et 20 ans. Sur la période 2000-2006, les données collectées par les 2 registres nationaux, le Registre National des Hémopathies malignes de l'Enfant (RNHE) et le Registre National des Tumeurs Solides de l'Enfant (RNTSE) permettent d'évaluer l'incidence brute annuelle de 153,2 cas par million et par an. Ces 2400 cas au total représentent toutefois moins de 1% de l'ensemble des cancers diagnostiqués annuellement en France (Lacour 2011).

Une des difficultés rencontrées dans la prise en charge des cancers de l'enfant réside dans la multiplicité des types histologiques concernés, ce qui fait de chaque sous-type de cancer une maladie orpheline avec finalement très peu de cas annuels pour chacun de ces sous-types. Par ailleurs, les diagnostics anatomopathologiques rencontrés diffèrent des cancers de l'adulte. En effet, on rencontre très peu de carcinomes en pédiatrie alors qu'ils sont très fréquents chez les adultes. En revanche, les tumeurs embryonnaires comme les tumeurs de blastème (néphroblastome, neuroblastome, médulloblastome, rétinoblastome...) très rares chez l'adulte représentent quasiment un quart des tumeurs chez l'enfant. Les localisations tumorales sont également différentes chez l'enfant, et les localisations fréquentes chez les adultes comme le sein, la prostate, le poumon ou encore le tube digestif sont très rares en pédiatrie. La répartition des principales tumeurs pédiatriques est indiquée ci-dessous (Figure 1). D'autre part, l'enfant est un être en développement et ses grandes fonctions

métaboliques varient en fonction de son âge, nécessitant ainsi un choix adéquat dans l'arsenal thérapeutique et souvent une adaptation spécifique des doses à utiliser. Ces constatations mettent le doigt sur la nécessité d'une recherche spécifique à l'oncologie pédiatrique dans la mesure où les résultats obtenus chez les adultes ne peuvent être extrapolés chez l'enfant.



**Figure 1 : Répartition des cancers de l'enfant en France** selon les catégories histologiques selon les données enregistrées dans le Registre national des hémapathies malignes de l'enfant (RNHE) et le Registre national des tumeurs solides de l'enfant (RNTSE) sur la période 2000-2006 (Adapté de Lacour *et al.* 2011).

Néanmoins, la survie globale à 5 ans des enfants atteints de cancer a été estimée en France à 75% sur la période 1990-1999, tous types de cancer et âges confondus, et doit avoisiner actuellement les 80%, ce qui est nettement supérieur aux résultats obtenus chez les patients adultes (Desandes 2008). Les raisons de cette différence sont multifactorielles, et

comprennent notamment la plus importante sensibilité des cancers pédiatriques aux traitements par chimiothérapie. Ce taux de survie globale à 5 ans peut donc sembler particulièrement important, mais doit être modéré par le fait qu'il varie de façon majeure selon les diagnostics histologiques, allant de 65-70% pour l'ensemble des tumeurs du système nerveux central mais seulement 10% pour les gliomes malins localisés au tronc cérébral, à 97% pour les rétinoblastomes.

Ainsi les différentes stratégies adoptées actuellement dans les protocoles nationaux de la Société Française de lutte contre les Cancers et les leucémies de l'Enfant et de l'adolescent (SFCE) ainsi que dans ceux des grands groupes internationaux, visent-elles deux grands objectifs :

- ✓ D'une part, les excellents résultats obtenus pour certains types de cancers incitent à une désescalade thérapeutique vigilante dans l'optique de diminuer la toxicité éventuelle des traitements reçus par ces enfants qui seront guéris de leur maladie, tout en conservant des taux de survie équivalents. Deux exemples marquants ont été les tentatives réussies de suppression de la doxorubicine et donc de sa toxicité cardiaque tout en conservant une survie similaire, pour le traitement des néphroblastomes de stades II et III et de risque histologique intermédiaire dans le protocole SIOP 2001 de la Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique (SIOP), ou encore pour les hépatoblastomes de risque standard dans le protocole SIOPEL3. De la même manière, la future approche européenne pour le traitement des tumeurs germinales malignes cérébrales prévoit une diminution des doses de radiothérapie afin de tenter d'en limiter les effets secondaires notamment cognitifs à long terme.

- ✓ A l'inverse, le pronostic particulièrement mauvais de certains cancers comme les gliomes malins ou les neuroblastomes de haut risque rend nécessaire le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques et l'introduction de nouvelles molécules.

Depuis le début des années 2000, les stratégies thérapeutiques en oncologie médicale adulte ont connu un profond bouleversement suite au développement des thérapies dites « ciblées », dont le premier agent ayant connu un succès important initialement dans le traitement des leucémies myéloïdes chroniques est l'imatinib mésylate. Le développement clinique de cet inhibiteur de tyrosine kinase et la meilleure connaissance des voies de signalisation impliquées dans la tumorigénèse ont conduit à la réalisation de multiples essais de molécules ciblées dans les cancers des adultes. Chez l'enfant, le développement des nouvelles molécules accuse toujours un retard certain, et ceci pour des raisons multiples. Tout d'abord, il est de coutume d'attendre que la nouvelle molécule en question ait été évaluée par des essais de phase II voire de phase III chez les adultes, permettant ainsi d'accumuler un grand nombre de données relatives à sa toxicité, avant d'envisager la réalisation d'un essai de phase I pédiatrique. D'autre part, le relatif faible nombre de cancers pédiatriques au regard de la population générale et leur grande hétérogénéité anatomopathologique n'encouragent pas un développement prioritaire de nouvelles molécules chez l'enfant.

En Décembre 2000, le Parlement européen a voté une résolution visant à améliorer l'accès des enfants aux nouveaux médicaments, et une nouvelle réglementation européenne est entrée en vigueur le 26 janvier 2007, incitant les compagnies pharmaceutiques à développer des essais spécifiques en pédiatrie. Cette nouvelle réglementation a ouvert de grands

espoirs quant à l'accès des nouvelles molécules en oncologie pédiatrique. Néanmoins, le nombre de nouveaux médicaments anticancéreux en cours de développement précoce dans la population pédiatrique reste faible, car l'indication pédiatrique n'est envisagée par les industriels qu'en cas d'indication équivalente chez l'adulte (Vassal 2009, 2013). Or, les tumeurs pédiatriques pour lesquelles le pronostic vital demeure très péjoratif et qui nécessitent donc l'introduction de nouveaux médicaments sont en premier lieu les gliomes de haut grade (HGG), et les formes métastatiques et/ou récidivantes de neuroblastomes ou de sarcomes. Même s'il est maintenant bien démontré que les HGG de l'enfant diffèrent de ceux des adultes (Jones 2012), une certaine ambiguïté terminologique du diagnostic histologique permet d'envisager l'amalgame entre les 2 populations facilitant ainsi le développement des nouvelles molécules en pédiatrie. Il en va différemment par exemple des neuroblastomes, rarissimes chez l'adulte, qui nécessitent donc des études pédiatriques spécifiques.

## II. LES GLIOMES DE HAUT GRADE DE L'ENFANT

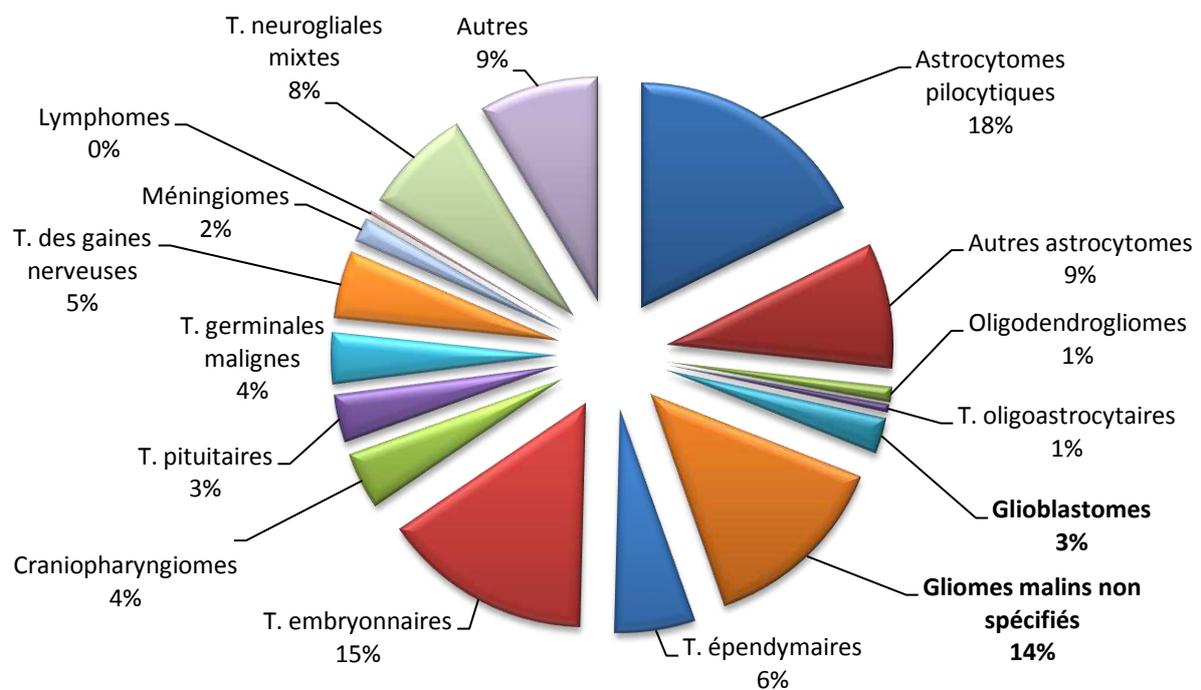
### II.A. Epidémiologie et diagnostic

Le diagnostic histologique des tumeurs cérébrales repose sur une classification précise de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), dont la partie concernant les gliomes est indiquée dans le tableau I (Louis 2007).

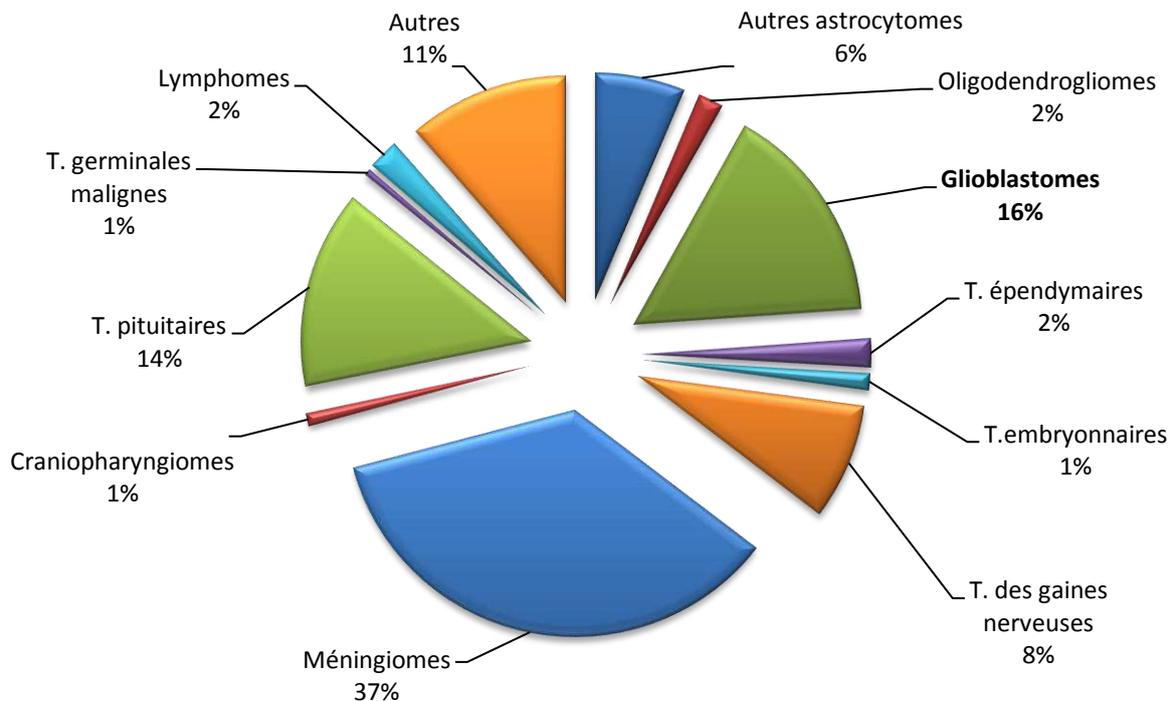
**Tableau 1: « Grading » de la classification 2007 de l'OMS des principales tumeurs gliales et neuro-gliales (Adapté de Louis *et al.* 2007)**

	Grade I	Grade II	Grade III	Grade IV
<b>Tumeurs astrocytaires</b>				
Astrocytome subépendymaire à cellules géantes	X			
Astrocytome pilocytique	X			
Astrocytome pilomyxoïde		X		
Astrocytome diffus		X		
Xanthoastrocytome pléiomorphe		X		
Astrocytome anaplasique			X	
Glioblastome				X
<b>Tumeurs oligodendrogiales et oligoastrocytaires</b>				
Oligodendrogliome		X		
Oligodendrogliome anaplasique			X	
Oligoastrocytome		X		
Oligoastrocytome anaplasique			X	
<b>Tumeurs neuronales et neuro-gliales mixtes</b>				
Gangliogliome	X			
Gangliogliome anaplasique			X	
Astrocytome et gangliogliome desmoplasique infantile	X			
Tumeur neuroépithéliale dysembryoplasique	X			

Parmi les tumeurs gliales, les gliomes de haut grade représentent les tumeurs cérébrales les plus fréquentes chez les patients adultes, chez qui il s'agit le plus souvent de glioblastomes multiformes. Chez l'enfant, les tumeurs cérébrales les plus fréquentes sont les gliomes de bas grade représentés essentiellement par les astrocytomes pilocytiques. L'incidence exacte des gliomes de haut grade ou gliomes malins (HGG) de l'enfant, qui correspondent dans la grande majorité des cas à des astrocytomes anaplasiques ou à des glioblastomes est assez imprécise car le diagnostic anatomopathologique peut être difficile voire non disponible. Elle est estimée entre 8 et 20% selon les auteurs (Dolecek 2012). Les répartitions des différents sous-types histologiques des tumeurs cérébrales chez l'enfant, et tous âges confondus sont indiquées sur les figures 2 et 3.



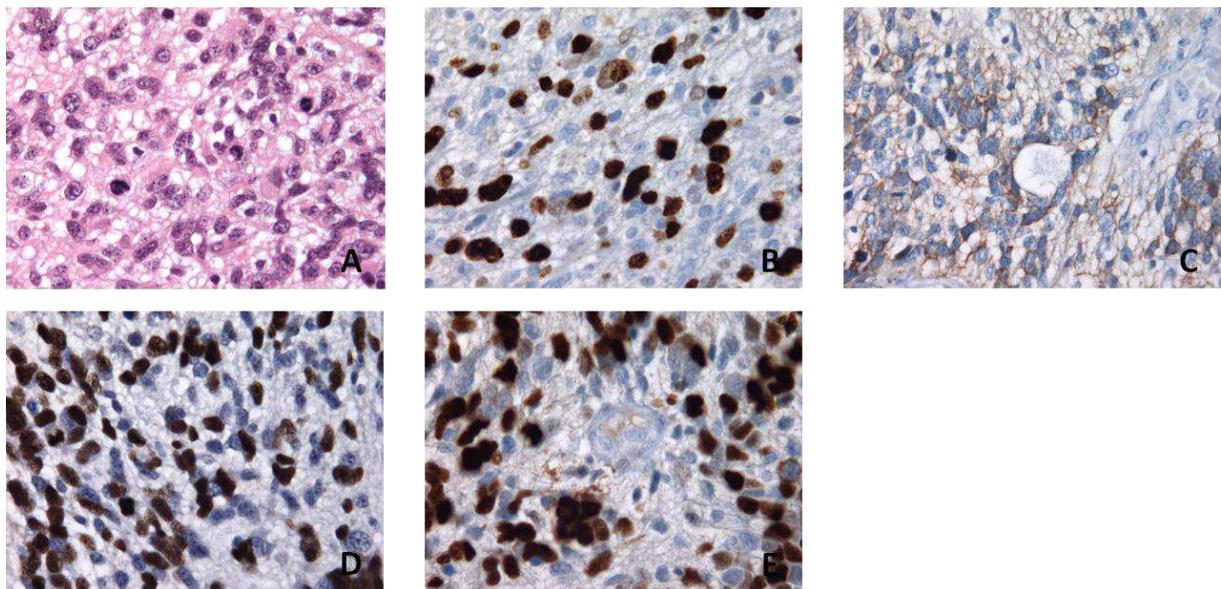
**Figure 2 : Répartition par sous-types histologiques des tumeurs cérébrales chez les enfants de moins de 15 ans** selon une étude épidémiologique menée de 2005 à 2009 aux Etats-Unis (Adapté de Dolecek *et al.* 2012)



**Figure 3 : Répartition par sous-types histologiques des tumeurs cérébrales tous âges confondus** selon une étude épidémiologique menée de 2005 à 2009 aux Etats-Unis (Adapté de Dolecek *et al.* 2012).

Le diagnostic de gliome malin, correspondant aux gliomes de grade III et IV de la classification de l'OMS repose sur l'analyse histologique de la pièce d'exérèse lorsque la tumeur est au moins en partie extirpable comme cela peut être le cas des tumeurs situées en dehors du tronc cérébral ou sur une ou des biopsies chirurgicales ou stéréotaxiques (Louis 2007). Cependant, dans le cas des tumeurs infiltrantes du tronc cérébral, il est classique d'évoquer le diagnostic de gliome malin sur un aspect typique en IRM chez un enfant présentant des signes neurologiques évocateurs et une histoire clinique compatible (Epstein 1993). Ce diagnostic histologique de gliome malin peut être particulièrement difficile en raison de l'hétérogénéité histologique parfois présente au sein d'une même tumeur, et des difficultés d'interprétation en cas de prélèvements de faible abondance issus de biopsies stéréotaxiques. Ainsi, plusieurs études avec revue anatomopathologique centralisée ont rapporté des erreurs diagnostiques consistant à qualifier de haut grade des tumeurs en fait

de bas grade dans environ 20% des cas (Fouladi 2003, Chastagner 2007). Les caractéristiques histologiques des gliomes de haut grade (grades III et IV de la classification de l'OMS) comportent notamment une hypercellularité, des atypies nucléaires et une activité mitotique importante plus ou moins accompagnée d'une prolifération microvasculaire et de plages nécrotiques (Louis 2007). Le diagnostic est aidé par les analyses en immunohistochimie (Figure 4).

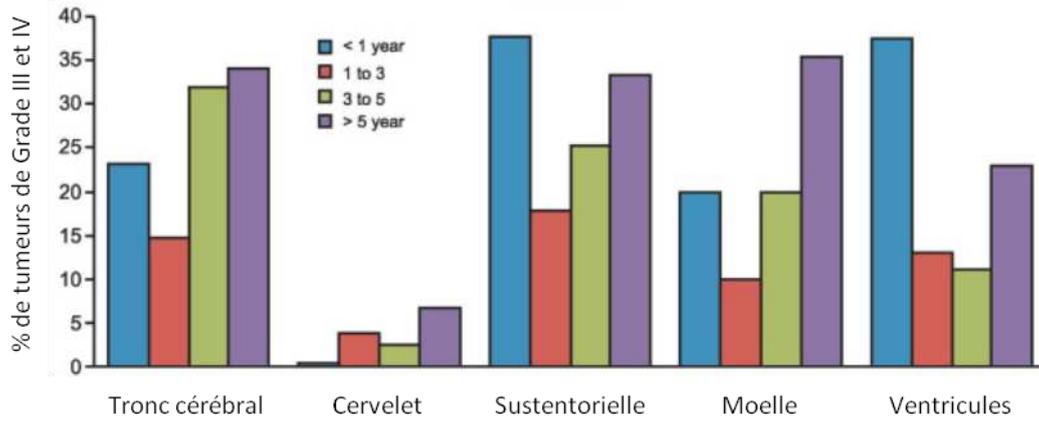


**Figure 4 : Aspect anatomopathologique d'un glioblastome** de localisation médullaire cervicale chez une jeune fille de 17 ans (grossissement X 400). **A.** Coloration standard HES. **B.** Immunomarquage MIB1 (Ki67) positif dans 30% des cellules. **C.** Immunomarquage d'EGFR positif dans 20% des cellules. **D.** Immunomarquage Olig2 positif dans 70% des cellules. **E.** Immunomarquage de p53 très fortement positif.

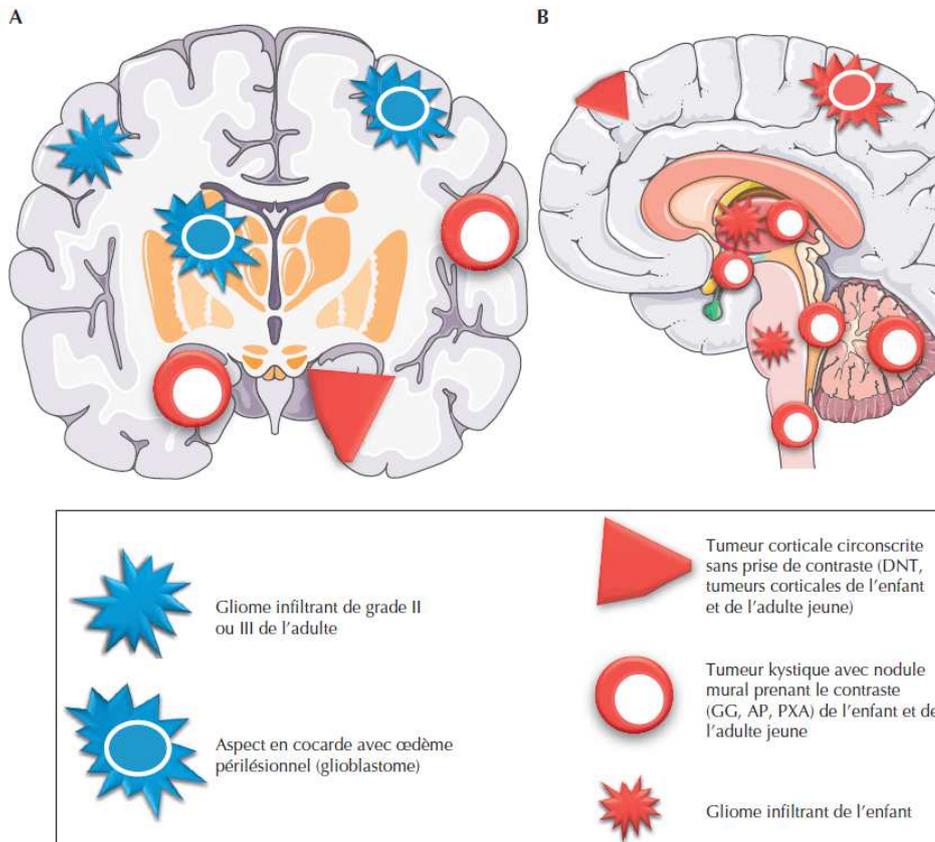
## II.B. Localisation

Les gliomes peuvent survenir à tout âge mais leur incidence varie. Les gliomes de bas grade sont plus fréquents chez l'enfant tandis que les gliomes de haut grade sont plus fréquents chez les patients adultes. Le taux de transformation maligne des gliomes de bas grade est

faible chez l'enfant, de l'ordre de 7%, tandis qu'il est supérieur à 50% chez les adultes. Ainsi, contrairement aux glioblastomes de l'adulte qui sont souvent secondaires à la transformation maligne d'un gliome de bas grade, les gliomes de haut grade de l'enfant surviennent-ils dans leur grande majorité *de novo* (Soffietti 2010, Broniscer 2007). Les localisations tumorales des gliomes de haut grade sont également différentes (Figure 5). Les tumeurs de l'adulte sont le plus souvent localisées dans les espaces sustentoriels (structures médianes et hémisphères cérébraux) tandis que les formes pédiatriques, à l'exception des tumeurs des moins de un an, sont plus volontiers localisées à la fosse postérieure et notamment au tronc cérébral (Rineer 2010, Qaddoumi 2009). Une étude récente menée à partir de la base de données américaine SEER (Surveillance Epidemiology and End-Results database) s'est intéressée à 455 cas de gliomes malins diagnostiqués entre 1988 et 2003. Dans cette étude, 55% des patients étaient âgés de moins de 18 ans, et 91,6% des tumeurs étaient localisées au tronc cérébral. Chez l'enfant, 80% des tumeurs du tronc cérébral ont les caractéristiques de gliomes diffus (entité qualifiée de Diffuse Intrinsic Pontine Glioma – DIPG – par les anglo-saxons) et représentent la majorité des gliomes de haut grade de localisation sous-tentorielle (Hargrave 2006). Les autres localisations sous-tentorielles concernent essentiellement les plus jeunes patients. Les localisations thalamiques semblent également plus fréquentes chez les enfants que chez les adultes, et ont une présentation clinique ainsi qu'un pronostic intermédiaires si on les compare aux formes sustentorielles ou du tronc cérébral (Kramm 2011, Wolff 2008). Enfin, les localisations spinales sont plus rares, avec une incidence d'environ 3% tant chez l'adulte que chez l'enfant (Wolff 2012).



**Figure 5 : Histogrammes représentant l'incidence relative des gliomes en fonction de l'âge en comparaison aux autres tumeurs du SNC chez 9192 enfants diagnostiqués entre 1973 et 2005 (d'après Qaddoumi *et al.* 2009).**

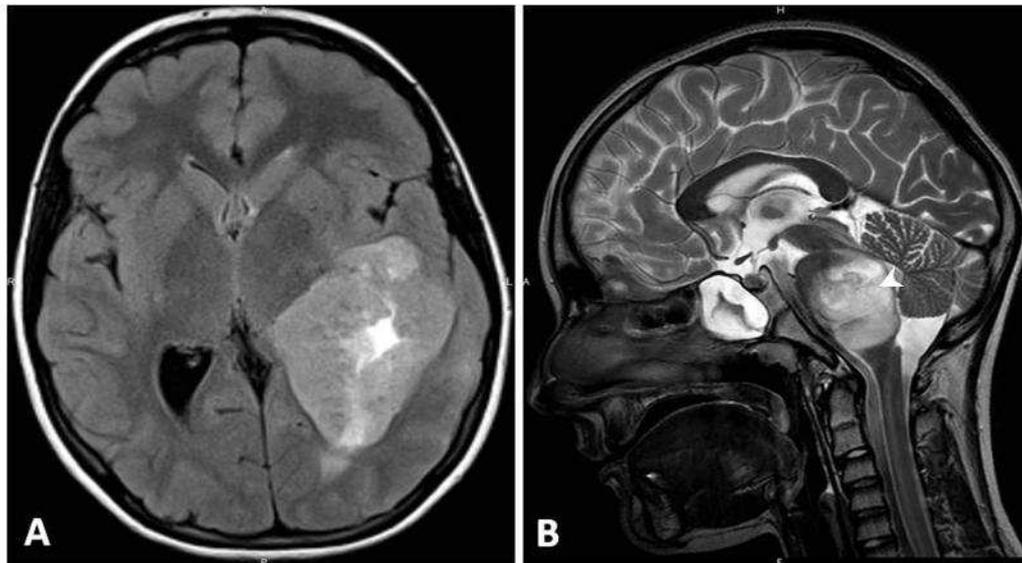


**Figure 6 : Topographie des tumeurs gliales et glio-neuronales de l'adulte (A) et de l'enfant et de l'adulte jeune (B). DNT : Tumeur neuroépithéliale dysembryoplasique, GG : gangliogliome, AP : astrocytome pilocytique, PXA : xanthoastrocytome pléiomorphe (Figarella-Branger *et al.* 2013)**

### II.C. Clinique/imagerie

Les gliomes de haut grade peuvent survenir à tout âge, et les signes cliniques conduisant au diagnostic sont fonction de la localisation tumorale. Les localisations sus-tentorielles s'accompagnent assez fréquemment d'une hypertension intracrânienne en rapport avec la tumeur en elle-même mais également avec l'œdème péri-tumoral réactionnel fréquent. Les localisations au tronc cérébral surviennent le plus souvent chez des enfants âgés de 5 à 10 ans, et le délai entre les premiers symptômes et le diagnostic est habituellement court, de l'ordre d'un mois. Les signes évocateurs sont des atteintes pyramidales avec hyper-réflexie et déficits moteurs, une ataxie et des troubles de la coordination des mouvements, des anomalies des paires crâniennes responsables d'un strabisme et/ou d'une paralysie faciale, plus rarement de troubles de la déglutition.

L'aspect en IRM est souvent celui d'une volumineuse tumeur aux contours mal limités, apparaissant en hyposignal T1 et hypersignal T2, et peu ou partiellement réhaussée après injection de produit de contraste (Figure 7) (Schumacher 2007). L'apparition récente des séquences de spectroscopie par résonance magnétique permet également d'apporter des arguments diagnostiques supplémentaires (Takhur 2006, Porto 2007). La confirmation anatomopathologique est dans ce contexte considérée comme peu utile car ne modifie que très rarement la prise en charge thérapeutique et le diagnostic fait peu de doute. Par ailleurs, elle nécessite la réalisation d'un geste biopsique en conditions stéréotaxiques dont l'innocuité est controversée, et qui est essentiellement réalisée pour la recherche d'une cible thérapeutique potentielle en rapport avec la possibilité d'une thérapie moléculaire ciblée dans le cadre d'un essai thérapeutique (Rougeau 2007, Klein 2008).



**Figure 7 : Imageries cérébrales de gliomes de haut grade.** A. IRM cérébrale en coupe axiale FLAIR montrant une volumineuse masse intra-axiale mésencéphalique infiltrant le lobe temporal interne et le pédoncule cérébral droit correspondant à un glioblastome chez un garçon de 7 ans. B. IRM cérébrale en coupe sagittale T2 montrant une lésion infiltrante protubérantielle typique de gliome malin du tronc cérébral chez une fille de 8 ans.

## II.D. Profil biologique des HGG

Plusieurs publications de ces 5 dernières années, bien résumées par une revue de la littérature publiée par Chris Jones, ont permis de démontrer d'une part que les gliomes de l'enfant étaient différents de ceux des adultes, mais également que les gliomes pédiatriques étaient différents d'un point de vue biologique selon leur localisation (Jones 2012). Ainsi doit-on distinguer les localisations sustentorielles des localisations du tronc cérébral.

### II.D.1. Profil biologique des HGG sustentoriels

✓ *Les anomalies chromosomiques* : celles-ci surviennent plus rarement dans les HGG pédiatriques. Notamment le gain du chromosome 7 ou la perte du 10q, événements très fréquemment rencontrés dans les glioblastomes de l'adulte, sont rares chez l'enfant.

✓ *L'amplification d'EGFR* : fréquente chez l'adulte (> 40%), elle est plus rare chez l'enfant, de l'ordre de 10% selon les séries et la technique employée. Toutefois, la surexpression d'EGFR survenait dans 40% des tumeurs du tronc cérébral et 75% des lésions sustentorielles chez les patients inclus dans un essai de phase I européen utilisant l'erlotinib (Georger 2011).

✓ *Mutations d'IDH1 et IDH2* : elles sont fréquemment mises en évidence dans les glioblastomes secondaires de l'adulte issus de lésions gliales initialement de plus grade, pouvaient laisser supposer leur implication dans les HGG de l'enfant. Cependant ces anomalies demeurent rares chez l'enfant (< 10%) et semblent concerner uniquement les plus de 13 ans dont les tumeurs sont sans doute plus proches biologiquement de celles de l'adulte (Jones 2012).

✓ *Mutation V600E de BRAF* : récemment mise en évidence dans les gangliogliomes et les xanthoastrocytomes pléiomorphes, elle serait présente dans environ 10% des HGG pédiatriques sustentoriels et absente des tumeurs du tronc cérébral et des tumeurs présentant une amplification de PDGFRA.

✓ *Autres anomalies géniques* : la plupart des autres anomalies classiquement retrouvées chez les adultes comme l'amplification de MYC, MYCN, CDK6, CCND2 et KRAS ou encore la délétion de CDKN2C, surviennent plus rarement chez l'enfant. Seule l'amplification de PDGFRA semble plus fréquente chez l'enfant (Paugh 2010).

### II.D.2. Profil biologique des HGG du tronc cérébral (DIPG)

Le manque de connaissances relatives aux aspects biologiques des tumeurs gliales malignes du tronc cérébral est en partie lié aux difficultés d'accès au matériel tumoral, qui ne peut être obtenu que par biopsies stéréotaxiques ou suite à des prélèvements nécropsiques.

✓ *Anomalies chromosomiques* : la plupart, comme le gain du 1q, sont communes aux tumeurs sustentorielles, mais certaines autres anomalies comme la perte du 16q, du 17p ou du 20p sont plus fréquentes dans les tumeurs du tronc cérébral.

✓ *Amplification de PDGFRA* : celle-ci est plus fréquemment retrouvée dans les DIPG.

mutations spécifiques d'histones : de très récents travaux ont montré l'existence de la mutation *H3F3A K27M*, observée dans 60% des cas dans ces localisations au tronc cérébral (Wu 2012). Une étude publiée par Gielen *et al.* a permis de démontrer que cette mutation était spécifique des gliomes de haut grade, et que sa mise en évidence pouvait ainsi permettre d'aider lors de diagnostics histologiques difficiles (Gielen 2013). De même, une étude récente suggère que cette mutation spécifique pourrait être corrélée au pronostic de la maladie (Khuong-Quang 2012).

Les principales caractéristiques génétiques des gliomes malins sont présentées dans le tableau ci-dessous (tableau 2).

**Tableau 2 : Principales caractéristiques génétiques des gliomes malins selon l'âge et la localisation**  
(Adapté de Jones *et al.*, 2012)

Anomalies génétiques	DIPG	HGG				
		< 3 ans	3-14 ans	14-21 ans	21-44 ans	> 45 ans
Transformation	NR	-	-	+	+++	+
Nombre d'altérations	++	-	+	+	++	+++
Gain du 1q	++	++	++	++	+	-
Perte du 16q	+	++	++	++	-	-
Gain du 7	+	-	-	-	++	+++
Perte du 10q	++	+	+	+	++	+++
Amplification <i>EGFR</i>	+	-	+	+	++	+++
Amplification <i>PDGFRA</i>	+++	-	++	++	++	+
Délétion <i>CDKN2A</i> ou <i>CDKN2B</i>	-	+	++	++	+++	+++
Altérations signalisation p53	+++	+++	++	++	++	++
Altérations signalisation PI3K	++	+	++	++	++	+++
Altérations signalisations Rb	++	+	+	+	++	+++
<i>BRAF V600E</i>	-	-	+	++	+	-
<i>IDH1 R132X</i>	-	-	-	+	+++	+
<i>H3F3A K27M</i>	+++	NR	+++	++	+	-
<i>H3F3A G34R/V</i>	-	NR	+	++	+	-
<i>HIST1H3B K27M</i>	++	NR	-	-	-	-

(-) faible, (+) modéré, (++) élevé, (+++) très élevé ; DIPG (pour Diffuse Intrinsic Pontine Glioma) : Gliome infiltrant du tronc cérébral ; HGG (pour High Grade Glioma) : Gliome de haut grade ; NR : Non Rapporté

## II.E. Stratégies thérapeutiques dans les HGG de l'enfant

En dépit d'approches thérapeutiques agressives et variées, le pronostic des enfants atteints d'un gliome malin du tronc cérébral (DIPG) demeure particulièrement sombre avec un taux de survie globale de l'ordre de 10% à 2 ans et une médiane de survie de 9 à 12 mois selon les séries. La survie globale à 3 ans est d'environ 20% dans les formes sustentorielles. L'approche thérapeutique dépend essentiellement de la localisation et de la taille de la tumeur, ce qui conditionne son « opérabilité », et de l'âge de l'enfant pour ce qui concerne les traitements complémentaires ou « alternatifs » à la chirurgie.

### **II.E.1. La chirurgie**

Le traitement de première intention des gliomes malins localisés en dehors du tronc cérébral (HGG) est la chirurgie qui doit être la plus complète possible et dont la qualité a un impact majeur sur la survie sans récurrence et la survie globale (Finlay 2005, Kramm 2006). Néanmoins, dans le cas des localisations au tronc cérébral, l'exérèse est le plus souvent irréalisable, en raison du caractère très infiltrant de la lésion en zone éloquentes et ne peut en aucun cas être complète. Dans cette situation, le geste chirurgical, s'il est réalisé, consiste en la réalisation de biopsies stéréotaxiques à visée de confirmation diagnostique et/ou de recherche.

### **II.E.2. La radiothérapie et la radio-chimiothérapie concomitante**

Chez les enfants de moins de 3 à 5 ans, le traitement chirurgical est souvent complété d'une chimiothérapie, dans le but d'éviter les séquelles à long terme de la radiothérapie. Dans cette population rare et particulière, les taux de survie globale sont d'ailleurs souvent meilleurs que chez les plus grands enfants, ce qui confirme une biologie différente de ces tumeurs (Dufour 2006, Sanders 2007).

Chez les enfants de plus de 3 à 5 ans, le traitement historique, qui reste actuellement le standard en complément du geste chirurgical, est la radiothérapie focale à une dose de 50-60 Gy, avec un fractionnement classique de 1,8-2 Gy par séance et par jour. Cette irradiation entraîne le plus souvent une amélioration clinique du patient avec diminution de ses symptômes, et une diminution voire l'arrêt du traitement par corticoïdes en général instauré dès le diagnostic afin de limiter les conséquences cliniques de l'œdème péri-tumoral. Des plus hautes doses de radiothérapie ont été testées en deux fractions quotidiennes

permettant de délivrer des doses jusqu'à 78 Gy, mais n'ont pas apporté de bénéfice en terme de survie (Packer 1994). Une étude pilote a proposé la réalisation d'une radiothérapie hypofractionnée, dont l'objectif était d'améliorer la qualité de vie en réduisant le temps de traitement et donc les venues à l'hôpital. Les auteurs délivraient donc 13 fractions de 3 Gy ou 6 fractions de 5,5 Gy sur 3 semaines, au lieu des 6 semaines habituelles, sans surcroît de toxicité, et avec des résultats équivalents au fractionnement classique en termes de survie sans progression et de survie globale (Janssens 2009).

En parallèle, le très mauvais pronostic des DIPG a conduit à tester d'autres stratégies de traitement comme l'administration d'une chimiothérapie concomitante utilisée le plus souvent dans un but de radiosensibilisation. Une étude de phase III a comparé une radiothérapie classique (54 Gy, fractions de 1,8 Gy/j) à une radiothérapie bifractionnée (70,2 Gy, 2 fractions de 1,17 Gy/j), avec administration concomitante de cisplatine (Mandell 1999). Les résultats en termes de survie sans événement et de survie globale étaient comparables dans les 2 bras, avec un profil de toxicité similaire, et les auteurs concluaient à l'absence de supériorité de la radiothérapie bifractionnée avec cisplatine concomitant. Une étude de phase II a évalué l'impact du topotécan utilisé en tant que radiosensibilisant et administré quotidiennement avant chaque séance de radiothérapie (54 Gy, fractions de 1,8 Gy/j) (Bernier-Chastagner 2005). La durée médiane de survie chez les 32 patients inclus était comparable aux résultats historiques obtenus avec radiothérapie seule. Des études similaires ont été menées en associant la radiothérapie à d'autres cytotoxiques comme le carboplatine (Allen 1999, Doz 2002), une combinaison vincristine/étoposide (Korones 2008), le tamoxifène (De Aquino 2006, Broniscer 2000), l'éthanidazole (Marcus 2003), une combinaison trophosphamide/étoposide (Wolff 2002) ou encore le paclitaxel (Liu 2001). Une publication récente a proposé l'inhalation de carbogène à but de radiosensibilisation avant

chaque séance de radiothérapie. Cette inhalation n'a apporté aucune amélioration du pronostic chez les 10 premiers patients traités (Aquino-Parsons 2008).

Les données disponibles concernant les principaux essais de radiothérapie et de radio-chimiothérapie concomitante sont résumées dans le tableau 3.

**Tableau 3 : Principaux essais cliniques de radiothérapie et de radio-chimiothérapie concomitante concernant les tumeurs infiltrantes du tronc cérébral chez l'enfant.**

Auteurs	n	Dose RT (Gy)	CT concomitante	OS médiane (mois)
<b>Packer <i>et al.</i> (1994)</b>	66	78*	--	9,5
<b>Janssens <i>et al.</i> (2009)</b>	9	39 ou 33**	--	8,6
<b>Mandell <i>et al.</i> (1999)</b>	66	54	Cisplatine	8,5
	66	70,2*	Cisplatine	8
<b>Bernier-Chastagner <i>et al.</i> (2005)</b>	32	54	Topotecan	8,3
<b>Allen <i>et al.</i> (1999)</b>	34	72*	Carboplatine	12
<b>Doz <i>et al.</i> (2002)</b>	38	54	Carboplatine	11
<b>Korones <i>et al.</i> (2008)</b>	31	54	Etoposide / Vincristine	9
<b>Broniscer <i>et al.</i> (2000)</b>	29	54	Tamoxifène	10,3
<b>Marcus <i>et al.</i> (2003)</b>	18	66*	Etanidazole	8,5
<b>Wolff <i>et al.</i> (2002)</b>	20	54	Trophosphamide / Etoposide	8
<b>Sirachainan <i>et al.</i> (2008)</b>	12	59	Témozolomide / acide rétinoïque (adj.)	13,5

RT : radiothérapie ; CT : chimiothérapie ; OS : survie globale ; \* : irradiation bifractionnée ; \*\* hypofractionnement

### II.E.3. Le témozolomide seul ou en association

Suite à la publication princeps de Stupp *et al.* en 2005, l'administration de témozolomide de manière concomitante à la radiothérapie suivie d'un traitement d'entretien par témozolomide seul est devenue le standard de prise en charge des glioblastomes de l'adulte (Stupp 2005). Le témozolomide est un agent alkylant dont le principal mécanisme de toxicité correspond à une alkylation en position 6 de la guanine. Chez l'adulte, le bénéfice en survie est supérieur lorsque les cellules tumorales présentent une méthylation du promoteur de la méthylguanine DNA méthyltransférase (*MGMT*) diminuant ainsi l'expression de la *MGMT*. Des schémas de traitement inspirés de celui proposé par Stupp ont donc été évalués chez les enfants porteurs d'un gliome malin. Une étude pilote, réalisée chez 12 enfants porteurs d'un gliome infiltrant du tronc cérébral, a associé la radiothérapie au témozolomide, selon le schéma classiquement réalisé chez les patients adultes, en ajoutant un traitement métronomique par acide rétinoïque. Dans cette série, la survie médiane était de 13,5 mois (Sirachainan 2008).

Dans un essai de phase II mené chez 90 enfants porteurs d'un gliome de haut grade localisé très majoritairement en dehors du tronc cérébral, la survie sans évènement et la survie globale à 3 ans étaient respectivement de 11 +/- 3 % et 22 +/- 5%, ce qui était tout à fait comparable aux résultats obtenus après radiothérapie seule (Cohen 2011). Parmi les 71 prélèvements tumoraux disponibles pour l'analyse de la *MGMT* en immunohistochimie, 22 présentaient une surexpression et il s'agissait essentiellement de glioblastomes. La survie sans évènement à 2 ans était de 17 +/- 5% chez les patients sans surexpression de la *MGMT* versus 5 +/- 4% en cas de surexpression ( $p=0,045$ ). Cette association radiothérapie/témozolomide constitue le bras de référence d'un essai de phase II randomisé

actuellement en cours qui étudie l'intérêt de l'ajout du bevacizumab à cette association (étude HERBY, [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). L'impact de la méthylation du promoteur de *MGMT* sera étudié à cette occasion.

Une autre étude de phase II a été menée également par le groupe COG auprès de 63 enfants porteurs d'un gliome infiltrant du tronc cérébral, recevant du témozolomide aux mêmes doses et une radiothérapie à la dose de 59,4 Gy. La survie médiane était de 9,6 mois, comparable aux résultats antérieurs (Cohen 2011).

Enfin, une étude pilote française a testé la même stratégie auprès de 21 enfants porteurs d'un gliome infiltrant du tronc cérébral, associant une radiothérapie à la dose de 54 Gy à du témozolomide en concomitant à la dose quotidienne de 75 mg/m<sup>2</sup>/j suivi du traitement d'entretien classique. Dans cette étude, l'examen anatomopathologique effectué de manière systématique suite à des biopsies avait confirmé le diagnostic de gliome de haut grade pour 17 patients, et d'astrocytome de grade II pour 3 patients. La survie médiane était de 11,7 mois, soit comparable aux résultats obtenus historiquement avec la radiothérapie seule. En outre, le traitement était émaillé d'une toxicité hématologique significative grevant la qualité de vie et impliquant une réduction des doses de témozolomide chez 58% des patients (Chassot 2012).

Au total, cette association radiothérapie/témozolomide apparaît comme une option raisonnable de traitement de première ligne des HGG sustentoriels chez les enfants de plus de 3 à 5 ans, mais elle doit être évitée dans les localisations au tronc cérébral.

L'utilisation d'agents cytotoxiques classiques en combinaison avec le témozolomide s'avère décevante. L'association témozolomide-irinotecan a été étudiée chez les enfants de plus de 6 mois porteurs d'un gliome de haut grade localisé en dehors du tronc cérébral au diagnostic

lors d'un essai de phase II européen. Le recrutement des patients a du être stoppé pour futilité en raison de l'absence de réponse tumorale chez les dix premiers patients évaluables (Hargrave 2013). De même, l'association témozolomide-cisplatine n'a permis d'obtenir qu'un taux de réponse de 7% (Grill 2007).

#### **II.E.4. La polychimiothérapie cytotoxique dans les gliomes de haut grade de l'enfant**

Alors que le témozolomide s'est imposé comme un standard de traitement des HGG de l'adulte, il n'existe pas actuellement de protocole de chimiothérapie clairement validé chez l'enfant. Très peu d'études randomisées ont pu démontrer le bénéfice d'une chimiothérapie adjuvante chez l'enfant. Ceci n'est guère étonnant si l'on prend en compte les difficultés spécifiques inhérentes à la conduite de tels essais dans cette indication, comme le faible nombre de patients concernés, les éventuelles difficultés du diagnostic histologique, ou encore les difficultés pour estimer les réponses en imagerie. Globalement, la chimiosensibilité des HGG quelle que soit leur localisation est faible, avec des taux de réponses le plus souvent inférieurs à 20%, comme en atteste une revue des essais cliniques de phase II. Cette revue montrait notamment de meilleures réponses chez les patients non pré-traités par rapport aux patients en rechute (Chastagner 2001).

Alors que certaines associations utilisées en situation adjuvante ont démontré un certain bénéfice dans les localisations sustentorielles, les taux de réponse sont très faibles, de l'ordre de 4%, et l'impact sur la survie est quasi nul dans les localisations au tronc cérébral. La première étude de phase III randomisée effectuée chez des enfants porteurs d'un gliome de haut grade (CCG-943) a permis de démontrer l'intérêt d'une chimiothérapie adjuvante associant lomustine (CCNU), vincristine et prednisone (pCV), administrée après chirurgie et

radiothérapie. La survie sans progression était de 46 % +/- 10% versus 18 % +/- 7% dans le bras radiothérapie seule (Sposto 1989). Néanmoins, les études randomisées ultérieures n'ont pas permis de reproduire ces résultats. Notamment, cette association pCV-radiothérapie a été comparée à l'association « 8 en 1 »-radiothérapie lors de l'essai CCG-945. La combinaison « 8 en 1 » est composée de vincristine, CCNU, procarbazine, hydroxyurée, cisplatine, cytarabine, dacarbazine et méthylprednisolone. Lors de cet essai la survie sans progression à 5 ans n'était que de 26% +/- 8% dans le bras pCV (Finlay 1995). Par ailleurs, cet essai avait particulièrement mis en lumière les difficultés d'évaluation en imagerie des résidus tumoraux post-opératoires et la nécessité d'effectuer des revues radiologiques centralisées.

Plusieurs autres agents de chimiothérapie utilisés seuls ou en associations ont été évalués lors d'essais de phase II ou d'études pilotes publiés lors des dix dernières années. L'association BCNU-cisplatine-étoposide a été étudiée lors d'une étude prospective auprès de 73 enfants porteurs d'un HGG localisé en dehors du tronc cérébral, et a montré un taux de réponse de 20% toutefois non corrélé à la survie. Les survies sans évènement à 5 et 10 ans étaient respectivement de 16 +/-9% et 13,3 +/- 9,4%. Cette association avait été responsable d'une toxicité pulmonaire chez 7 patients entraînant le décès chez 6 d'entre eux (Chastagner 2007).

Un essai prospectif a proposé la réalisation d'une chimiothérapie de première ligne avant radiothérapie dans les gliomes infiltrants du tronc cérébral. Il s'agissait de cycles de 30 jours alternant l'association tamoxifène-BCNU-cisplatine avec du méthotrexate à haute dose. La radiothérapie a été réalisée en cas de progression, associée à une chimiothérapie concomitante par tamoxifène et hydroxyurée, suivie d'un traitement d'entretien par

hydroxyurée. Cette étude a montré une survie médiane de 17 mois (10-23 mois) significativement plus élevée que celle de la cohorte historique choisie pour comparaison, toutefois associé à une toxicité importante grevant la qualité de vie (Frappaz 2008).

Plus récemment des essais avec des inhibiteurs de topoisomérase I, topotécan et irinotécan, ont montré une activité antitumorale très modeste dans les HGG (Chitagumpala 2006, Vredenburgh 2009).

La chimiothérapie à haute dose suivie de réinjection de cellules souches hématopoïétiques, effectuée après la radiothérapie n'améliorait pas non plus le pronostic (Bouffet 2000, Chastagner 2001). Cette stratégie thérapeutique a donc été abandonnée compte-tenu de son absence d'efficacité et de sa toxicité importante grevant la qualité de vie des malades.

#### **II.E.5. Les nouvelles molécules ciblées en essai clinique**

Les résultats modestes des chimiothérapies cytotoxiques utilisées à dose conventionnelle, à haute dose, et avec radiothérapie concomitante ont conduit à proposer d'autres approches thérapeutiques. Parallèlement, la meilleure compréhension des mécanismes moléculaires et des voies de signalisation dans les gliomes malins ont permis de proposer des essais de thérapies moléculaires ciblées. Il s'agit essentiellement d'études précoces de phase I.

Dans un essai testant le tipifarnib, inhibiteur de farnésyl transférase, durant la radiothérapie puis en entretien dans les gliomes malins du tronc cérébral (Haas-Kogan 2008), la survie sans événement à 1 an de 9,4%. L'essai de phase II consécutif effectué chez des enfants en récurrence de leur maladie a montré des taux de réponse inférieurs à 5% (Fouladi 2008).

La surexpression du Platelet-Derived Growth Factor Receptor (PDGFR) et de son ligand dans des modèles pré-cliniques de gliomes malins a conduit à proposer également l'utilisation concomitante de l'imatinib avec la radiothérapie, puis en entretien. L'essai de phase I a été marqué par des épisodes d'hémorragies intra-tumorales possiblement liés à l'imatinib et/ou à son association avec la radiothérapie, sans modification de la survie (Pollack 2007).

L'implication de la cascade de signalisation qui concerne l'Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) a conduit à réaliser un essai clinique de phase I avec l'erlotinib dans les gliomes malins du tronc cérébral et les tumeurs cérébrales malignes en rechute (Geoerger 2011). Dans la cohorte correspondant aux patients ayant un gliome infiltrant du tronc cérébral nouvellement diagnostiqué, l'erlotinib était administré de manière concomitante à la radiothérapie, puis seul en traitement d'entretien. La survie médiane sans progression était de 8 mois, et la survie globale de 12 mois (9,3-14). On notait une tendance toutefois non statistiquement significative pour un gain en survie d'environ 3 mois chez les patients dont la tumeur présentait une surexpression d'EGFR.

Le même schéma de traitement était utilisé pour des études de phase I avec le vandetanib, inhibiteur des voies impliquant EGFR et le récepteur au Vascular Endothelial Growth Factor (VEGFR2), le gefitinib, inhibiteur de l'EGFR, ou encore l'association du vandetanib au dasatinib, inhibiteur de PDGFRA et de Sarc, et ne permettait pas d'améliorer la survie (Broniscer 2010, Pollack 2011, Broniscer 2013).

Enfin, la découverte de la mutation V600E de *BRAF* dans 10% des localisations sustentorielles de HGG pourrait ouvrir la voie à un traitement ciblé comme le vémurafenib ou le dabrafenib.

Au total, ces nouvelles molécules ciblées sont globalement bien tolérées mais ont une activité anti-tumorale qui semble modeste en monothérapie. Néanmoins, dans la plupart des essais effectués, les courbes de survie montrent l'existence de « longs » survivants. L'un des écueils de la plupart de ces essais à l'exception de l'essai européen concernant l'erlotinib (Georger 2011), est d'une part l'absence de preuve histologique, et d'autre part l'absence de preuve de l'existence de la cible à la surface des cellules tumorales puisque dans la grande majorité des cas, ces tumeurs n'étaient pas biopsiées. Il aurait été intéressant de connaître le profil biologique de ces tumeurs particulières du fait de leur évolution inhabituelle.

#### **II.E.6. Les stratégies basées sur les anti-angiogéniques**

La néoangiogenèse, correspondant à la formation de néovaisseaux à partir d'une vascularisation pré-existante, est un phénomène requis pour la pérennité des cellules tumorales et leur prolifération. En l'absence d'angiogenèse tumorale, les cellules tumorales entrent en état de dormance. Cette angiogenèse tumorale est orchestrée par une surproduction locale simultanée de multiples promoteurs incluant notamment le vascular endothelial growth factor (VEGF) qui est le facteur pro-angiogénique dominant, et cible de la plupart des stratégies thérapeutiques anti-angiogéniques. La vascularisation des gliomes malins est structurellement et fonctionnellement anormale, conduisant à la formation d'un œdème vasogénique et à l'augmentation de la pression interstitielle. Ces phénomènes induisent une hétérogénéité de pénétration de l'oxygène et des drogues cytotoxiques *in situ* (Jain 2007). Le VEGF, un facteur clé dans le processus d'angiogenèse des gliomes malins agit comme facteur majeur de perméabilité vasculaire et comme promoteur de survie et de

division des cellules endothéliales (Plate 1992). L'expression de VEGF est stimulée par l'hypoxie, l'acidose et par de multiples facteurs de croissance (EGFR, PDGFR, HGFR, c-kit, insulin-like growth factor) et les voies de signalisation d'aval, PI3K-Akt, Ras-MAPK, sont souvent activées dans les gliomes malins.

Il existe donc un rationnel fort pour le développement de stratégies anti-angiogéniques dans la prise en charge des gliomes malins. La possibilité d'une normalisation des structures vasculaires par le traitement anti-angiogénique permettrait d'augmenter les effets de drogues cytotoxiques ou de radiations ionisantes administrées de manière concomitante. Plusieurs stratégies anti-angiogéniques sont actuellement en essai chez l'adulte dans le traitement des gliomes de haut grade : le thalidomide, seul ou en association avec la radiothérapie ou la chimiothérapie, le lenalidomide, et les associations de chimiothérapie métronomiques (tamoxifène, celecoxib, cyclophosphamide) qui ont montré une faible activité antitumorale en clinique. Cette stratégie métronomique consiste en l'administration d'agents de chimiothérapies associés ou non à des anti-inflammatoires, et administrés à des doses volontairement inférieures à celles maximales tolérées, le plus souvent quotidiennement sans arrêt prolongé (André 2009). Actuellement, le traitement de seconde ligne recommandé chez l'adulte en cas de récurrence de gliomes malins est l'association bevacizumab (anticorps monoclonal anti-VEGF) plus ou moins associé à l'irinotécan. Plusieurs études de phase II ont montré des taux de réponses importants compris entre 38 et 63%, permettant également d'augmenter la survie sans progression (Pope 2006, Vredenburgh 2007, Chen 2007).

Chez l'enfant les données concernant l'utilisation du bevacizumab sont limitées. Dans une étude de faisabilité du bevacizumab chez des enfants et jeunes adultes porteurs d'une

tumeur solide réfractaire, des réponses objectives ont été observées chez les 2 patients traités pour astrocytome de grade III (Benesch 2008). Cette association a fait l'objet d'une étude de phase II chez 34 enfants porteurs d'un gliome de haut grade en récurrence ou réfractaire quelle que soit sa localisation. Les résultats ont été décevants puisque la survie sans progression à 6 mois était de 41,8% dans les localisations sustentorielles et de 9,7% dans les localisations au tronc cérébral (Gururangan 2010).

Un essai de phase II multicentrique randomisé est actuellement en cours (HERBY study, [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)) et étudie précisément l'intérêt de l'ajout du bevacizumab au schéma désormais classique radiothérapie-témzolomide chez les enfants porteurs d'un gliome malin sustentoriel nouvellement diagnostiqué.

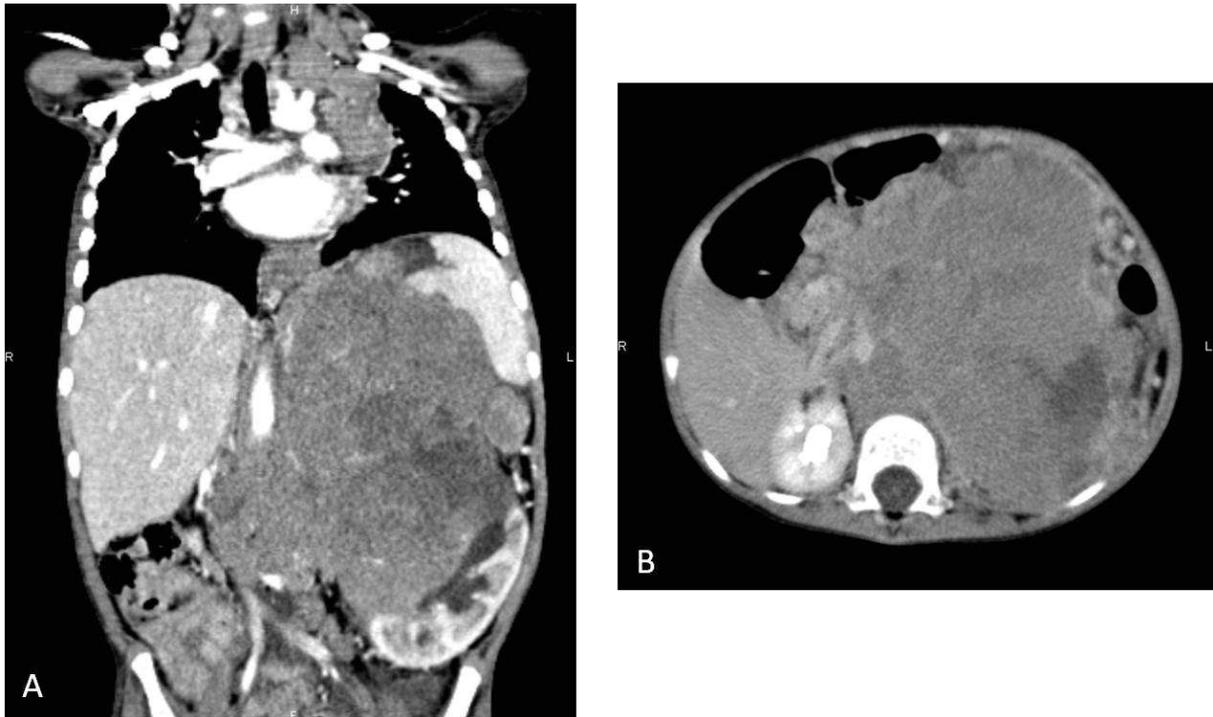
### III. LES NEUROBLASTOMES

#### III.A. Epidémiologie

Les neuroblastomes sont les tumeurs solides les plus fréquemment rencontrées dans l'enfance après les tumeurs cérébrales, et représentent un ensemble hétérogène de tumeurs malignes dont le pronostic peut être extrêmement variable selon une multitude de critères (Maris 2010). Les neuroblastomes prennent leur origine aux dépens des cellules de la crête neurale censées générer la médullosurrénale et les ganglions sympathiques paravertébraux. L'incidence des neuroblastomes a été évaluée à 10,5 par million d'enfants de moins de 15 ans et par an, ce qui représente environ 650 nouveaux cas annuels en Amérique du nord (Park 2013). Cette maladie atteint préférentiellement les enfants de moins de 4 ans et l'âge médian au diagnostic est de 19 mois (London 2005). Des cas familiaux ont été décrits, le plus souvent en rapport avec des mutations constitutionnelles des gènes *ALK* ou *PHOX2B*, ainsi que des associations avec la maladie de Hirschsprung ou le syndrome d'Ondine (Mosse 2004, 2008).

#### III.B. Localisations et diagnostic

Compte tenu de ses cellules d'origine, la localisation tumorale est préférentiellement surrénalienne, mais peut également concerner les ganglions sympathiques en position paravertébrale abdominale, pelvienne, thoracique ou cervicale (Figure 8). Au total les localisations abdominales représentent environ 65% des cas. Les formes métastatiques représentent environ 50% des cas de neuroblastomes et surviennent au niveau osseux, médullaire, ganglionnaire, hépatique ou encore sous-cutané.

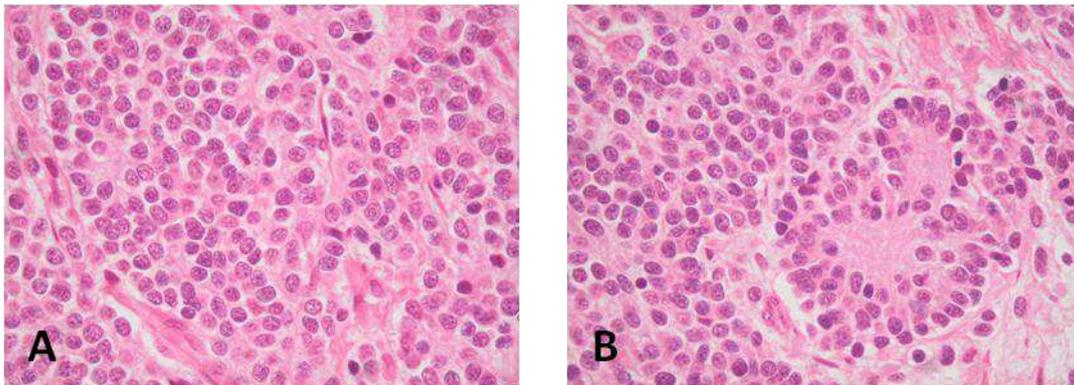


**Figure 8 : Imagerie tomodensitométrique d'un neuroblastome. A.** Scanner thoraco-abdominal en coupe coronale montrant une volumineuse masse surrénalienne gauche déplaçant le rein gauche et dépassant la ligne médiane chez un garçon de 3 ans. **B.** Scanner abdominal en coupe axiale montrant cette même lésion.

Les symptômes diagnostiques sont intimement liés à la localisation tumorale primitive parfois responsable d'un syndrome de masse cliniquement repérable, mais peuvent également correspondre à un syndrome algique dans le cas d'un envahissement métastatique osseux et/ou médullaire. Certaines localisations peuvent être responsables de symptômes spécifiques comme le syndrome de Claude Bernard Horner accompagnant les formes cervicales. Le diagnostic de neuroblastome repose sur une très fréquente élévation des taux de catécholamines urinaires, une hyperfixation de la tumeur et des localisations métastatiques en scintigraphie à la méta-iodo-benzyl-guanidine (MIBG) marquée à l'iode 123, et l'analyse histologique d'une pièce d'exérèse ou d'une biopsie tumorale.

Sur le plan histologique, les neuroblastomes font partie des tumeurs à petites cellules rondes de l'enfant, d'aspect assez caractéristique, regroupées autour d'un centre occupé par

les prolongements cytoplasmiques (rosettes d'Homer-Wright). Le groupe des tumeurs neuroblastiques périphériques incluent donc les neuroblastomes, les ganglioneuroblastomes et les ganglioneuromes. L'analyse en immunohistochimie permet de différencier les neuroblastomes des autres tumeurs de blastème par le marquage des anticorps monoclonaux anti-neurofilaments, synaptophysine, Neurone-Specific Enolase (NSE), et éventuellement anti-GD2.



**Figure 9 : Aspects anatomopathologiques d'un neuroblastome** (grossissement X 400). **A.** Petites cellules rondes à cytoplasme peu abondant, noyau dense, arrondi ou polygonal (aspect « lymphocytoïde »). **B.** Regroupement de cellules autour d'un centre occupé par les prolongements cytoplasmiques (rosettes d'Homer-Wright)

### III.C. Facteurs pronostiques principaux et classifications

Les neuroblastomes sont caractérisés par une grande hétérogénéité clinique, avec des évolutions très variables allant de la maturation cellulaire pouvant conduire à une régression spontanée, jusqu'à une progression tumorale non contrôlable en dépit d'une polychimiothérapie. Cette hétérogénéité clinique a conduit à rechercher depuis de nombreuses années des facteurs pronostiques qui permettraient d'identifier différents groupes de risque et adapter au mieux les traitements (Maris 2005, Brodeur 2003).

Les deux facteurs cliniques pronostiques les plus importants sont l'âge au diagnostic et le stade de la maladie. Le pronostic est nettement meilleur chez les enfants âgés de moins de 18 mois (London 2005).

Le stade de la maladie au diagnostic a également été redéfini, par l'International Neuroblastoma Risk Group Classification (INRG) qui distingue maintenant les stades L1 et L2 (tumeurs localisées avec ou sans possibilité de chirurgie première selon des critères d'imagerie) des stades métastatiques (M ou MS) (Cohn 2009, Monclair 2009). Le pronostic des stades L1 et L2 est intermédiaire. Le stade « spécial » MS, correspond à l'ancien stade 4s, regroupant les tumeurs du nourrisson avec des métastases diffuses hépatiques, cutanées et/ou médullaires, mais sans atteinte osseuse, et est associé à un pronostic favorable (Schleiermacher 2003). Le stade M reste de mauvais pronostic.

Outre ces facteurs cliniques, et certains facteurs anatomopathologiques comme le degré de différenciation tumoral, de multiples marqueurs biologiques et biochimiques ont été identifiés comme facteurs pronostiques du neuroblastome (Castleberry 1997, Brodeur 1997). Parmi eux, une élévation sérique de LDH, de neurone-specific enolase (NSE), ou de la ferritine est associée à un mauvais pronostic. Le profil de sécrétion urinaire des catécholamines donne des informations pronostiques complémentaires, avec une association entre mauvais pronostic et taux de dopamine élevé ou rapport HVA/VMA élevé (Schleiermacher 1996).

L'essor de la génétique a permis de mieux comprendre l'oncogénèse des neuroblastomes et d'apporter des éléments pronostiques. Un grand nombre d'altérations génétiques somatiques récurrentes portant sur des gains ou des pertes de matériel chromosomique ont été décrites. Ces altérations peuvent porter sur le nombre de chromosomes entiers, avec

hyperdiploïdie ou pseudotriploïdie, qui sont fréquentes chez les enfants de moins d'un an et dans les tumeurs localisées (Look 1991, Kaneko 2000). De telles anomalies sont associées à un bon pronostic. En revanche, une di- ou tétraploïdie, observée plus fréquemment dans les stades avancés, est associée à un mauvais pronostic. D'autres altérations chromosomiques, de type structural, ont également été décrites et sont bien résumées dans une revue récente de Normand *et al.* (Normand 2011). Celles-ci concernent surtout des gains ou des pertes de segments de chromosomes, en rapport avec des translocations chromosomiques déséquilibrées. L'anomalie structurale chromosomique la plus fréquente, associée à un mauvais pronostic, est le gain du bras long du chromosome 17, observé dans 50 % des cas. Les régions chromosomiques perdues concernent le plus fréquemment les chromosomes 1p, 3p, 4p et 11q, et sont associées à un pronostic défavorable. Il existe également des délétions plus grandes, qui sont quant à elles associées à une amplification de *MYCN*. L'amplification génomique de l'oncogène *MYCN*, situé dans la bande 2p24, est observée dans 20 à 25 % des cas de neuroblastome et son rôle dans l'oncogenèse n'est pas encore élucidé. Une amplification de *MYCN* est associée à un pronostic très sombre, et quel que soit leur stade clinique, ces tumeurs présentent les caractéristiques d'une très grande agressivité (Normand 2011). Cette amplification est un facteur pronostique important, et ce paramètre, évalué au diagnostic, est pris en compte dans le choix du traitement, notamment chez des nourrissons âgés de moins d'un an. Dans cette tranche d'âge, si la survie sans récurrence est de 93 % en absence d'amplification de *MYCN*, elle s'effondre à 10 % en présence d'amplification. L'amplification de *MYCN* est actuellement recherchée dans toutes les tumeurs neuroblastiques au diagnostic.

La meilleure connaissance de ces différents facteurs pronostiques ont conduit à proposer la classification INRG (Tableau 4).

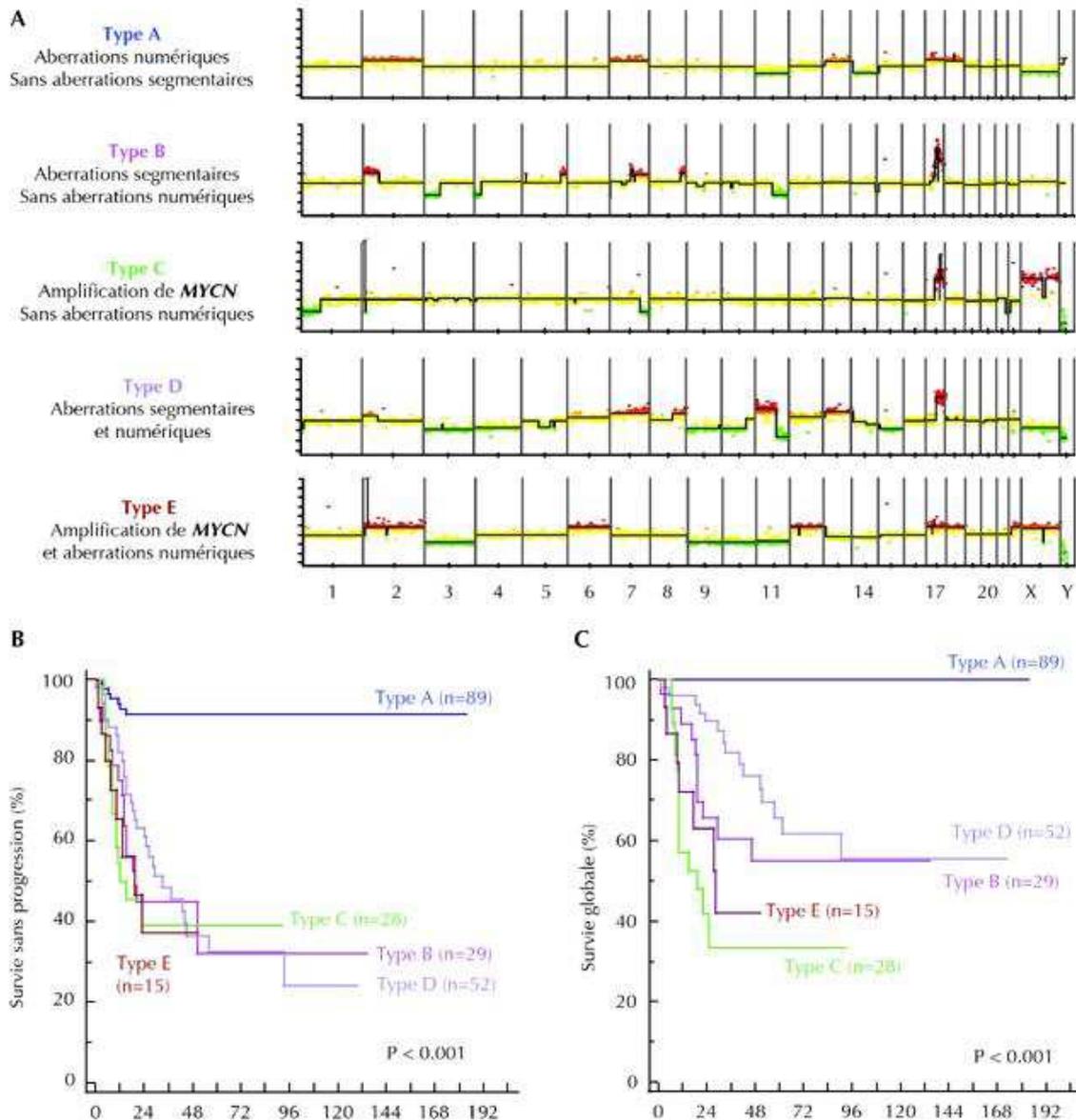
**Tableau 4 : Schéma de consensus de la classification de l'International Neuroblastoma Risk Group (INRG), d'après Cohn *et al.* (Cohn 2009).**

Stade INRG	Âge (mois)	Histologie	Grade de différenciation de la tumeur	MYCN	Altération de 11q	Ploïdie	Groupe de risque avant traitement
L1/L2		GN mature GNB "intermixed"					A Très bas
L1		tous sauf GN mature ou GNB "intermixed"		NA			B Très bas
				Amp			K haut
L2	< 18	tous sauf GN mature ou GNB "intermixed"		NA	Non		D Bas
					Oui		G Intermédiaire
	> 18		Différencié	NA	Non		E Bas
					Oui		
		GNB Nodulaire ; NB	Peu différencié ou indifférencié	NA			H Intermédiaire
				A			N Haut
M	< 18			NA		Hyperdiploïde	F Bas
	< 12			NA		Diploïde	I Intermédiaire
	12 à < 18			NA		Diploïde	J Intermédiaire
	< 18			Amp			O Haut
	≥ 18						P Haut
MS				NA	Non		C Très bas
	< 18				Oui		Q Haut
				Amp			R Haut

GN : ganglioneurome ; GNB : Ganglioneuroblastome ; NB : Neuroblastome; NA : Non amplifié

D'autres altérations somatiques peuvent concerner le gène *ALK*, qui se situe également sur le chromosome 2p et qui code pour une protéine de la famille des tyrosines-kinases. Des mutations activatrices de ce gène ont récemment pu être mises en évidence, impliquant ce gène directement dans l'oncogenèse des neuroblastomes (Wang 2013). Ces altérations, retrouvées dans environ 8 % des cas de NB, pourraient constituer une cible thérapeutique potentielle (Barone 2013). Actuellement, les analyses tumorales génomiques à haut débit en CGH-array sont devenues indispensables dès le diagnostic, pour guider la prise en charge thérapeutique, en permettant de déterminer le groupe de risque dans lequel le patient doit

être traité. Une illustration des différents profils génomiques tumoraux ainsi que leur impact sur la survie des patients est proposée ci-dessous (Figure 10).



**Figure 10 : Les différents profils génomiques tumoraux de neuroblastome** déterminés en CGH-array sur 493 échantillons tumoraux de neuroblastome (A) et leur impact sur la survie sans évènement (B) et sur la survie globale (C) (d'après Janoueix-Lerosey *et al.*, 2009).

### III.D. Les traitements des neuroblastomes

#### III.D.1. L'attitude « Wait and see »

Il a été rapporté de nombreux cas de régression tumorale spontanée chez des enfants de moins de un an porteurs d'un neuroblastome de stade 4S selon la classification de l'International Neuroblastoma Staging System (INSS) (Tableau 5). Ainsi les patients asymptomatiques et dont la tumeur ne présente pas de marqueurs pronostiques défavorables peuvent-ils être uniquement surveillés.

**Tableau 5 : Classification de l'International Neuroblastoma Staging System (INSS)**

<b>Stade 1</b>	Tumeur localisée et résection macroscopiquement complète ; ganglions lymphatiques homolatéraux indemnes en cas de résidu microscopique.
<b>Stade 2A</b>	Tumeur localisée et résection macroscopiquement incomplète ; ganglions lymphatiques homolatéraux indemnes.
<b>Stade 2B</b>	Tumeur localisée et résection complète ou non, et ganglions lymphatiques homolatéraux envahis. Absence d'envahissement des ganglions controlatéraux.
<b>Stade 3</b>	Tumeur unilatérale inopérable traversant la ligne médiane avec ou sans envahissement ganglionnaire ; ou tumeur localisée unilatérale avec envahissement ganglionnaire controlatéral ; ou tumeur médiane avec extension bilatérale sous forme d'infiltration non extirpable ou de ganglions
<b>Stade 4</b>	Dissémination métastatique ganglionnaire, osseuse, médullaire, hépatique ou autre (à l'exception des conditions définies dans le stade 4S)
<b>Stade 4S</b>	Tumeur primitive localisée (stade 1, 2A, ou 2B) avec dissémination métastatique limitée à la peau le foie et/ou la moelle osseuse, chez les enfants de moins de un an

#### III.D.2. La chirurgie

L'exérèse chirurgicale reste une des pierres angulaires du traitement des neuroblastomes. Le geste chirurgical a pour but de confirmer le diagnostic, d'obtenir des prélèvements tumoraux pour permettre la classification histologique et moléculaire, et de réséquer la

tumeur avec un minimum de morbidité. La chirurgie première peut être le traitement de choix d'une tumeur localisée, en cas d'absence de facteurs de risque chirurgicaux. Dans tous les autres cas, la chirurgie, si elle est effectuée, devra faire suite à une chimiothérapie.

### III.D.3. La chimiothérapie cytotoxique

Compte-tenu de la proportion élevée de patients ayant une maladie métastatique (environ 50%) ou avec envahissement locorégional important, la chimiothérapie cytotoxique occupe un rôle important pour le traitement des neuroblastomes. Les agents alkylants (cyclophosphamide, ifosfamide, busulfan, melphalan), les sels de platine (cisplatine, carboplatine), les vinca-alcaloïdes (vincristine), les épipodophylotoxines (VP-16, VM-26) et les anthracyclines (doxorubicine) ont montré une efficacité depuis longtemps et sont considérés comme des traitements standards, dont les combinaisons utilisées dépendent du groupe de risque. Dans les dix dernières années, des essais cliniques avec le topotecan, l'irinotecan et le témozolomide ont également montré des réponses tumorales (Bagatell 2011, Di Giannatale 2013).

Les patients traités pour un neuroblastome de haut risque (patients de plus de un an et de stade 4 de la classification INSS, ou stades 2, 3 et 4 avec amplification de *MYCN*) reçoivent un traitement intensif comprenant notamment une chimiothérapie à haute dose, myéloablatrice, avec support de cellules souches hématopoïétiques autologues, dont l'intérêt en terme d'amélioration de la survie a été démontré dans une récente revue exhaustive (Yalçin 2013). L'association du busulfan au melphalan a d'ailleurs montré récemment sa supériorité par rapport à l'association Melphalan, carboplatine, étoposide (Ladenstein 2011).

#### III.D.4. La radiothérapie externe et la radiothérapie métabolique

Les neuroblastomes sont des tumeurs radiosensibles, et les doses efficaces sont comprises entre 15 et 32 Gy, en fonction du site, du volume tumoral et de l'âge du patient. La radiothérapie externe est réservée aux formes de haut risque, et est administrée sur le site tumoral primitif pour en garantir le contrôle local, seule ou en complément de l'exérèse chirurgicale.

Un autre moyen d'irradier ces tumeurs consiste à effectuer une irradiation métabolique en administrant par voie veineuse au patient de la MIBG marquée à l'iode 131 (<sup>131</sup>I-MIBG), ce qui permet d'obtenir une irradiation de toutes les localisations tumorales fixant la MIBG, présentant ainsi l'avantage de traiter les formes métastatiques. Un essai de phase II (MITOP) est actuellement en cours en France ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)).

#### III.D.5. Le traitement d'entretien

La majorité des patients, y compris ceux ayant des formes de haut risque tel que précédemment décrit, répondent au traitement d'induction par chimiothérapie, mais il est fréquent de constater une récurrence de la maladie, locale et/ou métastatique, attribuée à la maladie résiduelle. Cette constatation a conduit à proposer un traitement d'entretien fondé sur l'utilisation d'agents induisant la différenciation comme l'acide cis-rétinoïque, et/ou sur une immunothérapie utilisant des anticorps monoclonaux anti-GD2, un antigène glycolipidique présent à la surface des neuroblastes. Ces deux modalités de traitement d'entretien ont montré leur efficacité en améliorant significativement la survie des patients (Matthay 1999, Gilman 2009).

### III.D.6. Les nouvelles molécules

Parallèlement à la poursuite d'essais cliniques étudiant des associations de molécules cytotoxiques classique, la meilleure connaissance de l'importance notamment de *MYCN* et de *ALK* conduisent actuellement au développement de stratégies ciblant ces 2 gènes ou leur signalisation. Compte-tenu de l'importance de l'amplification de *MYCN* tant sur le plan de la pathogénèse des neuroblastomes que du pronostic clinique, le blocage de la voie de signalisation de *MYCN* est une approche pertinente pour le développement de nouveaux traitements. Il n'existe toutefois aucun inhibiteur direct disponible actuellement. Les stratégies utilisant des RNAi ont démontré une activité intéressante *in vitro*, mais sont confrontées à des difficultés de délivrance du médicament *in vivo*. L'Aurora kinase A, dont l'expression est un facteur pronostique négatif dans le neuroblastome représente également une cible thérapeutique pertinente car joue un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire et contribue à la stabilisation de la phosphorylation de *MYCN*. Des projets d'utilisation d'inhibiteurs de l'Aurora kinase A sont en préparation.

Par ailleurs, l'inhibition pharmacologique de *ALK* pourrait représenter une nouvelle approche prometteuse pour le traitement des neuroblastomes (Barone 2013). L'efficacité de deux nouveaux inhibiteurs de *ALK*, NVP-TAE684 et PF-02341066, a été démontrée *in vitro* dans des études menées sur des lignées cellulaires de neuroblastome ayant une mutation de *ALK* (Janoueix-Lerosey 2008, George 2008). Ces résultats ont guidé la réalisation d'essais cliniques avec le crizotinib, inhibiteur de *ALK*, et les premières données suggèrent une efficacité dans les neuroblastomes ayant une mutation de *ALK*. Une étude de phase II avec le crizotinib, portée par l'Institut National du Cancer et promu par UNICANCER, garantissant un

accès sécurisé à cette molécule, vient d'être débutée, et les enfants atteints d'un neuroblastome avec mutation de *ALK* peuvent y être inclus (Programme AcSé Crizotinib).

#### **III.D.7. Les antiangiogéniques pour le traitement des neuroblastomes**

Différents mécanismes d'angiogénèse ont été décrits dans les neuroblastomes. L'amplification de l'oncogène *MYCN*, fréquente dans les neuroblastomes de haut risque, s'accompagne d'une augmentation de l'index vasculaire de ces tumeurs. L'hypothèse d'une régulation de certains aspects de l'angiogénèse par *MYCN* n'a pas été vérifiée. Cependant Fotsis et al ont montré que le comportement agressif des tumeurs amplifiant *MYCN* était lié en partie à une diminution de l'expression de certains inhibiteurs de l'angiogénèse (Fotsis, 1999). Il a notamment été démontré que l'un de ces inhibiteurs, l'activine A, était capable de réprimer la croissance tumorale des neuroblastomes ainsi que la prolifération des cellules endothéliales et donc l'angiogénèse *in vitro* et *in vivo* (Breit, 2000).

Ainsi est-il logique d'envisager des traitements antiangiogéniques dans les neuroblastomes. Un essai clinique de phase II étudiant l'intérêt de l'adjonction du bevacizumab à l'association témozolomide-irinotecan est actuellement en cours ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)).

#### **IV. LES INTEGRINES ET LE CILENGITIDE**

Le cilengitide (EMD121974 ; Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne) est un pentapeptide cyclisé, inhibiteur sélectif des intégrines  $\alpha v\beta 3$  et  $\alpha v\beta 5$ , présentant une activité antitumorale directe par décollement des cellules tumorales, ainsi qu'une activité antiangiogénique.

L'angiogenèse est le processus de formation de nouveaux vaisseaux sanguins (néovascularisation) à partir de vaisseaux préexistants. Il intervient au cours de nombreux processus physiologiques tels que le développement embryonnaire et l'implantation du placenta mais également dans certaines pathologies et principalement le cancer. L'angiogenèse est alors induite par les cellules cancéreuses elles mêmes, par la sécrétion de différents facteurs tel que le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), et va permettre l'irrigation et donc la croissance de la tumeur, mais surtout la dissémination des cellules cancéreuses via la circulation sanguine et la formation de métastases. Compte tenu de ce rôle prépondérant de l'angiogenèse dans la croissance tumorale, de nombreux agents anticancéreux ont été développés pour cibler celle-ci. Les molécules antiangiogéniques dont le développement est actuellement le plus avancé, inhibent la formation de néovaisseaux en ciblant le VEGF comme le bévacizumab et le VEGF-trap ou son récepteur (VEGF-R) comme le sorafenib et le sunitinib. Il est également possible d'utiliser des agents ciblant les facteurs de survie des cellules endothéliales (Interféron, thalidomide). L'efficacité des nouvelles molécules antiangiogéniques est déjà reconnue dans le traitement de certains cancers métastatiques, en particulier les cancers du rein (Pouessel 2007) et pourrait présenter un effet synergique en association à la radiothérapie (Lartigau 2007). Toutefois, l'activité antitumorale propre des antiangiogéniques est souvent limitée. En effet, des manifestations de résistance sont possibles et, dans certaines conditions, stimuleraient paradoxalement le

potentiel invasif des tumeurs (Ebos 2009, Paez-Ribes2009). Il apparaît ainsi nécessaire de rechercher des nouvelles molécules ayant à la fois une activité antiangiogénique intervenant sur la vascularisation tumorale mais également un effet cytotoxique direct sur les cellules tumorales. Parmi les stratégies émergentes, le ciblage des interactions entre la matrice extracellulaire et les cellules tumorales apparaît pertinent.

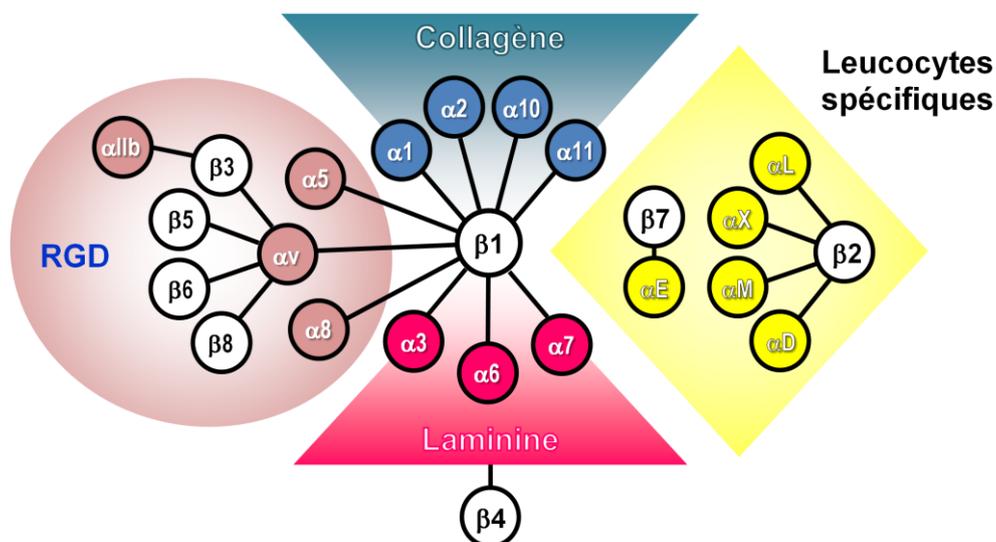
#### **IV.A. La matrice extracellulaire**

Le microenvironnement tumoral se révèle aujourd'hui essentiel aux différentes étapes de la cancérogenèse que sont l'angiogenèse, l'invasion et la dissémination métastatique. La matrice extracellulaire (MEC) est un ensemble structuré de composants macromoléculaires sécrétés par les cellules dans leur environnement immédiat. Sa composition, variée et spécifique, diffère souvent entre tissu sain et tissu cancéreux et compte diverses substances telles que la fibronectine et le collagène. La nature des interactions entre les cellules et cette matrice peut conditionner le développement de la tumeur. En effet, étant une barrière naturelle englobant les cellules tumorales, la MEC, de part son remodelage, participe à l'angiogenèse mais également à l'invasion du stroma par les cellules cancéreuses, étape clé du processus métastatique. Au-delà de ce rôle local déterminant dans la progression tumorale, la MEC module également la croissance des foyers métastatiques. Les molécules d'adhésion régissent les interactions cellules-cellules et aussi cellules-matrice et sont très impliquées dans la cancérogenèse, c'est pourquoi elles représentent des cibles intéressantes en oncologie. Il existe plusieurs types de molécules d'adhésion comme les cadhérines, les CAM et les intégrines qui, elles, permettent les interactions hétérotypiques cellules-matrice.

## IV.B. Les intégrines

### IV.B.1. Structure

Les intégrines sont des hétérodimères composés d'une sous-unité  $\alpha$  et d'une sous-unité  $\beta$  liées de manière non covalente. La partie transmembranaire des intégrines en forme d'hélice est très courte. La partie cytoplasmique est dépourvue d'activité catalytique. Elle sert au recrutement de nombreuses protéines adaptatrices qui vont, soit agir sur le cytosquelette, soit permettre la transduction d'une signalisation intracellulaire après fixation du ligand. Dix-huit chaînes  $\alpha$  et huit chaînes  $\beta$  ont été décrites chez l'homme. L'association des deux sous-unités détermine la spécificité de l'intégrine pour son ligand. Elles peuvent se combiner en 24 hétérodimères différents et peuvent être classées en différents groupes selon la spécificité de leur ligand : les intégrines à laminine, les intégrines à collagène, les intégrines leucocytaires et les intégrines reconnaissant les motifs RGD (séquence arginine-glycine-acide aspartique) (figure 11) (Takada 2007, Hynes 2002).



**Figure 11 : Les différentes familles d'intégrines.** Certaines intégrines présentant une sous-unité  $\beta 2$  sont majoritairement d'expression leucocytaire et ont des fonctions immunitaires, d'autres jouent un rôle dans l'agrégation plaquettaire ( $\alpha 1b\beta 3$ ) ou peuvent avoir des liaisons hétérophiles avec des molécules d'adhésion comme les CAM et les cadhérines ( $\alpha E\beta 7, \alpha 4\beta 7$ ). Certaines intégrines ( $\alpha 6\beta 1$ ,

$\alpha6\beta4$ ) se lie avec la MEC via leurs substrats spécifiques comme la laminine. Enfin, les intégrines  $\alpha\beta3$  et  $\alpha\beta5$  se lient spécifiquement à la séquence peptidique RGD (adapté de Hynes *et al.*, 2002).

#### IV.B.2. Rôle physiologique

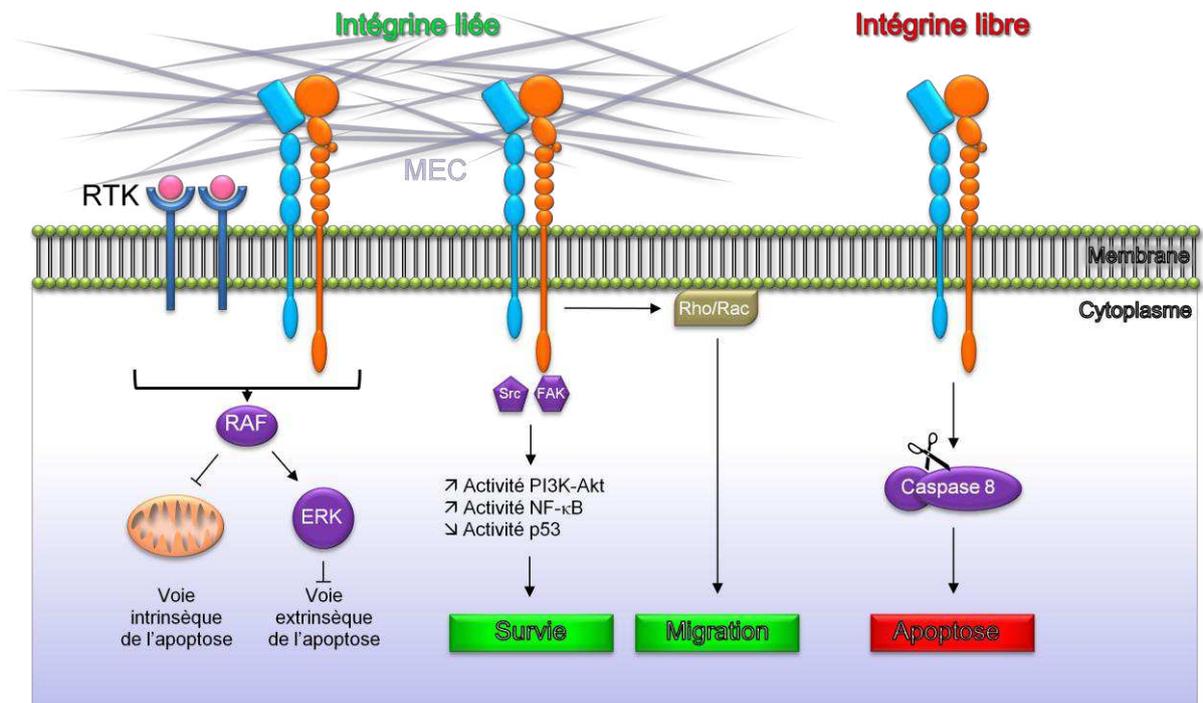
Des études menées par invalidation génique des différentes intégrines ont montré leur implication dans de nombreux processus tels que le développement embryonnaire, l'agrégation plaquettaire, l'inflammation, la vascularisation et la prolifération cellulaire (Hynes 2002). Les dimères d'intégrines ont un rôle mécanique dans la cohésion tissulaire. Les intégrines assurent notamment :

- une fonction d'ancrage des cellules à la MEC en créant localement une large plateforme protéique appelée plaque d'adhésion focale (Huveneers 2007) ;
- la migration des cellules par leur action sur le cytosquelette. Par l'intermédiaire d'une petite protéine G appelée Rac, elles vont contrôler la polymérisation des filaments d'actine et la formation de lamellipode à l'avant de la cellule. Elles contrôlent également la contractilité cellulaire via une autre protéine G appelée Rho, qui contrôle l'assemblage et la contraction des fibres d'actomyosine pour permettre à la cellule de s'épandre puis de se rétracter lors de sa migration. L'activation de ces deux protéines G est Src dépendante (Guarino 2010) ;
- des modifications du cytosquelette menant à des changements de conformation de la membrane nucléaire et de la chromatine modifiant ainsi l'expression de certains gènes (Huveneers 2007) ;
- la transduction d'un signal intracellulaire, au niveau des plaques focales d'adhésion puisque les intégrines peuvent recruter des adaptateurs et activer différentes voies de

signalisation intracellulaire de survie. Elles peuvent également former des complexes avec d'autres récepteurs membranaires, principalement à activité tyrosine kinase, pour amplifier leur signal (Huveneers 2007).

#### **IV.B.3. Voies majeures de signalisation**

Après interaction avec leurs ligands, les intégrines, dépourvues d'activité catalytique, recrutent des protéines adaptatrices à activité tyrosine kinase comme FAK et Src. Lorsque FAK est activée par phosphorylation, elle s'associe avec Src. Puis, via une cascade de phosphorylation, FAK et Src activées recrutent des partenaires cytoplasmiques impliqués dans différentes voies de survie cellulaire comme celles des MAP kinases, NFκB et PI3Kinase-Akt (Desgrosellier 2010). Les intégrines activent aussi de petites protéines de la famille des protéines G, comme Rho et Rac, qui agissent sur le cytosquelette (Huveneers 2007). Elles peuvent également induire la mort cellulaire (Integrins Mediated Death [IMD]) en activant directement la caspase 8 (figure 12) (Desgrosellier 2010).



**Figure 12 : Représentation schématique des différentes voies de signalisation des intégrines.** Lorsque l'intégrine est liée à son substrat, elle est capable d'activer, via ses adaptateurs Src et FAK, des voies de survie comme PI3K-Akt et NF- $\kappa$ B et/ou de promouvoir la migration cellulaire via Rho/Rac. Elle peut également former des complexes avec des récepteurs à tyrosine kinase (RTK) et amplifier leur signal menant à une inhibition de l'apoptose. Par contre, lorsque les intégrines ne sont pas liées à leurs ligands, elles sont capables d'induire la mort cellulaire en activant directement la caspase 8. (Adapté de Desgrosellier *et al.*, 2009) [Desgrosellier Nat Med].

#### IV.B.4. Rôle dans la cancérogenèse

Il existe plusieurs intégrines ( $\alpha\beta5$ ,  $\alpha\beta3$ ,  $\alpha5\beta1$ ,  $\alpha6\beta4$ ,  $\alpha4\beta1$ ,  $\alpha\nu\beta6$ ) dont l'expression a été corrélée avec la progression tumorale (Huveneers 2007, Robert 2013). D'un point de vue historique, les intégrines  $\alpha\beta3$  et  $\alpha\beta5$  ont été les premières identifiées comme impliquées dans l'angiogenèse. Elles sont fortement exprimées dans les néovaisseaux tumoraux. Les travaux de Brooks et de Friedlander ont mis en évidence le rôle fondamental de ces deux intégrines dans l'angiogenèse tumorale *in vivo*, liant chacune d'elles à des voies distinctes d'induction de l'angiogenèse. Ainsi, les processus angiogéniques induits par le basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) et le Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) se révèlent-ils liés à

l'intégrine  $\alpha\beta3$ , alors que ceux initiés par le VEGF, dépendraient de l'intégrine  $\alpha\beta5$  (Brooks 1994, Friedlander 1995, Friedlander 1996).

Dans les gliomes de haut grade (HGG),  $\alpha\beta5$ ,  $\alpha\beta3$  et  $\alpha5\beta1$  sont surexprimées et particulièrement impliquées dans l'angiogenèse et la progression tumorale. L'intégrine  $\alpha\beta3$  est surexprimée dans les cellules de HGG mais également dans les cellules endothéliales engagées dans le processus angiogénique (Bellail 2004, Gladson 1995). De façon intéressante elle n'est pas retrouvée dans le tissu cérébral sain. Elle joue vraisemblablement un rôle important dans le caractère invasif de ces tumeurs puisqu'elle est particulièrement exprimée au niveau du front d'invasion tumoral (Gladson 1995). De plus, le contact avec son ligand, va entraîner le recrutement local de protéases qui vont digérer la matrice extracellulaire et faciliter l'invasion (Desgrosellier 2009). L'intégrine  $\alpha\beta3$  permettrait également à la tumeur d'acquérir un phénotype métastatique. En effet, dans le cancer du sein et dans le cancer du pancréas, son expression est surtout retrouvée au niveau des ganglions lymphatiques de drainage tumoral laissant supposer une relation entre expression de l' $\alpha\beta3$  et phénotype migratoire (Desgrosellier 2009).

Au delà de ces rôles mécaniques dans la progression tumorale, l'intégrine  $\alpha\beta3$  va activer des voies de signalisation de survie et de prolifération cellulaire. La liaison d' $\alpha\beta3$  à son substrat entraîne l'activation des voies MAPK et PI3Kinase-Akt, voies de survie et de prolifération connues (Oliveira-Ferrer 2008, Mikkelsen 2009). Cependant, il a également été décrit dans certaines lignées de cancer du pancréas qu' $\alpha\beta3$  permettrait aux cellules de survivre indépendamment de l'ancrage. Dans ces modèles, Src serait alors recrutée par le domaine intracytoplasmique de l'intégrine et déclencherait une cascade de phosphorylation à l'origine de la transduction d'un signal antiapoptotique (Desgrosellier 2009).

Enfin,  $\alpha\beta3$  et  $\alpha\beta5$ , interagissant respectivement avec le Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR) et le Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (VEGFR 2), amplifieraient leur signal proangiogénique (Desgrosellier 2009).

Les intégrines  $\alpha\beta3$  et  $\alpha\beta5$  représentent donc des cibles thérapeutiques intéressantes dans le traitement des gliomes de haut grade de part leurs effets proangiogénique et de stimulation de la croissance tumorale.

## IV.C. Le Cilengitide

### IV.C.1. Mécanisme d'action

Les intégrines  $\alpha\beta3$  et  $\alpha\beta5$  ont pour ligand les protéines de la MEC contenant un motif peptidique spécifique nommé RGD pour Arginine-Glycine-Acide Aspartique. Le cilengitide (EMD121974 ; Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne) est un pentapeptide cyclisé contenant cette séquence RGD (Figure 13). Sa formule chimique est  $C_{27}H_{40}N_8O_7$  et son poids moléculaire est de 588,67 g/mol.

Il agit donc comme antagoniste sélectif de haute affinité pour les intégrines  $\alpha\beta3$  et  $\alpha\beta5$  inhibant ainsi leurs diverses implications dans la tumorigenèse (Dechantsreiter 1999). Ainsi, une activité antiangiogénique du cilengitide, liée à l'inhibition de ces intégrines, a t'elle été démontrée *in vitro* (Nisato 2003). Parallèlement, en empêchant la liaison des intégrines avec la MEC, le cilengitide provoque aussi bien le détachement des cellules endothéliales que des cellules tumorales, une désorganisation de leur cytosquelette et des leurs jonctions serrées et également une induction de l'apoptose dans ces cellules (Oliveira-Ferrer 2008). Ainsi, le cilengitide inhibe t'il non seulement les fonctions d'ancrage des intégrines, mais aussi les voies de signalisation qui leur sont associées, empêchant ainsi la phosphorylation de FAK, de Src et de Akt.

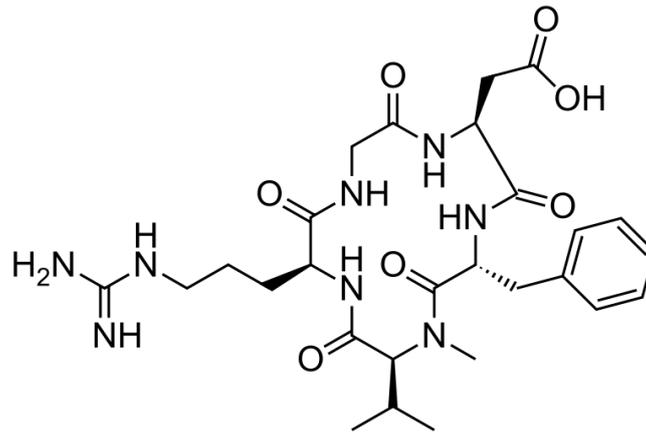


Figure 13 : Formule moléculaire du cilengitide (EMD121974 ; Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne)

#### IV.C.2. Études *in vitro*

Dans des modèles cellulaires de médulloblastome et de glioblastome mais aussi de cellules endothéliales issues de capillaires cérébraux, il a été montré que le cilengitide inhibe la croissance cellulaire par induction de l'apoptose suite à la perte des interactions entre les cellules, endothéliales et tumorales, et les protéines de la MEC substrats des intégrines  $\alpha\beta3$  et  $\alpha\beta5$  que sont la vitronectine et la ténascine (Taga 2002). Il semblerait toutefois que le niveau d'expression de ces intégrines ne soit pas corrélé au taux de détachement des cellules gliales après traitement (Maurer 2009). Des travaux plus récents sur un modèle de cellules humaines CD133+ différenciées en cellules endothéliales ont montré que le cilengitide inhibe, de manière dose-dépendante, la prolifération et la différenciation des cellules endothéliales progénitrices (EPC) (Loges 2007). Ainsi le cilengitide bloquerait-il la néoangiogenèse en inhibant l'incorporation des cellules progénitrices dérivées de la moelle osseuse dans les néovaisseaux. En outre, dans ce même modèle, le cilengitide ne présente aucun effet apoptotique direct, suggérant que, alors que la prolifération et la différenciation finale des EPC dépendent des voies de signalisation activées par le VEGF et les intégrines, la

signalisation par le VEGF seule est suffisante pour prévenir l'apoptose des EPC et des cellules endothéliales.

#### IV.C.3. Études *in vivo*

Seul ou combiné à la chimiothérapie cytotoxique classique ou aux radiations ionisantes, l'effet antitumoral et antiangiogénique du cilengitide a été démontré *in vivo* et sur plusieurs types tumoraux. La plupart des études précliniques disponibles concernent les tumeurs malignes cérébrales, notamment les glioblastomes qui sont richement vascularisés et surexpriment les intégrines  $\alpha\beta3$  et  $\alpha\beta5$  (Chatterjee 2000). Sur des modèles de xénogreffes stéréotaxiques de cellules de HGG (U-87 MG) dans la région du putamen de souris nude, le cilengitide bloque de manière dose-dépendante l'apparition de néovaisseaux sanguins et inhibe ainsi la croissance tumorale des glioblastomes (Taga 2002, Yamada 2006). Cet effet a été confirmé sur des xénogreffes orthotopiques de cellules de médulloblastome (DAOY) (MacDonald 2001). En effet, les souris du groupe contrôle greffées en orthotopique et traitées par un peptide inactif meurent de progression tumorale après quatre à six semaines, tandis que les souris traitées quotidiennement par le cilengitide survivent au-delà de 16 semaines sans tumeur mesurable. De façon intéressante, le cilengitide s'avère sans effet sur les tumeurs des souris greffées de manière hétérotopique en sous-cutané. Ainsi, il existerait une susceptibilité particulière du tissu cérébral soulignant l'importance de l'environnement pour l'inhibition de la croissance tumorale par le cilengitide, faisant de celui-ci un candidat de choix pour le traitement des tumeurs cérébrales. De plus, l'association du cilengitide avec le témozolomide (agent alkylant) apparaît synergique *in vitro* et *in vivo*. Cet effet serait dû à une « normalisation » de la vascularisation induite par le cilengitide permettant ainsi une

meilleure délivrance du témozolomide in situ. Cette synergie ouvre des perspectives intéressantes pour le traitement des glioblastomes (Oliveira-Ferrer 2008, Maurer 2009). Par ailleurs, il est maintenant connu que les radiations ionisantes ont un effet antiangiogénique propre (Lartigau 2007). Cependant, il peut exister un effet réactionnel au sein de la tumeur protégeant sa propre vascularisation par la libération importante de facteurs proangiogéniques comme le VEGF. Ces phénomènes conduisent alors à une limitation de l'effet recherché sur la vascularisation tumorale, et à une diminution de l'effet antitumoral. En ce sens, il a été démontré que les radiations ionisantes provoquaient une augmentation de l'expression de l'intégrine  $\alpha\beta3$  au sein des cellules endothéliales, aboutissant à une phosphorylation accrue d'Akt, voie connue de radiorésistance. Cette phosphorylation d'Akt induite par les radiations ionisantes est fortement inhibée en présence d'un antagoniste peptidique Arginine-Glycine-Glutamine de l'intégrine  $\alpha\beta3$  (Abdollahi 2005). Ainsi, la radiosensibilité des cellules endothéliales est-elle augmentée par l'administration concomitante d'un inhibiteur de l'intégrine  $\alpha\beta3$ , du fait d'un effet antiangiogénique majoré. Ce mécanisme, démontré dans des modèles de xénogreffes hétérotopique et orthotopique de glioblastome (Mikkelsen 2009), a été confirmé sur d'autres modèles cellulaires dont le cancer du poumon non à petites cellules (Albert 2006). Des expériences similaires ont été également effectuées sur des modèles de cancer du sein, en comparant les effets du cilengitide, seul ou concomitant à une radio-immunothérapie. Dans ce cas, le cilengitide seul n'altère pas la croissance tumorale (Burke 2002) alors qu'il potentialise les effets de la radiothérapie en augmentant l'apoptose des cellules tumorales et des cellules endothéliales, conduisant à une réduction du volume tumoral.

#### IV.C.4. Développement clinique du cilengitide

##### *IV.C.4.a. Essais cliniques de phase I*

Les résultats obtenus sur les modèles précliniques ont rapidement conduit à un essai clinique de phase I chez des adultes porteurs d'une tumeur solide réfractaire. Au cours de cette étude, la tolérance au cilengitide s'est révélée bonne puisque aucune toxicité limitant la dose n'a été constatée (Eskens 2003). Un autre essai de phase I plus récent faisait état de toxicités de grade 1 ou 2, avec fatigue (32 %), nausées (16 %), céphalées (8 %) et n'ayant pas nécessité d'adaptation des doses (Hariharan 2007). Cet essai montre un profil pharmacocinétique du cilengitide dose-dépendant et une demi-vie de la molécule de 4 heures. Une autre étude de phase I, cette fois-ci menée chez des patients adultes porteurs d'un glioblastome réfractaire, utilisait une méthodologie d'escalade de dose, avec administration bi-hebdomadaire de cilengitide par voie intraveineuse sur une heure avec des doses allant de 120 à 2400 mg/m<sup>2</sup> par injection (Nabors 2007). Le produit se révèle parfaitement toléré lors des injections. Les toxicités observées lors de cette étude étaient les suivantes : une thrombose veineuse (120 mg/m<sup>2</sup>), un épisode de douleurs musculaires et articulaires de grade 4 (480 mg/m<sup>2</sup>), une thrombopénie de grade 3 (600 mg/m<sup>2</sup>), et une anorexie avec hypoglycémie, hypokaliémie et hyponatrémie de grade 3. La dose maximale tolérée n'avait pas alors pu être déterminée par cet essai. Sur les 51 patients inclus, on notait deux réponses complètes (un astrocytome anaplasique et un glioblastome). Les patients avaient volontairement arrêté leur traitement après 24 et 12 mois, et étaient toujours en rémission complète après respectivement 29 et 15 mois d'arrêt de traitement. On notait également trois réponses partielles d'une durée médiane de 9,3 mois. Compte-

tenu de la faible toxicité du cilengitide, aucune dose n'a pu être véritablement recommandée pour les essais de phase II.

#### ***IV.C.4.b. Essais cliniques de phase II***

- *Essais cliniques dans des cancers autres que les gliomes de haut grade*

Nous ne développerons principalement ici que les différents essais et utilisation cliniques du cilengitide dans le domaine de la neuro-oncologie. Néanmoins, le cilengitide a également été testé dans une étude de phase II randomisée chez des adultes atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules, en comparaison avec le docetaxel. Dans cet essai la survie sans progression et la survie globale à un an obtenue avec le cilengitide (600 mg/m<sup>2</sup>) et le docetaxel étaient comparables, au prix d'une moindre toxicité dans le bras cilengitide (Manegold 2013).

Une autre étude de phase II a comparé 2 doses de cilengitide chez des patients atteints d'un mélanome métastatique, mais n'a pas montré d'efficacité clinique significative. Fait intéressant dans cette étude, l'efficacité du cilengitide n'était pas corrélée à l'expression de l'intégrine  $\alpha\beta 3$  par les cellules tumorales (Kim 2012).

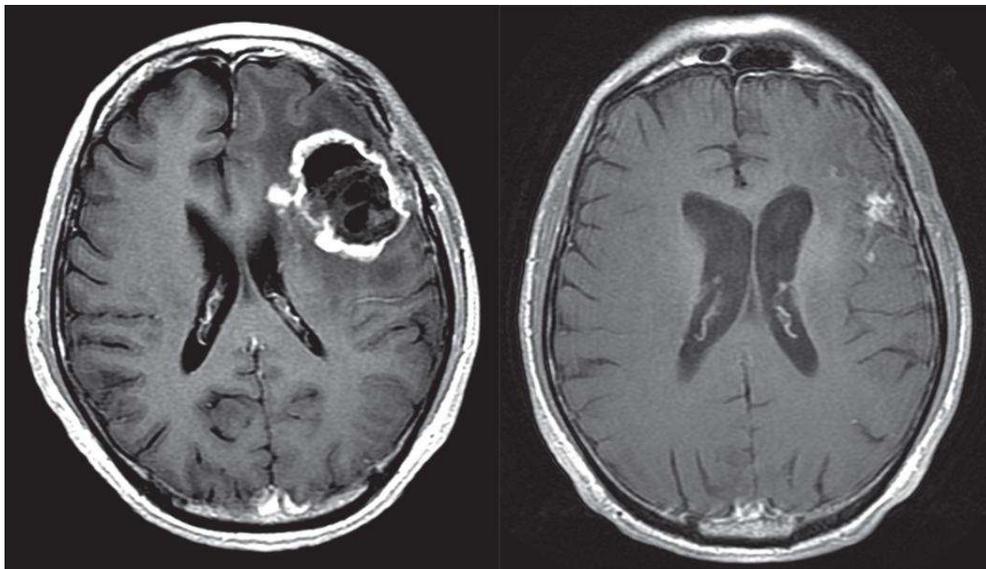
Une étude de phase 1-2 randomisé évaluant l'efficacité et la tolérance de différents schémas d'association du cilengitide ou cisplatine, 5-FU et cétuximab, chez des patients ayant un cancer à cellules squameuses de la tête et du cou en rechute ou métastatique est également en cours (Etude ADVANTAGE, [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)).

- *Essais cliniques dans les gliomes de haut grade*

Une étude de phase II a été conduite chez des patients adultes ayant une récurrence de glioblastome, et devant être opérée de cette récurrence en raison, d'une part de la faisabilité du geste chirurgical, et d'autre part de l'intérêt de cette résection sur le plan clinique. Les patients recevaient 3 injections de cilengitide avant cette intervention, puis un traitement d'entretien classique bihebdomadaire. Le cilengitide a pu être détecté dans les échantillons tumoraux prélevés au moment de l'intervention chirurgicale alors qu'il ne l'était plus dans les prélèvements sanguins prélevés de manière concomitante au geste, témoignant ainsi de la bonne délivrance de la molécule à la tumeur, et d'une possible rétention au niveau tumoral (Gilbert 2012).

Une étude de phase II randomisée a été menée chez 81 patients adultes atteints d'un glioblastome en récurrence et comparait deux dosages de cilengitide, 500 et 2000 mg, administrés de manière bi-hebdomadaire en perfusion intraveineuse d'une heure (Reardon 2008). Tous les malades avaient antérieurement été irradiés et 99 % avaient reçu du témozolomide. Les données pharmacocinétiques ont confirmé les données obtenues en phase I et aucune accumulation n'a été observée au fur et à mesure des doses reçues. La pénétration du cilengitide dans le liquide cébrospinal étant corrélée à la dose injectée dans le sang, les patients recevant une dose de 2000 mg par injection avaient des taux d'exposition au cilengitide supérieurs aux patients recevant la dose inférieure. Le cilengitide était globalement parfaitement toléré avec une toxicité hématologique faible, de grade le plus souvent inférieur à 3. Les effets secondaires non-hématologiques étaient rares (quatre toxicités de grade 3, aucune de grade 4) : élévation des transaminases, arthralgies, prise pondérale, céphalées. Le taux de réponse partielle obtenu lors de cette étude était de 9 % et

la durée médiane de réponse sans progression chez ces patients était de 17 mois (10,8- 36). Bien que la puissance statistique de cette étude ne permette pas de conclure de manière indiscutable, les résultats obtenus chez les patients recevant le cilengitide à la dose de 2000 mg par injection semblent meilleurs, suggérant un effet-dose de la molécule. En effet, le taux de réponse radiologique, le taux de survie sans événement à six mois et le nombre de patients ayant reçu plus de 12 cycles de quatre semaines de traitement étaient supérieurs dans le bras de traitement à 2000 mg par injection avec augmentation de la médiane de survie globale (9,9 mois versus 6,5 mois) (figure 14).



**Figure 14 : Réponse IRM au cilengitide.** Clichés d'imagerie par résonance magnétique pondérée en T1 après injection de gadolinium. Réponse partielle après traitement par cilengitide chez un patient porteur d'une récurrence de glioblastome multiforme (D'après Reardon *et al.* 2008).

Enfin, une publication italienne récente suggère l'intérêt potentiel du cilengitide chez les patients dont la tumeur progresse sous traitement par bevacizumab (Lombardi 2012). Cette constatation clinique pourrait ouvrir des perspectives pour l'utilisation d'un inhibiteur des intégrines chez les patients traités au préalable par bevacizumab.

***IV.C.4.c. Le cilengitide utilisé en association***

Par ailleurs, les données précliniques encourageantes concernant les associations du cilengitide avec le témozolomide ou la radiothérapie ont conduit à proposer un essai de phase I-II combinant le cilengitide au traitement classique de Stupp (radiothérapie-témzolomide) en première ligne chez des adultes porteurs d'un glioblastome multiforme nouvellement diagnostiqué (Stupp 2007). Les patients recevaient une dose de 500 mg de cilengitide en association avec le témozolomide pendant la radiothérapie puis pendant les six mois suivant l'irradiation. Avec un suivi médian de 14 mois, la survie sans progression à six mois et la survie globale à un an étaient respectivement de 69 et 67 %, contre 54 et 62 % avec le schéma classique (Stupp 2005).

Un essai de phase II récent du même type, NABTT-0306, a comparé deux doses différentes de cilengitide – 500 versus 2000 mg – administrées de manière concomitante à l'association radiothérapie-témzolomide chez des patients adultes porteurs d'un glioblastome nouvellement diagnostiqué. Le profil de tolérance était favorable et aucun épisode hémorragique n'a été déclaré. Dans cet essai, l'adjonction de cilengitide semble augmenter la survie globale en comparaison avec les cohortes historiques traitées par la classique association radiothérapie-témzolomide. On note également une tendance à de meilleurs résultats dans le bras 2000 mg (Nabors 2012).

***IV.C.4.d. Essai cliniques précoces avec le cilengitide en pédiatrie***

Un essai de phase I a récemment été mené chez des enfants porteurs d'une tumeur cérébrale réfractaire (MacDonald2008). Il s'agissait d'une étude d'escalade de dose, utilisant un design Continual Reassessment Method (CRM) modifié. Les patients recevaient deux injections intraveineuses hebdomadaires, le premier palier de dose étant de 120 mg/m<sup>2</sup>, pour atteindre une dose finale de 2400 mg/m<sup>2</sup>. Sur les 35 patients inclus, 31 étaient évaluables pour la toxicité mais aucune toxicité limitant la dose (DLT) n'a été mise en évidence dans cet essai. Contrairement à l'essai de phase I de Nabors effectué chez les patients adultes où aucun épisode hémorragique n'avait été constaté, on notait trois hémorragies intratumorales (deux glioblastomes et un gliome infiltrant du tronc cérébral) de grade 3-4, possiblement en rapport avec le traitement, et survenues à la dose de 2400 mg/m<sup>2</sup>. Il semble toutefois que ces événements soient à relativiser puisque deux de ces hémorragies étaient asymptomatiques. La toxicité dans cet essai étant évaluée selon l'échelle National Cancer Institute Common Toxicity (version 2.0), ces événements seraient considérés comme de grade 1 selon l'échelle actuelle Common Terminology Criteria of Adverse Events (version 3). En revanche, aucune hémorragie n'est survenue au palier de dose inférieur de 1800 mg/m<sup>2</sup>. Il est à noter cependant l'apparition d'une neutropénie et d'une lymphopénie de grade 3. Pour l'un des patients, porteur d'un glioblastome en récurrence, cet essai a donné lieu à une réponse complète. Ce patient avait reçu le traitement par cilengitide pendant un an et est demeuré en rémission complète pendant un an après la fin du traitement. On constatait également une stabilisation de la maladie chez un patient traité pour un glioblastome. Cette étude a de plus mis en évidence une relation entre l'exposition systémique au cilengitide, la clairance rénale et le génotype ABCB1. Quant aux données pharmacocinétiques, elles sont comparables à celles obtenues chez les patients adultes.

Ces résultats prometteurs n'ont pas été confirmés dans l'étude de phase II effectuée chez des enfants porteurs d'un gliome de haut grade (Macdonald 2013).

Deux autres essais pédiatriques ont débuté et leurs résultats sont actuellement en cours d'analyse. Le premier intéresse les enfants et adolescents en récurrence d'un gliome malin et étudie en phase II l'administration de cilengitide en association au témozolomide administré selon un schéma métronomique (HGG-CilMetro). Le second est un essai français national de phase I intéressant les enfants et adolescents porteurs d'un gliome malin localisé au tronc cérébral nouvellement diagnostiqué, et testant le cilengitide en association avec la radiothérapie puis seul en entretien (CILENT-0902) ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)).

## **V. LE SYSTEME DE TRANSPORT DES POLYAMINES ET F14512**

Le F14512 est une molécule développée par les laboratoires Pierre Fabre appartenant à la famille des inhibiteurs de topoisomérase II de type épipodophyllotoxine, empruntant le système de transport des polyamines afin de pénétrer dans les cellules tumorales.

### **V.A. Les polyamines**

Les polyamines sont une famille de petites molécules ubiquitaires, cationiques et de faible poids moléculaire. La putrescine, la spermidine et la spermine sont les membres principaux de cette famille retrouvée chez les procaryotes et les eucaryotes.

Les polyamines peuvent être d'origine endogène (synthétisées par les cellules de l'organisme à partir de l'arginine) ou exogène (issues de l'alimentation, des bactéries de la flore intestinale). La concentration intracellulaire des polyamines est régulée par différents mécanismes qui contrôlent leur biosynthèse et leur dégradation ainsi que les échanges avec le milieu extracellulaire. Ces régulations passent par des systèmes de transport facilité et des voies métaboliques complexes qui permettent le maintien d'une concentration optimale de polyamines et ce en fonction de l'état prolifératif des cellules (Okamoto 1997, Noack 1998, Gilmour 2007)

#### **V.A.1. Rôle physiologique des polyamines**

Les polyamines jouent un rôle clé dans de nombreux processus cellulaires dont la prolifération et la différenciation grâce à leur capacité à interagir comme des polycations

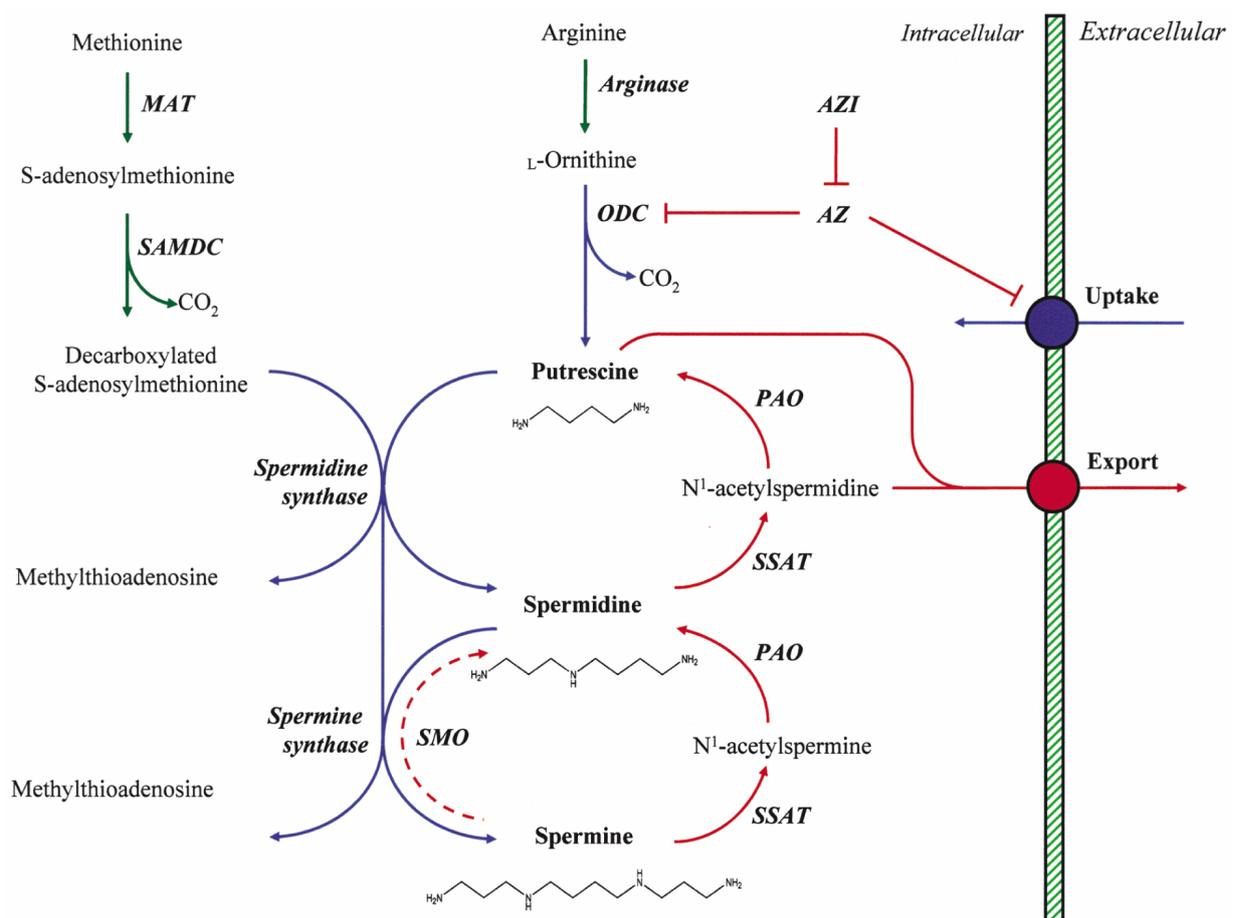
avec des structures chargées négativement comme les acides nucléiques, les protéines et les lipides membranaires (Wallace 2000). En neutralisant les charges négatives, les polyamines diminuent la répulsion électrostatique existant entre les brins d'ADN. La spermine et la spermidine peuvent ainsi condenser l'ADN et induire un changement de conformation de certaines de ses séquences (Pegg 1982, Wallace 2000). Les polyamines peuvent également se fixer sur différentes protéines et cette interaction se traduirait par une stimulation de certaines activités enzymatiques (Kinase II, topoisomérase) ou par la modulation de certains récepteurs tels que les récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA) ou les canaux membranaires (Thomas 2001, Soulet 2003).

Au niveau membranaire, les polyamines agissent sur le mouvement des ions tels que le calcium, mais elles peuvent interagir également avec des phospholipides membranaires en formant des complexes protéines-phospholipides augmentant ainsi la rigidité des membranes biologiques (Igarashi 1982). De même, elles jouent un rôle préventif dans la peroxydation lipidique (Ransom 1990).

### **V.A.2. Métabolisme des polyamines**

La synthèse des polyamines est initiée à partir de l'ornithine, acide aminé formé par l'intermédiaire de l'arginase dans le cycle de l'urée ou à partir de l'alimentation (Figure 15). L'ornithine peut être décarboxylée en putrescine par l'ornithine décarboxylase (ODC). La putrescine peut alors être transformée en spermidine (Spd) par greffage d'un groupement aminopropyl sous l'action de la spermidine synthétase. A son tour, la spermidine peut être transformée en spermine (Spm) par la spermine synthétase selon le même schéma réactionnel.

Les réactions catalysées par les synthétases de la spermine et de la spermidine sont considérées comme irréversibles dans les conditions physiologiques. Cependant, la reconversion de la spermine en spermidine et de la spermidine en putrescine est possible grâce à l'intervention de deux enzymes : la spermidine/spermine-acétyltransférase (SSAT) et la polyamine oxydase (PAO) (Wallace 2003).



**Figure 15 : Métabolisme des polyamines** (Adapté de Wallace *et al.*, 2003). L'ornithine, produite par l'activité arginase, est décarboxylée en putrescine par l'ornithine décarboxylase (ODC). La putrescine est alors transformée en spermidine (Spd) sous l'action de la spermidine synthétase par transfert d'un groupement aminopropyl. De la même façon, la spermidine est transformée en spermine (Spm) par la spermine synthétase. Les groupements aminopropyls transférés sont issus de l'activité de deux enzymes : l'adénosylméthionine transférase (MAT) et la S-adénosylméthionine décarboxylase (SamDC). Ces enzymes catalysent, à partir de la méthionine, la décarboxylation de la S-adénosylméthionine en S-désoxy-adénosylméthionine, donneur d'un groupement aminopropyl. Le

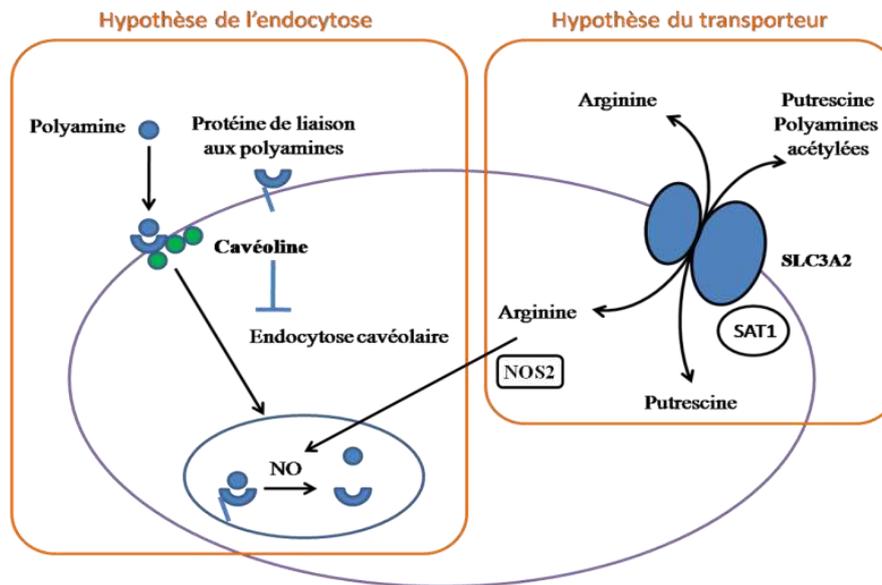
second produit de cette réaction est du 5'-méthylthioadénosine qui, phosphorylé, produit de l'adénine et du 5'-méthylthioribose-1-phosphate. La reconversion de la spermine en spermidine et de la spermidine en putrescine est possible grâce à l'intervention de la spermidine/spermine-acétyltransférase (SSAT) et de la polyamine oxydase (PAO).

### V.A.3. Le Système de Transport des Polyamines

Le système de transport des polyamines (STP) est un mécanisme connu chez les procaryotes.

Il existe un système de transport de haute affinité pour la spermidine et la spermine ainsi qu'un système de transport non saturable et de faible affinité pour les trois polyamines. Une étude réalisée à l'aide de spermidine, couplée à un fluorophore, a montré que le transport était initié par la liaison de la polyamine à la membrane, suivie d'une séquestration dans un compartiment vésiculaire acide (Soulet 2002, Soulet 2004). A l'inverse chez les mammifères, le STP reste à ce jour non identifié sur le plan moléculaire. Cependant, on sait que son activité dépend de l'ATP et qu'il est stimulé par le Na<sup>+</sup>.

Deux hypothèses ont été émises (Figure 16), l'une où l'absorption des polyamines dépendrait de protéines transmembranaires ayant une affinité élevée pour ces polycations, l'autre décrit un système d'endocytose (Seiler 1996, Uemura 2010). Cette endocytose serait calvéoline dépendante et ferait intervenir une protéine de liaison aux polyamines. L'oxyde nitrique (NO), produit par l'oxyde nitrique synthétase (NOS2), libérerait ensuite dans la vacuole la polyamine de cette protéine de liaison. Concernant les protéines transmembranaires, dans les cellules gastro-intestinales de souris, elles véhiculeraient l'arginine, la putrescine et les polyamines acétylées. Ces dernières sont produites par la spermidine/spermineN-acétyltransférase (SAT1) et exportées de la cellule par le canal transmembranaire SLC3A2.



**Figure 16 : Représentation schématique des hypothèses de transport des polyamines et de la chaîne des polyamines** (Adapté de Uemura *et al.*, 2010). Il existerait 2 hypothèses principales indépendantes ou associées. Dans la première hypothèse, l'endocytose qui serait cavéoline dépendante, ferait intervenir une protéine de liaison aux polyamines. L'oxyde nitrique (NO), produit par la NOS2 à partir de l'arginine, libérerait ensuite dans la vacuole la polyamine de cette protéine de transport. Dans la seconde hypothèse, le canal transmembranaire SLC3A2, véhiculerait arginine, putrescine et polyamines acétylés produit par la spermidine/spermine N-acétyltransférase (SAT1).

#### V.A.4. Implications des polyamines dans le cancer

Les polyamines sont connues pour leur rôle crucial dans la croissance cellulaire et sont ainsi retrouvées en concentrations plus importantes dans les cellules cancéreuses que dans les cellules saines (Thomas 2003). En ce sens, le système de transport des polyamines a été retrouvé suractivé dans différents types cancéreux tels que le cancer du sein, de la prostate (Moulinoux 2010). Partant de ce constat, deux stratégies peuvent être envisagées : l'une ayant pour but d'inhiber les voies de synthèse des polyamines via une réduction des sources exogènes de polyamines dans l'organisme, l'autre consistant à utiliser le STP afin d'acheminer un agent cytotoxique de façon active et cibler dans les cellules cancéreuses

(Barret 2008). C'est cette dernière stratégie que les laboratoires Pierre Fabre ont choisi pour l'élaboration de leur nouvel inhibiteur de topoisomérase II, le F14512.

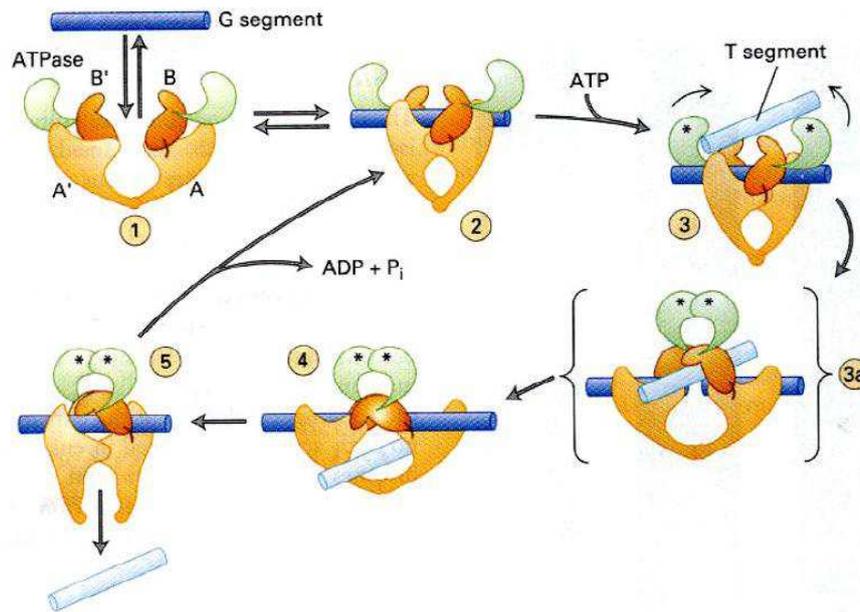
## **V.B. Le F14512, nouvel inhibiteur de topoisomérase II à action ciblée**

Le F14512 est une molécule développée par les laboratoires Pierre Fabre appartenant à la famille des inhibiteurs de topoisomérase II de type épipodophyllotoxine.

### **V.B.1. La topoisomérase II**

Les topoisomérases sont des enzymes qui contrôlent la topologie de l'ADN par des phénomènes de coupures-rotation-religation en brins. Chez les mammifères, elles se divisent en deux classes principales, selon la nature des mécanismes qu'elles mettent en œuvre, les topoisomérases I et II.

La topoisomérase II est une enzyme majeure dans le processus de réplication, de transcription et de recombinaison de l'ADN. Cette topoisomérase se lie à la double hélice d'ADN et stabilise les coupures doubles-brins. L'action de cette enzyme peut se décomposer en cinq étapes (Figure 17)(Berger 1996).

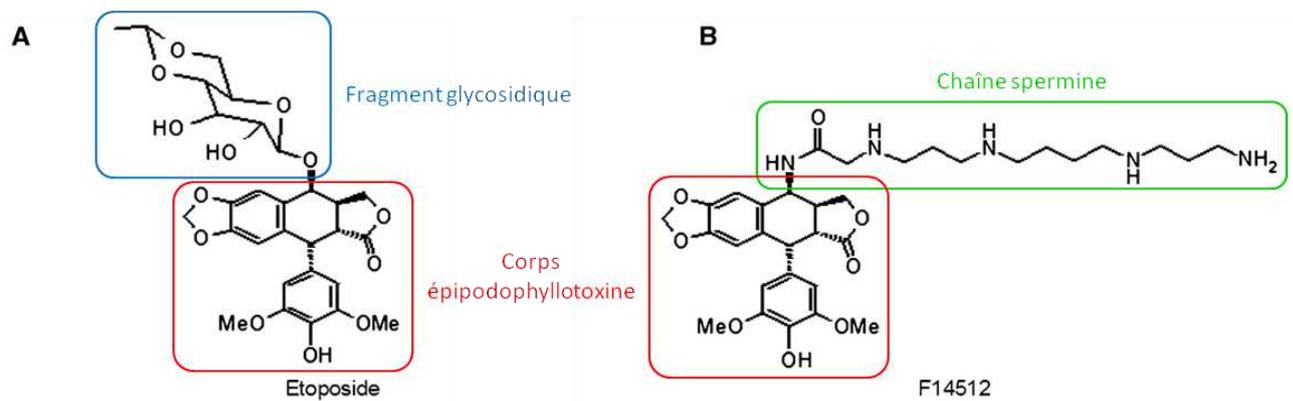


**Figure 17 : Mécanisme d'action de la topoisomérase II.** (Adapté de Berger *et al.*, 1996). L'enzyme, composée de 2 sous-unités, comprend des domaines à activité ATPase représentés en vert et des domaines consacrés à l'interaction avec l'ADN représentés en orange. (1-2) Reconnaissance du substrat et liaison de l'enzyme à l'ADN. (3-3a) Clivage du double brin du segment G. (3a-4) Modifications conformationnelles et passage du segment T à travers le segment G ouvert. (5) Hydrolyse de l'ATP, libération des molécules d'ADN et recyclage de l'enzyme.

Dans un premier temps, la topoisomérase II se lie de façon non covalente à un ADN surenroulé appelé segment G (1 et 2). A la suite de l'interaction avec le segment G, la topoisomérase se trouve dans une conformation présentant une cavité qui interagit avec une deuxième double hélice appelée segment T (3 et 3a). Cette cavité est générée par les extrémités N-terminales de la topoisomérase II possédant une activité ATPase. Le segment G est clivé et la fixation d'une molécule d'ATP par le complexe entraîne une modification conformationnelle de l'enzyme qui déclenche la migration du segment T au travers du segment G ouvert (3a et 4). La religation du segment G s'accompagne de la libération du segment T (4). La topoisomérase II retrouve ensuite sa capacité à s'engager dans un nouveau cycle catalytique grâce à l'hydrolyse de la deuxième molécule d'ATP en ADP et en phosphate inorganique (5).

### V.B.2. Le F14512, nouvel inhibiteur sélectif de topoisomérase II

Le F14512, nouvel inhibiteur de topoisomérase II, est un dérivé de l'étoposide, chef de fil de la famille des épipodophyllotoxines (Figure 18).



**Figure 18 : Structure de l'Etoposide (A) et du F14512 (B).** L'étoposide est composé d'un corps épipodophyllotoxine (encadré rouge) et d'un fragment glycosidique en C4 (encadré bleu). Le F14512 comporte le même corps épipodophyllotoxine (encadré rouge) sur lequel est greffée une chaîne spermine (encadré vert).

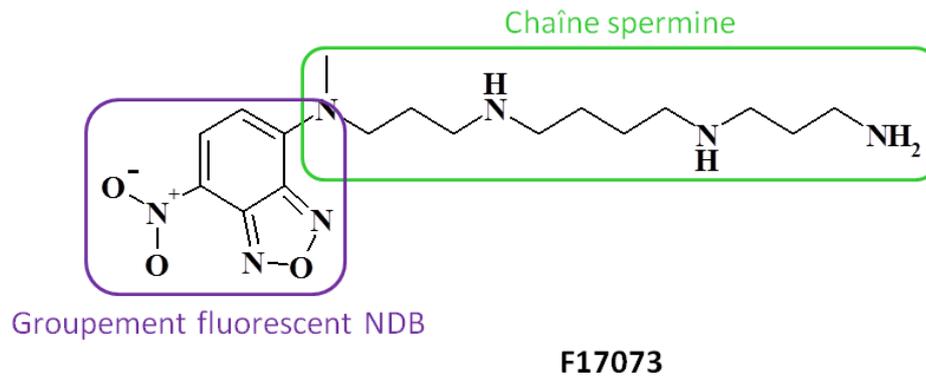
L'étoposide est un agent cytotoxique classique non sélectif très largement utilisé pour le traitement de différents types de tumeurs malignes en pédiatrie telles que les médulloblastomes, les neuroblastomes, les néphroblastomes ou encore les tumeurs osseuses. Il se compose d'un corps épipodophyllotoxine, responsable de son interaction avec la topoisomérase II et d'un fragment glycosidique en C4 modulant les interactions de la molécule avec l'ADN. L'étoposide est un inhibiteur de topoisomérase II dit « poison » puisqu'il forme un complexe covalent avec l'ADN et l'enzyme, complexe provoquant des cassures double brin de l'ADN conduisant à la mort cellulaire. L'étoposide, bien qu'efficace

en monochimiothérapie, est une molécule toxique pouvant potentiellement provoquer de nombreux effets indésirables au niveau hématologique, hépatique ou encore une hypofertilité. Ce composé est le plus souvent utilisé en association avec d'autres agents cytotoxiques comme les sels de platine ou des alkylants dans des protocoles de polychimiothérapie.

Afin de limiter les effets indésirables de ce type de composés, les laboratoires Pierre Fabre ont entrepris de greffer un groupement polyamine sur un corps épipodophyllotoxine. Après synthèse et optimisation, différents composés ont été testés sur de l'enzyme purifiée d'abord puis *in vitro* sur des cultures cellulaires. Parmi ces composés, le F14512 s'est avéré être le plus efficace et a été sélectionné pour le développement en thérapeutique humaine.

Le F14512, porteur d'un groupement spermine, s'est révélé plus soluble et plus affiné pour l'ADN que l'étoposide. Mais surtout, de part ce groupement polyamine, le F14512 est activement et sélectivement incorporé par les cellules possédant une activité STP accrue telle que cela a été décrit dans plusieurs types de cellules cancéreuses.

La connaissance imparfaite au plan moléculaire du STP impose, pour son étude, l'utilisation d'une sonde fluorescente développée par les laboratoires Pierre Fabre, le F17073 (Figure 19) Cette sonde possède un groupement spermine permettant sa prise en charge par le STP et comporte un groupement fluorescent, le nitrobenzoxadiazole (NBD) (Guminski 2009, Annereau 2010).



**Figure 19 : Structure de la sonde fluorescente F17073.** Le F17073 se compose d'une chaîne spermine associée à un fluorophore, le nitrobenzoxadiazole.

Ainsi cette molécule a t'elle montré une forte activité anticancéreuse sur de nombreux modèles tumoraux tels que les leucémies, les sarcomes, les cancers du poumon non à petites cellules. Dans tous ces modèles, l'efficacité du F14512 s'est révélée nettement supérieur à celle de l'étoposide, molécule de référence de cette famille.

Sur des lignées cellulaires d'ovaires de hamster chinois (CHO), les concentrations inhibitrices à 50% (IC<sub>50</sub>) *in vitro* du F14512 et de l'étoposide étaient respectivement de 0,12 µM et 1,1 µM. *In vivo*, des expériences de xénogreffes de cellules leucémiques P388 et de cellules tumorales de sein MX-1, en souris immunodéficientes nude, ont confirmé que le F14512 était un composé plus cytotoxique que l'étoposide, hautement actif chez l'animal. Dans ce modèle, le F14512 entraînait une régression complète de la tumeur chez toutes les souris greffées. Enfin, le F14512 n'entraînait pas de perte de poids de la souris à une dose de 80 mg/Kg (Barret 2008).

Une autre étude préclinique menée sur des cellules A549 de cancer du poumon non à petites cellules a montré que le F14512 était 30 fois plus cytotoxique que l'étoposide et que son action était rapide (dans les 3 heures) (Brel 2011). A l'inverse de l'étoposide, il n'était

pas pas noté d'accumulation en phase S du cycle cellulaire. Le type de mort cellulaire induite par le composé différait également de celui induit par l'étoposide. En effet, alors que l'étoposide entraînait une mort cellulaire par apoptose, le F14512 induisait préférentiellement une mort cellulaire par sénescence dans ce modèle comme en témoignait l'augmentation de l'activité  $\beta$ -galactosidase.

Ces données ont été confirmées sur des lignées de leucémies aiguës myéloïdes, dans lesquelles le F14512 induisait une mort par apoptose ou une sénescence (Kruczynski 2013). Dans cette étude les auteurs rapportaient également une synergie *in vitro* du F14512 avec la gemcitabine, le SAHA, le bortezomib, la cytosine arabinoside et la doxorubicine.

Ainsi le F14512 diffère t-il donc de l'étoposide à la fois de part son mode de délivrance à l'ADN (le STP versus une diffusion passive) et de part le type de mort qu'il induit.

### **V.B.3. Développement clinique du F14512**

Suite à ces résultats, un premier essai clinique de phase I a été effectué chez 39 patients adultes porteurs d'une leucémie aigüe myéloïde réfractaire ou en rechute (De Botton 2012). Le F14512 était administré par cycle de 5 jours consécutifs, et la dose maximale tolérée a été déterminée à 44 mg/m<sup>2</sup>/j, et la dose recommandée pour l'étude de phase II actuellement en cours est de 39 mg/m<sup>2</sup>/j. Les auteurs ont rapporté 4 réponses complètes et 3 réponses partielles. Chez les patients inclus dans cette étude clinique, l'activité du STP, évaluée par l'analyse de l'incorporation de la sonde F17073 était plus importante dans les cellules leucémiques que dans les lymphocytes (Zorza 2012).

## OBJECTIFS DE LA THESE

---

## OBJECTIFS DE LA THESE

---

## OBJECTIFS DE LA THESE

Malgré les progrès importants effectués dans les trente dernières années dans la prise en charge de la plupart des tumeurs solides pédiatriques et malgré la multitude d'essais thérapeutiques effectués, le pronostic des gliomes malins quelle que soit leur localisation, ainsi que celui des formes métastatiques de neuroblastome reste sombre. Il est donc nécessaire d'introduire de nouvelles stratégies thérapeutiques et de nouveaux traitements médicamenteux. Pour ces deux types tumoraux, la meilleure compréhension des mécanismes conduisant à la prolifération tumorale ainsi qu'à la résistance aux traitements jusqu'alors proposés, a permis et permettra de proposer des essais cliniques utilisant de nouvelles molécules ciblant des récepteurs et des voies de signalisation spécifiques.

Parmi ces cibles potentielles, le rôle des intégrines  $\alpha\beta3$  et  $\alpha\beta5$  concernant l'angiogenèse, la prolifération, la migration et l'invasion des cellules tumorales est maintenant bien connu notamment dans les glioblastomes de l'adulte. Or, les gliomes de l'enfant diffèrent des gliomes de l'adulte, ce qui rend nécessaire la réalisation d'études spécifiques pédiatriques. Par ailleurs, le cilengitide (EMD121974 ; Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne), inhibiteur spécifique des intégrines  $\alpha\beta3$  et  $\alpha\beta5$  fait précisément l'objet d'études cliniques dans le traitement des gliomes de haut grade de l'adulte et de l'enfant, et sa synergie avec les radiations ionisantes et le témozolomide a été démontrée sur des modèles précliniques. En revanche, l'expression des intégrines  $\alpha\beta3$  et  $\alpha\beta5$  dans les cellules de neuroblastome est très mal connue et il n'existe aucune donnée concernant l'effet du cilengitide dans le neuroblastome.

D'autre part, les polyamines sont connues pour leur rôle crucial dans la croissance cellulaire et il a été démontré qu'elles se trouvaient en concentrations plus importantes dans les cellules cancéreuses que dans les cellules saines. Le système de transport des polyamines a

## OBJECTIFS DE LA THESE

été retrouvé suractivé dans différents types cancéreux tels que le cancer du sein et de la prostate. Il n'existe en revanche aucune donnée concernant son activité dans des cellules de gliomes pédiatriques ou de neuroblastome. La stratégie consistant à utiliser ce STP dans le but d'acheminer un agent cytotoxique de façon active et de cibler ainsi plus spécifiquement les cellules cancéreuses a conduit les laboratoires Pierre Fabre à élaborer un nouvel inhibiteur de topoisomérase II à action ciblée, le F14512. Il semblait donc pertinent de tester cette nouvelle molécule, à la fois dans les gliomes malins pédiatriques compte-tenu de leur habituelle chimiorésistance, mais aussi dans le neuroblastome dans la mesure où l'étoposide, également inhibiteur de la topoisomérase II comprenant un noyau épipodophyllotoxine, est largement utilisé pour son traitement.

Le premier objectif de mon travail était donc d'étudier les mécanismes d'action et la cytotoxicité du cilengitide, utilisé seul ou en association avec les radiations ionisantes, sur les lignées cellulaires de gliomes et de neuroblastome.

Mon second objectif était d'étudier l'activité du STP et la cytotoxicité du F14512, utilisé seul ou en association à d'autres agents cytotoxiques ou aux radiations ionisantes sur notre panel de lignées de cellulaires de gliomes et de neuroblastome.

Les résultats sont présentés sous la forme de 2 articles intitulés :

- ✓ « **Cilengitide targets pediatric glioma and neuroblastoma cells through cell detachment and anoikis induction** », publié en 2013 dans le journal Anticancer Drugs
- ✓ « **The vectorized anti-cancer drug F14512 demonstrates a higher preclinical activity in neuroblastoma than in pediatric glioma cell lines: First data in pediatric oncology** », qui sera soumis prochainement pour publication.

---

**MATERIEL ET METHODE**

---

### ***Les lignées cellulaires de gliome pédiatrique***

---

La plupart des études précliniques *in vitro* portant sur des gliomes malins sont effectuées sur des lignées cellulaires de gliome de l'adulte. En effet, Il existe très peu de lignées commerciales de gliome pédiatrique disponibles, probablement du fait de la rareté de ces tumeurs. Dans la mesure où il est maintenant bien établi que les gliomes malins pédiatriques diffèrent de ceux de l'adulte sur un plan moléculaire, il était indispensable d'effectuer les expérimentations sur des lignées spécifiques pédiatriques.

Les lignées Res186, Res259, KNS42, UW479 et SF188 nous ont été gracieusement fournies par les Dr Dorine Bax et Chris Jones, chercheurs à l'Institute of Cancer Research, Sutton, Royaume-Uni, qui avaient au préalable effectué une caractérisation de ces lignées (Bax 2009). Les lignées SF188 et KNS42 étaient de grade IV selon la classification de l'OMS, UW479 de grade III, Res259 de grade II, et Res186 de grade I, ce qui nous permettait d'avoir un panel large représentant les différents grades de gliome. La lignée cellulaire prototypique U87MG, lignée de glioblastome multiforme de l'adulte, a été obtenue auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC), et a été utilisée en parallèle le plus souvent comme témoin, car il s'agit d'une ligne largement caractérisée et sur laquelle le cilengitide avait déjà été testée (Yamada 2006).

Les principales caractéristiques concernant la provenance et l'immunophénotypage des lignées cellulaires pédiatriques sont exposées dans le tableau 6. Toutes ces lignées provenaient de tumeurs de patients âgés de 3 à 16 ans, et leur nature astrocytaire avait été confirmée en immunohistochimie par le marquage de la Glial fibrillary acidic protein (GFAP), ainsi que par celui de la protéine S100 et de la vimentine pour la plupart des lignées. Par ailleurs, les auteurs notaient un haut niveau d'expression du marqueur CD133 dans les

## MATERIEL ET METHODE

lignées SF188 et KNS42, avec une positivité respectivement de 7% et 4% des cellules.

L'immunomarquage de la nestine était également fortement positif dans ces 2 lignées (Figure 20).

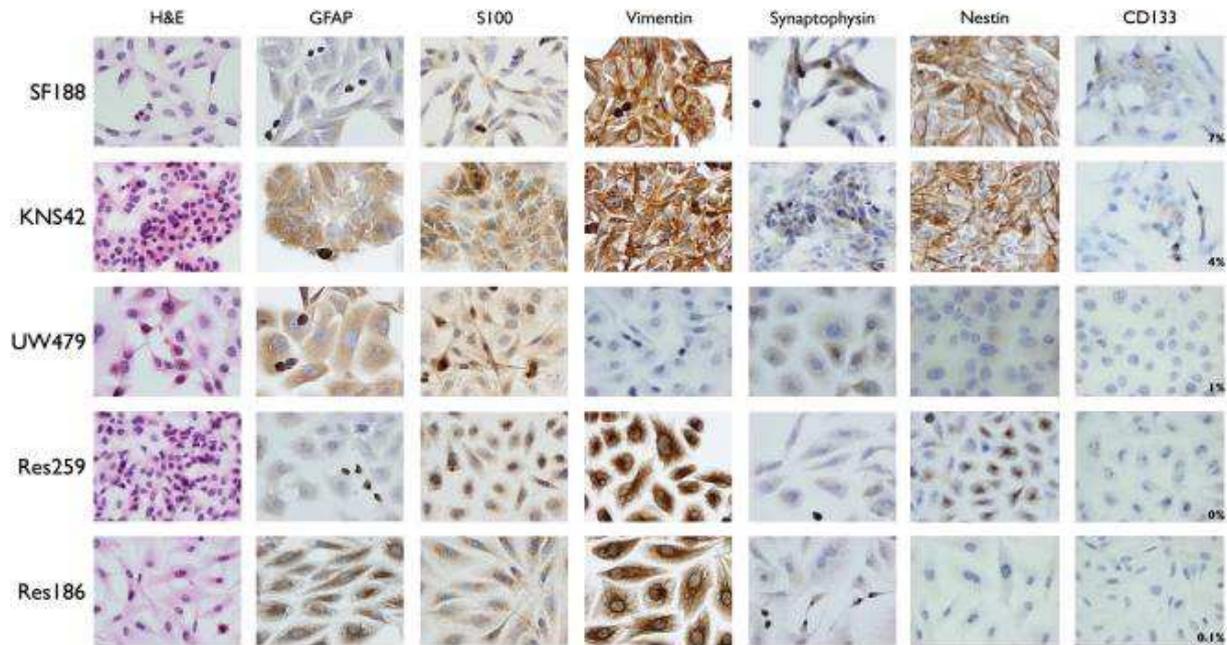
Par ailleurs, les auteurs ont confirmé l'existence d'une différence d'expression de nombreux gènes en comparant les cellules pédiatriques de haut grade à un panel de lignées cellulaires de glioblastome de l'adulte.

**Tableau 6 : Caractéristiques principales et immunophénotypage des cellules de gliome pédiatrique**  
(d'après Bax *et al.* 2009)

Lignées cellulaires	Grade (OMS)	Diagnostic	Age (ans)	Immunohistochimie				
				GFAP	S100	Vimentine	Synaptophysine	CD133
<b>SF188</b>	IV	GBM	8	++	++	+++	++	7%
<b>KNS42</b>	IV	GBM	16	+++	+++	+++	++	4%
<b>UW479</b>	III	AA	13	+++	+++	-	+	1%
<b>Res259</b>	II	AD	4	+	++	+++	-	0%
<b>Res186</b>	I	AP	3	+++	++	+++	-	0,1%

GBM : Glioblastome Multiforme ; AA : Astrocytome Anaplasique ; AD : Astrocytome Diffus ; AP : Astrocytome Pilocytique. GFAP : glial fibrillary acidic protein. (+++) marquage fortement positif, (++) marquage modérément positif, (+) marquage faiblement positif, (-) absence de marquage

## MATERIEL ET METHODE



**Figure 20 : Immunophénotypage des cellules gliales** (grossissement X400). Toutes les cellules étaient cultivées en conditions adhérentes et colorées avec des marqueurs indiquant d'une part une origine gliale comme la glial fibrillary acidic protein (GFAP), la protéine S100, la vimentine et la synaptophysine, et d'autre part des marqueurs de cellules souches comme la nestine et le CD133. H&E – hématoxyline (noyaux) et éosine (cytoplasme et matrice extracellulaire)(Bax *et al.* 2009).

Nous avons également tenté de créer 3 lignées cellulaires à partir de prélèvements tumoraux obtenus auprès de patients opérés de leur tumeur dans le service de neurochirurgie pédiatrique du CHRU de Lille (Pr Vinchon). Les tumeurs concernées étaient un xanthoastrocytome pléiomorphe anaplasique (grade III de l'OMS), un glioblastome (Grade IV) et une tumeur tératoïde et rhabdoïde atypique (grade IV). Nous nous sommes heurtés à des difficultés de culture de ces cellules, dont la vitesse de croissance était très faible. Ces difficultés ne nous ont pas permis d'utiliser ces cellules pour les travaux. Néanmoins, nous souhaitons poursuivre cette collaboration avec le service de neurochirurgie pédiatrique du CHRU de Lille afin d'accroître notre panel de lignées cellulaires de tumeurs cérébrales pédiatriques.

### ***Les lignées cellulaires de neuroblastome***

---

Nous avons choisi d'utiliser 4 lignées de neuroblastome ayant fait l'objet de nombreuses publications. Parmi ces lignées, trois proviennent de l'ATCC (SH-SY5Y, SK-N-AS, SK-N-DZ), et la lignée Kelly nous a été gracieusement fournie par le Dr Luc Buée.

La lignée SH-SY5Y est issue d'un prélèvement tumoral d'une métastase médullaire de neuroblastome, chez une fille de 4 ans. Ces cellules n'ont pas d'amplification de l'oncogène *MYCN* (Spengler 2002).

La lignée Kelly est issue d'un prélèvement de neuroblastome, et est commercialisée par le Leibniz Institut DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen). Ces cellules présentent une amplification de l'oncogène *MYCN* (Schwab 1983).

La lignée SK-N-AS est issue également issue d'un prélèvement tumoral d'une métastase médullaire de neuroblastome, chez une fille de 6 ans. Ces cellules présentent notamment une délétion du 1p classique de certains neuroblastomes et de mauvais pronostic en clinique. Ces cellules n'ont pas d'amplification de l'oncogène *MYCN* (Van Roy 1997).

La lignée SK-N-DZ est issue également issue d'un prélèvement tumoral d'une métastase médullaire de neuroblastome peu différencié, chez une fille de 2 ans. Ces cellules présentent une amplification de l'oncogène *MYCN* (Hossain 2013)

Une classification des lignées cellulaires de neuroblastome en trois sous-types phénotypiques distincts a été proposée par Ross *et al.* suite à l'étude de la croissance, de la différenciation et du degré de malignité de plus de 25 lignées (Ross 2003). Ces trois sous-types cellulaires ont été dénommés N pour Neuroblastique, S pour non-neuronal adhérent au Substrat, et I pour qualifier les cellules de morphologie Intermédiaire entre les cellules N

## MATERIEL ET METHODE

et les cellules S. Les cellules de type N et de type I ont un fort potentiel tumorigène en xénogreffe sur des souris nude. Cette classification n'a pas de traduction clinique, probablement du fait de l'hétérogénéité tumorale. Dans notre panel de lignées cellulaires, SK-N-DZ, SH-SY5Y et Kelly étaient de type N, et SK-N-AS de type S (Esumi 1989, Bian 2002, Kuçy 2002, Ross 2003).

**Les différentes méthodes utilisées sont décrites dans chacun des articles ci-après.**

## RESULTATS

---

## RESULTATS

---

Article 1 :

## **Cilengitide targets pediatric glioma and neuroblastoma cells through cell detachment and anoikis induction**

---

### **Introduction**

Ce travail fut débuté au sein du laboratoire parallèlement à la mise en place d'un essai thérapeutique de phase I national multicentrique promu par le centre Oscar Lambret (coordonateur : Dr Pierre Leblond) étudiant le cilengitide, un nouvel inhibiteur des intégrines  $\alpha\beta3$  et  $\alpha\beta5$ , en association à la radiothérapie chez les enfants et adolescents porteurs d'un gliome infiltrant du tronc cérébral. Cette étude clinique était fondée sur des données concernant le cilengitide lors de son utilisation dans les glioblastomes de l'adulte, seul ou en association à la radiothérapie, et sur l'unique étude pédiatrique ayant étudié en phase I le cilengitide chez l'enfant (MacDonald 2008). Il n'existait toutefois aucune donnée concernant l'utilisation du cilengitide en association à la radiothérapie chez l'enfant, ni sur l'effet du cilengitide sur les cellules de gliome malin pédiatrique ou de neuroblastome. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés au niveau d'expression des intégrines  $\alpha\beta3$  et  $\alpha\beta5$  et à l'effet du cilengitide dans des lignées cellulaires de gliomes pédiatriques et de neuroblastome.

### **Résultats**

Nous avons tout d'abord montré en cytométrie en flux que les 4 lignées cellulaires de neuroblastome et la plupart des lignées cellulaires de gliome exprimaient les intégrines  $\alpha\beta3$

## Article 1 : Cilengitide in pediatric tumor cell lines

et  $\alpha\beta 5$  à des niveaux variables. Le niveau d'expression des intégrines n'était pas corrélé au grade des cellules gliales. Seule la lignée de gliome de haut grade UW479 n'exprimait pas  $\alpha\beta 3$ , et nous a donc servi de témoin négatif pour la suite de notre étude.

Le traitement par les radiations ionisantes augmentait faiblement le niveau d'expression d' $\alpha\beta 3$  dans les lignées SF188, KNS42 et Res259, sans induire d'expression *de novo* de l'intégrine dans la lignée UW479.

Le traitement par cilengitide à doses croissantes a entraîné une inhibition dose-dépendante de la croissance cellulaire permettant l'obtention d'une valeur d' $IC_{50}$  dans les trois lignées pédiatriques, à l'exception de la lignée de gliome pédiatrique de haut grade UW479 bien que celle-ci exprime l'intégrine  $\alpha\beta 5$  de manière significative. Il n'a pas été possible de déterminer une valeur d' $IC_{50}$  dans la lignée prototypique adulte U87MG.

Le traitement par cilengitide à doses croissantes a également entraîné un détachement rapide et dose-dépendant de plus de 50% de nos cellules exprimant  $\alpha\beta 3$  cultivées en conditions adhérentes sur vitronectine, matrice spécifique des intégrines cibles. Il est en revanche resté sans effet lorsque les cellules étaient cultivées sur collagène, matrice non spécifique de ces intégrines. L'inhibition de la croissance cellulaire induite par le cilengitide était comparable à celle constatée lorsque les cellules étaientensemencées sur gel de polyHEMA et donc en condition physiquement non adhérente. De façon attendue, le cilengitide n'a provoqué aucun détachement des cellules UW479 et ceci quelle que soit la matrice utilisée. A l'inverse, les tests de viabilité cellulaire ont montré une forte inhibition de leur croissance lorsque ces cellules étaientensemencées sur gel de polyHEMA preuve de leur sensibilité à l'anoïkis.

### **Article 1 : Cilengitide in pediatric tumor cell lines**

Fait intéressant, les cellules U87MG restaient capables de croître malgré un fort détachement induit par le cilengitide, ce qui suggère une résistance de ces cellules à l'anoïkis.

Ainsi, l'inhibition de la croissance cellulaire induite par le cilengitide semblait-elle bien liée principalement au détachement cellulaire et correspondait à une mort cellulaire par anoïkis. Cette inhibition de la croissance cellulaire et le détachement des cellules n'étaient pas corrélés au niveau d'expression des intégrines  $\alpha\beta3$  et  $\alpha\beta5$ .

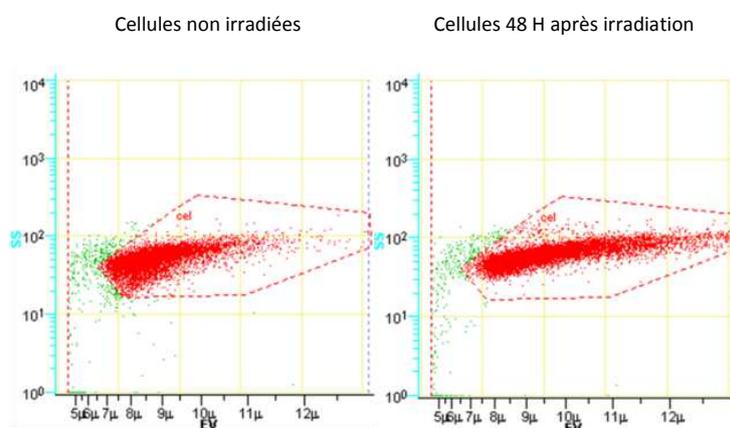
**Ces résultats sont présentés dans l'article qui suit, publié dans la revue *Anticancer Drugs*.**

### Résultats complémentaires

L'association du cilengitide avec les radiations ionisantes paraît pertinente puisqu'il a été suggéré que l'irradiation pouvait entraîner dans certains modèles de cancer du poumon une surexpression de ses intégrines cibles et pourrait ainsi avoir un impact sur son action (Albert 2006).

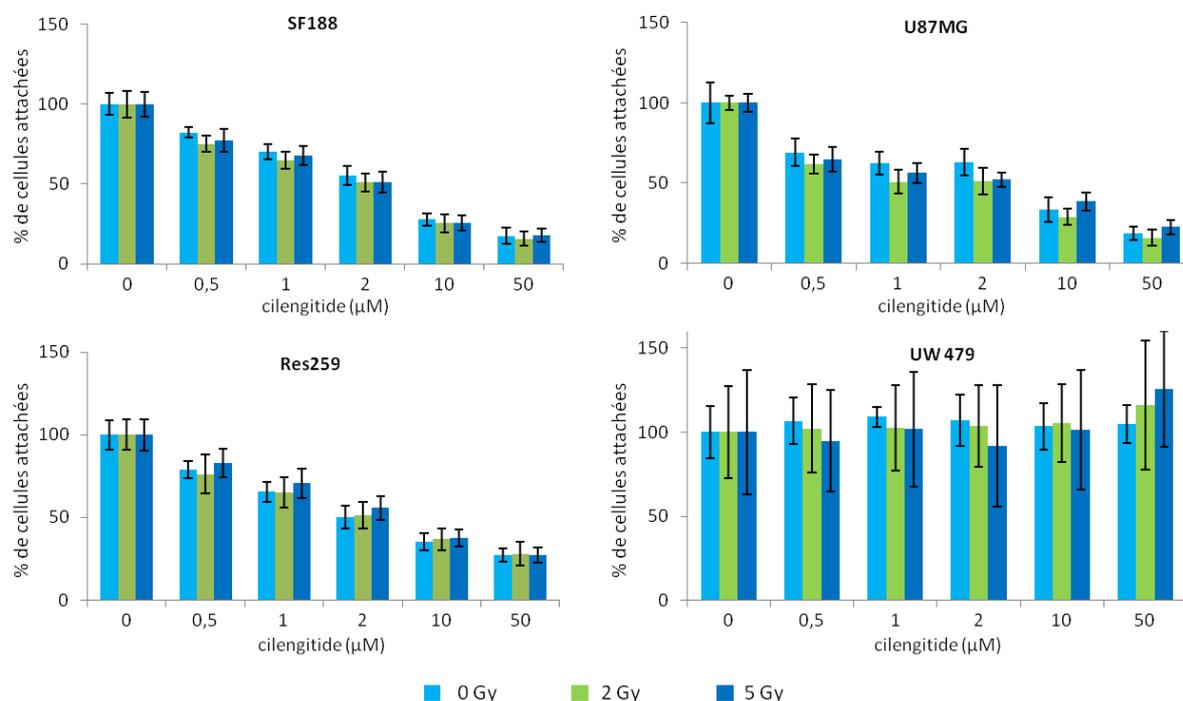
Nous avons voulu tout d'abord vérifier cette augmentation d'expression dans nos lignées par cytométrie en flux. Etant donné que le marquage anti- $\alpha\beta 3$  est un marquage de surface et que les radiations ionisantes peuvent induire une modification du volume et donc de l'autofluorescence des cellules, nous avons contrôlé auparavant par cytométrie en flux le volume cellulaire avant et après irradiation sur les cellules Res259.

Une augmentation de volume des cellules était effectivement constatée après irradiation avec un diamètre moyen des cellules passant de 8,6  $\mu\text{m}$  à 0 Gy à 9,65  $\mu\text{m}$  à 5 Gy. (Fig sup 1) Compte tenu de cette augmentation de volume et donc de surface, la cytométrie a été réalisée sur un appareil de type Cell Lab Quanta (Beckman Coulter) permettant une correction en fonction du volume de chaque cellules.



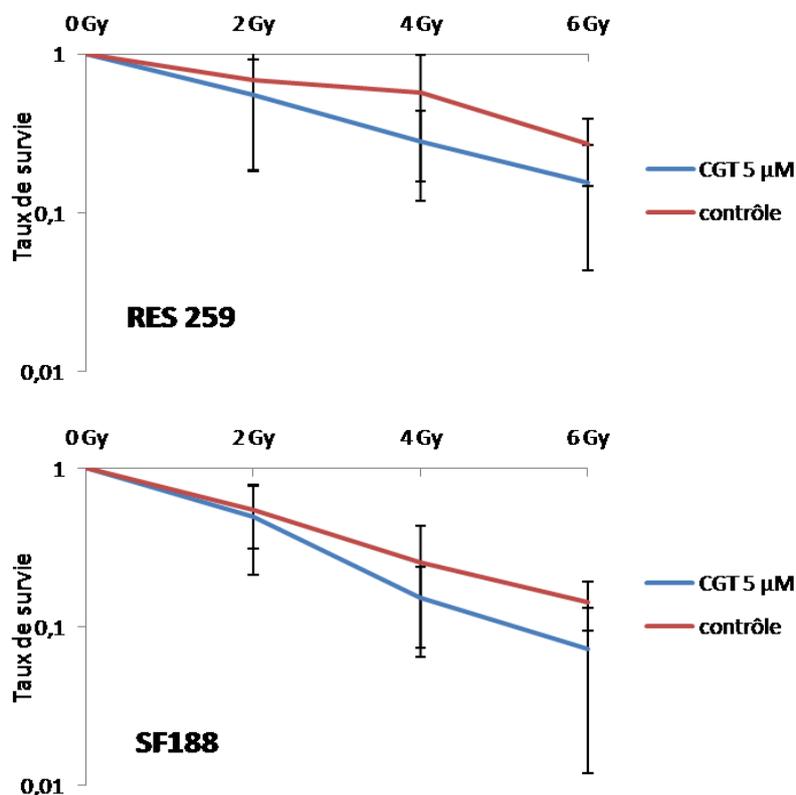
**Figure supplémentaire 1 : Histogramme de cytométrie en flux représentant la taille des cellules Res259 avant et après irradiation.** Mesure du diamètre des cellules Res259 48 heures après irradiation à 0 et 5 Gy sur le cytomètre Cell Lab Quanta.

Dans la mesure où l'irradiation semblait capable d'induire une modification de l'expression d' $\alpha v\beta 3$  dans les lignées SF188 et Res259, nous avons mesuré l'efficacité du cilengitide sur le détachement cellulaire après irradiation à 2 et 5 Gy. L'effet du cilengitide sur l'adhésion cellulaire n'était pas modifiée 48 h après une irradiation à 2 et 5 Gy dans les lignées Res259, SF188 et U87MG. Dans la lignée UW479, n'exprimant pas *de novo*  $\alpha v\beta 3$  après irradiation, aucun effet du cilengitide sur le détachement cellulaire n'était observé à 2 et 5 Gy (Fig sup 2).



**Figure supplémentaire 2 : Test de détachement cellulaire après irradiation.** Les cellules sont ensemencées dans des boîtes de pétri de 60 mm puis irradiée 6 heures plus tard à 0, 2 et 5 Gy. Quarante-huit heures plus tard, les cellules sont ensemencées dans des plaques 96 puits. Le lendemain, les cellules sont traitées par des concentrations croissantes de CGT de 0 à 50 µM durant 2h. Après deux lavages avec du milieu à 37 °C, la proportion de cellules vivantes est révélée par test MTS.

Enfin, afin d'évaluer le potentiel radiosensibilisant du cilengitide, nous avons effectué des tests de clonogénicité sur les cellules Res259 et SF188. Après avoir testé différentes modalités de traitement, nous avons opté pour un schéma dans lequel la molécule est administrée à 5  $\mu\text{M}$  deux heures avant l'irradiation, et éliminée 24 heures après. Dans ces lignées, les taux de survie cellulaire diminuaient avec l'augmentation de la dose d'irradiation. Cette décroissance semblait plus prononcée après traitement par le cilengitide. Néanmoins, aucune significativité statistique n'était obtenue (Fig sup 3).



**Figure supplémentaire 3 : Courbes de survie cellulaire en fonction de la dose d'irradiation avec ou sans traitement par cilengitide pour les lignées pédiatriques Res259 et SF188.** Les cellules sontensemencées à raison de 150 à 600 cellules/puits, puis traitées le lendemain avec 5  $\mu\text{M}$  de cilengitide. Deux heures après traitement, les plaques sont irradiées à 0, 2, 4 ou 6 Gy. Vingt quatre heures plus tard, les puits sont rincés et les cellules sont incubées à 37°C pendant 8 jours. Les

## Article 1 : *Cilengitide in pediatric tumor cell lines*

colonies sont révélées par coloration au cristal violet et comptés à l'œil nu (> 50 cellules/colonie). Le Plating Efficiency (PE) et le taux de survie sont déterminés selon les formules suivantes (Franken 2006) : PE = Nombre de colonies à 0 Gy/Nombre de cellulesensemencées, Taux de survie = Nombre de colonies après irradiation/(PE X Nombre de cellulesensemencées)

### **Conclusion**

Nous avons donc montré ici pour la première fois l'existence d'une expression des intégrines  $\alpha\beta3$  et  $\alpha\beta5$  dans des lignées cellulaires de neuroblastome et de gliomes pédiatriques. Le cilengitide, connu pour être un inhibiteur spécifique de ces intégrines, est responsable d'une inhibition de la croissance des cellules exprimant  $\alpha\beta3$  en provoquant leur détachement et en induisant la mort cellulaire par anoïkis comme l'avaient démontré les travaux d'Olivia-Ferrer *et al* sur des cellules endothéliales et des cellules de glioblastome de l'adulte (Olivia-Ferrer 2008). Nos résultats obtenus notamment sur la lignée cellulaire UW479 semblent montrer également que la cible principale du cilengitide est l'intégrine  $\alpha\beta3$ . Nous ne pouvons pas exclure cependant que le cilengitide puisse cibler l'intégrine  $\alpha\beta5$ , qui dans ce contexte aurait au mieux un rôle discret dans les effets biologiques que nous avons étudiés. Ainsi la cytotoxicité du cilengitide dépend-elle donc de l'expression de cette intégrine  $\alpha\beta3$ , mais aussi de la sensibilité des cellules à l'anoïkis, propriétés retrouvées dans nos lignées cellulaires de neuroblastome et dans la plupart de nos lignées de gliomes pédiatriques.

Article 2 :

**The vectorized anti-cancer drug F14512 demonstrates a higher preclinical activity in neuroblastoma than in pediatric glioma cell lines: First data in pediatric oncology.**

---

**Introduction**

Un des objectifs de ce travail était d'obtenir pour la première fois des données précliniques à propos du F14512, un nouvel inhibiteur de la topoisomérase II à action ciblée puisqu'empruntant le système de transport des polyamines (STP) et dont la structure moléculaire est proche de l'étoposide, dans des lignées cellulaires de HGG pédiatriques et de neuroblastomes. Le choix de ces modèles a été guidé d'une part, par la nécessité de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques dans ces maladies cancéreuses particulièrement graves, et d'autre part, par le fait que l'étoposide est largement utilisé dans le traitement des neuroblastomes.

**Résultats**

Nous avons tout d'abord évalué l'activité du STP dans nos 3 lignées cellulaires de gliome de haut grade et nos 4 lignées de neuroblastome. Le STP est un système de transport membranaire mal caractérisé sur le plan moléculaire. Nous en avons évalué l'activité en cytométrie en flux au moyen d'une sonde fluorescente, le F17073, dont la structure moléculaire, comprenant la même chaîne spermine que le F14512, lui confère la propriété

## Article 2 : *F14512 in pediatric tumor cell lines*

d'être prise en charge par le STP. Notre étude a ainsi montré que le STP était présent dans l'ensemble des lignées, bien que sans relation entre l'intensité de son activité et le type histologique de la tumeur. En effet, les lignées de gliomes de haut grade (KNS42, SF188, UW479) et 3 parmi les 4 lignées de neuroblastomes (KELLY, SH-SY5Y et SK-N-AS) révélèrent des variations des moyennes d'intensité de fluorescence relatives ( $\Delta$ MFI) importantes et donc une incorporation de la sonde élevée. A l'opposé, les cellules SK-N-DZ (neuroblastome) montraient une moyenne d'intensité de fluorescence relative inférieure.

Le traitement par F14512 à doses croissantes a entraîné une inhibition dose-dépendante de la croissance cellulaire dans toutes les lignées testées. Néanmoins les lignées cellulaires de neuroblastome sont apparues comme nettement plus sensibles au F14512 que les lignées de gliomes de haut grade. Il a été possible de déterminer des IC50 dans les 4 lignées de neuroblastome. La comparaison avec l'étoposide a montré une cytotoxicité supérieure du F14512 dans tous les cas. Cette cytotoxicité ne semblait pas liée au niveau d'activité du STP.

Des expériences de mise en compétition entre la sonde F17073 et les composés F14512, spermine et etoposide ont permis de confirmer la nécessité du STP dans l'entrée des 3 composés à chaîne spermine dans les cellules de neuroblastome.

L'étude en microscopie confocale a permis de visualiser la distribution de la sonde F17073 suite à son entrée dans les cellules. Cette expérience a été réalisée sur les lignées ayant un plus fort potentiel, les neuroblastomes, et a montré un marquage principalement nucléaire. Bien que le devenir du F17073 ne puisse être formellement transposé à celui du F14512, la localisation majoritairement nucléaire de la sonde, qui possède le même groupement

## Article 2 : F14512 in pediatric tumor cell lines

spermine que le F14512, apparaît comme une donnée encourageante quant à la translocation du F14512 vers le noyau, où se situe principalement la topoisomérase II.

L'activité antitumorale du F14512 a ensuite été évaluée *in vivo* en utilisant un modèle murin bioluminescent de métastases hépatiques de neuroblastome, par injection intraveineuse de cellules SH-SY5Y#Luc. Dans ce modèle, le F14512 administré par voie intraveineuse a été bien toléré, et a induit une réduction de la masse tumorale importante et prolongée.

Forts de ces résultats obtenus avec le F14512 utilisé seul, nous avons testé le potentiel thérapeutique de son association avec le cisplatine, le carboplatine et le melphalan, trois molécules largement utilisées dans le traitement des neuroblastomes. Bien que moins employé que le cyclophosphamide, l'ifosfamide ou encore le témozolomide, le melphalan est employé à hautes doses dans le traitement des neuroblastomes de haut risque, sous couvert d'une réinjection de cellules souches hématopoïétiques. Nous l'avons choisi pour son activité alkylante d'emblée, alors que les autres molécules pré-citées sont en fait des pro-drogues nécessitant une activation par un premier passage hépatique. Ces expériences d'associations ont montré globalement une synergie entre le F14512 et les agents dérivés du platine, et des résultats plus contrastés avec le melphalan.

Enfin, nous avons montré un effet radiosensibilisant du F14512 dans deux des trois lignées cellulaires de neuroblastome testées.

**Ces résultats sont présentés dans l'article qui suit, et qui sera prochainement soumis pour publication.**

**The vectorized anti-cancer drug F14512 demonstrates a higher preclinical activity in neuroblastoma than in pediatric glioma cell lines: first data in pediatric oncology.**

Pierre Leblond<sup>a,b</sup>, Elodie Boulet<sup>b</sup>, Christine Bal-Mahieu<sup>b</sup>, Arnaud Pillon<sup>c</sup>, Anna Kruczynski<sup>c</sup>, Nicolas Guilbaud<sup>c</sup>, Christian Bailly<sup>c</sup>, Thierry Sarrazin<sup>d</sup>, Eric Lartigau<sup>e</sup>, Amélie Lansiaux<sup>b</sup>, Samuel Meignan<sup>b</sup>.

<sup>a</sup>Pediatric Oncology Unit, Centre Oscar Lambret, Lille, France

<sup>b</sup>Antitumoral Pharmacology Laboratory, Centre Oscar Lambret, INSERM U837, Institut pour la Recherche sur le Cancer de Lille (IRCL), University of Lille Nord de France, Lille, France

<sup>c</sup>Research and Development Center Pierre Fabre, Toulouse, France

<sup>d</sup>Medical Physics Unit, Centre Oscar Lambret, Lille, France

<sup>e</sup>Radiotherapy Department, Centre Oscar Lambret, Lille, France

Correspondence to:

Samuel Meignan, Antitumoral Pharmacology Laboratory, Centre Oscar Lambret, 3 Rue Frédéric Combemale, 59020 Lille, France, Phone/Fax: +33 3 20 16 92 20/+33 3 20 16 92 29, email: [samuel.meignan@inserm.fr](mailto:samuel.meignan@inserm.fr)

Short title: F14512 in pediatric tumor cell lines

Key words: F14512, high grade glioma, neuroblastoma, etoposide, targeted therapy, ionizing radiations, Polyamine Transport System, topoisomerase II inhibition, child.

Conflicts of interest: Christian Bailly, Arnaud Pillon, Anna Kruczynski and Nicolas Guilbaud are employed by Pierre Fabre Medicaments, where the products F14512 and F17073 were synthesized.

## Abstract

---

### *Background*

The prognosis of children with high grade glioma (HGG) and high risk neuroblastoma remains poor despite aggressive multidisciplinary therapeutic approaches. There is a crucial need for new treatments in these indications. F14512 combines an epipodophyllotoxin core-targeting topoisomerase II with a spermine moiety introduced as a cell delivery vector. This spermine moiety facilitates selective uptake by tumor cells *via* the Polyamine Transport System (PTS) and reinforces topoisomerase II poisoning. F14512 is currently evaluated in patients with relapse of leukemia. Here we report for the first time the evaluation of F14512 toward pediatric HGG and neuroblastoma cell lines.

### *Materials and methods*

F14512 was evaluated in three pediatric HGG and four neuroblastoma cell lines. PTS activity and specificity were evaluated by confocal microscopy and flow cytometry using the fluorescent probe F17073 which contains the same spermine moiety as F14512. Cytotoxicity of F14512, alone or in association with pertinent chemotherapeutic agents commonly used in neuroblastoma (cisplatin, carboplatin, melphalan), and radio-sensitizing effects were investigated *in vitro* using MTS and clonogenic assays, respectively. The antitumor activity of F14512 was assessed *in vivo* using a bioluminescent liver-metastatic model of neuroblastoma.

### *Results*

An active PTS was evidenced in all tested pediatric cell lines, providing a specific and rapid transfer of spermine-coupled compounds into cell nuclei as assessed in three neuroblastoma cell lines. Competition experiments with spermine confirmed the essential role of the PTS in the cell uptake and cytotoxicity of F14512. This cytotoxicity appeared greater in neuroblastoma compared to HGG cells but seemed independent from the PTS activity levels. Interestingly, F14512 presented a significant higher cytotoxic effect than the reference compound etoposide (lacking the spermine chain). *In vivo* evaluation confirmed an important and prolonged antitumoral effect in neuroblastoma. The combinations of F14512 with cisplatin and carboplatin were found to be often synergistic, and combinations with

melphalan appeared various depending on the cell lines and the drug doses. Finally, we demonstrated the significant radio-sensitizing potential of F14512 in the MYCN-amplified Kelly cell line.

*Conclusion*

F14512 appears more effective than etoposide in pediatric tumor cell lines, with a higher efficacy in neuroblastoma cells. The synergistic effects observed with platinum compounds and its radiosensitizing effect could lead to a great potential development in pediatric oncology.

## INTRODUCTION

---

The considerable progresses made in pediatric oncology in the last 30 years have resulted in the recovery of more than 70% of children treated for cancer. Nevertheless, despite intensive and multidisciplinary approach as evidenced by the multiple clinical trials, the prognosis of certain subtypes of tumors such as malignant gliomas and high risk neuroblastomas remains poor. The standard of care for patients with high grade glioma is surgical resection when feasible followed by radiation therapy and/or chemotherapy. Unfortunately, the median survival for patients with diffuse brain stem glioma is currently 9 to 12 months, depending on the series (Jones 2012).

Moreover, metastatic forms of neuroblastoma occurring in children over 18 months and high-risk tumors harbouring MYCN amplification are difficult to cure despite the use of intensive chemotherapy protocols including high-dose chemotherapy followed by reinfusion of peripheral blood stem cells, radiation therapy and maintenance therapy using 13-cis-retinoic acid, that have been shown to significantly improve survival. However, less than 50% of patients can currently be cured by this strategy, at the cost of significant toxicity (Ladenstein 2011).

Thus, there is a crucial need for new treatments for children with high grade glioma and high risk neuroblastoma.

Recently, a new hybrid compound – so-called F14512 – combining an epipodophyllotoxin core-targeting topoisomerase II with a spermine moiety was designed to be actively carried into cell through the Polyamine Transport System (PTS), which has been known for many years to be particularly active in tumor cells (Pegg 1988, Casero 2009). Thus, this spermine moiety which replace the carbohydrate part of the well-established drug etoposide acts as a cell delivery vector, contributing to reinforce DNA interaction and topoisomerase II poisoning (Barret 2008, Gentry 2011).

Previous *in vitro* study has compared the antiproliferative activity of F14512 and etoposide against a comprehensive panel of 29 human solid or hematologic cancer cell lines (Barret 2008). In this study, F14512 was more cytotoxic than etoposide in 21 cell lines, especially in breast cancer, liposarcoma, melanoma and leukemia cells. The authors established that

F14512 was a highly potent topoisomerase II poison *in vitro*. Its high capacity to stabilize cleavable complexes is most likely attributable to its reinforced DNA binding capacity via the polyamine tail. These promising results were thereafter confirmed in a panel of 13 leukemia cell lines, and *in vivo* in xenograft models of leukemia, breast cancer, sarcoma and lung cancer (Annereau 2010, Kruczynski 2011, Kruczynski 2013).

The first-in man multicenter phase I trial of F14512 as a single drug conducted in adult patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia showed a favorable toxicity profile and significant anti-leukemic activity at different dose levels (De Botton 2012). A phase II trial about F14512 in combination with cytosine arabinoside is currently ongoing. Considering the specificity of histopathological and biological pediatric glioma profiles, and the lack of data concerning F14512 in glioma and neuroblastoma, there is a need for specific pediatric study in this field. This is particularly relevant as etoposide is a drug widely used for the treatment of neuroblastoma. Therefore, we decided to conduct an *in vitro* study on F14512 in various pediatric glioma and neuroblastoma cell lines. First of all, we characterized the PTS activity, using the previously described fluorescent probe F17073 which bears the same spermine moiety as F14512. F14512 and etoposide were subsequently evaluated in 3 pediatric high grade glioma and 4 neuroblastoma cell lines. The antiproliferative activities of F14512 and etoposide were compared and combination with carboplatin, cisplatin, melphalan and ionizing radiations were performed. The choice of these treatments was guided by the fact that there are widely used in clinical practice in neuroblastoma.

## MATERIAL AND METHODS

---

### ***Chemicals and drugs***

F14512 and F17073 were kindly provided by Pierre Fabre Research Institute (Pierre Fabre Médicament, Castres, France). Etoposide, cisplatin, carboplatin, melphalan and spermine were purchased from Sigma-Aldrich.

### ***Cell lines and culture***

Human pediatric high grade glioma cell lines (SF188, KNS42, UW479,) were kindly provided by Dr. Bax (Pediatric Oncology, The Institute of Cancer Research, Sutton, UK) and have previously been characterized (Bax). Cells were grown in F12 Ham medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) or 20% FBS for UW479 and KNS42. Neuroblastoma cell lines (SH-SY5Y, SK-N-AS, SK-N-DZ, Kelly) were grown in DMEM medium supplemented with 10% FBS, 1% non-essential amino acid solution and 1% L-Glutamine for SH-SY5Y and Kelly. Neuroblastoma cell lines were obtained from the American Type Culture Collection, except for Kelly cells kindly provided by Dr Luc Buée (INSERM U937, Lille, France). All culture media contained 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. Cells were maintained as monolayer culture in a humidified incubator at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. All cell culture products were from Invitrogen.

For *in vivo* experiments, SH-SY5Y neuroblastoma cells were grown in a 1:1 mixture of MEM and F12 medium supplemented with 10% FBS, 100µg/ml penicillin-streptomycin and NEAA. Cells have been stably transfected at Pierre Fabre Laboratories with a plasmid containing the firefly luciferase gene to generate the SH-SY5Y-Luc#7 cell line, a bioluminescent reporter tool for *in vivo* assays.

### **Flow cytometry**

Cells were seeded at  $8 \times 10^4$  cells per well in 12-well plates in appropriate medium. After 24 hours, the medium was replaced by FBS-free medium containing  $1\mu\text{M}$  of F17073 and  $10\mu\text{M}$  of spermine, F14512 or etoposide. After 2 hours at  $37^\circ\text{C}$ , cells were washed twice with PBS containing  $1\mu\text{M}$  of spermine, and then isolated by exposure to trypsin, and the intracellular fluorescence was monitored by flow cytometry using the 525-575nm channel (CyanADP, Beckman Coulter). Data analysis was done with the Summit 4.3 software and results were expressed as Mean Fluorescence Intensity (MFI). Untreated cells were used as auto fluorescent control. The  $\Delta\text{MFI} = \text{MFI considered} / \text{MFI control}$ . The competition ratio (CR) was determined as  $\Delta\text{MFI [F17073]} / \Delta\text{MFI [F17073 + competing compound]}$ .

### **Confocal microscopy**

Cells were seeded in 8 chambers slides (LAB-TEK CC2, Brand Products) at  $1.10^5$  cells per well. After 24 hours, the medium was replaced by fresh medium containing  $1\mu\text{M}$  F17073 for 3 hours at  $37^\circ\text{C}$ . Then cells were washed with PBS and fixed for 20 minutes in the dark at  $4^\circ\text{C}$  with 2% paraformaldehyde. Samples were stained with 100 nM phalloidin (Acti-stain 555, Cytoskeleton) for 30 minutes and DAPI (VECTASHIELD, Vector Laboratories) in the dark, and then mounted. Images were obtained with confocal microscope Zeiss LSM 710 using 63x magnification.

### **Growth inhibition assay**

Glioma and neuroblastoma cells were seeded respectively at  $3 \times 10^3$  cells and  $5 \times 10^3$  per well in 96-well plates. After 24 hours, the medium was replaced with medium containing increased concentrations of F14512 or etoposide. Cells were incubated during 72 hours, then 20  $\mu\text{L}$  of MTS (Promega) were added per well for 1 hour at  $37^\circ\text{C}$ . Absorbance was read at 492 nm using spectrophotometer (SPECTRAmax, Molecular Devices).  $\text{IC}_{50}$  values were obtained from the cytotoxicity curves using the SOFTmax PRO software.

***Antitumor activity of F14512 in a liver-metastatic model of neuroblastoma.***

*Mice.* 6-weeks old female Balb/c nude mice (Balb/cAnNRJ-Foxn1<sup>nu</sup>, Janvier Labs) were intravenously injected with SH-SY5Y-Luc#7 tumor cells. Animals were handled and cared for in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council, 1996) and the European Directive EEC/86/609, under the supervision of authorized investigators.

*Bioluminescence imaging.* Bioluminescence imaging was performed with a highly sensitive cooled CCD camera mounted in a light-tight box (NightOWL LB 983 NC100, Berthold Technologies). Animals were peritoneally injected with 125mg/kg body weight luciferin potassium salt (Caliper Life Sciences) in phosphate buffered saline which gave rise to a luminescent signal that was maximal 10 minutes later and remained stable for 10 more minutes. Acquisition settings (binning and duration) were set up depending on tumor lighting. The photons emitted from tumor cells were collected upon the CCD, integrated and the data were expressed as photon flux (photons/pix/sec) using WinLight software (Berthold).

*Drug preparation.* F14512 was initially dissolved in NaCl 0.9% and filtered (0.2µm). Concentration was set at 0.125mg/ml in vehicle and solution was intravenously injected to mice at 10ml/kg in order to reach a final concentration of 1.25mg/kg body weight.

*Experimental chemotherapy.* All experiments were conducted in compliance with French regulations and local ethical committee guidelines, based on the UKCCCR guidelines for the welfare of animals in experimental neoplasia, as detailed previously (Kruczynski 1998). Exponentially growing SH-SY5Y-Luc#7 cells ( $2.5 \times 10^6$ ) were injected intravenously into the tail vein of Balb/c nude mice (day 0). After bioluminescence-based randomisation in treatment cages at day 13, F14512 was given i.v. at 1.25mg/kg body weight according to the following schedule: three times a week over two weeks. Mice were checked daily, with any adverse clinical reactions noted and deaths recorded. Mice were weighed three times a week during treatment period. Mice were imaged in bioluminescence 2 times weekly and quantifications were given in photons/pix/sec.

### **Drug combinations**

Growth inhibition induced by drug combinations was assessed *in vitro* using MTS assay as previously described. Experiments were performed with F14512 combined with carboplatin, cisplatin or melphalan, chosen for their frequent use in neuroblastoma management. IC<sub>50</sub> values of cisplatin, carboplatin and melphalan were beforehand determined using MTS assay (Data not shown). Neuroblastoma cells were seeded respectively at  $5 \times 10^3$  per well in 96-well plates in appropriate medium. After 24 hours, the medium was replaced by medium containing increased concentrations of compounds ( $0.125 \times \text{IC}_{50}$  to  $16 \times \text{IC}_{50}$ ) alone and in combination. After MTS measurement for each combination, the ED<sub>50</sub>, ED<sub>75</sub> and ED<sub>90</sub> values were calculated. The Combination Index (CI) was defined as the quantitative measure of the degree of drug interaction in terms of additive effect (CI = 1), synergistic effect (CI < 1), or antagonistic effect (CI > 1), as previously described by Chou and Talalay, using means of the CalcuSyn software (Biosoft) (Chou 1984). Experimental measurements were considered as significant if  $r > 0.9$ .

### **Clonogenic assay**

Neuroblastoma cells (SH-SY5Y, Kelly, SK-N-AS) were seeded at 500 cells per well in 12-well plates in complete appropriate culture medium. After 24 hours of incubation at 37°C, the medium was replaced by medium containing etoposide or F14512 at different doses corresponding to IC<sub>50</sub> for each drug and each cell line during 6 hours. Then drugs were eliminated by medium removing and washing and cells were irradiated with 0, 2, 4 or 6 Grays using an 80 keV photon contact irradiator (Darpac 2000). The dose rate was 0.95 Gy/min. After treatment, cells were maintained for 8–10 days in 37°C culture incubator, and colonies were revealed by crystal violet staining and counted. The Plating Efficiency (PE) is the ratio [number of colonies at 0 Gray / number of seeded cells] and the survival rate is the ratio [number of colonies after irradiation / (PE x number of seeded cells)]. After 10 days, survival curves were drawn using GraphPad Prism3.0 software in logarithmic scale.

***Data and Statistical analysis***

IC<sub>50</sub> values are presented as the mean ± Standard Deviation. The statistical significance was evaluated with Student's *t* test. Irradiation survival curves were compared with ANOVA test. A  $p < 0.05$  was considered as significant.

## RESULTS

---

### ***PTS activity and sensitivity to F14512 and etoposide of neuroblastoma and pediatric HGG cell lines***

The PTS activity in the three pediatric HGG and the four neuroblastoma cell lines was assessed through the uptake of the fluorescent probe F17073 by flow cytometry.  $\Delta$ MFI values indicated a significant uptake of the probe in all cell lines. In pediatric HGG cells,  $\Delta$ MFI values were respectively 45.8, 61.1 and 45.2 in KNS42, SF188 and UW479. In neuroblastoma cells,  $\Delta$ MFI values were respectively 44.8, 66.3, 152.0, and 4.2 in Kelly, SH-SY5Y, SK-N-AS and SK-N-DZ.

Next, we tested F14512 cytotoxicity compared to etoposide, using a MTS assay in the 7 cell lines (Figure 1A). It was not possible to determine any  $IC_{50}$  value in HGG cell lines, which appeared to be weakly sensitive to both drugs. Nevertheless, SF188 cells were sensitive to F14512 in a dose-dependent manner, and F14512-induced cytotoxicity appeared at lower concentrations compared to etoposide. Considering neuroblastoma cell lines, F14512 appeared significantly more potent (lower  $IC_{50}$  values) than etoposide in all cases. The mean  $IC_{50}$  values of F14512 and etoposide were respectively 0.076  $\mu$ M vs 1.518  $\mu$ M in Kelly, 0.017  $\mu$ M vs 0.754  $\mu$ M in SH-SY5Y, 0.303  $\mu$ M vs 1.712  $\mu$ M in SK-N-AS and 1.485  $\mu$ M vs 5.485  $\mu$ M in SK-N-DZ cells (Figure 1B). The  $IC_{50}$  ratio between etoposide and F14512 ( $IC_{50}$  etoposide/ $IC_{50}$  F14512) was 20 for Kelly, 44.4 for SH-SY5Y, 5.6 for SK-N-AS and 3.7 for SK-N-DZ. Interestingly, the difference is lower for SK-N-DZ cell line showing the lowest uptake of the probe F17073, i.e. the lowest PTS activity (Table 1). These observations led us to focus our subsequent investigation on neuroblastoma PTS-positive cell lines, highly sensitive to F14512.

### ***Subcellular localization of F17073 fluorescent probe in neuroblastoma cells***

Confocal microscopy was performed in our 4 neuroblastoma cell lines and revealed in three of them that after 3 hours of incubation, the incorporated probe was mainly localized in cell nuclei. The low adhesion of SK-N-DZ cells on microscopy support did not allow for the experiment. In the 3 other cell lines, the green fluorescence of F17073 appeared intense in the cell nuclei (binding of the spermine polycation to DNA) but weak in the cytoplasmic

compartments. This weak cytoplasmic fluorescence was especially evident in SH-SY5Y cells (Figure 2).

### ***PTS-dependent cell uptake and cytotoxic activity***

To confirm the implication of the PTS for the cell uptake of both spermine-coupled compounds, we measured the cell uptake of F17073 in competition with spermine, F14512 or etoposide as a control in the four neuroblastoma cell lines.

In all cell lines, adding spermine in the culture medium induced a drastic decrease of  $\Delta\text{MFI}$  that revealed the direct competition between spermine and F17073 for cell entry (Table 1). In the same manner, F14512 prevented the uptake of F17073 through the PTS to a level almost equivalent to that observed with spermine. In sharp contrast, etoposide (lacking the polyamine moiety) did not affect F17073 uptake.

### ***Antitumor activity of F14512 in a liver-metastasis model of neuroblastoma***

The antitumor activity of F14512 was evaluated *in vivo* using a bioluminescent liver-metastatic model of neuroblastoma. SHSY5Y neuroblastoma cells stably expressing the firefly luciferase enzyme transgene were generated, and injected intravenously into BALB/c nude immunodeficient mice. As shown in Figure 3, the bioluminescent activity was markedly elevated at day 30 of cancer progression in the untreated control group. A strongly reduced intensity of bioluminescence, demonstrating a change of the tumor burden, was observed in all mice treated i.v. with F14512 at the optimal dose of 1.25 mg/kg/day. F14512 significantly retarded the growth of SHSY5Y cells *in vivo*. The delay in tumor growth is homogeneous in all mice treated with the drug and globally, a tumor growth inhibition rate of 77.2% was calculated ( $T/C_{d30} = 22.8\%$ ). The T/C bioluminescence ratio (signal of treated vs. control groups) was reduced to about 20% from day 22 to 38. The effect was less pronounced at the lower dose of 0.63 mg/kg/inj but in this case an antitumour activity was also clearly evidenced (data not shown). At 1.25 mg/kg/inj, a re-growth of the tumor was observed only about two weeks after the cessation of the drug treatment, illustrating a prolonged effect of the drug. Furthermore, administration of 1.25 mg/kg F14512 did not result in any significant

body weight loss (no median body weight loss in excess of 2.5%) or drug related death, suggesting that the treatment was well tolerated.

### ***F14512 combination with cisplatin, carboplatin and melphalan***

We tested the combination of F14512 with three cytotoxic drugs often used in the treatment of neuroblastoma, the platinum compounds cisplatin and carboplatin, and the alkylating agent melphalan. For each combination performed in three neuroblastoma cell lines (Kelly, SH-SY5Y, SK-N-AS), the Combination Index (CI) of each ED50, ED75 and ED90 values were calculated. CI values  $< 1$  reflect a synergistic effect, whereas CI values  $> 1$  indicate an antagonistic effect. In Kelly cell line, the Chou and Talalay's method revealed that the combination between F14512 and the two platinum compounds was significantly synergistic whatever the doses tested, whereas globally additive effect was observed with melphalan. In contrast, in SH-SY5Y cells, slightly synergistic effects were observed with platinum compounds at higher doses whereas more synergistic effect occurred with melphalan whatever the doses. Finally, the combinations between F14512 and cisplatin and carboplatin appeared synergistic at higher doses in SK-N-AS cells but combination with melphalan was significantly antagonistic (Table 2). Taken together, these combination studies have generally shown a synergy between F14512 and platinum compounds, and an additive or a synergic effect with melphalan depending on the doses and the cell lines.

### ***Radio-sensitizing effect of F14512***

To evaluate the potential radio-sensitizing effect of F14512 in comparison with etoposide, neuroblastoma cell survival was measured by clonogenic assay after exposure to radiation, up to 6 Gy, in the absence or presence of a fixed dose of F14512 or etoposide. The survival curves showed a drastic radio-sensitizing effect of F14512 at 2, 4 and 6 Gy in Kelly cells. This radiosensitizing effect was significantly higher than that of etoposide (data not shown). A relative similar effect was observed in SH-SY5Y cells at 6 Gy. No significant radiosensitizing effect could be demonstrated in SK-N-AS cell lines (Figure 3).

## DISCUSSION

---

The poor prognosis of children with high grade glioma (HGG) and high risk neuroblastoma calls for the introduction of new therapeutic strategies (Ladenstein 2011, Jones 2012). The main issues for these diseases are different. While the goal for HGG remains to improve the overall survival, the objective in neuroblastoma is also to reduce the toxicities of treatment which is particularly aggressive. Indeed, the European current strategy for high risk neuroblastoma is based on induction chemotherapy, surgery of the primary tumor, high-dose chemotherapy containing melphalan, followed by local irradiation and maintenance therapy with isotretinoin. Sensitivity to chemotherapeutic agents is also different. Neuroblastomas are often highly chemo sensitive, and most of cytotoxic agents have demonstrated efficacy. Among them, etoposide, an epipodophyllotoxin topoisomerase II inhibitor, is largely used in combination with other cytotoxic drugs or as a single drug in a palliative approach leading to objective responses. By contrast, HGG are usually resistant to chemotherapy, with an overall response rate lower to 20% (Chastagner 2001). In this context, the development of drugs exploiting an original currently untapped targeting strategy as the polyamine transport system (PTS) could represent a novel option for the management of several tumor pathologies (Pegg 1988, Seiler 1996, Casero 2009).

The PTS-vectorized topoisomerase II inhibitor F14512 was designed to target tumor cells presenting an active PTS (Barret 2008) and has demonstrated a favorable toxicity profile with objective responses in phase I study in adult patients with refractory leukemia (De Botton 2012). A phase II clinical trial is currently ongoing in this indication. This promising drug had revealed previously potent antitumor activities in a panel of tumor xenografts, including lung, breast and colon cancers for examples (Kruczynski 2011). F14512 bears a structural analogy with the epipodophyllotoxin etoposide but it is considerably more potent in terms of topoisomerase II inhibition (Gentry 2011) and drug-induced cell death (Brel 2011, Ballot 2012). Interestingly, previous study has shown that the cytotoxic action of F14512 is extremely rapid (within 3 hours) and does not lead to a marked accumulation in the S-phase of the cell cycle, unlike etoposide (Brel 2011). In a leukemia model, the mechanism of drug-induced cell death seems to be distinct for F14512 compared to etoposide, as A549 cells treated with F14512 were less prone to undergo apoptosis or autophagy but preferentially entered into senescence. This difference may account for the distinct activity of the two

drugs. Then, this superiority of F14512 compared to etoposide prompted us to evaluate the potential interest of the drug in pediatric HGG and neuroblastoma cell lines.

In our study, we observed in all tested cell lines a various incorporation of the PTS vectorized probe F17073 which was designed to apprehend the cell uptake of the drug F14512 (Guminski 2009, Annereau 2010). Interestingly, F14512 appeared more cytotoxic than etoposide in all cell lines, but, as expected, the cytotoxic effect of both drugs was clearly higher in neuroblastoma than in HGG cell lines in which no IC<sub>50</sub> values have been obtained. Moreover the cytotoxicity profiles of both drugs in neuroblastoma cells appeared stackable, suggesting that, although that F14512 had a higher cytotoxic effect, characteristics conferring sensitivity to etoposide apply to F14512. These results are in accordance with the data obtained by Barret *et al.* in a panel of 29 various tumor cell lines (Barret, 2008). In our study, the cytotoxicity of F14512 seemed to be not directly related to the PTS activity level as evaluated with F17073 uptake. Annereau *et al.* had investigated the antiproliferative effect of F14512 against 13 leukemia cell lines and demonstrated a statistically significant correlation with the level of PTS activity (Annereau 2010). We could hypothesize that the cytotoxicity could be dependent on numerous and various factors, and we can assume that cell lines derived from solid tumors could be more heterogeneous than cells derived from leukemia. Nevertheless, focusing on the neuroblastoma cell lines, we demonstrated a strong and specific spermine-coupled compounds uptake through the PTS. In particular, the competition experiments with spermine indicate that F14512, but not etoposide, is well vectorized in these cells through the PTS. Moreover, following its intracellular uptake, the spermine-coupled probe seems to be preferentially conveyed into cell nuclei, the pharmacological site of action of topoisomerase inhibitors.

The potent cytotoxicity of F14512 demonstrated *in vitro* in neuroblastoma cell lines was confirmed *in vivo* for the first time in an original intrahepatic neuroblastic metastases model using a luciferase xenograft. This model appeared particularly relevant regarding the high frequency of hepatic, bone or bone marrow metastatic forms of high risk neuroblastoma. This luciferase xenograft model using bioluminescence imaging is an ideal tool for non-invasive, quantitative monitoring of primary tumor progression/regression and metastasis to distant organs in animal models. It is also a very convenient model to evaluate effectiveness of therapy, monitored following injection of the luciferase substrate luciferin, using *in vivo*

imaging of bioluminescence emission from the cancer cells. SHSY5Y-Luc cells demonstrated a progressive and reproducible growth in the liver after intravenous injection. Thirteen days after injection, animals started to be analyzed for tumor growth. Although the emitted luciferase signal is generally limited by absorption and scattering of the bioluminescent signal through tissues, the emission is sufficiently intense to follow the tumor burden, providing thus a robust intrahepatic metastases model suitable for treatment evaluation. We showed that F14512 significantly retarded the growth of SH-SY5YLuc cells *in vivo*, leading to a significant and prolonged tumor growth inhibition.

In a preclinical study using xenografts models from established acute myeloid leukemia (AML) cell lines or patient primary AML samples, Kruczynski *et al.* reported *in vitro* synergistic anti-leukemic effects of F14512 in combination with cytosine arabinoside, doxorubicin, gemcitabine, bortezomib and SAHA (Kruczynski 2013). In order to assess the potential of F14512 in combination with cytotoxic drugs commonly used with etoposide in the treatment of neuroblastoma, we decided to study the association of the drug with two platinum compounds – cisplatin and carboplatin – and the alkylating agent, melphalan. In our study, we showed a synergistic effect of F14512 with platinum agents at ED<sub>75</sub> and ED<sub>90</sub> in all cell lines, in accordance with previous results obtained in our laboratory in head and neck squamous cell carcinoma cell lines (Mouawad *et al.*, *in press*). Results with melphalan were more various depending on the doses and the tested cell line.

Radiation therapy has an important role for the local control of the primary tumor in children with high risk neuroblastoma. Its antitumoral activity could be enhanced with a concomitant radiosensitizing agent as in malignant glioma in which temozolomide is commonly administered (Stupp 2005). In our study, we showed a significant radiosensitizing effect of F14512, superior of that of etoposide in Kelly cells. Curiously, this radiosensitizing effect was not found in SH-SY5Y and SK-N-AS cell lines. This is possibly related to the treatment schedule we choose. Nevertheless, we note with interest that the radiosensitizing effect was greater in cells that present *MYCN* amplification (Schwab 1983). These data need to be confirmed in mouse models of *MYCN*-amplified neuroblastoma, as these neuroblastoma subtypes have a particularly poor prognosis.

## Article 2 : F14512 in pediatric tumor cell lines

In conclusion, this study for the first time demonstrates the potent *in vitro* cytotoxicity of the polyamine-vectorized anti-cancer drug F14512 in neuroblastoma cells, and its strong anti-metastatic effects *in vivo* in a neuroblastoma tumor metastasis model. Taken together, our results provide a strong rationale for further clinical investigation in children with high risk neuroblastoma. As suggested by Kruczynski *et al.*, the use of fluorophor-labeled polyamine probes could be used to identify tumors expressing an active PTS and guide the selection of patients that might be treated with F14512 (Kruczynski 2011).

## REFERENCES

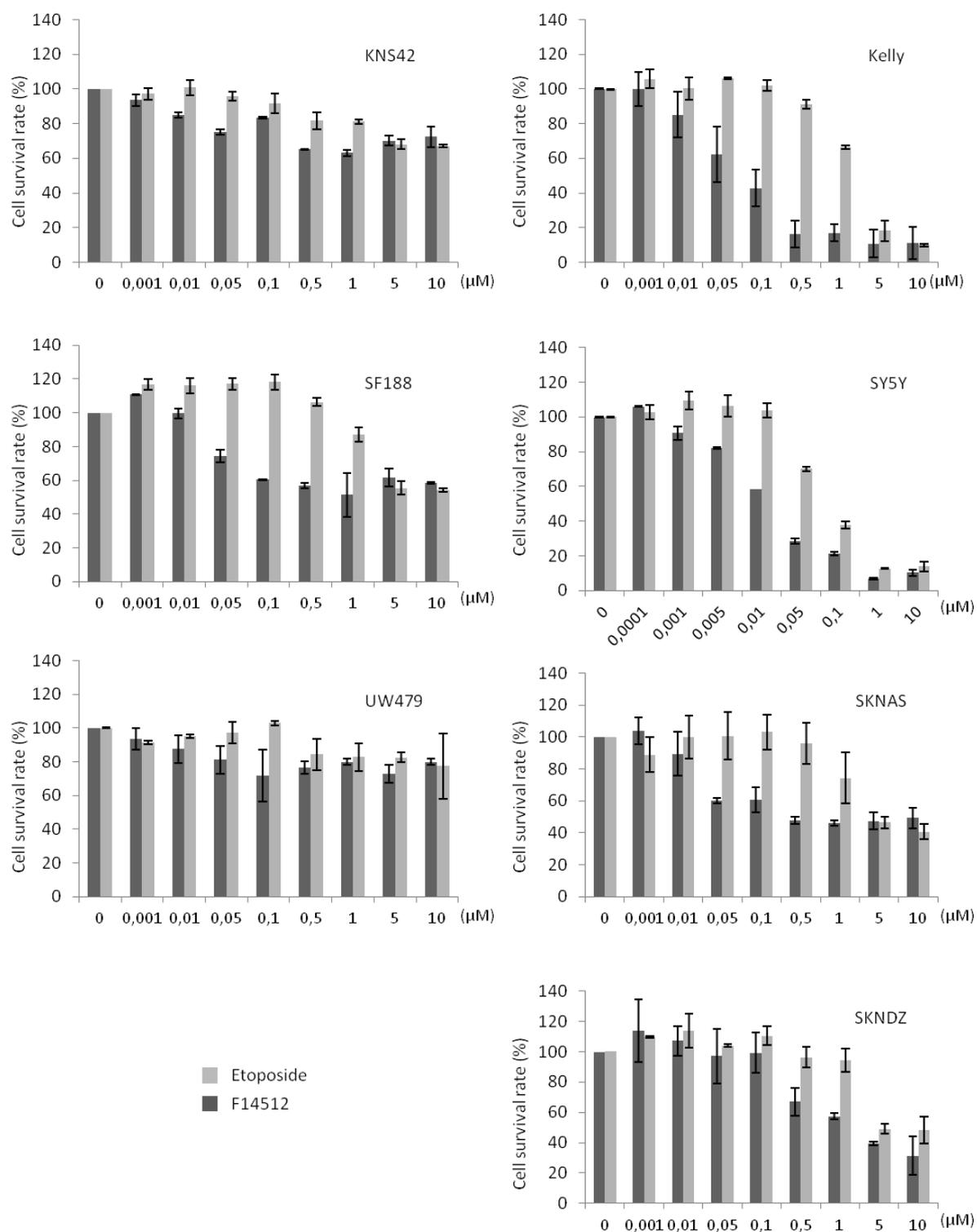
---

- **Annereau JP, Brel V, Dumontet C, Guminski Y, Imbert T, Broussas M, et al.** A fluorescent biomarker of the polyamine transport system to select patients with AML for F14512 treatment. *Leuk Res* 2010;34:1383-9.
- **Ballot C, Jendoubi M, Kluza J, Jonneaux A, Laine W, Formstecher P, et al.** Regulation by survivin of cancer cell death induced by F14512, a polyamine-containing inhibitor of DNA topoisomerase II. *Apoptosis* 2012;17:364-76.
- **Barret JM, Kruczynski A, Vispe S, Annereau JP, Brel V, Guminski Y, et al.** F14512, a potent antitumor agent targeting topoisomerase II vectored into cancer cells via the polyamine transport system. *Cancer Res* 2008;68:9845-53.
- **Bax DA, Little SE, Gaspar N, Perryman L, Marshall L, Viana-Pereira M, et al.** Molecular and phenotypic characterisation of paediatric glioma cell lines as models for preclinical drug development. *PLoS One* 2009;4:e5209.
- **Brel V, Annereau JP, Vispe S, Kruczynski A, Bailly C, Guilbaud N.** Cytotoxicity and cell death mechanisms induced by the polyamine-vectorized anti-cancer drug F14512 targeting topoisomerase II. *Biochem Pharmacol* 2011;82:1843-52.
- **Casero RA, Jr., Woster PM.** Recent advances in the development of polyamine analogues as antitumor agents. *J Med Chem* 2009;52:4551-73.
- **Chastagner P, Bouffet E, Grill J, Kalifa C.** What have we learnt from previous phase II trials to help in the management of childhood brain tumours? *Eur J Cancer* 2001;37:1981-93.
- **Chou TC, Talalay P.** Quantitative analysis of dose-effect relationships: The combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enz Regul* 1984;22:27-55.
- **De Botton S, Berthon C, Bulabois C, Prebet T, Vey N, Chevallier P.** F14512 a novel polyamine-vectorized anti-cancer drug targeting topoisomerase II in adults patients with acute myeloid leukemia (AML): results from a Phase 1 study. *EHA 17th Congress, Amsterdam* 2012:14-17.
- **Gentry AC, Pitts SL, Jablonsky MJ, Bailly C, Graves DE, Osheroff N.** Interactions between the etoposide derivative F14512 and human type II topoisomerases: implications for the C4 spermine moiety in promoting enzyme-mediated DNA cleavage. *Biochemistry* 2011;50:3240-9.
- **Guminski Y, Grousseau M, Cugnasse S, Brel V, Annereau JP, Vispe S, et al.** Synthesis of conjugated spermine derivatives with 7-nitrobenzoxadiazole (NBD), rhodamine and bodipy as new fluorescent probes for the polyamine transport system. *Bioorg Med Chem Lett* 2009;19:2474-7.
- **Jones C, Perryman L, Hargrave D.** Paediatric and adult malignant glioma: close relatives or distant cousins? *Nat Rev Clin Oncol* 2012;9:400-413.

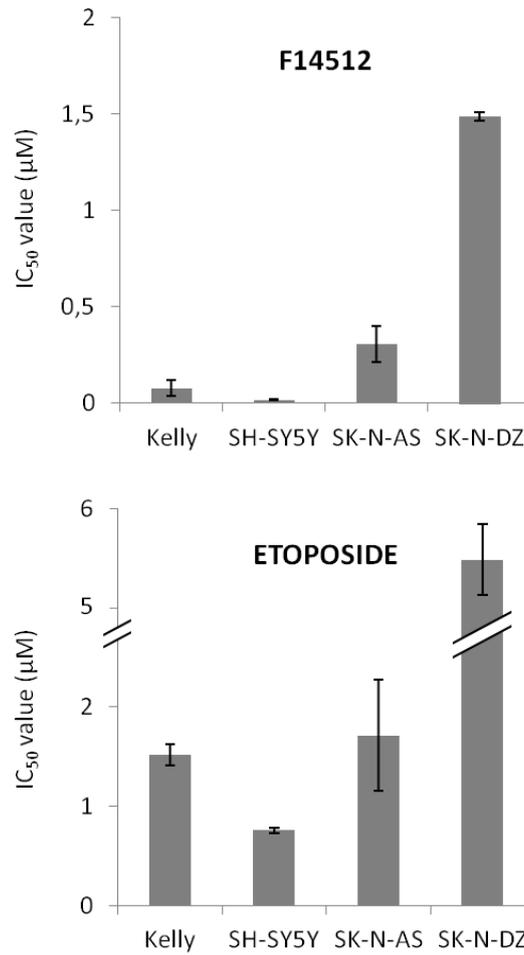
- **Kruczynski A, Colpaert F, Tarayre J-P, Mouillard P, Fahy J, Hill BT.** Preclinical *in vivo* antitumor activity of vinflunine, a novel fluorinated Vinca alkaloid. *Cancer Chemother Pharmacol* 1998;41:437-447.
- **Kruczynski A, Pillon A, Créancier L, Vandenberghe I, Gomes B, Brel V, et al.** F14512, a polyamine-vectorized anti-cancer drug, currently in clinical trials exhibits a marked preclinical anti-leukemic activity. *Leukemia* 2013 [Epub ahead of print]
- **Kruczynski A, Vandenberghe I, Pillon A, Pesnel S, Goetsch L, Barret JM, et al.** Preclinical activity of F14512, designed to target tumors expressing an active polyamine transport system. *Invest New Drugs* 2011;29:9-21.
- **Ladenstein RL, Poetschger U, Luksch R, Brock P, Castel V, Yaniv I, et al.** Busulphan-melphalan as a myeloablative therapy (MAT) for high-risk neuroblastoma: Results from the HR-NBL1/SIOPEN trial. *ASCO congress 2011*, 79897-102. *J Clin Oncol* 29: 2011 (suppl; abstr 2).
- **Mouawad F, Gros A, Rysman B, Bal-Mahieu C, Bertheau C, Horn S, et al.** The antitumor drug F14512 enhances cisplatin and ionizing radiation effects in head and neck squamous cell carcinoma lines. *Submitted to Oral Oncology*
- **Pegg AE.** Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and a target for chemotherapy. *Cancer Res* 1988;48:759-74.
- **Schwab M, Alitalo K, Klempnauer KH, Varmus HE, Bishop JM, Gilbert F, et al.** Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature* 1983;305:245-8.
- **Seiler N, Delcros JG, Moulinoux JP.** Polyamine transport in mammalian cells. An update. *Int J Biochem Cell Biol* 1996;28:843-61.
- **Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ et al.** Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;352:987-96.

FIGURES

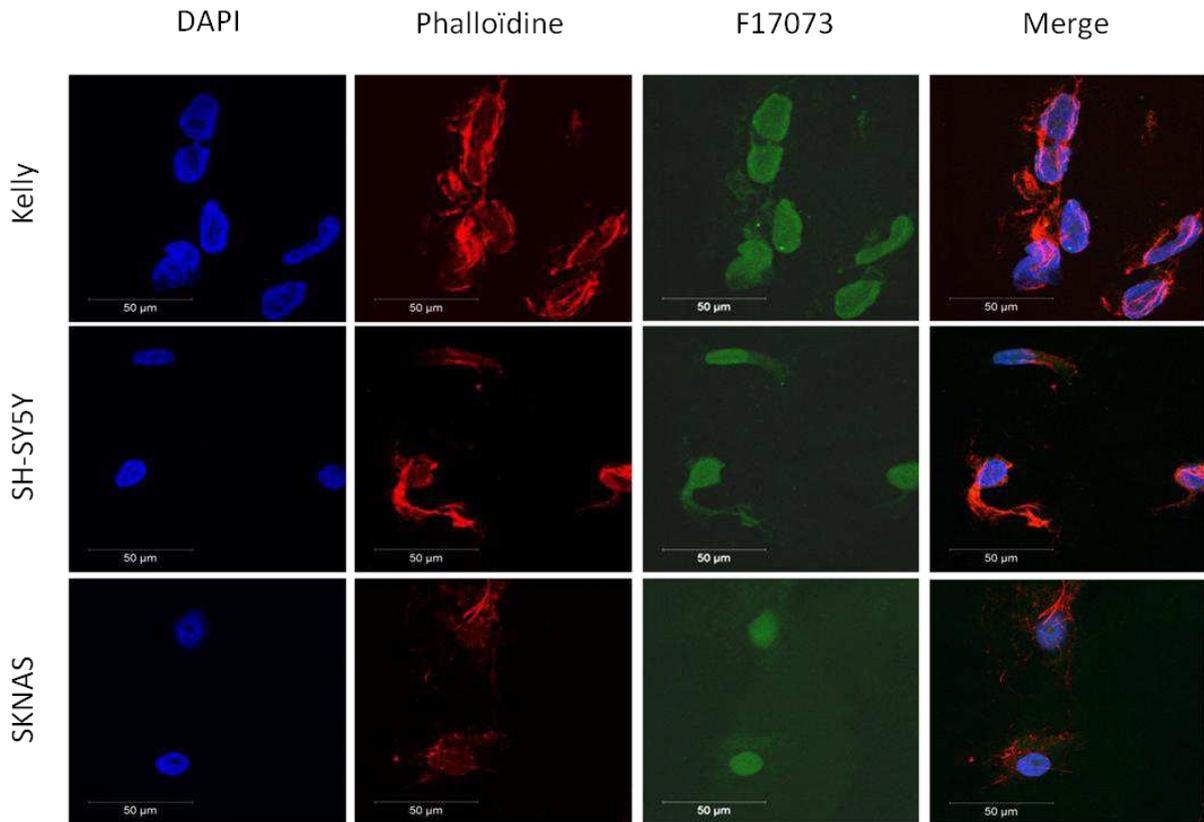
A.



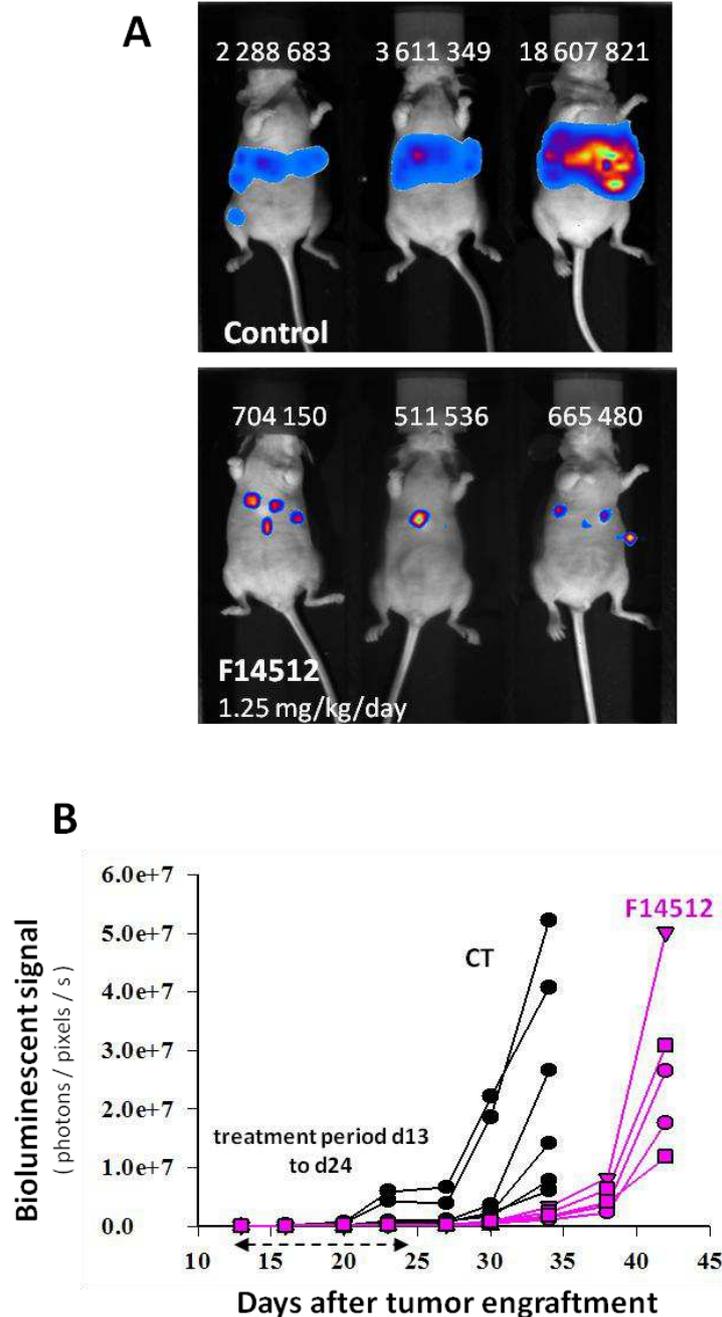
**B.**



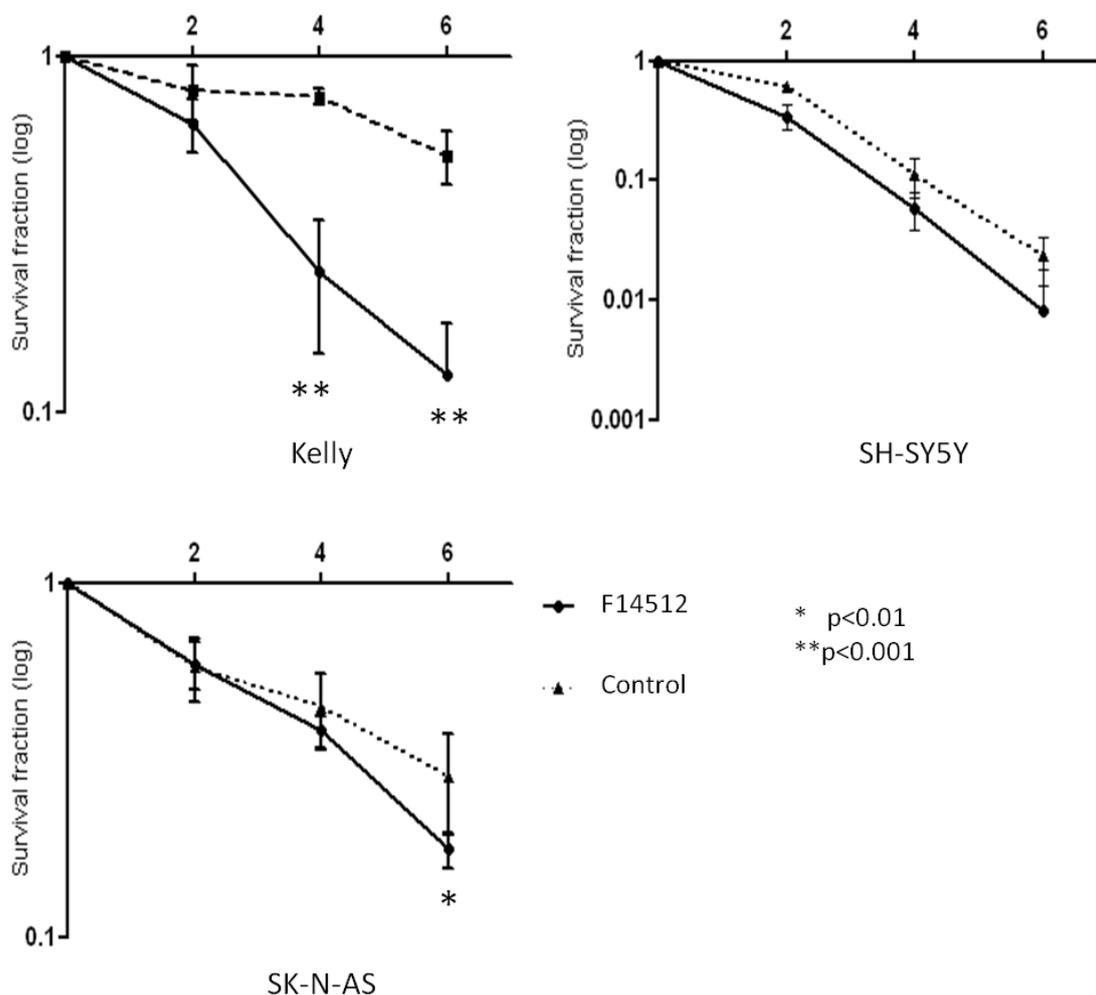
**Figure 1: A. F14512 cytotoxicity compared to etoposide in pediatric high-grade glioma and neuroblastoma cell lines.** Growing cells are treated with 0 to 10 μM of F14512 or etoposide for 72 hours. The viable cell population is then determined using MTS assay. Histograms represent the percentage of viable cells for each concentration of compounds. **B. IC<sub>50</sub> values of F14512 and etoposide in neuroblastoma cell lines** determined from A.



**Figure 2: Sub cellular localization of fluorescent probe F17073 in neuroblastoma cells.** Intracellular localization of probe (green) was visualized by confocal microscopy after 3 hours exposure to 1  $\mu$ M F17073. Cell nucleus and cytoskeleton were respectively stained with DAPI (blue) and phalloidin (red). Pictures were obtained by Zeiss LSM 710 confocal microscopy using objective x63.



**Figure 3: Antitumor activity of F14512 in a liver-metastasis model of neuroblastoma.** SHSY5Y-Luc neuroblastoma cells that reach liver start developing measurable tumors after 22-27 days of i.p. injection. F14512 (given i.v. at 1.25 mg/kg/day) treatment started on 13<sup>th</sup> day of tumor cell implantation, up to the 24<sup>th</sup> day (treatment schedule: three times a week over two weeks). Mice were imaged periodically. **A.** The bioluminescence signal was collected using a NightOWL LB 983 NC100 (Berthold Technologies) *in vivo* animal imager. Typical images collected at day 30 in the control and treated groups are presented. **B.** Quantification of the bioluminescent signal (photons/pixels/s) plotted against time (days) to obtain tumor growth curves. The signal intensity from each mouse was reported (individual curves).



**Figure 4: Radio-sensitizing effect of F14512 in neuroblastoma cells.** The combination effect of F14512 with ionizing radiations was determined by clonogenic assay. Cells were treated with 1 $\mu$ M F14512 for 6 hours, then washed and irradiated at 0, 2, 4 and 6 grays using an 80 keV photon contact irradiator (Darpac 2000). After 8-10 days Cells were fixed and stained with crystal violet. Colonies were counted with the naked eye. Survival fraction is expressed in logarithmic scale. \*p<0.01; \*\*p<0.001.

## TABLES

		Kelly	SH-SY5Y	SK-N-AS	SK-N-DZ
F17073	$\Delta$ MFI	44,83	66,28	152	4,24
F17073 + Spermine	$\Delta$ MFI	8,82	5,29	3,44	1,67
	CR	5,08	12,53	44,19	2,54
F17073 + F14512	$\Delta$ MFI	11,25	7,75	8,97	1,82
	CR	3,98	8,55	16,95	2,33
F17073 + Etoposide	$\Delta$ MFI	45,65	60,65	156	4,83
	CR	0,98	1,09	0,97	0,88

**Table 1: PTS activity in neuroblastoma cell lines.** Cells were seeded in FBS-free medium containing 1 $\mu$ M of F17073 fluorescent probe and 10  $\mu$ M of spermine, F14512 or etoposide. After 2 hours at 37°C, cells were washed twice with PBS containing 1 $\mu$ M of spermine, and then isolated. The intracellular fluorescence was monitored by flow cytometry and results were expressed as Mean Fluorescence Intensity (MFI). Untreated cells were used as auto fluorescent control. The  $\Delta$ MFI = MFI considered / MFI control. The competition ratio (CR) was determined as  $\Delta$ MFI [F17073] /  $\Delta$ MFI [F17073 + competing compound].

		Combination Index (mean)			
		ED 50	ED 75	ED 90	r
<b>Kelly</b>	F14512 + cisplatine	0.96 +/- 0.02	0.92 +/- 0.07	0.9 +/- 0.12	0.96 +/- 0.01
	F14512 + carboplatine	0.84 +/- 0.07	0.82 +/- 0.06	0.81 +/- 0.08	0.96 +/- 0.01
	F14512 + melphalan	1.10 +/- 0.26	1.00 +/- 0.15	0.92 +/- 0.10	0.98 +/- 0.01
<b>SH-SY5Y</b>	F14512 + cisplatine	1.06 +/- 0.21	1.00 +/- 0.13	0.97 +/- 0.05	0.98 +/- 0.01
	F14512 + carboplatine	1.04 +/- 0.34	0.94 +/- 0.19	0.93 +/- 0.42	0.99 +/- 0.01
	F14512 + melphalan	0.89 +/- 0.14	0.93 +/- 0.09	0.99 +/- 0.21	0.99 +/- 0.01
<b>SK-N-AS</b>	F14512 + cisplatine	1.09 +/- 0.31	0.95 +/- 0.15	0.91 +/- 0.11	0.96 +/- 0.04
	F14512 + carboplatine	1.20 +/- 0.57	0.94 +/- 0.35	0.80 +/- 0.34	0.97 +/- 0.02
	F14512 + melphalan	1.10 +/- 0.32	1.17 +/- 0.14	1.39 +/- 0.18	0.92 +/- 0.02

**Table 2: Drugs combination with F14512 in neuroblastoma cell lines.** F14512 was tested in combination with cisplatin, carboplatin or melphalan. Cytotoxicity was determined by MTS assay after 72 hours drugs exposure and the synergistic effect was analyzed by Chou and Talalay method using CalcuSyn software. Results are the mean of 3 independent experiments and expressed as Combination Index at ED50, 75 and 90. A combination is considered synergistic if CI < 1. Experiment is considered significant if r > 0.9.

**Résultats complémentaires**

*Cytotoxicité du F14512 et de l'étoposide dans les lignées cellulaires de neuroblastome*

Dans un souci de clarification, les résultats des IC<sub>50</sub> obtenues avec le F14512 et l'étoposide dans les 4 lignées cellulaires de neuroblastomes, ainsi que le niveau d'activation du système de transport des polyamines ont été synthétisé dans le tableau supplémentaire 1.

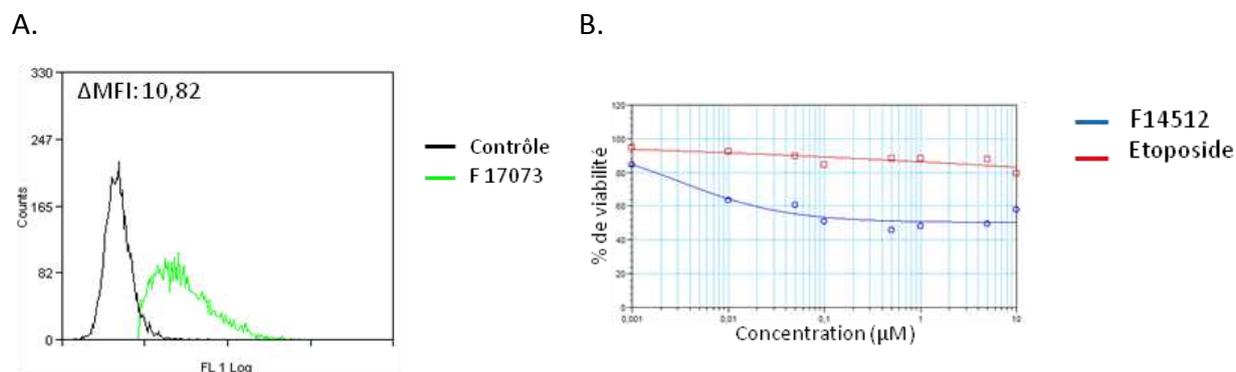
**Tableau supplémentaire 1 : Valeurs des IC<sub>50</sub> du F14512 et de l'étoposide dans les lignées de neuroblastome, et niveau d'activation du STP**

	<b>Kelly</b>	<b>SH-SY5Y</b>	<b>SK-N-AS</b>	<b>SK-N-DZ</b>
<b>ΔMFI</b>	44.83	66.28	152.00	4.24
<b>F14512 (IC<sub>50</sub>, μM)</b>	0.076	0.017	0.303	1.485
<b>Etoposide (IC<sub>50</sub>, μM)</b>	1.518	0.754	1.712	5.485
<b>IC<sub>50</sub> ratio</b>	20	44.4	5.6	3.7

IC<sub>50</sub> : Inhibition Concentration 50, ΔMFI = MFI considered / MFI control, MFI: Mean Fluorescence Intensity

*Etude de l'activité du STP et de la cytotoxicité du F14512 dans une lignée de cancer neuro-ectodermique primitif*

De la même façon que précédemment décrit pour les lignées de neuroblastomes et de gliomes pédiatriques, nous avons évalué l'incorporation du F17073 ainsi que la cytotoxicité du F14512 comparé à l'étoposide dans la lignée de tumeur primitive neuro-ectodermique de l'enfant PFSK-1 (Fig sup 4).



**Figure supplémentaire 4: Activité du STP et courbes de cytotoxicité du F14512 et de l'étoposide dans la lignée de tumeur primitive neuro-ectodermique PFSK-1.** A. Mesure de l'incorporation de la sonde spécifique F17073 en cytométrie en flux. Les courbes représentent l'intensité de fluorescence des cellules non traitées (noire) et traitées 2h par 1  $\mu\text{M}$  de F17073 (verte). Le  $\Delta\text{MFI}$  (Variation Mean Fluorescence Intensity) est le rapport entre la moyenne de fluorescence des cellules traitées par le F17073 sur la moyenne de fluorescence des cellules « contrôles » non traitée. B. Courbes de cytotoxicité du F14512 (courbe bleue) et de l'étoposide (courbe rouge) dans la lignée PFSK-1.

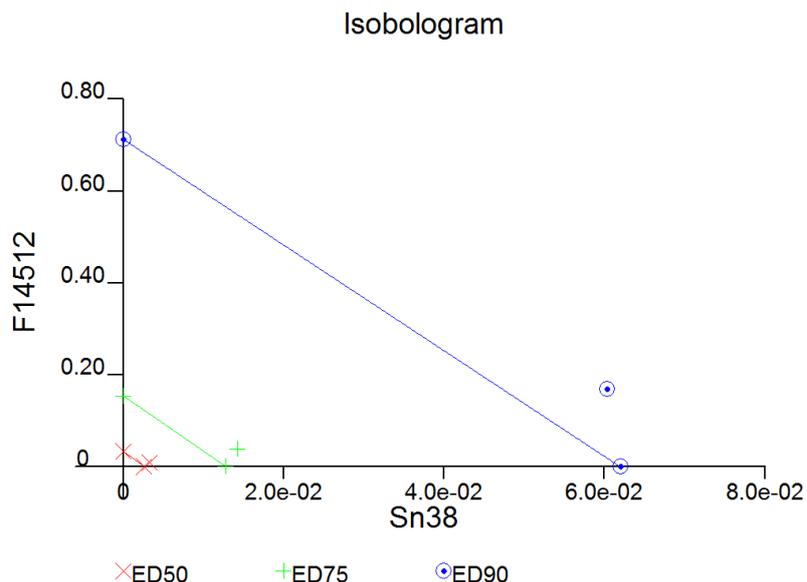
Le rapport des moyennes des intensités de fluorescence ( $\Delta\text{MFI}$ ) de la lignée PFSK-1 est de 10,82 et montre que la sonde F17073 est incorporée par les cellules.

Les résultats de cytotoxicité ne nous permettent pas de déterminer de valeurs d' $\text{IC}_{50}$  pour les 2 composés mais montrent tout de même un effet cytotoxique supérieur du F14512. En effet, l'inhibition de la croissance est proche de 50% dès 0,1  $\mu\text{M}$  de F14512 alors que celle de l'étoposide n'excède pas 80% même à 10  $\mu\text{M}$ .

Nous n'avons pas poursuivi les expérimentations avec cette lignée en raison de l'activité modérée du F14512.

Association du F14512 avec le SN38

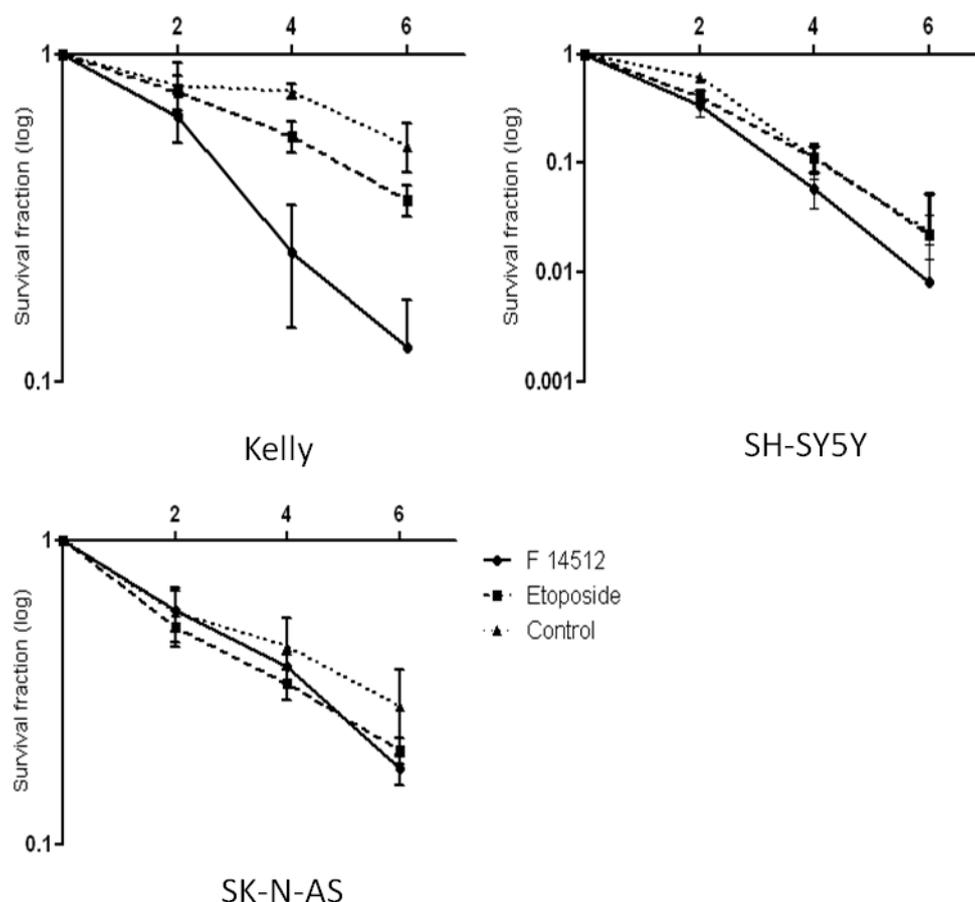
Nous avons étudié la cytotoxicité de l'association entre le F14512 et le SN38, composé actif de l'irinotecan, inhibiteur de la topoisomérase I. Les associations ont été réalisées uniquement dans la lignée de neuroblastome Kelly, comme précédemment décrit avec les autres molécules, et les résultats ont été obtenus par la méthode de Chou et Talalay. Ces résultats montrent un antagonisme entre les 2 molécules, quelles que soient les doses testées. Les index de combinaison (CI) des ED<sub>50</sub>, ED<sub>75</sub> et ED<sub>90</sub> étaient respectivement de 1.55, 1.37 et 1.21. On rappelle que, selon Chou et Talalay, la synergie est définie par un IC<1, et l'antagonisme par un IC>1. Ces résultats sont illustrés sur l'isobogramme ci-dessous (Fig sup 5).



**Figure supplémentaire 5 : Isobogrammes de l'association du F14512 avec métabolite actif de l'irinotecan (SN38).** Les cellules sont ensemencées en plaques 96 puits. Après 24h, le milieu est remplacé par du milieu contenant du F14512 et/ou du SN38 en gamme croissante en équitoxicité. Après 72h, la viabilité est mesurée par test MTS et les résultats sont interprétés sous forme d'un isobogramme (méthode de Chou-Talalay) grâce au logiciel CalcuSyn. L'axe des ordonnées indique la concentration du F14512 en μM et l'axe des abscisses celle du SN38 en μM. La courbe rouge représente l'ED<sub>50</sub> (dose d'une drogue pharmacologiquement effective pour 50% de réponse) de l'association, la verte l'ED<sub>75</sub> et la bleue l'ED<sub>90</sub>. Le CI (Index de Combinaison) est calculé pour chaque ED et permet de déterminer s'il y a synergie, additivité ou antagonisme entre les composés.

Association du F14512 et de l'étoposide aux radiations ionisantes

Nous avons étudié l'effet radiosensibilisant potentiel du F14512 et de l'étoposide. L'effet observé dépend du type de lignée cellulaire étudié. L'effet radiosensibilisant du F14512 a déjà été montré dans l'article. Nous montrons ici un effet radiosensibilisant de l'étoposide essentiellement dans la lignée Kelly. Il n'y a pas d'effet radiosensibilisant significatif de l'étoposide dans les autres lignées. Dans la lignée Kelly, on note que l'effet radiosensibilisant du F14512 est supérieur à celui de l'étoposide ( $p < 0.001$ ) (Fig Sup 6).



**Figure supplémentaire 6 : Effet radiosensibilisant du F14512 et de l'étoposide dans les lignées cellulaires de neuroblastome.** L'effet combiné des 2 molécules avec les radiations ionisantes est déterminé par un test de clonogénicité. Les cellules sont traitées avec 1  $\mu\text{M}$  de F14512 ou d'étoposide pendant 6 heures puis lavées et irradiées à 0, 2, 4, et 6 Gy au moyen d'un irradiateur de

type Darpac 2000. Après 8 à 10 jours, les cellules sont fixées et colorées au crystal violet. Les colonies sont comptées à l'oeil nu. Le pourcentage de cellules survivantes (survival fraction) est exprimé au moyen d'une échelle logarithmique.

### Conclusion

Notre étude a montré pour la première fois le fort potentiel du F14512, nouvel inhibiteur de la topoisomérase II véhiculé par le STP sur des lignées cellulaires tumorales pédiatriques et plus particulièrement dans les neuroblastomes. En effet, nous avons mis en évidence une incorporation active dans les cellules de neuroblastomes du F14512 via le STP. Nous avons également mis en évidence la localisation nucléaire de la sonde F17073 permettant d'extrapoler le devenir du F14512 à proximité de sa cible pharmacologique, la topoisomérase II. Nous avons montré une supériorité de la cytotoxicité du F14512 par rapport à l'étoposide *in vitro*, et son effet antitumoral a été démontré sur un modèle *in vivo*. Ces résultats, ainsi que l'effet globalement synergique de l'association du F14512 avec les sels de platine, sont de solides arguments pour poursuivre le développement de cette molécule, en phase clinique chez les patients atteints d'un neuroblastome. Par ailleurs, d'autres investigations pourraient être envisagées dans d'autres types tumoraux dans lesquels l'étoposide occupe une place importante. L'effet radiosensibilisant du F14512 pourrait dans ce cadre ouvrir des perspectives dans la prise en charge des médulloblastomes.

## DISCUSSION

---

## DISCUSSION

---

## DISCUSSION

Les objectifs de cette thèse étaient d'étudier les mécanismes d'action dans des modèles pédiatriques de 2 nouvelles molécules ciblées, le cilengitide, inhibiteur des intégrines  $\alpha\beta3$  et  $\alpha\beta5$  développé par le laboratoire Merck KGaA, et le F14512, inhibiteur de la topoisomérase II, empruntant le système de transport des polyamines, développé par les laboratoires Pierre Fabre. Le choix des lignées cellulaires s'est porté d'une part sur des gliomes de haut grade en raison du pronostic sombre de ces maladies, et d'autre part sur des neuroblastomes compte-tenu du mauvais pronostic des formes de haut risque et de leur habituelle sensibilité à l'étoposide. Les travaux concernant le cilengitide ont essentiellement été menés sur des lignées cellulaires de gliomes de bas et de haut grade, alors que les travaux concernant le F14512 ont d'avantage porté sur les lignées de neuroblastome.

### ***Le cilengitide***

Le cilengitide est un inhibiteur sélectif de haute affinité des intégrines  $\alpha\beta3$  et  $\alpha\beta5$  se présentant comme un peptide cyclisé contenant la séquence d'acides aminés ([Arg-Gly-Asp-DPhe-(NMeVal)]) également appelée séquence RGD. Les intégrines  $\alpha\beta3$  et  $\alpha\beta5$  sont des récepteurs transmembranaires dimériques pouvant se lier à des molécules d'adhésion cellulaire par interaction avec des motifs de reconnaissance cellulaires contenant cette fameuse séquence RGD. Leur liaison spécifique au cilengitide inhibe ainsi leurs diverses implications dans la tumorigenèse (Dechantsreiter 1999). Ainsi, une activité antiangiogénique du cilengitide, liée à l'inhibition de ces intégrines, a été démontrée *in vitro* (Nisato 2003). Parallèlement, en empêchant la liaison des intégrines avec la matrice extracellulaire, le cilengitide provoque également le détachement des cellules tumorales, une désorganisation de leur cytosquelette et des leurs jonctions serrées et également une

## DISCUSSION

induction de l'apoptose (Oliveira-Ferrer 2008). Ainsi, le cilengitide inhibe t'il non seulement les fonctions d'ancrage des intégrines, mais aussi les voies de signalisation qui leur sont associées, empêchant ainsi la phosphorylation de FAK, de Src et de Akt. Le cilengitide est le premier inhibiteur de ce type à avoir démontré son efficacité *in vitro* comme *in vivo* et à être en cours de développement clinique.

Cependant aucune donnée concernant l'expression des intégrines cibles  $\alpha\beta3$  et  $\alpha\beta5$  dans des tumeurs pédiatriques ni même dans des lignées cellulaires issues de tumeurs pédiatriques n'étaient jusqu'alors disponibles. Nous avons donc montré pour la première fois une expression de l'intégrine  $\alpha\beta3$  dans toutes nos lignées cellulaires de HGG pédiatriques et de neuroblastomes à l'exception de la lignée UW479. L'intégrine  $\alpha\beta5$  était quant à elle exprimée dans toutes les lignées. Nous n'avons pas trouvé de modification significative du niveau d'expression des intégrines après irradiation à la différence des résultats publiés par Albert *et al.* (Albert 2006). Bien que présente, l'induction de l'expression d' $\alpha\beta3$  par l'irradiation s'est révélée plus modeste que ce que ne laissait supposer l'étude d'Albert *et al.* Notons que, dans cette étude menée sur des modèles de cancers pulmonaires, les auteurs avaient choisi de mesurer l'expression initiale d' $\alpha\beta3$  par cytométrie en flux alors que l'expression induite par l'irradiation avait été curieusement mesurée par immunohistochimie. Albert *et al.* avaient démontré un effet radiosensibilisant du cilengitide en utilisant une dose de 5  $\mu\text{M}$ , dose qui s'est également révélée être la plus efficace en terme d'inhibition de la croissance dans nos modèles pédiatriques. Dans une autre étude menée sur des cellules de glioblastomes, Maurer *et al.* avaient montré que l'association du cilengitide à la radiothérapie avait un effet additif (Maurer 2009). Dans des modèles *in vitro* de cancer du sein, Lautenschlaeger et al. ont également récemment montré un discret effet radiosensibilisant du cilengitide (Lautenschlaeger 2013). Dans notre étude,

## DISCUSSION

nous avons retrouvé une tendance à un effet radiosensibilisant du cilengitide. Toutefois, les écarts-types importants, probablement dus à la forte hétérogénéité de taille et de densité des colonies, ne nous ont pas permis de démontrer cet effet de manière significative.

Par ailleurs, une hypothèse envisagée avait été qu'une surexpression des intégrines induite par les radiations ionisantes aurait pu conduire à une augmentation de la cytotoxicité du cilengitide. Cette hypothèse n'a pas été vérifiée, ce qui finalement n'étonne guère dans la mesure où nous n'avons pas non plus mis en évidence de relation entre le niveau d'expression des intégrines et le détachement cellulaire induit par le cilengitide. Ces résultats sont en accord avec ceux des travaux de Maurer menés sur des lignées de gliomes de l'adulte (Maurer 2009).

Les résultats obtenus sur la lignée UW479, qui exprime  $\alpha\beta 5$  mais pas  $\alpha\beta 3$  sont particulièrement intéressants. En effet, le cilengitide est décrit pour inhiber ces deux intégrines de manière spécifique. Nous avons montré par nos expériences de détachement cellulaire et de cytotoxicité que les cellules UW479 n'étaient pas sensibles au cilengitide, ce qui suggère que, non seulement la présence d'une expression d' $\alpha\beta 3$  est nécessaire pour son action quel que soit le niveau d'expression d' $\alpha\beta 5$ , mais également que cette action est principalement liée à l'inhibition de l'intégrine  $\alpha\beta 3$ . Cette constatation nous semble d'un intérêt tout particulier pour l'application clinique, notamment pour ce qui serait d'une sélection éventuelle des patients en fonction du profil d'expression des intégrines de leur tumeur. Cette sélection devrait donc plutôt concerner les patients porteurs d'une tumeur surexprimant  $\alpha\beta 3$  et non  $\alpha\beta 5$ , par exemple par l'utilisation d'une sonde marquée par un isotope telle que le  $(99m)\text{Tc-NC100692}$  ou le  $[(18)\text{F}]\text{Galacto-RGD}$  (Schnell 2009, Dearling 2013). Ceci pourrait donner lieu à une étude clinique chez les enfants porteurs d'un HGG.

## DISCUSSION

Compte-tenu de l'importance de la radiothérapie dans la prise en charge clinique des gliomes malins, et de l'existence d'un essai de phase I en cours combinant le cilengitide à la radiothérapie chez les enfants porteurs d'un gliome infiltrant du tronc cérébral (essai CILENT-0901, [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)), nous avons étudié cette association *in vitro*. Nous avons montré qu'en dépit d'une discrète surexpression radio-induite des intégrines, les radiations ionisantes n'avaient pas d'impact sur la réponse au cilengitide dans nos modèles. Nous n'avons pas non plus retrouvé l'effet additif décrit par Maurer antérieurement, ce qui est possiblement en rapport avec le schéma de traitement choisi (Maurer 2009). Néanmoins, ces résultats ne préjugent pas d'un éventuel effet synergique *in vivo*, dans la mesure où, comme l'a suggéré Mikkelsen, le cilengitide pourrait avoir un effet radiosensibilisant de part notamment son effet antiangiogénique (Mikkelsen 2009).

Néanmoins, les perspectives de développement ultérieur du cilengitide en oncologie pédiatrique sont faibles. En effet, les résultats de l'étude randomisée de phase III CENTRIC qui étudiait l'intérêt de l'ajout du cilengitide au traitement traditionnel associant radiothérapie et témozolomide chez les adultes porteurs d'un glioblastome, ont montré que l'adjonction de cilengitide ne modifiait ni la survie sans progression ni la survie globale des patients (Stupp 2013). Faisant suite à ces résultats communiqués lors du congrès de l'American Society of Clinical Oncology (ASCO) en juin 2013, le laboratoire Merck a décidé de stopper tout développement du cilengitide, et ceci dans toutes les indications. Ainsi est-il très peu probable que des travaux ultérieurs soient menés avec cette molécule en oncologie pédiatrique. Néanmoins, notre étude a eu le mérite de démontrer dans des lignées cellulaires de tumeurs pédiatriques, l'intérêt du ciblage des intégrines et notamment de l'intégrine  $\alpha\beta3$ . Ces résultats pourraient fournir un rationnel pour le développement en neuro-oncologie pédiatrique d'autres inhibiteurs des intégrines comme par exemple des

## DISCUSSION

anticorps monoclonaux comme l'etaracizumab qui est actuellement en développement clinique en phase I ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). Cependant, il faut garder à l'esprit le risque théorique d'une possible dissémination métastatique des cellules tumorales ainsi détachées de leur environnement. En effet, nous avons pu constater, lors de nos expériences, que les cellules tumorales décollées par le cilengitide étaient capables de réadhérer à leur support après élimination de la molécule. Cette observation plaiderait pour une administration métronomique de ce type d'inhibiteurs afin d'éviter toute implantation de ces cellules à distance.

### ***Le F14512***

S'appuyant sur le fait que le système de transport des polyamines (STP) est décrit comme suractivé au sein de la majorité des types tumoraux, le design du F14512 a reposé sur la conjugaison d'une molécule cytotoxique de type épipodophyllotoxine, inhibitrice de la topoisomérase II, à une chaîne spermine, permettant au composé de s'introduire préférentiellement dans les cellules tumorales en empruntant le STP (Barret 2008, Brel 2011). Ce type de concept a déjà été illustré par le développement de l'elacytarabine (CP-4055), un composé analogue de la cytarabine couplé à un vecteur lipidique. L'effet antitumoral de la cytarabine est limité par le fait que le niveau d'expression de son transporteur hENT1 (human Equilibrative Nucleoside Transporteur) est faible à la surface des cellules tumorales et notamment des cellules leucémiques. L'utilisation du vecteur lipidique couplé permet une entrée de la molécule de manière indépendante d'hENT1, augmentant ainsi la concentration intracellulaire de la molécule et donc son efficacité (Adema 2012,

## DISCUSSION

Keane 2013). La synthèse du F14512 fait partie d'une stratégie assez proche mais toutefois plus sélective des cellules tumorales.

Préalablement à nos travaux, le mécanisme d'action du F14512 avait déjà été démontré dans des modèles de leucémies, *in vitro* et *in vivo*, et ces résultats ont conduit à la mise en place d'essais cliniques dans les leucémies aiguës myéloïdes réfractaires (Annereau 2010, Kruczynski 2011, De Botton 2012).

L'objectif de notre travail était donc d'évaluer l'intérêt potentiel de ce composé dans des modèles de tumeurs pédiatriques. Ceci semblait d'autant plus pertinent que l'étoposide, inhibiteur de la topoisomérase II proche du F14512 mais dénué de toute action ciblée, est largement utilisé en oncologie pédiatrique dans de nombreux types tumoraux différents. Le choix de nos lignées s'était porté, d'une part sur des gliomes de haut grade compte-tenu de leur gravité, et d'autre part sur des neuroblastomes compte-tenu à la fois de leur potentielle gravité mais également du fait de la large place de l'étoposide dans leur traitement.

Nous avons, au cours de notre travail, montré la présence d'une activité du STP dans toutes nos lignées cellulaires de HGG pédiatriques et de neuroblastomes, confirmant ainsi la pertinence d'une stratégie ciblée utilisant le STP dans ces types tumoraux. Les cellules de neuroblastomes se sont montrées plus sensibles au F14512 que les cellules gliales, ce qui n'est guère étonnant compte-tenu de la faible chimiosensibilité de ces tumeurs y compris en clinique. Comme attendu, les cellules de HGG se sont révélées également peu sensibles à l'étoposide, ce qui conforte l'idée que la relative résistance de ces cellules est bien en rapport avec la faible activité des inhibiteurs de la topoisomérase II, et ceci indépendamment de l'activité du STP.

## DISCUSSION

Fait intéressant toutefois, nous avons montré que le F14512 était plus cytotoxique que l'étoposide dans toutes nos lignées. Cette constatation pourrait être la conséquence d'une différence dans le type de mort cellulaire induit par ces molécules. Kruczynski *et al.* a démontré dans un modèle *in vivo* de leucémie que le F14512 induit, selon la dose administrée, à la fois une mort par apoptose et par sénescence, mais pas par autophagie (Kruczynski 2013). Dans un modèle cellulaire de cancer du poumon non à petites cellules Brel *et al.* ont montré que l'apoptose survenait à des doses élevées et la sénescence à des doses proches de l'IC<sub>50</sub>, correspondant aux doses pharmacologiques (Brel 2011). Dans nos modèles, cependant, nous avons pu constater au sein de notre panel de lignées un profil similaire de réponse à l'étoposide et au F14512. Ces résultats suggèrent que les différences de cytotoxicité observées seraient d'avantage liées à la sensibilité intrinsèque de chaque lignée à l'inhibition de la topoisomérase II plutôt qu'au niveau d'activité du STP.

Par ailleurs, une des raisons conduisant en clinique à l'échec des traitements par chimiothérapie cytotoxique est liée à des mécanismes de résistance. Les poisons de la topoisomérase II sont des substrats des pompes appelées ABC transporteurs, capables de réduire la quantité d'inhibiteur intracellulaire disponible. Un des transporteurs les plus connus est la glycoprotéine P (ABCB1), responsable de la multidrug resistance (MDR) qui entraîne une diminution de l'accumulation de la molécule par augmentation de l'efflux, comme c'est le cas pour l'étoposide (Lansiaux 2011). Or, des résultats obtenus *in vitro* ont suggéré que le F14512 ne serait pas un substrat de la glycoprotéine P, ce qui pourrait le rendre moins dépendant de ce mécanisme de résistance (Kruczynski 2013).

Suite aux résultats de Chelouah et au vu du type de mort particulier induit par le F14512, Kruczynski *et al.* a formulé l'hypothèse particulièrement intéressante que les lésions de

## DISCUSSION

l'ADN induites par le F14512 n'étaient pas facilement réparées (Chelouah 2011). Ceci mériterait d'être confirmé par une analyse des mécanismes de réparation de ces lésions. En effet, un des effets secondaires redoutés des inhibiteurs de la topoisomérase II comme l'étoposide et le téniposide, est la survenue de leucémies secondaires dont le pronostic est particulièrement mauvais. Il s'agit le plus souvent de leucémies myéloïdes aigues diagnostiquées le plus souvent dans les 2 ans après l'arrêt du traitement par étoposide. Ces leucémies induites sont liées à la dose totale d'étoposide administrée et au schéma d'administration. Elles font suite à la survenue de réarrangements du gène MLL localisé en 11q23, suite à une réparation inadéquate des lésions de l'ADN (Ezoe 2012). Le fait que les lésions de l'ADN induites par le F14512 soient difficilement réparées pourrait permettre d'éviter une réparation inadéquate conduisant à un processus leucémique.

Dans nos conditions, le F14512 était peu cytotoxique dans les cellules PFSK-1. En revanche, il était plus cytotoxique que l'étoposide dans cette lignée de tumeur primitive neuroectodermique (PNET) dans laquelle le STP était activé. Le manque d'autres lignées de ce type tumoral à notre disposition au laboratoire, et le fait que les résultats obtenus dans nos lignées de neuroblastome formaient un ensemble cohérent ne nous a pas encouragés à poursuivre les expérimentations dans ce type tumoral. Néanmoins, ces résultats mériteraient d'être confirmés sur d'autres lignées cellulaires et, le cas échéant, *in vivo*, dans la mesure où l'étoposide est également largement utilisé en clinique pour le traitement des tumeurs de la famille PNET/médulloblastome.

La combinaison du F14512 avec l'irradiation a montré un effet radiosensibilisant franc de la molécule, supérieur à celui de l'étoposide, notamment dans la lignée cellulaire Kelly. Cette constatation est intéressante dans la mesure où cette lignée est la seule de notre panel testé

## DISCUSSION

présentant une amplification de l'oncogène *MYCN*. En clinique, cette amplification de *MYCN* confère un pronostic défavorable notamment chez les enfants de moins de 18 mois. En effet les récurrences tumorales, y compris locales, sont fréquentes dans ces formes particulièrement agressives. L'effet radiosensibilisant du F14512 pourrait donc encourager son utilisation concomitante à la radiothérapie chez ces enfants. Cette hypothèse devrait être confirmée sur un panel plus large de lignées cellulaires de neuroblastome et dans des modèles *in vivo*.

Nous avons également montré que le F14512 avait un effet synergique avec les sels de platine, ce qui ouvre des perspectives intéressantes en pédiatrie dans la mesure où de nombreux protocoles de traitement associent l'étoposide au carboplatine ou au cisplatine, notamment dans le neuroblastome. Cette synergie avait été également mise en évidence dans des travaux parallèlement menés au laboratoire sur des lignées cellulaires de cancer des voies aériennes digestives supérieures (Mouawad, *submitted*). D'autre part, dans son étude menée sur des cellules leucémiques HL-60, Kruczynski *et al.* a également montré une synergie du F14512 avec la cytarabine, la doxorubicine, la gemcitabine, le SAHA et le bortezomib (Kruczynski 2013). A l'inverse, ces travaux ont montré que l'association du F14512 avec la camptothécine, inhibiteur de la topoisomérase I était antagoniste. Nous avons également constaté au laboratoire un effet antagoniste en associant le F14512 et le SN38 dans la lignée cellulaire Kelly. Ces données concordantes n'encouragent donc pas ce type d'association en clinique.

L'effet synergique du F14512 avec le bortezomib, inhibiteur du protéasome, démontré *in vitro* par Kruczynski *et al.* pourrait en revanche ouvrir des perspectives spécifiques. En effet, depuis quelques années émerge le concept de cellules souches cancéreuses (CSC). De nombreuses études tendent à prouver que cette sous-population de cellules cancéreuses,

## DISCUSSION

bien que minoritaire au regard de la masse tumorale, jouerait un rôle déterminant dans la tumorigénèse, le développement de métastases et la récurrence loco-régionale. Ces CSC possèdent des propriétés communes aux cellules souches non-tumorales avec des capacités d'autorenouvellement et de multipotence qui les rend capables de réengendrer toute la complexité et la hiérarchie tumorale (Reya, 2001). Echappant aux thérapeutiques classiques que sont la chimiothérapie et la radiothérapie, les CSC joueraient également un rôle important dans le développement des récurrences post thérapeutiques (Rich 2007, Vlashi 2009, Mohrin 2010). Or, l'existence de CSC a été démontrée dans certaines tumeurs cérébrales de l'enfant (Hemmati 2003, Thirant 2011). Fait particulièrement intéressant, l'équipe de Vlashi a montré dans des modèles de gliome de l'adulte et de cancers du sein, que ces CSC présentaient, entre-autres caractéristiques, une faible activité protéasomique (Vlashi 2009). Or, les mécanismes responsables de la synergie dans l'association entre le F14512 et le bortezomib, inhibiteur du protéasome ne sont pas connus. On pourrait émettre l'hypothèse que le F14512 pourrait être plus cytotoxique dans les cellules dont l'activité protéasomique est faible, qu'il s'agisse d'une de leurs caractéristiques intrinsèques ou d'une réponse à un agent pharmacologique. Ainsi pourrait-on extrapoler que le F14512 pourrait avoir une activité cytotoxique dans les CSC, ce qui ouvre des perspectives quant au traitement de ces clones résistants. Cette hypothèse pourrait être vérifiée au laboratoire puisque nous avons à notre disposition un système rapporteur fluorescent dont la pertinence dans le repérage des CSC a été démontrée, la protéine de fusion ZsGreen-cODC (Vlashi 2009). Celle-ci est normalement dégradée dans les cellules non-CSC par le protéasome mais elle s'accumule en cas d'activité protéasomique faible, donc dans les CSC, qui deviennent alors repérables en fluorescence. Il serait intéressant dans ce modèle d'étudier l'effet du F14512 sur la proportion de CSC (i.e. cellules à faible activité protéasomique).

## DISCUSSION

D'un point de vue clinique, le mode d'entrée original du F14512 dans les cellules tumorales pourrait encourager à l'utiliser chez des malades sélectionnés dont la tumeur présenterait une activation du STP. Alors que ce niveau d'activation peut être évalué *in vitro* par l'utilisation de sondes fluorescentes, des travaux récents de Pesnel *et al.* ont montré la faisabilité *in vivo* dans des modèles murins, d'une imagerie du STP par scintigraphie en utilisant un isotope marqué au technetium 99, formé d'une polyamine associée à un noyau hydrazinonicotinamide ( $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-spermine) (Pesnel 2011). Ceci ouvre la voie d'une possible sélection en imagerie, des malades chez lesquels la tumeur présente un STP activé permettant ainsi de proposer un traitement par F14512 de façon optimale.

## CONCLUSION

---

## CONCLUSION

---

## CONCLUSION

Les progrès diagnostiques et thérapeutiques effectués durant les trente dernières années en oncologie pédiatrique permettent actuellement de guérir environ 75% des patients toutes tumeurs confondues. Les raisons de ce progrès spectaculaire, et notamment pour ce qui concerne la survie, sont évidemment nombreuses, et comprennent certes une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires de la tumorigenèse, mais également à un apprentissage du maniement des molécules de chimiothérapies cytotoxiques dites « classiques » qu'il est désormais classique d'opposer aux thérapies dites « ciblées ». En oncologie adulte, les résultats n'ont pas été aussi spectaculaires, ce qui est probablement largement en rapport avec une moindre chimiosensibilité intrinsèque des types histologiques, et ont conduit à l'engouement actuel pour les thérapeutiques ciblées qui occupent maintenant une place importante et précoce dans l'arsenal thérapeutique. A l'inverse, les molécules cytotoxiques classiques restent d'un intérêt majeur pour le traitement des cancers de l'enfant, ce d'autant que les premiers résultats des études menées depuis une dizaine d'année chez l'enfant avec des agents ciblés n'ont pour le moment pas permis d'améliorer le pronostic des tumeurs les plus agressives.

En ce sens, évaluer dans des modèles pédiatriques de nouveaux composés dits « ciblés » tels que le cilengitide, mais aussi des molécules conjuguant un effet cytotoxique « classique » à un mode de transport ou de délivrance spécifiques lui conférant un mécanisme d'action ciblé, a un intérêt tout particulier. Dans ce contexte, mes travaux de thèse ont permis de montrer *in vitro* l'intérêt d'une inhibition de l'intégrine  $\alpha\beta3$  dans les HHG pédiatriques et les neuroblastomes et la pertinence de la vectorisation d'une molécule cytotoxique « classique » par le STP dans les neuroblastome tant *in vitro* qu'*in vivo*. Ces deux stratégies présentent de plus l'avantage de pouvoir s'appuyer sur une possible sélection des patients potentiellement répondeurs par des moyens d'imagerie.

---

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

---

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Abdollahi A, Griggs DW, Zieher H, Roth A, Lipson KE, Saffrich R, et al.** Inhibition of alpha(v)beta3 integrin survival signaling enhances antiangiogenic and antitumor effects of radiotherapy. *Clin Cancer Res* 2005;11:6270-6279.
- **Adema AD, Smid K, Losekoot N, Honeywell RJ, Verheul HM, Myhren F, et al.** Metabolism and accumulation of the lipophilic deoxynucleoside analogs elacytarabine and CP-4126. *Invest New Drugs* 2012;30:1908-16.
- **Albert JM, Cao C, Geng L, Leavitt L, Hallahan DE, Lu B.** Integrin alpha v beta3 antagonist cilengitide enhances efficacy of radiotherapy in endothelial cell and non-small-cell lung cancer models. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;65:1536-1543.
- **Allen J, Siffert J, Donahue B, Nirenberg A, Jakacki R, Robertson P, et al.** A phase I/II study of carboplatine combined with hyperfractionated radiotherapy for brainstem gliomas. *Cancer* 1999;86:1064-9.
- **André N, Pasquier E, Verschuur A, Sterba J, Gentet JC, Rössler J.** Metronomic chemotherapy in pediatric oncology: hype or hope? *Arch Pediatr* 2009;16:1158-65.
- **Annereau JP, Brel V, Dumontet C, Guminski Y, Imbert T, Broussas M, et al.** A fluorescent biomarker of the polyamine transport system to select patients with AML for F14512 treatment. *Leuk Res* 2010;34:1383-1389.
- **Aquino-Parsons C, Hukin J, Green A.** Concurrent carbogen and radiation therapy in children with high-risk brainstem gliomas. *Pediatr Blood Cancer* 2008;50:397-9.
- **Bagatell R, London WB, Wagner LM, Voss SD, Stewart CF, Maris JM, et al.** Phase II study of irinotecan and temozolomide in children with relapsed or refractory neuroblastoma: a Children's Oncology Group study. *J Clin Oncol* 2011;29:208-13.
- **Barone G, Anderson J, Pearson AD, Petrie K, Chesler L.** New Strategies in Neuroblastoma: Therapeutic Targeting of MYCN and ALK. *Clin Cancer Res* 2013. [Epub ahead of print]
- **Barret JM, Kruczynski A, Vispe S, Annereau JP, Brel V, Guminski Y, et al.** F14512, a potent antitumor agent targeting topoisomerase II vectored into cancer cells via the polyamine transport system. *Cancer Res* 2008;68:9845-9853.
- **Bax DA, Little SE, Gaspar N, Perryman L, Marshall L, Viana-Pereira M, et al.** Molecular and phenotypic characterisation of paediatric glioma cell lines as models for preclinical drug development. *PLoS One* 2009;4(4):e5209.
- **Bellail AC, Hunter SB, Brat DJ, Tan C, Van Meir EG.** Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:1046-69.
- **Benesch M, Windelberg M, Sauseng W, Witt V, Fleischhack G, Lackner H, et al.** Compassionate use of bevacizumab (Avastin) in children and young adults with refractory or recurrent solid tumors. *Ann Oncol* 2008;19:807-13.
- **Berger JM, Wang JC.** Recent developments in DNA topoisomerase II structure and mechanism. *Curr Opin Struct Biol* 1996;6:84-90.
- **Bernier-Chastagner V, Grill J, Doz F, Bracard S, Gentet JC, Marie-Cardine A et al.** Topotecan as a radiosensitizer in the treatment of children with malignant diffuse brainstem gliomas. Results of a French Society of Paediatric Oncology phase II study. *Cancer* 2005;104:2792-7.
- **Bian X, Opirari AW Jr, Ratanaproeaksa AB, Boitano AE, Lucas PC, Castle VP.** Constitutively active NFkappa B is required for the survival of S-type neuroblastoma. *J Biol Chem* 2002;277:42144-50.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Bouffet E, Raquin M, Doz F, Gentet JC, Rodary C, Demeocq F, et al.** Radiotherapy followed by high dose busulfan and thiotepa: a prospective assessment of high dose chemotherapy in children with diffuse pontine gliomas. *Cancer* 2000;88:685-92.
- **Breit S, Ashman K, Wilting J, Rössler J, Hatzi E, Fotsis T, Schweigerer L.** The N-myc oncogene in human neuroblastoma cells: down-regulation of an angiogenesis inhibitor identified as activin A. *Cancer Res* 2000;60:4596-601.
- **Brel V, Annereau JP, Vispé S, Kruczynski A, Bailly C, Guilbaud N.** Cytotoxicity and cell death mechanisms induced by the polyamine-vectorized anti-cancer drug F14512 targeting topoisomerase II. *Biochem Pharmacol* 2011;82:1843-52.
- **Brodeur GM, Maris JM, Yamashiro DJ, Hogarty MD, White PS.** Biology and genetics of human neuroblastomas. *J Pediatr Hematol Oncol* 1997;19:93-101.
- **Brodeur GM.** Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* 2003;3:203-16.
- **Broniscer A, Leite CC, Lanchote VL, Machado TM, Cristófani LM.** Radiation therapy and high-dose tamoxifen in the treatment of patients with diffuse brainstem gliomas: results of a Brazilian cooperative study. Brainstem Glioma Cooperative Group. *J Clin Oncol* 2000;18:1246-53.
- **Broniscer A, Baker SJ, West AN, Fraser MM, Proko E, Kocak M, et al.** Clinical and molecular characteristics of malignant transformation of low-grade glioma in children. *J Clin Oncol* 2007;25:682-9.
- **Broniscer A, Baker JN, Tagen M, Onar-Thomas A, Gilbertson RJ, Davidoff AM, et al.** Phase I study of vandetanib during and after radiotherapy in children with diffuse intrinsic pontine glioma. *J Clin Oncol* 2010;28:4762-8
- **Broniscer A, Baker SD, Wetmore C, Pai Panandiker AS, Huang J, Davidoff AM, et al.** Phase I trial, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of vandetanib and dasatinib in children with newly diagnosed diffuse intrinsic pontine glioma. *Clin Cancer Res* 2013;19:3050-8.
- **Brooks PC, Clark RAF, Cheresh DA.** Requirement of vascular integrin  $\alpha v \beta 3$  for angiogenesis. *Science* 1994;264:569-571.
- **Burke PA, DeNardo SJ, Miers LA, Lamborn KR, Matzku S, DeNardo GL.** Cilengitide targeting of  $\alpha(v)\beta 3$  integrin receptor synergizes with radioimmunotherapy to increase efficacy and apoptosis in breast cancer xenografts. *Cancer Res* 2002;62:4263-4272.
- **Castleberry RP.** Biology and treatment of neuroblastoma. *Pediatr Clin North Am* 1997;44:919-37.
- **Chassot A, Canale S, Varlet P, Puget S, Roujeau T, Negretti L, et al.** Radiotherapy with concurrent and adjuvant temozolomide in children with newly diagnosed diffuse intrinsic pontine glioma. *J Neurooncol.* 2012;106:399-407.
- **Chastagner P, Bouffet E, Grill J, Kalifa C.** What have we learnt from previous phase II trials to help in the management of childhood brain tumours? *Eur J Cancer* 2001;37:1981-93.
- **Chastagner P, Kalifa C, Doz F, Bouffet E, Gentet JC, Ruchoux MM, et al.** Outcome of children treated with preradiation chemotherapy for a high-grade glioma: results of a French Society of Pediatric Oncology (SFOP) Pilot Study. *Pediatr Blood Cancer* 2007;49:803-7.
- **Chatterjee S, Matsumura A, Schradermeier J, Gillespie GY.** Human malignant glioma therapy using anti- $\alpha(v)\beta 3$  integrin agents. *J Neurooncol* 2000;46:135-144.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Chelouah S, Monod-Wissler C, Bailly C, Barret JM, Guilbaud N, Vispé S, Käs E.** An integrated *Drosophila* model system reveals unique properties for F14512, a novel polyamine-containing anticancer drug that targets topoisomerase II. *PLoS One* 2011;6(8):e23597.
- **Chen W, Delaloye S, Silverman DH, Geist C, Czernin J, Sayre J, et al.** Predicting treatment response of malignant gliomas to bevacizumab and irinotecan by imaging proliferation with [18F] fluorothymidine positron emission tomography : a pilot study. *J Clin Oncol* 2007;25:4714-4721.
- **Chitagumpala MM, Friedman HS, Stewart CF, Kepner J, McLendon RE, Modrich PL, et al.** A phase II window trial of procarbazine and topotecan in children with high grade glioma: a report from the children's oncology group. *J Neurooncol* 2006;77:193-8.
- **Cohen KJ, Pollack IF, Zhou T, Buxton A, Holmes EJ, Burger PC, et al.** Temozolomide in the treatment of high-grade gliomas in children: a report from the Children's Oncology Group. *Neuro Oncol* 2011;13:317-23.
- **Cohen KJ, Heideman RL, Zhou T, Holmes EJ, Lavey RS, Bouffet E, Pollack IF.** Temozolomide in the treatment of children with newly diagnosed diffuse intrinsic pontine gliomas: a report from the Children's Oncology Group. *Neuro Oncol* 2011;13:410-6.
- **Cohn SL, Pearson AD, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, et al.** The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol* 2009;27:289-97.
- **De Aquino Gorayeb MM, Aisen S, Nadalin W, Panico Gorayeb R, de Andrade Carvalho H.** Treatment of childhood diffuse brain stem tumors: comparison of results in different treatment modalities. *Clin Transl Oncol* 2006;8:45-9.
- **Dearling JL, Barnes JW, Panigrahy D, Zimmerman RE, Fahey F, Treves ST, et al.** Specific uptake of <sup>99m</sup>Tc-NC100692, an  $\alpha\beta$ 3-targeted imaging probe, in subcutaneous and orthotopic tumors. *Nucl Med Biol* 2013;40:788-94.
- **De Botton S, Berthon C, Bulabois C, Prebet T, Vey N, Chevallier P.** F14512 a novel polyamine-vectorized anti-cancer drug targeting topoisomerase II in adults patients with acute myeloid leukemia (AML): results from a Phase 1 study. *EHA 17th Congress, Amsterdam*: abstract 1091E.
- **Dechantsreiter MA, Planker E, Mathä B, Lohof E, Hölzemann G, Jonczyk A, et al.** N-Methylated cyclic RGD peptides as highly active and selective  $\alpha(V)\beta(3)$  integrin antagonists. *J Med Chem* 1999;42:3033-40.
- **Desandes E, Berger C, Tron I, Demeocq F, Bellec S, Blouin P, et al.** Childhood cancer survival in France, 1990-1999. *Eur J Cancer* 2008;44:205-15.
- **Desgrosellier JS, Barnes LA, Shields DJ, Huang M, Lau SK, Prevost N, et al.** An integrin  $\alpha(v)\beta(3)$ -c-Src oncogenic unit promotes anchorage-independence and tumor progression. *Nat Med* 2009;15:1163-9.
- **Desgrosellier JS, Cheresh DA.** Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2010;10:9-22.
- **Di Giannatale A, Dias-Gastellier N, Devos A, Mc Hugh K, Boubaker A, Courbon F, et al.** Phase II study of temozolomide in combination with topotecan (TOTEM) in relapsed or refractory neuroblastoma: A European Innovative Therapies for Children with Cancer-SIOP-European Neuroblastoma study. *Eur J Cancer* 2013 Sep 7. [Epub ahead of print]
- **Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C.** CBTRUS statistical report : Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro Oncol* 2012;14 Suppl 5:v1-49.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Doz F, Neuenschwander S, Bouffet E, Gentet JC, Schneider P, Kalifa C, et al.** Carboplatin before and during radiation therapy for the treatment of malignant brain stem tumours: a study by the Société Française d'Oncologie Pédiatrique. *Eur J Cancer* 2002;38:815-9.
- **Dufour C, Grill J, Lellouch-Tubiana A, Puget S, Chastagner P, Frappaz D, et al.** High-grade glioma in children under 5 years of age: a chemotherapy only approach with the BBSFOP protocol. *Eur J Cancer* 2006;42:2939-45.
- **Ebos JM, Lee CR, Cruz-Munoz W, Bjarnason GA, Christensen JG, Kerbel RS.** Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 2009;15:232-9.
- **Epstein FJ, Farmer JP.** Brain-stem glioma growth patterns. *J Neurosurg* 1993;78:408-12.
- **Eskens FA, Dumez H, Hoekstra R, Perschl A, Brindley C, Böttcher S, et al.** Phase I and pharmacokinetic study of continuous twice weekly intravenous administration of cilengitide (EMD121974), a novel inhibitor of the integrins alphavbeta3 and alphavbeta5 in patients with advanced solid tumours. *Eur J Cancer* 2003;39:917-926.
- **Esumi N, Imashuku S, Tsunamoto K, Todo S, Misawa S, Goto T, Fujisawa Y.** Procoagulant activity of human neuroblastoma cell lines, in relation to cell growth, differentiation and cytogenetic abnormalities. *Jpn J Cancer Res* 1989;80:438-43.
- **Ezoe S.** Secondary leukemia associated with the anti-cancer agent, etoposide, a topoisomerase II inhibitor. *Int J Environ Res Public Health* 2012;9:2444-53.
- **Figarella-Branger D, Chappe C, Padovani L, Mercurio S, Colin C, Forest F, Bouvier C.** Glial and glioneuronal tumors in adults and children: main genetic alterations and towards a histomolecular classification. *Bull Cancer* 2013;100 :715-726.
- **Finlay JL, Boyett JM, Yates AJ, Wisoff JH, Milstein JM, Geyer JR, et al.** Randomized phase III trial in childhood high-grade astrocytoma comparing vincristine, lomustine, and prednisone with the eight-drugs-in-1-day regimen. Childrens Cancer Group. *J Clin Oncol* 1995;13:112-23.
- **Finlay JL, Zacharoulis S.** The treatment of high grade gliomas and diffuse intrinsic pontine tumors of childhood and adolescents: a historical – and futuristic – perspective. *J Neurooncol* 2005;75:253-266.
- **Fotsis T, Breit S, Lutz W, Rössler J, Hatzi E, Schwab M, Schweigerer L.** Down-regulation of endothelial cell growth inhibitors by enhanced MYCN oncogene expression in human neuroblastoma cells. *Eur J Biochem* 1999;263:757-64.
- **Fouladi M, Hunt DL, Pollack IF, Dueckers G, Burger PC, Becker LE, et al.** Outcome of children with centrally reviewed low-grade gliomas treated with chemotherapy with or without irradiation on Children's Cancer Group high-grade glioma study CCG-945. *Cancer* 2003;98 :1243-52.
- **Fouladi M, Nicholson HS, Zhou T, Laningham F, Helton KJ, Holmes E, et al.:** a Children's Oncology Group study. A phase II study of the farnesyl transferase inhibitor, tipifarnib, in children with recurrent or progressive high-grade glioma, medulloblastoma/primitive neuroectodermal tumor, or brainstem glioma: a Children's Oncology Group study. *Cancer* 2008;110:2535-41.
- **Frappaz D, Schell M, Thiesse P, Marec-Bérard P, Mottolese C, Perol D, et al.** Preradiation chemotherapy may improve survival in pediatric diffuse intrinsic brainstem gliomas : final results of BSG 98 prospective trial. *Neuro Oncol* 2008;10:599-607.
- **Friedlander M, Brooks PC, Shaffer RW, Kincaid CM, Varner JA, Cheresch DA.** Definition of two angiogenic pathways by distinct  $\alpha$ v integrins. *Science* 1995;270:1500-1502.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Friedlander M, Theesfeld CL, Sugita M, Fruttiger M, Thomas MA, Chang S, et al.** Involvement of integrins  $\alpha\beta 3$  and  $\alpha\beta 5$  in ocular neovascular diseases. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93:9764-9769.
- **George RE, Sanda T, Hanna M, Frohling S, Luther W, Zhang J, et al.** Activating mutations in *ALK* provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature* 2008;455:975-978.
- **Geoerger B, Hargrave D, Thomas F, Ndiaye A, Frappaz D, Andreiuolo F, et al.;** ITCC (Innovative Therapies for Children with Cancer) European Consortium. Innovative Therapies for Children with Cancer pediatric phase I study of erlotinib in brainstem glioma and relapsing/refractory brain tumors. *Neuro Oncol* 2011;13:109-18.
- **Gielen GH, Gessi M, Hammes J, Kramm CM, Waha A, Pietsch T.**H3F3A K27M mutation in pediatric CNS tumors: a marker for diffuse high-grade astrocytomas. *Am J Clin Pathol* 2013;139:345-9.
- **Gilbert MR, Kuhn J, Lamborn KR, Lieberman F, Wen PY, Mehta M, et al.** Cilengitide in patients with recurrent glioblastoma: the results of NABTC 03-02, a phase II trial with measures of treatment delivery. *J Neurooncol* 2012;106:147-53.
- **Gilman AL, Ozkaynak MF, Matthay KK, Krailo M, Yu AL, Gan J, et al.** Phase I study of ch14.18 with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2 in children with neuroblastoma after autologous bone marrow transplantation or stem-cell rescue: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 2009;27:85-91.
- **Gilmour SK.** Polyamines and nonmelanoma skin cancer. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007;224:249-256.
- **Gladson CL, Cheresh DA.** Glioblastoma expression of vitronectin and the alpha v beta 3 integrin. Adhesion mechanism for transformed glial cells. *J Clin Invest* 1991;88:1924-32.
- **Gladson CL, Wilcox JN, Sanders L, Gillespie GY, Cheresh DA.** Cerebral microenvironment influences expression of the vitronectin gene in astrocytic tumors. *J Cell Sci* 1995;108: 947-56.
- **Grill J, Lowis S, Frappaz D, Michalski A, Picton S, Jouvet A, et al.** Phase II study of the combination of cisplatin + temozolomide in malignant glial tumours in children and adolescents at diagnosis or in relapse (cistem2/nct00147160) *J Clin Oncol* 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition);25:18S-9543.
- **Guarino, M.** Src signaling in cancer invasion. *J Cell Physiol* 2010;223:14-26.
- **Guminski Y, Grousseau M, Cugnasse S, Brel V, Annereau JP, Vispé S, et al.** Synthesis of conjugated spermine derivatives with 7-nitrobenzoxadiazole (NBD), rhodamine and bodipy as new fluorescent probes for the polyamine transport system. *Bioorg Med Chem Lett* 2009;19:2474-2477.
- **Gururangan S, Chi SN, Young Poussaint T, Onar-Thomas A, Gilbertson RJ, Vajapeyam S, et al.** Lack of efficacy of bevacizumab plus irinotecan in children with recurrent malignant glioma and diffuse brainstem glioma: a Pediatric Brain Tumor Consortium study. *J Clin Oncol* 2010;28:3069-75.
- **Haas-Kogan DA, Banerjee A, Kocak M, Prados MD, Geyer JR, Fouladi M, et al.** Phase I trial of tipifarnib in children with newly diagnosed intrinsic diffuse brainstem glioma. *Neuro Oncol* 2008;10:341-7.
- **Hargrave D, Bartels U, Bouffet E.** Diffuse brainstem glioma in children: critical review of clinical trials. *Lancet Oncol.* 2006;7:241-8.
- **Hargrave D, Geoerger B, Frappaz D, Pietsch T, Gesner L, Cisar L, et al.** A phase II single-arm study of irinotecan in combination with temozolomide (TEMIRI) in children with newly diagnosed high grade glioma: a joint ITCC and SIOPE-brain tumour study. *J Neurooncol* 2013;113:127-34.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Hariharan S, Gustafson D, Holden S, McConkey D, Davis D, Morrow M, et al.** Assessment of the biological and pharmacological effects of the  $\alpha v\beta 3$  and  $\alpha v\beta 5$  integrin receptor antagonist, cilengitide (EMD 121974), in patients with advanced solid tumors. *Ann Oncol* 2007;18:1400-1407.
- **Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, Bronner-Fraser M, et al.** Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:15178-15183.
- **Hossain MM, Banik NL, Ray SK.** N-Myc knockdown and apigenin treatment controlled growth of malignant neuroblastoma cells having N-Myc amplification. *Gene* 2013;529:27-36.
- **Huveneers S, Truong H, Danen HJ.** Integrins: signaling, disease, and therapy. *Int J Radiat Biol* 2007;83:743-51.
- **Hynes RO, Lively JC, McCarty JH, Taverna D, Francis SE, Hodivala-Dilke K, et al.** The diverse roles of integrins and their ligands in angiogenesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2002;67:143-53.
- **Hynes RO.** Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002;110:673-87.
- **Igarashi K, Sakamoto I, Goto N, Kashiwagi K, Honma R, Hirose S.** Interaction between polyamines and nucleic acids or phospholipids. *Arch Biochem Biophys* 1982;219:438-443.
- **Jain RK, Di Tomaso E, Duda DG, Loeffler JS, Sorensen AG, Batchelor TT.** Angiogenesis in brain tumours. *Nat Rev Neurosci* 2007;8:610-22.
- **Janoueix-Lerosey I, Lequin D, Brugieres L, Ribeiro A, de Pontual L, Combaret V, et al.** Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature* 2008;455:967-970.
- **Janoueix-Lerosey I, Schleiermacher G, Michels E, Mosseri V, Ribeiro A, Lequin D, et al.** Overall genomic pattern is a predictor of outcome in neuroblastoma. *J Clin Oncol* 2009;27:1026-33.
- **Janssens GO, Gidding CE, Van Lindert EJ, Oldenburger FR, Erasmus CE, Schouten-Meeteren AY, et al.** The role of hypofractionation radiotherapy for diffuse intrinsic brainstem glioma in children : a pilot study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009;73:722-6.
- **Jones C, Perryman L, Hargrave D.** Paediatric and adult malignant glioma: close relatives or distant cousins? *Nat Rev Clin Oncol* 2012;9:400-13
- **Kaneko Y, Knudson AG.** Mechanism and relevance of ploidy in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;29:89-95.
- **Keane N, Freeman C, Swords R, Giles FJ.** Elacytarabine: lipid vector technology under investigation in acute myeloid leukemia. *Expert Rev Hematol* 2013;6:9-24.
- **Khuong-Quang DA, Buczkowicz P, Rakopoulos P, Liu XY, Fontebasso AM, Bouffet E, et al.** K27M mutation in histone H3.3 defines clinically and biologically distinct subgroups of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *Acta Neuropathol* 2012;124:439-47.
- **Kim KB, Prieto V, Joseph RW, Diwan AH, Gallick GE, Papadopoulos NE, et al.** A randomized phase II study of cilengitide (EMD 121974) in patients with metastatic melanoma. *Melanoma Res* 2012;22:294-301.
- **Klein O, Chastagner P, Joud A, Marchal JC, Léna G.** Pontine tumors. *J Neurosurg Pediatrics* 2008;1:423-4.
- **Korones DN, Fisher PG, Kretschmar C, Zhou T, Chen Z, Kepner J, Freeman C.** Treatment of children with diffuse intrinsic brain stem glioma with radiotherapy, vincristine and oral VP-16: a Children's Oncology Group phase II study. *Pediatr Blood Cancer* 2008;50:227-30.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Kramm CM, Wagner S, Van Gool S, Schmid H, Sträter R, Gnekow A, et al.** Improved survival after gross total resection of malignant gliomas in pediatric patients from the HIT-GBM studies. *Anticancer Res* 2006;26:3773-9.
- **Kramm CM, Butenhoff S, Rausche U, Warmuth-Metz M, Kortmann RD, Pietsch T, et al.** Thalamic high-grade gliomas in children: a distinct clinical subset? *Neuro Oncol* 2011;13:680-9
- **Kruczynski A, Pillon A, Créancier L, Vandenberghe I, Gomes B, Brel V, et al.** F14512, a polyamine-vectorized anti-cancer drug, currently in clinical trials exhibits a marked preclinical anti-leukemic activity. *Leukemia* 2013 [Epub ahead of print]
- **Kuçi Z, Bruchelt G, Seitz G, Karov Y, Or R, Handgretinger R, et al.** Bone marrow-derived factors support growth of N-type, but not of melanocytic neuroblastoma cells. *Anticancer Res* 2002;22:4325-9.
- **Lacour B, Guyot-Goubin A, Desandes E, Clavel J.** Cancer in children and adolescents: what are we talking about ? *Oncologie* 2011;13:125-135.
- **Ladenstein RL, Poetschger U, Luksch R, Brock P, Castel V, Yaniv I, et al.** Busulphan-melphalan as a myeloablative therapy (MAT) for high-risk neuroblastoma: Results from the HR-NBL1/SIOPEN trial. *SIOP meeting 2011. J Clin Oncol* 2011 (suppl; abstr 2).
- **Lansiaux A, Pourquier P.** Molecular determinants of response to topoisomerase II inhibitors. *Bull Cancer* 2011;98:1299-310.
- **Lartigau E.** Angiogénèse et radiothérapie (Vaisseaux, anémie, oxygène et radiosensibilité). *Bull Cancer* 2007;94:S197-202.
- **Lautenschlaeger T, Perry J, Peereboom D, Li B, Ibrahim A, Huebner A, et al.** *In vitro* study of combined cilengitide and radiation treatment in breast cancer cell lines. *Radiat Oncol* 2013;8:246.
- **Liu L, Vapiwala N, Munoz LK, Winick NJ, Weitman S, Strauss LC et al.** A phase I study of cranial radiation therapy with concomitant continuous infusion paclitaxel in children with brain tumors. *Med Pediatr Oncol* 2001;37:390-2.
- **Loges S, Butzal M, Otten J, Schweizer M, Fischer U, Bokemeyer C, et al.** Cilengitide inhibits proliferation and differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;357:1016-20.
- **Lombardi G, Zustovich F, Farina P, Polo V, Farina M, Puppa AD, et al.** Cilengitide in bevacizumab-refractory high-grade glioma: two case reports and critical review of the literature. *Anticancer Drugs* 2012;23:749-53.
- **London WB, Castleberry RP, Matthay KK, Look AT, Seeger RC, Shimada H, et al.** Evidence for an age cutoff greater than 365 days for neuroblastoma risk group stratification in the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 2005;23:6459-65.
- **Look AT, Hayes FA, Shuster JJ, Douglass EC, Castleberry RP, Bowman LC, et al.** Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1991;9:581-91.
- **Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al.** The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007;114:97-109.
- **MacDonald TJ, Taga T, Shimada H, Tabrizi P, Zlokovic BV, Cheresch DA.** Preferential susceptibility of brain tumors to the antiangiogenic effects of an alpha (v) integrin antagonist. *Neurosurgery* 2001;48:151-157.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **MacDonald TJ, Stewart CF, Kocak M, Goldman S, Ellenbogen RG, Phillips P, et al.** Phase I clinical trial of cilengitide in children with refractory brain tumors: Pediatric Brain Tumor Consortium Study PBTC-012. *J Clin Oncol* 2008;26:919-924.
- **Macdonald TJ, Vezina G, Stewart CF, Turner D, Pierson CR, Chen L, et al.** Phase II study of cilengitide in the treatment of refractory or relapsed high-grade gliomas in children: A report from the Children's Oncology Group. *Neuro Oncol* 2013;15:1438-44.
- **Mandell LR, Kadota R, Freeman C, Douglass EC, Fontanesi J, Cohen ME, et al.** There is no role for hyperfractionated radiotherapy in the management of children with newly diagnosed diffuse intrinsic brainstem tumors: results of a Pediatric Oncology Group phase III trial comparing conventional vs. hyperfractionated radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999;43:959-64.
- **Manegold C, Vansteenkiste J, Cardenal F, Schuette W, Woll PJ, Ulsperger E, et al.** Randomized phase II study of three doses of the integrin inhibitor cilengitide versus docetaxel as second-line treatment for patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Invest New Drugs* 2013;31:175-82.
- **Marcus KJ, Dutton SC, Barnes P, Coleman CN, Pomeroy SL, Goumnerova L, et al.** A phase I trial of etanidazole and hyperfractionated radiotherapy in children with diffuse brainstem glioma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;55:1182-5.
- **Maris JM.** The biologic basis for neuroblastoma heterogeneity and risk stratification. *Curr Opin Pediatr* 2005;17:7-13.
- **Maris JM.** Recent advances in neuroblastoma. *N Engl J Med* 2010;362:2202-2211.
- **Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, Stram DO, Harris RE, Ramsay NK, et al.** Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group. *N Engl J Med* 1999;341:1165-73.
- **Maurer GD, Tritschler I, Adams B, Tabatabai G, Wick W, Stupp R, et al.** Cilengitide modulates attachment and viability of human glioma cells, but not sensitivity to irradiation or temozolomide in vitro. *Neuro Oncol* 2009;11:747-756.
- **Mikkelsen T, Brodie C, Finniss S, Berens ME, Rennert JL, Nelson K, et al.** Radiation sensitization of glioblastoma by cilengitide has unanticipated schedule-dependency. *Int J Cancer* 2009;124:2719-27.
- **Mohrin M, Bourke E, Alexander D, Warr MR, Barry-Holson K, Le Beau MM, et al.** Hematopoietic stem cell quiescence promotes error-prone DNA repair and mutagenesis. *Cell Stem Cell* 2010;7:174-185.
- **Monclair T, Brodeur GM, Ambros PF, Brisse HJ, Cecchetto G, Holmes K, et al.** The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol* 2009;27:298-303.
- **Mosse YP, Laudenslager M, Khazi D, Carlisle AJ, Winter CL, Rappaport E, Maris JM.** Germline PHOX2B mutation in hereditary neuroblastoma. *Am J Hum Genet* 2004;75:727-30.
- **Mosse YP, Laudenslager M, Longo L, Cole KA, Wood A, Attiyeh EF, et al.** Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature* 2008;455:930-5.
- **Mouawad F, Gros A, Rysman B, Bal-Mahieu C, Bertheau C, Horn S, et al.** The antitumor drug F14512 enhances cisplatin and ionizing radiation effects in head and neck squamous cell carcinoma lines. *Oral Oncol*, submitted.
- **Moulinoux JP, CIPOLLA B, SIMONNET G.** Polyamines and cancer: scientific basis and therapeutic potentialities. *La Revue de Gériatrie* 2010;35(6).

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Nabors LB, Mikkelsen T, Rosenfeld SS, Hochberg F, Akella NS, Fisher JD, et al.** Phase I and correlative biology study of cilengitide in patients with recurrent malignant glioma. *J Clin Oncol* 2007;25:1651-1657.
- **Nabors LB, Mikkelsen T, Hegi ME, Ye X, Batchelor T, Lesser G, et al.**; New Approaches to Brain Tumor Therapy (NABTT) Central Nervous System Consortium. A safety run-in and randomized phase 2 study of cilengitide combined with chemoradiation for newly diagnosed glioblastoma (NABTT 0306). *Cancer* 2012;118:5601-7.
- **Nisato RE, Tille JC, Jonczyk A, Goodman SL, Pepper MS.** Alpha v beta 3 and alpha v beta 5 integrin antagonists inhibit angiogenesis in vitro. *Angiogenesis* 2003;6:105-19.
- **Noack J, Kleessen B, Proll J, Dongowski G, Blaut M.** Dietary guar gum and pectin stimulate intestinal microbial polyamine synthesis in rats. *J Nutr* 1998;128:1385-1391.
- **Normand C, Michon J, Janoueix-Lerosey I, Delattre O, Schleiermacher G.** Genetic alterations in neuroblastoma and their usefulness for clinical management. *Bull Cancer* 2011;98:477-88.
- **Okamoto A, Sugi E, Koizumi Y, Yanagida F, Udaka S.** Polyamine content of ordinary foodstuffs and various fermented foods. *Biosci Biotechnol Biochem* 1997;61:1582-1584.
- **Oliveira-Ferrer L, Hauschild J, Fiedler W, Bokemeyer C, Nippgen J, Celik I, et al.** Cilengitide induces cellular detachment and apoptosis in endothelial and glioma cells mediated by inhibition of FAK/src/AKT pathway. *J Exp Clin Cancer Res* 2008;27:86.
- **Packer RJ, Boyett JM, Zimmerman RA, Albright AL, Kaplan AM, Rorke LB, et al.** Outcome of children with brain stem gliomas after treatment with 7800 cGy of hyperfractionated radiotherapy. A Childrens Cancer Group Phase I/II Trial. *Cancer* 1994;74:1827-34.
- **Pàez-Ribes M, Allen E, Hudock J, Takeda T, Okuyama H, Viñals F, et al.** Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell* 2009;15:220-31.
- **Park JR, Bagatell R, London WB, Maris JM, Cohn SL, Mattay KM, Hogarty M;** COG Neuroblastoma Committee. Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer* 2013;60:985-93.
- **Paugh BS, Qu C, Jones C, Liu Z, Adamowicz-Brice M, Zhang J, et al.** Integrated molecular genetic profiling of pediatric high-grade gliomas reveals key differences with the adult disease. *J Clin Oncol* 2010;28:3061-8.
- **Pegg AE, McCann PP.** Polyamine metabolism and function. *Am J Physiol* 1982;243:C212-221.
- **Pesnel S, Guminski Y, Pillon A, Lerondel S, Imbert T, Guilbaud N, et al.** <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-spermine for imaging polyamine transport system-positive tumours: preclinical evaluation. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2011;38:1832-41.
- **Plate KH, Breier G, Weich HA, Mennel HD, Risau W.** Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* 1992;359:845-848.
- **Pollack IF, Jakacki RI, Blaney SM, Hancock ML, Kieran MW, Phillips P, et al.** Phase I trial of imatinib in children with newly diagnosed brainstem and recurrent malignant gliomas : a Pediatric Brain Consortium report. *Neuro Oncol* 2007;9:145-60.
- **Pollack IF, Stewart CF, Kocak M, Poussaint TY, Broniscer A, Banerjee A, et al.** A phase II study of gefitinib and irradiation in children with newly diagnosed brainstem gliomas: a report from the Pediatric Brain Tumor Consortium. *Neuro Oncol* 2011;13:290-7.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Pope WB, Lai A, Nghiemphu P, Mischel P, Cloughesy TF.** MRI in patients with high-grade gliomas treated with bevacizumab and chemotherapy. *Neurology* 2006;66:1258-1260.
- **Porto L, Hattingen E, Pilatus U, Kieslich M, Yan B, Schwabe D, et al.** Proton magnetic resonance spectroscopy in childhood brainstem lesions. *Childs Nerv Syst* 2007;23:305-314.
- **Pouessel D, Culine S.** Angiogenesis targeting in renal carcinomas. *Bull Cancer* 2007;94:F223-6.
- **Qaddoumi I, Sultan I, Gajjar A.** Outcome and prognostic features in pediatric gliomas: a review of 6212 cases from the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Cancer* 2009;115:5761-70.
- **Ransom RW, Deschenes NL.** Polyamines regulate glycine interaction with the N-methyl-D-aspartate receptor. *Synapse* 1990;5:294-298.
- **Reardon DA, Fink KL, Mikkelsen T, Cloughesy TF, O'Neill A, Plotkin S, et al.** Randomized phase II study of cilengitide, an integrin-targeting arginine-glycine-aspartic acid peptide, in recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol* 2008;26:5610-5617.
- **Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL.** Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001;414:105-11.
- **Rich JN, Bao S.** Chemotherapy and cancer stem cells. *Cell Stem Cell* 2007;1:353-355.
- **Rineer J, Schreiber D, Choi K, Rotman M.** Characterization and outcomes of infratentorial malignant glioma: a population-based study using the Surveillance Epidemiology and End-Results database. *Radiother Oncol* 2010;95:321-6.
- **Robert J.** Biology of cancer metastasis. *Bull Cancer* 2013;100:333-42.
- **Ross RA, Biedler JL, Spengler BA.** A role for distinct cell types in determining malignancy in human neuroblastoma cell lines and tumors. *Cancer Lett* 2003;197:35-9.
- **Roujeau T, Machado G, Garnett MR, Miquel C, Puget S, Geoerger B, et al.** Stereotactic biopsy of diffuse pontine lesions in children. *J Neurosurg* 2007;107 (1 Suppl):1-4.
- **Sanders RP, Kocak M, Burger PC, Merchant TE, Gajjar A, Broniscer A.** High-grade astrocytoma in very young children. *Pediatr Blood Cancer* 2007;49:888-93.
- **Schleiermacher G, Delattre O, Peter M, Mosseri V, Delonlay P, Vielh P, et al.** Clinical relevance of loss heterozygosity of the short arm of chromosome 1 in neuroblastoma: a single-institution study. *Int J Cancer* 1996;69:73-8.
- **Schleiermacher G, Rubie H, Hartmann O, Bergeron C, Chastagner P, Mechinaud F, Michon J;** Neuroblastoma Study Group of the French Society of Paediatric Oncology. Treatment of stage 4s neuroblastoma--report of 10 years' experience of the French Society of Paediatric Oncology (SFOP). *Br J Cancer* 2003;89:470-6.
- **Schnell O, Krebs B, Carlsen J, Miederer I, Goetz C, Goldbrunner RH, et al.** Imaging of integrin alpha(v)beta(3) expression in patients with malignant glioma by [18F] Galacto-RGD positron emission tomography. *Neuro Oncol* 2009;11:861-70.
- **Schumacher M, Schulte-Mönting J, Stoeter P, Warmuth-Metz M, Solymosi L, et al.** Magnetic resonance imaging compared with biopsy in the diagnosis of brainstem diseases of childhood: a multicenter review. *J Neurosurg* 2007;106:111-119.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Schwab M, Alitalo K, Klempnauer KH, Varmus HE, Bishop JM, Gilbert F, et al.** Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature* 1983;305:245-8.
- **Seiler N, Delcros JG, Moulinoux JP.** Polyamine transport in mammalian cells. An update. *Int J Biochem Cell Biol* 1996;28:843-861.
- **Sirachainan N, Pakakasama S, Visudithbhan A, Chiamchanya S, Tuntiyatorn L, Dhanachai M, et al.** Concurrent radiotherapy with temozolomide followed by adjuvant temozolomide and cis-retinoic acid in children with diffuse intrinsic pontine glioma. *Neuro Oncol* 2008;10:577-82.
- **Soffietti R, Baumert BG, Bello L, von Deimling A, Duffau H, Frénay M, et al.;** European Federation of Neurological Societies. Guidelines on management of low-grade gliomas: report of an EFNS-EANO Task Force. *Eur J Neurol* 2010;17:1124-33.
- **Soulet D, Covassin L, Kaouass M, Charest-Gaudreault R, Audette M, Poulin R.** Role of endocytosis in the internalization of spermidine-C(2)-BODIPY, a highly fluorescent probe of polyamine transport. *Biochem J* 2002;367(Pt 2):347-357.
- **Soulet D, Rivest S.** Polyamines play a critical role in the control of the innate immune response in the mouse central nervous system. *J Cell Biol* 2003;162:257-268.
- **Soulet D, Gagnon B, Rivest S, Audette M, Poulin R.** A fluorescent probe of polyamine transport accumulates into intracellular acidic vesicles via a two-step mechanism. *J Biol Chem* 2004;279:49355-49366.
- **Spengler BA, Biedler JL, Ross RA.** A corrected karyotype for the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;138:177-8.
- **Spoto R, Ertel IJ, Jenkin RD, Boesel CP, Venes JL, Ortega JA, et al.** The effectiveness of chemotherapy for treatment of high grade astrocytoma in children: results of a randomized trial. A report from the Childrens Cancer Study Group. *J Neurooncol* 1989;7:165-77.
- **Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al.** Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;352:987-96.
- **Stupp R, Rugg C.** Integrin inhibitors reaching the clinic. *J Clin Oncol* 2007;25:1637-1638.
- **Stupp R, Hegi ME, Gorlia T, Erridge S, Grujcic D, Steinbach JP, et al.** Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma and methylated O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene promoter: Key results of the multicenter, randomized, open-label, controlled, phase III CENTRIC study. *ASCO annual meeting 2013. J Clin Oncol* 31, 2013 (suppl; abstr LBA2009)
- **Taga T, Suzuki A, Gonzalez-Gomez I, Gilles FH, Stins M, Shimada H, et al.**  $\alpha$ -Integrin antagonist EMD 121974 induces apoptosis in brain tumor cells growing on vitronectin and tenascin. *Int J Cancer* 2002;98:690-697.
- **Takada Y, Ye X, Simon S.** The integrins. *Genome Biol* 2007;8:215.
- **Thakur SB, Karimi S, Dunkel IJ, Koutcher JA, Huang W, et al.** Longitudinal MR spectroscopic imaging of pediatric diffuse pontine tumors to assess tumor aggression and progression. *Am J Neuroradiol* 2006;27:806-9.
- **Thirant C, Bessette B, Varlet P, Puget S, Cadusseau J, Tavares SDR, et al.** Clinical relevance of tumor cells with stem-like properties in pediatric brain tumors. *PLoS One* 2011;6(1):e16375.
- **Triche TJ.** Neuroblastoma - biology confronts nosology. *Arch Pathol Lab Med* 1986;110:994-6.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Thomas T, Thomas TJ.** Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:244-258.
- **Thomas T, Thomas TJ.** Polyamine metabolism and cancer. *J Cell Mol Med* 2003;7:113-126.
- **Uemura T, Stringer DE, Blohm-Mangone KA, Gerner EW.** Polyamine transport is mediated by both endocytic and solute carrier transport mechanisms in the gastrointestinal tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010;299:G517-522.
- **Van Roy N, Jauch A, Van Gele M, Laureys G, Versteeg R, De Paepe A, et al.** Comparative genomic hybridization analysis of human neuroblastomas: detection of distal 1p deletions and further molecular genetic characterization of neuroblastoma cell lines. *Cancer Genet Cytogenet* 1997;97:135-42.
- **Vassal G.** Will children with cancer benefit from the new European paediatric medicines regulation? *Eur J cancer* 2009;45:1535-1546.
- **Vassal G, Geoerger B, Morland B.** Is the European pediatric medicine regulation working for children and adolescents with cancer? *Clin Cancer Res* 2013;19:1315-1325.
- **Vlashi E, McBride WH, Pajonk F.** Radiation responses of cancer stem cells. *J Cell Biochem* 2009;108:339-342.
- **Vlashi E, Kim K, Lagadec C, Donna LD, McDonald JT, Eghbali M, et al.** In vivo imaging, tracking, and targeting of cancer stem cells. *J Natl Cancer Inst* 2009;101:350-9.
- **Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE, Dowell JM, Reardon DA, Quinn JA, et al.** Phase II trial of bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma. *Clin Cancer Res* 2007;13:1253-1259.
- **Vredenburgh JJ, Desjardins A, Reardon DA, Friedman HS.** Experience with irinotecan for the treatment of malignant glioma. *Neuro Oncol* 2009;11:80-91.
- **Wallace HM.** The physiological role of the polyamines. *Eur J Clin Invest* 2000;30:1-3.
- **Wallace HM, Fraser AV, Hughes A.** A perspective of polyamine metabolism. *Biochem J* 2003;376(Pt 1):1-14.
- **Wang M, Zhou C, Sun Q, Cai R, Li Y, Wang D, Gong L.** ALK amplification and protein expression predict inferior prognosis in neuroblastomas. *Exp Mol Pathol* 2013;95:124-30.
- **Wolff JE, Westphal S, Molenkamp G, Gnekow A, Warmuth-Metz M, Rating D, Kuehl J.** Treatment of paediatric pontine glioma with oral trophosphamide and etoposide. *Br J Cancer* 2002;87:945-9.
- **Wolff JE, Classen CF, Wagner S, Kortmann RD, Palla SL, Pietsch T, et al.** Subpopulations of malignant gliomas in pediatric patients: analysis of the HIT-GBM database. *J Neurooncol* 2008;87:155-64.
- **Wolff B, Ng A, Roth D, Parthey K, Warmuth-Metz M, Eyrich M, et al.** Pediatric high grade glioma of the spinal cord: results of the HIT-GBM database. *J Neurooncol* 2012;107:139-46.
- **Yalçın B, Kremer LC, Caron HN, van Dalen EC.** High-dose chemotherapy and autologous haematopoietic stem cell rescue for children with high-risk neuroblastoma. *Cochrane Database Syst Rev* 2013;8:CD006301.
- **Yamada S, Bu XY, Khankaldyvan V, Gonzales-Gomez I, McComb JG, Laug WE.** Effect of the angiogenesis inhibitor Cilengitide (EMD 121974) on glioblastoma growth in nude mice. *Neurosurgery* 2006;59:1304-1312.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Zorza G, Dumontet C, Tagoug I, Amsellem S, Roumier C, Jacob MC, et al.** Vectorization of F14512, a novel targeted cytotoxic agent, towards leukemic cells: Functional biomarker implementation during a multicentric phase I trial in acute myeloid leukemia (AML) patients. *EHA 17th Congress, Amsterdam 2012*:abstract 0078.

---

**ANNEXES**

---